

HIV-1 前体蛋白早成熟化激活剂筛选模型的建立及应用

张 全, 李晓宇, 刘振龙, 贾平平, 魏晓露, 赵立勋, 蒋建东, 岑 山*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所免疫生物学室, 北京 100050)

摘要: HIV-1 蛋白酶 (PR) 活性的严格调控对于病毒的生存至关重要。在病毒蛋白表达及病毒颗粒装配过程中, 处于病毒前体蛋白 Gag-Pol 中的蛋白酶必须以无活性状态存在, 避免前体蛋白 Gag-Pol 和 Gag 被提前酶切加工 (前体蛋白早成熟化)。干扰 HIV-1 蛋白酶活性的调控机制, 特异性的激活前体蛋白中的蛋白酶, 诱导前体蛋白早成熟化, 就可以直接抑制病毒的复制。根据这一设想, 运用生物发光共振能量转移技术, 建立细胞水平的 HIV-1 前体蛋白早成熟化激活剂筛选模型, 并通过 3 000 个化合物的试验性筛选对筛选模型进行评价。研究结果表明该筛选方法灵敏可靠, 特异性高, 重复性好 (Z' 因子为 0.905)。

关键词: 艾滋病; 抗 HIV-1 药物; 筛选模型; 蛋白酶; 前体蛋白; 早成熟化

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 02-0247-06

Establishment and application of a high-throughput screening assay for premature activation of HIV-1 precursors

ZHANG Quan, LI Xiao-yu, LIU Zhen-long, JIA Ping-ping, WEI Xiao-lu, ZHAO Li-xun, JIANG Jian-dong, CEN Shan*

(Department of Immunology, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Strict regulation of HIV-1 PR function is critical for efficient production of mature viral particles. During viral protein expression and viral assembly, HIV-1 PR located within Gag-Pol precursor must be inactive to prevent premature cytoplasmic processing of the viral Gag and Gag-Pol precursors. Premature activation of HIV-1 precursors leads to major defects in viral assembly and production of viral particles. A cell-level premature activation of HIV-1 precursors assay using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) was established. Three thousand compounds were screened to evaluate this assay. The results showed that the assay is sensitive, specific and stable (Z' factor is 0.905).

Key words: AIDS; anti-HIV-1 drug; screening assay; protease; precursor; premature

艾滋病防治工作目前主要依靠于抗 HIV-1 药物治疗, 但由于 HIV-1 高变异而导致的耐药性问题, 严重制约了传统抗 HIV-1 药物的应用^[1]。因此, 亟待发展针对新靶标, 具有新作用机制的抗 HIV-1 药物, 以解决目前 HIV-1 多重和交叉耐药的问题。

HIV-1 蛋白酶 (protease, PR) 是由 HIV-1 *pol* 基

因 5' 端所编码的。该酶含 99 个氨基酸, 属天冬氨酸蛋白酶。全酶为旋光对称的同源二聚体, 而两者界面形成酶活性中心^[2, 3]。HIV-1 蛋白酶作为前体蛋白 (precursor) Gag-Pol 的一部分被翻译出来, 前体蛋白形式的蛋白酶处于无活性状态。Gag-Pol 通过与 HIV-1 另一前体蛋白 Gag 相互结合, 形成未成熟的病毒颗粒。病毒颗粒装配完成后, 在病毒出芽或者出芽后的瞬间, Gag-Pol 中的蛋白酶被激活, 将 Gag-Pol 和 Gag 剪切成为较小的成熟结构蛋白和酶 (包括逆转录酶和整合酶), 这个过程被称为病毒的成熟化^[4, 5]。

收稿日期: 2009-11-03.

基金项目: 十一五“新药创制”科技重大专项基金 (2009ZX09303-005).

*通讯作者 Tel: 86-10-63037279, Fax: 86-10-63017302,

E-mail: shancen@hotmail.com

只有经过蛋白酶酶切加工形成的成熟病毒颗粒才具有感染性^[6]。

HIV-1 蛋白酶活性的严格调控对于病毒的生存至关重要^[7-9]。研究表明, 如果 Gag-Pol 中的蛋白酶在装配完成前被激活, 会导致前体蛋白 Gag-Pol 和 Gag 被提前酶切加工, 这一过程被统称为前体蛋白早成熟化 (premature)。一旦发生前体蛋白早成熟化, 病毒颗粒便无法装配, 因此病毒颗粒的产量将显著减少, 甚至无病毒颗粒产生^[8, 10]。目前, HIV-1 病毒装配完成前细胞内 Gag-Pol 中蛋白酶活性的抑制机制, 以及装配完成后蛋白酶被迅速激活的机制, 尚不清楚^[5, 6]。尽管如此, 如果能干扰 HIV-1 蛋白酶活性的调控机制, 特异性地激活前体蛋白中的蛋白酶, 诱导前体蛋白早成熟化, 就可以直接抑制病毒的复制。

根据这一设想, 作者运用生物发光共振能量转移 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET) 技术, 建立了细胞水平的 HIV-1 前体蛋白早成熟化激活剂筛选模型, 并通过 3 000 个化合物的试验性筛选对筛选模型进行了评价。

材料与方法

质粒构建 pRLuc-N2 质粒购自 PerkinElmer 公司; pEYFP-N1 购自 Clontech 公司; 以 pEYFP-N1 质粒为模板, PCR 扩增得到增强的黄色荧光蛋白 (enhanced yellow fluorescent protein, EYFP) 基因片段, HIV-1 蛋白酶识别序列 p2/p7 通过退火反应得到^[11], 将两片段插入 pRLuc-N2, 得到 pEYFP-p2/p7-Rluc 质粒。pEYFP-p2/p7-Rluc 质粒中的 p2/p7 序列按文献^[12]报道进行突变得到 pEYFP-p2/p7 (mut)-Rluc 质粒。phGagPol.PR-、phGag/GagPol 质粒中带有密码子优化的 HIV-1 的 Gag-Pol 编码序列^[11, 12], 而 phGagPol 质粒是在 phGag/GagPol 中的移码区引入 5T 的缺失突变而得到的。HIV-NL4-3 Luc 和 pHCMV-G (VSV-G env) 质粒见文献^[13]报道。

细胞培养及转染 293T 细胞 (本室保存) 培养于含 100 单位青霉素、链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。6 孔板每孔接种细胞 4×10^5 个, 培养 24 h 后转染, 转染试剂为 Lipofectamine 2000, 根据使用说明书进行转染。

生物发光共振能量转移比值 (BRET ratio) 测定 转染 40 h 后, 弃培养基, 6 孔板每孔加入冰上预冷的 PBS 1 mL 收取细胞, 调整细胞数为 1×10^6 /mL, 取 100 μ L 放入白色不透明、平底的 96 孔板中, 加入海肾荧光素酶 (Renilla luciferase, Rluc) 底物

Coelenterazine h (Promega 公司), 终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 测定 480 nm (± 10 nm) 和 535 nm (± 10 nm) 两处发射光强度。计算 BRET 比值^[14, 15]。

免疫印迹 (Western blotting) 检测 $2\ 000 \times g$ 离心 5 min 收集细胞, RIPA [$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4), $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, Roche 蛋白酶抑制剂混合物] 裂解, 提取细胞总蛋白。SDS-PAGE 分离蛋白样品。转膜后, 先后与一抗和二抗孵育, 然后 ECL 显色。所有抗体 [anti-GFP、anti- β -actin、羊抗鼠 (二抗)、驴抗兔 (二抗)] 均购自 Santa Cruz 公司。

高通量筛选流程及模型评价 10 cm 细胞培养皿接种 2.4×10^6 个细胞, 培养 24 h 后转染, 转染 12 h 后, 胰酶消化, 加入 DMEM 培养基 30 mL, 轻轻吹打, 使细胞分散为单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 150 μ L。培养 12 h 后, 加入待测药物。药物处理培养 16 h 后, 吸去培养基, 每孔加入含 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Coelenterazine h 的 PBS 100 μ L, 测定 BRET 比值。为评价此筛选模型的性质, 按 Zhang 等^[16]的方法计算 Z' 因子, 计算公式: $Z' \text{ 因子} = 1 - (3 \times \text{EFV 处理孔 BRET 比值的 SD} - 3 \times \text{空白对照孔 BRET 比值的 SD}) / (\text{EFV 处理孔 BRET 比值的平均值} - \text{空白对照孔 BRET 比值的平均值})$ 。对本所化合物库中的 3 000 个化合物进行了初步筛选, 如果样品孔 BRET 比值下降大于等于阳性对照孔, 则认为此样品为初筛阳性样品。

阳性化合物抗病毒活性测定 HIV-NL4-3 Luc 和 pHCMV-G 质粒共转染 293T 细胞, 转染 24 h 后, 加入药物处理 16 h, 吸取上清液, 0.22 μm 滤膜过滤, 即得到假型 HIV-1 病毒溶液。24 孔板每孔接种 SupT1 细胞 (本室保存) 5×10^5 个, 加入病毒溶液 50 μ L 感染 SupT1 细胞, 48 h 后收取细胞, 通过测量荧光素酶活性来评价化合物的抗病毒活性。

数据处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性分析采用 Excel 软件中的数据分析工具进行 *t* 检验 ($n \geq 3$)。

结果

1 模型的建立

本研究运用 BRET 技术, 建立了细胞水平的 HIV-1 前体蛋白早成熟化激活剂筛选模型。如图 1A 所示, p2/p7 (SATIMQRGN) 序列是 HIV-1 前体蛋白 Gag 中 p2 和 NCp7 两个蛋白相邻的 10 个氨基酸, 是 HIV-1 蛋白酶酶切加工 Gag 的第 1 个位点^[12]。pEYFP-p2/p7-Rluc 质粒为在 EYFP 和 Rluc 之间插入 p2/p7 序列, 表达融合蛋白 EYFP-p2/p7-Rluc (图 1A)。该模型

的工作原理为, 加入 Rluc 底物 Coelenterazine h 后, 将产生发射光 ($\lambda_{em} \sim 475 \text{ nm}$), 在 Rluc 与 EYFP 距离小于 10 nm 时, Rluc 催化产生的光波发生能量转移, 激发受体 EYFP, 产生激发光 ($\lambda_{em} \sim 535 \text{ nm}$) (图 1B)。HIV-1 蛋白酶酶切 EYFP 和 Rluc 之间的 p2/p7 序列后,

使得 EYFP 和 Rluc 成为两个独立的蛋白。两者从融合状态改变成分离状态将直接阻断能量转移 (图 1C), 导致 BRET 比值下降。

2 HIV-1 蛋白酶能够有效、特异酶切 EYFP-p2/p7-Rluc 融合蛋白

为了证明 HIV-1 蛋白酶能有效酶切 p2/p7 序列, 并相应的引起 BRET 比值的改变, 采用 pEYFP-p2/p7-Rluc 和不同的 Gag-Pol 表达质粒 (图 2A) 共转染 293T 细胞, 然后进行 Western blotting 分析 (图 2C) 和 BRET 比值测定 (图 2B)。如图 2A 所示, phGagPol.PR-和 phGagPol 质粒中均删除了 gag 和 pol 基因之间移码区的 5 个 T, 使得两者处于同一阅读框, 表达 Gag-Pol, 不表达 Gag。phGagPol.PR-的蛋白酶通过点突变 (R57G) 失活, 与空载体相比, 其 BRET 比值无明显变化 (图 2B)。与野生型 HIV-1 相似, phGag/GagPol 可以同时表达 Gag 和 Gag-Pol (两者比例 20 : 1), 并形成病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs)。虽然主要的 Gag-Pol 都参与了病毒的装配, 但仍有少量 Gag-Pol 中的蛋白酶在 Gag-Pol 被装配进病毒颗粒前被激活, 因此细胞内具有一定的蛋白酶活性 (图 2B, $P < 0.01$, $n = 3$)。phGagPol 质粒只表达 Gag-Pol, 由于该前体蛋白不能形成病毒颗粒, 而在细胞中大量累积, 细胞内蛋白酶活性较 pVRC4200 高^[7], 因此其 BRET 比值较 phGag/GagPol 低 (图 2B, $P < 0.01$, $n = 3$)。Western blotting 结果 (图 2C) 同 BRET 比值结果一致。

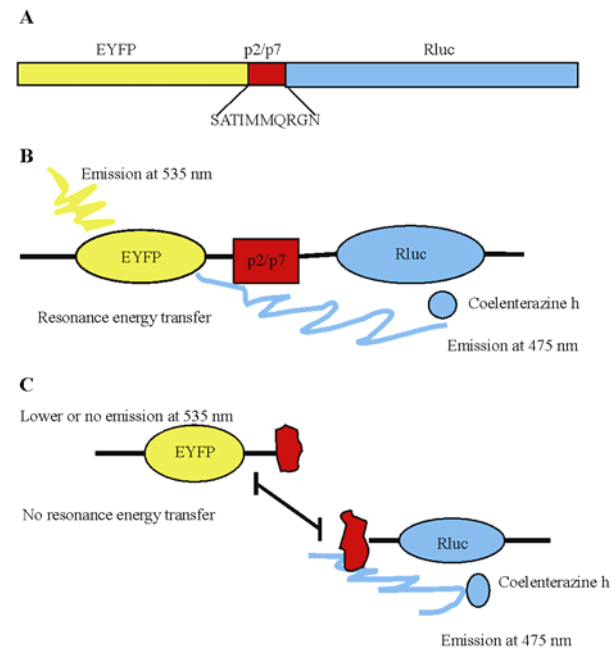


Figure 1 The scheme of the assay. A: Schematic representation of EYFP-p2/p7-Rluc fusion protein; B: If EYFP-p2/p7-Rluc fusion protein is intact, resonance energy transfer occurs between Rluc and EYFP; C: If HIV-1 PR cleaves p2/p7 to distance Rluc and EYFP greater than 100Å, no resonance energy transfer occurs

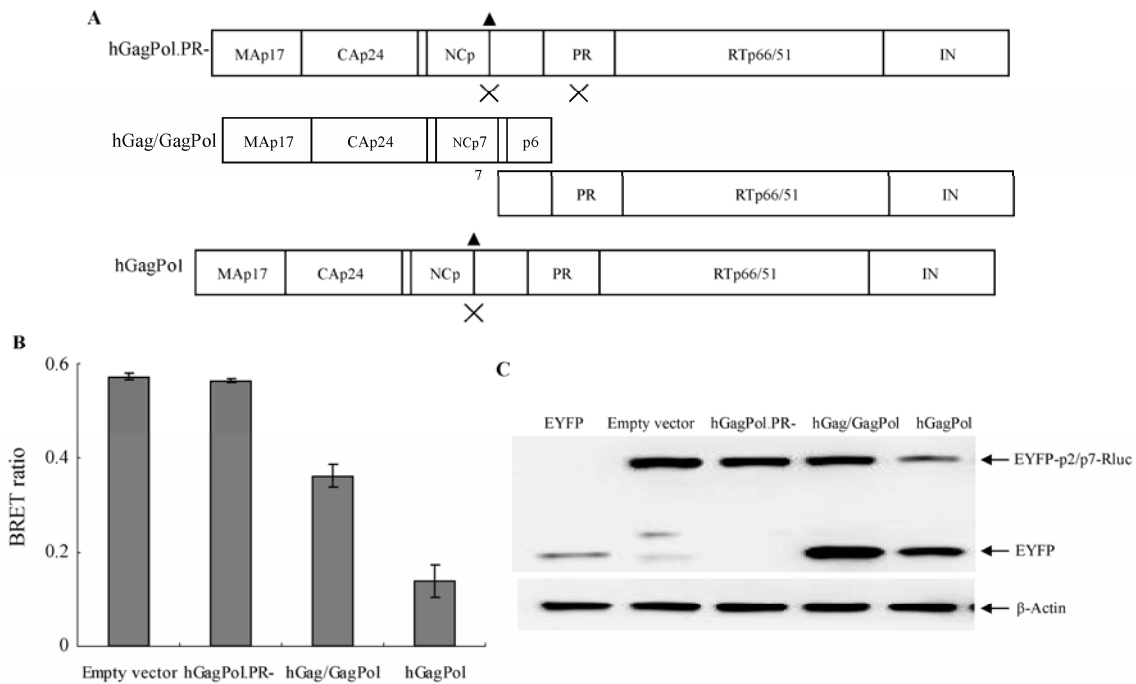


Figure 2 EYFP-p2/p7-Rluc fusion protein is cleaved efficiently by HIV-1 PR. A: Schematic representation of hGagPol.PR-, hGag/GagPol, hGagPol; B: Measurement of BRET ratio; C: Western blotting analysis

为了进一步验证上述实验现象是 HIV-1 蛋白酶特异性酶切的结果, 在 p2/p7 序列进行了点突变 (SGTIIMQSGN), 使得 HIV-1 蛋白酶不能酶切该序列。如图 3 所示, 当共转 phGag/GagPol 或 phGagPol 质粒时, HIV-1 蛋白酶均不能有效酶切 p2/p7 位点突变的融合蛋白 EYFP-p2/p7 (mut)-Rluc, 同时 BRET 比值基本不变。结果表明, HIV-1 蛋白酶特异酶切 p2/p7 序列, 并相应的引起 BRET 比值下降。

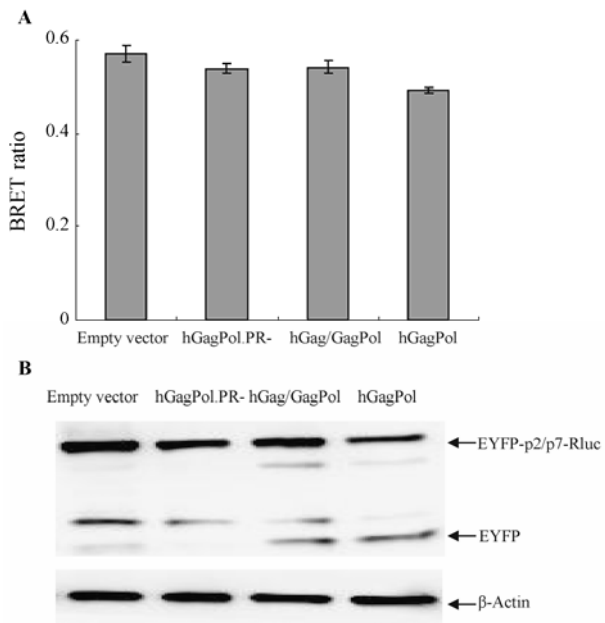


Figure 3 EYFP-p2/p7(mut)-Rluc fusion protein is not cleaved efficiently by HIV-1 PR. A: Measurement of BRET ratio; B: Western blotting analysis

3 HIV-1 蛋白酶活性的剂量关系

为了证明细胞内 HIV-1 蛋白酶活性高低与其酶切融合蛋白 EYFP-p2/p7-Rluc 量相关, 保持质粒 pEYFP-p2/p7-Rluc 量不变, 调整质粒 phGag/GagPol 用量, 随着比例增高, 细胞内 HIV-1 蛋白酶活性增高, 酶切融合蛋白 EYFP-p2/p7-Rluc 量增多 (图 4B), BRET 比值下降 (图 4A, $P < 0.05, n = 3$)。

4 非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs) EFV、TMC-125 能增加细胞内 HIV-1 蛋白酶活性

HIV-1 蛋白酶全酶是同源二聚体蛋白, 因此认为其激活需要 Gag-Pol 的二聚化^[6]。Figueiredo 等^[17]发现有些 NNRTIs, 如 efavirenz (EFV)、etravirine (TMC-125), 能加速 Gag-Pol 的二聚化, 导致细胞内被激活的 HIV-1 蛋白酶增多, 加速前体蛋白 Gag 和 Gag-Pol 的酶切加工, 病毒颗粒释放量减少。这些药物可以用来评价建立的系统的有效性。pEYFP-p2/p7-Rluc 质粒与 phGag/GagPol 质粒共转染 293T 细胞, 转染 24 h

后, 加入不同药物处理。如图 5 所示, 经过 EFV、TMC-125 处理, BRET 比值较阴性对照 (DMSO 处理) 下降 ($P < 0.01, n = 6$), 而 nevirapine (NVP)、zidovudine (AZT) 处理则无影响, 该结果同文献^[17]报道相吻合。蛋白酶抑制剂 saquinavir 则提高了 BRET 比值 ($P < 0.01, n = 6$)^[12]。图 6 显示, 细胞内 HIV-1 蛋白酶活性是 EFV 浓度依赖的, 随着 EFV 浓度增加, 细胞内 HIV-1 蛋白酶活性提高 ($P < 0.05, n = 3$)。

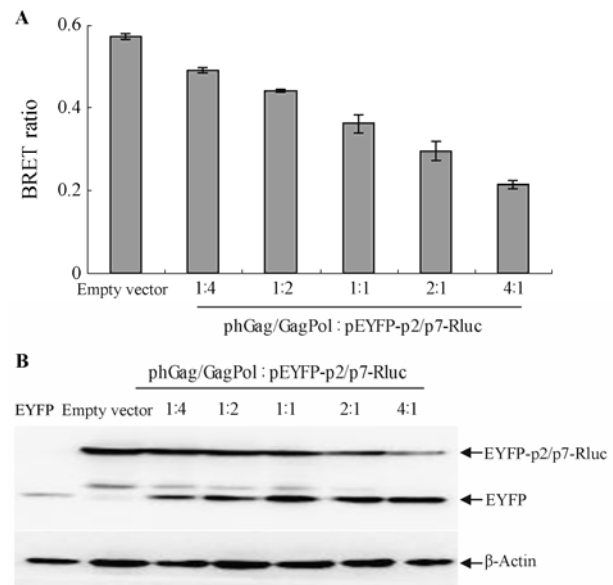


Figure 4 Dose dependence of HIV-1 PR activity. A: Measurement of BRET ratio; B: Western blotting analysis

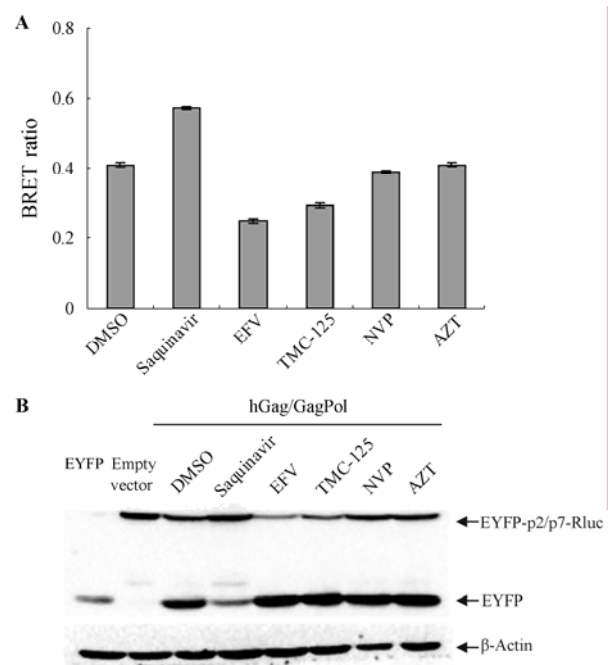


Figure 5 Influence of different drug treatments on intracellular HIV-1 PR activity. A: Measurement of BRET ratio; B: Western blotting analysis

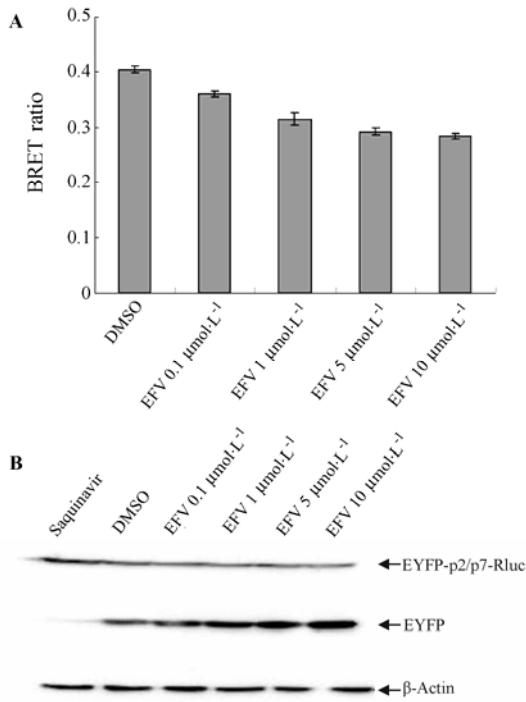


Figure 6 Dose dependence of EFV on intracellular HIV-1 PR activity. A: Measurement of BRET ratio; B: Western blotting analysis

5 模型评价及初筛结果

选取 EFV 作为模型的阳性对照药物。Z' 因子是评价高通量筛选方法稳定性的一个重要参数。当 Z' 因子大于 0.4, 则认为该方法较稳定, 适用于高通量药物筛选。计算得出本模型的 Z' 因子为 0.905 ($n = 24$)。筛选了 3 000 个化合物 (图 7), 筛选时每 5 个化合物合为 1 个样品, 每个化合物的筛选质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将初筛为阳性的混合物样品再拆分为单个化合物, 测量每个化合物的活性。最终得到阳性化合物 3 个, 阳性率为 0.1%。

6 阳性化合物 17D9 抗病毒活性测定

筛选得到的化合物 17D9 浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其降低 BRET 比值的活性同 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EFV 相当 (图

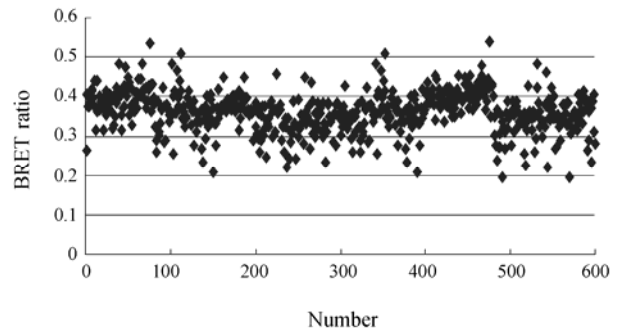


Figure 7 The results of primary screening of 3 000 compounds

8A, $P < 0.01$, $n = 6$)。对 17D9 进行了抗病毒活性测定, 结果显示其抗病毒效果一般, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理减少病毒产量为 30% (图 8B, $P < 0.05$, $n = 4$)。

讨论

目前, 艾滋病的防治主要是依靠药物治疗。临床上使用的抗 HIV-1 的药物主要可分为核苷类和非核苷类逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、整合酶抑制剂以及跨膜糖蛋白抑制剂^[18]。但是这些药物均针对新产生的病毒, 阻止新病毒感染新的细胞, 无法清除感染的细胞。本研究选择 HIV-1 前体蛋白早成熟化作为抗 HIV-1 药物靶点, 以期获得可以激活前体蛋白早成熟化的新型抗 HIV-1 药物。这一新型抗病毒药物可以提前激活 Gag-Pol 中的蛋白酶, 导致细胞内的蛋白酶活性过高, 直接抑制病毒的装配, 减少病毒产量。同时, 因为蛋白酶具有细胞毒性, 能引起细胞凋亡^[19], 所以有可能清除被病毒感染的细胞, 从源头上抑制病毒的生长。从理论上讲, 将该种药物同其他非蛋白酶抑制剂的抗 HIV-1 药物联合使用, 可以从清除感染细胞和抑制病毒感染两个方向共同抑制病毒的复制, 将会缩短疗程, 提高疗效, 更为重要的是这将成为根除艾滋病的化学药物治疗的发展方向之一。

BRET 的信号通过比较 EYFP 发出的绿光和 Rluc 发出的蓝光的量来进行测量, 其信号是一个比率数,

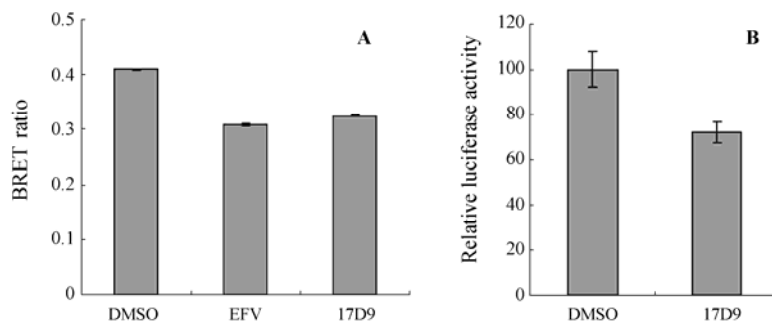


Figure 8 Inhibition of positive compound on viral particle production. A: Measurement of BRET ratio; B: Inhibition of 17D9 on viral particle production

不是一个绝对量, 它消除了那些由于细胞数、细胞类型和其他实验变量而引起的数据变量。作者运用该技术建立的筛选系统经验证, 特异性较好, Z' 因子为 0.905, 说明系统准确度较高, 稳定性较好, 达到筛选模型的统计学要求。运用该模型筛选得到的药物, 不仅可能为治疗艾滋病提供新的选择, 而且也将有助于对 HIV-1 蛋白酶活性调控机制的研究。

References

- [1] Clavel F, Hance, AJ. HIV drug resistance [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1023–1035.
- [2] Loeb DD, Hutchison CA III, Edgell MH, et al. Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases [J]. *J Virol*, 1989, 63: 111–121.
- [3] Navia MA, Fitzgerald PM, McKeever BM, et al. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1 [J]. *Nature*, 1989, 337: 615–620.
- [4] Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency [J]. *J Virol*, 1994, 68: 6782–6786.
- [5] Hill M, Tachedjian G, Mak J. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins [J]. *Curr HIV Res*, 2005, 3: 73–85.
- [6] Vogt VM. Proteolytic processing and particle maturation [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 214: 95–131.
- [7] Karacostas V, Wolffe EJ, Nagashima K, et al. Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles [J]. *Virology*, 1993, 193: 661–671.
- [8] Krausslich HG. Human immunodeficiency virus proteinase dimmer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 3213–3217.
- [9] Ott DE, Coren LV, Chertova EN, et al. Elimination of protease activity restores efficient virion production to a human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid deletion mutant [J]. *J Virol*, 2003, 77: 5547–5556.
- [10] Arrigo SJ, Huffman K. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by inducible expression of HIV-1 PR multimers [J]. *J Virol*, 1995, 69: 5988–5994.
- [11] Hu K, Clément JF, Abrahamyan L, et al. A human immunodeficiency virus type 1 protease biosensor assay using bioluminescence resonance energy transfer [J]. *J Virol Methods*, 2005, 128: 93–103.
- [12] Huang Y, Kong WP, Nabel GJ. Human immunodeficiency virus type 1-specific immunity after genetic immunization is enhanced by modification of Gag and Pol expression [J]. *J Virol*, 2001, 75: 4947–4951.
- [13] Akkina RK, Walton RM, Chen ML, et al. High-efficiency gene transfer into CD341 cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G [J]. *J Virol*, 1996, 70: 2581–2585.
- [14] Pflieger KDG, Seeber RM, Eidne KA. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein–protein interactions [J]. *Nat Protocol*, 2006, 1: 1337–1345.
- [15] Pflieger KDG, Eidne KA. Illuminating insights into protein–protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) [J]. *Nat Methods*, 2006, 3: 165–174.
- [16] Zhang JH, Chung TDK, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays [J]. *J Biomol Screen*, 1999, 4: 67–73.
- [17] Figueiredo A, Moore KL, Mak J, et al. Potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors target HIV-1 Gag-Pol [J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2: 1051–1059.
- [18] Wapling J, Srivastava S, Shehu-Xhilaga M, et al. Targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly, maturation and budding [J]. *Drug Target Insights*, 2007, 2: 159–182.
- [19] Badley AD. *In vitro* and *in vivo* effects of HIV protease inhibitors on apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 924–931.