

Pin1 及其抑制剂的研究进展

张崇敬¹, 张志辉², 徐柏玲^{1*}, 王玉玲²

(1. 中国医学科学院、中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学 制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: Pin1 是一个新的肽脯氨酰异构酶, 特异性地催化蛋白质中磷酸化的 Ser/Thr-Pro 酰胺键的顺反异构, 改变蛋白质的构象, 调控蛋白质的功能。抑制 Pin1 的表达和活性, 可抑制肿瘤细胞的生长。Pin1 抑制剂有望发展成为新作用机制的抗癌药物。本文综述了近年来 Pin1 及其抑制剂研究的最新进展。

关键词: 肽脯氨酰异构酶; Pin1 抑制剂; 肿瘤; 综述

中图分类号: R916 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2008)01-0009-09

Recent advances in the study of Pin1 and its inhibitors

ZHANG Chong-jing¹, ZHANG Zhi-hui², XU Bai-ling^{1*}, WANG Yu-ling²

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Pin1 is a phosphorylation-dependent peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase, which specifically catalyzes the amide bond isomerization of phosphoserine-proline or phosphothreonine-proline in mitotic phosphoproteins. Pin1 induces the conformational changes to control the function of phosphoproteins. Depletion of Pin1 on various human cancer cell lines cause mitotic arrest and apoptosis. Pin1 is an attracting therapeutic target for anticancer and its inhibitors might be potential anticancer drug. In this review, Pin1 inhibitors and the catalytic mechanism, the biological function of Pin1 and its role in oncogenesis are summarized.

Key words: peptidyl-prolyl isomerase; Pin1 inhibitor; neoplasms; review

蛋白质中 Ser-Pro(丝氨酸-脯氨酸)或者 Thr-Pro(苏氨酸-脯氨酸)的磷酸化是一个非常重要的信号传导机制, 它可以调控正常细胞的增殖与分化及肿瘤的生长和转移^[1,2]。Pin1 (Protein interaction with NIMA1) 是一种新的肽脯氨酰异构酶 (PPIases), 通过特异性地催化 pSer-Pro (p = phosphorous, 磷酸化) 或 pThr-Pro 酰胺键的顺反异构, 调控许多细胞周期蛋白的构象, 从而调控细胞的增殖与分化。癌症是细胞增殖与分化失控、细胞快速增殖的结果。大量分子生物学研究以及 Pin1 抑制剂的研究表明, Pin1

有可能成为一个新的比较理想的抗癌药物靶标。

本文从 Pin1 的结构与催化机制、Pin1 的生物功能、Pin1 与肿瘤的关系及已发现的 Pin1 抑制剂几方面进行综述。

1 Pin1 的结构与催化机制

Pin1 是 1996 年发现的肽脯氨酰异构酶, 由 163 个氨基酸构成, 含有两个结构域, 一个是 N 端的 WW 域 (由 1~39 氨基酸构成), 参与 Pin1 与底物的识别, 使得 Pin1 特异性地与含有 pSer/Thr-Pro 肽段的蛋白质结合; 另一个是 C 端的催化结构域 (PPIase domain, 由 45~163 氨基酸构成), 特异性地异构化 pSer/Thr-Pro 酰胺键, 诱导蛋白质的构象变化^[3]。

图 1 是 Pin1 与底物 Ala-*cis*-Pro 的结合模式^[4]。在 Pin1 的催化域, Leu122、Met130 和 Phe134 形成

收稿日期: 2007-07-27.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (30500634).

* 通讯作者 Tel: 86-10-63166764, Fax: 86-10-63166764, E-mail: xubl@imm.ac.cn

疏水腔, Ala-Pro 二肽的吡咯环结合于此疏水区域。Lys63、Arg68 和 Arg69 的碱性侧链聚集, 形成了一个静电和氢键位点结合腔, Ala 的侧链接近这一结合腔, 并有一个硫酸根离子镶嵌于此腔中, 与 Lys63 和 Arg68 形成氢键, 这为 Pin1 特异性地旋转 pSer/Thr-Pro 酰胺键提供了结构基础, 也提示在 Pin1 抑制剂中, 能够模拟磷酸化的丝氨酸的酸性基团(如: $-PO_4H_2$, $-COOH$, $-PhOH$)有助于结合力的提高。

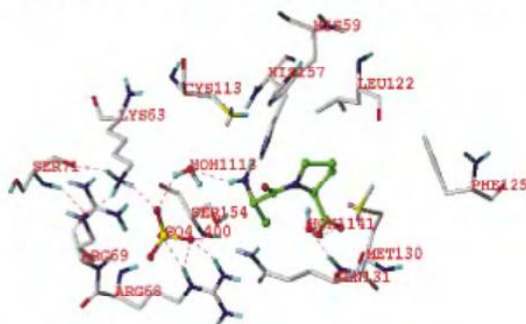


图1 Pin1 与 Ala-cis-Pro 的结合方式

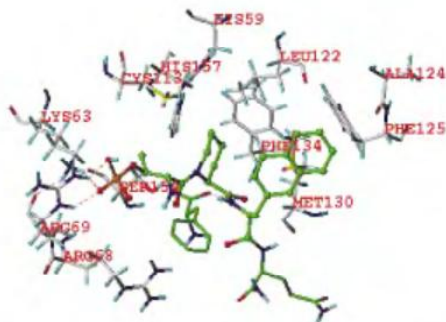


图2 Pin1 与 D-peptide 的结合方式

Zhang 等^[5]最近报道了 D-peptide (Ac-Phe-D-pThr-Pip-Nal) 与 Pin1 复合物的晶体结构(图2), 进一步证实了 Pin1 催化底物的特异性。D-pThr 位于碱性结合腔中, PO_4^{2-} 与 Lys63 和 Arg69 发生静电相互作用。Pip(2-哌啶羧酸)位于由 Leu122、Met130 和 Phe134 组成的疏水腔中, 与 Ala-Pro 二肽复合物中 Pro 环处于同一区域, 但由于哌啶环比吡咯环具有较大的疏水体积, 增加了疏水相互作用。非天然芳香氨基酸 Nal[β -(2-萘基)丙氨酸]位于 Leu122、Ala124、Phe125 和 Met130 组成的疏水腔中, 进一步增加了 D-peptide 与 Pin1 的结合力, 也证明了芳香疏水基团连接于 pSer/Thr-Pro 的 C-端, 更有利于提高与 Pin1 的结合能力。连接于 pSer/Thr-Pro N-端的氨基酸处于无规则状态, 提示这一区域有较大的

灵活性, 可用于改造化合物的药代动力学性质。

此外, Pin1 与 Ala-cis-Pro 复合物的晶体结构为 Pin1 可能的催化机制提供了结构基础^[4]。在晶体结构中, 可以明显看到, Ala-Pro 的酰胺键被 Cys113, His59, His157 和 Ser154 的侧链所包围, 这提示 Pin1 可能是经共价结合的催化机制异构化酰胺键。如图3所示, 半胱氨酸 Cys113 的巯基在 His59 的作用下去质子化, 形成的硫负离子亲核进攻肽-脯酰胺键, 形成四面体中间体。这一中间体被质子化的 His157 通过静电作用稳定。在四面体中, C-N 键旋转, 导致构型改变。

从上述催化机制中可以看出, 共价键的形成涉及 Cys113、His59 的去质子化和 His157 的质子化, 提示 pH 值的变化对 Pin1 的催化活性可能有较大的影响。实验证明 Pin1 的活性对 pH 值呈现出倒钟状的曲线^[4]。在 pH 5.6 时, 活性最高; 在 pH 7.5 时, 活性显著降低。研究表明, 当 Pin1 的 Cys113 突变为 Ala 或者 Ser 时, Pin1 的催化活性分别降低 123 倍和 20 倍^[4]; Pin1 的突变体 G155A-H157A-I159A 在体外对底物 succinyl-AlaAlaProPhe-(p)-nitroanilide 没有催化活性^[3]。上述实验表明, Cys113 和 His157 在共价催化机制中起关键作用, 与 Pin1 晶体复合物预示的催化机制一致。

2 Pin1 的生物功能

对蛋白质结构数据库中约 1% 的 Ser-Pro 和 Thr-Pro 进行分析, 预测 pSer-Pro 和 pThr-Pro 以顺式构象存在的比例大约占总量的 10% ~ 20%^[6]。Pin1 能特异性地催化 pSer/Thr-Pro 酰胺键的旋转, 从而改变磷酸化蛋白质的构象, 影响蛋白质的生理功能。如: 蛋白的催化活性、磷酸化状况、蛋白-蛋白相互作用、亚细胞定位和蛋白的稳定性等^[2]。许多调控细胞增殖与分化的蛋白质(如: NIMA、Cdc25、Cyclin D1)和转录因子(如: c-Jun、 β -catenin、p53、NF- κ B)中均含有 Ser-Pro/Thr-Pro 肽段^[7], 被脯氨酸激酶(如: CDKs、MAPKs、JNKs 和 GSK-3)催化磷酸化, 产生了 Pin1 特异性的结合位点(pSer/Thr-Pro), Pin1 能够诱导其靶蛋白构象改变, 调控靶蛋白功能。因此, 在细胞的增殖与分化过程中, Pin1 发挥着构象转换开关的作用, 调控与有丝分裂相关的多种蛋白质的构象, 从而调节细胞的增殖与分化, 保证细胞周期的正常进行。

3 Pin1 在肿瘤发生和发展中的作用

Pin1 在多数肿瘤细胞中, 包括最常见的宫颈癌、前列腺癌、脑瘤、肺癌、乳腺癌、肝癌以及黑色素

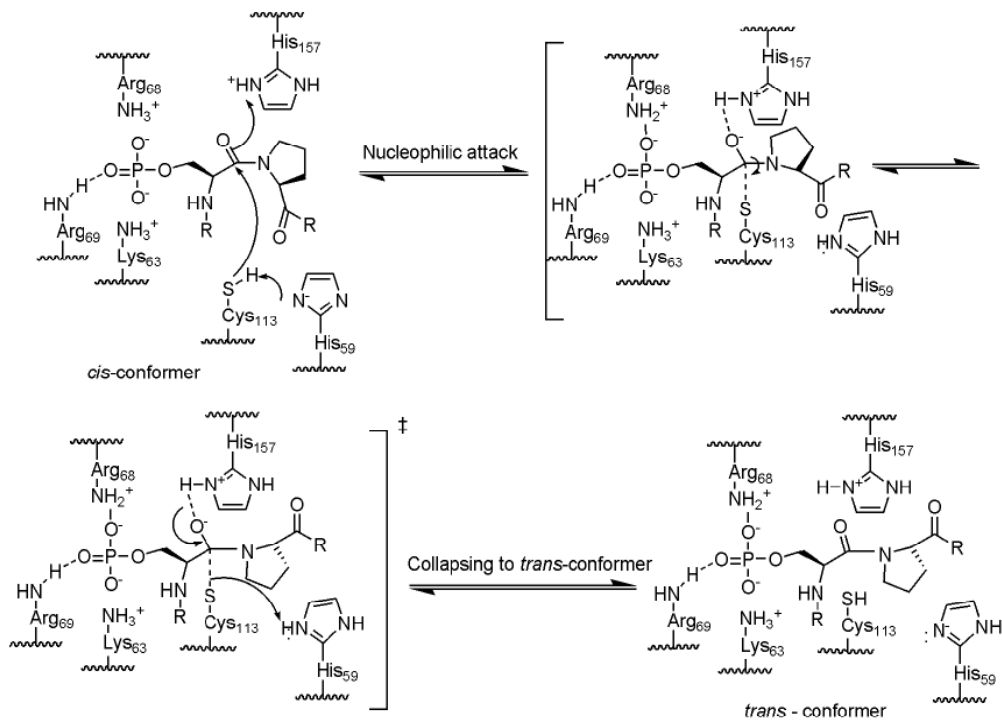


图3 Pin1 的作用机制

瘤,均呈过度表达,Pin1 的过度表达是肿瘤发生和发展的一个重要标志^[8]。分子生物学研究表明,Pin1 的过度表达与其他癌信号传导途径的基因和蛋白密切相关。如图4所示,Pin1 可通过多个信号传导途径,如 Ras/Neu 和 Wnt- β -catenin 信号传导通路,上调细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 的表达^[9]。Cyclin D1 在许多肿瘤的发生和发展中,起着非常关键的作用^[10,11]。Pin1 作为重要的细胞增殖与分化的调控蛋白,整合了多个癌信号传导途径,并接受各

个信号途径传来的致癌信息并放大,它在致癌信号传导通路中发挥着不可缺少的翻译和放大作用。因此,Pin1 抑制剂有望可以同时抑制癌发生发展过程中的多个信号传导通路,发挥抗癌作用。

4 Pin1 抑制剂的研究进展

尽管采用反义核苷酸^[12]、RNA 干扰^[13,14]、基因敲除^[15,16]策略,成功地抑制了 Pin1 的表达,但是特异的高活性的 Pin1 抑制剂的研究还处于起步阶段。按照结构类型的不同,Pin1 抑制剂可分为拟肽类抑

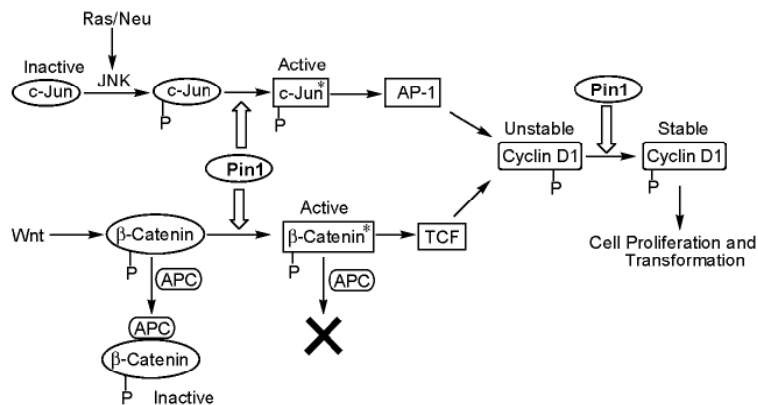


图4 Pin1 调控的致癌信号传导通路

制剂和小分子抑制剂。

4.1 拟肽类抑制剂

Pin1 拟肽抑制剂主要是采用了基于底物的药物分子设计策略,采用非天然氨基酸替代天然氨基酸和酰胺键的生物电子等排策略,得到以下拟肽抑制剂。

4.1.1 非天然氨基酸替代天然氨基酸

采用非天然氨基酸替代天然氨基酸,避免了化合物被各种酶降解,增加化合物的稳定性,是设计拟肽类似物非常成功而且重要的策略。如图 5 所示, Zhang 等^[17]经优化得到 Pin1 的结合底物为 Ac-Ala-Ser(PO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np(1, $k_{cat}/k_m = 9\ 500\ \text{mM}^{-1}\ \text{s}^{-1}$)。用 *D*-Ser 替代底物 1 中的 *L*-Ser,成功地将底物转化为 Pin1 抑制剂 2, IC₅₀ 值为 1.0 μmol · L⁻¹,这也证明 Pin1 的顺反异构催化作用是立体专一性的。为了避免抑制剂 2 被评价体系中的胰蛋白酶降解,将化合物 2 中的 Arg 替换为 Leu,得到化合

物 3,对 Pin1 的抑制活性(IC₅₀) 仍为 1.0 μmol · L⁻¹。化合物 3 是 Pin1 的可逆性抑制剂,具有较好的选择性,在浓度为 20 μmol · L⁻¹时,对肽脯氨酰异构酶家族的 Cyp18 和 FKBP12 均无抑制活性。

Bayer 等^[18]通过组合合成天然活性化合物 Pepticcinnamin E 的拟肽类似物,寻找诱导细胞凋亡的化合物时,意外地发现化合物 4~6(图 5)为 Pin1 抑制剂,其 IC₅₀ 在微摩尔水平。构效关系研究发现,三肽片段 *D*-Tyr-*L*-Tyr-Nal/*N*-Me(Phe) 是诱导活性的关键结构。这类拟肽抑制剂不含有磷酸基等负性基团,只含弱酸性的酚羟基,更易于穿过细胞膜,是 Pin1 抑制剂的新型先导化合物。

最近, Wildemann 等^[19]基于 Pin1 底物,设计合成了含非天然氨基酸的五肽库,经筛选发现了抑制活性为纳摩尔水平的抑制剂 7($K_i = 183\ \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (图 6)。构效关系研究表明,芳香疏水性非天然氨基酸 Bth [β -(3-苯并噻吩基)丙氨酸]和 Nal 替换底

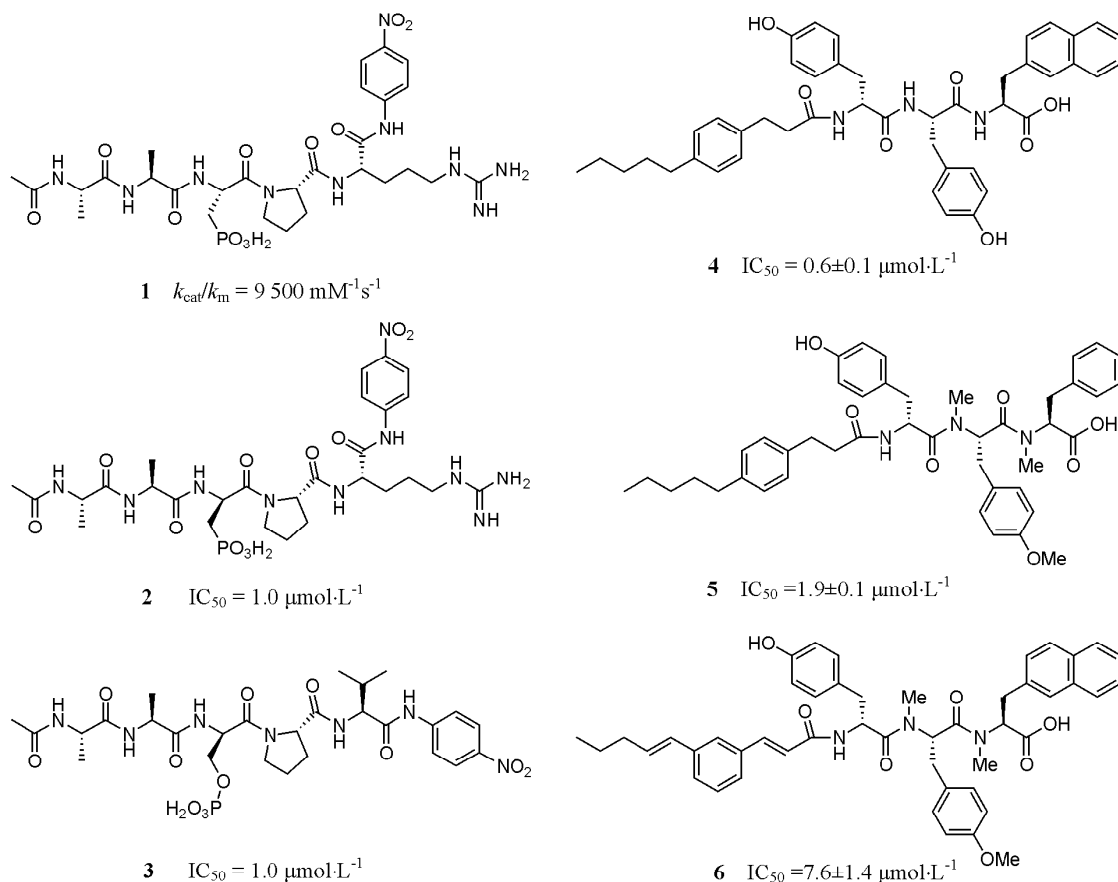


图 5 用非天然氨基酸代替天然氨基酸的拟肽类抑制剂

物中天然的芳香氨基酸 Phe 和 Trp,有利于结合力的提高。以吡咯环替换化合物 7 中的哌啶环,抑制活性降低 100 倍,推测不仅是由于 Pip(2-哌啶羧酸)增加了与 Pin1 的疏水作用,也可能是在诱导化合物的活性构象中,Pip 发挥着非常关键的作用。无磷酸基的 Thr 嵌入到分子中,化合物几乎丧失了活性,进一步证明了 Pin1 催化活性的磷酸依赖性。当 *D*-Thr 替代化合物 7 中的 *L*-Thr,得到活性显著提高的化合物 8(图 6), K_i 值为 $1.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,可见构型对活性的影响是非常显著的。化合物 8 是迄今为止发现的抑制活性最强的化合物。

为了提高化合物 8 的透膜能力,将化合物 8 中的 Biotin 片段(由于酶水平活性评价方法需要而引入)除去,合成了化合物 9(*D*-peptide)(图 6), K_i 值为 $18.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,*D*-peptide 为选择性 Pin1 可逆性抑制剂。*D*-peptide 与 Pin1 的结合方式前已述及,与构效分析结果一致,为设计新结构类型的抑制剂提供了结构基础。

4.1.2 酰胺键的生物电子等排体

设计拟肽类抑制剂的另一个重要策略是根据生物电子等排原理,采用生物电子等排体替代酰胺键。基于这一原则得到的拟肽类抑制剂如下:

4.1.2.1 用 C=S 替换 C=O 将底物 1 中 Ser-Pro 的 C=O 替换为 C=S,得到了抑制活性与化合物 2

和化合物 3 相当的抑制剂 10, IC_{50} 为 $(4.0 \pm 0.5) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [17]。

4.1.2.2 用 C=C 替换酰胺键 采用 C=C 双键替换 pSer-Pro 的酰胺键,本文作者参与合成了构象锁定的拟肽类化合物 11 和 12(图 7),(*Z*)-式双键模拟酰胺键的 *cis*-异构体,(*E*)-式双键模拟酰胺键的 *trans*-异构体 [20]。用 C=C 双键替换酰胺键,增加了化合物的稳定性和类药性,对研究 Pin1 的作用机制提供了探针。根据 Yaffe 等 [21] 报道的 Pin1 最佳结合底物(WFYpSPR-pNA, $K_{\text{cat}}/K_m = 20 \text{ 160 mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$),采用 Phe 替换底物中 *N*-端的芳香氨基酸,通过固相合成方法得到了化合物 11 和 12。化合物 11($K_i = 1.74 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的抑制活性是化合物 12($K_i = 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 21 倍,说明 Pin1 更易与顺式构象的底物结合。化合物 11 能够抑制卵巢癌细胞 A2780 的增殖, IC_{50} 值为 $8.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,进一步证明 Pin1 是一个潜在的抗癌靶点。

4.1.2.3 用酮酰胺替换酰胺键 Felicia [22] 报道在 pSer-Pro 酰胺键中插入酮羰基,得到 Pin1 过渡态抑制剂 13(图 7)。13 的结构中,R 为芳香疏水性基团,模拟 Pin1 底物 *N*-端的芳香疏水性氨基酸;R' 为含有胍基、氮杂环的长链胺类化合物,模拟底物 *C*-端的精氨酸。带有负电荷的磷酸基不易穿过细胞膜,采用前药策略,将化合物中的磷酸基用 bis(POM)

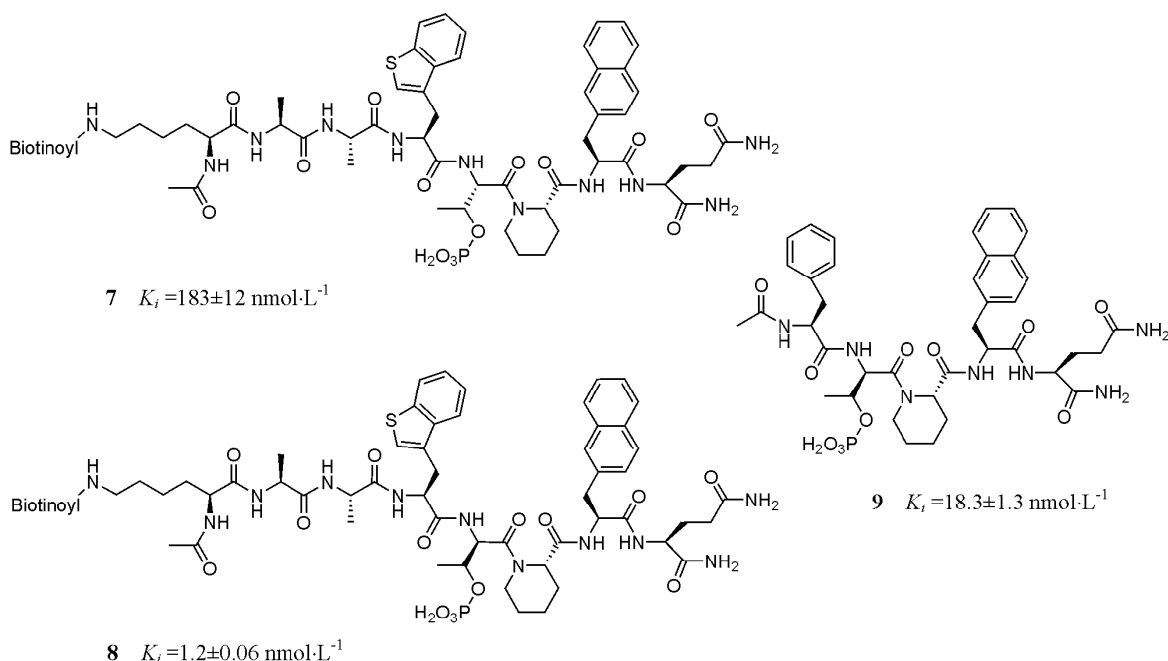


图 6 抑制剂 7~9 的结构式

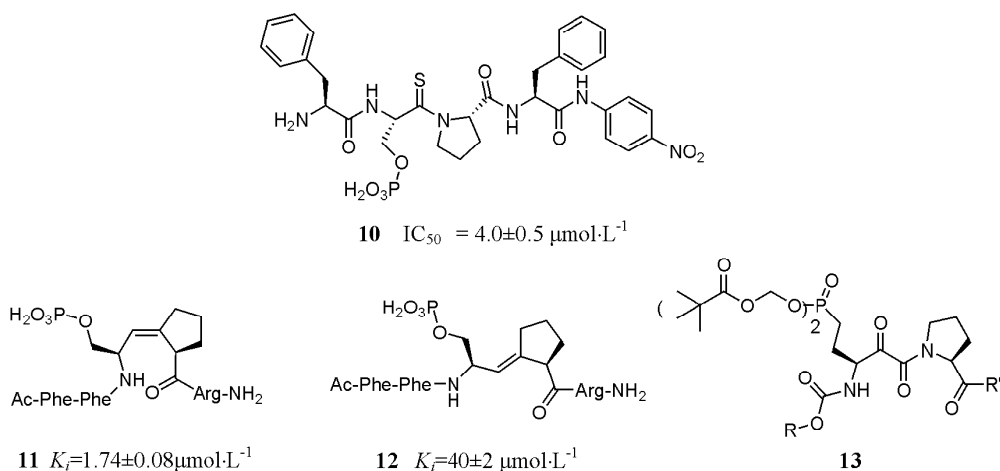


图7 酰胺键的生物电子等排体抑制剂

保护, bis(POM) 易于被体内酯酶水解, 释放出活性化合物。但文献中没有报道此类化合物的有效抑制浓度。

从以上拟肽类抑制剂可以看出, Pin1 拟肽抑制剂具有如下结构特征: (1) 含有磷酸基或者酚羟基等酸性基团; (2) 至少含有三个氨基酸, 芳香疏水性氨基酸位于 pSer-Pro 的 C-端, 有助于活性的提高; (3) 与 Pro 相连的 Ser 或者 Thr 的构型对抑制剂的活性有显著影响, 非天然的 D 构型的抑制剂比天然 L 构型的抑制剂显示更高的活性; (4) pSer-Pro 或 pThr-Pro 肽键的构象对抑制剂的活性也有影

响, 顺式异构体的活性强于反式异构体。

4.2 小分子抑制剂

4.2.1 天然产物类抑制剂

天然产物胡桃醌(Juglone) 14(图8)是通过高通量筛选发现的第一个 Pin1 小分子抑制剂^[23]。胡桃醌是 Pin1 的不可逆抑制剂, Pin1 催化域中 Cys113 游离的 SH 与胡桃醌发生 Michael 加成, 导致结合腔部分打开, 从而抑制了 Pin1 的活性。然而, 胡桃醌对许多酶具有非特异性抑制作用, 如对 RNA 聚合酶 II^[24]、丙酮酸脱羧酶和谷胱甘肽-S-转移酶^[25]均有抑制作用, 因此, 可能产生较大的毒副作用。

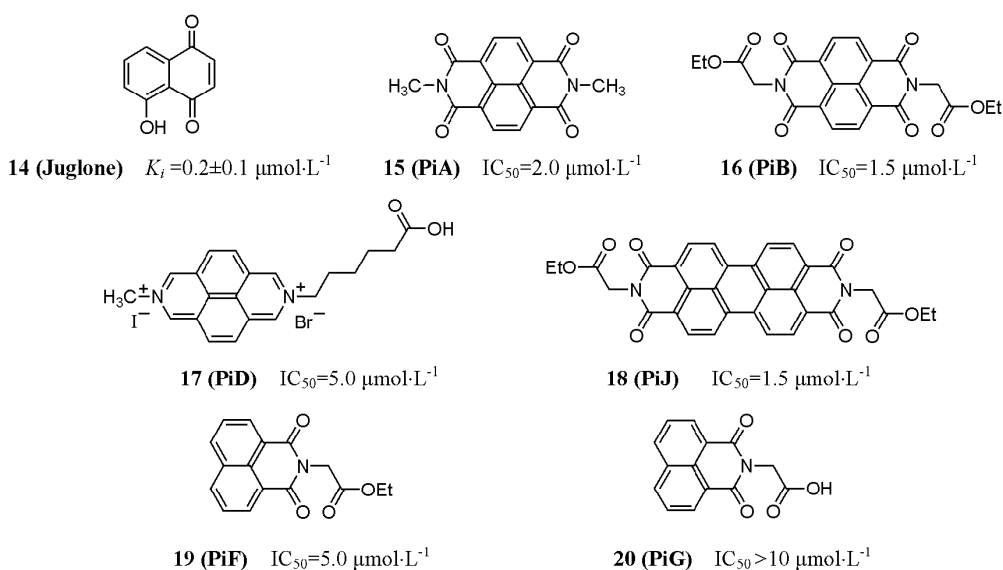


图8 天然产物与稠环类抑制剂

4.2.2 稠环类抑制剂

Uchida 等^[26]通过筛选含有双环结构的合成小分子化合物库,发现了一系列对 Pin1 抑制活性在微摩尔水平的稠环化合物(15~20)(图8)。其中 PiB 和 PiJ 的抑制活性最强,IC₅₀值均为 1.5 μmol·L⁻¹。分子对接显示,PiA 和 PiJ 可与 Pin1 催化域中与底物识别密切相关的氨基酸残基发生相互作用。化合物中的稠芳环与 Pin1 结合腔的疏水性残基作用,对结合力贡献显著,此外,PiA 和 PiJ 中的氧原子可与 Pin1 底物结合腔中的 Arg68 和 Arg69 发生氢键作用,意味着这类化合物可能是 Pin1 的竞争性抑制剂。化合物 PiA 和 PiJ 能够抑制 Pin1 过表达的肿瘤细胞(如:HSC2、HCT116 和 SKOV3)生长,IC₅₀值在微摩尔水平,并且 Pin1 高表达的肿瘤细胞对化合物

的抑制作用更敏感。

4.2.3 芳基茛基酮类抑制剂

Baum 等^[27]基于 Pin1 的过渡态,设计合成了一种新型的芳基茛基酮类 Pin1 可逆性抑制剂 21~23(图9)。其中化合物 21 和 22 对 Pin1 的抑制活性 K_i 值分别为 5.1 μmol·L⁻¹和 3.1 μmol·L⁻¹。引入硝基,显著提高了化合物的抑制活性,化合物 23 的抑制活性是化合物 22 的 15 倍。

4.2.4 其他抑制剂

近年来,一些制药公司也开始了 Pin1 抑制剂的研究(图10),其中 Pintex 制药公司报道了噻唑二酮类 24^[28]、N-取代苯基吡咯类 25^[29]、二苯基硫醚类 26^[30]、硫代嘧啶酮类 27^[31]、N-苯基吡唑酮类 28^[32] Pin1 抑制剂,但未见活性数据报道。Jerini 公司发

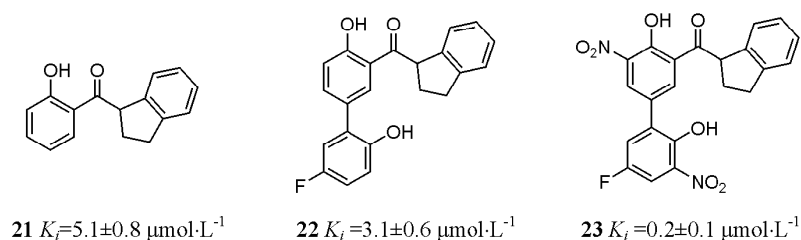


图9 芳基茛基酮类抑制剂

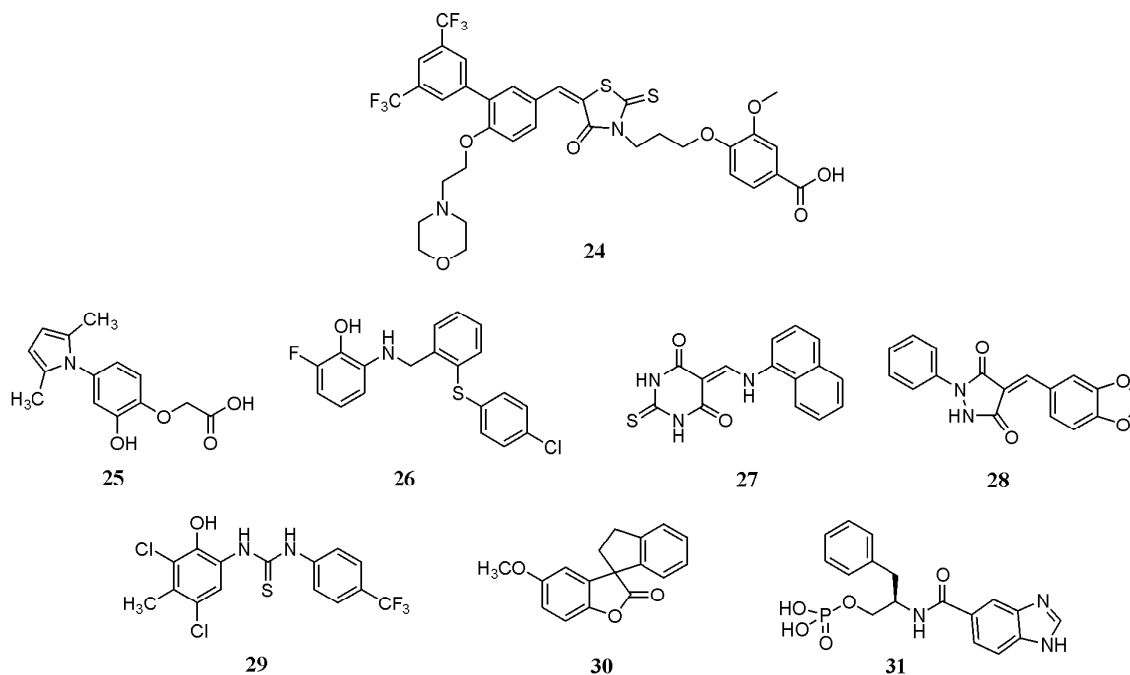


图10 其他类型抑制剂

现,硫代脲类化合物对 Pin1 有抑制作用^[30],其中化合物 **29** 对 Pin1 的 IC_{50} 值小于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,且对胰蛋白酶和组织蛋白酶 B 表现出选择性 ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。细胞毒评价结果显示,化合物 **29** 对肿瘤细胞 HL-60、HeLa、PC-3、Caco-2 和 MCF-7 的生长具有抑制作用, ED_{50} 值小于 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Max-Planck-Gesellschaft 公司高通量筛选发现螺环酮或酸类化合物对 Pin1 有抑制作用^[33],其中化合物 **30** 的 K_i 值为 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,在浓度为 $0.1 \sim 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能够抑制 HeLa 细胞的增殖。辉瑞制药公司设计合成了 2-氨基丙基磷酸类 Pin1 抑制剂^[34],这类抑制剂以 *D*-型苯丙氨酸还原得到的氨基醇为结构骨架,羟基酯化引入磷酸基后,再经 *N*-酰化反应,引入多种芳香疏水性基团,其中代表性化合物 **31** 对 Pin1 的 K_d 和 K_i 值均小于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

由此可见,Pin1 小分子抑制剂主要由两部分构成,即芳香疏水性片段和酸性基团(如羧基、磷酸基或酚羟基),这与 Pin1 结合腔含有疏水性区域和碱性区域是一致的。

结论

Pin1 作为一种新的作用机制的细胞周期调控蛋白,有可能成为一个新的比较理想的抗癌靶标。Pin1 具有如下特征:(1) Pin1 具有高度的底物选择性,特异识别含有 pSer/Thr-Pro 的蛋白质;(2) Pin1 与底物的结合腔形状和结合位点明确,为基于结构设计高选择性、高活性 Pin1 抑制剂提供了结构基础^[4,7,21,35,36];(3) Pin1 抑制剂可能同时抑制癌发生发展过程中的多个信号传导通路,从而克服癌细胞的遗传可塑性特征^[15,37~40];(4) Pin1 敲除小鼠不仅可以正常发育,而且对转基因引起的致癌性有很高的抵制能力^[15,16],提示 Pin1 抑制剂可能具有小的非特异性毒性。但 Pin1 抑制剂的研究还处于起步阶段,尤其是 Pin1 小分子抑制剂的研究。特异性 Pin1 小分子抑制剂不仅是分子生物学研究的重要工具,也是研制新型抗癌药物的新途径。本课题组开展了 Pin1 小分子抑制剂的设计与合成工作,发现了对 Pin1 高表达肿瘤细胞 MCF-7 的抑制活性在微摩尔水平的苗头化合物,进一步的优化合成及活性评价正在进行中。

References

- [1] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling [J]. *Nature*, 2001,411:355-365.
- [2] Lu KP, Liou YC, Zhou XZ. Pinning down the prolinedirected phosphorylation signaling [J]. *Trends Cell Biol*, 2002,12:164-172.
- [3] Lu KP, Hanes SD, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis [J]. *Nature*, 1996,380:544-547.
- [4] Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, et al. Structural and functional analysis of the mitotic rotamase pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent [J]. *Cell*, 1997,89:875-886.
- [5] Zhang Y, Daum S, Wildemann D. Structural basis for high-affinity peptide inhibition of human Pin1 [J]. *ACS Chem Biol*, 2007,2:320-328.
- [6] Zhou XZ, Kops O, Werner A, et al. Pin-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of cdc25c and tau proteins [J]. *Mol Cell*, 2000,6:873-883.
- [7] Shen M, Stukenberg PT, Kirschner MW, et al. The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins [J]. *Genes Dev*, 1998,12:706-720.
- [8] Bao L, Kimzey A, Sauter G, et al. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers [J]. *Am J Pathol*, 2004,164:1727-1737.
- [9] Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2003,4:175-180.
- [10] Wulf G, Ryo A, Liou YC, et al. The prolyl isomerase Pin1 in breast development and cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2003,5:76-82.
- [11] Kuramochi J, Arai T, Ikeda S, et al. High Pin1 expression is associated with tumor progression in colorectal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2006,94:155-160.
- [12] Rippmann JF, Hobbie S, Daiber C, et al. Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis [J]. *Cell Growth Differ*, 2000,11:409-416.
- [13] Pang RW, Lee TK, Man K, et al. Pin1 expression contributes to hepatic carcinogenesis [J]. *J Pathol*, 2006,210:19-25.
- [14] Ryo A, Uemura H, Ishiguro H, et al. Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11:7523-7531.
- [15] Liou YC, Ryo R, Huang HK, et al. Loss of Pin1 function in the mouse resembles the cyclin D1-null phenotypes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99:1335-1340.
- [16] Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, et al. Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell

- cycle from G (0) arrest [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999,265:658 – 663.
- [17] Zhang YX, Füssel S, Reimer U, et al. Substrate-based design of reversible Pin1 inhibitors [J]. *Biochemistry*, 2002,41:11868 – 11877.
- [18] Bayer E, Thutewohl M, Christner C. Identification of hPin1 inhibitors that induce apoptosis in a mammalian Ras transformed cell line [J]. *Chem Commun*, 2005,4: 516 – 518.
- [19] Wildemann D, Erdmann F, Alvarez BH, et al. Nanomolar inhibitors of the peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase Pin1 from combinatorial peptide libraries [J]. *J Med Chem*, 2006,49:2147 – 2150.
- [20] Wang XJ, Xu BL, Mullins AB, et al. Conformationally locked isostere of phosphoserine-*cis*-pro inhibits Pin1 23-fold better than phosphoserine-*trans*-pro isostere [J]. *J Am Chem Soc*, 2004,126:15533 – 15542.
- [21] Yaffe MB, Schutkowski M, Shen M, et al. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism [J]. *Science*, 1997,278:1957 – 1960.
- [22] Felicia E, Blackburg VA. Transition-state inhibitors of Pin1, alpha-ketoamide-containing peptidomimetics, and synthesis thereof: US, 20070027076 [P]. 2007-02-01.
- [23] Henning L, Christner C, Kipping M. Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone [J]. *Biochemistry*, 1998,37:5953 – 5960.
- [24] Chao SH, Greenleaf AL, Price DH. Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription [J]. *Nucl Acids Res*, 2001,29:767 – 773.
- [25] Webb JL. *Enzyme and Metabolic Inhibitors* [M]. New York: Academic Press, 1963:1996.
- [26] Uchida T, Takamiya M, Takahashi M, et al. Pin1 and par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation [J]. *Chem Biol*, 2003,10:15 – 24.
- [27] Daum S, Erdmann F, Fischer G. Aryl indanyl ketones: efficient inhibitors of the human peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006,45:7454 – 7458.
- [28] Tibbitts T, McKeen TD, Suto RK, et al. Pin1-modulating compounds and methods of use thereof: WO, 2004028535 [P]. 2004-04-08.
- [29] Suto RK, McKeen TD. Pin1-modulating compounds and methods of use thereof: WO, 2003073999 [P]. 2003-09-12.
- [30] Stragies R, Tradler T, Hummel G, et al. New compounds for the inhibition of rotamases use thereof: WO, 2004026815 [P]. 2004-04-01.
- [31] Suto RK, Sowadski J, McKeen, TD. Pin1-modulating compounds and methods of use thereof: WO, 2003074497 [P]. 2003-09-12.
- [32] Suto RK, McKeen TD. Pin1-modulating compounds and methods of use thereof: WO, 2003074550 [P]. 2003-09-12.
- [33] Braun M, Hessamian-Alinejad A, Fliri H, et al. Novel spiro ketone and carboxylic acid derivatives as specific inhibitors for (PO₃H₂) Ser/(PO₃H₂) Thr-Pro-specific peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerases: WO, 2003093258 [P]. 2003-11-13.
- [34] Dagostino EF, Margosiak SA, Dong L, et al. Phosphate/sulfate ester compounds and pharmaceutical compositions for inhibiting protein interacting NIMA (PIN1): WO, 2004087720 [P]. 2004-10-14.
- [35] Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, et al. A function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules [J]. *Science*, 1999,283:1325 – 1328.
- [36] Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, et al. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains [J]. *Nat Struct Biol*, 2000,7:639 – 643.
- [37] Ryo A, Nakamura N, Wulf G, et al. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC [J]. *Nat Cell Biol*, 2001,3:793 – 801.
- [38] Ryo A, Liou YC, Wulf G, et al. Pin1 is an E2F target gene essential for the Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2002,22: 5281 – 5295.
- [39] Ryo A, Liou YC, Lu KP, et al. Prolyl isomerase Pin1, a catalyst for oncogenesis and a potential anticancer target [J]. *J Cell Sci*, 2003,116:773 – 783.
- [40] Wulf GM, Liou YC, Ryo A, et al. Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2002,277:47976 – 47979.