DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.150102

采用 X 射线衍射解析人鸟嘌呤核苷酸解离刺激因子(RalGDS) Ras 结合结构域的空间结构

黄雪英¹ 雷 明² 沈 阳³ 张 巍² 刘艳丽² 刘 珂² 赵浩斌² 祁 超^{* 2}

1(华中师范大学化学学院,武汉 430079)

2(华中师范大学生命科学学院湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室 武汉 430079)

³(多伦多大学结构生物学中心 加拿大 M5G 1L7)

摘要 Ras 结合结构域(RBD) 是鸟嘌呤核苷酸解离刺激因子(RalGDS) 家族成员 *C*-端的高保守区,通过它 连接 Ras 和 Ras 相关蛋白。利用 Red Wings 和 SGC-1 screens 相关的悬滴法设盘结晶, 按体积比 1:1 加蛋白液 到含 1:100 胞内蛋白酶 Glu-C(w/w) 的结晶溶液(2 mol/L (NH₄)₂SO₄, 0.2 mol/L NaAc, 0.1 mol/L HEPES, 5% MPD, pH 7.5) 中 晶体 3 天长成可组装大小。利用 X-射线晶体衍射技术解析了人 RalGDS 的 Ras 结合域 (RalGDS-RBD) 的晶体结构,对比鼠和人 RalGDS-RBD, 主要是 Ras 结合区的 *C*-端不同。人 RalGDS-RBD 通过 Glu₈₃₈和 Glu₈₄₀在 RalGDS 和 Ras 蛋白间形成氢键,而在同一位点,鼠 RalGDS-RBD 通过 Asp₈₂₀和 Asp₈₂₂形成氢 键。人 RalGDS-RBD 结构中含 $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -型三维结构的泛素样构象,一个单体的 *C*-端残基与相邻单体的 β 折叠形成平行 $\beta\beta\beta\beta\beta\beta$ 结构。

关键词 鸟嘌呤核苷酸解离刺激因子(RalGDS); Ras 结合结构域(RBD); Ras 蛋白

1 引 言

Ras 蛋白是一类小型 GTP-结合蛋白,能作为分子开关耦合细胞外信号,从而调控不同的细胞应答。 细胞信号通路中,Ras 蛋白表现为无活性的 GDP 结合形式和有活性的 GTP 结合形式两种构象。通过两 种构象之间的转换,调节细胞生长、细胞流动性及细胞增殖^[1]。在 GTP 结合区,Ras 蛋白通过与 Rafs 丝 氨酸/苏氨酸激酶、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3-kinase)、Ral 鸟嘌呤核苷酸置换因子(Ral-GEFs)等效应分子 结合,激活类似的通路^[2,3]。鸟嘌呤核苷酸解离刺激因子(RalGDS)家族四个成员(RalGDS、RGL、RGL2/ Rlf 和 RGL3)含部分相同结构,均含一个带上游 Ras 交换锚的中央 CDC25 同源结构域和一个 *C-*端 Ras/ Rap 同源结构域(RBD)(图 1A)。通过 *C-*端 RBD,RalGDS 蛋白结合 Ras 及 Ras 相关蛋白。

目前,已利用核磁共振和 X 衍射法分析了 RBDs 的三维结构^[4,5]。虽然 RalGDS 家族各成员 RBDs 残基没有明显的序列同源性,但它们的三维结构非常相似,各 RalGDS-RBD 含泛素样构象(呈 ββαββαβ 型三级结构特征),但 Ras 结合区和疏水核心^[2-5]却存在结构差异。这些特点导致 RalGDS-RBDs 与 Ras/Rap1A 的不同结合。从 Rap 和 Ras 效应区的突变情况来看,残基 31 对 Ras/Rap 特异性结合 Raf-RBDs 至关重要^[6]。虽然鼠和人 RBDs 有很高的全序列同源性和结构相似性,但与 Ras 蛋白结合的鼠 RalGDS-RBD 和人 RalGDS-RBD 残基还是有一些不同。经最关键的 Raf 途径, Ras 介导正常鼠细胞致瘤; 经关键的 Ral-GEFs 途径, Ras 介导正常人细胞致瘤^[3,7]。鼠 RalGDS-RBD 的空间结构虽然早已解析,与人 RalGDS-RBD 的空间结构相似性较高,但还是有种属差异。以鼠 RalGDS-RBD 为靶标研究 Ral-GDS-RBD 引起的相关疾病,并根据鼠 RalGDS-RBD 的空间结构及作用机制为人设计药物就会有较大误差。因此,为更好地了解人 RalGDS-RBD 特异性结合 Ras 蛋白的结构基础,本研究制备了人 RalGDS-RBD 蛋白晶体,并分析 Ras 结合残基及各 RBDs 三维结构的特点,特别是人和鼠 RalGDS-RBD 的差异,为下一步研究由于人和鼠 RalGDS-RBD 的空间结构的差异导致细胞功能的差异奠定基础,同时也可以为根据人 RalGDS-RBD 的空间结构及作用机制设计药物提供重要参考。

²⁰¹⁵⁻⁰¹⁻²⁹ 收稿; 2015-03-17 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 20772040 31300629)、教育部中央高校自主项目(No. CCNU14F01006)资助

^{*} E-mail: qichao@ mail. ccnu. edu. cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UP200S 超声破碎仪(德国 Hielscher 公司); Ni-NTA 亲和柱和 MiniPROTEAN 3 电泳仪(Poly-Prep, Bio-Rad 公司); Superdex-75 26/60 凝胶过滤柱和 AKTA Purifier 100 Protein Purication System(美国 GE 公司)。

硫酸卡那霉素、氯霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、苯甲基磺酰(PMSF, $C_6H_5CH_2SO_2F$)、 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]-I-丙磺酸(CHAPS)、 $C_{32}H_{58}N_2SO_7$ 、NaCl、KCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、咪唑、 (NH₄)₂SO₄、NaAc、HEPES(*N*-2-羟乙基哌嗪-*N*´-2-乙磺酸 $C_8H_{18}N_2O_4S$),均为分析纯,购于 BBI 公司;核 酸酶(DNase 250 U/µL)、蛋白酶抑制剂混合物、巯基乙醇、2-甲基-2 A-戊二醇, $C_6H_{14}O_2$ (MPD,分析纯), 购于 Sigma-Aldrich 公司;甘油购于国药集团化学试剂有限公司。

2.2 实验过程

2.2.1 目的蛋白的表达及纯化 以编码 RBD 域的含氨基酸残基 N793-F914 的人 RalGDS 为 cDNA 模板 通过不依赖于连接反应的高效克隆方法 病 pET-28a-MHL 载体。具密码子偏好表达特性的 pRARE 质粒重组蛋白 ,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中过量表达。细胞在 37℃含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素和 25 μ g/mL氯霉素的基本培养基(极品肉汤) 上培养 ,至光密度约 3.0。加终浓度 0.5 mmol/L IPTG ,诱导蛋白表达 ,15℃继续培养。过夜培养后收集细胞 ,液氮速冻 ,并存于-80℃。细胞冻融后 ,用 400 mL 提取 缓冲液重悬 ,并立即加入终浓度 1 mmol/L PMSF/苯甲脒、0.5% CHAPS、5 U/mL 核酸酶 ,1 mL 蛋白酶抑制剂混合物 ,然后冰上超声破碎 5 min(120 W ,工作 10 s ,间隔 10 s)。

将破碎产物 16000 r/min 离心 60 min ,取上清液过 4 mL Ni-NTA 亲和柱^[8](Mississauga 试剂盒) 4℃ 孵育 1 h。然后,上清通过亲和柱,用 50 mL 结合缓冲液(1× PBS pH 7.3,500 mmol/L NaCl、 5 mmol/L 咪唑、5 mmol/L 巯基乙醇、5% 甘油)和 50 mL 洗涤缓冲液(1× PBS pH 7.3、500 mmol/L NaCl、 10 mmol/L 咪唑、5 mmol/L 巯基乙醇、5% 甘油)分别冲洗柱子。用 15 mL 洗脱液(1× PBS pH 7.3、 500 mmol/L NaCl、300 mmol/L 咪唑、5 mmol/L 巯基乙醇、5% 甘油)洗脱柱上蛋白。收集液体,过 Superdex-75 26/60 凝胶过滤柱。收集各浓缩液合并后超滤浓缩(*M*_w. cut-off 10000),经 SDS-PAGE 检 测^[9]。以牛血清白蛋白为标准,测蛋白浓度为 23.0 mg/mL。

2.2.2 人 RalGDS-RBD 蛋白复合物的结晶及晶体数据收集和处理 利用 Red Wings 和 SGC-1 screens 相关的悬滴法设盘结晶。按体积比 1:1 加蛋白液到含 1:100 胞内蛋白酶 Glu-C(w/w) 的结晶溶液 (2 mol/L (NH₄)₂SO₄、0.2 mol/L NaAc、0.1 mol/L HEPES、5% MPD、pH 7.5) 中。晶体 3 天长成可组装 大小。用 Paratone 作冷冻保护剂。蛋白质晶体的衍射数据通过 Advanced Photon Source 的 beamline 19ID 收集 利用 HKL 软件^[10] 对数据进行整合分析。进一步的详细实验数据见表 1。晶体结构由 SHELX^[11]软件提供的多波段不规则衍射法^[12]在不同波长下进行解析。蛋白结构模型由 ARP/WARP 软件^[13]分子置换方法确定。蛋白结构的进一步修正及优化由 COOT^[14]、PHENIX^[15]和 REFMAC^[16]程 序完成。蛋白结构几何模型的确定由 MOLPROBITY^[17]完成。

3 结果与讨论

3.1 人 RalGDS-RBD 晶体的空间结构和晶体数据

人 RalGDS 包含一个 *N*-端 REM ,一个中央 CDC25 同源结构域和一个 *C*-端 RBD(图 1A)。人 Ral-GDS 的 RBD 域为 122 *C*-端残基片段(对应人 RalGDS 中残基 793 ~ 914), 且人 RalGDS-RBD(残基 793 ~ 888)的晶体结构在 2.1 nm 条件下确定。尽管晶体中每个单体分子的分布不同,但人 RalGDS-RBD 能通 过每个单体的二硫键形成一个对称同源二聚体(图 1B)。由图 1B 可见,每个单体人 RalGDS-RBD 都有 泛素样构象,由一个 α 螺旋(α 1)和两个小 α 螺旋(α 2 和 α 3)插入五链混合 β -sheet(β 1 ~ β 5)而组成。与鼠 RalGDS-RBD 的疏水核心残基组成一致^[5],人 RalGDS-RBD 的疏水核心也由残基 Ile₈₀₁, Val₈₀₃, Ile₈₁₆, Val₈₁₈, Ala₈₂₄, Val₈₂₇, Ile₈₂₈, Ala₈₃₁, Leu₈₄, Ile₈₅₉, Val₈₆₅, Phe₈₆₆, Ala₈₆₈, Phe₈₇₇和 Leu₈₇₉组成。通过氨基

酸序列比对发现 , RalGDS 家族的 RBD 域保留了大多数疏水残基 ,这表明残基间的疏水作用对 Ras/Rap 蛋白结合 RalGDS-RBDs 很重要。晶体数据如表 1。

表1 晶体结构的数据收集和相关参数

Table 1 Data collection and refinement statistics

数据收集 Data collection		精修 Refinement	
空间群 Space group	P61	分辨率 Resolution (Å)	40.0~2.1
晶胞尺寸 Cell dimensions		反射编码 No. reflections	13,479
a , b , c (Å)	104.59,104.596,3.98	$R_{ m work}$ / $R_{ m free}$	0.204/0.226
α,β,γ	90°,90°,120°	原子编码 No. atoms	
波长 Wavelength (Å)	0.979	蛋白 Protein	1612
分辨率 Resolution (Å)	4.00 ~ 0.21(2.18 ~ 2.1)	重原子数 Heterogen atoms	4
$R_{ m merge}(~\%$)	65.8 (16.1)	溶剂化原子数 Solvent atoms	55
Ι/σΙ	8.4(3.5)	R. m. s 偏差 R. m. s. deviations	
完整性 Completeness (%)	82.5(96.7)	键长 Bond lengths (Å)	0.014
冗余度 Redundancy	6.7 (2.1)	键角 Bond angles	1.554°

注: 括号里的数值表示修正后的最高分辨率。

Values in parentheses correspond to the highest resolution shells.



图 1 RalGDS 的域分布及人 RalGDS-RBD 的整体结构

Fig. 1 The domain organization of Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RalGDS) and overall structure of the human RalGDS-Ras binding domain(RBD)

(A) 图解 RalGDS 的各域分布情况,字母代表 RBD 边界的氨基酸位点情况。(B) 人 RalGDS-RBD 通过每个单体的二硫 键形成 1 个对称同源二聚体。每个单体人 RalGDS-RBD 都有由 5 线混合 β -sheet(β 1 ~ β 5)、1 个 α 螺旋(α 1)、2 个小 α 螺旋(α 2 和 α 3) 组成的泛素样构象。

(A) Schematic representation shows the domain organization of human RalGDS-RBD. Numbers below indicate amino-acid positions of RBD boundaries. (B) The crystal of human RalGDS-RBD forms a symmetry homodimer via disulfide bridges in each monomer. The overall structure of each monomer exhibits an ubiquitin-like conformation , characterized by a five-stranded mixed β -sheet (β 1- β 5) , a α -helix (α 1) and two additional small α -helixes (α 2 and α 3).

3.2 与其它 RalGDS-RBDs 结合的 Ras 残基比对

RalGDS-RBDs-Ras^[4,18]的结构分析显示, RalGDS-RBD 主要通过彼此的 β2 折叠结构与 Ras 蛋白结 合。作用区域包括 Ras 蛋白的效应区(分子开关区 I) 及 RalGDS-RBD 的作用表面。除构成疏水核心的 残基,作用表面的残基也对 Ras/Rap 蛋白结合 RalGDS-RBDs 至关重要。人 RalGDS-RBD 的相关表面含 残基 829~841。3 个 RalGDS-RBD 成员的 Ras-1 作用残基的氨基酸序列和结构有明显差异,但构成疏水 核心的残基则基本相同(图 2)。鼠和人 RalGDS-RBD 的氨基酸序列一致,但 Ras 结合区的结构和序列 不同(图 2)。以上结果表明,每个 RalGDS-RBD 通过特异的 Ras 结合区结合不同的 Ras 蛋白,也证实了 RalGDS-RBDs 特异性与 Ras 结合区密切相关的报道^[6,19]。

对比鼠和人 RalGDS-RBD,主要是 Ras 结合区的 *C*-端不同。人 RalGDS-RBD 通过 Glu₈₃₈和 Glu₈₄₀在 RalGDS 和 Ras 蛋白间形成氢键。而在同一位点,鼠 RalGDS-RBD 通过 Asp₈₂₀和 Asp₈₂₂形成氢键。与鼠 RalGDS-RBD 的 Asp₈₂₀和 Asp₈₂₂相比,Glu₈₃₈和 Glu₈₄₀多一个甲基,因此 Glu₈₃₈与 Glu₈₄₀间距更大,Ras 蛋白 与人 RalGDS-RBD 离的远, Ras 蛋白与人 RalGDS-RBD 的结合力更弱。虽然人和鼠 RalGDS-RBD 的折叠 情况相同且属于同一泛素超折叠家族,但 Ras 结合残基不同,因此与 Ras 蛋白的结合不同。由此推测, 不同的 RalGDS-RBDs 利用特异性 Ras 结合残基,结合不同的 Ras 蛋白,从而表现出不同的细胞功能,如 使不同细胞致瘤。RAS 突变会提高鸟嘌呤核苷酸的交换,并增强 Ras 蛋白的基本激活状态^[20,21]。最早 被研究的是定义为结合致癌因子的鼠 RAS 基因,随后,以转染为基础了解了人 HRAS、KRAS、NRAS 的 突变激活。KRAS 蛋白为人类最常见的突变激活癌蛋白,大量 KRAS 错义突变与肺癌、结肠腺瘤、胰腺 癌等密切相关;半数以上的恶性甲状腺肿瘤与 HRAS 或 NRAS 等相关^[21]。与 Ras 蛋白的结合不同,致 瘤情况不同。Ras 对应负调控因子 NF1,与神经细胞致瘤相关;正调控因子 SOS1(Ras 的效应分子 GEF) 过表达,与肾肿瘤细胞相关^[22-25]。



图 2 不同 RalGDS 家庭成员的序列化队列和不同 Ras 结合区的结构

Fig. 2 Structure-guided sequence alignment of different RalGDS family members and structure of different Ras-interacting regions

A) 4 个 RalGDS 家族成员的序列化队列(M-RalGDS-RBD:鼠 RalGDS-RBD,H-RalGDS-RBD:人 RalGDS-RBD)。 虚线代表最优 队列与 Ras 结合残基间的匹配情况。B) 不同 Ras 结合区的结构(I:人 RalGDS-RBD,II:鼠 RalGDS-RBD,III:RGL-RBD)。 A) Structure-guided sequence alignment of RBDs in four RalGDS family members (M-RalGDS-RBD: mouse RalGDS-RBD, H-RalGDS-RBD: human RalGDS-RBD). The dashed lines indicate gaps introduced to optimize alignments and the Ras-interacting residues are boxed. B) Structure of different Ras-interacting regions (I: human RalGDS-RBD, II: mouse RalGDS-RBD, III: RGL-RBD).

3.3 作为 Ras 效应分子、GEFs 以及连接 Ras 与 Ral 的 RalGDS 的功能

RalGDS 蛋白结合 Ras 及 Ras 相关蛋白的能力,取决于 C-端 RBD,约由 90 个氨基酸组成。RalGDS 家族的所有成员都是 Ras 的效应分子,参与 Ras 的下游调节,并结合 Ras 或 Ras 家族成员的活性 GTP 结 合态。Ras(G12V)主要活性突变体的使用,证实了 RalGDS 家族成员作为 Ras 效应分子的相关行为。 对于结合 Ras 所有已知下游靶标, Ras 效应分子结合域(残基 30~40)是至关重要的作用位点,该结合域 的特定突变可明确效应分子循环的不同功能及与效应分子的特定结合情况。

RalGDS 家族成员,作为 Ral 鸟嘌呤核苷酸置换因子(Ral-GEFs),能促进 Ras 家族成员从 GDP 态转换为 GTP 态。此促进行为由 RalGDS 蛋白的中央 CDC25 同源结构域(下行至 REM)决定。CDC25 是酵母细胞中 Ras 相应的 GEF,调节 Ras 转换于无活性 GDP 结合态与有活性 GTP 结合态间。CDC25 的催化域约含 250 个残基,且通过多个酵母菌及哺乳动物的 GEFs 序列比对得知其含有 5 个结构保守区(scr 1~5)。所有 RalGDS 家庭成员特定地作为体内外亚型 RalA 和 RalB 的置换因子,不与其它 Ras 蛋白作用。

研究发现,Ras-GTP和 RalGDS的相互作用不引起 RalGDS的任何构象变化,也不刺激其 GEF 活性, 仅促进 RalGDS 易位靠近膜(在膜处识别并激活 Ral)^[26,27]。携带膜定位块 CAAX的 RalGDS或 Rlf的突 变体,能在 Ras不存在的情况下激活 Ral。Ras 被激活以应答许多类型的上游信号,包括几乎所有的酪 氨酸激酶受体、一些 G 蛋白偶联受体、如钙和甘油二酯的细胞内第二信使。Ral 蛋白有可能参与协调不同的细胞外信号作用。据报道,RalGDS-Ral 途径参与调制各种转录因子的活动^[28 29]。Rlf 负责激活能刺激 c-Fos 响应元件的三元复杂因子(TCF),并促进转录因子 c-Jun 的磷酸化和激活。另外,Ras-Ral-GDS-Ral 途径的激活引起转录因子 ATF2 上 Thr69 的磷酸化。由于 RalGDS 及 Ral 蛋白影响基因表达的效应分子途径不清楚,因此目前数据都仅为初步分析。生长因子介导的 Ral 活化,在结合 Ras-GTP 时发生,并递送 RalGDS 结合质膜上的靶标 Ral,该递送过程与 C-端 RBD 作用、Ras /PI3K/PDK1 信号途径中 RalGDS 催化活性的增强及 N-端结构域情况相关。

4 结 论

本研究利用 X-射线晶体衍射技术解析了人 RalGDS 的 Ras 结合域(RalGDS-RBD)的晶体结构。人 RalGDS-RBD 结构中含 ββαββαβ-型三维结构的泛素样构象,一个单体的 C-端残基与相邻单体的 β 折叠 形成平行 βββββ 结构。人 RalGDS-RBD 与鼠 RalGDS-RBD 结构大体相同,区别主要体现在 Ras 结合区。 本研究可为研究人 RalGDS-RBD 引起的相关疾病的致病机理,并根据人 RalGDS-RBD 的空间结构及作 用机制设计药物提供参考;同时,为由于人和鼠 RalGDS-RBD 的空间结构的差异导致细胞功能的差异研 究奠定基础。

References

- 1 Johnson D S , Chen Y H. Curr. Opin. Pharmacol. , 2012 , 12(4): 458-463
- 2 Ferro E , Trabalzini L. Cell. Signal. , 2010 , 22(12): 1804-1810
- 3 Rangarajan A , Hong S J , Gifford A , Weinberg R A. Cancer Cell. , 2004 , 6(2): 171-183
- 4 Huang L , Hofer F , Martin G S , Kim S H. Nat. Struct. Biol. , 1998 , 5(6): 422-426
- 5 Huang L , Weng X , Hofer F , Martin G S , Kim S H. Nat. Struct. Biol. , 1997 , 4(8): 609-615
- 6 Nassar N, Horn G, Herrmann C, Block C, Janknecht R, Wittinghofer A. Nat. Struct. Biol., 1996, 3(8): 723-729
- 7 Hamad N M, Elconin J H, Karnoub A E, Bai W, Rich J N, Abraham R T, Der C J, Counter C M. Genes Dev., 2002, 16(16): 2045–2057
- 8 YANG Xu-Guang , XU Xiao-Yu , LI Jia-Huang , YAO Qi-Zheng , ZHU Tong-Yang , HUA Zi-Chun , ZHENG Wei-Juan. Chinese J. Anal. Chem. , 2012 , 40(3): 365-370
 - 杨旭光,徐晓煜,李家璜,姚其正,朱彤阳,华子春,郑伟娟.分析化学,2012,40(3):365-370
- 9 XU Ming-Fang , DAI Jin-Feng , XIANG Ming-Xia , CHENG Xi-Fei , ZENG Xiao-Cong , WAN Cong-Qing , ZHOU Wei-Jun. Chinese J. Anal. Chem. , 2014 , 42(4): 501-506
- 徐明芳,戴金凤,向明霞,成希飞,曾晓琮,万丛庆,周卫军.分析化学,2014,42(4):501-506
- 10 Otwinowski Z , Minor W. Methods. Enzymol. , 1997 , 276: 307-326
- 11 Schneider T R , Sheldrick G M. Acta Crystallogr. D , 2002 , 58(10): 1772-1779
- 12 Guss J M , Merritt E A , Phizackerley R P , Hedman B , Murata M , Hodgson K O. Science , 1988 , 241(4867): 806-811
- 13 Perrakis A , Harkiolaki M , Wilson K S , Lamzin V S. Acta Crystallogr. D , 2001 , 57(10): 1445-1450
- 14 Emsley P, Lohkamp B, Scott W G, Cowtan K. Acta Crystallogr. D, 2010, 66(4): 486-501
- 15 Adams P D, Grosse-Kunstleve R W, Hung L W, Ioerger T R, McCoy A J, Moriarty N W, Read R J, Sacchettini J C, Sauter N K, Terwilliger T C. Acta Crystallogr. D, 2002, 58(11): 1948–1954
- 16 Murshudov G N , Vagin A A , Dodson E J. Acta Crystallogr. D , 1997 , 53(3): 240-255
- 17 Davis I W, Leaver-Fay A, Chen V B, Block J N, Kapral G J, Wang X, Murray L W, Arendall III W B, Snoeyink J, Richardson J S, Richardson D C. Nucleic. Acids Res., 2007, 35(2): 375–383
- 18 Bunney T D , Harris R , Gandarillas N L , Josephs M B , Roe S M , Sorli S C , Paterson H F , Rodrigues-Lima F , Esposito D , Ponting C P , Gierschik P , Pearl L H , Driscoll P C , Katan M. Mol. Cell. , 2006 , 21(4): 495–507
- 19 Ragain C M, Newberry R W, Ritchie A W, Webb L J. J. Phys. Chem. B, 2012, 116(31): 9326-9336
- 20 Harvey J J. Nature , 1964 , 204(4963) : 1104-1105
- 21 Colicelli J. Sci. Stke , 2004 , 2004(250): RE13

- 22 Xu G F , Lin B , Tanaka K , Dunn D , Wood D , Gesteland R , White R , Weiss R , Tamanoi F. Cell , 1990 , 63 (4) : 835-841
- 23 Martin G A, Viskochil D, Bollag G, McCabe P C, Crosier W J, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon R M, Innis M A, McCormick F. Cell, 1990, 63(4): 843-849
- 24 Ballester R , Marchuk D , Boguski M , Saulino A , Letcher R , Wigler M , Collins F. Cell , 1990 , 63(4): 851-859
- 25 Shinohara N, Ogiso Y, Tanaka M, Sazawa A, Harabayashi T, Koyanagi T. J. Urol, 1997, 158(3): 908-911
- 26 Ferro E , Trabalzini L. Cell. Signal. , 2010 , 22: 1804-1810
- 27 Johnson D S , Chen Y H. Curr. Opin. Pharmacol. , 2012 , 12: 458-463
- 28 Kishida S, Koyama S, Matsubara K, Kishida M, Matsuura Y, Kikuchi A. Oncogene, 1997, 15: 2899-2906
- 29 Matsubara K , Kishida S , Matsuura Y , Kitayama H , Noda M , Kikuchi A. Oncogene , 1999 , 18: 1303-1310

Determination of Human Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator Ras Binding Domain by X-ray Diffraction

HUANG Xue-Ying¹, LEI Ming², SHEN Yang³, ZHANG Wei², LIU Yan-Li², LIU Ke², ZHAO Hao-Bin², QI Chao^{* 2}

¹(College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

²(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology,

College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

³(Structural Genomics Consortium, University of Toronto, 101 College St., Toronto, Ontario, Canada M5G 1L7)

Abstract The Ras binding domain (RBD) is a highly conserved domain in the C-terminal region of Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RalGDS) , which functions as cross-linking domain between Ras and Ras-related proteins. Crystallization was setup using in situ proteolysis method of sitting drops with Red Wings and SGC-I screens. Crystals suitable for X-ray diffraction analysis were obtained by mixing equal volumes of the protein solution and the reservoir solution [2 mol/L (NH_4) $_2SO_4$, 0. 2 mol/L NaAc, 0. 1 mol/L N-hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid (HEPES), 5% 1 β -methyl-propanediol (MPD), pH 7.5] with 1:100 (w/w) endoproteinase Glu-C. The differences of Ras-interacting regions between the mouse and human RalGDS-RBD were revealed by X-ray diffraction analysis and the results showed that the differences were mainly on the C-terminal of Ras-interacting region. Glu₈₃₈ and Glu₈₄₀ amino acid residues of human RalGDS-RBD involve in the formation of hydrogen bonds between RalGDS and Asp₈₂₂. The overall structure of human RalGDS-RBD adopts an ubiquitin-like conformation , which is characterized by a $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -type tertiary structure , and the C-terminal residues of one monomer form parallel β -sheet interaction with the β -strand of another molecule.

Keywords Ral guanine nucleotide dissociation stimulator; Ras binding domain; Ras protein

(Received 29 January 2015; accepted 17 March 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20772040, 31300629)