

研究论文

金属离子对 GTP 结合蛋白 Cdc42Hs 的内源性 GTP 酶活性的影响

张晓东, 谭英才*

(中国科学院生物物理所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 不同的金属离子会对 GTP 结合蛋白 Cdc42Hs 的内源性 GTP 水解酶活性产生不同的影响。相对于生理条件下的辅基 Mg^{2+} 而言, Mn^{2+} 对 Cdc42Hs 酶活力有所激活, 表现在饱和浓度时, 实验曲线指数项的表现速率常数 k_{obs} 有 2 倍左右的提高, 而其稳态反应速度要低于 Mg^{2+} 。 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的实验曲线在本质上没有什么差别, 都是一个指数项和一个一次项的叠加, 说明 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 以相似的机制结合于 Cdc42Hs。在 Ca^{2+} 存在时, 实验曲线无明显的指数项出现, Ca^{2+} 的存在仅使稳态反应速度有所降低, 说明 Ca^{2+} 以不同于 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的机理与 Cdc42Hs 结合。随着 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 离子浓度的增大, 指数项的表现速率常数 k_{obs} 逐步升高, 稳态反应速度 v_s 逐渐降低。进一步的动力学模型分析得到了这一反应的微观动力学常数和 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 与蛋白的结合常数。

关键词: 金属离子; GTP 结合蛋白; Cdc42Hs; GTP 水解酶活性; 结合常数

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号: 1000-6737(2001)01-0035-11

Rho 家族 GTP 结合蛋白 Cdc42Hs 是 Ras 超家族中的一员, 是胞内信号传导途径的最基本组成成分之一, 主要负责传导与肌动蛋白胞质骨架重组和基因活化相关的信号^[1-3]。在这些过程中, Cdc42Hs 是联系胞外刺激和胞内信号传导通路的一个分子开关, 在 GDP 结合的非活性状态和 GTP 结合的活性状态间循环^[4]。处于 GTP 结合状态时, Cdc42Hs 可结合其效应物, 将信号向下游传递; 由于其内源性的 GTP 水解酶活性, 所结合的 GTP 可被水解成 GDP, 转变成非活性状态, 中止信号传递。这一水解过程可被其调控蛋白 GTP 酶激活蛋白 (GTPase-activating protein, GAP) 类所促进。而在生理条件下, 水解后的底物 GDP 与 Cdc42Hs 处于紧密结合状态, 所以从 GDP 结合的非活性状态到 GTP 结合的活性状态的转换则需要另外一类调控蛋白鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 的参与^[5,6]。

在整个 Ras GTP 结合蛋白超家族中, 在生理条件下二价金属离子是其 GTP 结合/GTP 水解循环中一个不可缺少的辅基, 体内是 Mg^{2+} 来充当这种角色^[7]。 Mg^{2+} 的存在可稳定鸟嘌呤核苷和蛋白质的结合。在 Ras 中, 如果没有 Mg^{2+} 的存在, Ras 对 GDP 或 GTP 的结合能力有大

收稿日期: 2000-07-07

作者简介: 张晓东, 1973 年生, 硕士, 现在美国; 谭英才, 1973 年生, 在读博士, 电话: (010) 6488498,

E-mail: tanyingcai@sina.com.

* 通讯联系人

于 500 倍的降低^[8]。与 Ras 超家族其它成员不同,在 Rho 家族中, Mg^{2+} 在本质上并不影响核苷酸的与蛋白质的亲和能力,而是通过降低核苷酸的解离速度起到稳定核苷酸-蛋白质复合物的作用。在 GEF 和 GAP 对 GTP 结合蛋白的调控中, Mg^{2+} 处于中心地位, RhoGEF 通过替换掉 Mg^{2+} 从而降低 GTP 结合蛋白所结合的核苷酸的稳定性来促进核苷酸的交换; RhoGAP 利用 Mg^{2+} 为辅基来获得高度的特异性和高催化效率^[9]。

对 Ras 的研究表明, Ca^{2+} 可以和 Mg^{2+} 一样,充当其辅基,表现出相同的催化活力,而 Mn^{2+} 则使其 GTP 水解活力有 3 倍左右的提高^[10]。通过 Ras 与 Mg^{2+} 结合的晶体结构的分析表明, Mn^{2+} 对其 GTP 水解酶活性的提高是通过提高结合于其上的 GTP 作为一个广义碱的碱性,从而使其更容易被质子亲电攻击来实现的。

除 Mg^{2+} 之外,其它的二价金属离子对 Rho 家族 GTP 结合蛋白的影响未见有文献报道。本文初步探讨了 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子对 Rho 家族 GTP 结合蛋白 Cdc42Hs 的内源性 GTP 水解酶活性的不同影响并通过进一步的动力学分析,试图对 GTP 结合蛋白的普遍的 GTP 水解机制有一个更详尽的了解。

1 材料和方法

1.1 试剂

GTP, 嘌呤核苷酸磷酸核糖转移酶 (purine nucleotide phosphorylase, PNPase, E.C.2.4.2.1), Thrombin 酶均购自于 Sigma 公司, 2-氨基-6-巯基-7-甲基嘌呤核糖核苷酸 (2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside, MESG) 按照文献方法合成^[11], Ni-NTA-Agarose 购自 Qiagen 公司。其它试剂均为国产分析纯级。实验用水均为二次去离子水。

1.2 Cdc42Hs 的表达提纯

人源的 Cdc42 基因通过 pET 表达系统 (Novagen) 在 E.coli 中以 $(His)_6$ 融合的形式表达, 用 Ni^{2+} -NTA-Agarose 金属螯合柱纯化。所得的蛋白质经考马斯亮兰染色 SDS-PAGE 分析纯度大于 95%。蛋白质浓度测定用 Bradford 方法^[12], 以 BSA 作为标准。

1.3 Metal ion-free Cdc42Hs 的制备

按照文献^[9]的方法略加修改, 以去除 Cdc42Hs 上所结合的 Mg^{2+} 。所提纯的蛋白质在 Buffer A (50mmol/L Hepes, pH7.6, 20mmol/L EDTA) 中于 25°C 保温 30min, 然后以 Centricon-10 (Amicon) 微量浓缩管于 6000 r/min 条件下离心超滤浓缩 1 小时, 使其体积缩小 10 倍左右, 再加入 Buffer A 稀释, 离心超滤。此过程重复三次, 以去除溶液中残存的 Mg^{2+} 离子。再将 Buffer A 换成 Buffer B (50mmol/L Hepes, pH7.6, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT), 重复稀释-离心超滤过程, 以除掉溶液中的 EDTA, 保证实验所用酶溶液中 EDTA 含量低于 $1\mu\text{mol/L}$ 。所得的无辅基酶加入 40% 甘油分装后冻存于 -20°C。

1.4 游离金属离子浓度的确定

在大量 GTP 存在的情况下, 必须要考虑 GTP 对金属离子的螯合作用, 所以采用下面的公式来确定体系中游离金属离子的浓度: $[M^{2+}]_{\text{total}} = [M^{2+}]_{\text{free}} \cdot \{1 + [GTP]_{\text{total}} / ([M^{2+}]_{\text{free}} + K_{GTP \cdot M^{2+}})\}$, 其中 $K_{GTP \cdot Mg^{2+}} = 60\mu\text{mol/L}$ ^[13], $K_{GTP \cdot Mn^{2+}} = 35\mu\text{mol/L}$ (Zhao J. unpublished data)。

1.5 活力测定

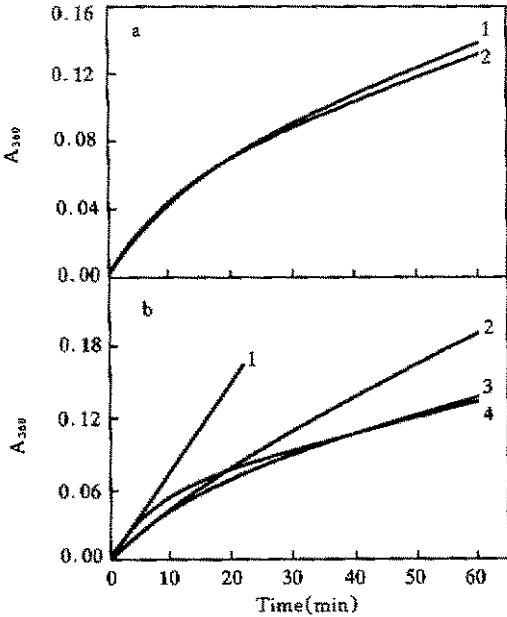


Fig.1 (a) Compare activity of native Cdc42 and EDTA - treated Cdc42 measured by absorbance at 360nm with the MESH assay system. The absorption of 5.7 μ M solution of Cdc42 in a buffer containing 20mmol/ L Hepes, pH7.6, 200 μ mol/ L GTP, 0.2mmol/ L MESH and 5mmol/ L MgCl with 5 unit of coupling phosphorylase was monitored during the time course. There were EDTA - treated Cdc42 and native Cdc42 from 1 - 2, respectively. (b) Time course of GTP hydrolysis of different metal ions measured by absorbance at 360nm with the MESH assay system. There were no metal ion, 5mmol/ L Ca²⁺, 5mmol/ L Mg²⁺ and 5mmol/ L Mn²⁺ from 1 - 4, respectively

含有 Mg²⁺ 其活性与天然酶没有明显差别,如 Fig.1 - a 中线 1 与线 2 所示。天然酶测活时,先在 1mmol/ L EDTA 存在下 Cdc42Hs 与 GTP 保温,用 EDTA 螯合掉酶分子本身所结合的 Mg²⁺,以促进 GTP 与 GDP 之间的交换,再加入过量的 Mg²⁺起始反应(原理见后)。EDTA 处理过的 Cdc42Hs 测活时,直接与 GTP 温浴后加入 Mg²⁺起始反应。

2.2 不同金属离子与 Cdc42Hs 的结合机理

在 GTP 大大过量的情况下, GTP 与 Cdc42Hs 之间的结合为快平衡,设金属离子和 Cdc42Hs 之间的结合也是快平衡,则可以写出如下模型:

其中 S、E、P 和 M 分别代表 GTP、Cdc42Hs、GDP 和金属离子,ES、EP、EM、EMS 和

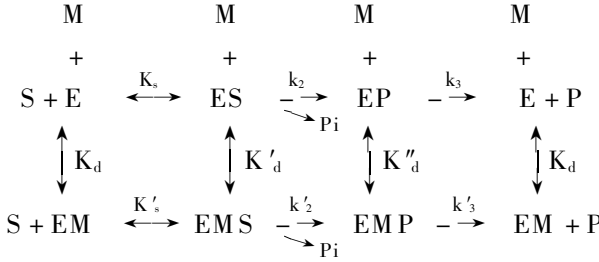
Cdc42Hs 的 GTP 水解酶活力测定按照文献^[14]所述的方法进行:用 MESH/PN-Pase 体系监测 Cdc42Hs 上所结合的 GTP 的 $\gamma - Pi$ 的释放情况。反应体系为 50mmol/ L Hepes 缓冲液, pH7.6, 含 0.2mmol/ L MESH, 5 个单位的嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNase), 200 μ mol/ L GTP, 5 μ mol/ L Cdc42, 总体积为 500 μ L。25 $^{\circ}$ C 保温 5min 后, 定量的各种金属离子加入反应体系启动 Single - turnover GTP 水解反应。用 Shimadzu UV - 2501 分光光度计监测由于无机磷 - 磷酸化酶偶联反应所导致的 360nm 处吸光度变化情况。以不含有 Cdc42Hs 的反应体系为空白对照, 从各自独立的实验中减去相应的背景吸收。

反应体系中无机磷的浓度与 360nm 的吸光度变化成正比。在 pH7.6 时消光系数 $\epsilon_{360nm} = 11,000\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^[15]。相对于 GTP 酶水解速率而言磷酸化酶偶联反应的速率是非常快的,速率常数是 40s⁻¹^[11]。因而吸光度随时间变化的曲线的斜率与 Cdc42Hs 的 GTP 水解酶活力成比例: Cdc42Hs - GTP 水解速率 = $1/\epsilon \times \Delta A\text{cm}^{-1}\text{min}^{-1}$ ^[14]。

2 结果

2.1 EDTA 处理过的 Cdc42Hs 与天然 Cdc42Hs 的活性比较

为保证实验不受酶分子本身所结合的 Mg²⁺ 的影响,按照文献方法^[9]用 EDTA 温浴除去酶分子本身所结合的 Mg²⁺,再稀释 - 超滤除去 EDTA。这样处理过的酶不再



EMP 分别代表它们之间的复合物。

运用快平衡假设,当 $[S] \gg K_s$ 时,最终可导出产物方程:

$$[Pi] = v_s t + \frac{v_0 - v_s}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs} t}) \tag{1}$$

其中:

$$v_s = \frac{AB[E]_0}{A+B}$$

$$v_0 = A[E]_0$$

$$k_{obs} = A+B$$

$$A = \frac{k_2 + k_2' \frac{[M]}{K_d'}}{1 + \frac{[M]}{K_d'}}, \quad B = \frac{k_3 + k_3' \frac{[M]}{K_d''}}{1 + \frac{[M]}{K_d''}}$$

由 k_{obs} 和 v_s 可以求出在不同的金属离子浓度下的 A 和 B 值,以 A、B 分别对 $[M]$ 作图,可以拟合出 K'_d 以及 K_d'' , k_2, k_3, k_2', k_3' 。

当没有 Mg^{2+} 存在的时候, (1) 式可以简化成:

$$[Pi] = \frac{k_2 k_3 [E]_0}{k_2 + k_3} + \frac{k_2^2 [E]_0}{(k_2 + k_3)^2} (1 - e^{-(k_2 + k_3)t})$$

由 Fig. 1-b 线 1 可知,此时 Pi 释放为一条直线,说明指数项在测活能监测的时间范围内已经消失。此时结合于 Cdc42Hs 上的核苷酸可以快速的交换。由于 GTP 大大过量, Cdc42Hs 催化反应快速达到稳态,并以固定的速度释放无机磷。此时, GDP 从 Cdc42Hs 解离不是限速步骤,习惯称此时所进行的反应为 multiple-turnover 反应。

当有饱和 Mg^{2+} 存在时, (1) 式可以简化成:

$$[Pi] = \frac{k_2' k_3' [E]_0}{k_2' + k_3'} + \frac{k_2'^2 [E]_0}{(k_2' + k_3')^2} (1 - e^{-(k_2' + k_3')t})$$

由于金属离子的加入会阻止 GDP 从 Cdc42Hs 上解离,抑制 GTP 与 GDP 之间的交换。理论上如果核苷酸之间的交换全部被抑制,即 $k_3 = 0$ 时,产物释放可简化为:

$$[Pi] = [E]_0 (1 - e^{-k_2 t})$$

所得测活线为单指数曲线,习惯上称这种情况下的反应为 single-turnover 反应。

实际上,即使是饱和的 Mg^{2+} 存在时,核苷酸间仍有一定程度的自由交换,所以所得的实验曲线为指数项与线性项之和。如 Fig. 1-b 中线 3 所示。

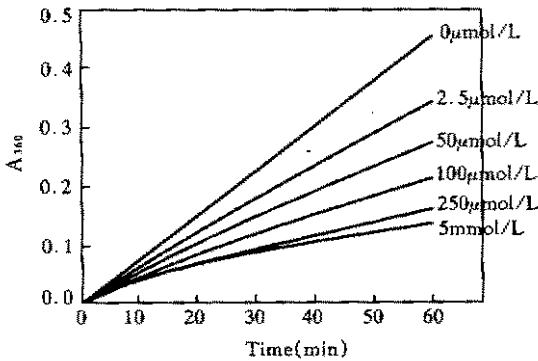


Fig.2 Continuous spectroscopic assay of γ Pi release from the Cdc42-GTP complex measured by absorbance at 360nm with the MESG assay system. The absorption of 5.7 μ mol/L solution of Cdc42 in a buffer containing 20mmol/L HEPES, pH7.6, 200 μ mol GTP, and 0.2mmol/L MESG with 5 unit of coupling phosphorylase was monitored during the time course. Reactions were initiated by the addition of $MgCl_2$. Final concentration of $MgCl_2$ was 5mmol/L, 250 μ mol/L, 100 μ mol/L, 50 μ mol/L, 2.5 μ mol/L, 0 μ mol/L from bottom to top, respectively

2.3 不同金属离子对 Cdc42Hs GTP 水解酶活力的不同影响。

Fig.1-b 显示饱和浓度时不同金属离子对 Cdc42Hs GTP 水解酶活力的不同影响。线 2、3、4 分别表示 5mmol/L Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 存在时的情况。相对于生理条件下的辅基 Mg^{2+} 而言, Mn^{2+} 对 Cdc42Hs 的水解活力有一定程度的激活, k_{obs} 约为 Mg^{2+} 的两倍 (Mg^{2+} 的 $k_{obs} = 7.67 \pm 0.03 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$, Mn^{2+} 的 $k_{obs} = 14.2 \pm 0.1 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$)。

Mn^{2+} 存在时的实验曲线与 Mg^{2+} 的实验曲线相似, 都是指数项与线性项的叠加, 说明 Mn^{2+} 以与 Mg^{2+} 类似的结合方式结合于 Cdc42Hs。而在 5mmol/L Ca^{2+} 存在时, 实验曲线上几乎观测不到指数项, 相对于无离子的情况而言, 加入 Ca^{2+} 只是使稳态速度 v_s 有 3 倍左右的降低, 如 Fig.1-b 中线 2 所示。 v_s 在 5mmol/L Ca^{2+} 时是 $2.57 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$, 在无离子存在时 $v_s = 7.50 \pm 0.05 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$

¹, 这说明 Ca^{2+} 可能以不同于 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的机制与 Cdc42Hs 结合。

2.4 金属离子浓度对 Cdc42Hs 水解活力的影响。

Fig.2 显示了改变 Mg^{2+} 离子浓度时, Cdc42Hs 活力变化的情况。随着 Mg^{2+} 离子浓度的增高, 稳态速度逐步下降, k_{obs} 逐步升高。Fig.3-a 表示了 k_{obs} 随 Mg^{2+} 离子浓度的变化情况, 随着 Mg^{2+} 离子浓度的增高, 指数项的 k_{obs} 逐步增大, 在 1000 μ mol/L Mg^{2+} 左右达到饱和。Fig.3-b 表示了稳态速度随 Mg^{2+} 离子浓度的变化情况。随着 Mg^{2+} 离子浓度的增大, Cdc42Hs 与核苷酸的结合能力改变, 因而核苷酸间的交换, 即 GTP 替换 GDP 结合到 Cdc42Hs 的速度逐步降低, 稳态速度下降。Fig.3-c 和 3-d 分别是 A 和 B 与 Mg^{2+} 离子浓度的关系。

Fig.4 显示了随着 Mn^{2+} 离子浓度的变化, Cdc42Hs 活力变化情况: 与 Mg^{2+} 类似, 随着 Mn^{2+} 离子浓度的升高, k_{obs} 逐步升高, 而稳态速度逐步下降。Fig.5-a 和 5-b 分别表示了 k_{obs} 和稳态速度随 Mn^{2+} 离子浓度的变化情况。 Mn^{2+} 对 k_{obs} 的激活幅度要大于 Mg^{2+} , Mn^{2+} 的存在可以使 k_{obs} 提高 6 倍, Mg^{2+} 只能提高 2 倍。在 250mmol/L Mn^{2+} 左右即达到饱和。饱和浓度时的 Mn^{2+} 的稳态反应速率也要低于 Mg^{2+} 。Fig.5-c 和 5-d 分别是 A 和 B 与 Mn^{2+} 离子浓度的关系。

Fig.6 显示了 Cdc42Hs 随 Ca^{2+} 离子浓度的变化情况: 与 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 不同, Ca^{2+} 结合于 Cdc42Hs 时, 没有明显的 single-turnover 现象, 随着 Ca^{2+} 浓度的升高, 稳态速度逐步下降。这

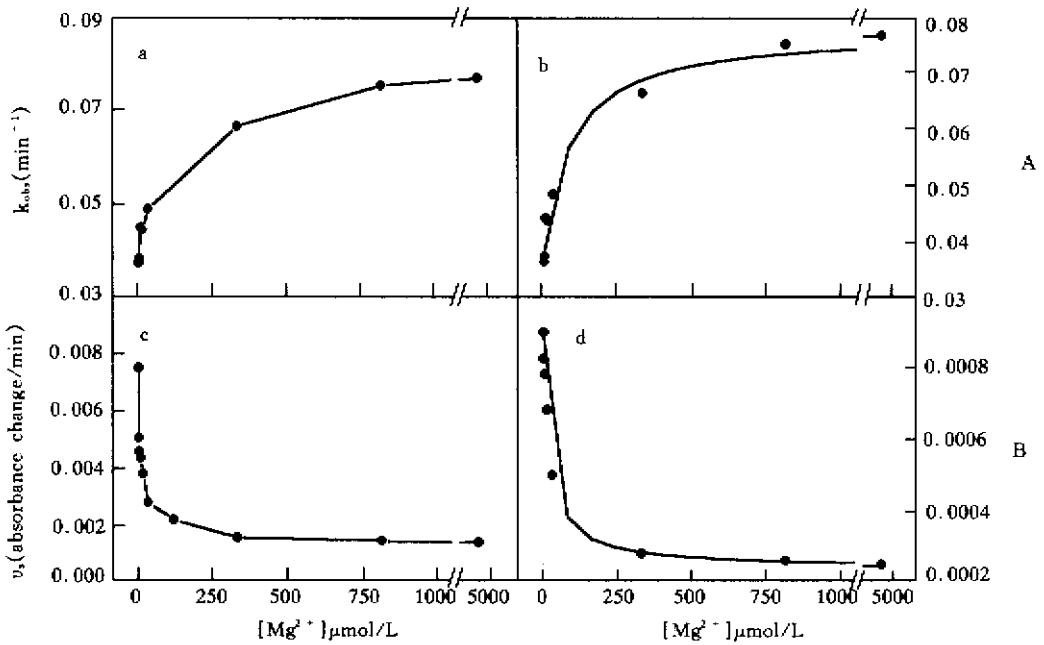


Fig.3 The continuous lines represent the calculated lines according the eqn. (A) with the parameters given in Fig.2. (a), (b), (c), (d) are the replots in the form of k_{obs} , v_s , A and B versus the Mg^{2+} concentrations, respectively

意味着 Ca^{2+} 离子与 Cdc42Hs 的结合机制与 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 与 Cdc42Hs 结合机制不同。Fig. 6 的内插图表示了稳态速度随 Ca^{2+} 离子浓度的变化情况, 饱和浓度大约为 3mmol/L。

2.5 金属离子与 Cdc42Hs 的结合常数, 及水解反应的微观动力学常数。

Table 1 Disassociate constants of metal ions with the Cdc42Hs · GTP and Cdc42Hs · GDP and the microscopic kinetic constants of the hydrolysis reaction

	K_d' ($min^{-1}\mu mol/L$)	K_d'' ($min^{-1}\mu mol/L$)	k_2 ($10^{-2}min^{-1}$)	k_2' ($10^{-2}min^{-1}$)	k_3 ($10^{-4}min^{-1}$)	k_3' ($10^{-4}min^{-1}$)
Mg^{2+}	21.6 ± 2.6	91.6 ± 3.1	3.84 ± 0.15	7.70 ± 0.21	9.2 ± 0.2	2.5 ± 0.1
Mn^{2+}	8.26 ± 1.51	13.6 ± 3.6	2.68 ± 0.72	14.5 ± 0.6	10.1 ± 0.1	2.3 ± 0.2

3 讨论

3.1 在整个 GTP 结合蛋白家族中, 核苷酸的结合口袋, 特别是 Mg^{2+} 的结合位点是相当保守的: 在 GDP 结合状态时, Mg^{2+} 直接与 GDP 的 β -磷酸及 Ser/Thr 残基的羟基配位键合, 同时与四个结合与蛋白上的水分子配位, 形成一个正八面体的六配位结构。在 GTP 结合状态时, GTP 的 γ -磷酸和另外一个保守的 Thr 残基的羟基取代了 GDP 结合状态中的两个水分子与 Mg^{2+} 发生配位键合^[16]。在 Cdc42Hs 中, 在 GDP 结合状态与 Mg^{2+} 直接键合的是 Thr₁₇, 在

GTP 结合状态与 Mg^{2+} 直接键合的是 Thr₃₅, 通过水分子与 Mg^{2+} 间接键合的是 Asp₆₃^[17]。 Mg^{2+} 结合位点的高度保守性说明了 Mg^{2+} 在 GTP 结合蛋白的核苷酸结合、交换及 GTP 水解过程中起到重要作用。对比 Ras 蛋白结合 Mg^{2+} 和结合 Mn^{2+} 的晶体结构, 发现无论是在 Mg^{2+} 还是 Mn^{2+} 结合状态, 金属离子的结合位点都只有一个, 且无论是在 GTP 还是 GDP 结合状态, Mn^{2+} 都是以与 Mg^{2+} 相同的配位模式结合于 Ras 蛋白^[7]。生化方面的证据表明, 在结合 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 时, 结合于蛋白上的 GTP 的 γ -磷酸的 pK_a 发生了改变, 从结合 Mg^{2+} 的 2.9 提高到结合 Mn^{2+} 的 3.4。而所结合的核苷酸的 pK_a 越高, 则 γ -磷酸接受质子的能力越强, 越容易受到 H^+ 的亲电攻击, 所以在中性 pH 下, 水解速度也越大。GTP 的 γ -磷酸在此充当一个广义碱。所以 Mn^{2+} 可以激活 Ras 的 GTP 水解能力^[7]。

从我们的结果看, 相对于 Mg^{2+} 而言, Mn^{2+} 存在下的 Cdc42Hs 的水解活力有约 2 倍的提高, 对比于 Ras 中, Mn^{2+} 可以提高大约 3 倍于 Mg^{2+} 的反应速度^[10]。我们可以推测 Mn^{2+} 对 Cdc42Hs 的激活机制与 Ras 相同, 都是通过提高 GTP 的 γ -磷酸的 pK_a 从而使其更容易受到 H^+ 的亲电攻击来提高 GTP 的水解速度, 这是从 single-turnover 的情况看。从稳态速度看, 结合 Mn^{2+} 后, 稳态反应速率更低于 Mg^{2+} , 而稳态反应速率主要是在有金属离子存在时核苷酸间自发交换的一种反应。所以结合 Mn^{2+} 时, Cdc42Hs 对核苷酸有更大的亲和能力, 即在这种情况下, 核苷酸更不易于从 Cdc42Hs 上解离下来, 所以稳态速度较小。

在结合 Ca^{2+} 的情况下, 几乎观测不到 single-turnover 现象, 这说明 Ca^{2+} 与 Cdc42Hs 的结合与 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 与 Cdc42Hs 的结合不同。 Ca^{2+} 的结合不能促进 GTP 的水解, 而 Ca^{2+} 对结合于 Cdc42Hs 上的 GTP 的 γ -磷酸的 pK_a 可能影响不大, 不能提高 γ -磷酸作为广义碱的碱性。但 Ca^{2+} 的结合同样提高了核苷酸与 Cdc42Hs 的结合能力, 阻止了核苷酸从 Cdc42Hs 上的解离, 这表现在结合 Ca^{2+} 后, 稳态速度降低。 Ca^{2+} 的这些现象说明, Ca^{2+} 可能以不同于 Mn^{2+} 所采用的六配位的方式与 Cdc42Hs 及核苷酸结合。

3.2 从微观反应速率常数来看, 金属离子 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 的存在能激活 Cdc42Hs 的 GTP 水解酶活性。 k_2 的物理意义为无金属离子存在时, GTP 水解反应的速率常数。分别从 Mg^{2+} 或者 Mn^{2+} 存在的情况下单独求出的 k_2 在误差范围内可以认为是相等的, 见表 (1), 这从侧面验证了整个实验数据的可靠性。 k_2' 表示在饱和的金属离子浓度下 GTP 水解的速率常数。在 Mg^{2+}

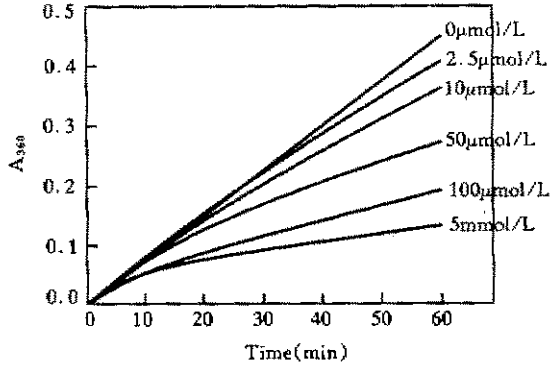


Fig.4 Continuous spectroscopic assay of γ Pi release from the Cdc42-GTP complex measured by absorbance at 360nm with the MESH assay system. The absorption of $5.7\mu\text{mol/L}$ solution of Cdc42 in a buffer containing 20mmol/L HEPES, pH7.6, $200\mu\text{mol/L}$ GTP, and 0.2mmol/L MESH with 5 unit of coupling phosphorylase was monitored during the time course. Reactions were initiated by the addition of $MnCl_2$. Final concentration of $MnCl_2$ was 5mmol/L , $100\mu\text{mol/L}$, $50\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$, $2.5\mu\text{mol/L}$, $0\mu\text{mol/L}$ from bottom to top, respectively

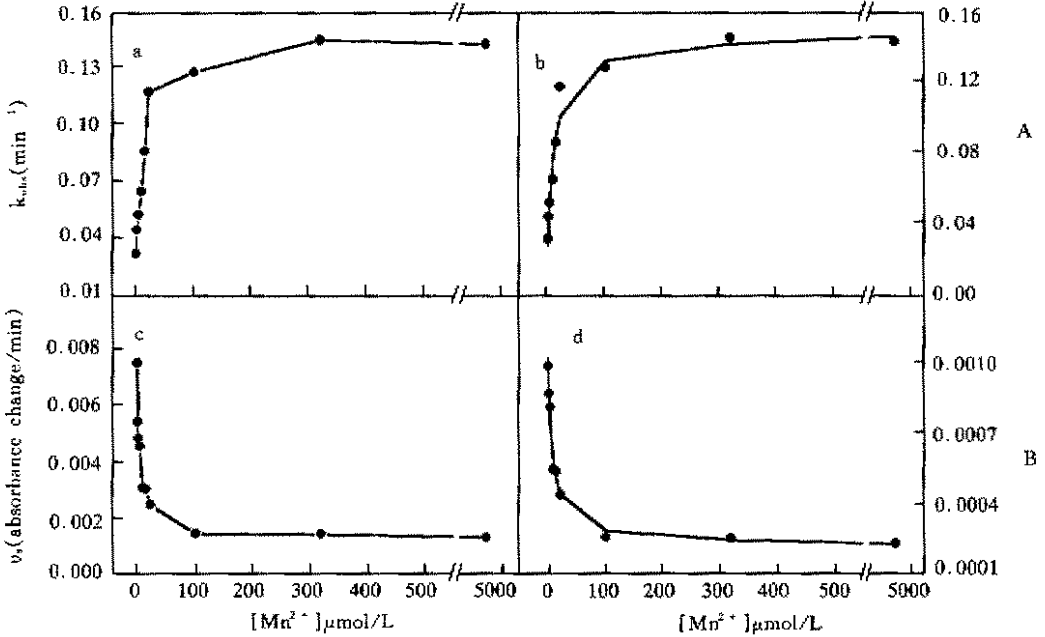


Fig.5 The continuous lines represent the calculated lines according the eqn. (A) with the parameters given in Fig.4. (a), (b), (c), (d) are the replots in the form of k_{obs} , v_s , A and B versus the Mn^{2+} concentrations, respectively

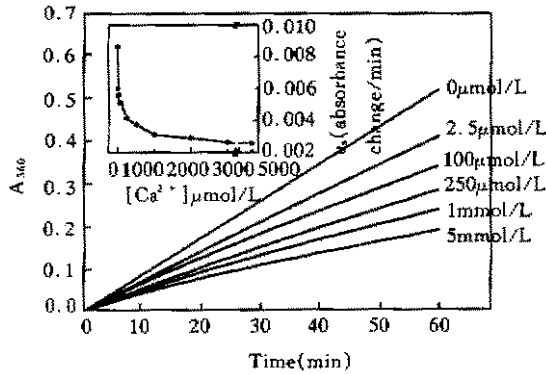


Fig.6 Continuous spectroscopic assay of γ Pi release from the Cdc42-GTP complex measured by absorbance at 360nm with the MESH assay system. The absorption of $5.7\mu\text{mol/L}$ solution of Cdc42 in a buffer containing 20mmol/L HEPES, pH7.6, $200\mu\text{mol/L}$ GTP, and 0.2mmol/L MESH with 5 unit of coupling phosphorylase was monitored during the time course. Reactions were initiated by the addition of CaCl₂. Final concentrate of CaCl₂ was 5mmol/L, 1mmol/L, $250\mu\text{mol/L}$, $100\mu\text{mol/L}$, $2.5\mu\text{mol/L}$, $0\mu\text{mol/L}$ from bottom to top, respectively. The inset shows the replots in the form of v_s versus the Ca^{2+} concentrations

存在的情况下, k_2' 为 k_2 的两倍, 在 Mn^{2+} 存在时, k_2' 为 k_2 的四倍, 说明金属离子能够激活 GTP 水解酶的活性, 而且 Mn^{2+} 的激活程度要大于 Mg^{2+} 。 k_3 的物理意义是在无金属离子存在

时 GTP 从 Cdc42Hs 上解离的速率常数。同样,通过 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 单独求出的 k_3 基本相等。 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 的存在对 GDP 的解离有相同程度的抑制, k_3' 比 k_3 小 4 倍左右。

3.3 K'_d 是金属离子与 GTP 结合状态的酶的解离常数, K''_d 是金属离子与 GDP 结合状态的酶的解离常数。无论是 Mg^{2+} 还是 Mn^{2+} , 对于处于 GTP 结合状态的酶都具有更大的亲和力。 Mn^{2+} 对两种状态的 Cdc42Hs 的结合能力都要大于 Mg^{2+} 。 Mg^{2+} 与酶的结合对酶所处的状态更具选择性: Mg^{2+} 对处于 GTP 结合状态的酶的结合能力要比处于 GDP 状态的酶大 4 倍左右 (K'_d 约为 K''_d 的 1/4)。而 Mn^{2+} 与两者的结合能力更趋向于相同, 它们之间只 1.5 倍的差距。 Mg^{2+} 与 Cdc42Hs 的这种结合行为更适于在生理条件下充当酶的辅基。一般认为 GEF 对 GTP 结合蛋白的 GTP - GDP 交换的促进是通过替换掉 Mg^{2+} 而使蛋白处于 Mg^{2+} - Free 状态而进行的。合适的 GTP 状态的结合能力 相对而言较低的 GDP 状态的结合能力, 更有利于 GEF 发挥其功能。

3.4 在 Ras 中, 认为 Mg^{2+} 的结合可导致两种效应。第一种效应是由于高亲和力的结合引起, 结合常数在 nmol 数量级。这种结合主要是为核苷酸与蛋白的结合提供配位键, 促进 GTP 水解; 第二种效应发生在 Mg^{2+} 浓度在 mmol/L 数量级时, 主要调控 GTP 结合蛋白的构象, 影响核苷酸的解离^[10]。这两种效应在 Cdc42Hs 上可能是加合的, 即 Mg^{2+} 促进 GTP 水解与抑制核苷酸交换是同时进行的。随着 Mg^{2+} 离子浓度的升高, k_{obs} 升高, 而同时稳态反应速度降低。 k_{obs} 反应的是 Cdc42Hs 对 GTP 的水解能力。而稳态速度表征 GDP 从 Cdc42Hs 上解离的情况。Cdc42Hs 与 Ras 的这种不同, 可能是由于在没有 Mg^{2+} 存在时, Ras 的本底水解速度很低, 而 Cdc42Hs 则能以较大的速度水解 GTP。在另外一种 GTP 结合蛋白 EF - Tu 中, 无 Mg^{2+} 时, GTP 水解酶活力完全丧失^[10]。这种不同从侧面反映出第一种效应即高亲和力的 Mg^{2+} 结合在 Cdc42Hs 中可能不存在。

参考文献:

- [1] Symons M. *Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond* [J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 178 - 181.
- [2] Hall A. *Rho GTPases and the actin cytoskeleton* [J]. *Science*, 1998, 279: 509 - 514.
- [3] Chant J, Stowers L. *GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more* [J]. *Cell*, 1995, 81: 1 - 4.
- [4] Van Aelst L, D'Souza - Schorey C. *Rho GTPases and signaling networks* [J]. *Genes Dev*, 1997, 11: 2295 - 3011.
- [5] Lamarche N, Hall A. *GAPs for rho - related GTPases* [J]. *Trends Genetics*, 1994, 10: 436 - 440.
- [6] Cerione R A, Zheng Y. *The Dbl family of oncogenes* [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8: 216 - 222.
- [7] Schweins T, Scheffzek K, Assheuer R, Wittinghofer A. *The Role of the Metal Ion in the p21ras Catalysed GTP - hydrolysis: Mn^{2+} versus Mg^{2+}* [J]. *J Mol Biol*, 1997, 266: 847 - 856.
- [8] Pan J Y, Sanford J C, Wessling - Resnick M. *Influence of Mg^{2+} on the structure and function of Rab5* [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 1322 - 1328.

- [9] Zhang B, Zhang Y, Wang ZX, Zheng Y. *The role of Mg^{2+} Cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP-hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins*[J]. *J Biol Chem*, 2000,275:25299-25307.
- [10] Mistou MY, Cool RH, Parmeggiani A. *Effects of ions on the intrinsic activities of c-H-ras protein p21*[J]. *Eur J Biochem*, 1992,204:179-185.
- [11] Webb M R. *A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992,89:4884-4887.
- [12] Bradford M M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding* [J]. *Anal Biochem*, 1976,72:248-254.
- [13] Higashijima T, Ferguson K M, Sternweis P C, Smigel M D, Gilman A G. *Effects of Mg^{2+} and the beta gammol/La-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins*[J]. *J Biol Chem*, 1987,262:762-6.
- [14] Zhang B, Wang Z X, Zheng Y. *Characterization of the interactions between the small GTPase Cdc42 and its GTPase-activating proteins and putative effectors* [J]. *J Biol Chem*, 1997,272:21999-22007.
- [15] Webb M R, Hunter J L. *Interaction of GTPase-activating protein with p21ras, measured using a continuous assay for inorganic phosphate release*[J]. *Biochem J*, 1992,287:555-559.
- [16] Pan J Y, Marianne W-R. *GEF-mediated GDP/GTP exchange by monomeric GTPases: a regulatory role for Mg^{2+}* [J]. *BioEssays*, 1998,20:516-521.
- [17] Feltham J L, Dotsch V, Raza S. *Definition of the switch surface in the solution structure of Cdc42Hs*[J]. *Biochemistry*, 1997,36:8755-8766.

EFFECTS OF METAL IONS ON THE INTRINSIC GTP – HYDROLYSIS ACTIVITIES OF SMALL GTPase Cdc42Hs

ZHANG Xiao – dong, TAN Ying – cai

(*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract: Different metal ions have different effects on the intrinsic GTP – hydrolysis activity of Cdc42Hs. Compared with Mg^{2+} , the physiological cofactor, Mn^{2+} has a slight activation effect on GTP – hydrolysis activity. The k_{obs} of the exponential phase of the experiment curve of Mn^{2+} is two – times higher than that of Mg^{2+} under saturated condition. And the velocity of the steady state is lower than that of Mg^{2+} . Essentially, there is no difference between the experiment curves of Mn^{2+} and Mg^{2+} . Both of them have an exponential phase and linear phase, which indicate that Mn^{2+} and Mg^{2+} adopt the same mechanism in binding to Cdc42Hs. In the case of Ca^{2+} , there is no detectable exponential phase in the experiment curve. The presence of Ca^{2+} only slows down the velocity of the steady state. This indicates that the binding mechanism of Ca^{2+} to Cdc42Hs is different from that of Mn^{2+} and Mg^{2+} . With the increasing of Mn^{2+} and Mg^{2+} concentration, the k_{obs} of the exponential phase increase, and the velocity of the steady state decrease. A detail kinetic analysis deduces the microscopic kinetic constants of the hydrolysis reaction and the disassociate constants of the metal ions with the protein.

Key Words: Metal ions; GTP – binding protein; Cdc42Hs;
GTP – hydrolysis activity; Disassociate constants