

БИОИНФОРМАТИКА И НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.322.5:543.25

©Андреанов, Анищенко

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1 ПОДТИПА А КАК ОСНОВА ДЛЯ РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА ЭФФЕКТИВНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.М. Андреанов^{1}, И.В. Анищенко²*

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
ул. Ак. Купревича 5/2, Минск, 220141 Республика Беларусь; тел.: +37517-264-82-63;
факс: +37517-224-12-14; эл. почта: andrianov@iboch.bas-net.by

²Объединённый институт проблем информатики Национальной академии наук
Беларуси, Республика Беларусь, 220012 Минск, ул. Сурганова 6;
эл. почта: anishchenko.ivan@gmail.com

Методами молекулярного докинга построена модель структурного комплекса одного из представителей семейства иммунофилинов – циклофилина В, с петлей V3 ВИЧ-1 подтипа А – участком белка gp120 вируса, формирующим его основную антигенную детерминанту, а также детерминанты, ответственные за клеточный тропизм и образование синцития. Исходя из конформационных и энергетических характеристик комплекса, осуществлен компьютерный дизайн полипептида, способного к эффективной блокаде функционально значимых участков петли V3 ВИЧ-1. На основе совместного анализа полученных результатов и данных литературы высказано предположение о том, что сконструированная молекула представляет перспективную фармакологическую субстанцию антивирусного действия и может быть использована в качестве базовой структуры для реализации белково-инженерных проектов, ориентированных на создание эффективных лекарственных препаратов для терапии СПИДа.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека типа 1, белок gp120, петля V3, циклофилин В, компьютерное моделирование, молекулярный докинг, лекарственные препараты.

ВВЕДЕНИЕ. Специфические взаимодействия ВИЧ-1 с первичным рецептором вируса CD4 и с хемокиновыми корецепторами CCR5 и/или CXCR4 осуществляются через петли V1-V5 белка gp120, которые характеризуются высокой вариабельностью аминокислотного состава в разных подтипах вируса [1]. В настоящее время особое внимание исследователей, занимающихся разработкой противовирусных препаратов, сконцентрировано на петле V3 ВИЧ-1 [2]. Этот интерес обусловлен тем, что указанный сегмент белка gp120 образует не только основную мишень для нейтрализующих антител (основную антигенную детерминанту), но и отвечает за выбор корецептора, определяющего предпочтительность вируса в отношении Т-клеток лимфоидного ряда или первичных макрофагов (см., например, обзор [1]). Поскольку домен V3 ВИЧ-1 управляет процессом клеточного тропизма, одно из стратегических направлений в работах по созданию новых лекарственных препаратов для терапии СПИДа основывается на подходе, предусматривающем поиск химических веществ, способных к эффективной блокаде этого функционально значимого сегмента вируса [2]. Анализ данных литературы позволяет высказать предположение о том, что в качестве исходной субстанции для реализации поиска таких терапевтических агентов могут быть использованы иммунофилины – белки, проявляющие высокое сродство с петлей V3 белка gp120 ВИЧ-1 [3].

* - адресат для переписки

Иммунофилины, широко известные как рецепторы циклоспорина А, рапамицина и FK506, относятся к классу пептидил-пролил-*цис/транс*-изомераз и подразделяются на две большие группы молекул (циклофилины и белки, связывающие FK506), значительно различающихся по аминокислотной последовательности и третичной структуре [4]. В настоящее время установлено, что большинство иммунофилинов выполняет функцию шаперонов, осуществляющих сворачивание белков и контроль качества их пространственной укладки [4]. На сегодняшний день в базе Международного банка белков [5] представлена информация о трехмерных структурах более ста молекул, принадлежащих семейству иммунофилинов, однако сведения о структуре комплексов, формируемых ими с петлей V3 ВИЧ-1, в указанном информационном источнике отсутствуют. Поскольку V3-домен белка gp120 формирует один из главных “рабочих инструментов” вируса и является высоко-аффинным лигандом для рассматриваемого класса пептидил-пролил-*цис/транс*-изомераз [3], получение данных о структуре таких надмолекулярных ансамблей является важной задачей, решение которой может заложить основу для информационного обеспечения белково-инженерных проектов, использующих “V3-мишень” для разработки фармакологических субстанций антивирусного действия [2].

Настоящая статья продолжает исследования, начатые нами в работах [6, 7], где в результате анализа специфических взаимодействий, реализующихся в структурных комплексах двух представителей иммунофилинов – белка, связывающего FK-506 (FK506 binding protein; FKBP), и циклофилина А (CycA), с петлей V3, смоделированы молекулы, которые, согласно, данным компьютерных экспериментов, могут выступать в роли потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1 подтипа В, циркулирующего преимущественно в Северной Америке и Западной Европе [8].

Цель работы - построение модели структурного комплекса петли V3 ВИЧ-1 подтипа А, доминирующего в Восточной Европе [8], с еще одним белком из семейства иммунофилинов – циклофилином В, и определение его фрагмента, образующего участок связывания, синтетическая копия которого, при условии сохранения пространственной структуры пептида в свободном состоянии, может рассматриваться как перспективный кандидат на роль противовирусного препарата.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Осуществлён молекулярный докинг трехмерной структуры петли V3 ВИЧ-1 подтипа А с конформацией циклофилина В, установленной методом рентгеноструктурного анализа, и выполнена энергетическая оптимизация геометрических параметров сформированного структурного комплекса.

2. Рассчитана матрица межатомных расстояний для аминокислотных остатков молекул, входящих в состав структурного комплекса “рецептор/лиганд”, проанализированы типы взаимодействий, ответственных за его стабилизацию, и установлен сегмент циклофилина В, на долю которого приходится основная часть результативных контактов с петлей V3.

3. Предсказана трехмерная структура этого сегмента в свободной форме, проведено её сопоставление с расшифрованной методом рентгеновской кристаллографии структурой идентичного участка, встроенного в белковую цепь циклофилина В, и рассчитана молекулярно-динамическая траектория сконструированного иммунофилин-пептида.

4. Исследованы энергетические составляющие функции потенциальной энергии структурного комплекса, построенного методом молекулярного докинга петли V3 с CysВ-пептидом гипотетической молекулой, первичная структура которой воспроизводит сегмент циклофилина В, определяющий эффективность взаимодействий интактного белка с V3-доменом ВИЧ-1.

На основе полученных результатов установлена аминокислотная последовательность молекулы, которая, согласно структурным данным, может быть использована как базовое химическое соединение в работах по дизайну эффективных лекарственных препаратов для терапии СПИДа.

МЕТОДИКА. Молекулярный докинг петли V3 ВИЧ-1 подтипа *A*, трёхмерная структура которой приведена в работе [9], с циклофилином *B* (файл 1CYN Международного банка белков [5]), а также с СусВ-пептидом реализовали с помощью компьютерной программы Nex 4.5 [10], позволяющей проводить “жесткий” докинг белков с лигандами. Определение участка связывания лиганда осуществляли путем полного сканирования поверхности рецептора, и в результате расчетов в каждом из рассматриваемых случаев отбирали лучшую структуру комплекса согласно критериям, используемым в программе Nex 4.5 [10]. Энергетическую оптимизацию геометрических параметров построенных структурных комплексов проводили в пакете GROMACS [11] (<http://www.gromacs.org/>) путем минимизации потенциальной энергии методом сопряженных градиентов с последующим имитационным отжигом в вакууме (время отжига – 100 пс; начальная и конечная температуры составляли соответственно 500 и 0 К).

При расчёте пространственной структуры СусВ-пептида в качестве начального приближения использовали “рентгеновскую” структуру соответствующего фрагмента циклофилина *B* в кристалле, геометрические параметры которой оптимизировали методами минимизации энергии и имитационного отжига, реализованными в программе TINKER [12]. Полученную таким образом структуру рассматривали в последующих расчётах как статическую модель СусВ-пептида в свободном состоянии. Молекулярно-динамические (МД) расчеты СусВ-пептида проводили в пакете GROMACS [11] с использованием силового поля GROMOS96 (набор параметров 53A6). Перед проведением МД расчетов исходную структуру СусВ-пептида, полученную на первом шаге моделирования, подвергали процедуре минимизации энергии методом градиентного спуска. МД расчеты выполняли при температуре 310 К во временном интервале 20 нс с шагом 1 фс при фиксированном давлении и числе атомов. Интегрирование уравнений движения Ньютона осуществляли с помощью алгоритма “leap-frog”, а для контроля температуры задействовали слабую схему сопряжения с термостатом (<http://www.gromacs.org/>) с характерным временем 0,1 пс.

МД расчеты осуществляли в параллельном режиме на компьютерном кластере СКИФ К-1000 с использованием 64 процессоров (16 узлов) [13].

Геометрические и энергетические характеристики расчетных структур, а также типы взаимодействий, реализующихся в построенных структурных комплексах, анализировали с привлечением программного пакета GROMACS [11].

Для отнесения аминокислотных остатков к различным типам вторичных структур рассматривали интервалы величин углов ϕ , ψ , приведенные в работе [14]. При идентификации типов β - и γ -изгибов применяли классификацию Хатчинсона и Торнтон [15].

Сравнение структур проводили с привлечением величин среднеквадратичных отклонений координат атомов (cRMSD) и двугранных углов (aRMSD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 1 изображен структурный комплекс петли V3 ВИЧ-1 с циклофилином *B*, построенный с помощью молекулярного докинга их трехмерных структур и последующей оптимизации его геометрических параметров. Исследование функции, описывающей энергетическую поверхность комплекса, показывает, что связывание V3-домена с СусВ инициирует образование стабильной надмолекулярной структуры, характеризующейся величиной потенциальной энергии, равной -6434 ккал/моль. Анализ матрицы межатомных контактов, реализующихся в расчетном комплексе, позволяет идентифицировать аминокислотные остатки петли V3 и циклофилина *B*, участвующие в эффективных межмолекулярных взаимодействиях, суммарная энергия которых составляет -75 ккал/моль. Так, согласно полученным данным, остатки Ser-11, Val-12, Gly-15, Pro-16, Gly-17, Gln-18, Ala-19, Thr-23 и Arg-31 петли располагаются вблизи поверхности иммунофилина, формирующего участок

связывания рецептора, ответственный за связывание с V3-доменом, путём использования таких аминокислот, как Gly-1, Pro-2, Lys-3, Gly-28, Lys-29, Thr-30, Lys-91, Lys-93 и Glu-178. Следует отметить, что кооперирование CysB с петлей V3 приводит к появлению солевого мостика между остатками Arg-31 петли V3 и Glu-178 иммунофилина и шести водородных связей, в образовании которых со стороны рецептора задействованы Lys-91, Lys-93 и Glu-178, а со стороны лиганда – Ser-11, Val-12, Gln-18, Ala-19 и Thr-23 (см. табл. 1). Из приведённых результатов следует, что взаимодействие V3-домена с CysB сопровождается блокадой его центральной области, представляющей иммуногенную корону белка gp120 [16], в то время как остатки N- и С-концевых сегментов петли (за исключением Arg-31), относящихся к ее “стволовой” части [16], не вступают в непосредственный контакт с рецептором. Данный факт согласуется с результатами [3], согласно которым высокое сродство с иммунофилинами проявляет не только интактная петля V3 ВИЧ-1, но и её пептиды, содержащие главный иммуногенный участок вируса. Среди сегментов петли V3, эффективно взаимодействующих с CysB, необходимо выделить трипептид Gly-15-Pro-16-Gly-17, образующий иммуногенную “верхушку” белка gp120 и встречающийся практически во всех известных аминокислотных последовательностях основной антигенной детерминанты вируса [17]. Функциональная роль этого инвариантного участка V3-домена до сих пор полностью не выяснена, однако установлено [18], что одиночная замена его центрального остатка на аланин оказывает заметное влияние не только на иммуногенность ВИЧ-1, но и на его инфективность, что свидетельствует о важной роли Pro-16 в жизненном цикле вируса. Согласно расчетным данным, трехмерная структура рассматриваемого фрагмента петли V3 практически идентична структуре сближенного с ним в пространстве участка Gly-1-Pro-2-Lys-3 циклофилина В: значение cRMSD, вычисленное для атомов их основной цепи, составляет 0,7 Å. Близкое сходство в пространственной организации двух сегментов, входящих в состав лиганда и рецептора, позволяет высказать следующее предположение: N-концевой фрагмент Gly-1-Pro-2-Lys-3 циклофилина В формирует “сигнальную” структуру, “узнаваемую” иммуногенной “верхушкой” Gly-15-Pro-16-Gly-17 петли V3.

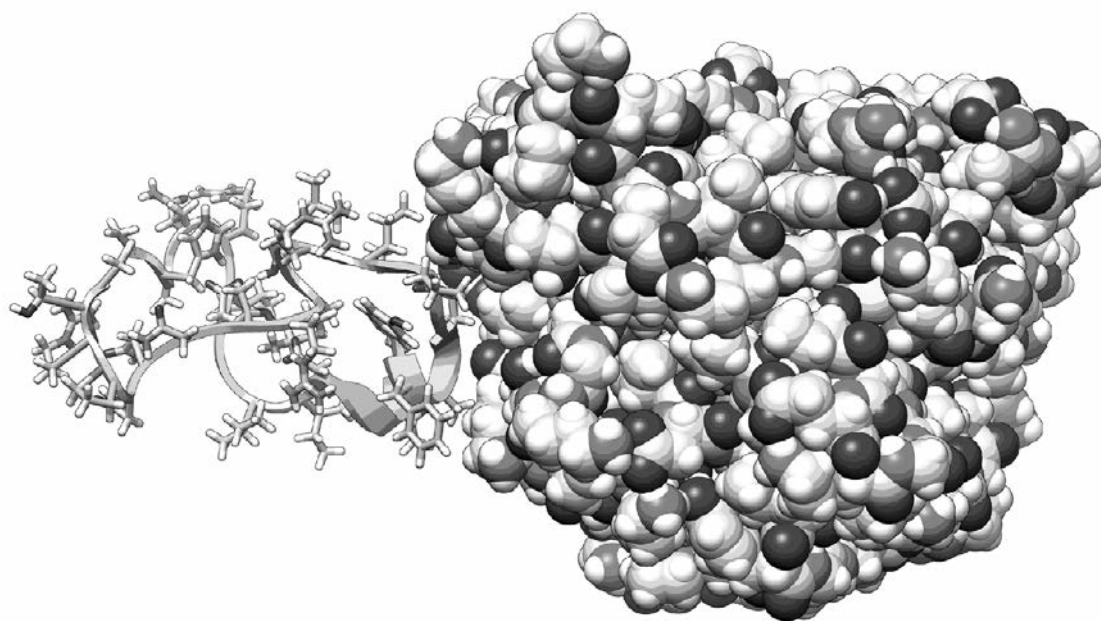


Рисунок 1.

Структурный комплекс циклофилина В (шаровая модель)
с петлей V3 ВИЧ-1 подтипа А (трубчатая модель).

Таблица 1. Геометрические параметры межмолекулярных водородных связей в структурном комплексе петли V3 подтипа А ВИЧ-1 с циклофилином В.

Остаток (донор)	Группа (донор)	Остаток (акцептор)	Группа (акцептор)	Расстояние (Å) Донор... Акцептор	Расстояние (Å) Водород... Акцептор
Lys-93 ²	NH	Gln-18 ¹	OE1	2,7	1,7
Lys-93 ²	NZ	Thr-23 ¹	OG1	2,8	1,8
Ser-11 ¹	OG	Glu-178 ²	OE2	2,7	1,7
Gln-18 ¹	NH	Lys-91 ²	CO	2,8	1,9
Gln-18 ¹	NE2	Glu-178 ²	OE2	2,8	1,9
Ala-19 ¹	NH	Lys-91 ²	CO	3,0	2,0

Примечание: с помощью верхних индексов 1 и 2 обозначены аминокислотные остатки петли V3 и циклофилина В соответственно.

Таким образом, результаты молекулярного докинга свидетельствуют о наличии энергетически благоприятных контактов между циклофилином В и петлёй V3 ВИЧ-1, реализация которых сопровождается блокадой ряда ключевых аминокислотных остатков иммуногенной “короны” белка gp120. В связи с этим возникает предположение о возможном использовании иммунофилинов и, в частности, циклофилина В, в качестве альтернативы индуцированным к петле V3 антителам, широко используемым в традиционных подходах для нейтрализации ВИЧ-инфекции. Однако результаты [19], свидетельствующие о том, что увеличение концентрации иммунофилинов в плазме инфицированной крови не оказывает заметного влияния на инфективность вируса, опровергают данное предположение. По-видимому, одной из основных причин недостаточной нейтрализующей активности иммунофилинов является то, что их специфическое связывание с петлёй V3 ВИЧ-1 реализуется путём взаимодействий с её центральной областью и не затрагивает N- и C-концевые сегменты V3-домена, в пределах которых локализована большая часть аминокислотных остатков, вовлечённых в процесс клеточного тропизма [1, 2]. Поэтому, для того чтобы усилить блокаду петли V3 и сохранить её способность к специфическим взаимодействиям с циклофилином В, мы предприняли попытку сконструировать и апробировать в роли потенциальной фармакологической субстанции виртуальную молекулу, названную СусВ-пептидом и имитирующую его N-концевой сегмент 1-30. Выбор сегмента 1-30 иммунофилина для проведения дальнейших исследований обусловлен тем, что, согласно расчетным данным, он содержит трипептид Gly-1-Pro-2-Lys-3, узнаваемый иммуногенной “верхушкой” вируса, и включает значительную долю аминокислотных остатков, образующих участок связывания рецептора. Такая постановка задачи правомерна в случае, если пространственная структура этого сегмента циклофилина В не подвергается существенным изменениям в свободном состоянии его полипептидной цепи. С целью проверки этого условия, мы провели компьютерное моделирование трехмерной структуры СусВ-пептида и сравнили её со рентгеновской структурой соответствующего участка циклофилина В, установленной методом рентгеноструктурного анализа. Анализ рисунка 2, на котором показано изображение совмещённых структур полипептида в свободном и встроенном в белковую цепь состояниях, позволяет сделать вывод об их подобии. Это визуальное впечатление подтверждает величина cRMSD между координатами атомов основной, равной 2,4 Å. Сравнивая

структуры, приведенные на рисунке 2, отметим, что практически их полное совпадение (значение cRMSD составляет 0,5 Å) наблюдается на сегменте Gly-1-Pro-2-Lys-3, который, как предположено выше, образует в циклофиллине *B* “сигнальную” конформацию, обеспечивающую специфичность его взаимодействий с петлей V3 ВИЧ-1. Аналогичный вывод о подобии структур можно сделать в результате их сопоставления в геометрическом пространстве углов внутреннего вращения: значение aRMSD, вычисленное для углов ϕ , ψ всех аминокислотных остатков пептида, составляет 43°.

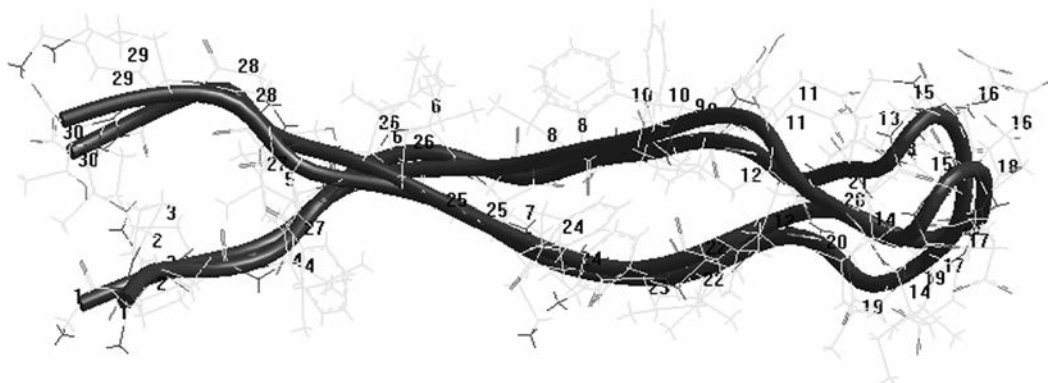


Рисунок 2.

Трёхмерная структура СусВ-пептида, совмещённая с конформацией сегмента 1-30 циклофилина *B*, установленной методом рентгеноструктурного анализа.

Анализ статической модели пространственной структуры СусВ-пептида, представленной на рисунке 3а, показывает, что важный вклад в её энергетическую стабилизацию вносят донорно-акцепторные взаимодействия, реализующиеся между аминокислотами, удалёнными вдоль полипептидной цепи. При этом сконструированная с помощью компьютерных средств молекула представляет собой вытянутую “конструкцию” со сближенными N- и C-концевыми остатками, образующими водородную связь между кислородом карбоксильной группы Gly-1 и протоном гидроксильной группы боковой цепи Thr-30. Центральная область 10-22 СусВ-пептида формирует β -лист (рис. 3б), в котором тетрапептидный сегмент Ile-14-Gly-15-Asp-16-Glu-17 принимает конформацию β -изгиба IV, близкую по форме пространственной укладки к той, что была идентифицирована нами ранее [9] на участке Gly-15-Pro-16-Gly-17-Gln-18 иммуногенной “короны” петли V3 ВИЧ-1 подтипа *A*: величина cRMSD для атомов основной цепи в рассматриваемом случае равна 1,1 Å. Сходство в структурной организации центральных областей петли V3 и СусВ-пептида наблюдается и для их более протяженных фрагментов. Например, сопоставление трёхмерной структуры гексапептида 15-20 петли V3, на долю которого приходится подавляющее число контактов с нейтрализующими антителами (см., например, работу [20]), с конформацией участка 14-19 СусВ-пептида указывает на то, что пространственные формы их основной цепи подобны (соответствующее значение cRMSD составляет 2,0 Å). Данный факт позволяет предположить, что при условии соблюдения принципа “зеркального подобия”, сформулированного нами в работе [6], участок СусВ-пептида, образующий “овальный перешеек” β -листа и локализованный в нативном белке внутри его глобулы, может представлять еще один сайт для специфического связывания с петлей V3, дополнительный к сегменту Gly-1-Pro-2-Lys-3 циклофилина *B*.

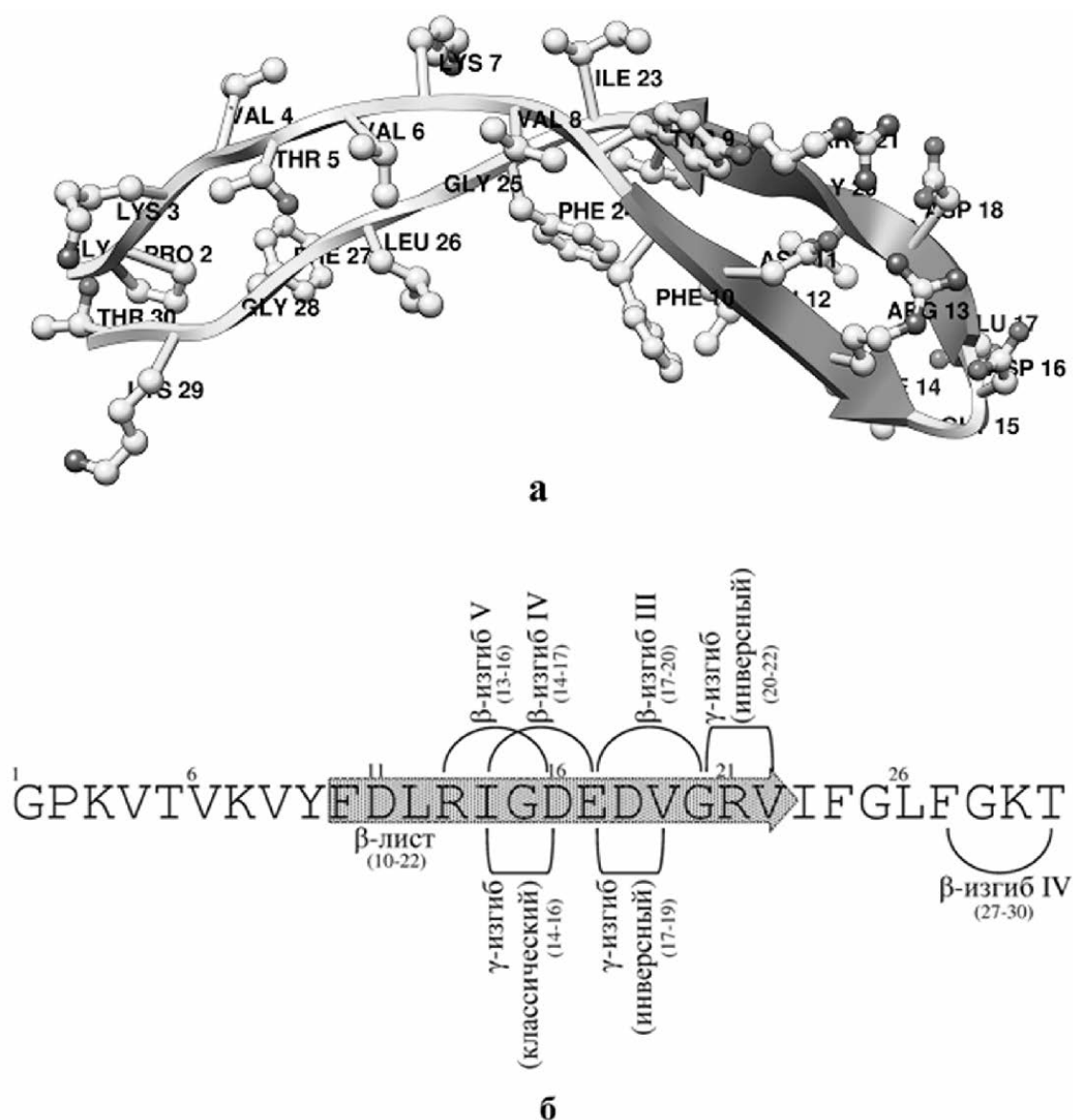


Рисунок 3.

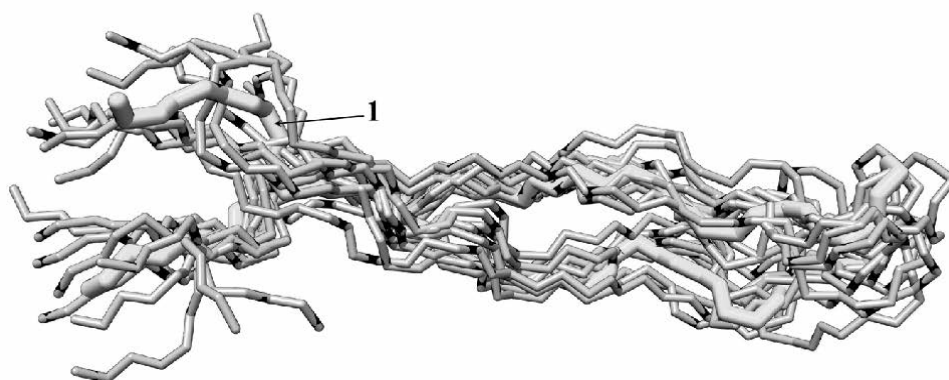
Пространственная (а) и вторичная (б) структуры СусВ-пептида, смоделированного на основе конформации сегмента 1-30 циклофилина В, установленной методом рентгеноструктурного анализа.

Анализируя вторичную структуру сконструированного пептида (рис. 3б), отметим также его С-концевой сегмент 27-30, образующий конформацию β -изгиба, что заслуживает внимания в связи с данными о структуре петли V3 ВИЧ-1 подтипа А [9], согласно которым С-концевой участок 32-35 V3-домена формирует точно такой же структурный мотив. Этот результат, объединённый с данными, приведенными выше, позволяет сделать заключение о подобии вторичных структур петли V3 и СусВ-пептида, реализующихся на их центральных и С-концевых сегментах.

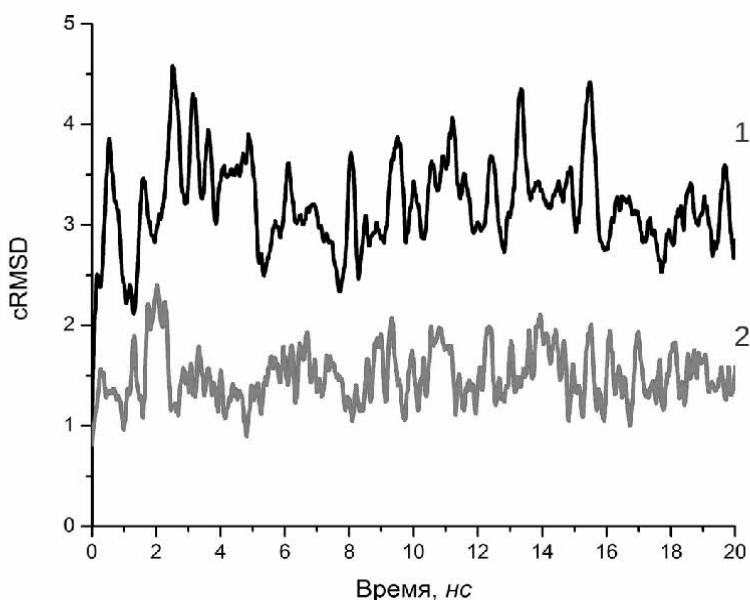
Рассмотрение двугранных углов основной цепи расчетной структуры, приведенной на рисунок 3а, показывает, что, кроме β -изгибов, в её аминокислотной последовательности присутствуют редко встречающиеся в пептидах и белках γ -повороты, центральные остатки которых располагаются в пятнадцатой, восемнадцатой и двадцать первой позициях полипептидной цепи (рис. 3б).

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1А

Данные молекулярно-динамических расчетов, выполненных во временном интервале 20 нс с использованием статической модели трехмерной структуры СусВ-пептида в качестве начального приближения, свидетельствуют об её относительной конформационной жёсткости (рис. 4), а система внутримолекулярных водородных связей, являющаяся одним из важных факторов, стабилизирующих структуру молекулы, не претерпевает существенных изменений за время моделирования. Однако тщательный анализ динамических структур СусВ-пептида показывает, что их отдельные представители сильно отличаются от исходной модели (рис. 4б), что не исключает вероятности его значительных структурных преобразований, вызванных резкими изменениями условий окружающей среды, которые, например, могут иметь место при вступлении в многочисленные межмолекулярные взаимодействия.



а



б

Рисунок 4.

(а) Отобранные с шагом 2 нс структуры молекулярно-динамической траектории СусВ-пептида, совмещённые с исходной статической конформацией молекулы, обозначенной на рисунке цифрой 1;

(б) Графики временных зависимостей cRMSDs, вычисленных в результате совмещения динамических структур СусВ-пептида (1) и его N-концевого сегмента Gly-Pro-Lys (2) с соответствующими стартовыми моделями. Средние значения cRMSD для СусВ-пептида и его N-концевого сегмента Gly-Pro-Lys составляют 3,1 и 1,5 Å соответственно.

Консервация СусВ-пептидом геометрических параметров, наблюдаемых на идентичном сегменте циклофилина В, и его конформационная прочность создают структурные предпосылки к сохранению им высокого сродства с петлей V3 ВИЧ-1, характерного для интактных иммунофилинов [3]. Действительно, изучение функции потенциальной энергии структурного комплекса СусВ-пептида с петлей V3 (рис. 5) показывает, что по сравнению с нативным белком, иммунофилин-пептид более эффективно взаимодействует с V3-доменом ВИЧ-1, вступая в многочисленные контакты с его участками, содержащими функционально значимые аминокислоты gp120. Так, энергия межмолекулярных взаимодействий, которая в первом случае составляет -75 ккал/моль (см. выше), в рассматриваемом структурном комплексе снижается до -350 ккал/моль. При этом стабилизирующий эффект достигается в значительной степени благодаря донорно-акцепторным взаимодействиям (см. табл. 2), а также солевому мостику, реализующемуся между остатками Arg-13 петли V3 и Asp-18 СусВ-пептида. Анализируя систему водородных связей, описание которой приведено в таблице 2, отметим, что со стороны петли V3 в её образовании задействованы биологически важные аминокислоты белка gp120 – Lys-10, Arg-13, Gly-17, Asp-18, Asp-25, Asp-29, Ile-30 и Arg-31, оказавшиеся заблокированными в результате возникновения надмолекулярной структуры. В приведенном списке аминокислотных остатков выделим Asp-25, активно участвующий в связывании вируса с поверхностью клеточной мембраны [1] и отвечающий за фенотип ВИЧ-1 [20], а также Asp-29, который стабилизирует структуру петли V3 и влияет на интенсивность взаимодействий CD-4-активированного белка gp120 с корецептором CCR5 [21]. Формирование комплекса СусВ-пептида с петлей V3 приводит также к маскировке таких ее функционально критических остатков, как Ser-11, Ala-19, Ile-23, Gly-24 и Gln-32, которые, наряду с Arg-13, Asp-25 и Asp-29, являются “строительными компонентами”, утилизируемыми вирусом для создания детерминанты, обеспечивающей его внедрение в клетки макрофагов (М-тропизм) и Т-лимфоцитов (Т-тропизм) [1, 2]. При этом в нерабочем состоянии находится Ser-11, который, совместно с остатком в двадцать пятой позиции петли V3, отвечает за выбор корецептора, определяющего предпочтительность вируса в отношении клетки-хозяина [20]: известно, что мутации этих остатков на положительно заряженные аминокислоты, имеющие место на поздних стадиях вирусного иммунопатогенеза, запускают в действие один из триггеров, инициирующих замену β-хемокинового корецептора CCR5 (макрофаги) на α-хемокиновый корецептор CXCR4 (Т-лимфоциты), что вызывает переход к Т-тропному варианту вируса, характеризующемуся появлением синцитиальных образований [1, 2]. В активном центре петли V3, ответственном за связывание с СусВ-пептидом, располагается остаток Asn-6, блокада которого может быть весьма результативной для инактивации вируса. Согласно данным работы [22], эта консервативная аминокислота [17], являющаяся частью структурно инвариантного сегмента 3-7 V3-домена [9], формирует один из потенциальных сайтов N-гликозилирования белка gp120, используемого вирусом для защиты от нейтрализующих антител и усиления инфективности.

При исследовании надмолекулярной структуры, приведенной на рисунке 5, обратим внимание на следующий факт: в этом комплексе, существенно отличающемся от надмолекулярной структуры нативного белка с петлей V3, участок Gly-1-Pro-2-Lys-3 СусВ-пептида сближен в пространстве со структурно жестким сегментом 28-32 V3-домена [9], в то время как соответствующий фрагмент интактного иммунофилина контактирует с иммуногенной “корона” белка gp120 (рис. 1). В связи с этим следует отметить, что иммуногенная “верхушка” петли V3 и её участок 28-32 образуют близкие пространственные укладки остова, относящиеся к β-изгибам полипептидной цепи [9], которые могут использоваться белками для образования структурных комплексов [23-25].

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1А

Вероятно, замена в анализируемых структурных комплексах участков связывания петли V3 с N-концевым сегментом Gly-Pro-Lys СусВ-пептида не влечёт за собой изменения его сигнальной функции, поскольку рассматриваемые сегменты V3-домена формируют, как отмечено выше, один и тот же элемент структуры.

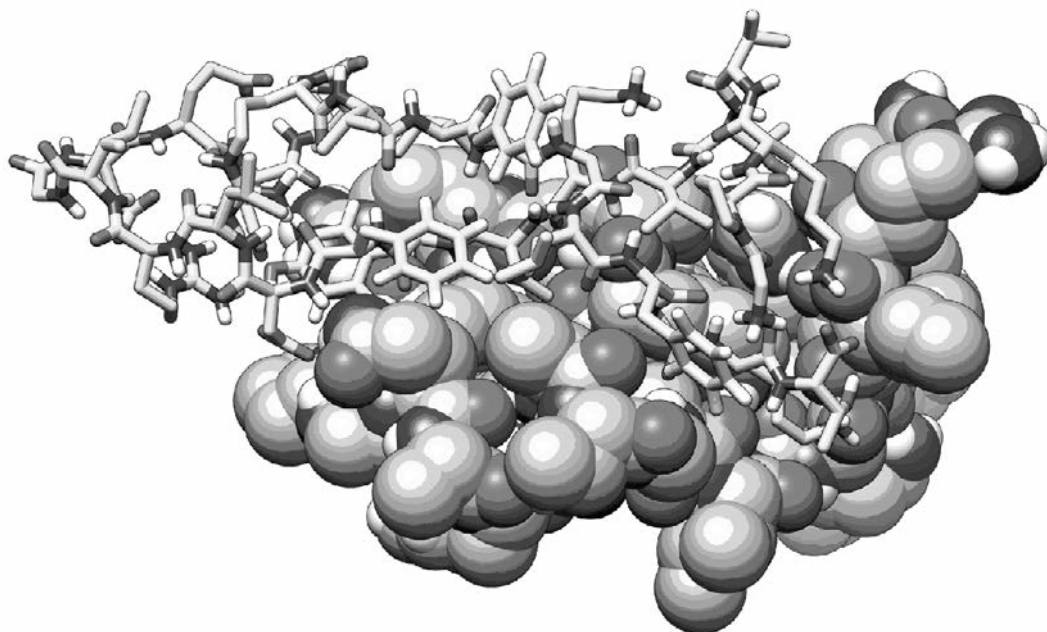


Рисунок 5.
Структурный комплекс петли V3 ВИЧ-1 подтипа А (шаровая модель)
с СусВ-пептидом (трубчатая модель).

Таблица 2. Геометрические параметры межмолекулярных водородных связей в структурном комплексе петли V3 подтипа А ВИЧ-1 с СусВ-пептидом.

Остаток (донор)	Группа (донор)	Остаток (акцептор)	Группа (акцептор)	Расстояние (Å) Донор... Акцептор	Расстояние (Å) Водород... Акцептор
Arg-13 ¹	NH1	Asp-18 ²	OD1	3,0	2,0
Arg-13 ¹	NH2	Asp-18 ²	OD1	3,2	2,3
Arg-13 ¹	NH2	Asp-18 ²	OD2	3,1	2,2
Gly-17 ¹	NH	Asp11 ²	OD1	2,9	1,9
Gln-18 ¹	NE2	Tyr-9 ²	CO	2,8	1,8
Gln-18 ¹	NE2	Asp-11 ²	OD1	2,8	1,8
Asp-25 ¹	NH	Gly-28 ²	CO	2,8	1,8
Lys-3 ²	NZ	Phe-30 ¹	CO	2,8	1,9
Thr-5 ²	OG1	Arg-31 ¹	CO	2,7	1,7
Lys-7 ²	NH	Lys-10 ¹	CO	2,8	1,8
Lys-29 ²	NZ	Asp-29 ¹	CO	2,9	2,0

Примечание: с помощью верхних индексов 1 и 2 обозначены аминокислотные остатки петли V3 и СусВ-пептида соответственно.

Сравнение трёхмерных структур петли V3 и СусВ-пептида в свободном и связанном состоянии показывает, что в обоих рассматриваемых случаях образование комплекса приводит к определенным структурным перестройкам, наблюдаемым для рецептора и лиганда как в пространстве декартовых координат атомов, так и в конформационном пространстве двугранных углов основной цепи. При этом СусВ-пептид подвергается более глубоким преобразованиям: так, если расхождения между структурами петли V3, реализующимися в свободной форме и в надмолекулярном ансамбле, в терминах величин cRMSD и aRMSD составляют 2,0 Å и 47° соответственно, то для СусВ-пептида соответствующие структурные различия определяются значениями, равными 4,0 Å и 57°. Полученные данные свидетельствуют в пользу высказанного выше предположения о том, что СусВ-пептид, несмотря на относительную конформационную жёсткость, способен проявлять гибкость полипептидной цепи в условиях резкого изменения окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В работах [6, 7] мы осуществили компьютерный дизайн двух молекул (СусА- и FKBP-пептиды) и, проанализировав их структурные комплексы с петлей V3 ВИЧ-1 подтипа А [9], высказали предположение о том, что СусА-пептид способен эффективно связываться с её иммуногенной “короной”, в то время как FKBP-пептид предпочтительнее взаимодействует с N- и C-концевыми участками основной антигенной детерминанты вируса. Результаты, приведенные выше, свидетельствуют о том, что, в отличие от молекул, сконструированных ранее [6, 7], СусВ-пептид способен к маскировке ключевых аминокислот петли V3, расположенных как в центральной области, так и в ее стволовых частях. Кроме того, в результате объединения петли V3 ВИЧ-1 подтипа А с СусВ-пептидом возникает более стабильная надмолекулярная структура: например, для комплекса V3-домена ВИЧ-1 подтипа А с СусА-пептидом, построенного в работе [9], энергия межмолекулярных взаимодействий составляет -87 ккал/моль, а в рассматриваемом случае её значение уменьшается до -350 ккал/моль (см. выше).

В работе [9] нами было показано, что, несмотря на вариабельность аминокислотного состава, сегменты 3-7, 15-20 и 28-32 петли V3, содержащие консервативные аминокислотные остатки белка gp120, сохраняют трехмерную структуру в разных штаммах ВИЧ-1, и, поэтому, могут рассматриваться в качестве перспективных “мишеней” для разработки лекарственных препаратов против вируса СПИДа. Располагая этими данными, а также результатами настоящего исследования, указывающими на эффективную маскировку СусВ-пептидом функционально важных остатков петли V3, входящих в состав инвариантных элементов её структуры, можно ожидать, что синтетическая копия этой виртуальной молекулы (или её структурных аналогов) будет проявлять биологическую активность к различающимся вирионам ВИЧ-1, обладая широким спектром нейтрализующего действия.

Предложенная модель структурного комплекса циклофилина В с петлей V3 ВИЧ-1 подтипа А дает структурное обоснование приведенным в литературе данным о высоком сродстве иммунофилинов к основной антигенной детерминанте вируса [3], а полученные на основе её анализа результаты позволяют сделать оптимистический прогноз относительно перспектив использования их пептидных фрагментов в качестве базовых соединений для дизайна эффективных противовирусных препаратов методами белковой инженерии.

Работа поддержана грантом Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Х08-003), а также грантом Союзного государства России и Беларуси, выполняемого в рамках научной программы СКИФ (шифр “СКИФ-ГРИД”, № задания 4С-Г/07-111).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hartley O., Klasse P.J., Sattentau Q.J., Moore J.P. (2005) *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **21**, 171-189.
2. Sirois S., Sing T., Chou K.-C. (2005) *Curr. Protein and Peptide Sci.*, **6**, 413-422.
3. Endrich M.M., Gehring H. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **252**, 441-446.
4. Barik S. (2006) *Cell. Mol. Life. Sci.*, **63**, 2889-2900.
5. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.
6. Andrianov A.M. (2008) *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **26**, 49-56.
7. Andrianov A.M. (2009) *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **26**, 445-454.
8. Kartikeyan S., Bharmal R.N., Tiwari R.P., Bisen P.S. (2007) *HIV and AIDS: Basic Elements and Priorities*, Springer: Netherlands, p. 428.
9. Andrianov A.M., Anishchenko I.V. (2009) *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **27**, 179-194.
10. Mustard D., Ritchie D.W. (2005) *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, **60**, 269-274.
11. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. (1995) *Comp. Phys. Commun.*, **91**, 43-56.
12. Ren P., Ponder J.W. (2003) *J. Phys. Chem. B*, **107**, 5933-5947.
13. Абрамев С.В., Абрамов С.М., Анищенко В.В., Медведев С.В., Парамонов Н.Н., Чуж О.Р. (2005) Конфигурации суперкомпьютера СКИФ, Объединённый Институт проблем информатики: Минск, с. 195.
14. Smith L.J., Bolin K.A., Schwalbe H., MacArthur M.W., Thornton J.M., Dobson C.M. (1996) *J. Mol. Biol.*, **255**, 494-506.
15. Hutchinson E.G., Thornton J.M. (1996) *Protein Sci.*, **5**, 212-220.
16. Cormier E.G., Dragic T. (2002) *J. Virol.*, **76**, 8953-8957.
17. LaRosa G.J., Davide J.P., Weinhold K., Waterbury J.A., Profy A.T., Lewis J.A., Langlois A.J., Dressman G.R., Boswell R.N., Shadduk P., Holley L.H., Karplus M., Bolognesi D.P., Matthews T.J., Emini E.A., Putney S.D. (1990) *Science*, **249**, 932-935.
18. Ivanoff L.A., Looney D.J., McDanal C., Morris J.F., Wong-Staat F., Lang A.J., Petteway S.R.Jr., Matthews T.J. (1991) *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **7**, 595-603.
19. Minder D., Boni J., Schupbach J., Gering H. (2002) *Arch. Virol.*, **147**, 1531-1542.
20. De Jong J.J., De Ronde A., Keulen W., Tersmette M., Goudsmit J. (1992) *J. Virol.*, **66**, 6777-6780.
21. Hu Q., Napier K.B., Trent J.O., Wang Z., Taylor S., Griffin G.E., Peiper S.C., Shattock R.J. (2005) *J. Mol. Biol.*, **350**, 699-712.
22. Ogert R.A., Lee M.K., Ross W., Buckler-White A., Martin M.A., Cho M.W. (2001) *J. Virol.*, **75**, 5998-6006.
23. Smith J.A., Pease L.J. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **8**, 315-399.
24. Rose G.D., Gierasch L.M., Smith J.A. (1985) *Adv. Prot. Chem.*, **37**, 1-109.
25. Newton A.C. (2001) *Chem. Rev.*, **101**, 2353-2364.

Поступила: 02. 11. 2009.

COMPUTER MODELING OF THE PROMISING INHIBITORS OF THE HIV-1 SUBTYPE A REPLICATION AS A FRAMEWORK FOR THE RATIONAL ANTI-AIDS DRUG DESIGN

A.M. Andrianov¹, I.V. Anishchenko²

¹Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Ac. Kuprevich str., 5/2, Minsk, 220141 Republic of Belarus; tel.: +37517-264-82-63; fax: +37517-224-12-14; e-mail: andrianov@iboch.bas-net.by

²United Institute of Informatics Problems, National Academy of Sciences of Belarus, Surganova str., 6, Minsk, 220012 Republic of Belarus; e-mail: anishchenko.ivan@gmail.com

The model of the structural complex of cyclophilin *B* belonging to the immunophilins family with the HIV-1 subtype A V3 loop presenting the principal neutralizing determinant of the virus gp120 envelope protein as well as determinants of cell tropism and syncytium formation was generated by molecular docking methods. Basing on the conformational and energy characteristics of the built complex, computer-aided design of the polypeptide able to block effectively the functionally crucial V3 segments was implemented. From the joint analysis of the results derived with the data of literature, the generated molecule was suggested to offer a promising pharmacological substance for making a reality of the protein engineering projects aimed at developing the anti-AIDS drugs able to stop the HIV's spread.

Key words: human immunodeficiency virus type 1, protein gp120, V3 loop, cyclophilin *B*, computer modeling, molecular docking, drugs.