

# 蛋白磷酸酶 1 对 HIV-1 转录的调节作用及其抑制剂研究

王 珺, 刘新泳\*

(山东大学药学院药物化学研究所, 山东 济南 250012)

**摘要:** 宿主细胞蛋白-蛋白磷酸酶 1 (PP1) 是人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 转录的调节因子之一, 参与 HIV-1 转录。脱磷酸化 cyclin T1 依赖性激酶 9 (CycT1-dependent kinase 9, CDK9) 或 RNA 聚合酶 II C 末端区 (RNAPII CTD) 以增强 Tat 诱导的转录。本文综述了 PP1 在 HIV-1 转录过程的作用及其抑制剂研究进展。

**关键词:** HIV-1; 转录; 蛋白磷酸酶 1; 磷酸化; 抑制剂

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1343-05

## Action of protein phosphatase-1 on Tat-dependent HIV-1 transcription and its related inhibitors

WANG Jun, LIU Xin-yong\*

(Institute of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** Host cell protein phosphatase-1 (PP1) is an important regulator of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) transcription. PP1 is involved in the regulation of HIV-1 transcription, and dephosphorylates RNA polymerase II C-terminal domain (RNAPII CTD) or CycT1-dependent kinase 9 (CDK9) to increase Tat-dependent HIV-1 transcription. In this review, we discuss the action of PP1 in Tat-induced HIV-1 transcription and related to PP1 inhibitors.

**Key words:** HIV-1; transcription; protein phosphatase-1; phosphorylation; inhibitor

自美国 1981 年诊断出首例艾滋病患者以来, 艾滋病病毒在全球范围内以惊人的速度传播。2007 年全球感染艾滋病病毒者达到 3 300 万, 新增艾滋病病毒感染者 270 万, 艾滋病死亡的人数为 200 万。我国的感染人数从 2001 年约 45 万上升到 2007 年约 70 万<sup>[1]</sup>。目前随着高效抗逆转录病毒治疗 (HAART) 的普遍实施, 艾滋病发病率和死亡率降低, 患者的生存时间和生活质量已有所改观。然而由于病毒基因组容易发生变异, 导致对药物产生耐药性, 使得药物对病毒作用降低或失效。因此迫切需要研制新型的, 尤其是与现有药物作用机制不同的抗艾滋病药物。

HIV 属于 RNA 逆转录病毒, 分 HIV-1 和 HIV-2

两种类型, 世界上大部分地区的艾滋病患者是由病毒 HIV-1 所感染。HIV-1 对细胞的感染过程包括吸附、融合、HIV-RNA 逆转录、HIV-DNA 复制和与宿主细胞 DNA 整合、HIV 转录和病毒蛋白的表达、HIV-1 装配和脱壳过程。转录是病毒的整个复制周期中关键的一步, 它决定了病毒粒子数量可以达到的程度<sup>[2]</sup>。转录过程被 HIV-1 反式激活因子 (trans-activator of transcription, Tat) 激活, Tat 蛋白与细胞周期因子 T1 (cyclin T1) / cyclin T1 依赖性激酶 9 (CycT1-dependent kinase 9, CDK9) 结合, 磷酸化 RNA 聚合酶 II (RNAPII) 和活化 HIV-1 病毒基因的转录。在这个反式激活的过程中, 有两步关键的磷酸化作用: 一是 CDK9 自身磷酸化; 二是 CDK9 磷酸化 RNAPII CTD。磷酸化作用同时受控于蛋白激酶和蛋白磷酸酶 (protein phosphatase, PP)。目前对于蛋白激酶已有了

收稿日期: 2009-05-18.

\*通讯作者 Tel: 86-531-88380270, Fax: 86-531-88382264,

E-mail: xinyongl@sdu.edu.cn

深入的研究,但对于 PP 的了解却尚浅。起初 PP 被认为是一小类非专一性的“管家”酶,随机地逆转蛋白激酶的磷酸化效应,这种看法很快被证明过于简单化。事实上,PP 组成了一个与蛋白激酶相平行的结构复杂多样的酶家族<sup>[3]</sup>。分子生物学研究表明,PP 可对信号转导途径起正向或负向调节作用,并在一系列哺乳动物组织和细胞中发挥重要的生理作用<sup>[4]</sup>。最近研究显示,宿主细胞蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 参与 HIV-1 转录,脱磷酸化 CDK9 或 RNAPII CTD 以增强 Tat 诱导的转录。本文就 PP1 在 HIV-1 转录过程的作用及其抑制剂研究进展作简要综述。

## 1 PP1 的结构

PP1 是一种多功能丝氨酸苏氨酸磷酸酶,属于一类不依赖于  $Mg^{2+}$  的蛋白丝氨酸-苏氨酸磷酸酶 PPP 家族。这一类磷酸酶还包括 PP2A、PP4、PP5、PP6、PP2B<sup>[5]</sup>。在人体中,PP1 由 3 种相关基因编码—PP1 $\alpha$ 、PP1 $\beta/\delta$  和 PP1 $\gamma$ ,且选择性的剪接可以产生  $\gamma 1$  和  $\gamma 2$  两个亚型。通常 PP1 由一个固定不变的催化亚基和几十种不同的调节亚基或靶向亚单位之一组成,分子量约为 37 kDa,其表面具有 3 个凹槽:酸性凹槽 (acidic groove)、疏水凹槽 (hydrophobic groove) 和 C 末端凹槽 (C-terminal groove),PP1 结构示意图见图 1。体内数据显示不同的 PP1 亚型具有不同的分布<sup>[6]</sup>。PP1 $\alpha$  在细胞质和细胞核中积累,而 PP1 $\gamma$  则主要在细胞核内积累<sup>[7]</sup>。PP1 亚型不同的分布意味着在与特殊的靶向亚单位相互作用时具有特异性,因而选择性地与不同的信号复合物结合<sup>[8]</sup>。

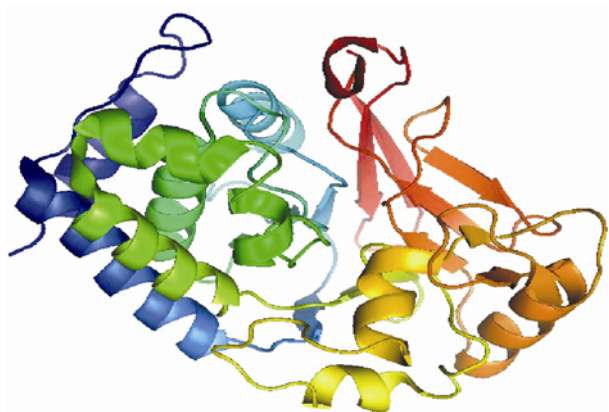


Figure 1 The structure of PP1

大多数与 PP1 相互作用的因子均含有一个被称为“RVXF”的序列,该序列可以与 PP1 的疏水凹槽结合。目前已有超过 90 个证据证明 PP1 与靶向亚单

位通过 RVXF 序列相结合<sup>[9]</sup>。通过对特征性 PP1 相互作用蛋白进行研究,定向地提取这一序列,最终确定该序列为 R/K<sub>1-2</sub>V/I[P]F/W,发现其中的[P]位置可以是除了脯氨酸以外的任何氨基酸<sup>[9]</sup>。

## 2 PP1 在 HIV-1 转录过程中的作用

最近多项研究表明蛋白磷酸酶在许多细胞进程包括 HIV-1 转录过程中有重要作用。当蛋白磷酸酶抑制剂 NIPP1 (nuclear inhibitor of proteinphosphatase-1, NIPP1) 存在时, Tat 介导的转录被阻断,显示细胞核 PP1 是 HIV-1 转录的正调节因子之一<sup>[10, 11]</sup>。图 2 是 PP1 在 HIV-1 转录过程中的作用模型<sup>[12]</sup>。由于作用场所的不同可以分为两部分:① 在细胞质中与 Tat 的相互作用;② 细胞核内与 RNA 聚合酶 II 及 CDK9 的相互作用。

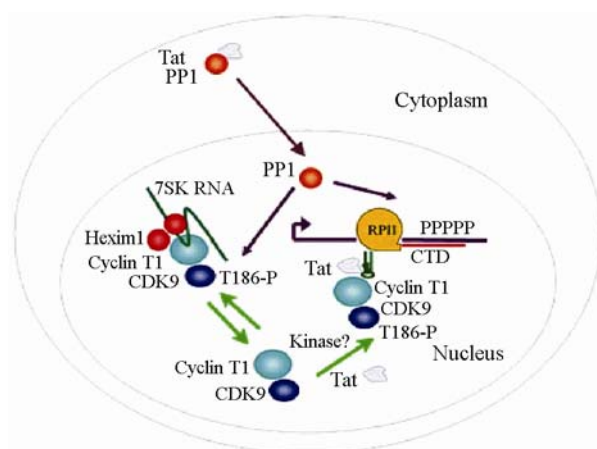


Figure 2 The working model of the PP1 role in HIV-1 transcription<sup>[12]</sup>

**2.1 PP1 与 Tat 的相互作用** Tat 与 PP1 的相互作用帮助 PP1 进入细胞核。竞争分析法显示 Tat<sup>35</sup>QACF<sup>38</sup> 序列可以直接与 PP1 的“RVXF 结合口袋”结合。Tat<sup>35</sup>QACF<sup>38</sup> 突变体与 PP1 较强或较弱的结合都会阻断 Tat 诱导的 HIV-1 转录。如 36VA/F38A 突变的 Tat 与 PP1 的结合能力减小,即使它可以与 CDK9/cyclin T1 及 RNA 的反式激活应答区 (trans-activator response region of transcription, TAR) 有效地结合,也不能诱导 HIV-1 转录的激活<sup>[10]</sup>。另一种突变体 Tat<sup>35</sup>RVCF<sup>38</sup> 突变体虽然拥有一个较好的“RVxXF”结合序列,可以有效地与 PP1 结合,但在 Tat 介导的 HIV-1 转录中,这种突变体在功能上存在缺陷。因为在体外当有 PP1 存在时, Tat<sup>35</sup>RVCF<sup>38</sup> 突变体无法有效地与 CDK9/cyclin T1 结合。这表明 Tat 与 PP1 相对较强的结合可以阻止 Tat 与 CDK9/cyclin T1 的相互作用及阻断 Tat 诱导的转录。此外在体内对 Tat 与 PP1 相互作用的分

析显示, 是 WT Tat 而不是 Tat<sup>35</sup>QACA<sup>38</sup> 突变体重新分布 PP1 $\alpha$  在细胞核中的位置<sup>[10]</sup>。这些结果表明, Tat 与 PP1 相互作用, 而且这种作用对 HIV-1 转录十分重要。为了进一步探索 Tat<sup>35</sup>QACA<sup>38</sup> 与 PP1 的相互作用, Nakhai 等<sup>[12]</sup>构建了 Tat 与 PP1 相互结合的计算机模型 (图 3)。

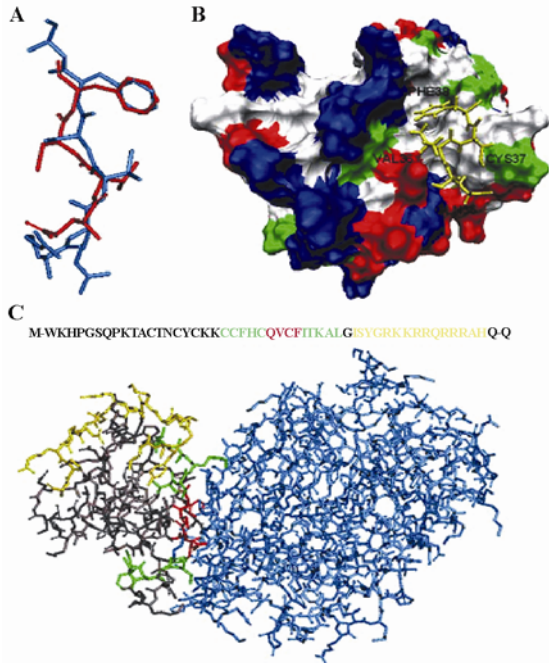


Figure 3 Molecular model of the Tat-PP1 complex<sup>[12]</sup>

QVCF 序列的 NMR 配合物与 RVSF 肽叠合 (图 3A) 显示 Tat<sup>35</sup>QVCF<sup>38</sup> 序列 (红色) 采取 S 构型, 与 PP1: RVSF X 射线衍射结构中 RVSF 肽 (蓝色) 相似。QVCF 肽残基与 PP1 表面的一个疏水沟槽结合 (图 3B)。QVCF 肽 (黄色) 的 Q35、V36 和 F38 与 PP1 疏水沟中不变且高度保守的残基接触, 其中 F38 的芳环与 GM 肽中的 Phe 残基相似。图 3C 为 Tat 与 PP1 复合物, 显示了 Tat 与 PP1 的 F257、C291 和 F293 残基的相互作用, 其中蓝色的为 PP1、Tat 的 QVCF 残基标记为红色, 绿色的是<sup>30</sup>CCFHCQVFITKAL<sup>43</sup>区域, 金色的是含有与 TAR RNA 结合区域的 45-49 残基, 其他残基为灰色。这个模型显示 PP1 疏水沟中一个潜在的靶向位点用于抑制 Tat-PP1 的相互作用而不需要抑制 PP1 的活性<sup>[12]</sup>。

**2.2 PP1 的作用靶点—RNA 聚合酶 II 和 CDK9** 在 Tat 的帮助下进入细胞核后, PP1 可能控制 RNAPII CTD 的磷酸化或者脱磷酸化 CDK9 Thr186。当位于 CDK9 的 T-loop 上 Thr 186 残基磷酸化时, CDK9/

cyclinT1 与 7SK RNA 及环六亚甲基二乙酰胺诱导蛋白 1 (hexamethylene bis-acetamide-inducible protein, HEXIM1) 结合而活性受到抑制<sup>[13, 14]</sup>。PP1 对 CDK9 Thr 186 脱磷酸化可以使 CDK9 与 7SK RNA 及 HEXIM1 分离而解除抑制<sup>[13]</sup>。随后 CDK9 Thr186 再次磷酸化, 增强 cyclin T1/CDK9 与 Tat 和 TAR RNA 的结合, 磷酸化 RNAPII CTD, 诱导 HIV-1 转录<sup>[15]</sup>。另外, PP1 也可能作用于 RNAPII CTD。在小鼠及人体中 CTD 是一个由 52 组重复的七肽组成, 只有低磷酸化的 CTD 才能与起始复合物结合, 在转录结束后 PP1 将高度磷酸化的 CTD 的 Ser2 和 Ser5 脱磷酸化, 使其可以与另一个起始复合物结合进行下一次转录<sup>[16]</sup>。

### 3 PP1 抑制剂的研究

目前有许多 PP1 抑制剂可以作为潜在的抗 HIV 药物的先导物, 主要有以下几类。

**3.1 冈田酸 (Okadaic acid, OA)** OA (图 4, 1) 是一种 C38 的长链脂肪酸的多醚衍生物, 属于聚醚类海洋毒素, 是从大田软海绵 (*Halichondria okadai*) 和隐瓜海绵 (*H. m. elanodoria*) 中分离得到, 抑制强度为 PP2A > PP1, 对 PP2A 敏感度高于 PP1 100 多倍 (其 IC<sub>50</sub> 分别为 1.2 和 315 nmol·L<sup>-1</sup>), 可逆地与 PP 活性中心结合, 可通透细胞<sup>[11]</sup>。

**3.2 Tautomycin** Tautomycin (2) 是 1987 年从链霉菌中分离得到的螺环抗生素, 是一种 PP1/PP2A 的强效抑制剂, 其结构式见图 4。构效研究发现, Tautomycin 酸酐片断无抑制 PP1 和 PP2A 活性的作用, 含 C<sub>22</sub>~C<sub>26</sub> 的部分有抑制作用, 说明 C<sub>22</sub>~C<sub>26</sub> 在抑制蛋白磷酸酶活性方面是必需的, 而酸酐部分可以加强其抑制作用<sup>[17]</sup>。Tautomycin 对 PP1 和 PP2A 的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.19 和 0.94 nmol·L<sup>-1</sup>, 对两种蛋白磷酸酶的选择性为 4.9 : 1<sup>[18]</sup>。

**3.3 蓝绿藻类** 蓝绿藻类包括微囊藻素、结瘤素和 mutoporin 等, 其化学结构为环肽。微囊藻素 (microcystin-XY, 3) 是一组由水体中的蓝绿藻如微囊藻、鱼腥藻、颤藻及其念珠菌产生的具有亲肝特性的环状七肽毒素, 其致毒机制是通过与蛋白磷酸酶中的丝/苏氨酸亚基结合, 抑制蛋白磷酸酶的活性, 对 PP1 及 PP2A 的选择性相同且都有较高的亲和力<sup>[19]</sup>; Mutoporin 也称 nodularin-V, 它是从巴布亚岛新几内亚海绵 (*Theonella swinhoei*) 中分离得到, 对 PP1 有很好的抑制活性, 其抑制浓度小于 1 nmol·L<sup>-1</sup>。

**3.4 花萼海绵诱癌素 A (calyculin A)** 花萼海绵诱癌素 A (图 4, 4) 是一种磷酸化的聚乙酰细胞毒素,

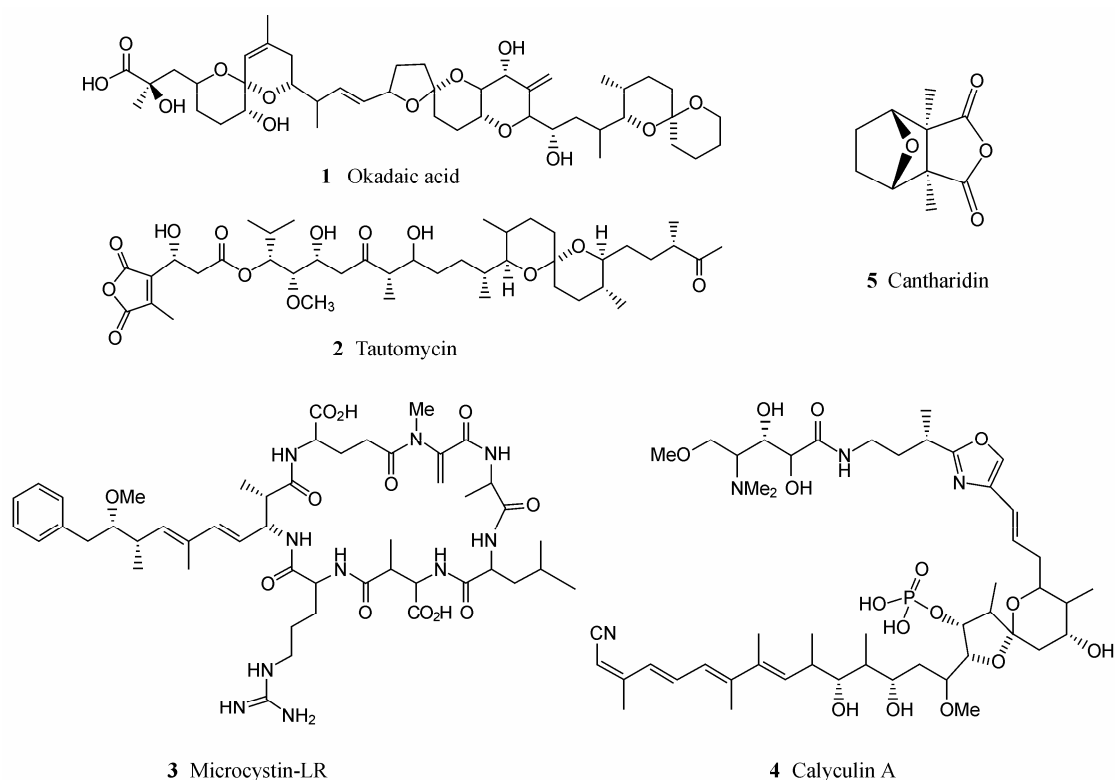


Figure 4 Structures of PP1 inhibitors

取自花萼盘皮海绵, 对 PP1 及 PP2A 选择性相同, 其  $IC_{50}$  分别为 1.4 和 2.6  $nmol \cdot L^{-1}$ 。构效关系研究发现 17-磷酸基、13-羟基及四烯部分是其抑制作用的关键<sup>[20]</sup>。

**3.5 斑蝥素 (cantharidin)** 斑蝥素 (图 4, 5) 是一类具有抗癌活性的萜类抑制剂。在这些抑制剂中, cantharidin 的结构比较简单, 具有很好的抗癌活性和促进白细胞生成的作用, 其抑制强度为 PP2A > PP1。此外改良的去甲斑蝥素 (norcantharidin) 类似物也可抑制 PP1 和 PP2A, 而且毒性比 cantharidin 低, 为药物研发提供了较好的先导化合物<sup>[12]</sup>。

**3.6 基于 PP1 结合肽抑制剂** 上述 5 类竞争性抑制剂由于大多存在对 PP1 的选择性低且毒性高等问题, 故被用于 HIV-1 治疗中的可能性减小。相反, 基于 PP1 结合肽的抑制剂, 因只作用于细胞质中一小部分的 PP1, 因此可能不会有较广泛的毒性, 为开发新的 HIV-1 抑制剂提供了新方向。

研究显示, 从 NIPP1 中得到的相关短肽 (NIPP1 143-224 氨基酸) 可以抑制 Tat 介导的 HIV-1 转录而无细胞毒性<sup>[21]</sup>。此外, 另一个与 NIPP1 中的 197-206 氨基酸类似物含有 RVTF 序列的短肽—KNSRVTFSED, 对于 PP1 的 RVxF 结合口袋具有很高的亲和力, 因而

竞争性的阻止 PP1 与 Tat 的结合抑制转录进行<sup>[9]</sup>。所以, 开发可以在 T 细胞中表达这些肽类似物的病毒载体或合成这些肽结构的化合物将会产生一些新的 HIV-1 抑制剂<sup>[12]</sup>, 是一类具有广阔研发前景的 PP1 抑制剂。

#### 4 小结

蛋白磷酸酶是一大类控制人体蛋白质去磷酸化的关键酶, 与蛋白激酶的磷酸化拮抗或协同, 这种协调作用决定着细胞内信号转导过程, 进而对细胞生长、分化、代谢、细胞周期以及基因转录等多方面进行调节, 近年来已成为研究热点。PP1 是 Tat 介导的 HIV-1 转录的正调节因子, 在 HIV-1 转录过程中与 Tat 相作用并脱磷酸化 RNA 聚合酶 II 或 CDK9, 靶向于 PP1 抑制 HIV-1 病毒转录过程成为抗 HIV-1 抑制剂研究的一个新方向。目前大多数使用的 PP1 抑制剂均存在选择性低和毒性较高的缺点, 而基于 PP1 结合肽的抑制剂则具有较好的开发前景。这类抑制剂对于 PP1 的选择性好且不具有较大的毒性。

目前对 Tat-PP1-CDK9 相互作用的认知仍不全面, 需要更多的实验来加深理解。而 Tat-PP1 相互作用的分子模型的建立将有助于针对 PP1 及其相关转录过程的抑制剂的合理药物设计, 为临床艾滋病的治疗

提供新的药物选择性。

## References

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr61/en/index.html>
- [2] Yu MY, Liu XY. Recent progress in the study of HIV-1 transcription factor NF- $\kappa$ B and its inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 1007–1012.
- [3] Li L, Dixon JE. Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases [J]. *Semin Immunol*, 2000, 12: 75–84.
- [4] Bannwarth S, Gatignol A. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host [J]. *Curr HIV Res*, 2005, 3: 61–71.
- [5] Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84: 1–39.
- [6] Andreassen PR, Lacroix FB, Villa-Moruzzi E, et al. Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 $\alpha$ ,  $\gamma$ 1, and  $\delta$  isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141: 1207–1215.
- [7] Trinkle-Mulcahy L, Sleeman JE, Lamond AI. Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114: 4219–4228.
- [8] Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemée A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 234–244.
- [9] Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, et al. Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 18817–18823.
- [10] Ammosova T, Jerebtsova M, Beullens M, et al. Nuclear protein phosphatase-1 regulates HIV-1 transcription [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 32189–32194.
- [11] Ammosova T, Washington K, Debebe Z, et al. Dephosphorylation of CDK9 by protein phosphatase 2A and protein phosphatase-1 in Tat-activated HIV-1 transcription [J]. *Retrovirology*, 2005, 2: 47.
- [12] Nekhai S, Jerebtsova M, Jackson A, et al. Regulation of HIV-1 transcription by protein phosphatase 1 [J]. *Curr HIV Res*, 2007, 5: 3–9.
- [13] Chen R, Yang Z, Zhou Q. Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 4153–4160.
- [14] Li Q, Price JP, Byers SA, et al. Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 28819–28826.
- [15] Garber ME, Mayall TP, Suess EM, et al. CDK9 autophosphorylation regulates high affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-PTEFb complex to TAR RNA [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 6958–6969.
- [16] Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, et al. A structural perspective of CTD function [J]. *Genes Dev*, 2005, 19: 1401–1415.
- [17] Ishii Y, Nagumo S, Arai T, et al. Synthesis study of tautomycin. Part 2: synthesis of ichihara's fragment based on regioselective enzymatic acetylation of complex molecule [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62: 7162–7251.
- [18] Liu W, Sheppeck JE, Colby DA, et al. The selection inhibition of phosphatases by natural toxins: the anhydride domain of tautomycin is not a primary factor in controlling PP1/PP2A selectivity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 1597–1600.
- [19] Colby DA, Chamberlin AR. Pharmacophore identification: the case of the ser/thr protein phosphatase inhibitors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6: 657–665.
- [20] Wakimoto T, Matsunaga S, Takai A, et al. Insight into binding of calyculin A to protein phosphatase 1: isolation of hemicalyculin A and chemical transformation of calyculin A [J]. *Chem Biol*, 2002, 9: 309–319.
- [21] Ammosova T, Jerebtsova M, Beullens M, et al. Nuclear targeting of protein phosphatase-1 by HIV-1 Tat protein [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 36364–36371.