

真菌双组分信号转导系统及其抑制剂研究进展

徐西光 张子平 程波

(福建医科大学附属第一医院皮肤科,福州 350005)

【摘要】 双组分信号转导系统存在于包括真菌在内的大部分低等真核生物、原核生物及一些植物中。真菌双组分信号转导蛋白在细胞新陈代谢、毒力以及致病性等方面具有重要作用,且目前在人类细胞中尚未发现双组分信号转导系统。因此,探明真菌双组分信号转导系统的机制,可为抑制剂的设计和寻找提供多个“靶点”,从而研制出能够抗致病性真菌而不对宿主细胞造成损伤的新型抗真菌药物。本文就近年来真菌双组分信号转导系统及其潜在抑制剂进行综述。

【关键词】 真菌;双组分信号转导;抑制剂;药靶

【中图分类号】 R 379 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)06-0370-03

Progression on the research of two-component signal transduction system in fungus and its inhibitors

XU Xi-guang ZHANG Zi-ping, CHENG Bo

(Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005)

【Abstract】 Two-component signal transduction system, which plays an important role in cell metabolism, virulence and pathogenicity, has been found in most lower eukaryotes, prokaryotes and some plants, yet not in human cells. Well-understanding of the mechanism may be helpful for inhibitor designing, which has antifungal effect without damage to host cell. Recent literatures about two-component signal transduction system in fungi and potential inhibitors are reviewed.

【Key words】 fungus; two-component signal transduction; inhibition; drug targets

[Chin J Mycol 2011 6(6): 370-372]

真菌是具有真核和细胞壁的异养生物,其中某些菌种可引起动、植物的多种病害,影响人体健康,甚至威胁人类生命安全。目前抗真菌药物在作用于真菌细胞的同时大都对宿主细胞有不同程度的副作用,且临床上耐药株越来越多。为了抑制病原真菌,人们一直致力于寻找新的药物作用靶点以及新型抗真菌药物。双组分信号转导对包括白念珠菌在内的致病性真菌的毒力很重要,而人类细胞中不存在该信号转导系统。因此,针对双组分信号传递系统研发新的抗真菌药靶,能有效地作用于真菌细胞而不对宿主细胞造成损伤^[1]。

1 双组分信号转导系统

双组分信号转导系统普遍存在于各种原核生

物信号通路中,主要作用为调节细胞的趋化、黏附力、新陈代谢等生理功能及生物的致病性。这一信号转导通路首次在大肠杆菌中发现^[2],许多真菌如酿酒酵母、裂殖酵母、白念珠菌等都具有与原核生物结构相似的“双组分信号转导系统”。

“双组分信号转导系统”由一个组氨酸蛋白激酶(HK,也称之为“感受器激酶”)和一个“反应调节蛋白(RR)”组成。感受器激酶通常是跨膜蛋白,与胞外配体相结合;反应调节蛋白是一个胞质蛋白,可与DNA序列特异性相结合;当感受器激酶与配体相结合时,激酶上的保守组氨酸残基发生自身磷酸化,随后该磷酸基被传递到反应调节蛋白接受域一个保守的天冬氨酸残基上,激活或抑制反应调节蛋白,最后调控基因表达。

真菌的双组分信号转导系统相对原核生物有所不同,真核生物中的双组分系统为变异性,有多级的“磷酸接力传递”。目前人类致病性真菌双组分信号转导了解最多的是白念珠菌。白念珠菌双

作者简介:徐西光,男(汉族),硕士研究生在读。E-mail: axi14388686@126.com

通讯作者:张子平 E-mail: zpzpfj@msn.com

组分信号转导系统包括: 3 个杂合组氨酸激酶 (HKs: CaSln1p、CaNik1p 和 CaHK1p), 1 个含有组氨酸的磷酸转移过渡体 (Ypd1p) 2 个反应调节蛋白 (RRs: CaSsk1p 和 CaSkn7p)。杂合组氨酸激酶包括 1 个保守的组氨酸残基和 1 个保守的天冬氨酸残基。细胞在等渗环境下, 信号由胞膜感受器激酶 (Sln1p) 上的天冬氨酸残基自身磷酸化, 然后传向含单个保守组氨酸残基的中间转移体 Ypd1p, 磷酸化的 Ypd1p 与反应调节蛋白 Ssk1p 或 Skn7p 相互作用, 使其反应调节蛋白接受域的一个保守的天冬氨酸残基磷酸化, 从而完成 His-Asp-His-Asp (His: 组氨酸; Asp: 天冬氨酸) 的磷酸传递过程。Ssk1p 和 Skn7p 都包括一个保守的天冬氨酸接受域, 根据刺激信号的不同来决定 Ssk1p 或 Skn7p 的活化^[3]。

广义的双组分信号转导系统还包括高渗透性甘油促丝裂原活化蛋白激酶 (HOG-MAPK) 途径, 该途径为真菌和人类所共有, 主要参与调节细胞的渗透压适应及氧化应激。在等渗环境下, 双组分信号通过上述途径传递, 磷酸化的 Ssk1p 不能激活其下游的 Ssk2p, HOG 途径不被启动; 而在高渗环境下, 不产生 Sln1p-Ypd1p-Ssk1p 的磷酸传递, 去磷酸化的 Ssk1p 激活 Ssk2p, 然后依次激活下游的 Pbs2p 及 Hog1p, 完成磷酸基团的传递, 从而激活 HOG 途径。该信号另一分支为 Sho1p 分支, Sho1p 为跨膜感受器蛋白, 它通过多种蛋白激酶 (Ste20p、Ste50p, GTP 酶 Cdc42) 激活 Ste11p, 从而活化 Pbs2p 及 Hog1p, 完成 HOG 途径的传递^[4-5]。

2 细菌和真菌拥有相似的双组分信号转导系统

双组分信号转导系统存在于包括细菌、真菌在内的大部分低等真核生物、原核生物及植物中, 且在细菌与真菌中具有相似的双组分信号转导系统。这些双组分信号转导蛋白在细菌、真菌等微生物适应高渗透压及氧化刺激、细胞壁生物合成以及毒力、黏附力等方面起着重要作用。但哺乳动物细胞中尚未发现双组分信号转导系统, 针对这些信号分子作为研发抗真菌药的新型药靶, 能够有效地抵抗致病性真菌而不对宿主细胞造成损伤^[1-6]。

细菌与真菌双组分信号转导系统的基本结构及作用机制类似^[7]。Petrikaite 等^[8]学者尝试将已知的细菌双组分信号转导系统抑制剂应用于抑制真菌的信号转导系统, 取得了良好的效果。这提示

可从细菌双组分信号转导系统抑制剂中筛选新型抗真菌药物, Deschenes 等^[9]通过试验也证实了这一点。设想将细菌双组分信号转导系统抑制剂应用于临床抗真菌治疗, 研发新型抗真菌药物, 将为各类真菌感染提供新型、有力的药物治疗手段, 弥补目前抗真菌药物较少且副作用较大的缺憾。

3 双组分信号转导系统抑制剂

当前常用的抗真菌药物主要有直接作用于真菌细胞膜, 损害细胞膜脂质结构和功能的多烯类, 影响真菌细胞膜麦角固醇生物合成的唑类、丙烯胺类、硫脲类和吗啉类, 选择性抑制 β -(1,3)-D-葡聚糖合成酶阻碍真菌细胞壁合成的棘白菌素类以及干扰真菌核酸的合成的 5-氟胞嘧啶。这些药物都存在一定的毒副作用, 且耐药菌株时有报道^[10-11]。因此, 探明双组分信号转导系统的机制, 可为抑制物的设计提供多个靶点, 包括信号分子结合位点、蛋白激酶的自身磷酸化位点、磷酸基团从激酶向反应调节蛋白的转移途径以及反应调节蛋白接受磷酸基团的位点等等。下面就介绍国内外出现的有效或潜在的适用于抗真菌的细菌双组分信号转导系统抑制剂。

利凡诺 (Ethacridine Lactate 又名雷佛双尔、乳酸依沙吡啶) 为外用杀菌防腐剂, 对革兰阳性细菌及少数革兰阴性细菌有较强的杀灭作用。Foster 等^[12]报道双组分信号通路在细菌存活与致病中具有重要作用, 而利凡诺作为双组分信号系统抑制剂可以抑制组氨酸激酶的磷酸化, 动力学分析显示利凡诺可阻断磷酸基团的传递。分析其化学结构, 可研究出相似的双组分信号系统抑制剂。Petrikaite 等^[8]报道可抑制双组分信号系统的利凡诺诱导剂可作为潜在的新型抗真菌药物, 且已在多种念珠菌属药敏试验中取得良好抑菌效果; Sergeev 等^[13]通过研究证实多烯类药物合并利凡诺具有更强的抑制真菌的效果。

RWJ-49815、RWJ-49968 和 RWJ-61907 这 3 种药物为双组分调控系统的小分子抑制物, 经体外实验证实这些小分子抑制物在金黄色葡萄球菌及绿脓杆菌中具有良好的抑菌作用^[14]。有关研究还表明大部分此类抑制物的作用机制是与 ATP 竞争以阻断双组分信号分子功能域的激酶活性^[15]。Stephenson 等^[16]研究证实 RWJ-49815 可以改变激酶的羧基端结构域, 从而抑制激酶的催化活性。

Deschenes 等^[9]通过实验观察三种细菌的组氨酸激酶抑制剂的抗真菌活性,发现所有 3 种化合物都不同程度的抑制了酿酒酵母和白念珠菌菌株的增长,并且通过抑制不同的组氨酸激酶发挥作用,从而证实了这些化合物的抗真菌特性。

氯氟碘柳胺 (Closantel 又名克罗散泰、氯生太尔) 氯氟碘柳胺是一种广谱驱虫药,而作为细菌的双组分信号转导系统抑制剂,同时具有治疗和预防作用。Cheng 等^[17]报道双组分信号在细菌感受信号及适应环境变化中发挥重要作用,氯氟碘柳胺作为组氨酸激酶的抑制剂,在作用于细菌后,可完全阻断细菌对宿主细胞的感染;双重免疫荧光标记可示氯氟碘柳胺使细菌双组分系统基因不同程度地受到抑制,继而组氨酸激酶自身磷酸化的活性下降;Theodorou 等^[18]学者也证实该类药品可以阻断双组分系统信号分子的磷酸转移;Hlasta 等^[19]应用结构-活性关系分析表明氯生太尔通过水杨苯胺作为药效基团来抑制双组分信号转导系统,具有潜在抗真菌作用,需要我们进一步去证实。

其他 另外 11-脱氢皮质酮 (compound-A)、四氯水杨酰苯胺 (tetrachlorosalicylanilide) 及 TNP-ATP 等药物有报道均为双组分信号转导系统抑制剂^[20]。Tabbene 等^[21]研究证实 compound A 对致病性念珠菌株有很强的杀菌活性,药敏试验显示该药具有比两性霉素 B 更低的 MIC 值; Ganendren 等^[22]亦表示 compound A 可考虑应用于抗新生隐球菌等真菌的感染。

4 结 语

综上所述,针对微生物双组分信号转导系统及其抑制剂的研究很多,主要集中在鉴定双组分信号蛋白及其抑制剂对其作用靶点的研究。这些蛋白在细菌及真菌等在适应渗透压、生物合成及致病性等方面发挥重要作用,因此研究其抑制剂具有重要临床意义。虽然近年来在双组分信号系统这一领域的研究有很大的进展,但对念珠菌 Ypd1p 是如何识别并与反应调节蛋白相互作用,以及 HOG 途径在真菌与哺乳动物之间的的差异性还不清楚^[23]。双组分信号转导系统作为真菌体内复杂调控网络的一支,还需进一步的研究来明确不同潜在的抗真菌靶点;对于一些筛选到的潜在的抗真菌双组分信号转导抑制剂,在人体内的安全性、有效性、特异性等还有待检验^[24]。

人类致病性真菌的双组分信号转导蛋白与其细胞壁合成及毒力等致病因素相关,针对这组蛋白作为新型药靶,本文探讨了若干的潜在的新型抗真菌药物。今后随着真菌基因组学、蛋白质组学、生物信息学和结构生物学等学科的发展和互相交叉渗透,相信在不久的将来,抗真菌药物的研究将会取得更大的突破,从而可以正确选择合理的抗真菌药物,探索并制定出高效、低毒和经济的诊疗方案。

参 考 文 献

- [1] Chauhan N, Calderone R. Two-component signal transduction proteins as potential drug targets in medically important fungi [J]. *Infect Immun* 2008, 76(11): 4795-4803.
- [2] Crump JA, Griffin PM, Angulo FJ. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness [J]. *Clin Infect Dis* 2002, 35(7): 859-865.
- [3] Kruppa M, Calderone R. Two-component signal transduction in human fungal pathogens [J]. *FEMS Yeast Res* 2006, 6(2): 149-159.
- [4] Bahn YS. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway [J]. *Eukaryot Cell* 2008, 7(12): 2017-2036.
- [5] Saito H, Tatebayashi K. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast [J]. *Biochem* 2004, 136(3): 267-272.
- [6] Chauhan N, Latge JP, Calderone R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* [J]. *Nat Rev Microbiol* 2006, 4(6): 435-444.
- [7] Lange R, Wagner C, de Saizieu A, et al. Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Gene* 1999, 237(1): 223-234.
- [8] Petrikaite V, Tarasevicius E, Pavilonis A. New ethacridine derivatives as the potential antifungal and antibacterial preparations [J]. *Medicina (Kaunas)* 2007, 43(8): 657-663.
- [9] Deschenes RJ, Lin H, Ault AD, et al. Antifungal properties and target evaluation of three putative bacterial histidine kinase inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43(7): 1700-1703.
- [10] Sangamwar AT, Deshpande UD, Pekamwar SS. Antifungals: need to search for a new molecular target [J]. *Indian J Pharm Sci* 2008, 70(4): 423-430.
- [11] Duo M, Zhang M, Luk YY, et al. Inhibition of *Candida albicans* growth by brominated furanones [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, 85(5): 1551-1563.
- [12] Foster JE, Sheng Q, McClain JR, et al. Kinetic and mechanistic analyses of new classes of inhibitors of two-component signal transduction systems using a coupled assay containing HpkA-DrrA from *Thermotoga maritima* [J]. *Microbiology* 2004, 150(Pt4): 885-896.

- [25] Yoneda A, Doering TL. A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis [J]. *Mol Biol Cell* 2006, 17(12): 5131-5140.
- [26] Gates MA, Thorkildson P, Kozel TR. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 52(1): 13-24.
- [27] Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂ [J]. *Infect Immun* 2003, 71(11): 6155-6164.
- [28] Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus* [J]. *Cell Microbiol*, 2009, 11(3): 370-380.
- [29] Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans* [J]. *Science*, 2005, 307(5713): 1321-1324.
- [30] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the third capsule-associated gene, *CAP60*, required for virulence in *Cryptococcus neoformans* [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(5): 2230-2236.
- [31] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, *CAP10*, of *Cryptococcus neoformans* [J]. *J Bacteriol* 1999, 181(18): 5636-5643.
- [32] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(7): 4912-4919.
- [33] Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, *CAP64*, is essential for virulence [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(6): 1977-1983.
- [34] Klutts JS, Doering TL. Cryptococcal xylosyltransferase I (Cxt1p) from *Cryptococcus neoformans* plays a direct role in the synthesis of capsule polysaccharides [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(21): 14327-14334.

[收稿日期] 2011-07-13

[本文编辑] 王 飞

(上接第 372 页)

- [13] Sergeev PV, Romanenko IM, Ukhina TV. The cellular acid phosphatase activity in yeast-like fungi of the genus *Candida* exposed to ultrasound, polyene antibiotics and dyes [J]. *Biull Eksp Biol Med*, 1993, 116(9): 272-274.
- [14] Yamada-Okabe T, Mio T, Ono N, et al. Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans* [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(23): 7243-7247.
- [15] Hilliard JJ, Goldschmidt RM, Licata L, et al. Multiple mechanisms of action for inhibitors of histidine protein kinases from bacterial two-component systems [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(7): 1693-1699.
- [16] Stephenson K, Yamaguchi Y, Hoch JA. The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems [J]. *Biological Chemistry*, 2000, 275(49): 38900-38904.
- [17] Cheng Z, Kumagai Y, Lin M, et al. Intra-leukocyte expression of two-component systems in *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* and effects of the histidine kinase inhibitor closantel [J]. *Cell Microbiol* 2006, 8(8): 1241-1252.
- [18] Theodorou EC, Theodorou MC, Kyriakidis DA. Inhibition of the signal transduction through the AtoSC system by histidine kinase inhibitors in *Escherichia coli* [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(8): 1327-1337.
- [19] Hlasta DJ, Demers JP, Foleno BD, et al. Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening hit closantel [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8(14): 1923-1928.
- [20] Calera JA, Zhao XJ, Calderone R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *C. albicans* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 518-525.
- [21] Tabbene O, Kalai L, Ben Slimene I, et al. Anti-candida effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 316(2): 108-114.
- [22] Ganendren R, Widmer F, Singhal V, et al. *In vitro* antifungal activities of inhibitors of phospholipases from the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(5): 1561-1569.
- [23] Cheetham J, Smith DA, da Silva Dantas A, et al. A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *C. albicans* [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(11): 4603-4614.
- [24] Stephenson K, Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets [J]. *Curr Opin Pharmacol* 2002, 2(5): 507-512.

[收稿日期] 2011-07-22

[本文编辑] 卫凤莲