

TGF- 家族信号的细胞内传导蛋白:SMAD 蛋白家族

刘一平 邓继先 综述 黄翠芬 审校

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘要 SMADs 是新近发现的参与 TGF- 超家族的信号在细胞内传导的一族蛋白,包括 8 个成员,分别称 SMAD1~8。SMAD1、2、3、5 和 8 属于一类,它们被 TGF- 的受体或 BMP 的受体激活而磷酸化,称为受体调节 SMAD,传导 TGF- 或 BMP 的信号。SMAD6 和 7 属于另一类,它们抑制受体调节 SMAD 的信号传导。SMAD4 是第三类,它是受体调节 SMAD 传导信号的伴侣。受体调节 SMAD 传导信号必须先与 SMAD4 结合形成异源复合物,才能进到核中,调节转录活动。

关键词 SMADs 信号传导 TGF-

转化生长因子 (TGF-) 超家族在胚胎发育、细胞分化、器官形成、免疫反应、生长控制等生理过程中起十分重要作用。TGF- 超家族的成员包括至少 25 种相关的蛋白。如 TGF- s、骨形态发生蛋白(BMPs)、活化素 (activin)、抑制素 (inhibin)、穆勒氏抑制物 (mullerian inhibiting substance)、nodal、dpp (decapentaplegic) 等。TGF- 超家族的成员通过与、两种类型的跨膜丝氨酸激酶受体相互作用而发挥作用。TGF- 相关分子先与型结合,然后结合型受体,在细胞表面形成一个异源复合物。此复合物中型受体上的丝氨酸和苏氨酸残基经型受体的激酶活性磷酸化而被激活。型受体激活后通过 SMADs 蛋白将信号从细胞浆转移到细胞核中⁽¹⁾。

1 SMAD 家族的发现及分类

在 TGF- 家族的信号传导研究中, Sekelsky 等⁽²⁾首先在黑腹果蝇中,对 dpp 的信号传导进行了研究。他们通过基因筛选鉴定 dpp 在信号传导时上下游的其它元件的作用,在两个筛选中发现并鉴定了 MAD (mother against dpp) 蛋白参与了 dpp 的信号传导。dpp 等位基因正常而 MAD 功能缺失时,会导致胚胎背腹成型的缺陷,以及成年附件的缺陷。在 MAD 同源突变的果蝇中出现中肠发生的缺陷、成虫盘发育的缺陷和胚胎背腹成型的缺陷。所有这些缺陷都与 dpp 突变的表型相一致。从而证实 MAD 参与了 dpp 的信号传导。Savage 等⁽³⁾在金银线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中鉴定到 MAD 的同源蛋白 Samr-2、Samr-3 和 Samr-4。在脊椎动物如蟾蜍、小鼠和人的细胞中也发现了同源的蛋白。Derynck

等人⁽⁴⁾建议将参与 TGF- 超家族蛋白的信号传导、不同动物和人的相关蛋白统一命名为 SMAD 信号蛋白家族(融合 Sam 和 mad 这两个词)。目前已发现 8 种 SMAD 蛋白在 TGF- 的信号传导中发挥不同的作用。

SMAD 蛋白家族成员可以分成 3 类:第一类包括 SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5 和 SMAD8。它们在 C 端含有 SSXS 结构。SSXS 结构被特异的丝氨酸激酶型受体磷酸化,即这些 SMADs 的活性不同丝氨酸激酶型受体的活性相关。因此也称为受体调节的 SMAD。SMAD2/SMAD3 能对下游的 ALK (activin-receptor like kinase)-4 和 ALK-5 起作用,介导生物素和 TGF- 的信号; SMAD1/SMAD5 对下游的 ALK-3 起作用,介导 BMP-2/4 的信号; SMAD8 对下游的 ALK-2 起作用。第二类是 SMAD4。SMAD4 与 SMAD 家族的其它成员在结构上明显不同, C 端不含 SSXS 结构。SMAD4 似乎并不特异地介导信号传导,但它能与 SMAD1、2、3、5 和 8 等协同激活各自的特异基因。因此也称为协同 SMAD。其确切作用尚不十分清楚。第三类是 SMAD6 和 SMAD7。它们与受体调节的 SMADs 不同,没有 SSXS 结构;与 SMAD4 也不同,因为它们直接与 TGF- 型受体结合,作为 TGF- 信号传导的拮抗物。因此也称拮抗 SMAD。

2 SMADs 家族蛋白的结构特征

所有的 SMADs 蛋白,都可以分成三个结构域: N 端区也称 MH1 (Mad Homology)、C 端区也称 MH2 区和中间连接区 (L 区)。N 端和 C 端都十分

保守。而中间连接区富含脯氨酸、长度不一、序列不同、高度可变。不过 SMAD4 的 MH2 区有一个独特的插入区。

SMADs 的 MH2 区在信号传导中起效应区的作用。因为当它融合到酵母 GAL4 DNA 结合区上,可以诱导转录反应。在没有 MH1 区时,SMAD1、SMAD2 和 SMAD3 的 MH2 区照样能诱导完整的 TGF- β 家族的信号反应,而且介导同源反应和与 SMAD4 的异源反应。而 SMAD4 的 MH2 区不能单独传递信号,必须要有一部分连接区参与⁽⁵⁾。

SMADs 的 MH1 区通过与 MH2 区作用而起到负调节的作用。它阻止受体调节的 SMADs 与 SMAD4 形成异源复合物。受体调节 SMADs 的 C 末端的 SSXS 结构域磷酸化可以消除这种抑制作用。另外 MH1 区与连接区还可能参与直接的 DNA 结合。

3 SMADs 蛋白的生物学意义

SMAD 家族蛋白的主要作用是介导 TGF- β 家族的信号。不同的 SMAD 介导不同的 TGF- β 家族成员的信号。SMAD1、5 和 8 主要介导 BMP 的信号。SMAD2 和 3 主要介导 TGF- β 和生物素的信号。

3.1 介导 BMPs 的信号

参与 BMPs 信号传导的主要是 SMAD1、5 和 8。Hoodless 等⁽⁶⁾对 SMAD1 在 BMP2 的信号传导中的作用进行了系统的研究。结果显示,SMAD1 以 BMP2 依赖的方式快速磷酸化,加入 BMP2 后 2 分钟,SMAD1 的 C 端丝氨酸残基就开始磷酸化,10 ~ 20 分钟达到高峰,并持续 2 小时。SMAD1 在 BMP2 刺激后,在核中的浓度显著升高。说明 SMAD1 是 BMP2 信号传导途径的下游组分,将 BMP2 的信号传递到核中。SMAD1 的磷酸化是特异的,它不被 TGF- β 、活化素或其它组成型活化受体调节,只受 BMP 受体的调节。

BMP 受体可以直接使 SMAD1 的 C 端 SSXS 结构上的丝氨酸残基磷酸化而激活 SMAD1。如果这些丝氨酸残基突变,就会阻止 SMAD1 的多种活性,包括与 SMAD4 的结合、在核中聚集和转录活性的获得⁽⁷⁾。作为 BMP 受体的直接生理底物,SMAD1 将受体丝氨酸/苏氨酸激酶和核连接起来。

SMAD1 还介导 BMP4 的信号传导⁽⁸⁾。用 FLAG-SMAD1 转染 COS 细胞,并用抗 FLAG 单抗对此细胞染色。结果显示在没有 BMP 时 SMAD1

存在于胞浆和核中,加入 BMP4 时,集中于核中。这种集中在加入 BMP4 30 ~ 60 分钟时达到最大。如此说明 SMAD1 是 BMP4 的下游组分并将 BMP4 的信号传到核中。

受 BMPs 的刺激,BMP 的 I、II 型受体发生磷酸化,受体激酶活化使相应的 SMADs 的 C 末端磷酸化,这些活化的 SMADs 与 SMAD4 形成异源复合物,转运到核中,调节转录。

SMAD5 与 SMAD1 高度同源⁽⁹⁾。SMAD5 通过两条途径磷酸化:一是 BMP1a 和 BMP1b 受体与 SMAD 5 直接物理结合,使 SMAD5 磷酸化,二是 BMP2 使 SMAD5 和 SMAD1 的丝氨酸磷酸化。磷酸化的 SMAD5 与 SMAD4 结合形成功能性异源寡聚体复合物,转移到核中,诱导间质细胞分化为成骨细胞,而不分化成肌细胞。SMAD5 与 SMAD4 的复合物的形成是 BMP 信号传导的关键。

Chen 等⁽¹⁰⁾从大鼠脑 cDNA 文库中克隆到了 SMAD8。SMAD8 与此家族中的其它成员一样,含有通用的结构。包括高度同源的 N 和 C 末端(MH1 和 MH2),高度可变的中间连接区。SMAD8 在其 C 末端含有与 SMAD1、2、3 和 5 一样的 SSXS 结构。因此,它具有其它 SMAD 相似的功能。:SMAD8 能与 SMAD4 协同诱导 Xbra (brachyury) 在动物核移植植物中表达。:SMAD8 被活化的 ALK-2 磷酸化,而不被 ALK-4 磷酸化。ALK-2 激活的 SMAD8 同样与 SMAD4 结合。因此 SMAD8 介导 BMP2 的信号。

3.2 介导 TGF- β 和活化素的信号

对 SMAD2 蛋白功能的研究表明,SMAD2 介导活化素的信号传导,加入活化素可以提高 SMAD2 在核中的浓度⁽¹¹⁾。SMAD2 和 SMAD4 以及 FAST-1(一种翼状螺旋转录因子)是活化素反应因子 (ARF)的成员,它们以活化素依赖的方式与 mix2 启动子的活化素反应元件直接反应。FAST-1 在 ARF 中是基本的 DNA 结合元件,FAST-1 的 C 端称为 SMAD 作用区 (SID),参与与 SMAD2 和 SMAD4 的结合,SID 的过表达会特异地抑制活化素的信号传导。SID 的 C 端对 FAST-1 与 SMAD2 的结合是必需。SMAD2 的磷酸化促进 SMAD2 与 FAST-1 的相互作用,而 SID 的 N 端对 SMAD4 与 SMAD2-FAST-1 复合物的相互作用是必要的,但 SMAD4 在没有 SMAD2 时不能直接与 FAST-1 结合⁽¹²⁾。活化素的信号是通过活化素的受体 (ActR) 磷酸化,传递到相关的 SMADs,再传到核中的。ActR 也有两种

类型, 和 型。

SMAD2 不仅受活化素受体激酶的活化, 而且受 TGF- 受体激酶的活化。TGF- 介导 SMAD2 的 C 端 Ser465 和 Ser467 磷酸化有严格的先后次序, 先是 Ser467 磷酸化, 然后 Ser465 才能磷酸化。如果这两个丝氨酸突变为丙氨酸, 就会抑制 TGF- 的信号传导。因为突变的 SMAD2 与 TGF- 受体牢固结合, 而不与 SMAD4 形成复合物, 如此而阻断 SMAD2 和 SMAD4 在核中聚集⁽¹³⁾。

SMAD3 与 SMAD2 的氨基酸序列高度同源, 因此它们介导类似的信号。活化素不仅使 SMAD2 磷酸化, 而且使 SMAD3 磷酸化。TGF- 同样引起 SMAD2 和 SMAD3 的磷酸化⁽¹⁴⁾。

3.3 诱导胚胎的发育

SMADs 在参与 TGF- 的信号传导过程中也同样参与胚胎的发育。SMAD2 在 TGF- 和活化素的激活下, 诱导蟾蜍胚胎的背脊中胚层的发育⁽¹⁵⁾。在小鼠胚胎发生过程中 SMAD2 的基因在所有的组织中表达, 并存在于成年小鼠的许多组织中。缺失 SMAD2 基因的胚胎在 8.5 天以前就会死亡。SMAD2 同源突变的胚胎在第 6.5 天比对照组小, 并没有卵柱的外胚层, 与 SMAD4 突变的第 6.5 天的胚胎十分相似。SMAD2 突变的胚胎不进行原肠形成, 也不形成中胚层。SMAD2 同源突变的胚胎不能形成有组织的卵柱, 并缺乏中胚层。20 % 的 SMAD2 同源突变的胚胎出现严重的原肠形成缺陷, 并没有下颌骨和眼睛。SMAD2 和 nodal 都突变的小鼠表现出原肠形成缺陷、独眼畸形和左右成型缺陷。这些结果说明在发育过程中 SMAD2 介导 nodal 的信号, 在小鼠的早期发育和许多成型过程如: 卵柱的伸长、原肠形成和中胚层的发育中起重要的作用⁽¹⁶⁾。

SMAD1 也参与胚胎的发育。Dick 等⁽¹⁷⁾比较了胚胎发育过程中 SMAD1 和 SMAD2 的 mRNA 的表达, 发现这两种蛋白的 mRNA 在许多组织中存在。大多数部位的表达与 TGF- 超家族成员的表达相关。说明 SMAD1 和 SMAD2 参与器官的形成, 特别是来源于间质-上皮相互作用的器官。第二个大量表达的部位是中枢神经系统。说明它们参与神经系统的发育。Ebendal 等⁽¹⁸⁾也证实 SMAD 不仅参与胚胎脑细胞的发育而且参与成年脑细胞受损的恢复。

SMAD5 在蟾蜍早期胚胎发育中也有作用⁽¹⁹⁾。SMAD5 与 SMAD4 协同作用于蟾蜍胚胎中的

BMP4 信号传导, 并指导腹中胚层和表皮的形成。

4 SMADs 信号传导的抑制

在 SMADs 家族传导信号过程中, 除了正向的作为信号传递元件的 SMADs 外, 还有一些起负调节作用的 SMADs。迄今已鉴定到两种这样的 SMADs, 分别称为 SMAD6 和 SMAD7。

SMAD6 是 Imamura 等⁽²⁰⁾从小鼠肺 cDNA 文库鉴定到的。SMAD6 的 C 端 1/3 与其它 SMAD 蛋白的 MH2 区有一个共同的保守区。但其 N 端表现出与 MH1 序列显著不同, 预示它有不同功能。

SMAD6 的主要作用表现在: SMAD6 能抑制活化的组成型 T R-I 诱导的 SMAD2 的磷酸化, 但 SMAD2 并不影响 SMAD6 的组成型磷酸化。SMAD3 与 SMAD2 在 N 端有 91 % 的同源性, 并且都介导 TGF- 的信号, 但 SMAD6 能加强受体诱导的 SMAD3 的磷酸化。说明 SMAD6 对这两种十分相近的分子有不同的作用。SMAD1 被组成型活性 BMPR-1a 和 BMPR-1b 磷酸化, SMAD6 能有效地抑制由 BMPR-1a 诱导的磷酸化 (减少 60 %), 但对 BMPR-1b 诱导的磷酸化无作用。这些结果说明 SMAD6 只对 SMAD 家族中的某些成员是一个抑制因子。

SMAD6 对 SMAD 蛋白异源体化的作用: 在有活化的组成型 T R-I 存在时, SMAD2 与 SMAD4 形成一个复合物, 而 SMAD6 能阻止此复合物的形成。然而 T R-I 诱导的 SMAD3 与 SMAD4 的相互作用不受 SMAD6 的影响, 这与 SMAD6 不能抑制 SMAD3 的磷酸化是一致的。SMAD2 与 SMAD3 之间的异源体化被 SMAD6 所抑制, 说明这两种蛋白的相互作用必须先磷酸化。这些结果说明 SMAD6 能特异性干扰 SMAD2 在 TGF- 信号传导中的激活。

SMAD7 与 SMAD6 在 MH1 和 MH2 分别有 36 % 和 56 % 的序列同源性。SMAD7 的 MH1 区与 SMAD1 至 SMAD5 的 MH1 区只有很弱的相似性。SMAD7 的抑制作用也发生在两个方面。首先是抑制 TGF- 家族受体的磷酸化。例如抑制 TGF- 1 诱导的荧光酶反应, 也抑制 TGF- 受体 T R-I 的组成型活性和生物素结构相关的 IB 受体 (ActR-IB) 诱导的 p3TP Lux 反应。因此说 SMAD7 是 T R-I 和 ActR-IB 诱导的 p3TP Lux 反应的一种负调节物。SMAD7 和 N 端标记 Flag 的 SMAD7 (F-SMAD7) 对 TGF- 的信号传导产生同样的抑制作用。说明 N

端标记并不影响 SMAD7 的功能⁽²¹⁾。另一方面它阻断依赖 TGF- β 介导 SMAD2/ SMAD4 复合物的形成,并抑制 SMAD2 在核中聚集⁽²²⁾。SMAD7 与活化的 TGF- β 型受体稳定结合,封闭 SMAD2 的结合磷酸化和活化。SMAD7 发生突变时,与受体的结合就受影响,并破坏这种抑制活性。

5 小结

在过去的 3 年中,对 TGF- β 信号在细胞内传导的了解,刺激了对 SMAD 家族信号传感器的研究。

通过对果蝇和线虫的基因筛选、脊椎动物 SMAD 的生物化学和细胞生物学的研究,证实 SMAD 是 TGF- β 家族诱导的转录反应的调节物。SMAD 不仅能介导 TGF- β 的信号,而且也抑制 TGF- β 的信号。这些抑制性 SMAD 本身也是由 TGF- β 的刺激所产生的。这就说明存在一种细胞内负反馈机制,调节 TGF- β 的信号。SMAD1、2、3、5、8 是典型的信号传导 SMAD。而 SMAD6 和 SMAD7 抑制 TGF- β 和 BMP 的信号传导。

SMADs 传导 TGF- β 超家族的信号总结于图 1。

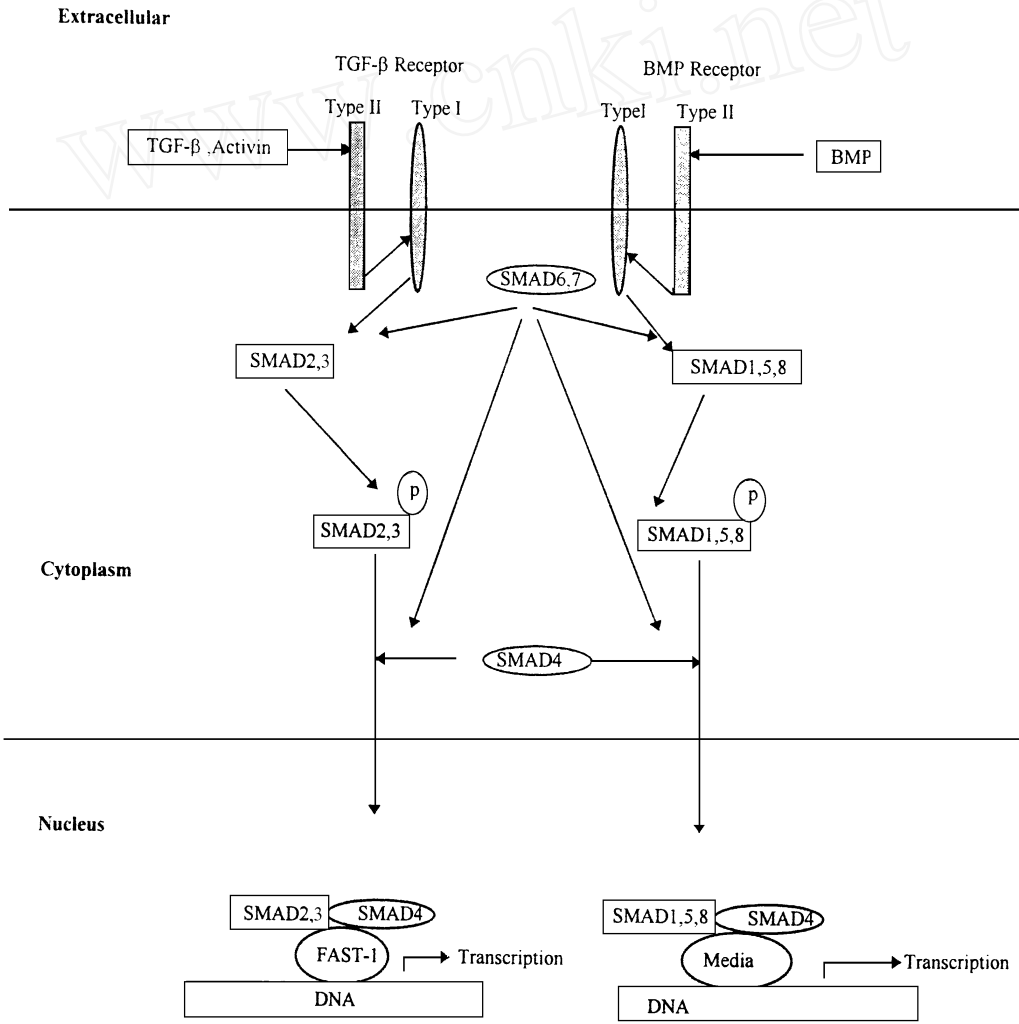


Fig1 : Scheme of SMADs signaling

SMADs 家族的信号传导是一个极其复杂的网络,对于它们的确切机制尚不十分清楚。受体调节的 SMADs 与 SMAD4 形成异源复合物后是怎样转运到核里面的,这些异源复合物在核中的靶基因是什么,它们怎样调节核中 DNA 的转录等这些问题都是有待进一步深入研究的课题。

参考文献

[1] Zhang Y, Feng XH, Yun R et al. Nature ,1996 ;383 :168 - 172.
[2] Sekelsky JJ, Newfeld S.J. ,et al. Genetics 1995 ,139 :1347 - 1358.
[3] Savage C, Das P, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ,93 :790 - 794.
[4] Derynck R, Gelbart WM ,et al. Cell 1996 ;87 :173.

- [5] Caestecker MP, Hemmings P, et al. J Biol Chem 1997;272: 13690 - 13696.
- [6] Hoodless P A, Harber T, Cell, 1996;85:489 - 500.
- [7] Kretschmar M, Liu F, Hata A et al. Genes Dev, 1997;11(8) : 984 - 995.
- [8] Liu F, Hata A, Baker JC et al. Nature 1996,381:620 - 623.
- [9] Nishimura R, Kato Y, Chen D et al. J Biol Chem, 1998;27(4) : 1872 - 1879.
- [10] Chen Y, Bhushan A and Vale W. Proc Natl Acad Sci USA, 1997;94:12938 - 12943.
- [11] Baker JC, Harland RM, Genes Dev, 1996;10(15) :1880-1889.
- [12] Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. Nature 1997,390:465 - 471.
- [13] Souchevnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U et al. J Biol Chem, 1997;272(44) :28107 - 28115.
- [14] Shimizu A, Kato M, Nakao A et al. Genes Cells. 1998;3(2) :125 - 134.
- [15] Weinstein M, Yang X, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998,95 (16) :9378 - 83.
- [16] Nomura M, Li E. Nature 1998,393(6687) :786 - 790.
- [17] Dick A, Risau W, Drexler H. Dev Dyn 1998,211(4) :293 - 305.
- [18] Ebendal T, Bengtsson H, Soderstrom S. J Neurosci Res 1998,51 (2) :139 - 146.
- [19] Suzuki A, Chang C, Yingling JM et al. Dev Biol, 1997;184(2) : 402 - 405.
- [20] Imamura T, Takase M, Nishihara A et al. Nature, 1997;389: 622 - 626.
- [21] Nakao A, Afrakhte M, Moren A et al. Nature, 1997;389:631 - 635.
- [22] Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y Cell, 1997;89(7) :1165 - 1173.

Intracellular Signaling Proteins of TGF β :SMAD Proteins Family

Liu Yiping Deng Jixian Huang Cuifen

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract A family of SMAD proteins composed of SMAD1 to SMAD8 was recently identified as intracellular signaling protein, conducting TGF β . The members of the SMAD proteins can be categorized into three subgroups. SMAD1, 2, 3, 5, and 8 which are called receptor-regulated SMADs belong to the subgroup contained the SSXS motif at the C-terminus which can be phosphorylated by the receptors of TGF β or BMPs, and mediate TGF β or BMPs signals. The second subgroup is SMAD4 which is indispensable for the receptor-regulated SMADs signaling. The receptor-regulated SMADs must form hetero-oligomeric complex with SMAD4 before mediating the signals. While SMAD6 and SMAD7 belong to the third class that differ from the receptor-regulated subgroup as they lack the SSXS motif. They inhibit TGF β superfamily mediating phosphorylation of receptor-regulated SMADs.

Key words SMADs; Intracellular signaling; TGF β

(上接第 17 页)

Applications of Genetic Engineered Fusion Proteins

Zhang Yi Qu Xianming Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Science, Shanghai, 200233)

Abstract Artificial multi-domain proteins could be conveniently constructed by gene fusion technology. With the development of recombinant DNA and protein engineering methodologies, this method has been widely used in many research areas and showed great potentials of commercial value. Recent advances and applications of the recombinant fusion proteins are reviewed and discussed in this article.

Key words Fusion protein, Genetic engineering