

特约综述

RKTG 基因功能研究

陈雁* 谢小多

(中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 营养与代谢重点实验室, 上海 200031)

摘要 RKTG (Raf kinase trapping to Golgi) 又名 PAQR3, 隶属于 PAQR 家族 (progesterone and adipoQ receptor family)。RKTG 是一个定位于高尔基体上具有 III 型拓扑结构的七次跨膜蛋白。已有研究表明它在高尔基体上结合细胞质内的 B-Raf、C-Raf 激酶并将其锚定到高尔基体上从而干扰 Raf 激酶与其上下游信号分子的结合, 导致 Ras/Raf/MEK/ERK 丝裂原信号途径的活化受到抑制。RKTG 基因敲除小鼠的各组织细胞内 Raf/MEK/ERK 通路上的激酶有异常激活现象, 基因敲除小鼠表皮角质细胞的增殖水平显著提高, RKTG 基因的缺失能促进 DMBA/TPA 诱导的皮肤癌的发生发展。总之, RKTG 能通过空间调控 Raf 的分布抑制 Ras/Raf/MEK/ERK 丝裂原信号通路, 从而抑制细胞在分裂原刺激时的细胞增殖和恶性转化, 具有协调和维持动物机体细胞正常增殖的生理功能。

关键词 丝裂原信号通路; RKTG; Raf 激酶; DMBA/TPA

RKTG (Raf kinase trapping to Golgi) 原名 PAQR3, 属于 PAQR 基因家族 (progesterone and adipoQ receptor family)。PAQR 基因家族是一组具有古老进化根源的膜蛋白, 在哺乳类动物中包括 11 个成员, 即 PAQR1~PAQR11。PAQR 基因家族成员具有类似于 G 蛋白耦联受体 (G protein coupled receptors, GPCRs) 的七次跨膜结构, 但与 GPCRs 并没有序列的同源性, 故起源于不同的进化分支^[1]。由于最初发现它们中有几个成员具有脂联素 (adiponectin/adipoQ) 或孕酮 (progesterone) 结合能力并介导了其相关的生物学效应, 故而被命名为孕酮及脂联素受体家族 (progesterone and adipoQ receptor family)^[2]。已有的研究表明, 这个基因家族成员的主要功能包括作为细胞质膜受体负责从细胞外向细胞内传递信号, 如脂联素受体 PAQR1、PAQR2 (AdipoR1、AdipoR2) 及孕激素膜受体 PAQR7、PAQR8、PAQR5 (mPR α 、mPR β 、mPR γ)^[3-5]; 或作为胞内细胞器膜受体 (endo-membrane receptors) 传递或调控胞内信号, 如 PAQR3^[6]。它们广泛参与了包括组织细胞能量代谢、细胞信号转导、细胞分裂增殖、细胞分化和生殖细胞的成熟等一系列生物学过程, 有关这个基因家族成员的生物学活性及生理功能研究正在蓬勃兴起。

RKTG 基因编码一个 37 kDa 左右的膜蛋白, 相比其他 PAQR 成员在进化上相对独立, 在 PAQR 家族中没有发现与其同源性特别高的亚科成员。RKTG

蛋白的氨基酸序列十分保守, 人、小鼠、爪蟾、鸟类、斑马鱼及线虫之间的序列同源性介于 65%~75% 之间。RKTG 基因在人和小鼠多种组织中有不同程度的表达, 其中皮肤、肝脏、肾脏及睾丸组织中表达水平较高。2007 年首次发现 RKTG 是一个 N 端朝向胞质、C 端朝向细胞器腔内、定位于高尔基体膜上的细胞器膜蛋白, 由于它能在高尔基体上结合胞内游离的 Raf 激酶故而被命名为高尔基体 Raf 激酶陷阱蛋白^[6]。RKTG 在高尔基体上对胞内 B-Raf 及 C-Raf 蛋白的结合能造成 Raf 激酶空间分布上的变化、干扰 Raf 激酶与其上游活化 G 蛋白 Ras-GTP 以及下游的底物 MEK 激酶的结合从而阻抑其活化信号的传递, 阻碍丝裂原信号 Ras/Raf/MEK/ERK 通路的活化, 从而影响细胞的扩增、细胞的恶性转化和癌症的发生发展^[7,8]。

Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路是经典的丝裂原活化蛋白激酶级联信号途径 (mitogen-activated protein kinases cascade, MAPKs cascade) 之一, 是细胞感受胞外信号、控制细胞增殖分化及存活主要的一条信号通路, 它负责将细胞外刺激信号转导至胞内, 可以调控组织细胞的增殖、分化、凋亡及细胞恶性转化、癌症的发生发展等生理过程^[9]。鉴于这条通路的重要性, 细胞内 Ras/Raf/MEK/ERK 丝裂原信号的调

* 通讯作者。Tel: 021-54920916, Fax: 021-54920291, E-mail: ychen3@sibs.ac.cn

控是近年来研究的热点,对于丝裂原途径各激酶的调控有的是通过细胞内外的各类刺激因子起作用,也有的是通过各种自身翻译后进行修饰或空间分布上进行的调控,其中有些支架蛋白的特殊定位分布能在空间上给予丝裂原信号途径中各个成员更为复杂而精密的调控^[10-14],在不同的亚细胞区域定位能导致 Ras/Raf/MEK/ERK 通路特异性的信号输出,产生更为广泛而精细的生物学效应^[15]。如 H-Ras 和 N-Ras 的合成后修饰导致其定位的变化;胞内支架蛋白动态地对丝裂原途径中的各激酶进行特异性区域化(compartmentalization),即将其锚定到各种细胞器或亚细胞结构中,这种亚细胞定位的信号穿梭(signaling trafficking)为 Ras/Raf/MEK/ERK 通路上的激酶发挥更为广泛和特异性生理功能提供了空间上的平台^[16-21]。

对 Raf 空间位置的调节可能会影响到 Raf 及其下游信号的活化, RKTG 就是一个通过结合 Raf 改变其亚细胞的分布和定位从而调控其介导的 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路及其生理功能的一个典型范例,本文将介绍有关 RKTG 基因的结构和功能方面的研究,如 RKTG 基因的拓扑结构、亚细胞定位、对 B-Raf 和 C-Raf 信号传递的调节及对 RKTG 动物模型的研究。

1 RKTG 的拓扑结构与亚细胞定位

RKTG 基因在整个真核生物中都有分布,它有着古老的进化历史,从进化树上看它较早就从 PAQR 基因家族分化出来,具有相对独立的分化方向,区别于属于溶血素3类蛋白(hemolysin III type protein, HLY3)分化支的 PAQR10 和 PAQR11、脂联素受体相关的 PAQR 基因成员 PAQR1 和 PAQR2 及孕酮激素膜受体类 PAQR 基因成员 PAQR4~PAQR9^[1]。

同其他 PAQR 基因一样,所有人或鼠源的 RKTG 基因都包含一个高度保守的 PFAM-UPF0073 结构域,根据序列的亲疏水性分析,这一结构域中被预测包含有一个七次跨膜的结构,但与 GPCR 典型的 I 型跨膜结构相比(即 N 端朝向胞外 C 端朝向胞内的质膜蛋白),PFAM 结构域具有更为复杂多样的拓扑结构。已经鉴定的膜蛋白孕激素膜受体及脂联素受体成员的结构显示它们的跨膜区序列与已知 GPCR 基因没有类似性。细胞组分分析及免疫荧光定位实验表明: RKTG 并不像 GPCR 或已知的 PAQR 家族膜受体成员一样定位于质膜,而是与高尔基体膜蛋白 Golgi97、GM130 等具有相同的分布,是一个高尔基体细胞器膜

蛋白。进一步的研究表明: RKTG 是一个具 III 型拓扑结构的七次跨膜蛋白,它的 N 端朝向胞浆一侧, C 端位于高尔基体腔内,朝向胞质侧的 N 端及 Loop 结构主要负责结合胞浆内的一系列信号分子(包括 B-Raf、C-Raf 激酶)从而影响胞内信号分子的信号传递和输出^[22]。

2 RKTG 的细胞生物学功能

已有的研究表明, PAQR 基因家族成员的生理功能各异,如脂联素受体(PAQR1, PAQR2)主要作为细胞质膜受体结合胞外的脂肪因子脂联素通过下游接头蛋白 APPL1 等介导下游 PPAR- α 、AMPK 及 p38 MAPK 信号途径,从而介导脂联素的生物学效应^[23,24]。而孕激素膜受体(PAQR5, PAQR7, PAQR8)则负责结合细胞外的孕激素将其信号转导至细胞膜内,通过特异性的信号转导通路在细胞内诱发快速的非基因作用,这种作用在卵母细胞的成熟及精子受精过程中具有重要意义^[1,5,25]。

RKTG 最初被发现具有阻抑丝裂原信号通路 Ras/Raf/MEK/ERK 信号激活的作用。一系列细胞功能实验表明 RKTG 过表达可以抑制表皮生长因子(EGF)或小牛血清(FBS)等丝裂原刺激的 ERK 信号活化及皮肤黑色素瘤细胞株 A375 的扩增;在 PC12 细胞系中过表达 RKTG 能抑制神经生长因子(nerve growth factor, NGF)诱导的细胞分化,而 NGF 对 PC12 分化的诱导特异性地依赖于 Ras/Raf/MEK/ERK 信号的持续激活^[26],从而从另一个角度证实了 RKTG 对持续的 ERK 激活具有抑制作用。为进一步探讨 RKTG 在 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路中的具体作用位置,利用 ERK 核内底物 Elk-1 的报告基因系统发现 RKTG 可以抑制由激活型 RasV12 和 Raf-BxB 所诱导的 Elk 激活,但未能抑制激活型 MEK-DD 诱导的 Elk 激活,这说明 RKTG 抑制 ERK 核内底物的活化是通过抑制 Raf 本身或者 Raf 和 MEK 之间的信号传递来实现的^[6]。

Raf 蛋白是普遍存在于脊椎动物细胞内的一组重要的蛋白激酶,包括 A-Raf、B-Raf、C-Raf,它们具有很高的同源性和非常保守的结构域,在各组织具有广谱的表达^[27,28],功能也非常广泛。其主要功能是负责将由活化的 Ras 蛋白传递过来的胞外信号从质膜向胞内传递给下一级级联信号分子。细胞在未受到外界因子刺激的状态下 Raf 蛋白主要分布在胞质中,当细胞受到特异性外界因子刺激时, Raf 被活化的 Ras-GTP 招募到质膜上,这一过程是 Raf 活化的一

个重要步骤。在质膜上被 Ras-GTP 结合的 Raf 蛋白经过磷酸化及构象改变, 进一步结合并激活下游的 MEK 激酶, 最终导致 ERK 信号通路的激活。对于 Raf 激酶的调控是这条信号通路调控的一个重要环节。细胞内 Raf 激酶某些位点受到的磷酸化及各种翻译后修饰导致的构象改变或与其他蛋白分子的结合都能导致其活性或功能受到影响。

为了证实 RKTG 对 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路的抑制是通过对 Raf 激酶的直接作用导致的, 用免疫荧光共定位及免疫共沉淀实验均检测到 RKTG 与 B-Raf、C-Raf 均能在高尔基体上相互作用^[6,7]。显然 RKTG 这种将 Raf 蛋白富集到高尔基体上的作用干扰了 Raf 在胞内及质膜上正常的位置分布, 这种作用能阻碍 Raf 蛋白在特异性细胞因子如 EGF 刺激状况下与其上游活化分子 Ras-GTP 及下游底物 MEK 分子的结合, 导致信号从 Ras 向 MEK 的传递受阻, 进而抑制了 ERK 信号通路的激活(图 1), RKTG 也因此被命名为 Raf 激酶高尔基体结合蛋白。在免疫荧光共定位和免疫共沉淀实验检测过程中发现 RKTG 与 Ras、MEK-1 并没有结合, 它只特异性地作用于 Raf 蛋白(B-Raf, C-Raf)。目前认为 RKTG 调节 Raf 蛋白功能的机制在于它能与 Ras 及 MEK 竞争性地结合 Raf 激酶, 从而能阻碍 Raf 蛋白活化所必须趋向质膜的位置变化过程, 已证实 RKTG 能通过抑制 Raf-1 Ser338 位的磷酸化来阻碍 EGF 诱导的 Ras-GTP 对 Raf-1 的招募上膜并使其活化的过程^[6,7]。在细胞内过表达 RKTG 蛋白时, Ras 蛋白在质膜上没有足量的 Raf 底物活化以传递其信号, 同时 Raf 激酶被 RKTG 结合到高尔基体

上似乎对其胞内的底物如 MEK 的活化产生了阻碍作用, 其中一种可能的机制就是高尔基体上 RKTG 能结合活化及未活化的 Raf 激酶, 导致没有足够的 Raf 激酶被活化也没有足够的活化 Raf 激酶激活胞内底物 MEK。由于 Raf 活化位点众多, 激活 MEK 所需的磷酸化位点目前还没有完全确定, 所以目前并不了解 RKTG 是否通过对某个或某些位点磷酸化修饰的 Raf 蛋白具有偏好性的结合来影响 Raf 与 MEK 的结合及其对 MEK 的活化。

PAQR 家族 PFAM-UPF0073 结构域序列保守, 但它们各组成员的功能却大相径庭, 造成这种差异的原因在于它们具有非保守性的 N 末端和 C 末端。RKTG 含有一个约 70 个残基朝向胞质相对较长的 N 端和一个约含 10 个残基朝向高尔基体腔内相对较短的 C 端。为了确定 RKTG 与 Raf 的作用区域, 通过构建突变体的方法发现 RKTG 蛋白 N 端前 20 个残基对结合 Raf 蛋白至关重要, 删除 N 端前 20 个残基的 RKTG 突变体虽然能定位于高尔基体但失去了结合 Raf 蛋白的功能, 同时也失去了对 ERK 信号通路的抑制作用; 同时发现 RKTG 蛋白 N 端序列对 RKTG 的高尔基体定位也是至关重要的, 删除 N 端前多于 40 个残基的 RKTG 突变体都不能定位于高尔基体。RKTG C 端位于高尔基体腔内, C 端删截体并不影响其定位和与 Raf 结合的功能。同样拥有 PFAM-UPF0073 七次跨膜结构域的其他 PAQR 成员如 PAQR1、PAQR2 并不能结合 Raf 蛋白也没有定位在高尔基体^[6,22]。这些证据说明 RKTG 朝向胞质的 N 端是其结合 Raf 及其高尔基体特异性定位的关键功能结构域。

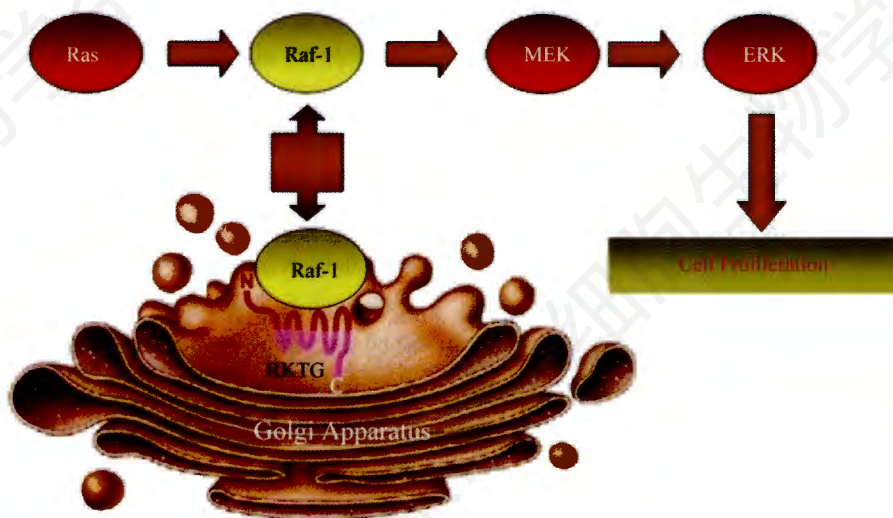


Fig.1 A model to illustrate the regulation of Ras to ERK signaling by RKTG

目前在细胞水平上对于 RKTG 的生理作用的研究主要集中在它对细胞扩增、细胞恶性转化的影响。鉴于 ERK 通路对细胞生长及转化的重要调控作用, RKTG 必然能通过抑制 ERK 通路来调节细胞的扩增和转化。在人类恶性黑色素瘤细胞系 A375 中过表达 RKTG 能显著抑制细胞的扩增和恶性转化程度, 在裸鼠皮下移植过表达 RKTG 的 A375 细胞能显著抑制其皮下成瘤作用, 与此相应的是 RKTG 过表达能显著降低 A375 细胞内因 B-RafV600E 激活突变导致的高 ERK 活性^[6,7]。

3 RKTG 基因敲除小鼠模型的研究

细胞水平的研究表明 RKTG 能通过干扰 Raf 激酶与其上下游信号分子的结合抑制 Ras/Raf/MEK/ERK 丝裂原信号途径的活化。尽管如此, RKTG 在丝裂原信号途径及其相关的细胞扩增、癌症发生等过程中的生理功能并未被完全了解。RKTG 基因敲除小鼠模型的建立和相关的皮肤癌诱导研究揭示了 RKTG 在机体内通过阻抑 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路活化所发挥的生理功能。

RKTG 基因缺失的小鼠表型正常, RKTG 基因敲除不影响小鼠的代谢和繁殖。但通过生化检测发现 RKTG 基因敲除小鼠的皮肤、脑、睾丸等组织中 ERK 信号活性明显上升, 从小鼠体内分离得到的胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblast, MEF)及皮肤角质细胞(keratinocyte)用血清(FBS)或佛波酯(TPA)刺激 Ras 的活化时, RKTG 基因的敲除能显著提高在质膜上 Raf1 蛋白 Ser338 位点的磷酸化, 同时 MEK/ERK 的活性都有所增强, 这些证据表明 RKTG 基因缺失提高了各组织细胞中 ERK 通路的活性。RKTG 基因缺失的 MEF 细胞在含 10% 小牛血清(FBS)培养条件下的扩增能力强于野生型对照; RKTG 基因敲除的原代角质细胞, 在 TPA 或 10%FBS 的刺激下的扩增速率较野生型对照, 当用 MEK 特异性抑制剂 PD98059 抑制 MEK 活性时, 刺激状况下 RKTG 敲除引起的细胞扩增速率的增加能被消除, 这些结果表明: 小鼠 MEF 细胞和原代角质细胞在体外受到 FBS 或 TPA 等丝裂原的刺激时 RKTG 基因的缺失都能显著增强 Raf/MEK/ERK 丝裂原信号通路的活化, 从而导致小鼠原代细胞体外扩增速率的增高^[6,8]。

鉴于 RKTG 缺失对 ERK 通路的这种激活效应以及在体内外所显示的对细胞扩增的促进作用, 进一步对 RKTG 基因敲除小鼠模型的癌症诱导实验表明

RKTG 的缺失能促进 DMBA/TPA 诱导的皮肤癌发生发展。Ras/Raf/MEK/ERK 丝裂原信号通路对各类皮肤癌的发生发展尤为重要, 紫外辐射或 DMBA 等致癌原引起 Ras 的突变激活或异常扩增可能是皮肤癌发生的一个早期或起始事件^[29], 在各类皮肤癌中经常发现原癌基因 Ras 的突变激活或扩增, 而 B-Raf 基因在黑色素瘤中突变率达 30%~70%, 是导致黑色素瘤的主要突变基因^[30,31]。DMBA 单独或与 TPA 联用可以诱导小鼠皮肤细胞 H-Ras 的突变激活及其它抑癌基因的突变失活从而导致皮肤肿瘤发生。皮肤表皮内的上皮角质细胞接触致癌原二甲基苯蒽(DMBA)后发生包括 Ras 的突变激活及 p53 等抑癌基因的失活等一系列突变, 而佛波酯(TPA)能刺激包括蛋白激酶 C (PKC)、Ras 等与细胞增殖相关酶的活化, 从而促进细胞过度分裂增殖导致角质细胞来源的皮肤癌症的发生(一般是乳头状肿瘤或者恶性程度较高的鳞状细胞癌)^[32]。这一皮肤癌模型常常用来研究特定基因在癌症发展过程所起的生理功能, 在 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路中的一系列调控基因对 DMBA/TPA 所诱导的皮肤癌的发生和恶化都具有重要的影响作用, 如 Ras 的效应分子包括 PLC ϵ 、RalGDS 的基因敲除都能抑制 DMBA/TPA 所诱导的小鼠皮肤癌发生频率和肿瘤恶性发展程度^[33,34], 而 EKR1、JNK2 基因的敲除同样可以抑制 DMBA/TPA 所诱导的皮肤癌发生发展^[35,36]。这种用来研究基因对癌症发展影响的方法周期比较短(约几个月到一年), 并且非常有效, 一旦基因能影响细胞增殖或恶性转化相关的信号, 特别是影响皮肤癌发生的主要信号途径如 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路的活化时, DMBA/TPA 所诱导的皮肤癌发生频率、潜伏期及恶性转化程度就会明显受到影响。RKTG mRNA 在皮肤中的丰富表达为建立皮肤癌模型提供了依据, 在动物皮肤癌诱导发生过程中纯合子小鼠出现乳头状肿瘤的时间早于野生型对照约 3 周, 表明 RKTG 基因敲除大大缩短了药物诱导皮肤肿瘤发生的潜伏期。实验统计结果显示, 80% 的基因敲除小鼠有乳头状肿瘤发生, 而在野生小鼠中只有 40% 肿瘤发生率, 杂合子中肿瘤发生率约为 75%, 这表明 RKTG 的单倍体不足(haplodeficiency)也能提高药物诱导皮肤肿瘤的发生率。同时小鼠纯合子肿瘤数目明显高于杂合及野生型小鼠, 其中大体积的肿瘤(直径大于 5 mm)数目在野生型小鼠中明显较纯合及杂合小鼠少, 这些结果表明 RKTG 基因的缺失不仅能促进药物诱导的肿瘤发生, 提高皮肤乳头状肿瘤的发

生率而且能促进肿瘤的生长。在进一步的肿瘤消退试验中发现,在停止药物处理后野生型的小鼠背部的皮肤乳头瘤消退得比纯和及杂合组的小鼠更快,这也表明 *RKTG* 的缺失有力地支持了皮肤乳头瘤的生长。对小鼠皮肤组织和肿瘤组织的病理学及免疫组织化学分析表明 *RKTG* 缺失小鼠中皮肤和肿瘤组织细胞扩增速率较野生型显著提高,肿瘤的细胞凋亡水平显著下降,但角质细胞的分化并未受到影响。显然 *RKTG* 缺失小鼠肿瘤的高发生率,高生长速度是因为皮肤表皮细胞过度增生失去抑制、凋亡机制受到损伤所导致的, *RKTG* 基因缺失导致了小鼠皮肤角质细胞有丝分裂原信号 *Ras/Raf/MEK/ERK* 通路的高水平激活,一旦某些细胞在药物刺激下被恶性转化也就提高了纯合子小鼠发生肿瘤的几率及其肿瘤的生长速度。

Ras/Raf/MEK/ERK 丝裂原信号通路是细胞感受胞外信号、控制细胞增殖分化及存活的一条主要信号途径,其能直接影响细胞的增生和恶性转化从而影响癌症发生和肿瘤的生长。我们已经了解到 *RKTG* 在细胞内通过对 *Raf* 激酶亚细胞定位的改变来阻碍这条信号通路活化,这些结果说明 *RKTG* 基因敲除可能导致了细胞具有较高水平的增殖分裂原信号,一旦在致癌原导致突变的情况下这种增强的分裂增殖信号可能会促进癌症的发生和发展。免疫组织化学方法也检测到 *RKTG* 基因敲除小鼠皮肤和肿瘤组织中 *Raf1/MEK/ERK* 的磷酸化激活水平均高于野生型对照,说明 *RKTG* 的确能通过结合 *Raf* 来抑制 *Ras/Raf/MEK/ERK* 丝裂原信号通路,从而抑制细胞在分裂原刺激或原癌基因激活时的过度增殖和恶性转化,具有保障动物机体细胞正常增殖的生理功能^[8]。

4 展望

综上所述, *RKTG* 作为一个高尔基体膜蛋白能通过结合 *B-Raf* 和 *C-Raf* 影响其与上下游信号的结合,阻抑 *Raf/MEK/ERK* 信号通路的激活,从而影响细胞的扩增、转化及机体肿瘤的发生发展。

目前对 *RKTG* 基因功能的研究还处于初步阶段,无论从分子水平上还是动物模型上对它生理功能的揭示可能只是冰山一角。在作用机理方面 *RKTG* 所调控的信号通路还需进一步的扩充研究,在动物皮肤肿瘤诱导模型中已经发现 *RKTG* 对凋亡信号的影响,那么 *RKTG* 具体是通过什么信号通路来影响细胞凋亡过程的呢? *RKTG* 在高尔基体上必定还存在更多

的结合蛋白,那么它是通过什么样的途径来调控这些结合蛋白所在的信号通路及其生理功能的呢?另外, *Raf* 激酶自身的磷酸化位点的修饰对其与 *RKTG* 的结合会有什么样的影响?被 *RKTG* 锚定在高尔基体上的 *Raf* 激酶是否具有特殊的生理功能?在动物或机体水平上 *RKTG* 对其他癌症及其他因素所导致的癌症又有什么样的影响呢?

最后,关于 *RKTG* 在人的肿瘤或其他疾病中的真正生理作用还未被完全了解。现有证据表明 *RKTG* 能抑制 *ERK* 信号通路的激活,抑制 *A375* 等肿瘤细胞系的过度扩增,这为我们在皮肤黑色素瘤治疗方略上提供了一个可能的作用靶点。同时, *RKTG* 基因缺失能促进从活体分离培养的皮肤角质细胞及 *MEF* 的扩增和转化,说明至少在体外转化实验中 *RKTG* 对体内组织细胞的恶性转化具有抑制作用,这也为我们在其他癌症治疗方面提供了一个可能的治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Thomas P, Pang Y, Dong J, *et al.* Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins, *Endocrinology*, 2007, 148(2): 705-718
- [2] Tang YT, Hu T, Arterburn M, *et al.* PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif, *J Mol Evol*, 2005, 61(3): 372-380
- [3] Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2237-2242
- [4] Zhu Y, Rice CD, Pang Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 100(5): 2231-2236
- [5] Thomas, P. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions, *Front Neuroendocrinol*, 2008, 29(2): 292-312
- [6] Feng L, Xie X, Ding Q, *et al.* Spatial regulation of *Raf* kinase signaling by *RKTG*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(36): 14348-14353
- [7] Fan F, Feng L, He J, *et al.* *RKTG* sequesters *B-Raf* to the Golgi apparatus and inhibits the proliferation and tumorigenicity of human malignant melanoma cells, *Carcinogenesis*, 2008, 29(6): 1157-1163
- [8] Xie X, Zhang Y, Jiang Y, *et al.* Suppressive function of *RKTG* on chemical carcinogen-induced skin carcinogenesis in mouse. *Carcinogenesis*, 2008, 29(8): 1632-1638
- [9] Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs, *Trends Biochem Sci*, 20(3): 117-122
- [10] Harding A, Tian T, Westbury E, *et al.* Subcellular localization determines MAP kinase signal output, *Curr Biol*, 2005, 15(9): 869-873
- [11] Mazet JL, Padieu M, Osman H, *et al.* Lipid posttranslational modification of *Ras* oncoproteins: evidence for dual prenylation pathways of *Ki-Ras* *in vivo* and inhibition studies. A new strategy for disrupting the proliferation of *Ras*-related tumorigenic cells,

- Chem Phys Lipids*, 2000, 105(2): 118-119
- [12] Choy E, Chiu VK, Silletti J, *et al.* Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi, *Cell*, 1999, 98(1): 69-80
 - [13] Ashley RL, Clay CM, Farmerie TA, *et al.* Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization, *Endocrinology*, 2006, 147(9): 4151-4159
 - [14] Rocks O, Peyker A, Bastiaens PI. Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors, *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(4): 351-357
 - [15] Chiu VK, Bivona T, Hach A, *et al.* Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi, *Nat Cell Biol*, 2002, 4(5): 343-350
 - [16] Rotblat B, Yizhar O, Haklai R, *et al.* Ras and its signals diffuse through the cell on randomly moving nanoparticles, *Cancer Res*, 2006, 66(4): 1974-1981.
 - [17] Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, *et al.* Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(5): 2449-2454
 - [18] Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, *et al.* MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade, *Science*, 1998, 281(5383): 1668-1671
 - [19] Wunderlich W, Fialka I, Teis D, *et al.* A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment, *J Cell Biol*, 2001, 152(4): 765-776
 - [20] Teis D, Wunderlich W, Huber LA. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction, *Dev Cell*, 2002, 3(6): 803-814
 - [21] Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, *et al.* Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling, *Dev Cell*, 2004, 7(1): 33-44
 - [22] Luo X, Feng L, Jiang X, *et al.* Characterization of the topology and functional domains of RKTG, *Biochem J*, 2008, 414(3): 399-406
 - [23] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature*, 2003, 423(6941): 762-769
 - [24] Yamauchi T, Nio Y, Maki T, *et al.* Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions, *Nat Med*, 2007, 13(3): 332-339
 - [25] Thomas P, Pang Y, Zhu Y, *et al.* Multiple rapid progestin actions and progestin membrane receptor subtypes in fish, *Steroids*, 2004, 69(8-9): 567-573
 - [26] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(7): 2424-2428
 - [27] Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues, *Oncogene*, 1990, 5(3): 345-351
 - [28] Luckett JC, Huser MB, Giagtzoglou N, *et al.* Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse, *Cell Growth Differ*, 2000, 11(3): 163-171
 - [29] Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, *et al.* Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis, *Nature*, 1986, 322(6074): 78-80
 - [30] van Kranen HJ, de Gruijl FR. Mutations in cancer genes of UV-induced skin tumors of hairless mice, *J Epidemiol*, 1999, 9(6 Suppl): S58-65
 - [31] Van der Lubbe JL, Rosdorff HJ, Bos JL, *et al.* Activation of N-ras induced by ultraviolet irradiation *in vitro*, *Oncogene Res*, 1988, 3(1): 9-20
 - [32] Kemp CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells, *Semin Cancer Biol*, 2005, 15(6): 460-473
 - [33] González-García A, Pritchard CA, Paterson HF, *et al.* RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis, *Cancer Cell*, 2005, 7(3): 219-226
 - [34] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, *et al.* Crucial role of phospholipase Cepsilon in chemical carcinogen-induced skin tumor development. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8808-8810
 - [35] Bourcier C, Jacquelin A, Hess J, *et al.* p44 mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1)-dependent signaling contributes to epithelial skin carcinogenesis, *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2700-2707
 - [36] Chen N, Nomura M, She QB, *et al.* Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH₂-terminal kinase-2-deficient mice, *Cancer Res*, 2001, 61(10): 3908-3912

The Studies of RKTG Function

Yan Chen*, Xiao-Duo Xie

(Key Laboratory of Nutrition and Metabolism, Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract RKTG (Raf kinase trapping to Golgi), also called PAQR3, belongs to the PAQR (progesterone and adipoQ receptor) superfamily. It is a type 3 membrane protein specifically localized at the Golgi apparatus with 7 trans-membrane domains. RKTG was recently characterized as a negative regulator of the Ras/Raf/MEK/ERK mitogenic pathway via sequestering B-Raf and/or C-Raf to the Golgi apparatus. In RKTG-deleted mice, the cell proliferation capability was enhanced in keratinocytes with elevated Raf/MEK/ERK kinase activities. Deficiency of RKTG could also promote skin carcinogenesis in the mouse. In summary, RKTG acts to suppress activation of Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway *in vitro* and *in vivo*, and negatively regulate cell proliferation upon mitogenic or oncogenic stimulation.

Key words MAPK signaling pathway; RKTG; Raf kinase; DMBA/TPA

*Corresponding author. Tel: 86-21-54920916, Fax: 86-21-54920291, E-mail: ychen3@sibs.ac.cn