

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002829

VAV2 蛋白 DH 结构域与 CDC42 蛋白相互作用的亲和力和热力学参数研究

何诗雨¹, 串俊兰², 杨正林¹

(1. 西南医科大学临床医学院, 泸州 646000; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院分子遗传中心, 成都 610072)

【摘要】目的:利用等温滴定热技术研究 VAV2 蛋白的 DH 结构域(VAV2-DH)与 CDC42 的相互作用。**方法:**首先分别将 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的编码基因克隆至 pGEX-6p-1 和 pET28a 载体上, 构建 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的重组表达载体。再将重组表达载体转入大肠杆菌中诱导表达蛋白, 并亲和层析、凝胶过滤层析纯化得到 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白, 最后利用鸟嘌呤核苷酸交换试验来验证 VAV2-DH 的鸟苷酸交换活性, 并采用等温滴定热技术检测这 2 种蛋白质相互作用的亲和力和热力学参数。**结果:**VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的平衡解离常数 $K_D=(11.44 \pm 2.12) \mu\text{mol/L}$, 其中摩尔结合焓 $\text{DH}=(-224.33 \pm 95.48) \text{kJ/mol}$, $-\text{TDS}=(195.97 \pm 95.95) \text{kJ/mol}$, 吉布斯自由能 $\text{DG}=(-28.30 \pm 0.49) \text{kJ/mol}$ 。**结论:**VAV2-DH 和 CDC42 蛋白属于中等强度的相互作用, 是一个焓驱动的结合过程。

【关键词】VAV2; CDC42; 鸟嘌呤核苷酸交换因子; 蛋白相互作用; 等温滴定热法

【中图分类号】Q71

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-12-24

Affinity and thermodynamic parameters of interaction between DH domain of VAV2 protein and CDC42 protein

He Shiyu¹, Chuan Junlan², Yang Zhenglin¹

(1. School of Clinical Medicine, Southwest Medical University; 2. Molecular Genetics Center, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Science)

【Abstract】Objective: To study the interaction between the DH domain of VAV2 protein(VAV2-DH) and CDC42 by isothermal titration calorimetry. **Methods:** The coding sequences of VAV2-DH and CDC42 were cloned into pGEX-6p-1 or pET28a vectors to construct recombinant prokaryotic expression plasmids. Purified proteins were obtained by prokaryotic expression, affinity chromatography and gel filtration chromatography. Then GEF assay and isothermal titration calorimetry were employed to detect the affinity and thermodynamic parameters of the interaction between VAV2-DH and CDC42. **Results:** Moderate binding affinity was recorded between VAV2-DH and CDC42 with a K_D value of $(11.44 \pm 2.12) \mu\text{mol/L}$, in which the molar binding enthalpy $\text{DH}=(-224.33 \pm 95.48) \text{kJ/mol}$, $-\text{TDS}=(195.97 \pm 95.95) \text{kJ/mol}$, and Gibbs free energy $\text{DG}=(-28.30 \pm 0.49) \text{kJ/mol}$. **Conclusion:** VAV2-DH and CDC42 protein interact with each other with moderate intensity, which is an enthalpy-driven binding process.

【Key words】VAV2; CDC42; guano-sinucleotide exchange factor; protein interaction; isothermal titration calorimetry

VAV2 是 VAV 家族蛋白(VAV1、VAV2、VAV3)的一员^[1], 几乎表达于所有组织^[2], 并且在各个发育阶段被检测到^[3]。其在细胞内参与细胞形态及肌动蛋白细胞骨架的组织形成^[4]、生长因子向细胞骨架的信号转导, 在血管生成和一氧化氮介导的血管舒张过程中也有很重要的作用^[5]。VAV2 在多种肿瘤

细胞和组织中高表达, 包括肺癌、甲状腺乳头状癌和乳腺癌等, 参与肿瘤细胞丝状伪足、片状伪足及膜褶皱的形成, 调控肿瘤细胞迁移和侵袭^[6-8]。在肿瘤细胞的侵袭性表型形成过程中, CDC42 蛋白通过促进肿瘤细胞内肌动蛋白的聚集使细胞骨架重新分布, 使肿瘤细胞长出伪足并发生迁移^[9-10]。CDC42 蛋白在 GTP 结合状态(激活)和 GDP 结合状态(失活)之间循环^[11]。VAV2 蛋白可以促进 GTP 结合到 CDC42 蛋白上, 发挥鸟嘌呤核苷酸交换因子(guano-sinucleotide exchange factors, GEFs)的作用, 使得

作者简介: 何诗雨, Email: tania_hsy@126.com,

研究方向: 临床检验诊断学。

通信作者: 杨正林, Email: zliny@yahoo.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20210513.2144.064.html>

(2021-05-17)

CDC42 蛋白被激活。CDC42 蛋白激活后作用于 Wiskott-Ardrich 综合征蛋白及其效应蛋白 Arp2/3 复合物,促进肌动蛋白装配形成伪足,使得肿瘤细胞具备侵袭能力^[12-14]。

虽然体外实验已经表明,VAV2 蛋白能直接促进 CDC42 蛋白上鸟苷酸的交换,但蛋白与蛋白之间的亲和力范围很宽,可以从微摩尔级别到皮摩尔级别^[15],不同亲和力范围的蛋白相互作用适用的药物开发策略不同。通过检索文献,发现 VAV2 蛋白与 CDC42 蛋白相互作用过程中的亲和力及热力学参数尚未见报道,研究 VAV2 蛋白与 CDC42 蛋白相互作用过程不仅有利于深入认识二者相互作用过程中可能发生的构象变化,还能为基于二者相互作用的药物开发提供数据参考。

等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)是一种无须标记的、测量生物分子之间相互作用的生物物理技术,可以应用于蛋白质-配体、蛋白质-蛋白质、DNA-蛋白质、蛋白质-碳水化合物、蛋白质-脂质和抗原-抗体结合过程^[16-17]。ITC 不仅可以测量 2 种生物分子之间的结合解离常数,判断二者之间的亲和力,还可以直接测量生物过程中的结合能量变化。本研究通过 ITC 记录 VAV2 蛋白和 CDC42 蛋白相互作用之间的量热曲线,同时提供热力学和动力学信息^[18],计算获得 VAV2 与 CDC42 蛋白相互作用完整的热力学参数(包括平衡解离常数、焓变、熵变和吉布斯自由能变化),为基于 VAV2 与 CDC42 蛋白相互作用的抗肿瘤治疗手段的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

含有人源 VAV2 和 CDC42 的 cDNA 序列质粒购于 Origene 公司(VAV2-pcmv6-entry、CDC42-pcmv6-entry);pGEX6P-1 载体购于长沙优宝生物科技有限公司;大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 菌株、PCR 产物回收试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;PrimerStar 聚合酶和 T4 连接酶购于日本 Takara 公司;限制性内切酶购于 NEB(New England Biolabs)公司;质粒小量提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;Amicon[®]

Ultra-4 浓缩管购自密理博中国有限公司;谷胱甘肽琼脂糖凝胶介质、Ni-琼脂糖凝胶介质以及分子筛层析柱 Superdex75 100/300 GL 购于美国 GE 公司;UEV 25D 蛋白纯化仪购自永联生物科技有限公司;引物合成和 DNA 序列分析由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白重组表达载体的构建

从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)数据库查询得到人源 VAV2 蛋白全长 cDNA 序列,利用 Phyre2 网站进行蛋白质二级结构预测,截取 DH 结构域蛋白序列(VAV2-DH),利用 Primer3 设计引物序列。以 VAV2-pcmv6-entry 为模板,使用 Primer-Star 聚合酶扩增 VAV2-DH 的编码序列。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后用 PCR 产物回收试剂盒回收,将 PCR 扩增产物及空白 pGEX-6p-1 质粒用限制性内切酶 BamH I-HF/Xho I 于 37 $^{\circ}$ C 酶切。酶切产物用 DNA 回收试剂盒回收后,使用 T4 连接酶 4 $^{\circ}$ C 过夜连接。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中,涂布于含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 16 h 左右。挑取单克隆菌落经菌落 PCR 鉴定出阳性克隆后,经测序验证得到 VAV2-DH 的重组表达质粒(VAV2-DH-pGEX-6p-1)。CDC42 蛋白(1-181 aa)的编码序列按照上述方法经 Nco I 和 Xho I 酶切后克隆至 pET28a 载体中,得到 C 端带有 His 标签的 CDC42 蛋白重组表达载体 CDC42-pET28a,引物序列及限制性内切酶位点详见表 1。

1.3 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的诱导表达

将构建好的重组表达载体 VAV2-DH-pGEX-6p-1、CDC42-pET28a 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,分别涂布于含有氨苄青霉素或卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养 16 h。分别挑取单克隆菌落至含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素或 60 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养得到种子液。第 2 天将 10 mL 种子液接种至 1 L 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素或 60 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基,于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值 0.4-0.6,将摇床温度降至 16 $^{\circ}$ C,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,于 16 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导表达 16 h。诱导表达结束后,于 7 548g 离心 20 min 收集菌体,放置-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的纯化

1.4.1 亲和层析 由于 VAV2-DH 蛋白的 N 端带有谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase,GST)标签,因此通过 GST 亲和层析对 VAV2-DH 蛋白进行纯化。将冻存菌液充分悬浮于 Buffer A(500 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCL pH 8.0,10%甘油,1 mmol/L DTT)中,用细胞破碎机裂解菌液,裂解后的菌液于 4 $^{\circ}$ C、17 418g 离心 30 min 收集上清液。将蛋白

表 1 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白编码序列扩增引物及限制性内切酶位点

| 重组表达质粒 | 正向引物 | 反向引物 | 限制性内切酶位点 |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|
| VAV2-DH-pGEX-6p-1 | CGCGGATCCaactgaagatgacaagaggaaactgc | CCGCTCGAGTTAagaactctgaaattcctgca | BamH I/Xho I |
| CDC42-pET28a | CATGCCATGGGCatgcagacaattaagtgtgtgt | CCGCTCGAGcggttctggaggctccag | Nco I/Xho I |

注:引物序列中大写字母为限制性内切酶位点序列及保护碱基

上清液与预先用 Buffer A 平衡的谷胱甘肽琼脂糖凝胶 (sepharose 4 fast flow) 介质于 4℃ 结合, 1 h 后让蛋白上清液从层析柱中流出, 并用 Buffer A 洗涤柱上的杂蛋白, 再用 Buffer B (50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10% 甘油, 1 mmol/L DTT) 对层析柱中溶液进行置换。最后加入 5 mL Buffer B 与 600 μ L 的 PPase (1 mg/mL) 于 4℃ 过夜酶切去除 GST 标签, 再用 Buffer B 洗脱去除 GST 标签后的 VAV2-DH 蛋白, 用于进一步纯化。

CDC42 蛋白的 C 端携带 His 标签, 因此可以经 Ni 柱亲和层析纯化 CDC42 蛋白。将冻存菌液充分悬浮于 Buffer C (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH 7.4) 中, 用细胞破碎机裂解菌液, 裂解后的菌液于 4℃、17 418g 离心 30 min 收集上清液。将蛋白上清液与预平衡的 Ni-琼脂糖凝胶介质于 4℃ 结合 1 h 后, 用含有 20 mmol/L 咪唑的 Buffer C 洗涤柱上的杂蛋白, 再用含有 200 mmol/L 咪唑的 Buffer C 洗脱得到 CDC42 蛋白用于下一步纯化。

1.4.2 凝胶过滤层析 将 1.4.1 项下所得蛋白样品用 Amicon® Ultra-4 浓缩管浓缩至适当体积后, 利用凝胶过滤层析柱 (Superdex75 100/300 GL) 进一步分离纯化。分子筛层析纯化过程在 UEV 25D 蛋白纯化仪上完成, 层析缓冲液为 Buffer D (100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0), 流速为 0.8 mL/min。根据洗脱图谱, 收集 VAV2-DH 蛋白、CDC42 蛋白, 经 SDS-PAGE 检测分析并用 Nanodrop 测定蛋白的浓度。

1.5 鸟苷酸交换活性实验

取 2.5 μ mol/L VAV2 蛋白与 2.5 μ mol/L 荧光标记 GDP 结合的 CDC42 蛋白置于缓冲液 Buffer F (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 3 mmol/L DTT, 5 mmol/L MgCl_2 , pH 8.0) 中。另外取同等体积的缓冲液与 2.5 μ mol/L 荧光标记 GDP 结合的 CDC42 蛋白作为阴性对照。将上述 2 组样品加入酶标板中, 再加入 100 μ L 未标记的 GTP 开始鸟苷酸交换反应。在 Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher scientific) 酶标板中设置激发光波长为 360 nm, 发射波长为 440 nm, 读取每个样品的相对荧光强度。每隔 20 s 读取一次相对荧光强度, 总共检测 180 次, 共计 60 min。

1.6 等温滴定量热法检测 VAV2-DH 与 CDC42 蛋白的相互作用

将 VAV2-DH 蛋白和 CDC42 蛋白用 Buffer D 分别稀释至 0.66 mg/mL 和 6.9 mg/mL, 于 4℃、12 000g 离心 10 min 除去气泡后, 使用 MicroCal PEAQ-ITC 等温滴定量热仪检测 CDC42 与 VAV2-DH 的相互作用。等温滴定量热仪的样品池中加入 300 μ L VAV2-DH 蛋白, 注射器中吸取 60 μ L CDC42 蛋白。设置初始延迟时间为 60 s, 共滴定 19 次, 首次滴定体积为 0.4 μ L, 其余滴定体积为 2 μ L, 2 次滴定的间隔时间为 150 s, 反应温度为 25℃。阴性对照组则将注射器中吸取相同体积的缓冲液, 其余操作步骤相同。实验结果由 Malvern 提供的 MicroCal PEAQ-ITC V1.21 软件通过分析滴定曲线得到结合等温线, 并测定 VAV2-DH 与 CDC42 蛋白平衡解离

常数 (K_D)、摩尔结合焓 (DH)、摩尔结合熵 (DS) 和吉布斯自由能 (DG) 等其他热力学参数。

2 结果

2.1 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白重组表达载体的构建

VAV2 蛋白的 DH 结构域对应第 194~392 位氨基酸残基, 因此本研究截取这段蛋白, 设计合成特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物长度为 500~750 bp, 与理论长度 597 bp 一致 (图 1A)。PCR 产物经酶切、连接至 pGEX-6p-1 质粒、转化, 采用 pGEX-6p-1 通用引物进行菌落 PCR 验证, 阳性克隆的菌落 PCR 产物条带与预期相符 (图 1B), 经 DNA 测序验证表明重组表达载体 DH-pGEX-6p-1 构建成功^[9]。由于 CDC42 蛋白的最后几个氨基酸参与跟脂质基团结合^[20], 不利于在大肠杆菌中表达, 因此本研究截取 CDC42 蛋白的最后几个氨基酸, 仅表达第 1~181 位氨基酸。同样, CDC42 编码序列扩增, 正向引物选用 pET28a 的通用引物, 反向引物选用表 1 中 CDC42 的特异性反向引物进行菌落 PCR, 阳性克隆 PCR 产物条带与理论长度 543 bp 一致 (图 2)。

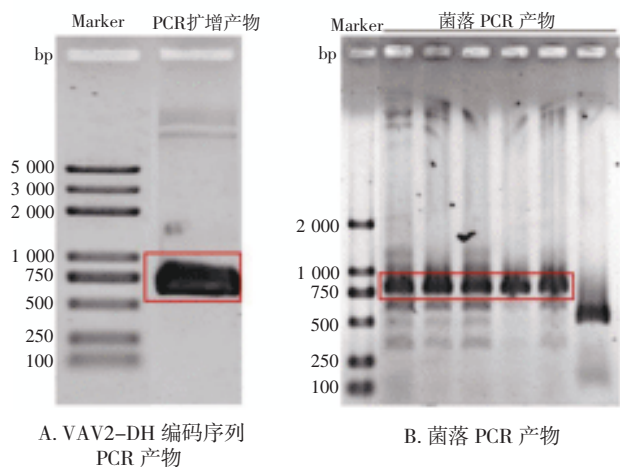


图 1 VAV2-DH 编码序列 PCR 产物及菌落 PCR 产物电泳图

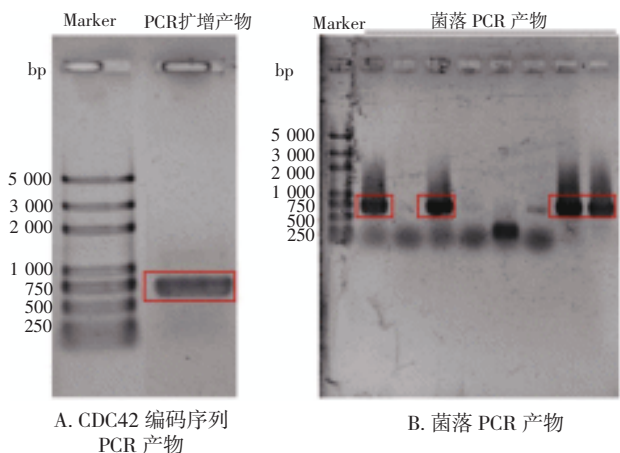


图 2 CDC42 编码序列 PCR 产物及菌落 PCR 产物电泳图

2.2 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的纯化

在蛋白过量表达过程中,引入标签蛋白有助于利用亲和层析纯化目的蛋白。原核表达系统中常用的标签蛋白有 His 标签、GST 标签、麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)标签等。比较大的标签蛋白不仅有利于蛋白的纯化,还能促进目的蛋白的可溶表达和折叠;在标签蛋白和目的蛋白之间引入酶切位点(如 PPase 酶切位点、Thrombin 酶切位点、Factor Xa 酶切位点),又可以利用蛋白酶切除标签蛋白。VAV2-DH 蛋白经 PPase 切除 GST 标签蛋白后,用 Superdex75 100/300 GL 进行凝胶过滤层析进行进一步纯化,VAV2-DH 蛋白在柱上的保留体积为 11.54 mL。按照 Superdex75 100/300 GL 柱的说明书,该保留体积位于卵清蛋白(43 kD)和核糖核酸酶 A(13.7 kD)的保留体积之间,与其理论分子质量 23.7 kD 一致,表明切除 GST 标签后的 VAV2-DH 蛋白以单体形式存在(图 3)。而 C 端带有 His 标签的 CDC42 蛋白用 Superdex75 100/300 GL 进行凝胶过滤层析后进一步纯化,在柱上的保留体积为 11.84 mL,与其理论分子质量 21.1 kD 也一致(图 4)。根据 SDS-PAGE 结果,本研究纯化得到的 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白纯度都比较高,并且在溶液中以单体形式存在。

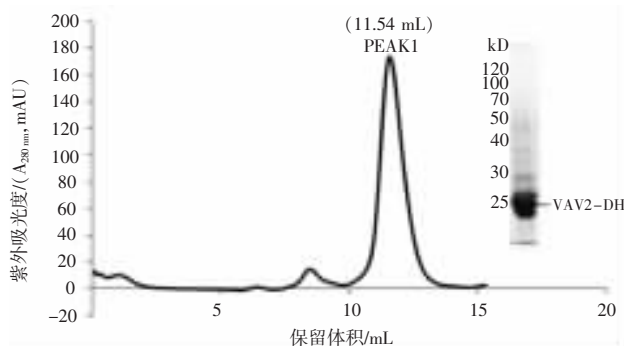


图 3 VAV2-DH 蛋白凝胶过滤层析和 SDS-PAGE 图谱

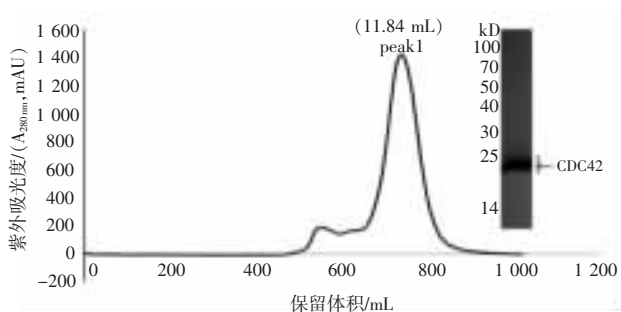


图 4 CDC42 蛋白凝胶过滤层析和 SDS-PAGE 图谱

2.3 体外鸟嘌呤核苷酸交换活性

以与体系中初始荧光强度的相对荧光强度百分比为纵坐标,以时间为横坐标,绘制 VAV2 蛋白 DH 结构域的鸟嘌呤核苷酸交换活性曲线图。VAV2 蛋白是 Dbl 家族鸟嘌呤核苷酸交换因子的成员之一,VAV2 蛋白的 DH 结构域(VAV2-DH)在体外对 RhoA、Rac1 和 CDC42 蛋白都表现出了鸟嘌呤核苷酸交换活性^[4,21]。当 VAV2 蛋白与带有荧光标记的 GDP 结合的 CDC42 蛋白共同孵育时,随着时间的增加,检测到的荧光强度逐渐减弱,

表明在 VAV2-DH 的作用下,CDC42 蛋白中的 GDP 逐步交换为 GTP,本研究所制备的 VAV2-DH 蛋白具有鸟嘌呤核苷酸交换活性(图 5)。

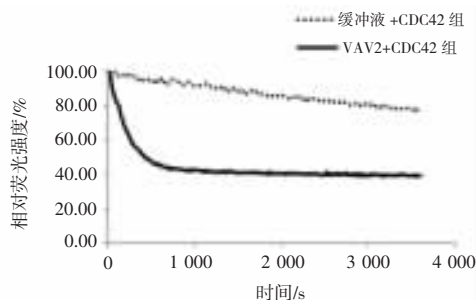


图 5 VAV2 蛋白 DH 结构域的鸟嘌呤核苷酸交换活性曲线

2.4 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的相互作用

与阴性对照相比(图 6B),利用等温滴定量热法测定 VAV2-DH 和 CDC42 的相互作用发现,二者之间有明显的相互作用(图 6A)。重复 3 次滴定试验得到 VAV2-DH 和 CDC42 的结合平衡解离常数 $K_D(11.44 \pm 2.12) \mu\text{mol/L}$ 、摩尔结合焓 $\Delta H(-224.33 \pm 95.48) \text{kJ/mol}$ 、 $-\text{TDS}(195.97 \pm 95.95) \text{kJ/mol}$ 、吉布斯自由能 $\Delta G(-28.30 \pm 0.49) \text{kJ/mol}$ 。VAV2-DH 与 CDC42 相互作用强度为 10^{-5}mol/L ,表明二者之间属于中等强度的相互作用^[8]。其中 VAV2-DH 与 CDC42 相互作用时吉布斯自由能 ΔG 的值小于 0,表明反应能自发进行。其中对反应贡献最大的是摩尔结合焓 ΔH ,熵变对于 VAV2-DH 与 CDC42 结合不利,表明 VAV2-DH 与 CDC42 的结合是焓驱动的过程,二者结合过程中可能引起 2 种蛋白中一些无序的区域重新折叠,使得二者的复合物更加稳定^[8]。

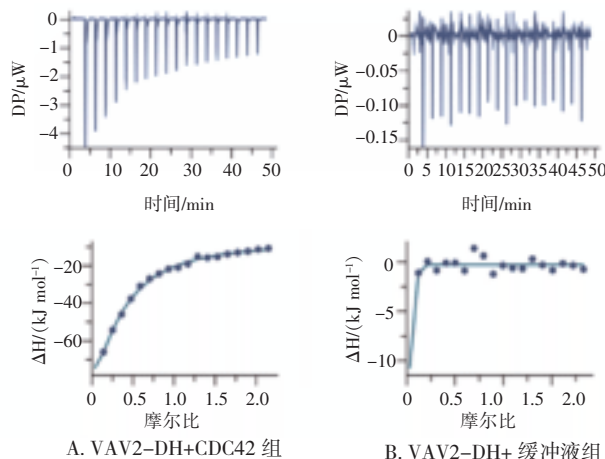


图 6 VAV2-DH 与 CDC42 相互作用的等温滴定曲线

3 讨论

本研究构建了 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的原核表达体系,并在体外表达纯化得到了高纯度的蛋白。体外的鸟嘌呤核苷酸交换活性实验表明,VAV2-DH 蛋白在体外能有效促进 CDC42 蛋白上的 GDP 交换为

GTP,即本研究纯化得到的 VAV2-DH 蛋白具有活性的。等温滴定量热法检测发现 VAV2-DH 与 CDC42 的平衡解离常数为 10^{-5} mol/L,表明二者之间属于中等强度相互作用。VAV2-DH 与 CDC42 的结合主要受焓变驱动,可能是这 2 种蛋白中一些无序的区域发生构象变化导致的,因此可以设计一些小分子靶向这些无序的区域,以此干扰 VAV2-DH 与 CDC42 的相互作用。

除了促进 CDC42 蛋白中的鸟苷酸交换以外, VAV2 蛋白还可以激活 Rho 家族小 GTP 酶中的 RhoA、Rac1 蛋白^[21]。VAV2 蛋白是如何实现识别 Rho 家族 3 种小 GTP 酶,以及优先识别 Rho 家族哪一种小 GTP 酶还不清楚。本研究只测定了 VAV2-DH 和 CDC42 蛋白的亲合力,还需要进一步比较 VAV2-DH 与 Rho 家族其他小 GTP 酶的亲合力,才能更清楚地解答这个问题。另外,由于 VAV2 蛋白可以促进 RhoA、Rac1 和 CDC42 蛋白中 GDP 和 GTP 的交换,但目前只报道了 VAV1 蛋白与 Rac1 蛋白的三维结构^[22-23],VAV 家族蛋白如何识别 RhoA 和 CDC42 蛋白还不清楚,研究 VAV 家族蛋白与这 2 种小 GTP 酶的复合物结构,不仅能阐明 VAV 家族蛋白识别不同小 GTP 酶的机制,还可通过了解如何调节 RhoA-GTP 活性形式和 RhoA-GDP 非活性形式在细胞内的不断转换和循环,从而调节肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,也将有助于设计抑制 VAV 家族蛋白活性的小分子应用于肿瘤治疗。

当然,VAV2 基因 DH 结构域的致病突变与 CDC42 相互作用的强度以及其鸟嘌呤核苷酸交换活性是否改变,这样的改变是否是致病原因或疾病发展的重要环节,仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Tamás P, Solti Z, Bauer P, et al. Mechanism of epidermal growth factor regulation of VAV2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(7): 5163-5171.
- [2] 杨永昌. VAV 蛋白在免疫系统中的作用[J]. *国际儿科学杂志*, 2020, 47(1): 47-50.
- [3] Bustelo XR. Regulatory and signaling properties of the VAV family[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(5): 1461-1477.
- [4] Abe K, Rossman KL, Liu B, et al. VAV2 is an activator of CDC42, Rac1, and RhoA[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10141-10149.
- [5] Bustelo XR. VAV family exchange factors: an integrated regulatory and functional view[J]. *Small GTPases*, 2014, 5(2): 9.
- [6] Havel LS, Kline ER, Salgueiro AM, et al. Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity[J]. *Oncogene*, 2015, 34(15): 1979-1990.
- [7] Hu JG, Meng Y, Zeng JH, et al. Ubiquitin E3 Ligase MARCH7 promotes proliferation and invasion of cervical cancer cells through VAV2-Rac1-CDC42 pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2): 2312-2318.
- [8] Li JJ, Sun ZJ, Yuan YM, et al. EphB3 stimulates cell migration and metastasis in a kinase-dependent manner through VAV2-Rho GTPase axis in papillary thyroid cancer[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(3): 1112-1121.
- [9] Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors[J]. *Cell*, 1992, 70(3): 389-399.
- [10] Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, et al. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling[J]. *Cell*, 1992, 70(3): 401-410.
- [11] Maldonado MDM, Dharmawardhane S. Targeting Rac and CDC42 GTPases in cancer[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(12): 3101-3111.
- [12] Barrio-Real L, Kazanietz MG. Rho GEFs and cancer: linking gene expression and metastatic dissemination[J]. *Sci Signal*, 2012, 5(244): pe43.
- [13] Bonnefoy-Bérard N, Munshi A, Yron I, et al. VAV: function and regulation in hematopoietic cell signaling[J]. *Stem Cells*, 1996, 14(3): 250-268.
- [14] Swat W, Fujikawa K. The VAV family: at the crossroads of signaling pathways[J]. *Immunol Res*, 2005, 32(1/2/3): 259-265.
- [15] Ghai R, Falconer RJ, Collins BM. Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research: survey of the literature from 2010[J]. *J Mol Recognit*, 2012, 25(1): 32-52.
- [16] Velázquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, et al. Isothermal titration calorimetry[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2004, 23(1): 1-24.
- [17] Tanwar HS, Khoo KK, Garvey M, et al. The thermodynamics of Pr55Gag-RNA interaction regulate the assembly of HIV[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(2): e1006221.
- [18] Velázquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1278: 183-204.
- [19] 格林, 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 4 版. 贺福初, 陈薇, 杨晓明, 译. 北京: 科学出版社, 2013.
- [20] Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 8): 1301-1312.
- [21] Liu BP, Burridge K. VAV2 activates Rac1, CDC42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta 1 integrins[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(19): 7160-7169.
- [22] Chrencik JE, Brooun A, Zhang H, et al. Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential VAV1[J]. *J Mol Biol*, 2008, 380(5): 828-843.
- [23] Rapley J, Tybulewicz VL, Rittinger K. Crucial structural role for the PH and C1 domains of the VAV1 exchange factor[J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(7): 655-661.

(责任编辑: 唐秋姗)