

封面：

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

**PKD3 通过调控 NF- κ B 信号途径增强 Prostrain
刺激下的 HIV-1 病毒转录**

胡向明

工作完成日期 2016 年 9 月

报告提交日期 2016 年 9 月

厦门大学

2016 年 9 月

题名页

**PKD3 通过调控 NF- κ B 信号途径增强 Prostratin
刺激下的 HIV-1 病毒转录**

**Protein Kinase D3 Is Essential for Prostratin-stimulated
Integrated HIV-1 Transcription activation via
NF- κ B Signaling Pathway**

博 士 后 姓 名 胡向明

流动站（一级学科）名称 化学

专 业（二级学科）名称 分析化学

研究工作起始时间 2012 年 07 月

研究工作期满时间 2016 年 9 月

厦 门 大 学

2016 年 9 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘要

Prostratin, 一种非肿瘤促进性的佛波酯, 能够通过激活HIV-1病毒转录来清除潜伏期的HIV-1病毒, 但其分子机制还不是很清楚。本文, 我们发现PKD3对于Prostratin激活HIV-1病毒转录是必需的。

首先, 敲除PKD3能够阻断Prostratin对HIV-1病毒的转录激活, 而敲除PKD家族的其他成员则不能。而且过表达持续活性的PKD3, 而非野生型或没有催化活性的PKD3, 能增强HIV-1病毒转录水平。于此同时, Prostratin通过增强PKD3活性结构域Ser731和Ser735位点的磷酸化促进PKD3的活性。另外我们鉴定出PKC ϵ 是磷酸化PKD3的激酶。最后, 我们发现Prostratin对HIV-1病毒的转录激活依赖于PKD3调控的NF- κ B信号途径。

因此, 本文首次发现Prostratin刺激下通过PKC ϵ PKD3 NF- κ B信号途径增强HIV-1病毒转录。

关键词: Prostratin; PKC ϵ ; PKD3; NF- κ B; HIV-1 病毒转录

Abstract

Prostratin, a nontumorigenic phorbol ester, has been shown to be capable of eradicating the latent HIV-1 provirus by inducing HIV-1 transcription activation. The molecular mechanism of inducing of this activation is still far from clear. Here, we show that the protein kinase D3 is essential for Prostratin-stimulated transcription activation of latent HIV-1 provirus.

First, knocking down of PKD3, but not the other members of PKD family, blocks prostratin-activated transcription of HIV-1. Second, overexpressing the constitutively active form of PKD3, neither the wild-type nor kinase-dead form of PKD3, enhanced the expression of HIV-1. Consistent with this observation, prostratin could trigger PKD3 activation by inducing the phosphorylation of its activation loop at S731 and S735. In addition, we identified PKC ϵ as the upstream kinase for the phosphorylation of PKD3. Finally, the activation effect of PKD3 on HIV-1 transcription was shown to depend on the presence of κ B element and the prostratin-induced activation of NF- κ B. Therefore, our study revealed for the first time that PKD3 is essential for the prostratin-induced transcription activation of latent HIV-1 provirus, and a molecular mechanism of its transcription activation via PKC ϵ PKD3 NF- κ B signaling pathway.

Keywords: Prostratin; PKC ϵ ; PKD3; NF- κ B; HIV-1 provirus transcription

目 录

目 次

1 前言	3
1.1 HIV 功能性治愈的概念	3
1.2 潜伏：阻断 HIV 表达的结果	4
1.2.1 第一轮阻断：转录起始	4
1.2.2 第二轮阻断：转录延伸	5
1.3 研究潜伏期 HIV 的细胞模型	5
1.4 激活潜伏期 HIV 的药物靶点	7
1.5 研究意义和内容	11
2 实验材料和方法	12
2.1 实验材料	12
2.2 方法	12
3 实验结果	15
3.1 Prostrain 主要激活潜伏期 HIV 转录的起始阶段	15
3.2 敲低 PKD3 阻断 Prostrain 激活潜伏期 HIV 转录	16
3.3 Prostrain 活化 PKD3 受 PKC ϵ 调控	16
3.4 Prostrain 通过增加 NF- κ B 与 HIV 启动子的结合激活转录依赖 PKD3	18
4 讨论	21
参考文献	22
致谢	29
博士后期间发表的学术论文	30
个人简历	30
联系地址	30

说 明

博士后研究工作报告的排版以全国博士后管理委员会办公室制定的统一格式为准（参见以上排版范例），研究报告封面统一以彩色羊皮卡纸制作，颜色不限，内页用纸为普通 A4 打印纸，单面或双面打印不限，正文字体为宋体小四。

为更好地保护博士后研究报告的著作权，请各位博士后在博士后研究工作报告中文摘要前加做《厦门大学博士后研究报告著作权使用声明》（具体格式见附件 2），并在该声明中明确保密年限。

出站时，提交 1 份研究报告至厦门大学图书馆，2 份给厦门大学人事处博士后管理办公室（学校定期提交给国家图书馆）。

1 前言

人类免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV），造成人类免疫系统缺陷的一种病毒。从 1983 年美国发现第一例患者起，三十多年间，在全球肆虐流行，至今无有效的治愈疗法。上世纪 90 年代末期，“组合抗逆转录病毒治疗”（Combined Antiretroviral Therapy, c-ART）燃起治愈 HIV 感染患者的希望。

“组合抗逆转录病毒疗法”能有效地控制 HIV 的复制，极大降低 HIV 相关的致病性和死亡率。“组合抗逆转录病毒疗法”在初期获得巨大的成功，乐观的人士预测继续该疗法 2-3 年，HIV 就能从患者身上根除^[1]。但是事实很快证明，一小部分潜伏病毒在治疗阶段不能被杀死，整合在人体基因组上不复制，一旦中止治疗，则可大量产生有感染性的病毒^[2-5]。因此，为了控制病情，患者必须接受终生治疗^[6]。这种终身疗法具有很强的副作用，且不能完全修复患者的免疫系统，因此，相比健康人群，感染病毒的人群患其他疾病或死亡的风险性更高。而且，从公共医疗卫生的角度来看，终身治疗和医疗支持的费用对于患者来说是一笔很大的经济负担^[7]。由于这些局限性，我们必须努力寻求新策略来清除 HIV，令患者在不接受治疗的情况下也能够控制病毒的复制。

1.1 HIV 功能性治愈的概念

具有广泛抑制效果的“组合抗逆转录病毒疗法”为潜伏期 HIV 的特点和动态性提供了重要的观念。接受“组合抗逆转录病毒疗法”的患者，血液中的 HIV 显著减少，减低至常规检测手段不能检测到的水平。因为 HIV 在体外环境极不稳定^[8]且“组合抗逆转录病毒疗法”能够阻止新一轮的感染，病毒血症的衰减速率取决于感染细胞的寿命^[1]。被感染的 CD4 T 淋巴细胞由于病毒引起的病变和宿主免疫系统的作用，在治疗初始的两周开始死亡。巨噬细胞，树突细胞和部分活化的 CD4s，认为也能被 HIV 感染的细胞，由于其半衰期更长，在“组合抗逆转录病毒疗法”的 4-6 周后开始减少。这是清除 HIV 的第二阶段，大多数患者在这个阶段血液中的 HIV 减至检测水平之下。第三阶段 HIV 的降解速率更加缓慢，推测需要接受“组合抗逆转录病毒疗法”长达 70 年才可完全清除患者体内的 HIV^[9]。由于 CD4 T 细胞长达 44 个月的半衰期及其稳态增殖，CD4 T 成为抗性 HIV 的主要宿主细胞^[4,10,11]。有种假说可以解释这个阶段的 HIV 具有长期抗性：

一部分潜伏期病毒处于静息态，不会被“组合抗逆转录病毒疗法”杀死，但在某些条件下能够被激活^[12]。潜伏期病毒是使用“组合抗逆转录病毒疗法”治疗艾滋病的障碍。

目前，成功治愈艾滋病有两种定义：一是完全清除体内 HIV (sterilizing cure, 即清除治愈)；二是在中止“组合抗逆转录病毒疗法”后相当长的一段时间内控制 HIV 的数量 (functional cure, 即功能性治愈)。

“组合抗逆转录病毒疗法”成功的关键在于尽可能减少甚至完全消除潜伏期病毒。消除潜伏期 HIV 的策略需要两个步骤：一，从大量晚期感染的细胞中辨别出能够激活 HIV 转录和复制的因子；二，增强免疫系统杀伤含有活性 HIV 的细胞。

1.2. 潜伏：阻断 HIV 基因表达的结果

逆转录和整合到宿主细胞基因组是 HIV 病毒复制的关键步骤。HIV 基因组偏爱整合在细胞转录活性强的基因中^[13]，一旦整合完成，如同细胞内源基因，病毒基因采用宿主细胞的分子机制调控表达。HIV 基因组的表达受病毒启动子或 5'长末端重复序列控制，其基因转录水平由宿主细胞的转录因子及其相关的辅助因子调控，并由此决定大量产生感染性病毒或进入受抑制的潜伏期。

1.2.1 第一轮阻断：转录起始

潜伏原病毒的染色体处于高度凝集状态。静息期的潜伏原病毒启动子序列没有或很少供宿主细胞转录因子结合的位点。启动子序列附近有两个核小体：处于上游的 Nuc-0(-415/-255) 和横跨核心启动子的 Nuc-1(+10/+155)^[14]。Nuc-1 抑制转录，当转录激活时，能迅速解体。这种核小体调控基因转录水平的模式在细胞中也存在，至少通过三种表观遗传分子机制来完成：1.染色体重塑复合物使用 ATP 水解的能量来重新编排核小体，2.组蛋白的翻译后修饰，如乙酰化和甲基化等，改变核小体结构，3.DNA 甲基化。这三种分子机制最后核心就是调整潜伏原病毒启动子的结构。

HIV 5'长末端重复序列具有很多宿主细胞的转录激活因子如 NF- κ B, AP-1, NFAT, LEF1 和 SP-1 的结合位点^[15,16]。在静息态的 CD4 T 细胞中，这些大部分的激活因子在细胞质中，激活后进入细胞核。另外，很多转录抑制因子，包括 YY-1, LSF, CbF-1, P50/P50 也能结合 5'长末端重复序列，抑制 HIV 转录。转录激

活和抑制因子的活性调控，决定 HIV 转录情况。潜伏 HIV 主要存在部分活化的 CD4 T 细胞中，此阶段 NF- κ B 和 NFAT 主要定位在细胞质^[17]，而且染色体处于凝集态，因此，HIV 的转录受到抑制。

1.2.2 第二轮阻断：转录延伸，起核心作用的 Tat 蛋白

基因转录启动，合成约 20-30bp RNA 序列时，由于负性转录因子 NELF 和 DSIF 的存在，RNA 聚合酶 II 停靠在 HIV 启动子的转录起始位点附近^[18-21]。为了克服这种阻碍，并产生完整的转录产物，HIV 编码出一个强力的转录激活因子---Tat 蛋白。Tat 蛋白通过募集超级转录复合物（Super Elongation Complex, SEC）^[22]，并与 HIV 5'长末端重复序列的初级结构 TAR RNA 相互结合。超级转录复合物的核心成员是正向转录延伸因子 b（Positive transcription elongation factor b, P-TEFb），它由 cyclin T1 和激酶 CDK9 组成^[23]。一旦被募集到 HIV 启动子上，CDK9 磷酸化 NELF 和 RNA 聚合酶 II 的碳末端结构域，从而克服 NELF 和 DSIF 的阻碍作用^[24,25]，并促进 RNA 聚合酶 II 的活性。除了募集 SEC, Tat 蛋白自身具有翻译后修饰的功能，通过结合并激活其他的转录激活因子，如乙酰化转移酶和 ATP 依赖性的染色体重塑复合物等，激活 HIV 转录。

由于其在基因转录调控中起核心作用，细胞内的 P-TEFb 含量受到严格控制。P-TEFb 以两种形式存在：与 7SK RNA 结合形成核内小核糖核蛋白复合物（small nuclear ribonucleoprotein complex, snRNP），非活化状态；不结合 7SK RNA 的活化状态。7SK snRNP 复合物含有一些其他因子，如核蛋白 HEXIM1 或 HEXIM2，能抑制激酶 CDK9 的活性。在病毒活跃复制的细胞中，7SK snRNP 的含量很少，Tat 蛋白诱导 HEXIM1 从 snRNP 复合物中解离，并与 HEXIM1 竞争结合 cyclin T1。与此相反，静息态的 CD4 T 细胞中，P-TEFb 主要以 7SK snRNP 的形式存在^[26]。

1.3. 研究潜伏期 HIV 的细胞模型

了解潜伏期 HIV 的自然结构，鉴定出保持其非活化状的关键因子和激活病毒转录的调控机制，有助于我们制定有效的策略逆转潜伏期 HIV。研究的关键在于建立合适有效的模型系统来检测潜伏期 HIV 的属性。感染潜伏期 HIV 的 CD4 T 细胞和单核细胞被证明是研究调控潜伏期 HIV 转录的分子机制非常好的模型。这些模型包括整合 Tat-TAR 轴突变或 Tet-on 系统的低表达可诱导性转录的细胞株^[27-30]。通过使用这些细胞株的研究揭示了调控 HIV 长末端重复序列转录的分子

机制。J-lat 模型来自于整合了最短或全长序列具有转录活性的潜伏期 HIV 的 Jurkat 细胞株。这些 HIV 介导的潜伏期病毒能激活报告基因如绿色荧光蛋白 GFP, 所以能够检测潜伏期 HIV 的转录水平^[31-34]。采用这些模型, 不仅可以鉴定调控潜伏期 HIV 的转录因子和信号通路, 也能筛选潜在的激活潜伏期 HIV 的药物分子靶点。

但是, 作为永生化的 T 细胞株, 潜伏期 HIV 的活性易受到病毒整合到基因组的位置和克隆效率的影响, 所以存在自身的局限性, 如不能正常的反映静息态 CD4 T 细胞体内潜伏期 HIV 的特点。

原代细胞模型来自于整合潜伏期 HIV 的 CD4 T 细胞。在自然宿主里, 潜伏期 HIV 的产生机制有两种: 活性状态的 HIV 感染细胞将其转化为记忆细胞, 此时活性状态的 HIV 进入潜伏期; 或直接感染静息态细胞。潜伏期 HIV 的原代模型可以在体外成功的模拟这两种过程。HIV 感染活跃期的 CD4 T 细胞, 大多数细胞由于凋亡死去, 少数细胞转变为静息态。采用缺陷型病毒和抗病毒化合物可以将感染限制在一轮复制。Bosque 和 Planelles 方法可以产生具有潜伏期 HIV 的细胞, 这些细胞的表型和能保持病毒长期潜伏性的中心记忆 CD4 T 细胞是一样的^[35]。通过外源过表达抗凋亡蛋白 Bcl-2, 降低凋亡率, 或与饲养细胞共培养, 可以获得更高产量的具有潜伏期 HIV 的细胞^[36]。目前, 直接感染静息态细胞的方法技术不够成熟, 成功率较低。

建立潜伏期 HIV 的原代细胞模型对研究清除 HIV 的工作十分重要, 特别是对于鉴定和筛选激活潜伏期 HIV 的药物分子非常有用。但是, 最近的研究表明不同的模型对激活潜伏期 HIV 的药物的敏感性是不一样的。这些差别可能来自每种模型只能代表体内一类的具潜伏期病毒的细胞, 也只能响应某些调控潜伏性 HIV 的信号通路。

为了进一步检测药物激活潜伏期 HIV 的效果, 必须从患者体内分离细胞。这种方法建立在从患者身体大量纯化静息态 CD4 T 细胞的基础上。尽管感染 HIV 的志愿者体内没有病毒复制的迹象, 体内依旧存在潜伏期或缺陷型的病毒。极低比例 (1:100,000-1:1000,000) 具复制能力的潜伏期 HIV 的 CD4 T 细胞就可以重新大量产生活性状态的 HIV^[37]。HIV 的重活化可以通过 HIV 相关的 RNA 定量或者饲养细胞的计数来检测。

1.4. 激活潜伏期 HIV 的药物靶点

调控 HIV 转录的核心信号通路能够为激活 HIV 复制，清除潜伏期病毒提供可能的药物靶点^[38]。对激活潜伏期 HIV 的前期研究工作主要集中在鉴定细胞因子和其他的有丝分裂激活因子^[39,40]。但是，细胞因子刺激能在细胞整体水平上激活，导致患者的免疫系统恶化，或者促进细胞增殖，从而令感染病毒的 CD4 T 细胞大量增加^[41]。

目前，分子水平上研究越来越多，包括调控染色体重塑的分子，激活 HIV 长末端序列转录的转录激活因子及其相关因子。下面有关章节主要是针对分子及其相关的信号通路的总结。

1.4.1 PKC 信号通路

参与激活 HIV 启动子转录的核心信号通路之一是 PKC 蛋白，丝氨酸-苏氨酸激酶家族成员之一，在 CD4 T 细胞中响应 TCR 刺激被活化^[42,43]。

转录因子 NF- κ B, NFAT, 和 AP-1 是 PKC 信号通路的下游底物，HIV 启动子序列上具有很多这些因子的结合位点。在基本状态下，HIV 启动子序列 NF- κ B 的结合位点被非活性的 NF- κ B 同源二聚体，P50/P50 占据，而活性的 NF- κ B 异源二聚体，P65/P50 则存在细胞质中^[44]。在 PKC 激活下，P65/P50 进入细胞核将 P50/P50 置换下来。同样的，NFAT 也被 PKC 活化，进入细胞核与 HIV 启动子序列结合^[45]。不仅如此，活性态 NF- κ B 和 NFAT 还能募集乙酰化转移酶，如 P300/CBP 等，将组蛋白尾巴乙酰化，从而使 HIV 长末端序列的染色体结构疏松^[46,47]。

不同种类的 PKC 激活剂，如佛波酯，甘油二酯和巨大戟二萜醇等，都能激活细胞模型和从患者身上提取的原代细胞中潜伏期的 HIV。但是，由于 PKC 参与宿主细胞中的很多信号通路，因此这些分子能促进细胞增殖和激活免疫系统。佛波酯 Prostratin 和大环内脂 bryostatin-1 能有效的激活 HIV 转录，但对宿主细胞的激活效应较少^[48-51]。有趣的是，在静息态的 CD4 T 细胞中，Prostratin 可以上调 P-TEFb 的表达量^[52]，而且很多 Prostratin 的类似物可以将 HIV 的转录激活 100 倍，同时也能轻微的增加 CD4 T 细胞表面标记物的表达量^[53]。PKC 激活剂巨大戟二萜醇的衍生物 Ing-B，也能激活来自于 HIV 患者细胞和潜伏期 HIV 原代细胞模型中的病毒转录^[54,55]。采用大规模筛选，发现 AV6 是一种很有发展前景的抗潜伏

分子，它可以通过激活 NFAT 介导的转录机制来激活潜伏期 HIV。

1.4.2 JNK 信号通路

在 JNK 的级联反应中，c-Jun N-terminal kinase(JNK)的磷酸化激活癌基因 c-Jun，组成二聚体，进而形成 AP-1 转录因子。HIV 基因组中存在大量的 AP-1 结合位点，包括在 5'长末端重复序列和 pol 基因的编码区^[56]。有趣的是，双突变扫描筛选表明 AP-1 的结合位点是调控 HIV 转录的关键部位，因为将这些位点删除，会增强潜伏期 HIV 感染的概率，即使在 NF- κ B 信号通路处于活化状态时也能阻断 HIV 的转录^[57,58]。

触发 TLR 信号能够激活 JNK 通路介导的 HIV 的转录。Pam3CSK4，一种 TLR-1/2 的激活剂，促进 NF- κ B 和 AP-1 进入细胞核，而且的不影响 T 细胞活化和增殖的情况下激活 HIV 转录^[59]。Farnesyl 转移酶，另一种可以通过 JNK 信号通路激活 HIV 转录的小分子，已经在不同的感染潜伏期 HIV 的细胞中进行高通量扫描^[60,61]。

1.4.3 Wnt 信号通路

Wnt 配体与其受体结合之后，将细胞质 β -catenin 含量维持在低水平 β -catenin 破坏复合物失活^[62]。因此，细胞质中 β -catenin 含量上升，进入细胞核与 LEF1 结合，进而激活 Wnt 调控的基因。HIV 长末端序列含有多个 LEF1 的结合位点，以 Wnt 信号通路的下游效应分子和 LEF1 为核心成员的 TCF/LEF 转录因子很早之前就发现能与 HIV 长末端序列结合^[63]。最近的研究表明采用体内配体和小分子抑制剂激活 Wnt 信号通路可以激活 HIV 转录和蛋白合成。而且采用 siRNA 敲除 β -catenin 破坏复合物中的 AXIN1，可以激活 HIV 转录，这些表明 LEF1/ β -catenin/Wnt 信号通路在正向调控 HIV 转录^[64]。与之相反，有些研究表明在星型胶质细胞中，LEF1/ β -catenin/Wnt 信号通路抑制 HIV 转录^[65-69]。另外，小分子 Wnt 信号通路激活剂 Lithium 处理周边血单核细胞也能抑制活性态 HIV 复制^[70]。

1.4.4 AKT 信号通路

Bcl-2 转导的原代 CD4 T 细胞，经 Disulfiram 处理后，通过激活 AKT 信号通路增强 HIV 转录^[71]。Disulfiram 是一种乙醛脱氢酶的抑制剂，通过降低 AKT 信号通路的负性调控因子 PTEN 的活性来治疗慢性酗酒^[72]。

1.4.5 组蛋白去乙酰化酶 (HDACs)

组蛋白乙酰化,或组蛋白乙酰化转移酶将组蛋白尾部加上带正电荷的乙酰基团,令染色体结构变得疏松,便于基因转录。HDACs 将正电荷从组蛋白尾部除去,导致染色体结构变得致密,因此 HIV 转录中起负性调控作用。HIV 启动子结合 HDAC1,HDAC2,HDAC3 和 HDAC4 伴随着 HIV 转录抑制^[73,74]。很多 DNA 结合复合体都能将 HDAC 募集到 HIV 启动子区:如 HDAC1 与 LSF 和 YY-1^[75],或转录因子 c-Myc 和 SP1 等结合被募集到 HIV 长末端重复序列的 Nuc-1 区域^[76]。非活性态的 NF-κB 异源二聚体 p50/p50 也能将 HDAC1 募集到 HIV 长末端重复序列^[77]。最后,Notch 信号通路的下游效应分子 CBF-1 同样能将 HDAC1 转运至 HIV 长末端重复序列。在 Jurkat 细胞中敲除 YY-1 而非 c-Myc,激活 HIV 转录。但是同时敲除 YY-1 和 c-Myc 不足以阻断 HDACs 结合 HIV 长末端重复序列,这表明很多途径参与募集 HDACs 至 HIV 长末端重复序列。

由于 HDACs 对 HIV 转录的抑制作用,因此 HDACs 成为药物激活潜伏期 HIV 的重要靶点。HDAC 抑制剂是用于临床治疗的药物大家族,主要是抑制 HDAC 的活性,促进基因转录。事实上,抑制 HDAC 可以使 Nuc-1 解体,激活 HIV 转录^[78-80]。Valproic acid(VPA),一种 HDAC 抑制剂,Lehrman 等的研究显示,与 c-ART 联合治疗,在初期阶段能极大降低 HIV 病毒数量^[81-83]。目前,Vorinostat, Givinostat, Droxinostat, Panobinostat, Romidepsin 和 Entinostat 在感染潜伏期 HIV 的细胞株和体外感染模型中均能激活 HIV 转录^[84-86]。有意思的是,不同抑制剂在不同细胞株和模型中,对转录的激活程度不一样,这可能是由于不同药物对 HDACs 的抑制效果有差别^[87]。

抑制 HDAC 活性可以激活不同压型的 HIV 转录,而且不会引起大量的 T 细胞活化。因此,抑制 HDACs 激活 HIV 转录的研究工作具有很好前景。但是大量的细胞体内反应需要组蛋白乙酰化,因此为了尽可能降低药物的副作用,如何使用 HDAC 抑制剂还需要进一步的研究。

1.4.6 组蛋白甲基化转移酶 (HMTs)

基因转录的抑制态另一个标记是组蛋白甲基化令核小体结构变得致密。组蛋白 H3K9 和 H3K27 的甲基化标记基因转录被抑制,组蛋白甲基化在很多感染潜伏期 HIV 的细胞株中意味着 HIV 转录水平低^[89]。在感染潜伏期 HIV 和患者体内

感染潜伏期病毒的细胞中,组蛋白甲基化转移酶 G9a 和 SUV39H1 分别催化 H3K9 二甲基化和三甲基化^[89-91]。EZH2, 另一种 HMT, 作为 PRC2 的核心成员, 将 H3K27 三甲基化。EZH2 结合在潜伏期 HIV 的启动子区, 为其他转录抑制复合物如 HDACs, HMTs, DNA 甲基化转移酶提供结合平台。

作为抑制 HIV 转录的重要成员, HMTs 也成为治疗 HIV 药物的关注点。目前, Chaetocin, SUV39H1 的特异性抑制剂和 G9a 的抑制剂 BIX-01294, 在感染潜伏期 HIV 的静息态 CD4 T 记忆细胞中激活病毒^[92,93]。尽管药物治疗的前景很美好, 但由于其细胞毒性和副作用太大, 还有很多工作要做。

1. 4. 7 DNA 甲基化转移酶

在对可能参与调控潜伏期 HIV 的细胞因子的扫描中, Kauder 等发现 CpG 甲基化结合蛋白 MBD2 是转录抑制因子。甲基化酶抑制剂 aza-CdR 可以激活潜伏期 HIV 转录^[94]。虽然在很多感染潜伏期 HIV 的细胞和原代细胞模型中发现 HIV 启动子去的甲基化, 但是从 c-ART 治疗的患者提取的 CD4 T 细胞中 DNA 的甲基化程度比较少^[95]。因此目前, DNA 甲基化和潜伏期 HIV 的关系不是很清楚。

1. 4. 8 ATP 依赖性的染色体重塑复合物 (BAF 和 CHD3)

包括 CHD3 和 MBD2 在内的 ATP 依赖性的染色体重塑复合物抑制 HIV 转录^[96]。SWI/SNF 家族成员 BAF 结合在 HIV 启动子区, 令 Nuc-1 结构致密, 抑制基因转录。

1. 4. 9 BET 家族蛋白

在真核细胞中, RNA 聚合酶 II 停滞是普遍的转录调控机制, P-TEFb 的募集依赖 BET 家族蛋白, 主要是 Brd4^[97,98]。有趣的是, 对 HIV 基因表达而言, Brd4 作为抑制因子, 因为 Brd4 与 Tat 蛋白竞争结合 P-TEFb, 因此阻碍超级转录延伸复合物 SEC 结合 HIV 长末端重复序列^[99]。而且在表达 Tat 蛋白的感染潜伏期 HIV 的细胞中, 抑制 BET 蛋白的活性, 也可以激活病毒转录。因此, BET 蛋白也可以通过 Tat 非依赖性的机制来抑制 HIV 转录。Bohem 等发现, 与 Brd4 一样, 敲除 Brd2, 也可激活潜伏期的 HIV^[100]。Brd2 可能通过与染色体重塑复合物结合, 有助于其他抑制因子结合 HIV 长末端重复序列。

1. 4. 10 HEXIM1

在静息态的 CD4 T 细胞中，低含量的活性 P-TEFb 是 HIV 大量复制的主要障碍。非活性的 P-TEFb 由核心成员 CKD9, CyclinT1 和抑制蛋白 HEXIM1 组成^[101]。在感染潜伏期 HIV 的细胞中，HMBA 能促进 P-TEFb 的活性。但由于 HMBA 生物学活性低^[102]，而且在原代体外模型的效果不佳，没有进行临床试验。

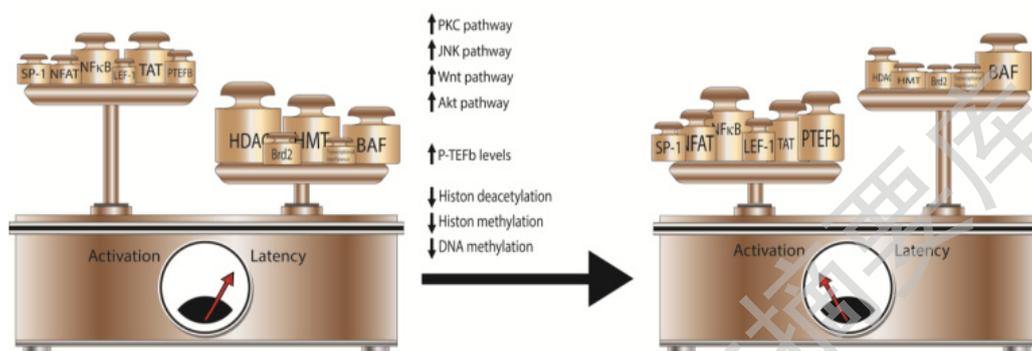


Figure 1. Multiple pathways can be targeted for reverting HIV latency. Silencing of viral transcription results from the concerted activities of LTR-repressive and activating factors and co-factors. The use of combinatorial therapy, targeting multiple pathways involved in the modulation of HIV transcription, will increase the likelihood of reversing the balance from latency to activation.

1.5. 研究意义和内容

调控潜伏期 HIV 转录的信号通路很多，分子机制复杂，多种因子的联合使用可能更有效的激活潜伏期病毒。Fig1 是对调控 HIV 活性转化相关分子及其信号通路的总结。

目前，Prostratin，作为一种激活潜伏期 HIV 的具有广阔前景的药物，尽管 PKC 被证明对 Prostratin 引起的 HIV 转录活化不可或缺，但其激活病毒转录的具体分子机制还不是非常清楚。本文首次发现 Prostratin 刺激下通过 PKC ϵ / PKD3 / NF- κ B 信号途径增强 HIV-1 病毒转录，为艾滋病的治疗及药物筛选提供了理论基础和指导。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.