

法尼基化修饰与法尼基转移酶抑制剂*

黄凌雯¹ 黄 浩^{1,2**}

(1 福建师范大学生命科学学院 福建福州 350117 2 福建省发育与神经生物学重点实验室 福建福州 350117)

摘要 法尼基化是一种广泛存在于真核细胞中的异戊二烯化修饰形式,作为一种翻译后修饰,能使被修饰蛋白锚定到胞膜上,对正常生命活动的维持十分重要。法尼基转移酶的活性与丁型肝炎病毒复制、实体肿瘤增殖与转移、遗传疾病和神经退行性疾病关系密切。以法尼基转移酶为疾病新靶标的法尼基转移酶抑制剂研究逐渐引起关注。综述了法尼基化修饰和法尼基转移酶的研究,探讨了法尼基转移酶抑制剂在临床疾病研究和治疗的应用。

关键词 法尼基化修饰 异戊二烯化 法尼基转移酶 法尼基转移酶抑制剂

中国图书分类号:Q28 文献标识码:A

丁型肝炎是由丁型肝炎病毒(Hepatitis D Virus, HDV)引起的最严重的一种人类病毒性肝炎。HDV只在乙型肝炎患者协同感染时发生,会引发比乙型肝炎更严重的肝脏疾病,并且会加快肝纤维化、肝癌和肝功能衰竭,导致死亡。目前,临床上尚无有效针对HDV的治疗药物。近期研究发现HDV在宿主肝细胞中进行复制必须经历一个法尼基化过程,而法尼基转移酶是其中的关键酶。2018年底,一种名为Lonafarnib的药物作为治疗人类丁型病毒性肝炎的首创新药,被美国食品和药品管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)分别授予突破性药物资格(BTD)和优先药物资格(PRIME)。Lonafarnib究竟有

什么特别之处能获得FDA和EMA的青睐? Lonafarnib和法尼基化与法尼基转移酶又有什么联系? 笔者将解开其中的关键秘密。

1 法尼基化修饰

1.1 法尼基与法尼基转移酶 法尼基是一种倍半萜类物质,在甾类化合物的生物合成过程的甲羟戊酸途径生成,通常以法尼基化焦磷酸(FPP)的形式出现。FPP含有15个碳基,法尼基转移酶(FTase)可识别FPP,既可将FPP合成为鲨烯(30个碳基),进一步合成胆固醇;也可将FPP加到靶蛋白上,使其法尼基化,从而锚定到细胞膜发挥作用^[1]。FPP的法尼基是FTase特异的底物之一,另

准定制合成.前沿科学,2018,12(1):55.

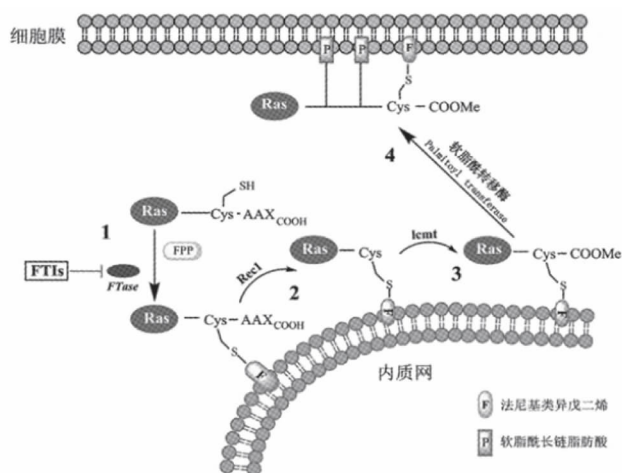
- [3] Smith H O, Hutchison C A 3rd, Pfannkuch C, *et al.* Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2003,100(26):15440.
- [4] Gibson D G, Glass J I, Lartigue C, *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010,329(5987):52.
- [5] Hutchison C A 3rd, Chuang R Y, Noskov VN, *et al.* Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, 2016, 351(6280):aad6253.
- [6] 柴梦哲,贾斌,李炳志,等.人工基因组合成与重排研究进展. *生命科学*,2019,31(4):364.
- [7] Annaluru N, Muller H, Mitchell L A, *et al.* Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*, 2014, 343(6179):1426.
- [8] 李炳志,吴毅,谢泽雄,等.真核生物酿酒酵母长染色体的精
- [9] 黄耀庆,刘夺,贾斌,等.合成型酿酒酵母染色体重排技术及应用. *生物产业技术*,2019(1):62.
- [10] Yangyang S, Ning L, Zhenfang W, *et al.* Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature*, 2018,560(7718):331.
- [11] 薛小莉,覃重军.基因组的设计与工程化构建. *中国科学院院刊*,2018,33(11):1205.
- [12] 杨菊,邓禹.合成生物学的关键技术及应用. *生物技术通报*, 2017,33(1):12.
- [13] 赵国屏.合成生物学:开启生命科学“会聚”研究新时代. *中国科学院院刊*,2018,33(11):1135.
- [14] 中华人民共和国教育部.普通高中生物学课程标准(2017年版).北京:人民教育出版社,2018:30.
- (E-mail: zhaixinhui666@126.com
李会珍:lh15660128270@163.com)

* 基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2019J01278);福建省发育与神经生物学重点实验室开放课题(FJDNBL201903)

** 通信作者

一个底物是含 CAAX 基序的蛋白质,CAAX 基序是位于碳末端的特殊序列,C 指半胱氨酸残基;A 指脂肪族氨基酸;X 代表任意氨基酸,由它决定底物的特异性^[2]。人体中最早被鉴定出含有 CAAX 基序的 FTase 底物蛋白质是 Ras 家族蛋白,此外还有 Rho、Rac 和 Rap 蛋白等。

1.2 法尼基化修饰 蛋白质的异戊二烯化修饰是一种重要的蛋白质翻译后修饰,广泛存在于真核细胞中,主要分为香叶基香叶基化修饰(GGPP)和法尼基化修饰(FPP)2种,分别由相应的转移酶 GGTase 和 FTase 催化完成。这2种转移酶均能识别含有 CAAX 基序的蛋白,X 残基决定了该蛋白是发生法尼基化还是香叶基香叶基化。当 X 为丝氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸和谷氨酰胺时,蛋白发生法尼基化;而当 X 为亮氨酸或异亮氨酸时,该蛋白发生香叶基香叶基化;而当 X 为苯丙氨酸时,蛋白既可发生法尼基化也可发生香叶基香叶基化^[3]。



1.法尼基化,2.蛋白水解,3.甲基化,4.软脂酰化,Cys.半胱氨酸残基,FPP.法尼基化焦磷酸,FTase.法尼基转移酶,FTI.法尼基转移酶抑制剂,Rec1.Ras 内切蛋白水解酶,Icm1.异戊二烯基半胱氨酸羧基甲基转移酶

图1 法尼基化修饰示意图(以 Ras 蛋白为例)

Ras 蛋白是第1个被发现的原癌基因,也是最早被鉴定为法尼基修饰底物的蛋白之一,属单体 GTP 结合蛋白,是细胞信号转导、细胞增殖和分化的关键调节分子。Ras 蛋白法尼基化修饰一般经历连续的4步反应(图1):1)法尼基化。由 FTase 识别 Ras 蛋白 C 端 CAAX 基序(X 为甲硫氨酸或丝氨酸),将 FPP 上的法尼基转到半胱氨酸的残基上;2)蛋白水解。由内切蛋白酶水解切除 C 端的 AAX 三肽;3)甲基化。由蛋白甲基转移酶催化,在半胱氨酸的残基上甲基化;4)软脂酰化。某

些 Ras 蛋白会在离法尼基化半胱氨酸上游的另一个半胱氨酸位点经软脂酰蛋白转移酶催化发生软脂酰化。经过法尼基化修饰后的 Ras 蛋白可极大提高与膜的亲和力,是其正确的膜定位,并完成跨膜细胞信号转导的前提。

2 法尼基化与疾病研究

2.1 恶性肿瘤 Ras 基因的表达产物 K-Ras 蛋白必须经过法尼基化修饰才可定位到细胞膜,进而促进肿瘤的发生。临床资料表明 K-Ras 蛋白的突变与急性淋巴细胞白血病、胰腺癌、骨髓瘤和精原细胞瘤等恶性肿瘤密切相关。Johnston 等^[4]和 Liu 等^[5]利用基因敲除小鼠分别证实了法尼基转移酶在乳腺癌和非小细胞肺癌发生与发展过程中的重要作用。通过抑制法尼基转移酶,Ras 蛋白法尼基化修饰被阻断,使之不能与细胞膜结合,这将成为一种抗肿瘤的新手段。

2.2 慢性病毒性肝炎 HDV 病毒也会利用蛋白质法尼基化攻击宿主。HDV 是由丁型肝炎病毒引起的,与乙型肝炎患者协同感染,会加快肝纤维化、肝癌和肝功能衰竭,是最严重的一种人类病毒性肝炎,目前临床上尚无有效的治疗药物和治疗手段。研究发现,HDV 病毒抗原属于 CAAX 蛋白,在宿主肝细胞中可由宿主 FTase 法尼基化完成病毒复制。前文提及的 Lonafarnib 就是一种以 FTase 为靶点的口服活性抑制剂,通过抑制 FTase 活性将阻断 HDV 病毒的法尼基化,进而阻止病毒繁殖。实验证实,Lonafarnib 在基于小鼠的 HDV 感染模型中清除 HDV 病毒血症非常有效,也正是基于这一结果,Lonafarnib 才能获得 FDA 和 EMA 的青睐。

2.3 血管生成异常 血管生成在血管重构中非常重要,肿瘤生长需要从血管中摄取营养物质,肿瘤血管形成过程中,Rac1(一种癌基因)是血管发生过程中调节内皮细胞迁移的主要信号转导分子。局部出血后,通过诱导 HMG-CoA 还原酶的表达,使 Rac1 法尼基化增多,活性增加,伴随着膜转位,进而促进血管生成^[6]。

2.4 神经系统疾病 法尼基化对神经退行性疾病的影响越来越受到研究者的关注。FTase 参与了帕金森氏病(PD)的发生过程,法尼基化蛋白也在阿尔茨海默症(AD)的发病机制中起重要作用^[7]。研究发现,辛伐他丁可恢复阿尔茨海默症的认知能力,其对长时程增强(LTP)的效果就是通过调

节 FTase 下游分子通路实现的^[8]。这也将成为对 AD 这类神经退行性疾病新的治疗靶点。

2.5 遗传性疾病 编码与法尼基化相关的蛋白和酶的基因的突变是严重遗传性疾病的诱因。例如, Hermansky-Pudlak 综合征 (HPS, 白化病综合征的一种)^[9]、神经变性失调症和早衰综合征等。早衰综合征 (HGPS), 也称早老症 (progeria), 是一种由 LMNA 基因突变引起的罕见遗传疾病。LMNA 基因正常编码一种 CAAX 蛋白——核纤层前体蛋白 A (prolamin A), 法尼基化后可转换为成熟的核纤层蛋白 A (lamin A)。但是当正常 LMNA 基因突变时, 则编码翻译成早老蛋白 (progerin), 法尼基化后在核膜内聚集, 无法脱离核膜, 使细胞核结构和功能受损, 导致 HGPS, 同时诱发多系统障碍, 最终导致早死^[10]。限制性皮肤病 (RD) 是一种更加严重的早衰症疾病, 与 HGPS 类似, RD 是因为缺失了 prolamin A 的加工酶, 使法尼基化的 prolamin A 不能加工为成熟的 lamin A, 进而导致其在核膜内侧积累而诱发细胞核的畸形。最近的研究表明, 通过抑制法尼基转移酶可使 HGPS 和 RD 小鼠的早衰症状得以缓解^[11]。

3 法尼基转移酶抑制剂 (FTI) 的研究

对于干预法尼基化修饰过程, FTase 是一个令人感兴趣的靶点。通过对 FTase 活性的抑制, 将抑制 Ras 蛋白的法尼基化, 使其无法结合到细胞膜上, 从而有效抑制肿瘤生长与转移。然而法尼基转移酶抑制剂 (FTI) 的研究在理论上面临 2 个难题: 一是 FTase 的底物除了突变细胞的 Ras 蛋白外, 也包括正常细胞中的 Ras 蛋白及其他含有 CAAX 基序的蛋白; 二是 FTase 属于异戊二烯转移酶超家族, 此超家族的另一个成员就是 GGTase I, 二者均是由相同分子量的 α 亚基和相似结构的 β 亚基组成的异源二聚体。但近年来的研究结果却令人兴奋: 研究发现突变的 Ras 蛋白对 FTI 特别敏感, FTI 既可防止突变 Ras 蛋白与细胞膜结合, 也可干扰细胞膜上的 Ras 蛋白, 从而阻断肿瘤细胞的生长信号通路, 并可启动细胞凋亡。而对正常细胞来说, 虽然 FTase 也可能受到一定抑制, 但残存的 FTase 活性及其他细胞通路的代偿作用可明显减弱这种影响; 另一方面, 基于 FTase 和 GGTase 对于 CAAX 四肽结构中 X 残基识别的差异, 通过严格控制抑制剂筛选条件, 可避免 FTI 的“误伤”。

3.1 FTI 的分类 目前在研的 FTI 可分为 6 类。1) CAAX 肽类似物, 可与 CAAX 肽竞争性结合 FTase, 从而抑制 FTase 的活性, 例如, L-739750 和 FTI-277; 2) FPP 类似物, 通过与 FPP 竞争性结合 FTase 而抑制 FTase 活性, 例如, R-115777 和手霉素; 3) 双底物抑制剂, 同时与 CAAX 肽和 FPP 竞争性结合 FTase, 例如, BMS-185878 和 BMS-186511; 4) 非肽类似物, 竞争性抑制 FTase 与 CAAX 肽结合部位, 例如, BIM-46068 和 SCH66336; 5) 多酚羟基类化合物, 例如, D-柠檬烯和紫苏乙醇可抑制 FTase 活性或抑制 HMG-CoA 还原酶的合成; 6) 其他微生物来源的 FTI, 例如, 烟曲霉产物中的胶囊素具有抑制 FTase 活性的结构, 以胶囊素为先导物可望开发出高效低毒的 FTI。

3.2 FTI 的检测标志物 临床使用 FTI 时, 通过检测 FTase 活性以决定 FTI 的用量显得十分必要。但是由于存在内源性抑制剂, 很难通过组织提取物分析测量 FTase 的活性, 借助检测一些潜在标志物, 可指导 FTI 的使用剂量。成熟的核纤层蛋白 lamin A 作为核膜的结构成分, 其前体 prolamin A 可成为测定 FTI 活性的有效标志物, 另一种陪伴蛋白 HDJ-2 也可有类似效果。此外, 通过检测下游蛋白, 例如, p21、raf-1、MEK 和 ERK-1 等也可间接反映 FTase 的活性。

3.3 FTI 的临床试验 研究表明, FTI 例如 R115777 和 SCH66366 对化学诱发的啮齿类动物的实质性肿瘤, 例如乳腺癌、胃癌、肺癌和肝癌等有很强的化学预防作用。对 DMBA 和 NMU 诱发的乳腺癌, 其完全康复率超过 80%^[4]。此外 D-柠檬烯在 0.5~5 mmol/L 浓度范围内, 抑制 NIH3T3 细胞 Ras 蛋白的异戊二烯化, 对结肠癌有明显抑制效果, 但不影响其他蛋白的异戊二烯化, 对正常细胞的生长发育无明显影响。此外, D-柠檬烯使 IGF-II 受体的表达增加, 促进 TGF- β 释放, 抑制细胞过度生长, 表现出明显的抗肿瘤效应。

法尼基化在一些寄生虫中是蛋白质修饰的主要形式, 许多寄生虫对蛋白质法尼基化的损伤非常敏感。研究发现原本用作抗癌剂的 FTI 对原生动物寄生虫病也有很好的疗效, 例如疟疾, 特别是由恶性疟原虫引起的疟疾, 这种恶性疟原虫本身就含有 FTase 活性。于是, 一些 CAAX 类似物和二苯甲酮类抑制剂被开发为新型抗疟药物, 其对恶

性疟原虫具有高度毒性,然而对包括人在内的哺乳动物有着良好的耐药性。

由于骨髓增生性疾病、急性髓细胞性白血病(AML)和骨髓增生异常综合征(MDS)等血液恶性肿瘤被证实与 Ras 突变高度相关,因此,以 FTase 为新靶标的临床试验正在用于这些血液恶性肿瘤的治疗^[12]。R115777(zamestra)是选择性抑制 FTase 的药物,其用于乳腺癌和肾癌的治疗正处于 II 期临床试验阶段,用于胰腺癌的研究已处于 II/III 期临床试验阶段。既然 FTase 参与神经疾病的发生过程,通过 FTI 抑制相关蛋白的法尼基化或抑制其相应的信号转导途径,则可能阻止神经元氧化应激引起的神经毒性或减轻其神经病理特征,实现挽救动物神经系统退行性病变,使其重新获得学习与记忆等认识功能。此外,FTI 也被证实对于早衰综合征、哮喘和重症肌无力等疾病具有较好的疗效。

FTI 在多项临床研究中表现的潜在抗癌效果,使之成为未来药物分子设计的新靶点。但是,FTI 的临床前研究也发现一些问题,FPP 类似物形式的 FTI 在抑制突变蛋白的 FTase 的同时也可能会抑制其他以 FPP 为底物的酶,从而导致较大毒性和副作用,由此可能在抑制癌细胞的同时引发其他一些疾病;而双底物抑制剂其分子极性较大,难以透过细胞膜,且结构复杂、合成困难。目前,FTI 的研究热点主要还是聚焦于 CAXX 竞争性抑制剂。此外,虽然实验中大剂量的 FTI 对正常细胞无毒性影响,但其机理并未得到合理阐释,且在某些癌变细胞中出现了耐药现象(例如,一种人 Ftase 的突变体 Y361L^[13])。这些都表明针对 FTI 的临床研究还有相当长的路要走。

4 展望

异戊二烯化作为一种翻译后修饰形式,使被修饰蛋白正确连接到细胞膜或核膜上,对正常生命活动的维持十分重要。而法尼基化是异戊二烯化的重要形式,与肿瘤增殖与转移、遗传早老症和神经退行性疾病密切相关。目前,已发现和合成了许多具有抑制 FTase 活性的化合物,且有些已进入临床试验阶段。未来利用大数据、虚拟筛选等生物信息技术手段寻找低毒高效 FTI 或替代物,将 FTI 与传统的免疫药物、其他靶向治疗药物和机制互补药物合用方案可能成为临床抗癌治疗的优先选择。

主要参考文献

- [1] Shen M, Pan P, Li Y, *et al.* Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: Structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling. *Drug Discovery Today*, 2015, 20(2): 267.
- [2] Gao J, Liao J, Yang G Y. CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis. *American Journal of Translational Research*, 2009, 1(3): 312.
- [3] McTaggart S J. Isoprenylated proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(3): 255.
- [4] Johnston S R, Hickish T, Ellis P, *et al.* Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 21(13): 2492.
- [5] Liu M, Sjogren A K, Karlsson C, *et al.* Targeting the protein prenyltransferases efficiently reduces tumor development in mice with K-RAS-induced lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(14): 6471.
- [6] D'amico G, Robinson S D, Germain M, *et al.* Endothelial-Rac1 is not required for tumor angiogenesis unless alphavbeta3-integrin is absent. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9766.
- [7] Cheng S, Cao D, Hottman D A, *et al.* Farnesyltransferase haploinsufficiency reduces neuropathology and rescues cognitive function in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(50): 35952.
- [8] Mans R A, McMahon L L, Li L. Simvastatin-mediated enhancement of long-term potentiation is driven by farnesyl-pyrophosphate depletion and inhibition of farnesylation. *Neuroscience*, 2012(202): 1.
- [9] Pereira-leal J B, Hume A N, Seabra M C. Prenylation of Rab GTPases: Molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Letters*, 2001, 498(2-3): 197.
- [10] Goldman R D, Shumaker D K, Erdos M R, *et al.* Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(24): 8963.
- [11] Young S G, Meta M, Yang S H, *et al.* Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(52): 39741.
- [12] Kurzrock R, Kantarjian H M, Cortes J E, *et al.* Farnesyltransferase inhibitor R115777 in myelodysplastic syndrome: Clinical and biologic activities in the phase I setting. *Blood*, 2003, 102(13): 4527.
- [13] Morgan M A, Wegner J, Aydiel E, *et al.* Synergistic cytotoxic effects in myeloid leukemia cells upon cotreatment with farnesyltransferase and geranylgeranyl transferase-I inhibitors. *Leukemia*, 2003, 17(8): 1508.

(E-mail: hhuang@fjnu.edu.cn

黄凌雯: 1571826265@qq.com)