

特约综述



张健研究员, 上海交通大学医学院医药生物信息学中心主任, 博士生导师。课题组近十年来研究主要集中于生物大分子别构机制研究及别构药物设计方法的发展。张健研究员实验室利用这些新方法, 在多种重大疾病中通过别构机制精准识别全新靶标, 发现具有高度特异性的别构激动剂及抑制剂。作为通讯作者, 张健研究员已经在Chem Rev、Chem Soc Rev、Am J Hum Genet、Nucleic Acids Res、Bioinformatics、Structure及ACS Med Chem Lett等期刊上发表多篇论文, 他引超过3 000次, H因子为28。自2015年以来, 张健研究员开始担任中国化学会专业委员会委员, 并受邀多次为Elesiver、Spring-Nature杂志社撰写别构药物发现专著。
<http://mdl.shsmu.edu.cn>

蛋白别构机制及其在药物研发中的展望

王承祥 张 健*

(细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘要 别构调节(allosteric regulation)是指调节分子结合在正位活性位点(orthosteric site)以外的位点, 诱导蛋白构象变化来调节蛋白活性位点功能。别构调节具有位点多样化、调节分子多元化、调节特异性高和调节效应有上限等优点, 使其成为新兴药物开发的重要策略。已有很多研究人员针对现有靶点研发别构药物, 与以往正位位点的竞争性药物相比, 别构药物特异性更好, 能够区分家族内的同源蛋白, 副作用小, 并且实现从别构位点至活性位点的远程通讯, 能够和内源性配体同时结合靶蛋白协同发挥功能等优点。该文将从别构调节的发展历史、机制、研究方法、别构调节剂的研究进展及别构药物开发的未来展望作一简要综述。

关键词 别构调节; 别构蛋白; 别构位点; 别构调节剂; 别构药物

Allosteric Regulation: Mechanism Study and Applications in Drug Discovery

Wang Chengxiang, Zhang Jian*

(Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of Chinese Ministry of Education, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract Allosteric regulation is that allosteric modulator binds at an allosteric site, a site distinct from the orthosteric site, inducing the change in conformation of protein to regulate its function activity. Allosteric regulation has many advantages due to specific features of allosteric sites, including structural diversity and flexibility. Then allosteric modulators show high selectivity, low toxicity and a ceiling effect on target, which presents a novel approach to drug discovery. In addition, allosteric modulator is able to trigger the communication between their

国家自然科学基金(批准号: 81322046)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54651728, E-mail: jian.zhang@sjtu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81322046)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54651728, E-mail: jian.zhang@sjtu.edu.cn

binding allosteric site and corresponding functional site, as well as act in synergy with cofactors or endogenous ligands. This review focuses on the history, mechanism, methods of allostery, the progress of allosteric modulators and the outlook of allosteric drugs in drug discovery.

Keywords allostery; allosteric protein; allosteric site; allosteric modulators; allosteric drug

蛋白质作为生命活动的主要承担者,一直是生命科学领域的重要研究方向。蛋白质发挥作用受到其自身及所处环境的多因素影响,其功能活性不仅与蛋白质结构特征相关,也与相互作用的调控因子密不可分。因此,针对蛋白质功能调节的研究和应用一直是研究蛋白质的热点问题之一。

别构调节(allosteric regulation)是指某种调节分子结合蛋白正位位点或活性位点(orthosteric site)以外的别构位点(allosteric site),诱导蛋白构象变化来实现对蛋白活性位点功能的调节^[1]。通过别构效应调节的蛋白称为别构蛋白(allosteric protein),调节别构蛋白功能的分子称为别构调节分子(allosteric modulator),别构调节分子结合在别构蛋白上进行调节的位点称为别构位点。别构调节被认为是生命体一种普遍的现象,对于细胞稳态的维持不可或缺^[2-3]。目前,已发现的内源性别构调节分子包括离子、脂质、环腺苷酸、药物到蛋白质、RNA和DNA等,其发挥别构调节和正位位点调节相比,具有位点结构多样性、调节效应上限性和低毒副作用的特征。这些推动了别构调节成为潜在的外源性调控蛋白功能的重要手段。

由于别构位点的结构多样性,结合该位点发挥功能的别构调节分子具有高度可变性,这预示着可以通过设计小分子对蛋白进行一系列精准调控从而改善相关疾病的发生和发展^[4-7]。随着近年来别构位点识别和别构调节分子发现技术的发展,越来越多受困于靶标选择性和毒性而一直无法利用的重大疾病靶标,先后通过别构调节方式在肿瘤、糖尿病、帕金森病、抑郁症等领域获得小分子突破性进展,而各大医药公司因此将针对蛋白别构调节位点的小分子设计作为药物开发的新策略。

1 别构调节发现历史

1904年,Christian Bohr等^[8]首先发现二氧化碳可以影响氧气对血红蛋白的结合效率,并将其命名为波尔效应(Bohr effect)。1910年,Hill^[9]创建希尔方程(Hill equation),认为这种现象是通过蛋白不同结

合方式的一种配体联合作用,一定程度上解释了波尔效应。之后,Adair^[10]、Pauling^[11]和Klotz^[12]进一步根据方程阐述了这种效应。随着20世纪50年代中旬生物学技术的进步,Fischer等^[13]几位学者观察到一些依赖效应分子而不是底物来调控催化活性的酶,其中典型的例子是首次发现的从舒张的骨骼肌中提取的糖原磷酸酶b体外催化活性需要5'-AMP的存在。此外,在细菌中也发现异亮氨酸能够反馈抑制苏氨酸脱氨酶的催化活性^[14],CTP抑制天冬氨酸转氨甲酰酶活性^[15]等。通过对大量蛋白现象的观察,Monod等^[16]于1961年提出了“别构抑制(allosteric inhibition)”的概念来描述非功能位点底物类似物的抑制效应。随后,Monod等^[17]于1963年正式提出分子别构调节的概念。

2 别构调节机制

基于别构调节概念,Monod等^[18]提出了著名的齐变模型(Monod-Wyman-Changeux, MWC)来解释别构机制,同时,Koshland等^[19]提出了不同于MWC的序变模型(Koshland-Némethy-Filmer, KNF)。在这些模型里,蛋白整体构象同步变化被认为是别构效应的重要特征。直到1984年,Cooper等^[20]提出了一个不依赖构象变化的别构模型,称之为“动态别构(dynamic allostery)”,是一种仅有熵效应引起蛋白热力学效应变化的模型。受Bryngelson等^[21]提出的自由能谱的启发,1999年,Nussinov等^[22-23]提出了构象选择和群体移动模型(conformation selection and population shift model)。同年,Ranganathan等^[24]提出了别构网络(Allosteric network)的概念。随着这些模型的提出及实验验证,研究人员发现,别构调节机制的复杂程度远超过单一构象同步变化所能解释。多个体系中别构调节分子的意外发现也对别构机制研究起到了重大促进作用。2005年,Rodriguez等^[25]发现中性调节小分子。Jaffe^[26]提出基于小分子的Morpheic模型的概念。这些研究进一步深化了别构调节机制在构象群体中的研究,并为小分子别构调节蛋白异常功能的实现提供了理论基础^[27-28]。

从本质上讲, 别构调节是由于别构位点通过原子波动、氨基酸残基网络或结构域运动来传递扰动信号至蛋白正位点, 从而引起蛋白构象群体发生改变, 最终导致蛋白在两个或更多的功能状态之间进行转换^[29]。在此过程中, 别构位点是别构蛋白发挥功能的触发点和调控中枢, 因此, 如何识别别构位点一直是别构调节的核心热点问题。

3 别构位点识别方法

X射线晶体衍射是研究别构位点目前最常用和有效的实验方法之一^[30]。首先通过高通量筛选有活性的调节分子, 然后使用结构生物学方法培养蛋白和调节分子的共晶, 接着使用X射线晶体衍射获得蛋白与调节分子的衍射点图像进行分析。解析别构调节分子和蛋白质的复合晶体的结构可以较为直观和准确地阐述其别构调节位点和机制。另外, 通过对比晶体解析后的结构, 可以发现蛋白在别构调节扰动前后细节上的变化。但是, X射线晶体学的方法也存在一定的局限性。蛋白的别构条件不仅仅是由蛋白构象引起的, 也可能由蛋白热力学驱动的, 蛋白质晶体观察到的是一个静态的晶体结构图, 而别构是一个动态过程, 因此, 晶体衍射的结果会缺乏动力学相关数据。

核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)属于光谱学方法的一种, 也是常用的研究别构动态过程的方法, 研究的时间尺度从皮秒到毫秒, 因而可以捕获更多短暂的构象变化。与同位素标记技术的联合使用是现在用于发现别构位点的新技术之一^[31]。除此之外, 通过核磁共振实验方法和分子模拟的联合使用, 也可以在原子级上揭示别构位点的位置^[32]。

荧光标记可以针对一类构象变化较大的蛋白进行别构位点研究。通过给蛋白加上标记, 可以追踪蛋白的构象变化, 其中荧光标记是最常用的标记类型, 荧光分子对所处环境很敏感, 同时便于监测, 所以被广泛用于对生物大分子的构象动态变化的研究。研究人员把荧光分子共价结合到蛋白质的适合的氨基酸上, 通过测定荧光基团的迁移来追踪表征配体分子结合的位点以及其引起靶标相应区域运动或构象的变化^[33]。

氢交换测定也可以定位蛋白的结合位点和构象变化, 并且量化为动力学参数和力能参数^[34]。其原理是把蛋白浸入重水溶液中, 蛋白内的氢原子会

和溶液中的氘离子交换, 而蛋白质表面的氢因为与重水密切接触, 会比位于蛋白质内部的或参与氢键形成的氢的交换速率快, 再通过质谱检测可以监控蛋白不同序列片段的氢氘交换速率, 来得出蛋白质空间结构信息^[35]。氢氘交换质谱(hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry, HDXMS)之前被广泛应用在监测蛋白-底物、蛋白-蛋白的相互作用上, 其主要通过监控氢键比率的变化(包括氢键断裂和结构变化)和可溶性变化或同时监察两种效应来监测蛋白的动态变化。在氢氘交换质谱中显示的变化, 可以读出蛋白整体的固有波动、局部解折叠、刚体运动和构象重排, 并推断别构位点位置, 所以使得氢氘交换质谱成为别构位点分析的灵敏工具^[36]。

二硫键捕获是Well等^[37-38]开发的直接使用小分子化合物定点探测蛋白潜在别构位点的方法。在这种方法中, 首先确定一个蛋白, 其兴趣位点邻近位置有天然或诱导突变产生的半胱氨酸残基, 用库中含巯基的化合物进行筛选, 探索在还原条件下能够与蛋白兴趣位点附近半胱氨酸形成蛋白-化合物二硫键的小分子化合物, 再通过质谱可以简便地检测。结合X射线晶体衍射可以证明和阐述化合物和蛋白的结合模式和二硫键捕获的片段, 即结合的位点。因为二硫键捕获法具有一定位点定向性, 但其适用范围只能涵盖位点中有半胱氨酸残基的蛋白。

上述方法的别构位点发现主要是通过实验随机发现再加以验证的方式识别别构位点。近年来, 随着组学技术的发展及对别构机制研究的深入, 利用现有知识系统对别构位点进行主动识别, 可以极大地推动别构位点调节在药物开发中的应用, 提高靶标成药性^[39-42]。本实验室在2009年起建立了别构调节综合数据分析系统ASD(<http://mdl.shsmu.edu.cn/ASD/>), 该系统不仅涵盖别构蛋白、别构调节分子、别构调节机制、别构相关疾病、别构通路和别构网络等信息, 更为重要的是, 我们基于ASD系统发展了一系列功能基因组学和结构基因组学为基础的药物设计方法, 包括别构位点识别方法Allosite、别构小分子筛选集中库构建方法Allolike、别构小分子筛选评价方法Alloscore、别构性能评价方法Asbench和别构靶标识别方法Allodriver, 构建了完整的别构药物从位点识别到合理发现流程。结合生物化学和结构生物学实验, 在CDK2(cyclin-dependent kinase 2)、STAT3(signal transducer and activator of transcription

3)上发现多个全新别构位点并筛选到高选择别构调节小分子^[43-44],为别构调节分子从随机发现到合理设计提供了高效工具和经典案例。

4 别构调节分子研究进展

随着别构调节分子机制研究的不断深入,别构药物研发越来越吸引各大医药公司和研究机构,其原因有三:(1)别构结合位点多样性强保守性低,结合别构药物的特异性比正位位点药物强,从而潜在的副作用更小。与其相比,正位位点药物都是结合在活性位点,但是同家族的蛋白一般来说活性位点往往共用底物,具有很高的保守性^[45-46]。作用于正位位点药物通常在结合靶蛋白的同时,也会结合靶蛋白同源蛋白同样的高度保守位点。(2)别构药物作用于部分蛋白发挥作用需要蛋白自身底物分子的参与,因此在功能调控上具有上限,毒性较小。(3)别构药物还可以和底物药物共用,通过协同效应增加药效并降低单一位点残基突变带来的耐受^[47-52]。

在现有别构药物的基础上,Nussinov等^[53]提出了别构药物网络(Allo-network drug)的概念,来拓宽别构药物的适用范围。他们建议将目前可获得的别构药物综合构建别构药物网络。别构药物网络将直接作用各自靶蛋白或通过结合靶蛋白上游其他蛋白的别构药物组合起来,联合发挥对靶蛋白的效应以达到治疗的目的。

药物毒性通常和药物剂量挂钩,这也是制药公司重要的关注点。要在治疗窗内减小剂量,可以通过提高药物的结合亲和力或药物在靶标的停留时间的方式,前者对应着高药物效价和剂量,后者意味着长的药物代谢周期可以保持持续性的药理作用,可以减少服药频率^[54]。为了实现这个目标,传统的正位位点的药物开发主要努力提升药物的非共价键亲和结合,然而,从生理的角度上来说,这种亲和力无法超过一个确定的阈值。有研究者将这一策略针对性地借鉴到别构药物开发上,融合正位位点药物的共价键和别构药物的非共价键的策略来设计有共价结合的别构药物^[55],对实现高效低毒别构药物的开发有重要意义。

恶性肿瘤是当今人类健康的主要威胁之一,药物治疗在三大恶性肿瘤的三大治疗方式之中占有着重要的地位。之前的化疗药物主要是细胞毒性药物,如环磷酰胺、阿霉素、氟脲嘧啶脱氧核苷等通过

干预细胞周期、DNA复制和损伤DNA等途径抑制肿瘤细胞的分裂增殖,所以也会对正常细胞造成伤害,甚至有免疫抑制的副作用,导致肿瘤患者免疫系统崩溃。因此,非特异性的抗肿瘤药物存在选择性低、毒副作用大和易产生耐药性的缺陷^[56]。研究靶向性抗肿瘤药物是现今药物开发的主要方向之一,其中别构调节小分子因其多样性、高选择性和调节效应有上限获得众多医药公司的青睐,为恶性肿瘤的治疗翻开新篇章。下面将选取部分经典靶标及其别构调节小分子具体讨论。

4.1 蛋白激酶别构调节剂

激酶(kinases)是一类催化将高能磷酸分子[如三磷酸腺苷(ATP)]转移到蛋白质、脂质等特定靶分子使其磷酸化的酶。它参与细胞信号通路,进行信号传递,与细胞生长、增殖、分化息息相关^[57]。其中,蛋白激酶是激酶中的一大类,其主要功能是把(ATP)上的 γ -磷酸基团转移到底物蛋白质特定的氨基酸残基上,使底物蛋白磷酸化,使底物蛋白的空间构象改变,激活一系列的下游信号通路,对诸多细胞生理生化过程进行调控^[58-59]。已有研究表明,蛋白激酶的异常活性在细胞的恶性增殖中起着非常重要的作用^[60],所以蛋白激酶被当做肿瘤的靶点之一来设计靶向性药物^[61]。

4.1.1 AKT1 AKT1是丝氨酸/苏氨酸AGC蛋白激酶家族中的一员,被生长因子激活,通过下游的PI3K促进细胞生长、增殖和迁移等生命进程。其结构包含氨基末端的PH区域、中心激酶结构域和碳端AGC激酶结构域,3,4,5-三磷酸肌醇(phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP₃)就结合在PH结构域内。在非活化状态时,PH结构域通过极性相互作用与激酶结构域紧密相连,从而阻止ATP结合到活性位点上,此时为“PH-in”构象。一旦被上游激酶蛋白招募到细胞膜表面磷酸化激活后,PH结构域呈现出“PH-out”构象,从而使得ATP和底物能够进入酶的反应中心。

目前,已有文献报道AKT1的别构调节分子——VIII和12j两种别构抑制剂,并且有课题组做出了蛋白-化合物的共晶分别为VIII(PDB code: 3O96)^[62]和12j(PDB code: 4EJN)^[63]。从图1的晶体结构上可以看出,别构抑制剂都是结合在PH结构域和中心激酶结构域的交界面上,距离ATP结合的位点大于10 Å。在结合上别构抑制剂后,AKT1的PH

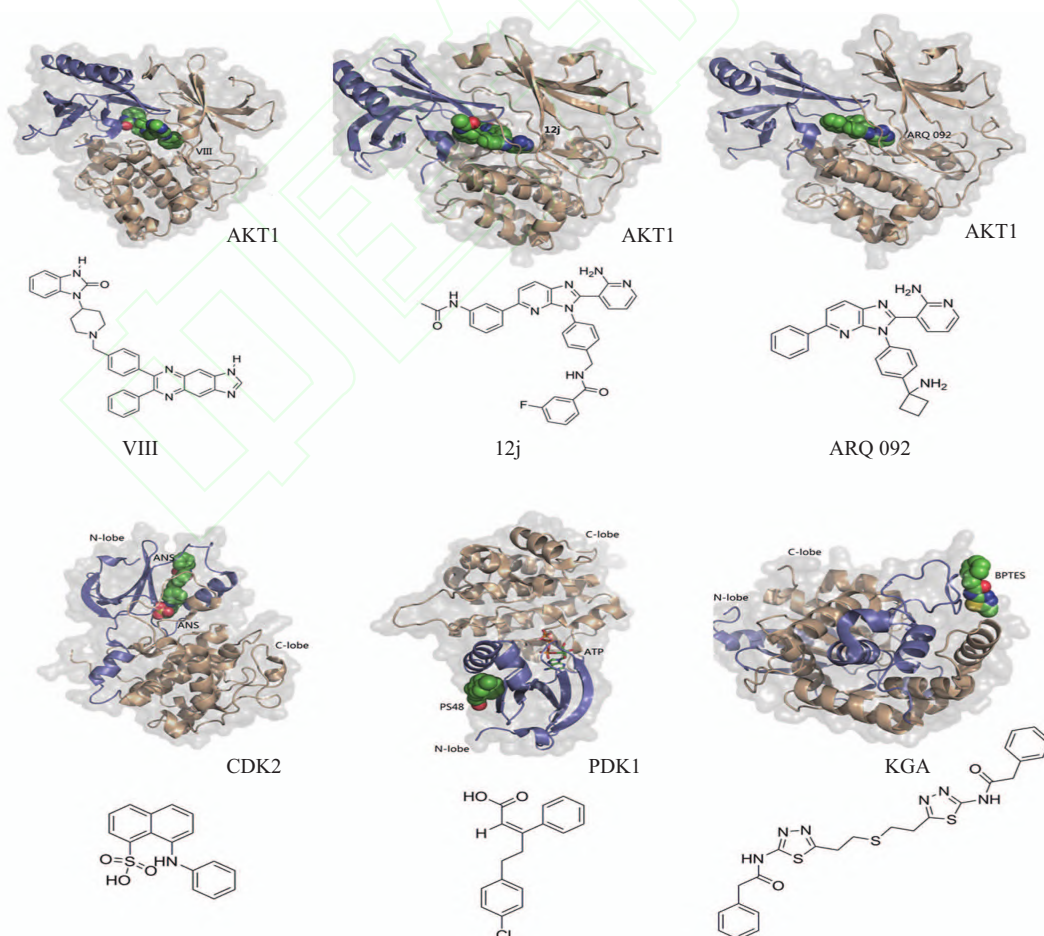
结构域和中心激酶结构域的被锁在一种失活、关闭的构象, PIP₃结合位点也被中心激酶结构域阻塞。其中, 别构抑制剂VIII的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为58 nmol/L, 12j的IC₅₀为5 nmol/L。可以看出, 别构抑制剂的抑制效应很有效, 对药物开发具有重大的借鉴意义。

近年, 有研究者开发AKT家族的别构抑制剂, 以研究肿瘤靶向药物。MK-2206^[64]便是研究人员开发出来一个效应较好的别构抑制剂, 对于人源性重组AKT1的IC₅₀为5 nmol/L, 对于AKT2的IC₅₀为12 nmol/L, 对于AKT3的IC₅₀为65 nmol/L。其靶向一个独特的别构口袋, 即AKT无活性构象下的催化激酶中心结构域和PH调节结构域的交界面。在研究中, 在体内、体外都做了相应实验, 与现今临床上使用的其他化疗药物联用能够对恶性肿瘤起到较好的抑制作用, 也为别构药物的开发奠定了一定的基础。现在, MK-2206已经在乳腺癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌、结肠

癌和直肠癌等恶性肿瘤的治疗上, 以日最大耐受剂量60 mg, 周间歇剂量200 mg, 广泛进行临床一期和二期的试验^[65]。

同样, ARQ 092(21a)也是最近研究人员开发的AKT激酶抑制剂。晶体学研究表明, ARQ 092能结合无活性、未磷酸化的AKT1, 其亲和力 $k_d=0.28$ nmol/L, 抑制ATK1、AKT2和AKT3的IC₅₀分别为3 nmol/L、4.5 nmol/L和5.5 nmol/L^[66]。最近, 21a与全长AKT1共晶(PDB code: 5KCV)被解析出来, 确定了其别构抑制的模式, 21a占据了激酶结构域和PH结构域之间的交界面的别构口袋, 使ATK1采用自抑制的构象, 从而抑制AKT1的活性^[67]。

4.1.2 CDK2 CDK2是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的一员, 依赖于与细胞周期蛋白A(cyclin A)的结合, 调控细胞G₁期到S期的转变, 其磷酸化是G₁/S过渡所必需的, 其异常活性会导致细胞内多种生理生化过程失调, 诱发炎症、癌症等疾病的发生^[68]。在



别构化合物为球状模式表示, 其中碳为绿色。

The modulators show in spheres, in which carbon is colored in green.

图1 蛋白别构调节分子共晶

Fig.1 The cocrystral structures of proteins in complex with allosteric modulators

肿瘤细胞中, CDK2活性异常上调, 至今己有许多针对CDK2设计的小分子抑制剂, 但是其中许多是ATP结合位点的竞争性抑制剂。由于CDKs家族蛋白的保守型较高, ATP结合位点的竞争性抑制剂的选择性和特异性较差^[69]。近些年己有针对CDK2的别构小分子抑制剂和别构多肽类似物陆续报道。

Betzi等^[70]发现了CDK2的新型别构抑制剂8-苯胺基-1-萘磺酸酯(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS), 主要作用于CDK2和cyclin相互作用界面。从CDK2-ANS复合物的共晶(PDB code: 3PXF)可以看出, 两个ANS分子并排结合在一个从 α C螺旋上天冬氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸区域延伸出来的大的口袋中, 距离ATP结合位点有较远距离。通过CDK2和CDK2-ANS构象比较可以看出, CDK2结合ANS后, 构象有了很大的变化, α C螺旋向外移动, 阻止了CDK2与cyclin的结合。

Hu等^[71]利用计算生物学方法, 首先进行虚拟筛选和生物学活性评价, 筛选到对CDK2/cyclin A3相互作用具有显著抑制作用的别构抑制小分子B2, 并在细胞水平发现, B2对人类恶性肿瘤细胞系具有广谱的抗肿瘤效应, 且呈现出明显地浓度梯度效应。随后, 邵媛媛等^[72]根据之前文献报道, 针对CDK2靶点进一步筛选和改造别构抑制剂(图2)。

4.1.3 PDK1 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(3-phosphoinositide dependent protein kinase-1, PDK1)是丝氨酸/苏氨酸AGC蛋白激酶家族的一员, 其是AGC家族蛋白激酶上游的主要调控因子之一, 其上游调控因子主要是PI3K, 在PI3K/Akt信号转导

通路中发挥重要作用, 参与细胞内转录、翻译, 细胞的增殖、凋亡, 细胞周期的调控等细胞生物学环节^[73]。PDK1具有氮端激酶片段(PDK1-interacting fragment, PIF)和碳端PH结构域, PIF可以与其底物碳端疏水基序(hydrophobic motifs, HMs)结合^[74]。一旦PIF口袋被占据, PDK1的激酶活性显著性提升。

Hindie等^[75]筛选了一个直接结合PIF口袋化合物库, 找到一个小分子别构激动剂PS48。通过PDK1和PS48的共晶解析(PDB code: 3HRF), 我们可以发现PS48结合在PIF口袋上, 位于 α C螺旋、 α B螺旋、 β 4片层和 β 5片层之间。通过对PS48诱导的构象变化的分析, 可以看出PS48诱导了PIF结合口袋的区域性变化, 同时ATP结合位点和活化环也发生了显著的别构效应, 从而稳定了PDK1活化的必要构象。

除此之外, Sadowsky等^[76]创建了通过与半胱氨酸形成二硫键共价结合到PDK1上, 具体来说是一段多肽基序上的一个半胱氨酸与PIF口袋里上的半胱氨酸结合, 这段多肽称为PIFtide。Sadowsky也发展了类似的小分子片段来实现与半胱氨酸共价结合。PIFtide与PDK1半胱氨酸突变体的配对二硫键形成实验确定了PIFtide结合到PIF口袋, 并且建立了PIFtide定位与蛋白激酶激活间的关系。大量的小分子二硫化物与PIF口袋配对结合, 其共晶(PDB code: 3ORZ、3OTU、3ORX), 分别对应化合物2A2、JS30、1F8, 也显现出对PDK1相似的激动或抑制效应, 而且与PIFtide相比, 这些小分子结合后还表现出很大的功能学差异, 2A2和JS30为激动效应, 1F8为抑制效应。这还说明了不同的别构调节分子结合同

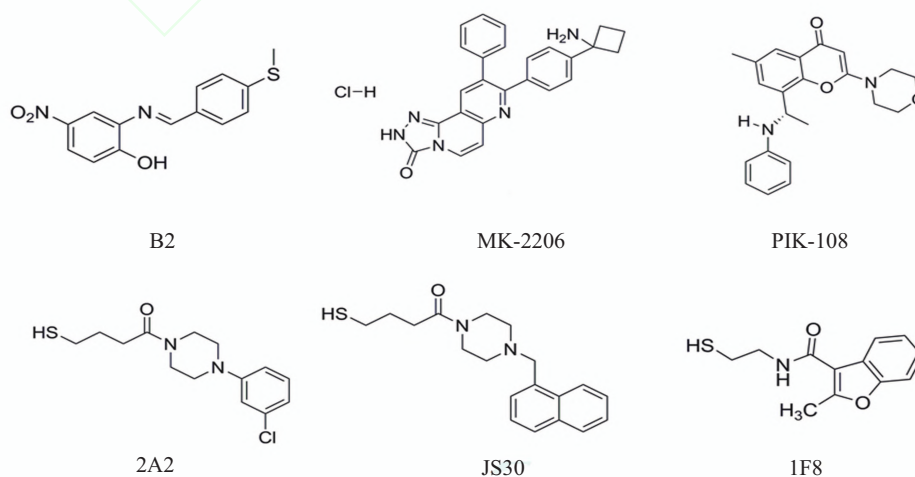


图2 别构调节分子化学结构

Fig.2 Chemical structures of allosteric modulators

一个别构位点, 也可能造成不同的别构效应, 可能是激动效应, 亦可能是抑制效应。

4.1.4 PI3K 磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3Ks)因其可以磷酸化磷脂酰肌醇PI(一种膜磷脂)肌醇环的第3位碳原子而得名, 属于脂质激酶家族^[77]。PI3K参与多种细胞信号通路, 调控着众多肿瘤发生发展中至关重要的生物学过程, 包括细胞生长、存活、增殖、血管生成、迁移和转移等^[78-79]。在人类许多恶性肿瘤临床样本中检测到PI3K异常活化^[80], 所以PI3K被当作一个具有很大潜力的药物开发靶点。

PI3K信号通路在细胞生长、增殖和存活等方面发挥重要的作用。在RTK(receptor tyrosine kinase)和生长因子等的刺激下, PI3K磷酸化PIP2产生PIP3。细胞内PIP3的水平受到磷酸酶和PTEN(phosphatase and tensin homolog)的严密调控, PIP3被PTEN去磷酸化成为PIP2。在许多类型的恶性肿瘤中, 因为上游生长因子信号通路的过度激活、突变或肿瘤抑制因子PTEN的缺失、PIK3CA的突变等都导致了PI3K信号通路的紊乱。不难看出PI3K在肿瘤行程过程中具有不可磨灭的作用。并且越来越多的证据显示PI3K α 的高度活化与肿瘤生存及对现有疗法的耐药性有很大关系^[81]。

针对PI3K靶点的别构调节小分子的设计是目前别构领域的一个重要研究方向, PI3K至今已发现多种活性位点的竞争性抑制剂^[82]。现在已有很多研究人员正在研究PI3K的自然状况下的别构机制^[83]。PI3K的别构抑制剂目前有PIK-108, 结合在PI3K α 碳端近突变热点H1047R的别构位点, 但是其也结合在ATP结合位点上^[84]。

4.2 其他蛋白别构调节剂进展

4.2.1 KGA 谷氨酰胺酶催化谷氨酰胺的水解作用, 人类有两种谷氨酰胺酶基因GLS1(glutaminase kidney isoform 1)和GLS2, GLS1编码两种亚型的谷氨酰胺酶, 一种是肾型谷氨酰胺酶(kidney-type glutaminase, KGA), 另一种是谷氨酰胺酶C(glutaminase C, GAC); GLS2编码肝型谷氨酰胺酶(liver-type glutaminase, LGA)。KGA和LGA两种谷氨酰胺酶都与恶性肿瘤和神经病理性疾病有关^[85], 但是KGA被认为会促进肿瘤生长, 而LGA被认为具有抑癌作用^[86-87]。谷氨酰胺酶在肿瘤细胞中起着维持生物大分子物质合成, 提供所需能量和平衡氧化还

原反应的重要作用。

Delabarre等^[88]和Thangavelu等^[89]解析出了KGA和小分子别构抑制剂BPTES的共晶。晶体结构显示, BPTES结合到一个之前没有预测到的别构口袋中, 这个口袋位于KGA二聚体表面的亲水的溶剂暴露区域内, 离第286位的丝氨酸活性位点大约18 Å的距离。对比单独的KGA和KGA-BPTES复合物(PDB code: 3UO9、3VOZ)的结构, 可以发现, BPTES引起KGA 312位的谷氨酸至329位的脯氨酸区域靠近活性位点的关键环结构的构象变化, 将催化位点固定成了一个开放的、无活性的构象。通过对结构和活性关系的研究, Shukla等^[90]开发出了具有更高活性的BPTES的类似物, 表现出相似的性能和更好的溶解度, 在人类淋巴瘤B细胞P493里显现出抑癌效应。

4.2.2 SR 丝氨酸消旋酶(serine racemase, SR)是磷酸吡哆醛依赖性的消旋酶, 能够催化L型丝氨酸转变为D型丝氨酸, 调节D型丝氨酸在组织中的表达水平。D型氨基酸在中枢神经系统中表达水平很高, 其作为一个神经元的信号分子, 具有很重要的作用^[91-92]。D型丝氨酸作为内源性配体, 结合于N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate, NMDA)的甘氨酸位点将其激活, 其活性主要是由谷氨酸激动剂和D型丝氨酸和甘氨酸协同激动剂调控^[93]。NMDA受体在神经兴奋的传递、海马区的突触可塑性、学习和记忆等方面发挥着重要的作用^[94]。

基于荧光测定, Marchetti等^[95]发现ATP结合到SR上是与甘氨酸共同作用且受甘氨酸调控的, 在ATP结合上SR后, SR被ATP别构激活。通过叠印人类SR(PDB code: 3L6B)的结构和粟酒裂殖酵母SR的结构(PDB code: 1V71)可以发现, ATP不仅引起了距离活性位点15 Å处的构象变化, 还引起了距ATP结合位点24 Å处的构象变化。这些数据表明, SR可以作为一个靶点进行靶向ATP别构位点的药物设计, 将可能用于NMDA导致的精神疾病的治疗。

5 结语与展望

别构调节是机体内普遍存在的调节方式, 主要通过别构位点结合调节分子, 在蛋白等大分子内部传递信号来有效地远程调控活性位点的功能活性。随着目前别构蛋白和别构位点不断的发现, 针对别构位点的调节分子在药物开发领域逐渐得到重视, 出现了针对药物靶点开发的多个重量级别构调节

分子候选药物。正位位点药物通常与蛋白的配体具有相似的化学结构, 竞争性地结合位点发挥功能, 但受困于同家族的蛋白正位位点保守而特异性不佳。别构药物因为别构位点保守性低因而结构多样性大, 并且能在家族蛋白中特异性识别靶蛋白。对于药物靶标中占50%以上的重要家族G蛋白耦联受体和蛋白激酶靶向药物, 高选择性尤为重要; 另外, 别构药物相比正位位点药物毒性更低。对于共价别构调节的研究表明, 共价别构调节可能对蛋白产生持续性地影响, 为长效低毒药的研发开辟了一条新途径。

别构药物的研发过程中凸显出了很多别构药物的优点, 但也仍有许多欠缺的地方等待完善。首先, 别构位点的识别和别构调节分子的设计需要更为精确的方法; 其次, 别构药物的亲和力大多不如正位位点的药物。随着药物设计和结构生物学的发展, 药物开发工作者将有更多的工具和手段对别构药物的结构进行高效率的改造以提高亲和力, 着重于提高已有高效别构调节分子的亲和力可能是其未来成药的关键点; 最后, 设计共价别构药物来降低药物使用剂量以降低副作用、提升作用时间和作为长效药设计策略也是未来研究的方向之一。

参考文献 (References)

- Goodey NM, Benkovic SJ. Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat Chem Biol* 2008; 4(8): 474-82.
- Pan Y, Tsai CJ, Ma B, Nussinov R. Mechanisms of transcription factor selectivity. *Trends Genet* 2010; 26(2): 75-83.
- Cui Q, Karplus M. Allostery and cooperativity revisited. *Pro Sci* 2008; 17(8): 1295-307.
- Iverson C, Larson G, Lai C, Yeh LT, Dadson C, Weingarten P, *et al.* RDEA119/BAY 869766: A potent, selective, allosteric inhibitor of MEK1/2 for the treatment of cancer. *Cancer Res* 2009; 69(17): 6839-47.
- Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, Haynes NE, Bizzarro FT, Coffey JW, *et al.* Allosteric activators of glucokinase: Potential role in diabetes therapy. *Science* 2003; 301(5631): 370-3.
- Marino MJ, Jr WD, O'Brien JA, Valenti O, McDonald TP, Clements MK, *et al.* Allosteric modulation of group III metabotropic glutamate receptor 4: A potential approach to Parkinson's disease treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(23): 13668-73.
- Ising M, Holsboer F. CRH-sub-1 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety. *Exp Clin Psychopharmacol* 2007; 15(6): 519-28.
- Bohr C, Hasselbalch K, Krogh A. Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt (pages 402-412). *Acta Physiologica* 1904; 16(2): 402-12.
- Hill A. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* 1910; 40(supplement): 1115-21.
- Adair GS. The hemoglobin system: VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J Biol Chem* 1925; 63(2): 529-45.
- Pauling L. The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Its Structural Interpretation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1935; 21(4): 186-91.
- Klotz IM. The application of the law of mass action to binding by proteins; interactions with calcium. *Arch Biochem* 1946; 9: 109-17.
- Fischer E, Pocker A, Saari J. The structure, function and control of glycogen phosphorylase. *Essays Biochem* 1969; 6: 23-68.
- Umbarger HE. Evidence for a negative-feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine. *Science* 1956; 123(123): 848.
- Pardee AB, Yates RA. Pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1956; 221(2): 743-56.
- Monod J, Jacob F. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1961; 26(5): 389-401.
- Monod J, Changeux JP, Jacob F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 1963; 6(4): 306-29.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol* 1965; 12(1): 88-118.
- Koshland Jr D, Nemethy G, Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 1966; 5(1): 365-85.
- Cooper A, Dryden DT. Allostery without conformational change. A plausible model. *Eur Biophys J* 1984; 11(2): 103-9.
- Bryngelson JD, Wolynes PG. Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(21): 7524-8.
- Kumar S, Ma B, Tsai CJ, Wolfson H, Nussinov R. Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. *Cell Biochem Biophys* 1999; 31(2): 141-64.
- Ma B, Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Eng* 1999; 12(9): 713-20.
- Lockless SW, Ranganathan R. Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science* 1999; 286(5438): 295-9.
- Rodriguez AL, Nong Y, Sekaran NK, Alagille D, Tamagnan GD, Conn PJ. A close structural analog of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine acts as a neutral allosteric site ligand on metabotropic glutamate receptor subtype 5 and blocks the effects of multiple allosteric modulators. *Mol Pharmacol* 2005; 68(6): 1793-802.
- Jaffe EK. Morpheins—a new structural paradigm for allosteric regulation. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(9): 490-7.
- Popovych N, Sun S, Ebright RH, Kalodimos CG. Dynamically driven protein allostery. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(9): 831-8.
- Nussinov R, Tsai CJ. Allostery without a conformational change? Revisiting the paradigm. *Curr Opin Struct Biol* 2015; 30: 17-24.
- Tsai CJ, Sol AD, Nussinov R. Protein allostery, signal transmission and dynamics: A classification scheme of allosteric mechanisms. *Mol Biosyst* 2009; 5(3): 207-16.
- Shi Y. A Glimpse of Structural Biology through X-Ray

- Crystallography. *Cell* 2014; 159(5): 995-1014.
- 31 Selvaratnam R, Chowdhury S, Vanschouwen B, Melacini G. Mapping allostery through the covariance analysis of NMR chemical shifts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(15): 6133-8.
- 32 Grutsch S, Brüscheiler S, Tollinger M. NMR methods to study dynamic allostery. *PLoS Comput Biol* 2016; 12(3): e1004620.
- 33 Modesti M. Fluorescent labeling of proteins. *Methods Mol Biol* 2011; 783: 101-20.
- 34 Englander JJ, Mar CD, Li W, Englander SW, Kim JS, Stranz DD, *et al.* Protein structure change studied by hydrogen-deuterium exchange, functional labeling, and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(12): 7057-62.
- 35 Engen JR. Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. *Anal Chem* 2009; 81(19): 7870-5.
- 36 Chandramohan A, Krishnamurthy S, Larsson A, Nordlund P, Jansson A, Anand GS. Predicting allosteric effects from orthosteric binding in Hsp90-ligand interactions: Implications for fragment-based drug design. *PLoS Comput Biol* 2016; 12(6): e1004840.
- 37 Hardy JA, Wells JA. Searching for new allosteric sites in enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14(6): 706-15.
- 38 Sadowsky JD, Burlingame MA, Wolan DW, McClendon CL, Jacobson MP, Wells JA. Turning a protein kinase on or off from a single allosteric site via disulfide trapping. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(15): 6056-61.
- 39 Zhuravlev PI, Papoian GA. Protein functional landscapes, dynamics, allostery: A tortuous path towards a universal theoretical framework. *Q Rev Biophys* 2010; 43(3): 295-332.
- 40 Jiao W, Parker EJ. Using a combination of computational and experimental techniques to understand the molecular basis for protein allostery. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2012; 87: 391-413.
- 41 Huang Z, Zhu L, Cao Y, Wu G, Liu X, Chen Y, *et al.* ASD: A comprehensive database of allosteric proteins and modulators. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(Database issue): D663-9.
- 42 Shen Q, Wang G, Li S, Liu X, Lu S, Chen Z, *et al.* ASD v3.0: Unraveling allosteric regulation with structural mechanisms and biological networks. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(D1): D527-35.
- 43 Li S. Alloscore: A method for predicting allosteric ligand-protein interactions. *Bioinformatics* 2016; 32(10): 8-17.
- 44 Huang W, Wang G, Shen Q, Liu X, Lu S, Geng L, *et al.* ASBench: Benchmarking sets for allosteric discovery. *Bioinformatics* 2015; 31(15): 2598-600.
- 45 Ma B, Elkayam T, Wolfson H, Nussinov R. Protein-protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(10): 5772-7.
- 46 Capra JA, Laskowski RA, Thornton JM, Singh M, Funkhouser TA. Predicting protein ligand binding sites by combining evolutionary sequence conservation and 3D structure. *PLoS Comput Biol* 2009; 5(12): e1000585.
- 47 Chiariello M, Marinissen MJ, Gutkind JS. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the c-jun oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol Cell Biol* 2000; 20(5): 1747-58.
- 48 Corcoran RB, Dias-Santagata D, Bergethon K, Iafrate AJ, Settleman J, Engelman JA. BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Science Signal* 2010; 3(149): ra84.
- 49 Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, *et al.* COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010; 468(7326): 968-72.
- 50 Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005; 2(3): e73.
- 51 Anderson AC. Winning the arms race by improving drug discovery against mutating targets. *ACS Chem Biol* 2011; 7(2): 278-88.
- 52 Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, *et al.* Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17(24): 7808-15.
- 53 Nussinov R, Tsai CJ, Cserehely P. Allo-network drugs: Harnessing allostery in cellular networks. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(12): 686-93.
- 54 Copeland RA. The dynamics of drug-target interactions: Drug-target residence time and its impact on efficacy and safety. *Expert Opin Drug Discov* 2010; 5(4): 305-10.
- 55 Nussinov R, Tsai CJ. The design of covalent allosteric drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015; 55: 249-67.
- 56 Kuo MT. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(1): 99-133.
- 57 Wang W, Guan KL. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 196(1): 55-63.
- 58 Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J* 2012; 441(2): 553-69.
- 59 Cosentinogomes D, Roccomachado N, Meyerfernandes JR. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *Int J Mol Sci* 2011; 13(9): 10697-721.
- 60 Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001; 61(61): 3986-97.
- 61 Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1): 28-39.
- 62 Wu WI, Voegtli WC, Sturgis HL, Dizon FP, Vigers GP, Brandhuber BJ. Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One* 2010; 5(9): e12913.
- 63 Ashwell MA, Lapierre JM, Brassard C, Bresciano K, Bull C, Cornell-Kennon S, *et al.* Discovery and optimization of a series of 3-(3-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: Orally bioavailable, selective, and potent ATP-independent Akt inhibitors. *J Med Chem* 2012; 55(11): 5291-310.
- 64 Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K, *et al.* MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(7): 1956-67.

- 65 Yap TA, Yan L, Patnaik A, Tunariu N, Biondo A, Fearon I, *et al.* Interrogating two schedules of the AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors incorporating novel pharmacodynamic and functional imaging biomarkers. *Clin Cancer Res* 2014; 20(22): 5672-85.
- 66 Chan TC, Lapierre JM, Ashwell MA, France DS, Chen CR, Cornell-Kennon S, *et al.* Abstract A230: Discovery and characterization of ARQ 092, an ATP-independent, potent and selective inhibitor of AKT kinases. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(11 Supplement): A230-A30.
- 67 Lapierre J-M, Eathiraj S, Vensel D, Liu Y, Bull CO, Cornell-Kennon S, *et al.* Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3 H-imidazo [4, 5-b] pyridin-2-yl) pyridin-2-amine (ARQ 092): An orally bioavailable, selective, and potent allosteric AKT inhibitor. *J Med Chem* 2016; 59(13): 6455-69.
- 68 Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(8): 558-72.
- 69 Errico A, Deshmukh K, Tanaka Y, Pozniakovsky A, Hunt T. Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Adv Enzyme Regul* 2010; 50(1): 375-99.
- 70 Betzi S, Alam R, Martin M, Lubbers DJ, Han H, Jakkaraj SR, *et al.* Discovery of a potential allosteric ligand binding site in CDK2. *ACS Chem Biol* 2011; 6(5): 492-501.
- 71 Hu Y, Li S, Liu F, Geng L, Shu X, Zhang J. Discovery of novel nonpeptide allosteric inhibitors interrupting the interaction of CDK2/cyclin A3 by virtual screening and bioassays. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25(19): 4069-73.
- 72 邵媛媛, 张璐, 沈瑛, 张健. CDK2别构小分子抑制剂的虚拟筛选和体外活性研究. *上海交通大学学报(医学版)*(Shao Yuanyuan, Zhang Lu, Shen Ying, Zhang Jian. Virtual screening of and in vitro activity study on allosteric small-molecule CDK2 inhibitors. *Journal of Shanghai Jiao Tong University, Medical Science*) 2016; 36(4): 523-7.
- 73 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7): 489-501.
- 74 Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(1): 9-22.
- 75 Hindie V, Stroba A, Zhang H, Lopez-Garcia LA, Idrissova L, Zeuzem S, *et al.* Structure and allosteric effects of low-molecular-weight activators on the protein kinase PDK1. *Nat Chem Biol* 2009; 5(10): 758-64.
- 76 Sadowsky JD, Burlingame MA, Wolan DW, McClendon CL, Jacobson MP, Wells JA. Turning a protein kinase on or off from a single allosteric site via disulfide trapping. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(15): 6056-61.
- 77 Kaplan DR, Whitman M, Schaffhausen B, Raptis L, Garcea RL, Pallas D, *et al.* Phosphatidylinositol metabolism and polyoma-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(11): 3624-28.
- 78 Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(8): 550-62.
- 79 Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, *et al.* Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2005; 11(9): 936-43.
- 80 Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304(5670): 554-54.
- 81 Crabbe T, Welham MJ, Ward SG. The PI3K inhibitor arsenal: Choose your weapon! *Trends Biochem Sci* 2007; 32(10): 450-6.
- 82 Zhao Y, Zhang X, Chen Y, Lu S, Peng Y, Wang X, *et al.* Crystal structures of PI3K α complexed with PI103 and its derivatives: New directions for inhibitors design. *ACS Med Chem Lett* 2013; 5(2): 138-42.
- 83 Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110 α (PIK3CA). *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109(38): 15259-64.
- 84 Hon WC, Berndt A, Williams RL. Regulation of lipid binding underlies the activation mechanism of class IA PI3-kinases. *Oncogene* 2012; 31(32): 3655-66.
- 85 Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm Genome* 2000; 11(12): 1107-10.
- 86 Martín-Rufián M, Nascimento-Gomes R, Higuero A, Crisma AR, Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, *et al.* Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *J Mol Med* 2014; 92(3): 277-90.
- 87 Szeliga M, Bogacińska-Karaś M, Różycka A, Hilgier W, Marquez J, Albrecht J. Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumor Biol* 2014; 35(3): 1855-62.
- 88 Delabarre B, Gross S, Fang C, Gao Y, Jha A, Jiang F, *et al.* Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. *Biochemistry* 2011; 50(50): 10764-70.
- 89 Thangavelu K, Sivaraman J. Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(20): 7705-10.
- 90 Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1, 2, 4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. *J Med Chem* 2012; 55(23): 10551-63.
- 91 Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, *et al.* The presence of free D - serine in rat brain. *FEBS Lett* 1992; 296(1): 33-6.
- 92 Bauer D, Hamacher K, Bröer S, Pauleit D, Palm C, Zilles K, *et al.* Preferred stereoselective brain uptake of d-serine—a modulator of glutamatergic neurotransmission. *Nucl Med Biol* 2005; 32 (8): 793-7.
- 93 Wolosker H. NMDA receptor regulation by D-serine: New findings and perspectives. *Mol Neurobiol* 2007; 36(2): 152-64.
- 94 Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996; 87(7): 1327-38.
- 95 Marchetti M, Bruno S, Campanini B, Peracchi A, Mai N, Mozzarelli A. ATP binding to human serine racemase is cooperative and modulated by glycine. *FEBS J* 2013; 280(22): 5853-63.