

## 原癌蛋白 c-Cbl 促进受体酪氨酸激酶 EphA2 的降解

王友洁<sup>1), 2)</sup>\*, 李忠佑<sup>2)</sup>, 吕斌<sup>1)</sup>, 邹立君<sup>1)</sup>, 周宜开<sup>1)</sup>, 昌村春彦<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup> 华中科技大学 同济医学院 环境医学研究所, 武汉市 430030; <sup>2)</sup> 日本 浜松医科大学 第一病理教研室, 日本 浜松市 431-3192)

**摘要** c-Cbl 最近被证明是泛素-蛋白酶体 (ubiquitin-proteasome) 通路中的一个新的 RING Finger 型泛素连接酶 (ubiquitin ligase, E3)。c-Cbl 可以介导受体酪氨酸激酶和非受体酪氨酸受体激酶的降解。利用内源性表达较高 EphA2 的大肠癌细胞株 HCT116, 通过转染野生型 c-Cbl 和显性负变异体 (dominant negative mutant) c-Cbl-70Z, 探讨 c-Cbl 在 EphA2 降解中的作用。结果显示, c-Cbl 可促进磷酸化 EphA2 的降解, EphA2 的降解必须依赖其配体 ephrin-A1 的刺激; 利用蛋白酶体 (proteasome) 抑制剂 MG132 可抑制磷酸化的 EphA2 降解, 提示 EphA2 的最终降解部位是在蛋白酶体。研究的结果提示, c-Cbl 作为泛素连接酶诱导磷酸化后的 EphA2 在蛋白酶体中降解。

**关键词** c-Cbl, EphA2, 蛋白酶体, 降解

**中图分类号** Q555+.7

### Proto-oncogene c-Cbl Promotes the Degradation of EphA2 Receptor Tyrosine Kinase

WANG You-jie<sup>1), 2)</sup>\*, LI Zhong-you<sup>2)</sup>, L ÜBin<sup>1)</sup>, ZOU Li-jun<sup>1)</sup>, ZHOU Yi-kai<sup>1)</sup>, Sugimura HARUHIKO<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup> Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China;

<sup>2)</sup> First Department of Pathology, School of Medicine, Hamamatsu University, Hamamatsu 431-3192, Japan)

**Abstract** The product of proto-oncogene c-Cbl has been proved as a new ubiquitin ligase (E3) of RING finger type for ubiquitin-proteasome pathway. Some studies reported that c-Cbl exerted the negative regulation to receptor tyrosine kinases and non-receptor tyrosine kinases by promoting their degradation. Eph receptor is the largest subfamily of receptor tyrosine kinase, but understanding of the activity regulation to this subfamily is quite poor. It has been demonstrated in our previous study that c-Cbl could negatively regulate the activity of EphA2 with an unknown mechanism. In this communication, it was shown that c-Cbl mediated degradation of EphA2 after it was activated by the ligand binding. It was also shown that EphA2 was rapidly degraded in response to the ligand stimulation, and this degradation could be blocked by MG132, an inhibitor of proteasome activity. Based on this result, it was proposed that c-Cbl might serve as E3 to mediate the ubiquitination of EphA2 and promoted its degradation in proteasome.

**Key words** c-Cbl, EphA2, proteasome, degradation

Eph 受体酪氨酸激酶是受体酪氨酸激酶家族中最大的亚族。到目前为止, 已发现 14 种 Eph 受体。Eph 受体的配体称为 ephrin, 现已发现有 8 种 ephrin。Ephrin 按照固定在细胞膜上方式的不同分为 2 类: ephrin-A 是通过糖基化磷脂酰肌糖 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 固定在细胞膜表面, 而 ephrin-B 则是穿膜 (transmembrane) 蛋白。根据 Eph 受体和其配体的结合特异性, 将 Eph 受体分为 A, B 两类, 受 ephrin-A 激活的 Eph 受体称为 EphA, 而受 ephrin-B 激活的 Eph 受体称为 EphB<sup>[1, 2]</sup>。与其它受体酪氨酸激酶不同, Eph 和 ephrin 可互为受体和配体。

当表达 Eph 受体的细胞和表达 ephrin 细胞互相接触时, 可同时激发表达 Eph 细胞和表达 ephrin 细胞的双向信号传递 (bi-directional signaling), 并导致这两种细胞相互排斥<sup>[3, 4]</sup>。目前 Eph 受体及其配体 ephrin

收稿日期: 2003-01-03, 接受日期: 2003-04-21

华中科技大学同济医学院科学研究基金资助

\*联系人: 王友洁, 女, 1967 年 9 月生, 医学博士, 讲师。Tel: 027-83691809, Fax: 027-83692701, E-mail: wangyoujie1@yahoo.com.cn

Received: January 3, 2003; Accepted: April 21, 2003

Supported by the Science Research Fund of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

\* Corresponding author Tel: 027-83640911, Fax: 027-85882569

E-mail: wangyoujie1@yahoo.com.cn

的功能研究主要集中在胚胎发育,特别是神经系统发生和发育,血管系统的发生和发育,以及在胚胎发育过程中各种脏器之间的边界(boundary)的形成等<sup>[5-8]</sup>. Eph 和 ephrin 在癌发生中所起的作用近几年来也倍受注目,一些 Eph 受体在许多肿瘤中有高表达和高活性,活化的 EphA2 单独即可引发正常细胞的转化(transformation)<sup>[9]</sup>.

受体酪氨酸激酶在接受外来刺激后活化并引发细胞内的信号传递,导致细胞转录水平的改变,从而控制细胞的生长、分化、转化等一系列生物学改变.但激活后的受体酪氨酸激酶在发挥其生理功效后,如何恢复到受刺激前的基础水平,以便接受新的外来刺激,一直是人们所关心的问题,因为酪氨酸激酶的持续活化状态是对细胞是有害的甚至是致癌的.泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway)是细胞选择性降解受体酪氨酸激酶的主要途径.被泛素化(ubiquitinated)的受体酪氨酸激酶通过内吞(endoctocytosis)进入细胞,在蛋白酶体内水解成多肽或氨基酸,终止由受体酪氨酸激酶激发的信号传递<sup>[10]</sup>.泛素化(ubiquitination)过程涉及到3种酶的系列反应,第1种酶称为E1,泛素激活酶(ubiquitin activating enzyme),作用是激活泛素分子;第2种酶是E2,泛素结合酶(ubiquitin conjugating enzyme),作用是将激活的泛素分子转移到E2上;第3种酶为E3,泛素连接酶(ubiquitin ligase),作用是识别特异性底物,并将泛素分子转移到底物上<sup>[11]</sup>.c-Cbl 最近被认为是RINGfinger类型的E3,它能诱导EGFR和PDGFR等受体酪氨酸激酶的泛素化,使这些酪氨酸激酶在蛋白酶体中降解,从而负性调节这些蛋白质的活性<sup>[12-15]</sup>.EphA2同属受体酪氨酸激酶,并且c-Cbl与EphA2在细胞内相互结合<sup>[16]</sup>.因此,c-Cbl可能是负调节EphA2活性的重要候选对象.并且在前一阶段的研究中,我们已经证实在293T细胞中共转染外源性c-Cbl和EphA2后,c-Cbl的表达抑制EphA2的表达量并同时降低它的活性.本研究是在原有的基础上,进一步探讨c-Cbl负调节EphA2活性的机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株,细胞培养条件和转染方法

用蛋白质印迹杂交(Western blotting)方法检测了不同的细胞株,发现直肠癌细胞株HCT116表达较高的内源性EphA2.HCT116细胞在含10%胎牛血清(GIBCO/BRL,USA)的McCoy's 5A培养基中培

养和传代.细胞转染利用脂质体转染试剂LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagent (Invitrogen Life Technologies,USA)转染,转染方法按照该公司提供的实验步骤进行.

### 1.2 质粒的构建

所使用的野生型c-Cbl及显性负变异体c-Cbl-70Z是由美国Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School的Hamid Band教授慷慨提供,这2种DNA在5'处带有HA标识并均已经亚克隆到可在哺乳细胞中表达的质粒pAlterMax (Promega, USA)中.

### 1.3 分泌型ephrin-A1-Fc的制备

通过RT-PCR和Western印迹,证实了在293T细胞中表达少量的ephrin-A1.然后通过RT-PCR,利用293T细胞的cDNA作为模板扩增了ephrin-A1的胞外部分(氨基酸序列1-182),引物设计为5'-CGG AAT TCA TGG AGT TCC TCT GGG CCC-3' (sense), 5'-CGG GAT CCG TGA CCG ATG CTA TGT AGA AC-3' (antisense),分别在5'端带有EcoR和BamH酶切位点.然后利用PCR将pcDNA-ephrin-B1-Fc(田中博士提供)作模板扩增了小鼠IgG2b的Fc部分,引物设计为5'-CGG CAT CCG AGC CCA GCG GGC CCA TTT CA-3' (sense), 5'-GCT CTA GAT CAT TTA CCC GGA GAC CGG G-3' (antisense),分别在5'端带有BamH和Xba酶切位点.将ephrin-A1胞外部分与小鼠的IgG2b的Fc部分2个DNA片段融合连接,克隆到哺乳细胞可表达的质粒pAlterMax (Promega, USA)中,并通过测序,保证融合DNA序列的准确.利用磷酸钙转染方法将pAlterMax-ephrinA1-Fc转染至293T细胞中,在转染8h后,换含10%胎牛血清(GIBCO/BRL,USA)的DMEM,在转染24h后,换10%含极低IgG胎牛血清(GIBCO/BRL,USA)的DMEM,在转染后48h后,收获细胞培养液.含有分泌型ephrin-A1-Fc的细胞培养液先用直径为0.22 μm过滤器(Millipore Corporation, USA)以去除培养液中的杂质,再加入蛋白A (protein A) (Pharmacia Biotech, Sweden),按照公司所给的实验步骤进行精制.洗脱后的ephrin-A1-Fc经过透析,浓缩,并用蛋白质浓度试剂盒Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad laboratories,USA)测定浓度,按1 μg/μl溶解在PBS中,-80℃保存备用.

### 1.4 细胞的刺激

据报道只有固定在细胞膜上的ephrin和经过聚集后的可溶性ephrin才能有效地激活Eph受体<sup>[17]</sup>.为了取得较好的刺激效果,我们利用抗小鼠Fc抗体

(MBL, Japan), 按抗体和 ephrin-A1-Fc 10:1 摩尔的比例, 在 ephrin-A1-Fc 中加入 anti-Fc 抗体, 在 4 时温育 2 h, 并按 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  终浓度加入 HCT116 细胞中. 为了保证细胞处在对数生长期, 一般是在 HCT116 细胞长到占培养皿底面积 80% 时进行刺激. 细胞在刺激前, 在含 0.5% 胎牛血清的 McCoy s 5A 培养基饥饿 6 h.

### 1.5 Western 印迹和免疫沉淀 (immunoprecipitation)

按照参考文献内方法所述步骤进行<sup>[16]</sup>. Western 印迹中所用的一抗 anti-EphA2 (Upstate Biotechnology, USA) 用于测定 EphA2 的表达, 抗磷酸化抗体 4G10 (Upstate Biotechnology, USA) 用于测定磷酸化的 EphA2, anti-HA (Y-11) (Santa Cruz, USA) 用于测定 c-Cbl 的表达.

### 1.6 蛋白酶体抑制剂 MG132

MG132 是一种广泛使用的蛋白酶体抑制<sup>[18]</sup>. 本实验所用的 MG132 (Calbiochem, Germany) 溶在二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 内源性表达 EphA2 的 HCT116 细胞在受刺激前 2h, 用 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  MG132 预处理, 对照组中加入二甲基亚砜, 为不造成对培养细胞的毒性, 实验组和对照组中的二甲基亚砜的最终浓度控制在 0.05% 以下.

### 1.7 NIHimage 软件

NIHimage 是美国卫生研究所 (NIH) 推荐使用的

图形分析处理软件, 可在互联网上免费下载. 本研究用于定量 Western 印迹结果.

## 2 结果

### 2.1 EphA2 受体在受到刺激后可引发快速降解

利用 EphA2 内源表达较高的肠癌细胞株 HCT116, 在 McCoy s 5A 培养基中培养至细胞占培养皿面积的 80%, 在用 ephrin-A1-Fc 刺激前, 细胞在含 0.5% 的胎牛血清的 DMEM 饥饿培养 6 h 后, 用 ephrin-A1-Fc 各刺激 0 min, 10 min, 30 min 和 60 min, 刺激完, 将细胞用冷 PBS(-) 冲洗 2 遍, 将细胞裂解后, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ , 14 000 r/min 条件下离心, 取上清, 用 Bio-Rad 试剂盒 (Bio-Rad laboratories, CA, USA) 测定含量, 在 SDS-PAGE 时加入同等量的蛋白, 每列 50  $\mu\text{g}$ . Fig. 1A 显示, 在细胞受到经过聚集的 ephrin-A1-Fc 刺激后, EphA2 迅速发生磷酸化, 从 Fig. 1A 可见, 在受到刺激后, 和未受刺激的 1 列比较, ephrin-A1-Fc 的加入可引起 EphA2 的磷酸化. Fig. 1A 的时间梯度实验显示 EphA2 和磷酸化的 EphA2 的含量随刺激时间延长而逐步减少, 在 60 min 时, 只能测到少量的 EphA2 和磷酸化的 EphA2. Fig. 1B 是利用 NIHimage 软件定量 Western 印迹结果中的 EphA2 和磷酸化 EphA2 带, 可比较清楚地看到 EphA2 在受到刺激后降解的趋势. 此结果表明, EphA2 的降解是依赖其配体的刺激和磷酸化的, 而且 EphA2 的降解速度很快.

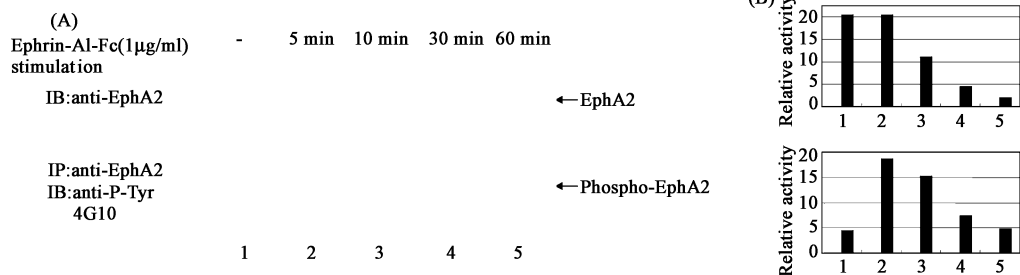


Fig. 1 The stimulation of ephrin-A1-Fc induced rapid degradation of EphA2

(A) HCT116 cells were cultured in McCoy s 5A -10% fetal bovine serum, and starved for 6 hours in McCoy s 5A -0.5% fetal bovine serum before stimulation with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ephrin-A1-Fc. Lysates from cells harvested at indicated 20 time after ephrin-A1-Fc was added. 50  $\mu\text{g}$  lysate per lane were separated by SDS-PAGE for the Western blotting examining of expression of EphA2 with anti-EphA2. The presence of phosphorylated EphA2, were detected by immunoprecipitation (IP) with anti-EphA2 and immunoblotting (IB) with anti-phosphotyrosine (4G10).

(B) The qualified result of the Western-blotting with software of NIHimage

### 2.2 c-Cbl 可加快磷酸化后的 EphA2 的降解

本实验利用内在表达 EphA2 较高细胞株 HCT116, 采用脂质体转染方法, 将野生型 c-Cbl 和显性负突变体 (dominant negative mutant) c-Cbl-70Z 变异

体导入细胞, c-Cbl-70Z 是在小鼠髓性白血病中发现的自然变异体, 该变异体在 c-Cbl 的 RING finger 结构域的 5 端丢失 17 个氨基酸, 使 c-Cbl 失去和 E2 结合的功能, 从而丧失 E3 的功能, 导致 c-Cbl-70Z 虽

然能和活化的酪氨酸激酶结合,却无法诱发其泛素化.在对照组中导入空白质粒 pAlterMax,在转染 48 h 后,将含有 10%胎牛血清的培养液换为只含 0.5%胎牛血清的培养液,饥饿 6 h 后,加入聚集后 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ephrin-A1-Fc 进行刺激,经过 30 min 后,将细胞从培养皿刮落,加入细胞裂解液,离心取上清,从 Fig. 2A 上列和 Fig. 2B 上列显示,在未受刺激前,转染 c-Cbl, c-Cbl-70Z 及空白对照组的 EphA2 含量没有明显差别.但在受 ephrin-A1-Fc 刺激后,转染野生型 c-Cbl 的细胞内的 EphA2 的含量与空白对照组比

较显著减少.但转染显性负突变型 c-Cbl-70Z 的细胞中的 EphA2 含量与空白对照相比却明显增加.可见显性负突变型 c-Cbl-70Z 能拮抗野生型 c-Cbl,阻止 EphA2 的降解. Fig. 2A 还显示,转染后细胞内的微管蛋白(内对照)含量无明显变化,表明 c-Cbl 及空白质粒的转染过程本身不影响细胞的蛋白表达.因此可以认为, c-Cbl 是通过促进活化后的 EphA2 的降解而负调节 EphA2 的活性的.由于有内源性的 c-Cbl 的存在,因此 c-Cbl-70Z 不能完全阻止 EphA2 的降解.

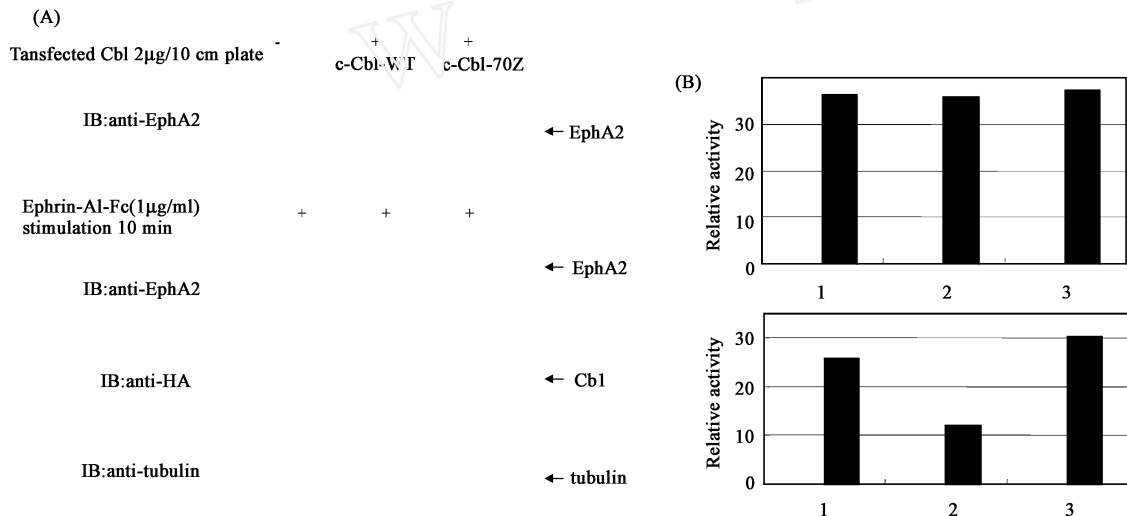


Fig. 2 Promotion of the degradation of EphA2 by c-Cbl

(A) HCT116 cells were transiently transfected with the indicated construct were cultured in McCoy's 5A-10% fetal bovine serum. 48 hours after transfection, cells were starved for 6 hours in McCoy's 5A-0.5% fetal bovine serum before stimulation with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ephrin-A1-Fc. Lysates were harvested 30 min. after ephrin-A1-Fc was added. Cell lysates (50  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) were separated with SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies to examine the expression of c-Cbl and EphA2.

(B) The quantified results of the first and second panel with software of NIHImage

### 2.3 EphA2 在蛋白酶体中降解

以上实验结果表明,在受到 EphA2 的配体刺激以后,可引发 EphA2 的快速降解.在这里,我们将探讨这种快速降解发生的部位.一般来说,蛋白质的降解途径有两条,一个是在溶酶体(lysosome)中被水解,另一条途径是在蛋白酶体(proteasome)中被降解.由于 c-Cbl 是泛素-蛋白酶体通路中的泛素连接酶,所以我们推测 EphA2 最有可能是是在蛋白酶体中被降解.为了证实这个假设,我们利用抑制剂蛋白酶体 MG132,在 HCT116 细胞刺激前 2 h,在实验组的细胞中加入最终浓度为 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  MG132,在对照组内加入溶解 MG132 的试剂 DMSO,并把浓度控制在 0.05% 以下使得该试剂不造成细胞毒性. 2 h 后,实验组和对照组分别用聚集后的分泌型 ephrin-A1-Fc

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  刺激不同的时间后,将细胞从培养皿上刮下,利用 Western 印迹测定 EphA2 的表达,从 Fig. 3A,B 可以看到,在实验组, MG132 可有效抑制 EphA2 的降解.从刺激 10 min 开始, Western 印迹的结果显示实验组的 EphA2 含量比对照组高.在刺激经过 60 min 后,实验组中 EphA2 的含量比对照组明显增高,可见 MG132 可以有效抑制 EphA2 的降解,此实验提示 ephrin-A1 刺激引发 EphA2 的快速降解很可能是在蛋白酶体中进行的.

### 3 讨论

本研究显示, EphA2 受体在受到配体的刺激后,可引起 EphA2 的降解,这种降解可以被蛋白酶体抑制剂 MG132 阻断.表明 EphA2 的降解是依赖其活性

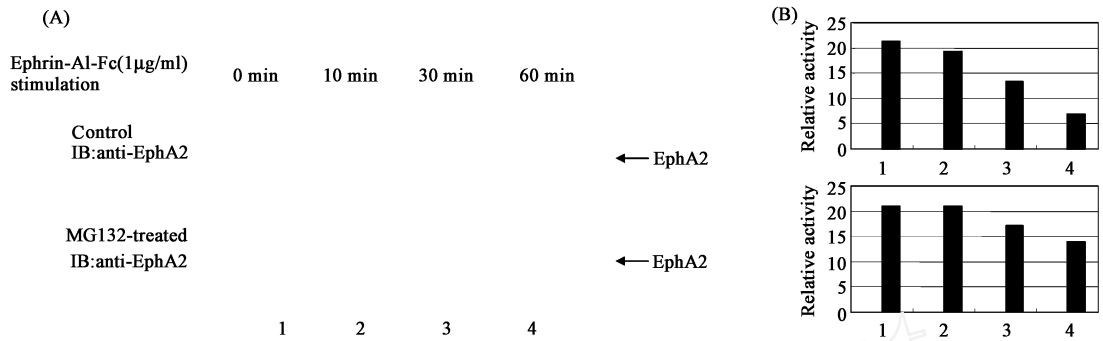


Fig. 3 MG132 prolongs the existence of active EphA2

(A). HCT116 cells endogenously expressing EphA2 were cultured in McCoy's 5A -10 % fetal bovine serum, and starved for 6 hours in McCoy's 5A -0.5 % fetal bovine serum, and pretreated with 50 μmol/L MG132 for 2 hours before the stimulation with 1 μg/ml ephrin-A1-Fc. The concentration of DMSO in both treated and control cells was kept under 0.05 %. Cell lysates (50 μg/lane) were separated with SDS-PAGE and the expression of EphA2 was detected by immunoblotting with anti-EphA2.

(B) The qualified result of the Western-blotting with software of NIHImage

的存在并且是通过泛素-蛋白酶体通路来实现降解的。受体酪氨酸激酶的活性常常是通过内吞噬 (endocytosis) 去除细胞膜上的受体数量来调控的, 一些受体比如胰岛素受体可重返细胞膜, 但另一些受体酪氨酸激酶如 EGFR 和 PDGFR 在受到相应的配体刺激后, 可引发受体的内吞噬从而使它们在细胞内被蛋白酶体降解<sup>[19,20]</sup>。本研究也发现, EphA2 受体在受到配体 ephrin-A1 刺激后, 可引发 EphA2 的快速降解, 这种快速降解的产生极有可能是通过受体的内吞噬并在细胞内被分解而引起的, 而非像胰岛素受体那样重新回到细胞膜表面。

本实验通过将 c-Cbl 转染到内源性 EphA2 表达较高的直肠癌细胞株 HCT116 中, 在受到 EphA2 的配体 ephrin-A1 的刺激后, 转染野生型 c-Cbl 的细胞和不转染 c-Cbl 细胞相比, EphA2 的降解速度明显加快。为进一步证实该结果, 我们将 c-Cbl 的显性负突变体 c-Cbl-70 转染细胞。结果表明, c-Cbl-70Z 可有效拮抗野生型 c-Cbl, 阻止 c-Cbl 加速降解 EphA2 的功能。由于 HCT116 细胞本身表达内源性的 c-Cbl, c-Cbl-70Z 不能完全阻止 EphA2 的降解。可以认为 c-Cbl 对 EphA2 的负调节是诱导 EphA2 的降解而实现的。EphA2 受体酪氨酸激酶不仅是在神经发育和血管发生中起重要作用, 许多研究表明, EphA2 在一些肿瘤的发生中起作用, 现已证实, 在前列腺癌, 黑色素瘤和乳腺癌等肿瘤中, EphA2 有较高的表达。并且 EphA2 的高表达及磷酸化, 可导致正常细胞的转化<sup>[23,24]</sup>。因此, 对 EphA2 受体的活性调控的研究, 有助于进一步了解上述肿瘤的发生和发展。但是, 到目前为止, Eph 受体酪氨酸激酶家族的活

性调节的机制还很不清楚, 特别是上游基因是如何调节它们的转录和翻译。总之, 本实验结果显示在受到配体的刺激后可引起活化的 EphA2 在蛋白酶体中降解, c-Cbl 可诱导 EphA2 的降解, 由于 c-Cbl 是 RING Finger 型的泛素连接酶, 我们推测 c-Cbl 是通过增强 EphA2 的泛素化而促使 EphA2 在蛋白酶体中的降解。

## 参考文献 (References)

- 1 Eph Nomenclature Committee. Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. *Cell*, 1997, **90**(3): 403 ~ 404
- 2 Jensen P L. Eph receptors and ephrins. *Stem Cells*, 2000, **18**(1): 63 ~ 64
- 3 Holland J, Gale N W, Mbamalu G, Yancopoulos G D, Henkemeyer M, Pawson T. Bidirectional signalling through the Eph family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature*, 1996, **383**(6602): 722 ~ 725
- 4 Bruckner K, Pasquale E B, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science*, 1997, **275**(5306): 1640 ~ 1643
- 5 Davy A, Gale N W, Murray E W, Klinghoffer R A, Soriano P, Feuerstein C, Robbins S M. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*, 1999, **13**(23): 3125 ~ 3135
- 6 Klein R. Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13**(2): 196 ~ 203
- 7 Holder N, Klein R. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development*, 1999, **126**(10): 2033 ~ 2044
- 8 Knoll B, Zerbatis K, Wurst W, Drescher U. A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development*, 2001, **128**(6): 895 ~ 906
- 9 Dodelet V C, Pasquale E B. Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene*, 2000, **19**(49): 5614 ~ 6519

- 10 Hicke L. Getting down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*, 1999, **9**(3):107~112
- 11 Weissman A M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(3):169~178.
- 12 Joazeiro C A, Wing S S, Huang H, Leverson J D, Hunter T Liu Y C. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, 1999, **286**(5438):309~312
- 13 Levkowitz G, Waterman H, Etenberg S A, Katz M, Tsygankov A Y, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell*, 1999, **4**(6):1029~1040
- 14 Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 1999, **274**(32):22151~22154
- 15 Feshchenko E A, Langdon W Y, Tsygankov A Y. Fyn, Yes, and Syk phosphorylation sites in c-Cbl map to the same tyrosine residues that become phosphorylated in activated T cells. *J Biol Chem*, 1998, **273**(14):8323~8331
- 16 Wang Y J, Ota S, Kataoka H, Kanamori M, Li Z Y, Band H, Tanaka M, Sugimura H. Negative regulation of EphA2 receptor by Cbl. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **296**(1):214~220
- 17 Davis S, Gale N W, Aldrich T H, Maisonpierre P C, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos G D. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*, 1994, **266**(5186):816~819
- 18 Lee D H Goldberg A L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 1998, **8**(10):397~403
- 19 Trowbridge I S, Collawn J F Hopkins C R. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol*, 1993, **9**:129~61
- 20 Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, **61**(2):203~212
- 21 Hess A R, Seftor E A, Gardner L M, Carles-Kinch K, Schneider G B, Seftor R E, Kinch M S, Hendrix M J. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res*, 2001, **61**(8):3250~3255
- 22 Zelinski D P, Zantek N D, Stewart J C, Irizarry A R, Kinch M S. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 2001, **1**(5):2301~2306
- 23 Ogawa K, Pasqualini R, Lindberg R A, Kain R, Freeman A L, Pasquale E B. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene*, 2000, **19**(52):6043~6052
- 24 Walker-Daniels J, Coffman K, Azimi M, Rhim J S, Bostwick D G, Snyder P, Kerns B J, Waters D J, Kinch M S. Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer. *Prostate*, 1999, **41**(4):275~280