

- priming and enhancing effects of mucin. *Biochem J*, 1999, **338** (pt3): 745~ 751
- 18 Kindo H, Pothoulaakis C, Thim L, *et al.* Trefoil peptides protect intestinal epithelia monolayer/barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology*, 1995, **109** (2): 516~ 523
- 19 Kanai M, Mullen C, Podolsky D K. Intestinal trefoil factor induces inactivation of extracellular signal regulated protein kinase in intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (1): 178~ 182
- 20 Taupin D, Wu D C, Jeon W K. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate early genes: EGF receptor and MAP kinase dependent interregulation. *J Clin Invest*, 1999, **103** (9): R31~ 38

Trefoil Factor Family. KOU Ru-Qin, WANG Wei, LI Ling-Yuan, RU Bing-Gen (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Science, Peking University, National Laboratory of Protein Engineering, Beijing 100871, China*).

Abstract Trefoil factor family (TFF) peptides have a special domain called trefoil domain. Trefoil domain contains highly conserved cysteine, arginine, glycine,

tryptophane, phenylalanine and a unique three-loop structure which is formed by intrachain disulfide bonds between six conserved cysteine residues in the 1 ~ 5, 2 ~ 4, 3 ~ 6 position. Three most important TFF peptides are TFF1/pS2, TFF2/SP (spasmolytic polypeptide) and TFF3/ITF (intestinal trefoil factor). The ectopically expressed sites of them are body and fundus of stomach, deep foveolar pits of gastric antrum and goblet cell of small and large intestine, respectively. TFF may play an important role in both maintaining the barrier function of mucosal surfaces and facilitating healing after injury. The structures of TFF peptides are very compact and contain α -helix, β -sheet. The mechanism of TFF is not clear and two hypotheses were proposed which were co-working with mucin or receptor.

Key words trefoil factor family, expression sites, structure, function, mechanism

Ras-GTP-Raf 复合物及其信号传导的分子机制*

李兆育¹⁾ 邹伟 崔肇春

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027)

摘要 Ras-GTP-Raf 复合物是 RTKs 介导的 Ras 通路的一个关键环节, 在 Ras-GTP-Raf 复合物中信号传递的分子机制是 Ras-GTP-Raf 复合物作为一个整体开关信号传导、启动信号放大级联反应及可能导致肿瘤发生。此外, PKC 介导的 Raf 的激活也必需有 Ras-GTP-Raf 复合物的存在。

关键词 信号传导, Ras-GTP-Raf 复合物, 肿瘤

学科分类号 Q73

在目前已知的所有细胞中具有一条高度保守的信号传导通路, 其中包括 RTKs、Ras、Raf、Mek、和 ERK, 也称之为 Ras 通路。它可使转录因子磷酸化而使之激活, 从而介导细胞的分化、增殖、存活及原癌基因的转化。

近年来由 Ras 和 Raf 介导的信号传导及它们之间的作用是研究的热点之一。但是以前的研究更多地注重蛋白质本身的独立作用, 把其单独看成是细胞生长和原癌基因转化的关键, 割裂了它们之间的关系, 甚至推断有的信号传导越过 Ras 而直接作用于 Raf^[1]。然而, 近几年的研究更侧重于以 Ras-GTP-Raf 复合物的形式把其放在信号通路中考

虑^[2,3]。Hallberg 等^[4]在研究 RTK 介导的信号传导通路时发现, 用抗 Ras 的单克隆抗体 Y13-238 免疫沉淀 Ras 的同时沉淀中还有 Raf, 而且 Raf 具有活性, 从而提出 Ras-Raf 复合物的概念。此前已证实 Ras 以 Ras-GTP 结合形式与 Raf 结合, 因此该复合物应该称之为 Ras-GTP-Raf 复合物。尤其最近的研究证实, 不仅在 RTKs 介导的通路中 Ras-GTP-Raf 复合物发挥重要作用, 而且 PKC 介导的

* 国家自然科学基金资助项目 (39670809)。

¹⁾ 大连大学医学院生物化学教研室, 大连 116622。

Tel: (0411) 7300666-2353, E-mail: zhylee1971@yahoo.com

收稿日期: 1999-07-19, 修回日期: 1999-12-02

Raf 的激活也必需有 Ras-GTP-Raf 复合物的存在^[3]。以下主要从分子结构的角度介绍信号在 Ras-GTP-Raf 复合物中的传递。

1 Ras 的结构与功能

Ras 属于只有一条多肽链的一种低分子质量 G 蛋白, 它有两种构象: 有活性的 GTP 结合构象和无活性的 GDP 结合构象。这两种构象在一定条件下可以互变, 构成 Ras 循环, 并受细胞质中 GTP/GDP 影响。

在 Ras 蛋白表面有两个区域, 分别称之为“开关 1”和“开关 2”。其中“开关 1”中的氨基酸残基形成一个环, 这个区域的作用是同效应物上的 Ras 结合域 (Ras binding domain, RBD) 结合并传导有丝分裂原信号; “开关 2”内具有 GTP 的 γ -磷酸基的结合位点。Ras 蛋白表面的“效应物结构域”与“开关 1”有重叠, 是效应物激活所必需的区域, 而且是 GTP 依赖性的; “激活物结构域”的构象不随 GTP/GDP 互换而改变, 稳定地接受 Ras 上游的信号。而氨基酸残基 5~22 和 109~120 形成的两个区域在所有的 G 蛋白中都具有保守性, 是 GTP/GDP 结合域。另外, Ras 蛋白 C 端在信号传导中的修饰包括 C 端 CAAX (C= Cys, A= 脂肪族氨基酸, X= 任何氨基酸) 四肽修饰和 Cys 的脂酰化, 对其膜锚定功能是必需的。

2 Raf 的结构与功能

主要以 α -Raf-1 为例, α -Raf-1 是一个分子质量为 74 ku 的细胞质 Ser/Thr 蛋白激酶, 它调节 MAPK 级联反应, 是 Ras 的主要靶蛋白。

α -Raf-1 的结构具有三个高度保守的区域 (conserved region, CR), 称为 CR1、CR2 和 CR3。CR1 和 CR2 位于 α -Raf-1 多肽链的 N 端侧, 是 α -Raf-1 的调节区域。CR1 具有一个复合结构, 含有一个 81 氨基酸 (51~131) 的 Ras 结合域, 它可以直接与 Ras “开关 1”中的效应物结构域相互作用, 其中的氨基酸残基 60 和 70, 105~106 周围残基构成的区域以及 118~120 残基是 RBD 与 Ras 结合的关键部位, 决定着是否传递有丝分裂原信号^[5]; 紧接着是一个 CX₂CX₉CX₂C (C= Cys, X= 任何氨基酸, 2 和 9 表示氨基酸的个数) 型锌指模体符 (motif)^[2], 也称之为半胱氨酸富含区 (cysteine-rich region, CRR), 它与 Ras 的激活结构域作用而参与 α -Raf-1 的激活, 是 Ras-Raf 有效结合所必需

的。CR2 是一个富含 Ser 和 Thr 的区域, 其中一部分是磷酸化的位点。CR3 位于 α -Raf-1 的 C 端的一半, 是催化区域, 具有激酶结构域和 Mek 的结合位点。 α -Raf-1 的 N 端的氨基酸段落 (1~257) 对信号传导具有抑制作用, 在未受刺激时, 抑制 α -Raf-1 的催化区域; 在受刺激后, 它成为 Ras 的作用靶, 导致 α -Raf-1 被催化而脱抑制或激活。

3 信号在 Ras-GTP-Raf 复合物中的传导

3.1 Ras 上游的信号传导

RTKs 介导的通路中, 在 Ras-GTP-Raf 复合物的上游, 也有一个三元复合物, 即 RTK/Grb2/Sos。信号经 RTK 传给 Grb2, Grb2 激活 Sos, Sos 作用于 Ras 的激活物结合域, 并催化 Ras-GDP 转化为 Ras-GTP。Ras 的 Tyr32、Thr35、Gly60 参与 GTP 的 γ -磷酸基的结合, Ras-GTP 的 γ -磷酸基的断裂可能减弱 Ras 与 Raf 的 RBD 的结合。

3.2 Ras-GTP 和 α -Raf-1 结合

Ras-GTP 通过 Ras 的效应物结构域与 α -Raf-1 的 RBD 结合。X 射线衍射分析证实, 这种结合由来自两个蛋白质的两条反向平行的 β 折叠的多肽链形成的 β 片层结构介导。尽管 RBD 是结合区, 但 RBD 周围区域在 Ras 与 Raf 的结合中也是必需的, 如 CRR 与 Ras 的激活物结构域结合。

最近 Terada 等^[2] (1999 年) 的研究表明, 当用 NMR 分析 Ras-GTP-Raf 复合物中 Ras 与 Raf 结合部位的结构时, 发现 Ras 与 Raf 结合的主要盐桥是 α -Raf-1 的 Lys84 与 Ras 的 Asp33 形成的紧密盐桥, 而不是以前报道的与 Ras 的 Glu31 形成的盐桥。

3.3 Ras-GTP 将 α -Raf-1 转位到质膜

Ras 是质膜胞浆面的内在膜蛋白, 而 α -Raf-1 是胞浆蛋白, 必须通过 Ras-GTP 与 α -Raf-1 的结合才能把 α -Raf-1 转位到质膜骨架蛋白上。Ras 来源的 CAAX 基本单元和 C 端的一段多聚 Lys 序列参与 α -Raf-1 的转位作用^[6]。

3.4 α -Raf-1 的激活

目前认为, α -Raf-1 的激活既需要 Ser/Thr 蛋白激酶磷酸化, 又需要 Tyr 蛋白激酶磷酸化。 α -Raf-1 转位到质膜上, 即被膜上的 Ser/Thr 蛋白激酶磷酸化而激活, 脂类可能是激活的辅助因子, 并且在激活过程中必须有 Ras-GTP 的参与。任何生理条件下 α -Raf-1 的激活一定伴随着过磷酸化作用, 如 Ser621 的磷酸化。而 Ser43、Ser259 的磷酸化是

c-Raf-1 激活所必需的^[1]。另外, Tyr340/341 在 c-Raf-1 的激活过程中被膜结合的 Tyr 激酶磷酸化, 主要是膜结合的 Src 家族蛋白, 如 p60 Src 等^[6]。目前认为磷酸化并不代表 Raf 激活的整个过程, 还可能与其他未知因子的参与。因而 Ras-GTP-Raf 复合物还存在着形成一个更大复合物的可能。c-Raf-1 被激活后具有 MAPKKK 活性, 而 c-Raf-1 的失活主要表现为从膜上回到细胞质中, 这可能与 c-Raf-1 的脱磷酸化有关^[1]。

3.5 级联反应 (Raf 的下游反应)

c-Raf-1 激活后, Mek 结合到 c-Raf-1 的 CR3, 并被 c-Raf-1 的激酶专一地磷酸化 Ser218、Ser222 (位于 Mek 的 VII 和 VIII 亚区之间)^[1], 使 Mek 激活, 接着依次作用于 ERK、转录因子等一系列级联反应, 导致结构基因的开关。

4 Ras-GTP-Raf 复合物的生物学意义

综上所述, Ras 只是一个开关分子, 而 Ras-GTP-Raf 复合物犹如给级联反应的源头 c-Raf-1 加上一个 GTP/GDP 依赖性的开关。从中不难看出 Ras-GTP-Raf 复合物作为一个整体所起的开启和关闭信号传导以及通过 c-Raf-1 激酶启动信号放大的级联反应的作用。除了在 RTKs 介导的信号传导通路中 Ras-GTP-Raf 复合物发挥重要作用外, 最近, Marais 等^[3]证实, 在 PKC 介导的信号传导通路中 c-Raf-1 的激活也需要 Ras-GTP-Raf 复合物的存在。这与以前的推测认为 PKC 直接激活 c-Raf-1 是不一致的^[1]。而且 PKC 通过一个完全不同于 RTK 的机制激活 Ras, 并形成 Ras-GTP-Raf 复合物, 其中 c-Raf-1 是有活性的。这同时也证明该复合物是多种细胞信号传导途径的一个枢纽点。随着它被作为复合物放到信号传导中去考虑, 更详尽的机制将会被阐明。通过对 Ras-GTP-Raf 复合物的研究, 进一步证实了 Ras 信号传导通路的整合性; 可以进一步推断, 凡是信号传导要经过 Ras 通路, 必然要经过 Ras-GTP-Raf 复合物, 而不是只作用于其中的某一成分。

5 Ras-GTP-Raf 复合物与肿瘤

在哺乳动物细胞中, Ras 信号传导通路中的某些成分与癌基因密切相关。实际上, Ras 最早就是作为动物致癌病毒中的转化基因被发现的。随后, 在约 30% 的人类肿瘤中发现有激活的 Ras 基因突变体存在。对 Ras 或 Raf 的部分取代、插入或删除

均能导致其处于持续的激活状态, 而这种持续的激活状态正是它们在肿瘤中的作用机制。在 Ras 突变型细胞中, Ras-GTP 处于一种持续结合的状态, 因此 Ras-GTP-Raf 复合物也可能处于持续结合的状态, 从而导致 Raf 处于持续激活的状态, 因而增殖信号处于持续传导状态, 最终导致细胞的迅速增殖, 以至于癌变。对 Ras-GTP-Raf 复合物在肿瘤中的作用推测如下: 若该复合物存在, 则增殖信号传导持续进行, 将导致肿瘤发生; 若该复合物解聚, 则信号传导终止。因此, 肿瘤细胞中突变的 Ras 和 Raf 对维持该复合物的稳定性的研究将是阐明该复合物在致癌作用中机制的基础。

参 考 文 献

- 1 Daum G, Eisenmanr-Tappe I, Fries H, *et al.* The ins and outs of Raf kinases. *TIBS*, 1994, **19** (11): 474~479
- 2 Terada T, Ito Y, Shirouzu M, *et al.* Nuclear magnetic resonance and molecular dynamics studies on the interactions of the Ras-binding domain of Raf-1 with wild-type and mutant Ras proteins. *J Mol Biol*, 1999, **286** (1): 219~232
- 3 Marais R, Light Y, Mason C, *et al.* Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science*, 1998, **280** (5360): 109~112
- 4 Hallberg B, Rayter S I, Downward J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem*, 1994, **269** (6): 3913~3916
- 5 Chen J M, Monaco R, Manolatos S, *et al.* Molecular dynamics on complexes of ras-p21 and its inhibitor protein, rap-1A, bound to the ras-binding domain of the raf-p74 protein: identification of effector domains in the raf protein. *J Protein Chem*, 1997, **16** (6): 619~629
- 6 Stoke D, Macdonald S G, Cadwallader K, *et al.* Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 1994, **264** (5164): 1463~1467

Ras-GTP-Raf Complexes and Its Molecular Mechanism in the Signal Transduction. LI Zhao-Yu, ZOU Wei, CUI Zhao-Chun (*Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116027, China*).

Abstract Ras-GTP-Raf complexes play an important role in the RTKs-mediated Ras pathway. The molecular mechanism of signal transduction in the Ras-GTP-Raf complexes is that the complexes switch signal transduction, trigger signal amplification cascade and may be involved in neoplasia. In addition, Ras-GTP-Raf complexes are essential in the PKC-mediated activation of Raf.

Key words signal transduction, Ras-GTP-Raf complexes, tumour