

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21720061152203

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**HMBA 和 prostratin 激活 HIV-1 转录机制
研究**

**Effects and mechanism of HMBA and prostratin on HIV-1
transcription**

朱莹

指导教师姓名: 陈瑞川 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2009 年 06 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

英文缩略语对照表.....	V
中文摘要.....	VII
英文摘要.....	VIII
1 前言.....	1
1.1 HIV 的潜伏感染.....	1
1.1.1 HIV 的发现以其意义.....	1
1.1.2 艾滋病的治疗.....	1
1.1.3 HIV 的潜伏感染.....	3
1.1.3.1 HIV 的 潜伏.....	3
1.1.3.2 HIV 潜伏的原因及活化.....	6
1.1.3.3 清楚 HIV 前病毒的策略.....	9
1.2 蛋白激酶 D (protein kinase D, PKD).....	9
1.2.1 蛋白激酶 D 的结构.....	9
1.2.2 蛋白激酶 D 的功能.....	10
1.2.3 蛋白激酶 D 的活性调控.....	12
1.3 本课题研究的目标和意义.....	13
2 材料与方 法.....	14
2.1 实验药品、试剂与仪器.....	14
2.2 实验方法.....	16
3 结果与分析.....	31
3.1 HMBA 和 prostratin 浓度依赖性诱导 HIV-LTR-Luciferase 报告基因的 活性.....	31
3.2 HMBA 和 prostratin 时间依赖性诱导 HIV-LTR-Luciferase 报告基因活 性增强.....	31
3.3 Prostratin 通过 PKC 途径影响 HIV-1 转录.....	33
3.4 HMBA 和 prostratin 分别通过转录因子 Sp1 和 NF- κ B 的结合位点影响	

HIV-1 的转录水平	34
3.5 PKDs shRNA 的筛选.....	36
3.6 Prostratin 通过 PKD3 激活 HIV-1 的转录.....	37
3.7 PKD3 通过 NF- κ B 结合位点影响 HIV-1 转录.....	37
4 讨论.....	40
5 参考文献.....	42
致谢.....	51

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abbreviation..... V

Abstract in Chinese.....VII

Abstract in English.....VIII

1 Introduction..... 1

1.1 HIV latency.....1

 1.1.1 the discovery of HIV and its significance..... 1

 1.1.2 the cure for AIDS.....2

 1.1.3 HIV latency.....3

 1.1.3.1 the definition of HIV latency.....3

 1.1.3.2 the reason for HIV latency and its activation6

 1.1.3.3potential therapies to disrupt latent proviral HIV
 infection.....9

1.2 protein kinase D ,PKD..... 9

 1.2.1 the structure of PKD.....9

 1.2.2 the function of PKD.....10

 1.2.3 the regulation of PKD’s activation.....12

1.3 aims and significance of this research.....13

2 materials and methods.....14

2.1 materials.....14

2.2 methods.....16

3 results.....31

**3.1 HMBA and prostratin induce HIV-LTR-Luc activity dependent of
 concentration**31

**3.2 HMBA and prostratin induce HIV-LTR-Luc activity dependent of time
 course**.....32

**3.3 prostratin has effect on the HIV-1 transcription via PKC signaling
 pathway**.....33

3.4 HMBA-mediated induction of HIV-1 expression requires Sp1 binding sites at HIV-LTR, whereas NF-κB binding sites are required for prostration response	34
3.5 the screening of PKDs shRNA	36
3.6 prostratin stimulates HIV-1 transcription through PKD3 activation	37
3.7 PKD3 stimulates HIV-1 transcription dependent of NF-κB binding sites at HIV-LTR	38
4 discussion	40
5 references	42
acknowledgement	51

英文缩略语对照表

Abbreviation	Full Name
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
HIV	Human immunodeficiency virus
HAART	Highly active anti-retroviral therapy
PI	Protease inhibitors
NNPTI	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
dsDNA	Double stranded DNA
CXCR	Chemokine receptor
CCR5	Chemokine(c-motif) receptor 5
LTR	Long terminal repeats
HDAC	Histone deacetylase
p-TEFb	Positive transcription elongation factor b
TAR	Transacting-response
CTD	C-terminal domain
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
NELF	Negative elongation factor
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
Pol II	RNA polymerase II
NF-κB	Nuclear factor κB
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein
HAT	Histone acetyltransferases
PTK	Protein tyrosine kinase
STAT	Transducer and activator of transcription
IL-7	Interleukin 7
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
PKC	Protein kinase C
PKD	Protein kinase D

英文缩略语对照表

ATP	Adenosine-triphosphate
AP	Apolar region
CYS	Cysteine-rich Zn finger domain
AC	Acidic domain
PH	Pleckstrin homology domain
DAG	diacylglycerol
CaMK	Calcium/calmodulin-dependent kinase
PI4K	Phosphatidylinositol 4-kinase
JNK	C-Jun N-terminal kinase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
PLC	PhospholipaseC
MEF2	Myocyte enhancer binding factor 2
GPCR	G-protein-coupled receptor
MnSOD	Manganese superoxide dismutase
BCR	B cell antigen receptor
TCR	T cell antigen receptor

摘要

HIV 在全球范围内流行 20 多年了, 人们为治愈艾滋病做了长期的努力。高效抗逆转录病毒治疗(HAART) 使人免疫缺陷病毒(HIV) 感染者的病死率明显下降。大多数感染者在接受抗病毒治疗后血浆 HIV-RNA 降至检测水平以下,然而病毒不能被彻底清除。因为在静止型 CD4 细胞中存在具有潜在复制能力的前病毒, 隐源性的病毒复制可在低于检测极限的宿主中出现。所以, 静止型 CD4 细胞成为 HIV 的病毒库。目前临床主要寻求诱导其表达的途径, 使其活化, 然后通过免疫系统识别进而加以清除。

近些年来, HMBA 和 prostratin 能有效激活 HIV-1 前病毒的潜伏感染, 为艾滋病的治疗带来新的曙光。HMBA——一种混合双极化合物, 是有效的细胞生长抑制剂和细胞分化诱导剂, 而 prostratin 是从 Mamala 树皮里分离的一种天然化合物, 而且在实验室条件下确实能够抵抗 HIV。

本文中, 我们通过药物处理稳定细胞株和转染的 HeLa 为模型, 发现 HMBA 和 prostratin 处理能激活 HIV-LTR 的活性。同时我们通过一些 HIV-LTR-Luciferase 报告基因的删除突变, 发现 HIV-LTR 对 HMBA 的应答需要转录因子 SP1 的结合位点, 而对 prostratin 的激活则需要 NF- κ B 结合位点。随后我们发现 prostratin 通过蛋白激酶 C 途径激活蛋白激酶 D3 (PKD3), 进而 HIV-1 的转录被激活。

关键词: HIV HMBA prostratin 蛋白激酶 D

Abstract

Through the HIV epidemic of over 20 years, people have strived to find cures for AIDS. The introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) has dramatically reduced the fatality rate of infected patients. After antiretroviral therapy, HIV-RNA drop to undetectable levels in the blood of most patients. However, the virus cannot be eradicated. In resting CD4 T-lymphocytes, provirus has potential of replication, at undetectable levels. Therefore resting CD4 T-lymphocytes act as a reservoir for HIV virus. Current methods explore ways to activate viral expression, and eradicate the virus through recognition by the immune system.

Recently, drugs HMBA and prostratin have shed new light on HIV therapy, as they can activate latently infected HIV-1. HMBA is a hybrid bipolar compound that effectively induces cell differentiation and retards cell growth. Prostratin, found in the bark of the mamala tree, can also induce HIV resistance under laboratory conditions.

In this thesis, using drug treatment of stable cell line and transient transfected HeLa cell models, we observed activation of HIV-LTR transcription by HMBA and prostratin. Our work on deletion mutants of the HIV-LTR-luciferase reporter gene showed that binding sites of the transcriptional factor Sp1 are essential for HIV-LTR response to HMBA, and NF- κ B binding sites are required for activation by prostratin. We further discovered that prostratin activates protein kinase D3 (PKD3) through the PKC pathway, to activate HIV-1 transcription.

Key words : HIV HMBA prostratin protein kinase D

1 前言

自1981年世界第一例艾滋病病毒感染者发现至今,短短20多年间,艾滋病在全球肆虐流行,已成为重大的公共卫生问题和社会问题,引起世界卫生组织及各国政府的高度重视。目前全世界艾滋病流行现状十分严峻,据联合国艾滋病规划署统计,目前全球共有3320万名艾滋病病毒感染者,其中2250万名感染者分布在撒哈拉沙漠以南的众多非洲国家;亚洲有近500万名感染者;东欧和中亚地区约150万名;拉美地区约170万名;北美、西欧和中东欧地区约200万名,其中美国约120万名。据世界卫生组织估计,中国艾滋病病毒感染人数在西太平洋地区居第1位,在亚洲居第2位,在全球居第14位。艾滋病的传播和蔓延威胁着人们的生命健康,它不仅直接对感染者躯体健康及其家庭造成严重的危害,带来家庭贫困、孤儿增加、社会歧视等一系列问题,而且会影响到地区甚至国家的社会经济发展。因此控制艾滋病在全球的蔓延是当前人类急需解决的重大医学问题之一。本文致力于某些能激活持续感染细胞方法的分子生物学机制的研究,这对于研究治疗HIV感染的新方法及探索彻底清除病毒的方法大有裨益。

1.1 HIV的潜伏感染

1.1.1 HIV的发现及其意义

20世纪80年代,出现了一种严重的传染病——获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS),一般称为艾滋病,该疾病是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起,HIV病毒是蒙塔格尼尔和巴尔-西诺西这两位科学家发现的[1],他们成功复制出一型艾滋病病毒(HIV-1)基因组片段,最终发现了艾滋病病毒循环复制及与主体病毒相互配合的病理,由此确立了诊断艾滋病病毒感染者的方式。关于艾滋病病原体HIV的发现及相关机制的阐明为深入研究HIV及艾滋病防治奠定了坚实的基础,为此他们分享了2008年的诺贝尔奖。HIV的研究迅速成为生命科学的热点之一,从而使HIV的详细复制机制及生命周期、病毒与宿主的相互作用及病毒侵染宿主细胞的分子机制被陆续揭示,这些成就为抗病毒药物的筛选和开发提供了依据。

1.1.2 艾滋病的治疗

HIV-1通过与宿主表面CD4分子及趋化因子辅助受体结合,粘附到宿主细胞

表面,融合,脱衣壳,HIV-1自身的RNA及其活性酶释放进入宿主细胞,然后由RNA依赖的DNA聚合酶来复制HIV-1的RNA产生DNA,形成前病毒。前病毒经HIV-1整合酶的一系列作用整合到宿主DNA上,随着每一次细胞的分裂,被整合的前病毒随宿主DNA一起复制。

对HIV/AIDS患者的治疗,目前常使用包括蛋白酶抑制剂在内的两种或多种药物的联合疗法,被称为高效抗逆转录病毒疗法(HAART),该方法是1996年临床开始将抗病毒药物合并使用治疗HIV感染。现行的HAART处方大部分包含3种抗反转录病毒药物,通常是两个核苷类似物以及蛋白酶抑制剂(PI)或是非核苷酸反转录酶抑制剂(NNPTI),HAART使人免疫缺陷病毒(HIV)感染者的病死率明显下降。但是HAART治疗方法毕竟不是万能的,存在很多弊端,如成本高,病人终生都要接受治疗,因为一旦停止治疗,病毒会爆发性的增值。大多数HIV感染者若要实现病毒的完全清除,需60年左右,而且治疗过程中存在的副作用和并发症是无法估计的,因为HAART治疗的药物大部分跟调节糖类跟脂类代谢相关[2]。大多数感染者在接受抗病毒治疗后血浆HIV-1 RNA降至检测水平以下($<50\text{copy/mL}$) [3, 4],然而最致命的是病毒不能被彻底清除,而且在患者终生的治疗中可能会引发心脏病,糖尿病,肝脏疾病,癌变等[5-8]。人免疫缺陷病毒(HIV)潜伏感染病毒库的存在,已成为目前HART治疗清除HIV的巨大障碍,为此探讨清除潜伏感染病毒库,优化HART治疗的策略,一直是抗HIV治疗的研究热点。

1.1.3 HIV的潜伏感染

1997年Chun等首先发现在静止的记忆CD4⁺T淋巴细胞中,存在人免疫缺陷病毒(HIV)潜伏感染病毒库[9]。所谓HIV潜伏感染是指感染的细胞内整合有完整的HIV基因组,但其表达受抑制,一旦条件适当,病毒又能恢复复制能力[10]。

1.1.3.1 HIV潜伏

潜伏感染是病毒感染中的一种重要类型,指病毒基因组存在于一定组织或细胞中,并不复制,但在某些条件下可被激活而产生出有感染性的病毒体。随着对HIV/AIDS研究的深入,人们逐渐认识到HIV潜伏感染在AIDS的发病机制、临床抗病毒治疗等领域的重要意义。目前认为存在潜伏感染HIV的静息CD4⁺T

细胞是构成机体内病毒储藏库的主要部分,同时也是清除HIV的巨大障碍。

HIV潜伏感染的产生机制可分为两种:整合前潜伏(p reintegration latency)和整合后潜伏(postintegration latency),虽然两者产生机制不同,但都发生在处于G0期的静息CD4+T细胞。

整合前潜伏指病毒以双链DNA(dsDNA)的形式存在于静息CD4+T细胞胞质内,细胞被激活仍可产生出病毒。以往研究已经证实,HIV最主要的靶细胞是活化的CD4+T细胞并且只能在活化细胞内复制。但在某些条件下,HIV也可以和静息CD4+T细胞表面受体结合并同细胞膜发生融合之后病毒基因组在胞质内进行逆转录形成dsDNA,并连同逆转录酶、整合酶等病毒蛋白形成整合前复合物,但由于宿主细胞处于G0期,整合前复合物无法进入细胞核[11],病毒的生命周期遂停滞于此形成潜伏感染。当静息细胞遇到抗原被活化,病毒就可以进入其生命周期的下一个阶段,进入细胞核、整合进宿主染色体,直至复制出新的病毒颗粒。静息CD4+T细胞包括纯真和记忆两种表型,两者分别以CXCR和CCR5为辅受体,两种静息细胞都可以形成整合前潜伏感染。

整合后潜伏指病毒的dsDNA整合到宿主染色体当中以前病毒的形式形成的潜伏状态。整合后潜伏发生于活化的效应CD4+T细胞转变为静息的记忆细胞过程中。在胸腺发育成熟的静息纯真T细胞移行至外周淋巴组织,遇抗原后活化、增殖并分化为效应细胞,效应细胞发挥免疫功能之后大部分发生了凋亡,小部分进入G0期成为静息记忆细胞,可长期存活,当再次遇到相同抗原,可迅速活化为效应细胞,一旦染色体中整合有HIV前病毒的效应细胞逃避了免疫防御机制并避免了病毒感染造成的细胞病变而成功转变为记忆细胞,即建立了整合后潜伏[12]。

表1.1 HIV潜伏的特征

Table 1.1 HIV latency

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> •存在潜伏感染HIV的静息CD4+T细胞是构成机体内病毒储藏库的主要部分 |
| <ul style="list-style-type: none"> •接受HAART治疗的患者静息CD4+T细胞中存在潜伏的HIV-1原病毒的比例为$1/10^6$ |

•潜伏的HIV前病毒随着CD4 +T细胞进入记忆状态而停止表达，呈现无转录状态而长期留存，它们对HAART不敏感，亦不会高频突变。

•一旦停止HAART治疗，病毒贮存库的病毒马上重新合成，释放HIV-1病毒颗粒。

•潜伏的HIV前病毒同样存在于一些对药物不敏感的部位，如脑，单核-巨噬细胞以及造血干细胞

•HIV病毒的潜伏可能跟HIV-1复制过程中的多个步骤相关，从而使得病毒根除策略复杂化。

1.1.3.2 HIV潜伏的原因及活化

潜伏期前病毒的活化程度会影响到HIV-1感染和人体免疫抑制的发展程度，而病毒 DNA 中的长末端（基因）重复序列（LTR）控制这个活化过程。HIV潜伏的原因分转录水平和转录后水平的影响

A.转录水平的影响

(1)组蛋白去乙酰化酶（HDAC）的抑制作用

研究显示，HIV-1前病毒的长末端重复序列（LTR）在表达活化前需要经过组蛋白乙酰化，而组蛋白去乙酰化酶（HDAC）可以将组蛋白去乙酰化。所以一旦HDAC聚集于LTR区会使前病毒表达抑制。目前研究证实，HDAC与LTR的结合在限制体内HIV-1表达和前病毒在细胞内长期整合都起到了核心作用[13]。组蛋白去乙酰化酶（HDAC）可减少RNA 聚合酶II的补充及HIV 转录的启动，促进HIV 在T 细胞内潜伏[14-17]，这意味着组蛋白去乙酰化酶抑制剂可在未来致力于消灭感染者潜在的细胞宿主的战略中成为有价值的目标。

(2) 宿主细胞转录因子的作用

在HIV转录中，tat蛋白扮演了重要的角色。Tat是HIV-1编码的一个小的调控蛋白，通过募集正性转录延伸因子p-TEFb（the positive transcription elongation

factor b , P-TEFb)复合体到新生的病毒转录产物5'末端的长59个碱基、应答反式激活 (TAR) 的RNA茎环结构区, 高效活化HIV-1 LTR序列后基因的转录延伸, 大幅度增强全长病毒基因组 (>9 kb) 的转录[18-20], 缺乏Tat时HIV-1 LTR起始的转录多为不成熟的短片段。Tat与CycT1均能特异性结合TAR RNA, Tat和CycT1在靠近cyclin-box的区域也有直接的相互作用, 因此这三者组装而成的稳定的三元复合体使P-TEFb复合体能够足够靠近被暂停的Pol II, 从而刺激活化HIV-1基因的转录延伸[18-20]。

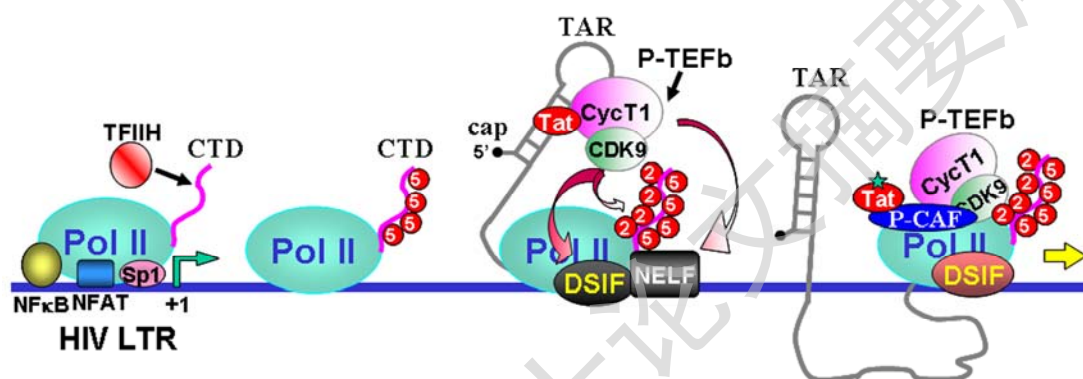


图 1.1 P-TEFb 复合体协助 Tat 蛋白完成 HIV-1 转录。

Fig 1.1 Tat activation of HIV-1 transcription.

此外, 静息期细胞中HIV前病毒的潜伏可能跟nuclear factor kB(NF-kB) and nuclear factor of activated T cells (NFAT)的低水平表达有关[21]。

B. 转录后水平的影响

HIV前病毒的潜伏还可能跟转录后修饰有关。静息期细胞中多嘧啶序列结合蛋白polypyrimidine tract-binding protein (PTB) 低水平表达导致HIV mRNA出核能力大大减弱[22]。另外, 人细胞内源的MicroRNAs (miRNAs)的表达进一步抑制HIV mRNA的表达或翻译[23,24]。这两者在转录后水平促进HIV的病毒潜伏感染, 如图1.2所示。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库