

化学介导的14-3-3蛋白翻译后修饰干预: 分子胶设计及其在肿瘤治疗中的应用

吴柳焱, 李龙静, 田于成, 徐倩倩, 韦伟, 李志裕, 卞金磊*

(中国药科大学药学院, 江苏 南京 211112)

摘要: 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interactions, PPIs) 不仅是构建蛋白质复合体的关键途径, 也是维护正常生物功能的基础。这些相互作用对于蛋白质结构及其生物学功能至关重要, 并在细胞的信号传导、代谢途径和调控网络中扮演核心角色。14-3-3蛋白是一种在真核生物中广泛表达的高度保守的功能性蛋白, 主要通过识别并结合其伴侣蛋白参与细胞周期控制、信号转导和能量代谢等关键生命过程。本文综述了14-3-3蛋白与其伴侣蛋白如雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)、RAF原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, C-RAF/RAF-1) 和p53的PPIs失调在肿瘤的发生和发展中的角色, 并集中讨论了14-3-3/ER α 、14-3-3/C-RAF和14-3-3/p53分子胶的研究进展。这些分子胶通过模拟或增强伴侣蛋白的磷酸化丝氨酸位点, 形成与14-3-3蛋白的共价键、盐桥和氢键, 从而提高了PPIs的稳定性, 并有效地干预了病理状态下的蛋白活性与信号传递。此外, 本文还探讨了这种化学干预策略在临床上抑制肿瘤发展的潜力, 为未来的研究方向提供了理论基础和实践指南。

关键词: 14-3-3分子胶; 蛋白-蛋白相互作用; RAF原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; 雌激素受体 α ; p53

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-2953-09

Chemically mediated 14-3-3 protein post-translational modification interference: design of molecular glue and the application in cancer treatment

WU Liu-yi, LI Long-jing, TIAN Yu-cheng, XU Qian-qian, WEI Wei, LI Zhi-yu, BIAN Jin-lei*

(School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211112, China)

Abstract: Protein-protein interactions (PPIs) are not only crucial for the assembly of protein complexes but also fundamental for maintaining normal biological functions. These interactions are vital for protein structure and biological functionality and play a central role in cellular signaling, metabolic pathways, and regulatory networks. The 14-3-3 protein, highly conserved and widely expressed in eukaryotes, primarily recognizes and binds to its partner proteins to participate in essential life processes such as cell cycle control, signal transduction, and energy metabolism. This review discusses the role of dysregulated PPIs between 14-3-3 proteins and their partner proteins such as estrogen receptor α (estrogen receptor α , ER α), RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (C-RAF/RAF-1), and p53 in the onset and progression of tumors, focusing on the research progress of 14-3-3/ER α , 14-3-3/C-RAF, and 14-3-3/p53 molecular glues. These molecular glues, by mimicking or enhancing the phosphorylation sites of serine on partner proteins, form covalent bonds, salt bridges, and hydrogen bonds with 14-3-3 proteins, thereby enhancing the stability of PPIs and effectively intervening in protein activity and signaling

收稿日期: 2024-04-30; 修回日期: 2024-08-15.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82373740).

*通讯作者 E-mail: bianjl@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0418

under pathological conditions. Additionally, this article explores the potential of this chemical intervention strategy in clinically suppressing tumor progression, providing a theoretical foundation and practical guidance for future research directions.

Key words: 14-3-3 molecular glue; protein-protein interaction; RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; estrogen receptor α ; p53

蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interactions, PPIs) 构成了细胞生命活动的基础, 涵盖细胞信号转导、结构组装等关键生理过程。14-3-3 蛋白能识别近千种结构各异的伴侣蛋白, 作为信号网络的关键调节中枢, 其功能的任何异常变化均可能触发多种疾病。长期以来, 科研人员主要集中于开发针对功能性蛋白的抑制剂, 但由于人体内大约 85%~90% 的蛋白质靶点难以药用或不可药用, 传统的分子干预策略往往难以达到预期效果。分子胶可作用于两种蛋白质的结合界面, 增强两者之间蛋白-蛋白相互作用, 进而调节相关生物学功能。根据分子的作用机制, 可以将其分为降解型分子胶和非降解型分子胶两类。目前, 以沙利度胺为代表的降解型分子胶研发相对较快, 该类分子可以诱导或稳定泛素连接酶和靶蛋白 (底物) 之间的 PPIs, 促进靶蛋白参与蛋白酶体系统, 发生泛素依赖性降解。非降解型分子胶则通过结合靶蛋白与伴侣蛋白, 形成三元复合物, 调控靶蛋白及其下游蛋白的生物活性。特别是对于无序蛋白, 由于其本身构象的不稳定性, 其活性状态的维持往往依赖于其他蛋白或底物复合物的互作; 这种依赖关系, 加之卡位效应的存在, 使得与其他底物的 PPIs 被阻断, 从而为开发具有高选择性的分子胶提供了理想的机制基础。作为一种创新的治疗策略, 针对 14-3-3 蛋白的分子胶研发虽仍处于初期阶段且尚未经过临床验证, 但其潜在的有效性和特异性是值得进一步探索的。本文重点综述了与肿瘤治疗相关的 14-3-3/ER α 、14-3-3/C-RAF 和 14-3-3/p53 分子胶的研究进展, 旨在推动 14-3-3 分子胶在肿瘤治疗领域的应用前景。

1 14-3-3 蛋白与癌症

1967 年, Moore 等^[1]发现了广泛存在于脑组织中的酸性蛋白 14-3-3, 其名字是依据层析编号及电泳移动位置进行定义, 因其能够调节酪氨酸与色氨酸羟化酶活性, 又被称为 YWHA。随着研究的深入, 学者发现 14-3-3 蛋白在真核生物的各个组织中普遍表达, 其中细胞质的 14-3-3 蛋白含量最为丰富。目前在人类体内共发现了 7 种 14-3-3 亚型蛋白 β 、 γ 、 ϵ 、 η 、 σ 、 τ 和 ζ ^[2], 各亚型的蛋白高度保守, 同源性高达 44%^[3]。因此大部分伴侣蛋白 (如 Raf-1、BAD 和 Cbl), 会表现出与各亚

型 14-3-3 蛋白相近的亲和力, 这种相似性为其他亚型蛋白补偿一种亚型蛋白损失提供可能^[4]。但由于亚细胞定位和组织表达量的差异, 14-3-3 的各亚型蛋白依旧存在功能的特异性, 且与人类疾病密切相关。14-3-3 σ 主要在上皮细胞中特异性表达, 14-3-3 σ 亚型蛋白的功能障碍与许多上皮组织肿瘤 (如卵巢上皮癌) 的发生有关^[5]。此外, 受到各亚型蛋白的序列差异影响, 依旧有部分伴侣蛋白表现出对某个单一亚型 14-3-3 的亲亲和偏好。如 Cdc25C 与 14-3-3 ζ 、 ϵ 和 γ 结合, 但不与 σ 结合^[6]。14-3-3 蛋白大多以二聚体形式存在, 每个单体蛋白由 9 个反向平行 α -螺旋 ($\alpha 1 \sim \alpha 9$) 组成, 含有 1 个磷酸肽结合位点, $\alpha 1$ 螺旋折叠呈凹槽形并且与 $\alpha 3$ 螺旋和 $\alpha 4$ 螺旋结合 (图 1)。所有的 14-3-3 亚型蛋白均包含产生 PPIs 所必需的两亲性凹槽, 可以识别特异的磷酸化丝氨酸/苏氨酸位点, 根据结合序列特征, 其伴侣蛋白可以分为三类: ① R[S/ Φ][+](pS/pT)XP; ② RX[Φ /S][+](pS/pT)XP; ③ (pS/pT)X₁₋₂-COOH^[7-10]。其中, pS/pT 是磷酸化丝氨酸或苏氨酸, Φ 是芳香性氨基酸残基, + 是碱性氨基酸残基, X 是任意氨基酸类型的残基 (通常是亮氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甲硫氨酸)。

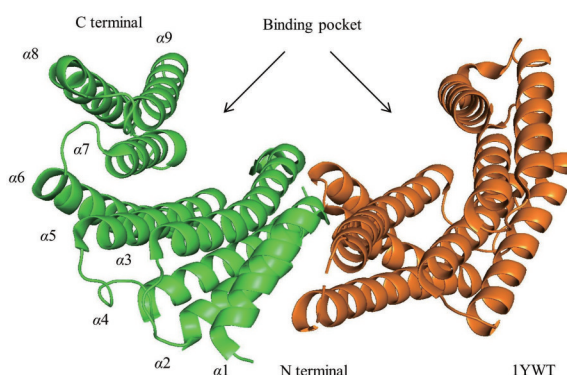


Figure 1 Crystal structure of the 14-3-3 protein

随着研究的深入, 学者陆续证实 14-3-3 蛋白调节功能的失衡, 可以促进乳腺癌^[11]、肺癌^[12]、前列腺癌^[13]、胃癌^[14]、头颈癌^[15]、骨髓瘤^[16]和胶质母细胞瘤^[17]等多类恶性肿瘤的发生与发展, 并与患者的化疗耐药和不良预后相关。由于 14-3-3 与配体的 PPIs 是由特定磷酸肽基序所介导, 因此通过化学干预, 竞争性占据底物结合口

袋并抑制 14-3-3 的调控活性, 可以恢复其异常的生理功能。例如, 一种磷酸化 R18 短肽, 能作用于带正电的 14-3-3 配体结合槽, 抑制其与伴侣蛋白的 PPIs, 增加顺铂对肿瘤细胞的杀伤能力^[18-20]。截至目前, 干预 14-3-3 PPIs 的抑制剂种类繁多, 但由于各亚型蛋白高度同源, 导致选择性抑制剂的开发十分困难。14-3-3 蛋白作为一种信号传导网络的核心蛋白, 其调控活性的广泛抑制, 可能导致潜在的毒副作用。与传统的抑制剂相比, 14-3-3 分子胶受到 PPIs 界面的可变性和特异性影响, 使得分子的选择性设计更易实现, 这些分子胶的发现促进了 14-3-3 PPIs 机制的深入研究, 也为相关疾病的治疗作出了积极贡献^[21]。

2 14-3-3 PPI 分子胶

2.1 14-3-3/ER α 分子胶

目前, 乳腺癌的治疗药物主要包含雌激素受体阻断剂、芳香化酶抑制剂等^[22], 它们可以阻止雌激素的产生或竞争性结合雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α), 抑制 ER α 转录活性。但随着抗雌激素治疗的深入, 患者常表现出耐药现象^[23], 因此寻找新的治疗靶点并以此为基础开展化学干预, 具有较高的应用价值。14-3-3 蛋白通过识别 ER α 的倒数第二位的磷酸化苏氨酸 (Thr594), 可以与 ER α 的 C 端结合, 进而抑制 ER α 的转录活性 (图 2A) 和乳腺癌细胞的增殖^[24]。

天然产物 fusicoccanes (FCs) 是真菌 *Phomopsis amygdali* 的提取物, 这类分子都具有以 5-8-5 环为核心的化学结构, 大部分 FCs 能打开气孔导致引起叶子枯萎并

导致植物死亡^[25], 因此最初 FCs 是植物学领域的研究热点。随着研究的深入, 与其他 FCs 相比, fusicoccin A (FC-A, **1**, 图 2B) 表现出了良好的抗肿瘤活性。De Vries-van Leeuwen 等^[24]证实 FC-A 能够增强 14-3-3 σ /ER α 相互作用, 抑制 ER α 二聚化, 降低 ER α 下游基因的转录活性, 如 RAP α 、PGR、GREB1, 进一步诱导乳腺癌细胞的凋亡 (图 2A)。FC-A 填补了 14-3-3 和 ER α 结合界面的空间 (图 2A), 熵效应和形状互补使 14-3-3 和 ER α 结合作用增强 (图 2C)。浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FC-A 将 ER α 与 14-3-3 σ 的结合亲和力提高了 25 倍 ($K_{\text{d-app}} = 6.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{d-DMSO}} = 169.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[26]。利用 14-3-3/ER α 分子胶, 开展针对 ER α 阳性乳腺癌的化学干预, 有望成为乳腺癌治疗的新兴疗法。目前 FC-A 已成为研究靶向 14-3-3 PPIs 的重要工具, 为研发靶向 14-3-3 分子胶的设计开发及作用机制研究提供大量信息。然而, FC-A 对于 14-3-3/p53^[27]、14-3-3/CFTR^[28] 等靶点的非选择性, 以及天然产物在合成和纯化中的难度, 限制了该类分子的进一步发展。

2019 年, Sijbesma 等^[29]采用针对半胱氨酸的定向筛选技术, 发现了一类可以作用于 14-3-3 σ /ER α 的共价分子胶。为了提高筛选灵敏性, 研究人员将 14-3-3 σ 的 42 位突变为半胱氨酸, 得到 C42 突变体, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物 **2** (图 2B) 将 ER α 与 14-3-3 σ (C42) 的结合亲和力提高了 40 倍 ($K_{\text{d-app}} = 32.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{d-DMSO}} = 1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 然而该分子并未关注对 C-RAF 的选择性问题。晶体结构示意图显示化合物 **2** 的硫原子连接到 14-3-3 突变

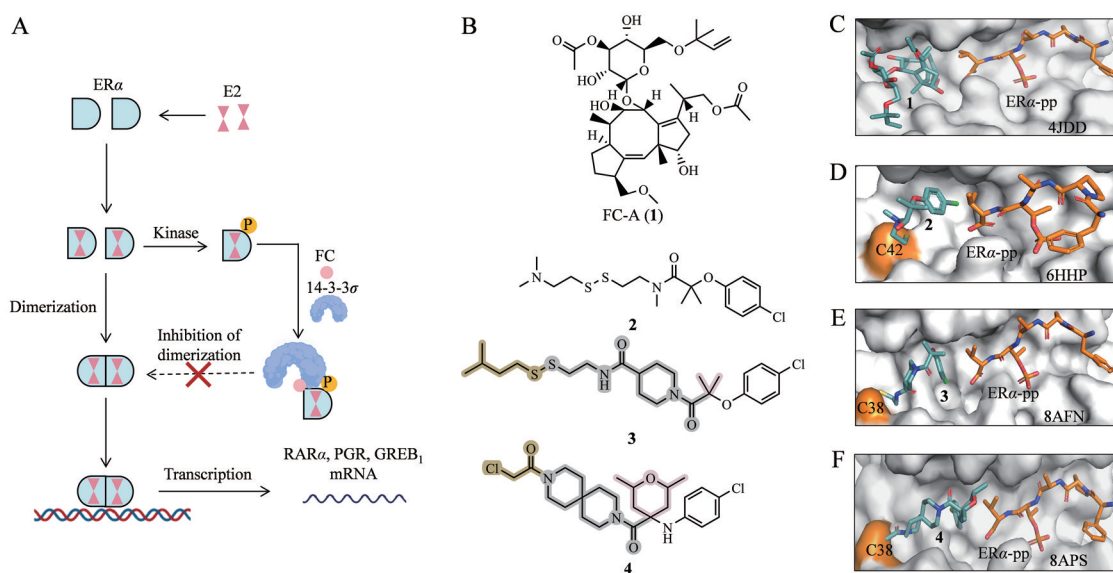


Figure 2 Role of 14-3-3 in estrogen receptor α (ER α) activation. Estradiol (E2) drives ER α dimerization and transcriptional activation. 14-3-3 binding and stabilization by FC, keeps the ER α remain in a monomeric state, thereby reducing DNA interactions, gene transcription, and cell growth (A); structure of compound **1-4** (B); cocrystallization of 14-3-3 (gray), the phosho-ER α peptide (orange), and compound (green): compound **1** (C), compound **2** (D), compound **3** (E), and compound **4** (F)

体的C42, 芳香环指向14-3-3口袋末端, 与ER α -pp的C端形成疏水相互作用, 增强了14-3-3 σ /ER α 相互作用(图2D)。2023年, 该团队改用14-3-3 σ (WT)进一步筛选, 发现了可以作用于14-3-3 σ /ER α 非选择性共价分子胶的化合物**3**(图2B), 浓度为1 mmol·L⁻¹的化合物**3**对C-RAF与14-3-3 σ 的结合亲和力提高了81倍(K_{d-app} = 106.0 nmol·L⁻¹, K_{d-DMSO} = 8.5 μ mol·L⁻¹), ER α 与14-3-3 σ 亲和力提高了19倍(K_{d-app} = 21.0 nmol·L⁻¹, K_{d-DMSO} = 360.0 nmol·L⁻¹), 14-3-3 σ /USP8的亲和力提高了4倍(K_{d-app} = 1.1 μ mol·L⁻¹, K_{d-DMSO} = 4.5 μ mol·L⁻¹)^[30]。化合物**3**与14-3-3 σ /ER α 结合模式与化合物**2**相似, 其末端的氯代苯基结构朝向了ER α 的磷酸化短肽(图2E)。鉴于化合物**3**具有较低的底物选择性, Konstantinidou等^[31]对化合物**3**开展了系列优化: 一方面, 将偕二甲基替换为大位阻的取代基团, 增加分子末端苯环的位阻, 提高对C-RAF的选择; 另一方面, 将靶向14-3-3 σ C38的二硫键共价弹头替换为氯乙酰胺弹头, 增加连接体的刚性, “锁定”化合物的构象, 进一步增强对ER α 的活性。设计出兼具选择性和活性的化合物**4**(图2B), 100 μ mol·L⁻¹化合物**4**对14-3-3 σ /C-RAF稳定作用比化合物**3**降低了42%, 对14-3-3 σ /ER α 稳定作用比化合物**3**提高了29倍, 与FC-A相近(K_{d-app} = 13.0 nmol·L⁻¹, K_{d-DMSO} = 2.2 μ mol·L⁻¹), 稳定作用总共为116倍(K_{d-app} = 18.0 nmol·L⁻¹, K_{d-DMSO} = 2.1 μ mol·L⁻¹)。在晶体结构中(图2F), 连接环系的改变影响了弹头的定向方式, 使化合物**4**与14-3-3的极性氨基酸形成氢键增强稳定作用。

Visser等^[32]结合已发现的两类分子碎片, 分析其与ER α /14-3-3复合物的结合模式, 将两个作用于邻近位点的分子碎片fragment class I(化合物**2**)和fragment

class II进行拼接和结构优化(图3A), 最终发现了非共价类分子胶**5**(图3B)。500 μ mol·L⁻¹的化合物**5**将14-3-3 γ /ER α PPIs增加了25倍。Fragment class I与14-3-3 σ (C42)的C42共价形成二硫键, 氯代苯环延伸到14-3-3口袋末端, 通过与ER α 磷酸肽C端缬氨酸的疏水作用发挥作用(图3C)。Fragment class II的氨基通过与14-3-3的E14羧基形成盐桥发挥作用(图3D)。化合物**5**则是拼接了两个分子碎片的有效部分进行优化, 增强与ER α 磷酸肽C端的疏水作用同时还与14-3-3的E14羧基形成盐桥进一步增强了**5**对14-3-3 γ /ER α 的稳定作用(图3E)。这种通过识别分子作用位点以及结合模式的化学生物学策略, 给一些形状和距离匹配不佳的分子提供改造空间, 更有利于识别蛋白质间的相互作用。

2020年, 研究人员^[33]发现了一种外消旋的吡咯烷酮类结构**6**(图4A), 其对14-3-3/ER α 有较弱的分子胶活性, 通过化学合成和手性拆分拆分, 发现R构象的分子**6**为其活性形式, 利用共晶衍射揭露出(R)-**6**与14-3-3/ER α 的三元复合物模型, 并发现该分子在晶体结构中Mg²⁺形成螯合物。为了验证金属螯合特征对分子活性产生的影响, 研究人员在荧光偏振测试体系中额外增加高浓度的金属离子, 发现(R)-**6**的分子活性与金属离子浓度呈正比。因此作者推测金属离子的螯合作用可能是影响分子构象的关键。为了对该假设进行探索, 研究人员采用环化策略以及分子内氢键模拟策略, 设计合成了一系列化合物, 其中R构象的化合物**7**(图4A)表现出了更强的分子胶活性(图4B)。

此外, Gigante等^[34]报道了一类含有对称结构的精氨酸模拟物, 该类分子多含有三个或四个结构相同的

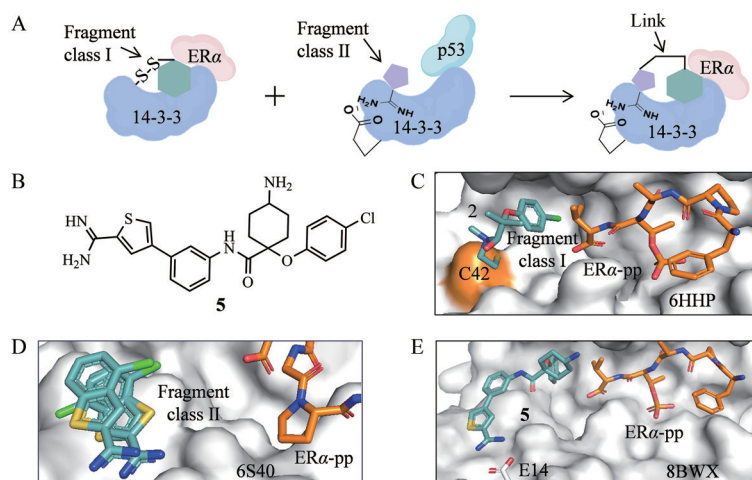


Figure 3 The design idea of compound **5**: linking two effective fragments and optimizing (A); structure of compound **5** (B); cocrystallization of 14-3-3 (gray), the phospho-ER α peptide (orange), and compound (green): **2**/fragment class I (C), fragment class II (D), compound **5** (E)

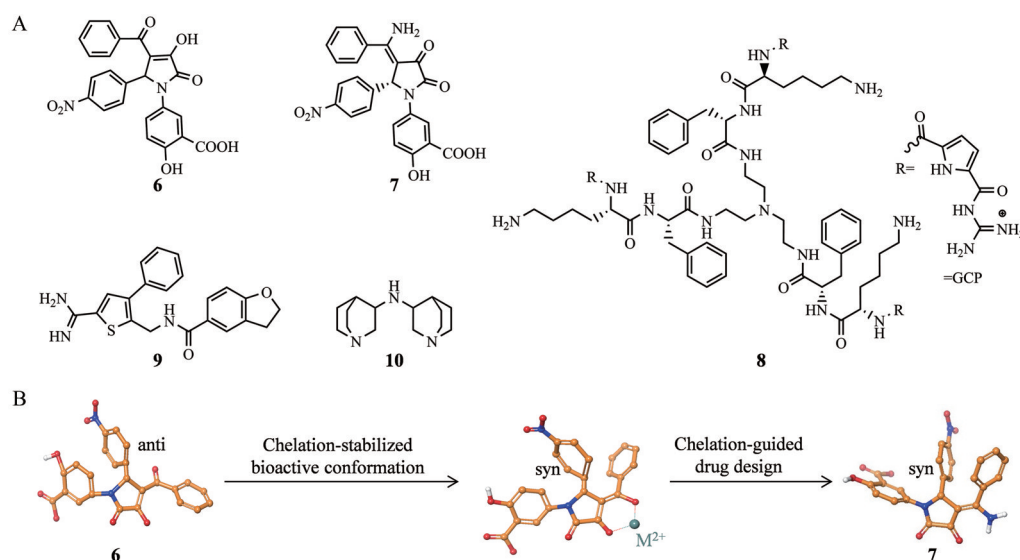


Figure 4 Structures of compound 6–10 (A) and the design concept of compound 7: separating *R* conformation and utilizing chelation-guided drug design for a cyclization strategy along with an intramolecular hydrogen bond simulation strategy (B)

多肽臂, 浓度为 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 **8** 能使 14-3-3 ζ /ER α 亲和力提高 80 倍 ($K_{\text{d-app}} = 29.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{d-DMSO}} = 2.321 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。而 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物 **8** 与 FC-A 联用时能使 14-3-3 ζ /ER α 结合亲和力提高 203 倍 ($K_{\text{d-app}} = 11.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{d-DMSO}} = 2.238 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)，证实了化合物 **8** 可以与 FC-A 以协同方式, 增强二者的分子胶活性 (图 4A)。化合物 **9** 是采用结构衍生化得到的一个 14-3-3/ER α 分子胶^[35] (图 4A), 尽管其活性较弱, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物 **9** 对 14-3-3/ER α 稳定作用仅增加 6.2 倍 ($K_{\text{d-app}} = 1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{d-DMSO}} = 6.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)，但其选择性较强。化合物 **10** 则是一类新型的非共价类分子胶 (图 4A), 该分子可以稳定 14-3-3 的二聚体形式, 并与 FC-A 协同增强 14-3-3 与 ER α 的稳定活性^[36]。

2.2 14-3-3/C-RAF 分子胶 RAF 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, C-RAF/RAF-1) 是快速加速纤维肉瘤 (rapidly accelerated fibrosarcoma, RAF) 蛋白家族成员之一, 它参与了膜蛋白 RAS 下游的 MAPK 信号转导。根据蛋白的三级结构, C-RAF 从 C 端到 N 端可分为三部分: 催化结构域 (CAD)、RAS 结合域 (RBD) 和富含半胱氨酸结构域 (CRD)。当激素、生长因子 (如 EGF) 等信号因子, 与细胞表面受体结合时, 细胞中的 RAS-GTP 增加, 进而激活 RAS; RAS 的激活会引发 RAS-GTP 与 C-RAF 直接结合, 从而将细胞浆中的 C-RAF 二聚体募集到细胞膜上^[37]。募集到膜上的 C-RAF 发生磷酸化而激活, 促 RAS-RAF-MEK-ERK 通路激活, 从而参与细胞的增殖、分化和迁移等相关生理活动。C-RAF 活化的关键是 14-3-3 介导的 C-RAF 激酶结构域二

聚化, 14-3-3 二聚体能同时结合两个 C-RAF 分子并稳定 C-RAF 二聚体构象。C-RAF 蛋白中共有三个 14-3-3 蛋白结合位点 (S233、S259 和 S621), 14-3-3 与 C-RAF 的 S233 和 S259 结合会阻止 Ras 介导的质膜募集和 C-RAF 的激活, 而 14-3-3 与 C-RAF 的 Ser621 的结合可激活 C-RAF^[38] (图 5A)。

真菌提取物 cotylenin A (CN-A, 图 5B), 是一种与 FC-A 结构相似的天然产物。Molzan 等^[39] 发现 CN-A 在增强 C-RAF 与 14-3-3 ζ 蛋白相互作用时, 选择性稳定了作用于 pSer233 和 pSer259 位点, 但不结合活化 C-RAF 的 pSer621 位点。 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CN-A 使 14-3-3 ζ /C-RAF (pSer233, pSer259) 结合亲和力增强了 17 倍 ($K_{\text{d-app}} = 20.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{d-DMSO}} = 346.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。CN-A 处于 14-3-3 和 C-RAF (pSer233, pSer259) 结合界面中 (图 5C), CN-A 高度位点选择性的产生, 是由 C-RAF 的 E622 与 CN-A 母环之间严重的立体空间和静电冲突所导致。体外实验发现 CN-A 可以诱导 ERK 活化, 其作用机制尚未被完全解析, 可能与 14-3-3 和 RAF 家族成员 (A-RAF、B-RAF 和 C-RAF) 之间复杂的相互作用有关。在 RAS 突变癌症模型中单独使用 CN-A 并未表现出显著的治疗效果, 但与抗 EGFR 抗体西妥昔单抗联合治疗时, 可显著下调 ERK 活性并增强对肿瘤的杀伤能力, 表明 CN-A 可以作为 ERK 通路治疗药物的增敏剂而发挥药理活性。因此靶向 C-RAF 抑制活化位点 pSer233 和 pSer259, 寻找可以增强其与 14-3-3 结合作用的分子胶, 并以此为基础开展化学, 将有望成为治疗 RAS 突变癌症的新策略。

Kenanova 等^[30] 通过将含有 pSer259 的 C-RAF 肽段

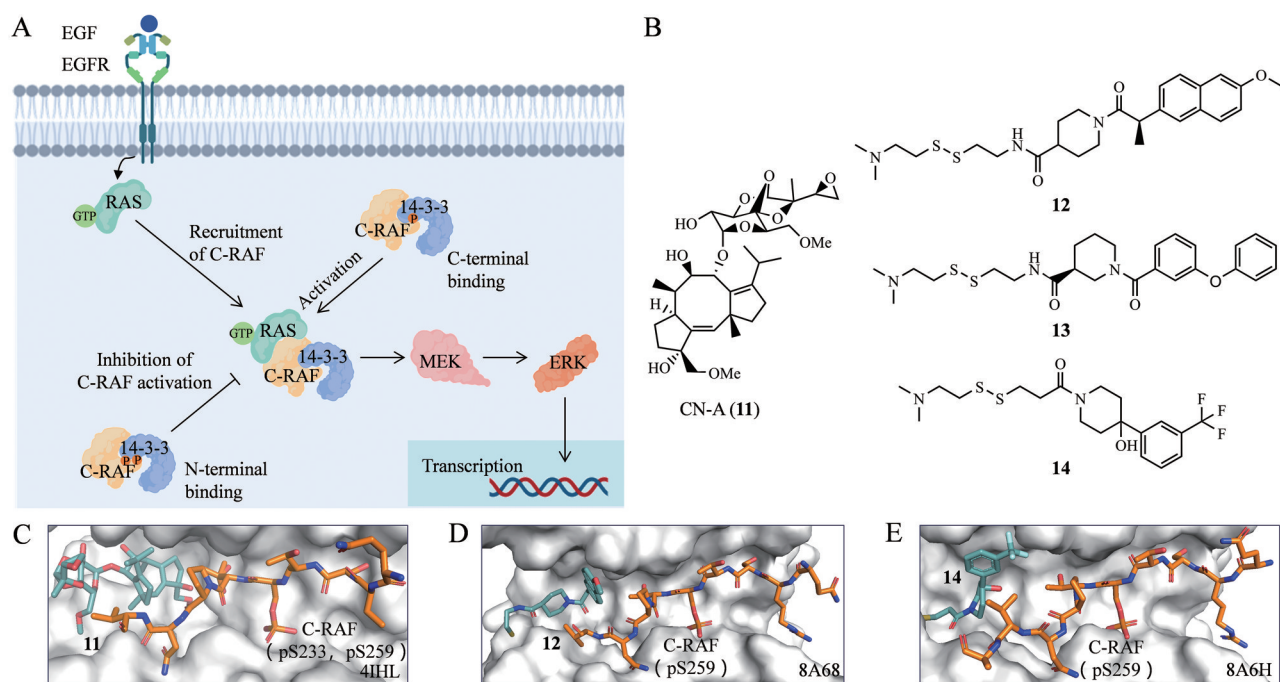


Figure 5 Role of 14-3-3 in RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (C-RAF) regulation. 14-3-3 binding to the N-terminal phosphorylation sites of C-RAF (pS233/pS259) inhibits RAS-mediated plasma membrane recruitment and C-RAF activation, while binding to the C-terminal phosphorylation site (pS621) promotes C-RAF activation (A); structures of compound **11**–**14** (B); cocrystallization of 14-3-3 (gray), the phosho-C-RAF peptide (orange), and compound (green): compound **11** (C), compound **12** (D), compound **14** (E)

进行荧光标记 (FAM-QRST{pS}TPNVHH-CONH₂), 构建了针对 14-3-3 和 C-RAF 分子胶的筛选模型, 通过荧光偏振检测筛选得到化合物 **12**~**14** (图 5B), 浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的化合物 **12** 和 **13** 使 14-3-3/C-RAF 的结合亲和力分别增加 250 倍 ($K_{d-app} = 92.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{d-DMSO} = 23.0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 420 倍 ($K_{d-app} = 100.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{d-DMSO} = 42.0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。化合物 **14** 对 14-3-3/C-RAF 的结合作用虽只增强了 77 倍 ($K_{d-app} = 294.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{d-DMSO} = 23.0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但 **14** 对 14-3-3 其他伴侣蛋白无稳定作用, 对 C-RAF 选择性良好。虽然 **12** 和 **14** 的结构不同, 但 **12** 的萘环和 **14** 的三氟甲基占据相同空腔, 通过与 C-RAF 的 +1 Thr 残基作用稳定 14-3-3/C-RAF (图 5D、E)。此外, **12** 和 **14** 都能使 C-RAF 发生了构象变化, 将 C-RAF 推向 14-3-3 σ 增强 14-3-3/C-RAF 相互作用。尽管 **12**~**14** 对 C-RAF 激活位点 pSer621 的作用尚未被披露, 但相关工作也为 14-3-3 分子胶的发现及修饰奠定了基础。

2.3 14-3-3/p53 分子胶 p53 是一种抑癌因子, 通过调控细胞周期及其凋亡, 防止受损细胞转变为恶性细胞。据统计, 约 50% 癌症患者体内, p53 存在突变失活现象, 其活性的正常发挥受到翻译后修饰和 PPIs 的调控^[40]。在正常的非应激细胞中, p53 会刺激 MDM2 的表达, 促进 MDM2 介导的 p53 降解。但在应激信号作

用下, 14-3-3 σ 可以分别与 p53 和 MDM2-COP1 的相互作用, 增强 p53 稳定性从而抑制 p53 的降解, 抑制肿瘤细胞的生长^[41-43]。目前针对 p53 的治疗策略主要是恢复野生型 p53 功能或抑制 p53 与关键负调控因子 MDM2 的相互作用 (图 6A)。通过稳定 p53 与正调节因子 14-3-3 相互作用, 增强 p53 稳定性, 对于抑制肿瘤生长具有重要意义。

FC-A (图 6B) 除了能够参与调节 14-3-3/ER α 的 PPIs 外, 还能占据 14-3-3 和 p53 结合界面空腔 (图 6C), 使 14-3-3/p53 结合增强从而稳定 p53 和抑制 p53 降解。1 mmol·L⁻¹ FC-A 使 14-3-3 σ /p53 稳定倍数增加 4 倍 ($K_{d-app} = 2.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{d-DMSO} = 8.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[27]。Andrei 等^[44]通过将 FC-A 的 C19 酰胺衍生化得到 FC-NAc (**15**, 图 6D), FC-NAc 增加了与 14-3-3 的 D215 氢键相互作用, 浓度为 400.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC-NAc 对 14-3-3/p53 的稳定因子为 5.1, 相对稳定因子为 3.1 的 FC-A 增加了 1.6 倍。但 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC-NAc 也对 14-3-3/TASK-3 稳定作用增强 42 倍, 对 14-3-3/p53 选择性较差。

Amifostine (**16**, 图 6E) 是一种临床批准的前药, 用于减轻与化疗和放疗相关的不良反应。在健康细胞中, **16** 被碱性磷酸酶 (ALP) 去磷酸化, 释放出活性物质氨基硫醇 WR-1065 (**17**, 图 6E)。**17** 主要清除辐射产生的有害活性氧 (ROS), 帮助双链断裂 (DSB) 的修复, 以保

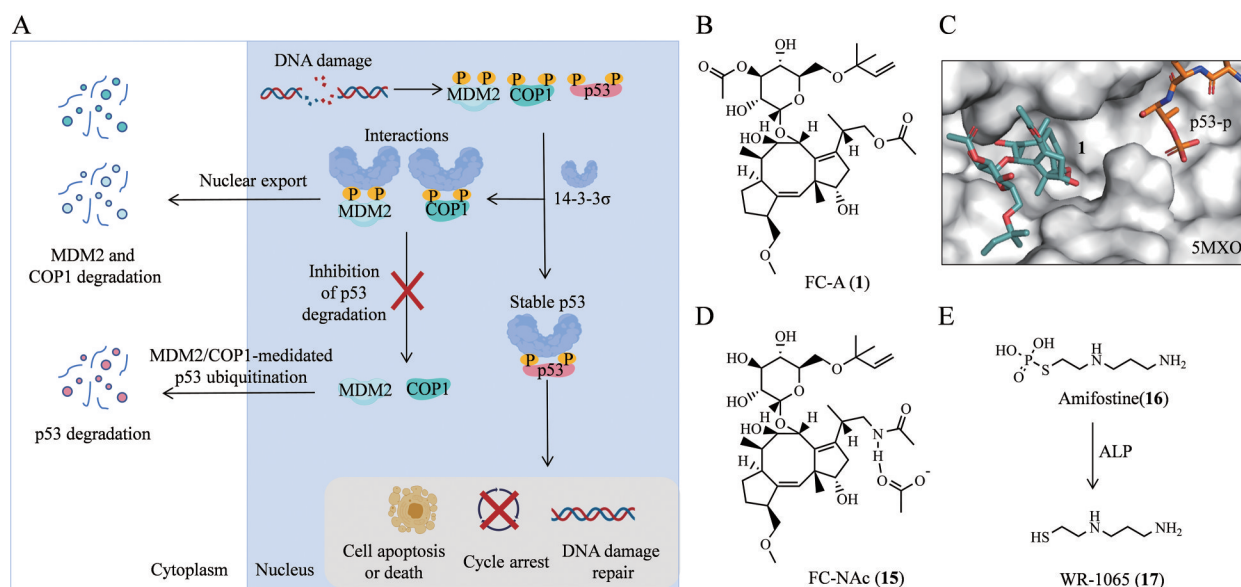


Figure 6 Role of 14-3-3 in p53 regulation. In normal unstressed cells, p53 induces the expression of MDM2, leading to the ubiquitination degradation of p53 by MDM2. Upon stress signals, 14-3-3 σ interacts with both p53 and MDM2-COP1, stabilizing p53, preventing its degradation, and suppressing tumor cell proliferation (A); structure of compound **1** (B); cocrystallization of 14-3-3 (gray), the phospho-p53 peptide (orange), and compound **1** (green) (C); structures of compound **15** (D); and compound **16** and **17** (E)

护正常细胞免受辐射诱导的DNA损伤。Falcicchio等^[26]通过蛋白质质谱发现**17**直接与14-3-3 σ 的Cys38形成共价二硫键,通过荧光偏振实验证明浓度为1 mmol·L⁻¹的化合物**17**能增强14-3-3 σ /p53稳定作用1.4倍($K_{d-app} = 5.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{d-DMSO} = 8.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),**17**和FC-A联用时增强14-3-3 σ /p53稳定作用5倍($K_{d-app} = 1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{d-DMSO} = 8.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外,细胞水平实验进一步证实了**17**可以与FC-A协同增强p53活性,从而增加膀胱癌细胞EJp53的杀伤效果。

3 总结与展望

14-3-3蛋白通过与伴侣蛋白的相互作用参与了细胞凋亡、信号转导和能量代谢等关键生命活动。这些PPIs的失调与多种人类疾病密切相关,因此,调节14-3-3 PPIs可能是一种有效的药物治疗策略。14-3-3的伴侣蛋白通过三种主要的结合基序与14-3-3蛋白结合,14-3-3 PPIs抑制剂(如R18和BV101)可以与伴侣蛋白竞争性结合14-3-3蛋白的两亲性凹槽,其对伴侣蛋白的特异性差。而稳定14-3-3 PPIs的分子胶主要结合于14-3-3蛋白与伴侣蛋白结合界面,在不同的伴侣蛋白结合模式中,PPIs的作用界面表现出一定的可变性,因此14-3-3 PPIs分子胶的开发可能具有更高的选择性。14-3-3分子胶的早期研发以FC-A等天然产物为主,分子发现过程具有很高的随机性,且受到合成难度和潜在的脱靶效应的制约,导致相关研究进展缓慢。随着研究深入和高通量筛选技术的应用,学者利用针

对半胱氨酸的共价筛选方法,发现了一类含有二硫片段或氯代乙酰基片段的分子可以增强14-3-3和伴侣蛋白的结合,为靶向性分子胶的研发提供了一条新思路。但14-3-3分子胶的研发目前仍面临许多问题,例如,现有的药物研发大多局限于14-3-3的某个单一亚型,缺少对其他亚型甚至突变型14-3-3蛋白的探索。此外,这一调控策略的有效性尚未通过临床试验得到证实,且对于某些靶点还缺乏充分的细胞水平验证。未来研究需要进一步探索如何分离伴侣蛋白的活性,并开发出具有精确治疗潜力的特异性分子胶。

作者贡献: 吴柳燚、李龙静和田于成是文章框架的构思者并负责内容的撰写和文献整理;卞金磊和李志裕指导论文写作;徐倩倩和韦伟对论文进行了检查和修改。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Moore BW, Perez VJ. Specific acidic proteins of the nervous system [C]// Physiological & Biochemical Aspects of Nervous Integration. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1967: 343-359.
- [2] Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, et al. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85: 7084-7088.
- [3] Mori M, Vignaroli G, Botta M. Small molecules modulation of 14-3-3 protein-protein interactions [J]. Drug Discov Today Technol, 2013, 10: e541-e547.

- [4] Schoenwaelder SM, Darbousset R, Cranmer SL, et al. 14-3-3 ζ regulates the mitochondrial respiratory reserve linked to platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12862.
- [5] Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, et al. Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 2687-2693.
- [6] Gardino AK, Smerdon SJ, Yaffe MB. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms [J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16: 173-182.
- [7] Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, et al. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity [J]. *Cell*, 1997, 91: 961-971.
- [8] Rittinger K, Budman J, Xu J, et al. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding [J]. *Mol Cell*, 1999, 4: 153-166.
- [9] Ganguly S, Weller JL, Ho A, et al. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine *N*-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 1222-1227.
- [10] Obsilova V, Obsil T. Structural insights into the functional roles of 14-3-3 proteins [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 1016071.
- [11] Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, et al. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 3348-3353.
- [12] Huang J, Tian F, Song Y, et al. A feedback circuit comprising EHD1 and 14-3-3 ζ sustains β -catenin/c-Myc-mediated aerobic glycolysis and proliferation in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 520: 12-25.
- [13] Oh S, Shin S, Lightfoot SA, et al. 14-3-3 proteins modulate the ETS transcription factor ETV1 in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 5110-5119.
- [14] Gong X, Yan L, Gu H, et al. 14-3-3 ϵ functions as an oncogene in SGC7901 gastric cancer cells through involvement of cyclin E and p27kip1 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10: 3145-3150.
- [15] Matta A, DeSouza LV, Ralhan R, et al. Small interfering RNA targeting 14-3-3 ζ increases efficacy of chemotherapeutic agents in head and neck cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9: 2676-2688.
- [16] Gu Y, Xu K, Torre C, et al. 14-3-3 ζ binds the proteasome, limits proteolytic function and enhances sensitivity to proteasome inhibitors [J]. *Leukemia*, 2018, 32: 744-751.
- [17] Hashemi M, Zali A, Hashemi J, et al. Down-regulation of 14-3-3 zeta sensitizes human glioblastoma cells to apoptosis induction [J]. *Apoptosis*, 2018, 23: 616-625.
- [18] Wang B, Yang H, Liu YC, et al. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 12499-12504.
- [19] Masters SC, Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 45193-45200.
- [20] Cao W, Yang X, Zhou J, et al. Targeting 14-3-3 protein, difopein induces apoptosis of human glioma cells and suppresses tumor growth in mice [J]. *Apoptosis*, 2010, 15: 230-241.
- [21] Ballone A, Centorrino F, Ottmann C. 14-3-3: a case study in PPI modulation [J]. *Molecules*, 2018, 23: 1386.
- [22] McDonald ES, Clark AS, Tchou J, et al. Clinical diagnosis and management of breast cancer [J]. *J Nucl Med*, 2016, 57 (Suppl 1): 9s-16s.
- [23] Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, et al. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 261-275.
- [24] De Vries-van Leeuwen IJ, da Costa Pereira D, Flach KD, et al. Interaction of 14-3-3 proteins with the estrogen receptor alpha F domain provides a drug target interface [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 8894-8899.
- [25] Guo ZR. Chemically induced proximity and molecular glue [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2024, 59: 789-800.
- [26] Falcicchio M, Ward JA, Chothia SY, et al. Cooperative stabilisation of 14-3-3 σ protein-protein interactions *via* covalent protein modification [J]. *Chem Sci*, 2021, 12: 12985-12992.
- [27] Doveston RG, Kuusk A, Andrei SA, et al. Small-molecule stabilization of the p53-14-3-3 protein-protein interaction [J]. *FEBS Lett*, 2017, 591: 2449-2457.
- [28] Stevers LM, Lam CV, Leysen SF, et al. Characterization and small-molecule stabilization of the multisite tandem binding between 14-3-3 and the R domain of CFTR [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: E1152-1161.
- [29] Sijbesma E, Hallenbeck KK, Leysen S, et al. Site-directed fragment-based screening for the discovery of protein-protein interaction stabilizers [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 3524-3531.
- [30] Kenanova DN, Visser EJ, Virta JM, et al. A systematic approach to the discovery of protein-protein interaction stabilizers [J]. *ACS Cent Sci*, 2023, 9: 937-946.
- [31] Konstantinidou M, Visser EJ, Vandenboom E, et al. Structure-based optimization of covalent, small-molecule stabilizers of the 14-3-3 σ /ER α protein-protein interaction from nonselective fragments [J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 20328-20343.
- [32] Visser EJ, Jaishankar P, Sijbesma E, et al. From tethered to freestanding stabilizers of 14-3-3 protein-protein interactions through fragment linking [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62: e202308004.
- [33] Bosica F, Andrei SA, Neves JF, et al. Design of drug-like protein-protein interaction stabilizers guided by chelation-controlled bioactive conformation stabilization [J]. *Chemistry*, 2020, 26: 7131-7139.
- [34] Gigante A, Sijbesma E, Sánchez-Murcia PA, et al. A supramo-

- lecular stabilizer of the 14-3-3 ζ /ER α protein-protein interaction with a synergistic mode of action [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59: 5284-5287.
- [35] Wu Q, Centorrino F, Guillory X, et al. Discovery of 14-3-3 PPI stabilizers by extension of an amidine-substituted thiophene fragment [J]. *Chembiochem*, 2024, 25: e202300636.
- [36] Brink HJ, Riemens R, Thee S, et al. Fragment screening yields a small-molecule stabilizer of 14-3-3 dimers that modulates client protein interactions [J]. *Chembiochem*, 2022, 23: e202200178.
- [37] Okamoto K, Sako Y. Two closed conformations of CRAF require the 14-3-3 binding motifs and cysteine-rich domain to be intact in live cells [J]. *J Mol Biol*, 2023, 435: 167989.
- [38] Obsilova V, Obsil T. The 14-3-3 proteins as important allosteric regulators of protein kinases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 8824.
- [39] Molzan M, Kasper S, Röglin L, et al. Stabilization of physical RAF/14-3-3 interaction by cotylenin A as treatment strategy for RAS mutant cancers [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 1869-1875.
- [40] Parrales A, Iwakuma T. Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 288.
- [41] Yang HY, Wen YY, Chen CH, et al. 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 7096-7107.
- [42] Lee MH, Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins [J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16: 225-234.
- [43] Wang JC, Yang CB, Zhuo YL, et al. Recent advances of MDM2-p53 inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 983-995.
- [44] Andrei SA, de Vink P, Sijbesma E, et al. Rationally designed semisynthetic natural product analogues for stabilization of 14-3-3 protein-protein interactions [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57: 13470-13474.