

NMD 逃逸机制及其在疾病治疗中的应用

程苗苗, 曹延延

首都儿科研究所遗传室, 北京 100020

摘要: 无义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)是指在病理或正常生理情况下 mRNA 上出现了提前终止密码子(premature termination codon, PTC), 从而导致 mRNA 降解。它是一种广泛存在的 mRNA 质量监控机制。近年来, 在多种疾病中发现某些 PTC 并未触发 NMD, 这种现象被称为 NMD 逃逸(NMD escape), 然而其确切机制尚不十分清楚。目前公认的两个学说为: (1) PTC 通读, 即蛋白的翻译可以顺利通过 PTC 直至正常的终止密码子, 产生全长蛋白; (2) 翻译的重新启动, 即蛋白翻译在 PTC 下游的潜在起始点重新开始直至终止密码子, 产生 N 端截短蛋白。目前, 通过利用 PTC 通读, 越来越多的药物或小分子已被成功用于无义变异相关疾病的治疗。本文主要综述了 NMD 逃逸的机制及其在疾病治疗中的应用和进展, 以期为进一步了解 NMD 逃逸及其相关应用概况提供参考。

关键词: NMD 逃逸; 无义突变; 提前终止密码子; PTC 通读

The NMD escape mechanism and its application in disease therapy

Miaomiao Cheng, Yanyan Cao

Department of Medical Genetics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Abstract: Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) refers to the degradation of mRNA due to the presence of premature stop codon (PTC) on mRNA under pathological or physiological conditions. NMD is widely considered an mRNA-specific quality control process. Recently it was discovered that some PTCs do not trigger NMD in a variety of diseases – a process known as NMD escape; however, its exact mechanism remains unclear. At present, there are two widely accepted mechanistic hypotheses during NMD escape. The first is PTC read-through, in which protein translation undergoes PTC until the normal stop codon is encountered, producing a full-length protein. The second is translation reinitiation, in which protein translation recommences at the potential start codon downstream of PTC and terminates at

收稿日期: 2019-12-20; 修回日期: 2020-02-25

基金项目: 北京市自然科学基金项目(编号: 5163028), 国家自然科学基金项目(编号: 81500979), 国家重点研发计划项目(编号: 2016YFC0901505)和中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(编号: 2016-I2M-1-008)资助[Supported by Beijing Natural Science Foundation (No.5163028), the National Natural Science Foundation of China (No.81500979), the National Key Research and Development Program of China (No.2016YFC0901505), and CAMS Initiative for Innovative Medicine(No.2016-I2M-1-008)]

作者简介: 程苗苗, 硕士研究生, 专业方向: 儿科学。E-mail: 1245156226@qq.com

通讯作者: 曹延延, 博士, 副研究员, 研究方向: 脊髓性肌萎缩症的分子机制。E-mail: caoyanyan@bjmu.deu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.19-335

网络出版时间: 2020/2/28 8:29:33

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20200226.1720.001.html>

the stop codon, producing an N-terminal truncated protein. Currently, an increasing number of drugs or small molecules that use PTC read-through have been successfully applied to treat nonsense variation-associated diseases. In this review, we summarize the NMD mechanism and discuss the application and progress in our understanding of NMD escape in disease therapy. This review should provide a useful framework to advance current understanding of the research and application of NMD escape.

Keywords: NMD escape; nonsense mutation; premature stop codon (PTC); PTC read-through

无义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)是一种广泛存在于真核生物的 mRNA 质量监控机制,特异性识别并降解含有提前终止密码子(premature termination codon, PTC)的 mRNA^[1],同时 NMD 也是机体调控基因表达的重要方式之一。在正常生理情况下, mRNA 的可变剪接、转录错误或程序性基因重排可产生 PTC,触发 NMD 途径使其降解,从而阻止有害的截短蛋白的产生。在病理情况下,以无义和移码变异为主的基因突变也可产生 PTC,通过触发 NMD 降解 mRNA 导致靶蛋白表达下降从而引发疾病^[2,3]。约 1/3 已知病因的人类遗传病是由基因突变产生的 PTC 所致^[4]。

在哺乳动物细胞中,前体 mRNA 被剪接后在距离外显子与外显子连接点(exon-exon junction, EEJ)上游约 20~24 个核苷酸的位置处会形成一个外显子-外显子连接点复合物(exon-exon junction complex, EJC)。在正常的翻译过程中,核糖体沿着 mRNA 移动,替换下游所有的 EJC 并在正常的终止密码子处停止翻译,产生全长蛋白。若 mRNA 中存在 PTC,翻译核糖体会在 PTC 处停止,募集 UPF1、SMG1 和两个翻译释放因子(eRF1 和 eRF3)形成 SURF 复合物。该复合物通过对下游 EJC 的识别,使 NMD 的核心组分-UPF1、UPF2 和 UPF3 相互作用,最终导致 UPF1 发生磷酸化。磷酸化的 UPF1 一方面靶向作用于翻译起始因子 eIF3 抑制下一轮翻译的开始,另一方面进一步招募具有核酸内切酶和核酸外切酶活性的 SMG 系列因子介导 mRNA 的降解^[5]。NMD 效率在不同的转录本、细胞和组织类型以及个体间均存在广泛的变异性,更有甚者甚至不发生 NMD,即产生了所谓的 NMD 逃逸(NMD escape)现象。本文对 NMD 逃逸的机制及其在临床中的应用进行了综述。

1 NMD 逃逸与机制

通常,当 PTC 距离最后一个 EEJ 大于或等于 50~55 个核苷酸即可触发 NMD,称为 NMD 途径的 50 边界规则^[6]。然而,研究者发现某些 PTC 虽然符合这个规则,但是却没有发生 NMD 导致 mRNA 的降解,学者称这种现象为 NMD 逃逸。通过分析功能基因组学数据库发现有 52.7% 的人群常见的无义变异发生了 NMD 逃逸^[7]。研究表明这些发生 NMD 逃逸的转录本,其 PTC 多位于距离翻译起始位点较近的区域,比如一些位于人 β 球蛋白基因外显子 1 的 PTC 并未触发 NMD 而导致 mRNA 的降解,携带这类 PTC 的转录本与野生型 β 球蛋白 mRNA 转录水平相当^[8]。这种现象也被称为“AUG 邻近效应”^[9,10]:即在加帽介导的翻译起始过程中,胞质多聚腺苷酸结合蛋白 1 (PABPC1)通过与真核起始因子 eIF4G 和 eIF3 之间的相互作用,靠近 40S 核糖体亚基,形成环状结构。PABPC1 也因此邻近 AUG 起始密码子。随着翻译延伸的开始,这个闭合的环状结构使 PABPC1 与位于 AUG 附近 PTC 上的终止复合物近在咫尺。此时 PABPC1 竞争性的与终止复合物中的 eRF3 相互作用,从而削弱了 eRF3 与 NMD 关键因子 UPF1 间的作用,抑制 NMD 途径。

虽然 NMD 逃逸的现象很早就有报道,但是近些年才开展系统性研究且确切机制尚不十分清楚,目前比较公认的学说有两个:PTC 通读和翻译的重新启动。蛋白质的翻译过程大体可以分为翻译的起始、肽链的延伸、翻译的终止以及翻译终止后核糖体复合物的解体即核糖体的循环再利用四个阶段。由于 NMD 与蛋白质的翻译偶联,因此 NMD 逃逸也与蛋白质的翻译过程息息相关。

1.1 PTC 通读

PTC 通读是指在蛋白翻译过程中, 由于 tRNA 错配或核糖体移码或跳跃等原因导致翻译可以顺利通过 PTC, 直至遇到正常的终止密码子。就通读效率而言, PTC 的通读效率约为正常终止密码子的 10 倍, 因而哺乳动物细胞中通读更倾向于发生在 PTC, 而对于正常终止密码子的通读则极为罕见且低效^[11]。

在生理情况下, 真核生物中蛋白质翻译的起始需要核糖体大小亚基、起始 tRNA (Met-tRNA^{Met}) 和包括起始因子(eIF1、eIF2 和 eIF3)在内的几十个蛋白因子的参与, 在模板 mRNA 编码区的 5'端形成核糖体-mRNA-起始 tRNA 复合物, 并将甲硫氨酸放入核糖体的 P 位。

蛋白翻译起始后, 随着下一个氨基酸由氨酰-tRNA (AA-tRNA) 运送到核糖体的 A 位, 在肽基转移酶的催化下, 与位于 P 位的上一个氨基酸生成肽键, 肽链得以不断延长。同时核糖体也向 mRNA 模板的 3'端方向逐步移动一个密码子, mRNA 模板上的密码子决定了何种 AA-tRNA 能被结合到 A 位上。当终止密码子(UAG、UGA 或 UAA)出现在核糖体的 A 位时, 没有相应的 AA-tRNA 能与之结合, 取而代之的是释放因子。释放因子能识别终止密码子并与之结合, 水解 P 位上多肽链与 tRNA 之间的二酯键。因其具有 GTP 酶活性, 通过催化 GTP 水解, 使肽链与核糖体解离。在真核细胞中, 释放因子 eRF1 识别终止密码子, 催化新合成的多肽链从 P 位点的

tRNA 中水解释放出来; 而具有 GTP 酶活性的释放因子 eRF3 在多肽链释放后刺激 eRF1 从核糖体 A 位解离, 至此蛋白质的合成结束。

因此, 蛋白质的翻译是终止还是继续取决于释放因子和非同工 tRNA 之间相互竞争与核糖体 A 位点的结合^[3]。当释放因子识别 PTC 并与核糖体大亚基的 A 位结合时, 则翻译终止, 触发 NMD 途径, mRNA 发生降解。虽然细胞内存在多种校正机制以确保 mRNA 上的密码子可以被正确识别, 但是准确率仍然达不到 100%。当携带某种氨基酸的非同工 tRNA 与核糖体 A 位偶然结合, 使无义密码子重新被解码为有义密码子, PTC 被该氨基酸所取代, 翻译继续进行, 即表现为由于 tRNA 错配导致的 PTC 通读(图 1A)。此外, 通常情况下核糖体对 mRNA 密码子的识别是由起始密码子开始, 沿 5'至 3'端方向, 一个接一个直到终止密码子, 但也有一些例外, 翻译过程中某些反式作用因子决定核糖体在 mRNA 特定位点上的读码框可以发生程序性移动一个或者多个核苷酸后继续翻译, 这一过程称为程序性核糖体移码或核糖体跳跃(ribosome frameshifting/jumping) (图 1B)^[12]。当核糖体恰巧跳过了 PTC, 则引发由于核糖体跳跃导致的 PTC 通读, 但是目前尚缺少相关报道。

综上所述, 因 PTC 通读引发的 NMD 逃逸, 具有以下两个特点: 首先, 由于未触发 NMD 途径, 因此携带 PTC 转录本的转录水平与野生型相当; 其次, 由于 PTC 被氨基酸取代, 且翻译终止于正常的

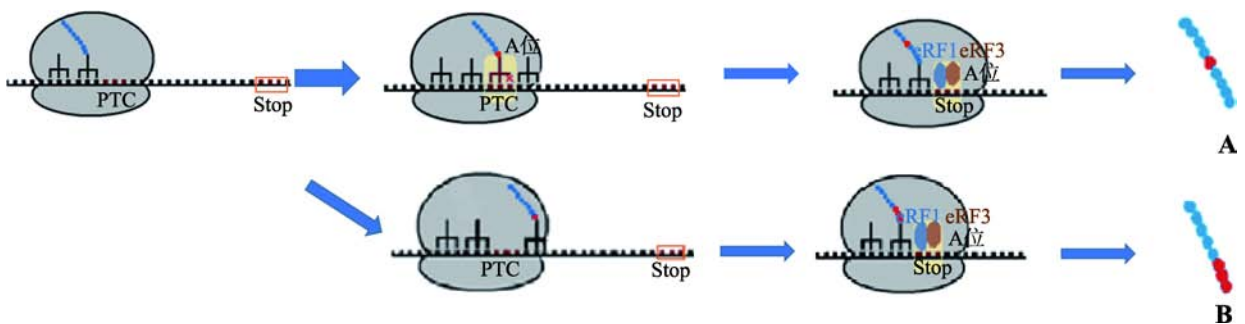


图 1 PTC 通读机制

Fig. 1 Mechanism of translational read-through

A: tRNA 错配。由于 tRNA 错配, 使 PTC 被解码为有义密码子, 生成氨基酸(红色), 翻译继续向下进行, 发生 PTC 通读。B: 核糖体跳跃。核糖体在 mRNA 特定位点上的读码框发生程序性移动, 即程序性核糖体移码或核糖体跳跃, 当核糖体恰巧跳过了 PTC, 则引发由于核糖体跳跃导致的 PTC 通读。PTC: 提前终止密码子; Stop: 终止密码子; eRF1: 翻译释放因子 1; eRF3: 翻译释放因子 3; 蓝色为野生型氨基酸序列; 红色为非野生型氨基酸序列。

终止密码子,因而可产生全长的蛋白质。虽然取代 PTC 的氨基酸可能与正常蛋白相应位置的氨基酸不同,但是如果该位置不是蛋白的关键功能区域,那么新生成的蛋白可发挥正常或部分正常功能。因此,这一机制也是目前主要用于抑制病理性 NMD 的有害作用、上调功能蛋白的表达从而靶向治疗遗传性疾病的分子基础^[13],使用氨基糖甙类抗生素、非氨基糖甙类抗生素、小分子化合物(如 PTC124)以及可与 PTC 结合的 tRNA 衍生物等均可诱导 PTC 的通读^[14]。

Menkes 综合征是一种由 *ATP7A* 基因突变导致铜转运障碍而引起的多系统受累 of X 连锁隐性遗传病,患者主要表现为神经系统变性和结缔组织异常。*ATP7A* 基因位于 Xq13.3,包含 23 个外显子,编码 1500 个氨基酸的蛋白产物 ATP7A。Kaler 等^[15]报道了 1 例 Menkes 综合征患者携带有 c.746C>T (p.Arg201Ter)无义变异,该变异在 *ATP7A* 基因的第 3 外显子产生一个 PTC。患者 cDNA 的 Sanger 测序在相应位置可见明显 C>T 的碱基替换峰,提示携带 PTC 的 mRNA 转录本未发生显著的降解;应用 Western blot 和免疫组化分析患儿细胞,均可检测到少量全长 ATP7A 蛋白。以上的检测结果符合由于通读机制导致的 NMD 逃逸特点。因此,作者推断携带 c.746C>T (p.Arg201Ter)无义变异的转录本发生了通读导致的 NMD 逃逸,为了进一步明确该通读是否源于 tRNA 错配,作者试图检测氨基酸序列,遗憾的是此例患者 NMD 抑制效率不是很高,未能足量分离和纯化通读产物。但是,酵母互补实验揭示该突变体表达的蛋白仍保留有部分铜转运功能,提示 PTC 的通读产物保留了部分功能。加之该患者在出生后不久即被诊断并进行铜注射治疗,因此治疗效果显著,无明显的神经系统症状出现^[15]。

1.2 翻译的重新启动

蛋白质翻译终止后,留下一个由 mRNA、位于 P 位的去酰化-tRNA 和核糖体组成的翻译终止后核糖体复合物。随后,在 ATP 酶 ABCE1、起始因子 eIF3、eIF1、eIF1A 以及 eIF3j 的协同作用下,翻译终止后核糖体复合物解体为 mRNA、去酰化-tRNA 和核糖体单体或其亚基^[3]。解体后的核糖体进入新一轮的蛋白质合成。

翻译的重新启动是指在 PTC 的下游存在着

AUG,即潜在的翻译起始点。由于 Met 的三联密码同为 AUG 与起始密码子相同,因此可作为 PTC 下游翻译重新启动的潜在起始点。翻译终止后,核糖体复合物并未完全解离进入再循环,而是沿着 mRNA 继续滑动,当它遇到潜在的翻译起始点时,蛋白质的翻译重新开始^[16]。

已有报道邻近翻译起始密码子的 PTC,由于在其下游重新启动了有效的翻译导致携带该 PTC 的 mRNA 转录本发生了 NMD 逃逸,包括神经鞘瘤相关基因 *SMARCB1*^[17]、乳腺癌相关基因 *BRCA1*、*LQT2* 基因^[18]、 α 和 β 珠蛋白基因^[10]等,提示有效的翻译重新启动可能存在着边界效应,位于边界内的 PTC 可通过翻译重新启动而逃离 NMD,而边界外的 PTC 则不能;此外,不同基因转录本的重新启动,其边界也有所不同,即便是密切相关的 α 和 β 珠蛋白基因也是如此。

Jagannathan 等^[7]利用生物信息学方法分析了人群中单核苷酸变异下游 50 个密码子的序列,研究发现与同义变异相比,Met 在无义变异下游的 50 个密码子内存在显著的富集:57%的罕见和 85%的常见无义变异在其下游 50 个密码子内存在 Met,即潜在的翻译起始点;而只有 52%的同义变异存在该现象,且这一富集现象仅在编码序列的前 10%中成立。以上研究提示,有效的翻译重新启动与正常的起始密码子、PTC 和潜在起始密码子三者之间的距离有关。首先,翻译终止后的核糖体与正常的起始密码子足够接近,也就是 PTC 需要靠近正常的翻译起始密码子;其次 PTC 距离下游的潜在起始点也较近,使得核糖体可以相对较快的遇到起始位点重启翻译。

尽管翻译的重新启动一直被认为是 NMD 逃逸的重要原因,但其发生的具体机制尚不十分清楚。具有短 uORF 转录本的翻译后重新启动是机体应对环境变化调节基因表达的途径之一。研究发现这类转录本在翻译终止后,只有核糖体的大亚基和去酰化 tRNA 被循环再利用,小亚基仍保留在 mRNA 上,进入下游从而发生翻译的重新启动。进一步研究显示真核生物起始因子 eIF3,在翻译的延伸和终止过程中可与核糖体发生短暂结合^[19,20],eIF3 可特异性稳定小亚基,使其不被循环,保留 eIF3 的核糖体能够继续向下游移动,识别 PTC 下游的潜在起始密码子重新启动翻译(图 2)。综上所述,因翻译的重新启

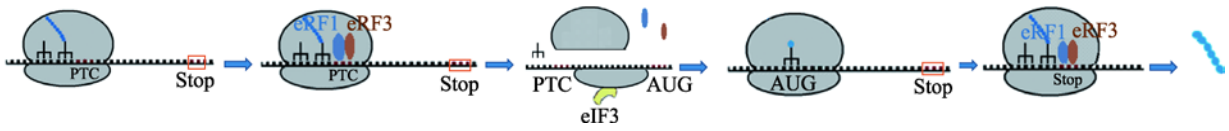


图 2 翻译的重新启动机制

Fig. 2 The reinitiation mechanism

PTC: 提前终止密码子; Stop: 终止密码子; eRF1: 翻译释放因子 1; eRF3: 翻译释放因子 3; AUG: 起始密码子; eIF3: 真核起始因子 3。

动引发的 NMD 逃逸, 同样由于未触发 NMD 途径, 携带 PTC 转录本的转录水平也与野生型相当; 其次, 翻译重新启动发生于 PTC 下游的潜在起始点, 因而可产生 N 端截短蛋白。

BRCA1 基因与乳腺癌的发生高度相关, 该基因发生突变使女性容易罹患乳腺癌和卵巢癌。该基因定位于 17q21, 含有 23 个外显子, 在 DNA 修复、细胞周期调控、蛋白质泛素化和染色质重塑中发挥重要作用^[21]。Buisson 等^[22]研究发现 *BRCA1* 基因的移码变异 185delAG (c.68_69delAG) 和 188del11 (c.71_81del), 分别位于第 36 位(Ter36)和 39(Ter39)位氨基酸位置产生 PTC, 且均位于第 3 外显子理论上应该触发 NMD, 但是 Northern blot 检测显示携带突变的转录本与野生型表达量相当; Western blot 检测发现 Ter36 与 Ter39 突变质粒可以产生 N 端截短蛋白。以上检测结果符合由翻译的重新启动所致的 NMD 逃逸。进一步分析 *BRCA1* 基因序列显示在 PTC 下游 22(Met48)和 262(Met128)核苷酸的位置分别存在有 Met, 即潜在的翻译起始位点。为了明确翻译重新启动的具体位置, 研究者利用定点诱变技术分别将 Ter36 与 Ter39 突变体的 Met48 和 Met128 突变为缬氨酸转染细胞, Western blot 发现当 Met48 突变为缬氨酸时, Ter36+Met48Val 与 Ter39+Met48Val 突变体产生的蛋白条带均与 Met48 突变之前一致; 而当 Met128 突变为缬氨酸时, Ter36+Met128Val 与 Ter39+Met128Val 突变体则不产生 N 端截短蛋白。由此推测 185delAG(c.68_69delAG) 和 188del11 (c.71_81del) 变异发生 NMD 逃逸是原于在 PTC 下游的 Met128 位置发生了翻译的重新启动。

1.3 其他影响 NMD 逃逸的因素

除 PTC 通读和翻译的重新启动外, 还存在其他一些因素可能导致 PTC 的 NMD 逃逸^[23,24], 如 mRNA 的剪接。当 mRNA 的选择性剪接将包含 PTC 的外显

子从转录本中去除, 则不再发生 NMD。同样, 如果 PTC 下游的某个单一内含子拼接效率低下, PTC 下游没有 EJC 来发出 NMD 信号, 从而无法触发 NMD。其他影响 NMD 效率的因素还有 3'非翻译区(UTR)的序列和结构。一些含有长 3' UTR 的 mRNA 中存在着抑制 NMD 的顺式作用元件。研究发现位于 *TRAM1* 基因 mRNA 的 3'UTR 前 200 个核苷酸的位置存在一个顺式作用元件, 当其位于终止密码子下游附近时可以抑制 NMD 的发生^[25]。此外, 由于 NMD 是一个翻译依赖的过程, 影响翻译的顺式作用元件和反式作用因子均可以影响 NMD 的结局。

2 NMD 逃逸在疾病治疗方面的进展

随着对 NMD 及其逃逸的研究深入, 近几年提出来许多针对 PTC 相关疾病的治疗策略, 研究主要集中在对 PTC 通读机制的应用, 即通过使用药物使致病的 PTC 发生通读, 上调有功能的蛋白表达, 从而抑制病理性 NMD 的有害作用。通读治疗已经被证明是治疗无义变异相关疾病的较成功方案, 已在囊性纤维化、杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)、血友病、代谢紊乱、眼遗传性疾病和癌症等疾病中取得良好的疗效。

PTC 通读的治疗首个突破发生在 20 世纪晚期, 研究者发现一些化合物能够在序列中引入一种天然氨基酸取代 PTC, 从而发生通读产生完整的多肽链, 避免因触发 NMD 导致的 mRNA 降解^[26]。随着研究的深入, 越来越多的药物被确定使用(表 1)。目前比较成功的治疗方法主要有两类, 即药物和分子生物学干预, 用于治疗 PTC 引起的疾病。

2.1 氨基糖苷类

氨基糖苷类是应用较广的一类抗生素, 可通过干扰核糖体校正作用减少核糖体翻译过程的提前终

表 1 基于促通读机制的药物研究应用现况

Table 1 Current research status of drugs

通读药物	实验模型	临床试验	相关疾病	特点与问题
氨基糖苷类				
庆大霉素 ^[27]	动物和患者	有	囊性纤维化(CF)、杜氏肌营养不良(DMD)、瑞特综合征(RTT)、共济失调性毛细血管扩张症(AT)、法布里病(Fabry)、尼曼匹克症 A/B 型(NPA/NPB)、全身性神经节苷脂贮积(Gangliosidosis I)、粘多糖累积症 II 型(MPS II)、MPS I-H、MPS IIIB、MPS VI、血友病 A 和 B(HA 和 HB)、无脉络膜症(Choroideremia)、先天性黑朦(LCA type 2)、眼缺损(Ocular coloboma)和 Usher 综合征 I 型(USH1)	副作用如耳毒性、肾毒性和视网膜毒性
阿米卡星 ^[28]	动物和细胞	无	囊性纤维化(CF)、瑞特综合征(RTT)、粘多糖累积症 I-H(MPS I-H)和脊髓型肌萎缩症 I 型(SMA I)	
妥布霉素 ^[29]	动物	无	囊性纤维化和脊髓型肌萎缩症 I 型(SMA I)	
巴龙霉素 ^[30]	细胞	无	囊性纤维化(CF)、杜氏肌营养不良(DMD)、瑞特综合征(RTT)、无脉络膜症(Choroideremia)、粘多糖累积症 I-H(MPS I-H)、眼缺损(Ocular coloboma)和 Usher 综合征 I 型(USH1)	
G418 ^[28]	动物和细胞	无	囊性纤维化(CF)、瑞特综合征(RTT)、共济失调性毛细血管扩张症(AT)、粘多糖累积症 I-H(MPS I-H)、脊髓型肌萎缩症 I 型(SMA I)、先天性黑朦(LCA type 2)、色素性视网膜炎(RP)和 Usher 综合征 I 型(USH1)	
氨基糖苷类衍生物				
新霉素衍生物 (TC003 和 TC007) ^[29]	动物和细胞	无	脊髓型肌萎缩症 I 型(SMA I)	生物相容性更好
卡那霉素衍生物 (JL023) ^[29]			脊髓型肌萎缩症 I 型(SMA I)	无明显副作用
巴龙霉素衍生物 (NB30、NB54、NB84 和 NB124) ^[31]	动物和细胞	无	囊性纤维化(CF)、瑞特综合征(RTT) Usher 综合征 I 型(USH1)和粘多糖累积症 I-H(MPS I-H)	较高的生物相容性、剂量依赖性, 可通过血脑屏障, 无明显副作用
非氨基糖苷类 ^[32]				
PTC124	动物和患者	有	囊性纤维化(CF)、杜氏肌营养不良(DMD)、粘多糖累积症 VI 型(MPS VI)、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCLs)、贝敦氏病(Batten disease)、色素性视网膜炎(RP)、Usher 综合征 I 型(USH1)和先天性无虹膜(Congenital aniridia)	耐受性良好, 无严重副作用
RTC13、RTC14 和 RTC229	细胞	无	杜氏肌营养不良(DMD)和共济失调性毛细血管扩张症(AT)	对 3 种提前终止密码子均有效

止。氨基糖苷类药物选择性地与核糖体的解码中心结合, 导致氨基酸的随机引入, 从而克服肽链中的 PTC, 发生通读^[33]。例如, 庆大霉素是一种常见的氨基糖苷类抗生素, 通过与真核核糖体结合发挥无义抑制活性^[34], 选择性地在 PTC 中引入氨基酸, 但

不影响正常终止密码子。在作用过程中, 庆大霉素通过促进近同工 tRNA 与核糖体 A 位点的结合而抑制校对过程, 使翻译的保真度降低, 从而导致误读和/或 PTC 抑制^[35]。

Hurler 综合征被认为是最严重的遗传性溶酶体

贮积病, 为常染色体隐性遗传病。由于 *IDUA* 基因变异导致所编码的 α -L-艾杜糖醛酸苷酶缺乏, 溶酶体内的粘多糖(GAG)不能正常降解, 引发粘多糖贮积病。*IDUA* 基因位于 1 号染色体, p.Gln70Ter 和 p.Trp402Ter 是欧洲裔 Hurler 综合征患者中较常见的两种无义变异^[36]。2001 年, Keeling 等^[37]使用 Hurler 综合征成纤维细胞系研究了庆大霉素对 *IDUA* 基因 p.Gln70Ter 和 p.Trp402Ter 变异的抑制活性, 发现经庆大霉素处理后可以显著提升 α -L-艾杜糖醛酸苷酶的活性。但是由于长期应用庆大霉素产生副作用, 研究者也尝试设计更为有效且毒性更小的氨基糖苷类药物, 其中一种氨基糖苷类衍生物-NB84, 在疗效上可恢复 α -L-艾杜糖醛酸苷酶活性, 且几乎没有毒性^[31]。

2.2 Ataluren

Ataluren (原称 PTC124)是一种非氨基糖苷类的小分子化合物, 能够在 mRNA 转录本的 PTC 位置随机插入氨基酸, 诱导 PTC 通读, 而不影响正常的终止密码子^[38]。DMD 由编码抗肌萎缩蛋白的基因突变引起, 患者主要表现为进行性近端肌肉无力, 导致行走困难、依赖轮椅以及最终的呼吸和心脏衰竭恶化。由无义变异产生 PTC 导致截短蛋白或蛋白质功能丧失约占 DMD 病例的 13%。Ataluren 是通过药物的高通量筛选和化学优化而被发现的, 它可以诱导核糖体读取 PTC, 而不是正常的终止密码子。当在无义突变的 DMD 小鼠模型中测试时, Ataluren 可产生全长的功能性抗肌萎缩蛋白。在随后的人 DMD 实验也成功诱导出了全长功能性抗肌萎缩蛋白^[39]。基于 PTC124 药物的有效性, 2017 年 PTC124 通过了欧盟的年度审核。目前, PTC 公司正在进行一个随机双盲、安慰剂对照、国际多中心的 III 期临床试验, 以进一步证实 PTC124 长期治疗无义变异的 DMD 患者的效果和安全性。该临床试验总目标入组人数 250 人, 中国入组人数 50 人, 预期 2021 年将公布结果(<https://clinicaltrials.gov>; <http://www.china-drugtrials.org.cn>)。

2.3 抑制子 tRNA

无义抑制子是一种 tRNA 的衍生物, 其反密码子能够识别 PTC, 继而在 PTC 处掺入氨基酸, 产生

全长功能蛋白, 防止翻译发生终止。抑制子介导的密码子-反密码子的相互作用, 可以避免由于核糖体校正而发生的氨酰-tRNA 排斥, 因此可以有效抑制 PTC。研究表明, 抑制子 tRNA 可用于人体由无义变异引起的疾病的体细胞基因治疗。遗传性弥漫性胃癌(HDGC)是一种侵袭性、无法治愈的胃癌, 主要由 *CDH1* 基因的无义变异引起, 导致截短的 E-钙粘蛋白产生^[40]。最近一项关于 HDGC 的研究显示, 在给予抑制子 tRNA 诱导后, 108 个具有 HDGC 家族史的家庭中, 有 23 个家庭(21.3%)的癌症的发病显著延迟, 并使由携带 PTC 的 *CDH1* 基因可以编码产生大约 30% 功能性 E-钙粘蛋白^[41]。

3 结语与展望

近年来, 关于 NMD 逃逸的研究成果很多, 但机制仍未得到完全阐明。随着研究的深入, PTC 相关疾病的致病机制和药物治疗越来越成为研究的热点, 目前研究成果主要集中在促通读药物的研发, 这些药物为遗传病的治疗带来了新希望。然而, 促通读药物的临床应用仍存在很多亟待解决的问题, 如庆大霉素等氨基糖苷类药物的长期应用有耳毒性、肾毒性等副作用, 静脉注射仍是许多氨基糖苷类药物的用药途径, 不适于患者长期应用。此外, 由于 NMD 逃逸和新型药物的作用机制尚未完全阐明, 使得药物在临床试验中疗效不稳定。针对这些问题, 尚需开展更多 NMD 逃逸机制以及药物作用机制的研究, 以提高药物疗效的特异性。

综上所述, NMD 逃逸使得携带 PTC 的转录本仍可编码具有部分功能的蛋白质, 缓解患者表型。最近, 马志鹏等^[42]通过引入 PTC 利用 NMD 途径构建敲除 *capn3a* 基因的斑马鱼突变体, 但是却发现该突变体发育正常并未出现预期的异常表型; 同时他们还发现该突变体中多个 *capn* 家族基因上调弥补 *capn3a* 基因的功能, 推测发生这种现象是由于遗传补偿效应, 并提出假设: 无义突变 mRNA 通过提高同源基因的表达来实现补偿效应。经实验证实无义突变与核酸序列同源性是激活遗传补偿效应的两个必要条件。该研究阐释了 PTC 不导致表型的另一重要机制, 也为 PTC 相关疾病的致病机制和药物治疗研究提供了新方向。

参考文献(References):

- [1] Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Mühlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(5): 677–700. [DOI]
- [2] Schoenberg DR, Maquat LE. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 246–259. [DOI]
- [3] Celik A, Kervestin S, Jacobson A. NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie*, 2015, 114: 2–9. [DOI]
- [4] Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik AE. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J*, 2010, 430(3): 365–377. [DOI]
- [5] GUO WT, XU WY, GU MM. Nonsense-mediated mRNA decay and human monogenic disease. *Hereditas(Beijing)*, 2012, 34(8): 935–942.
郭文婷, 徐汪洋, 顾鸣敏. 无义介导的 mRNA 降解机制及其在单基因遗传病中的作用. *遗传*, 2012, 34(8): 935–942. [DOI]
- [6] Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(6): 198–199. [DOI]
- [7] Jagannathan S, Bradley RK. Translational plasticity facilitates the accumulation of nonsense genetic variants in the human population. *Genome Res*, 2016, 26(12): 1639–1650. [DOI]
- [8] Neu-Yilik G, Amthor B, Gehring NH, Bahri S, Paidassi H, Hentze MW, Kulozik AE. Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human β -globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA*, 2011, 17(5): 843–854. [DOI]
- [9] Peixeiro I, Inácio Â, Barbosa C, Silva AL, Liebhaber SA, Romão L. Interaction of PABPC1 with the translation initiation complex is critical to the NMD resistance of AUG-proximal nonsense mutations. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(3): 1160–1173. [DOI]
- [10] Pereira FJ, Teixeira A, Kong J, Barbosa C, Silva AL, Marques-Ramos A, Liebhaber SA, Romão L. Resistance of mRNAs with AUG-proximal nonsense mutations to nonsense-mediated decay reflects variables of mRNA structure and translational activity. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(13): 6528–6544. [DOI]
- [11] Keeling KM, Bedwell DM. Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, 2(6): 837–852. [DOI]
- [12] Dunkle JA, Dunham CM. Mechanisms of mRNA frame maintenance and its subversion during translation of the genetic code. *Biochimie*, 2015, 114: 90–96. [DOI]
- [13] Bidou L, Allamand V, Rousset JP, Namy O. Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trend Mol Med*, 2012, 18(11): 679–688. [DOI]
- [14] Fu Y, Shu ZY, Gu MM. The functional mechanisms and clinical application of Read-through drugs. *Hereditas(Beijing)*, 2016, 38(7): 623–633.
付洋, 舒在悦, 顾鸣敏. 促通读药物的作用机制与临床应用. *遗传*, 2016, 38(7): 623–633. [DOI]
- [15] Kaler SG, Tang JR, Donsante A, Kaneski CR. Translational read-through of a nonsense mutation in ATP7A impacts treatment outcome in Menkes disease. *Ann Neurol*, 2009, 65(1): 108–113. [DOI]
- [16] Gunišová S, Hronová V, Mohammad MP, Hinnebusch AG, Valášek LS. Please do not recycle! Translation reinitiation in microbes and higher eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 2018, 42(2): 165–192. [DOI]
- [17] Hulsebos TJ, Kenter S, Verhagen WI, Baas F, Flucke U, Wesseling P. Premature termination of SMARCB1 translation may be followed by reinitiation in schwannomatosis-associated schwannomas, but results in absence of SMARCB1 expression in rhabdoid tumors. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(3): 439–448. [DOI]
- [18] Stump MR, Gong QM, Zhou ZF. LQT2 nonsense mutations generate trafficking defective NH2-terminally truncated channels by the reinitiation of translation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 305(9): H1397–H1404. [DOI]
- [19] Hronová V, Mohammad MP, Wagner S, Pánek J, Gunišová S, Zeman J, Poncová K, Valášek LS. Does eIF3 promote reinitiation after translation of short upstream ORFs also in mammalian cells? *RNA Biology*, 2017, 14(12): 1660–1667. [DOI]
- [20] Mohammad MP, Munzarová Pondělíčková V, Zeman J, Gunišová S, Valášek LS. In vivo evidence that eIF3 stays bound to ribosomes elongating and terminating on short upstream ORFs to promote reinitiation. *Nucl Ac Res*, 2017, 45(5): 2658–2674. [DOI]
- [21] Billack B, Monteiro AN. BRCA1 in breast and ovarian cancer predisposition. *Cancer Lett*, 2005, 227(1): 1–7. [DOI]
- [22] Buisson M, Anczuków O, Zetoune AB, Ware MD, Mazoyer S. The 185delAG mutation (c.68_69delAG) in the BRCA1 gene triggers translation reinitiation at a downstream AUG codon. *Human Mutation*, 2006, 27(10): 1024–1029. [DOI]
- [23] Krempely K, Karam R. A novel de novo CDH1 germline variant aids in the classification of carboxy-terminal E-cadherin alterations predicted to escape nonsense-mediated mRNA decay. *Cold Spring Harb Mol Case Stu*, 2018, 4(4): a003012. [DOI]

- [24] Loughran G, Jungreis I, Tzani I, Power M, Dmitriev RI, Ivanov IP, Kellis M, Atkins JF. Stop codon readthrough generates a C-terminally extended variant of the human vitamin D receptor with reduced calcitriol response. *J Biol Chem*, 2018, 293(12): 4434–4444. [DOI]
- [25] Toma KG, Rebbapragada I, Durand S, Lykke-Andersen J. Identification of elements in human long 3' UTRs that inhibit nonsense-mediated decay. *RNA*, 2015, 21(5): 887–897. [DOI]
- [26] Keeling KM, Wang D, Conard SE, Bedwell DM. Suppression of ^{UAG} premature termination codons as a therapeutic approach. *Critic Rev Biochem Mol Biol*, 2012, 47(5): 444–463. [DOI]
- [27] Matalonga L, Arias Á, Tort F, Ferrer-Cortés X, Garcia-Villoria J, Coll MJ, Gort L, Ribes A. Effect of readthrough treatment in fibroblasts of patients affected by lysosomal diseases caused by premature termination codons. *Neurotherapeutics*, 2015, 12(4): 874–886. [DOI]
- [28] Heier CR, DiDonato CJ. Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(7): 1310–1322. [DOI]
- [29] Mattis VB, Rai R, Wang J, Chang CW, Coady T, Lorson CL. Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum Genet*, 2006, 120(4): 589–601. [DOI]
- [30] Moosajee M, Gregory-Evans K, Ellis CD, Seabra MC, Gregory-Evans CY. Translational bypass of nonsense mutations in zebrafish *rep1*, *pax2.1* and *lamb1* highlights a viable therapeutic option for untreatable genetic eye disease. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(24): 3987–4000. [DOI]
- [31] Wang D, Belakhov V, Kandasamy J, Baasov T, Li SC, Li YT, Bedwell DM, Keeling KM. The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. *Mol Genet Metab*, 2012, 105(1): 116–125. [DOI]
- [32] Nagel-Wolfrum K, Moller F, Penner I, Wolfrum U. Translational read-through as an alternative approach for ocular gene therapy of retinal dystrophies caused by in-frame nonsense mutations. *Vis Neurosci*, 2014, 31(4–5): 309–316. [DOI]
- [33] Scheunemann AE, Graham WD, Vendeix FA, Agris PF. Binding of aminoglycoside antibiotics to helix 69 of 23S rRNA. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(9): 3094–3105. [DOI]
- [34] Eustice DC, Wilhelm JM. Fidelity of the eukaryotic codon-anticodon interaction: interference by aminoglycoside antibiotics. *Biochemistry*, 1984, 23(7): 1462–1467. [DOI]
- [35] Lee HL, Dougherty JP. Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. *Pharmacol Ther*, 2012, 136(2): 227–266. [DOI]
- [36] Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Zuther C, Morris CP, Schwinger E, Hopwood JJ, Scott HS, Gal A. Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common α -L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients. *Hum Mol Gen*, 1994, 3(6): 861–866. [DOI]
- [37] Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li PN, Thompson JN, Bedwell DM. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of α -L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Gen*, 2001, 10(3): 291–299. [DOI]
- [38] Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen GM, Jones S, Ren HY, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng HS, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 2007, 447: 87–91. [DOI]
- [39] Finkel RS. Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J Child Neurol*, 2010, 25(9): 1158–1164. [DOI]
- [40] Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YS, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, MacGillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australia K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet*, 2004, 41(7): 508–517. [DOI]
- [41] Bordeira-Carriço R, Ferreira D, Mateus DD, Pinheiro H, Pêgo AP, Santos MA, Oliveira C. Rescue of wild-type E-cadherin expression from nonsense-mutated cancer cells by a suppressor-tRNA. *Eur J Hum Genet*, 2014, 22(9): 1085–1092. [DOI]
- [42] Ma ZP, Chen J. Nonsense mutations and genetic compensation response. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(5): 359–364. 马志鹏, 陈军. 无义突变与“遗传补偿效应”. *遗传*, 2019, 41(5): 359–364. [DOI]