

## Исследование влияния консервативной мутации Leu10→Ile на внутримолекулярную подвижность ВИЧ-1 протеазы методом молекулярной динамики

Д. Б. Ковальский, В. М. Дубина, А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*ВИЧ-протеаза является основной мишенью для создания антиретровирусных препаратов. Однако при использовании ингибиторов появляются резистентные штаммы ВИЧ, содержащие мутации в структуре протеазы. При изучении молекулярных механизмов резистентности ВИЧ-1 протеазы к ингибиторам необходимо учитывать вклад отдельных точечных мутаций в суммарный эффект увеличения резистентности. Дистальные мутации (аминокислотные остатки, непосредственно не контактирующие с ингибитором) мало влияют на конформацию ВИЧ-1 протеазы, но могут изменять молекулярную динамику белка. В данной работе изучено влияние дистальной мутации Leu10 → Ile на конформационную подвижность ВИЧ-1 протеазы. Для этого проведено компьютерное моделирование молекулярной динамики мутанта Leu10 → Ile ВИЧ-1 протеазы в течение 10 нс. Результаты расчетов для мутанта Leu10 → Ile сравнены с данными по динамике нативной протеазы. Существенная консолидация среднеквадратичного отклонения  $C_{\alpha}$  атомов мутанта Leu10 → Ile свидетельствует об увеличении стабильности пространственной структуры ВИЧ-1 протеазы в течение изученного временного интервала. Перераспределение среднеквадратичных флуктуаций атомов относительно их позиций, а также изменение направления медленных движений протеазы указывают на влияние данной мутации на динамику ВИЧ-1 протеазы, вызывающее увеличение конформационной жесткости. Обсуждается возможное влияние изменения молекулярной динамики протеазы на устойчивость протеазы к ингибиторам.*

---

**Введение.** ВИЧ-протеаза — ключевой фермент в созревании вируса иммунодефицита человека — является основной молекулярной мишенью для создания новых лекарственных препаратов для терапии СПИДа [1]. Однако эффективность использования ингибиторов ВИЧ-1 протеазы в комплексной терапии ВИЧ/СПИДа ограничена появлением резистентных штаммов вируса, содержащих мутации в ее гене [2, 3]. Мутантные протеазы имеют пониженное сродство к ингибиторам, сохраняя при этом достаточную для репликации вируса энзиматическую активность. Исходя из пространственной структуры ВИЧ-1 протеазы все известные мутации делят на две группы: мутации в активном центре и дистальные, т. е. удаленные от активного центра фермента. Мутации в активном центре обнаружены для аминокислотных остатков, непосредственно

контактирующих с ингибитором, тогда как дистальные — для остатков, не находящихся в прямом контакте с лигандом. Механизм действия дистальных мутаций не очевиден ввиду того, что кристаллографические структуры ВИЧ-1 протеазы, содержащей такие мутации, практически не обнаруживают отличий от пространственной структуры нативной протеазы [3].

Метод моделирования молекулярной динамики (МД) позволяет получить детальные данные о тонких конформационных изменениях в структуре белка [4]. Ранее мы использовали метод МД для исследования влияния pH и концентрации NaCl на структурную стабильность нативной ВИЧ-1 протеазы [5, 6]. В данной работе нами проведено моделирование молекулярной динамики ВИЧ-1 протеазы, содержащей мутацию Leu10 → Ile, и сравнение с динамикой нативной протеазы. Анализ

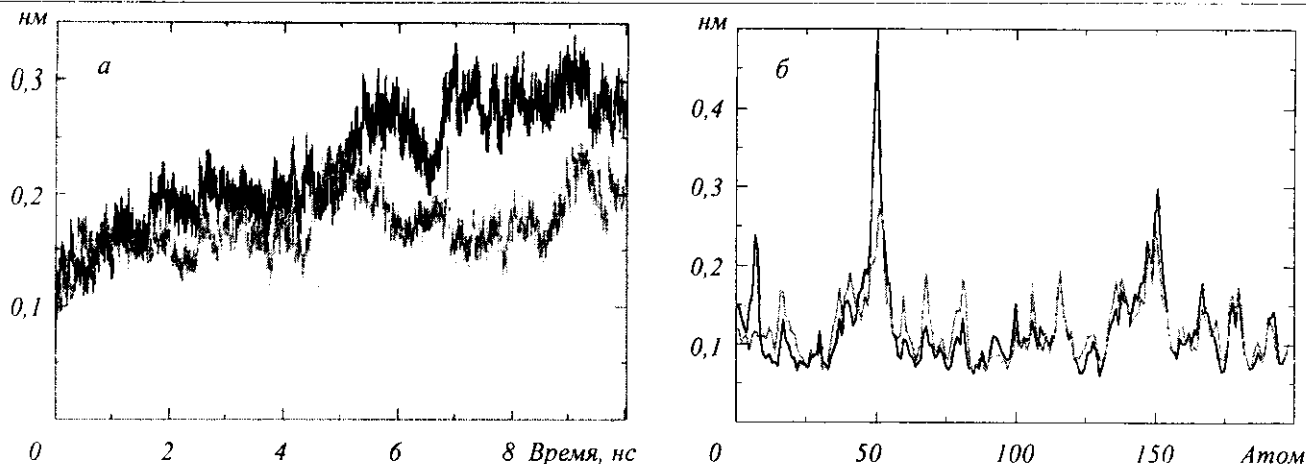


Рис. 1. Графики средноквадратичного отклонения (а) и средноквадратичных флуктуаций (б) для  $C_{\alpha}$  атомов Leu10 → Ile мутанта (1) и нативной ВИЧ-1 протеазы (2)

данных свидетельствует о том, что замена лейцина на изолейцин в 10-м положении существенно уменьшает конформационную гибкость ВИЧ-1 протеазы, что в свою очередь понижает сродство фермента к ингибиторам.

**Материалы и методы.** Подготовку систем к расчету МД проводили согласно схеме, изложенной в нашей предыдущей работе [5] со следующими дополнениями. После проведения моделирования МД с привязкой позиций атомов к их начальным координатам рассчитывали МД ВИЧ-1 протеазы в течение 1 нс без каких-либо ограничений. В структуре с помощью программы SwissPDBViewer осуществлена замена (мутация) Leu10 на Ile. После этого в течение 10 нс рассчитывали динамику как мутантной, так и нативной протеазы. Расчет молекулярной динамики проводили на четырехнодовом кластере AMD, любезно предоставленном фирмой «Entru» (Украина).

**Результаты и обсуждение.** *Глобальная динамика протеазы.* В ходе расчета выявлен различный характер конформационной подвижности двух систем. Обнаружено также, что мутант Leu10 → Ile сохранял структуру, близкую к начальным координатам, в то время как нативная протеаза показала высокую конформационную подвижность. Это отражено на графике изменения средноквадратичного отклонения (СКО)  $C_{\alpha}$  атомов от их начально положения (рис. 1, а). Проведенный анализ показал, что такое различие в СКО обусловлено, в первую очередь, конформационной гибкостью верхней части протеазы — «флэповых» доменов, которые включают в себя остатки 36—58 на каждой субъединице. В свою очередь, конформация «флэпов» у Leu10 → Ile мутанта мало изменялась в течение всего расчета МД.

Далее мы сравнили средноквадратичные флуктуации (СКФ)  $C_{\alpha}$  атомов относительно их начальных позиций. Как видно из рис. 1, б, у нативной протеазы основные движения приходятся на область «флэпов», причем колебания  $C_{\alpha}$  атомов во «флэпах» в первой субъединице более значительны (максимум 0,48 нм), чем во второй (максимум 0,29 нм), то есть в динамике симметрия C2 кристаллической ВИЧ-1 протеазы не сохраняется. Однако для мутанта Leu10 → Ile происходит перераспределение движений по всей структуре белка: при этом движения в области «флэпов» существенно гасятся (0,27 и 0,246 нм для разных субъединиц) и происходит незначительное увеличение движений  $\beta$ -шпилек в остальных структурных элементах ВИЧ-1 протеазы (рис. 1, б). Эти данные свидетельствуют об увеличении глобальной жесткости конформации ВИЧ-1 протеазы.

Чем обусловлена такая разница в конформационной подвижности ВИЧ-1 протеазы и ее Leu10 → Ile мутанта? Анализируя структуру данного фермента для двух проведенных расчетов, мы обнаружили, что принципиальным отличием конформаций нативной протеазы от Leu10 → Ile мутанта является конформация N-терминальной петли (остатки 5—9): у нативной протеазы происходит ее выворачивание с увеличением доступной растворителю поверхности (рис. 2, а, б), а у Leu10 → Ile мутанта конформация существенно не изменяется (рис. 2, б). Исследуя изменение конформации N-терминальной петли и аминокислотного остатка в 10-м положении в течение динамики, мы установили, что причиной наблюдаемых конформационных и динамических изменений является взаимодействие Leu23 с остатками Pro9 и Leu10. У нативной протеазы в кристаллической структуре Leu23 обра-

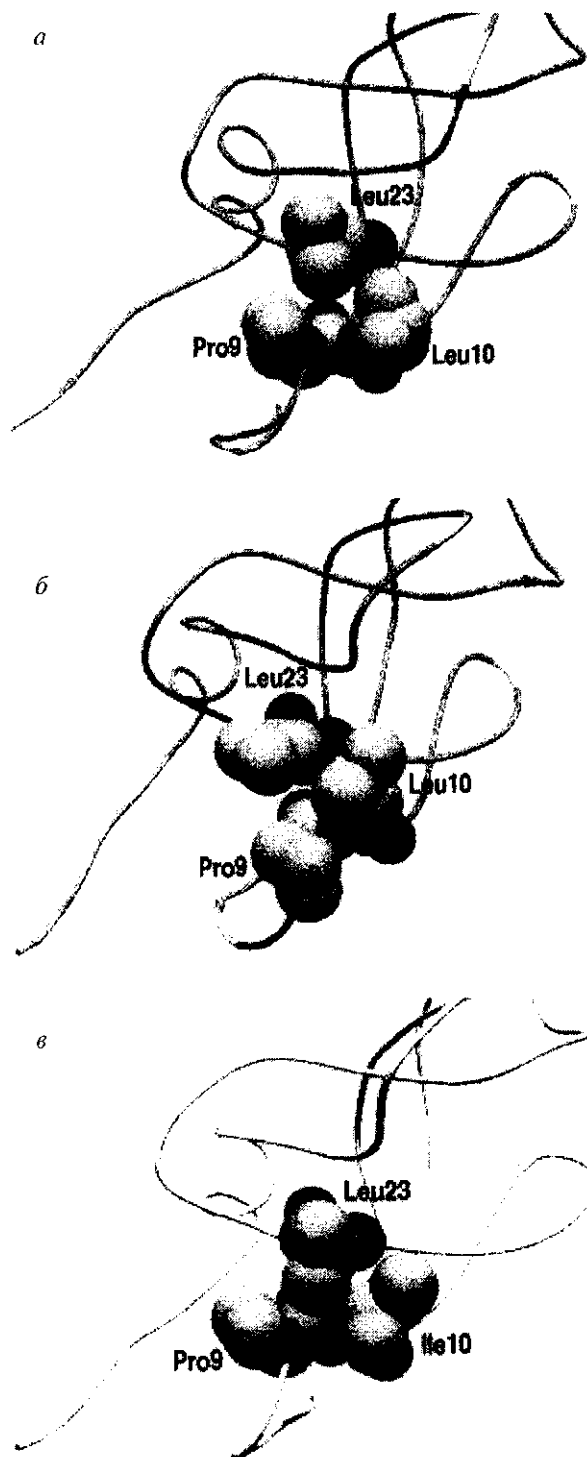


Рис. 2. Исходная (а) и конечная (б) конформации остатков Pro9, Leu10 и Leu23 нативной ВИЧ-1 протеазы; в — конечная конформация Leu10 → Ile мутанта. Показаны Ван-дер-Ваальсовы радиусы только тяжелых атомов. Темным цветом обозначены гидрофильные атомы (N и O); светлыми — липофильные (C)

зует непрочные Ван-дер-Ваальсовы контакты с Leu10 и Pro9, которые заметно ослабевают в процессе расчета МД. Это уменьшает как внутри-, так и межмолекулярные взаимодействия, что в конечном итоге приводит к выворачиванию N-терминальной петли и ВИЧ-1 протеаза становится более гибкой.

Изменение профиля поверхности боковой цепи 10-го остатка при замене лейцина на изолейцин улучшает Ван-дер-Ваальсовы контакты Leu23 с остатком Ile10. Сохраняя в ходе расчета МД это взаимодействие, остатки Leu23 и Ile10 блокируют выворачивание N-терминальной петли наружу и уменьшают конформационную подвижность структурных доменов ВИЧ-1 протеазы. Об уменьшении конформационной подвижности мутанта Leu10 → Ile протеазы свидетельствует увеличение на 10 % элемента относительной ковариационной матрицы, соответствующего атомам  $C_{\alpha}$  остатков 23 и 10.

*Влияние мутаций на устойчивость ВИЧ-1 протеазы к ингибиторам.* Анализируя собственные результаты изучения резистентности ВИЧ-1 протеазы к ингибиторам и сопоставляя их с данными литературы [7, 8], мы предложили следующий механизм влияния мутаций. При взаимодействии с ВИЧ-1 протеазой ингибитор связывается с несколькими аминокислотными остатками активного центра. Мутации этих остатков приводят к изменению конформации активного центра на менее благоприятную для взаимодействия с ингибитором и, как следствие, к снижению энергии взаимодействия ингибитора с ВИЧ-1 протеазой. Этот эффект частично компенсируется изменением конформации ВИЧ-1 протеазы, реализуемом благодаря высокой конформационной гибкости протеазы. Данная гипотеза подтверждается тем, что одна мутация в активном центре вызывает, как правило, только небольшое уменьшение ингибирования [7, 8].

Дистальные мутации, как, например, Leu10 → Ile, увеличивают конформационную жесткость белка, что усложняет вышеописанные конформационные изменения протеазы и таким образом ухудшает связывание ингибитора с протеазой.

Следовательно, комбинация нескольких мутаций в активном центре и вне его приводит к резкому увеличению резистентности ВИЧ-1 протеазы к ингибиторам. Эффект синергизма действия мутаций в области активного центра и дистальных мутаций, влияющих на динамику белка и приводящих к увеличению жесткости, «замораживанию» конформационно подвижных элементов структуры фермента, на наш взгляд, хорошо объясняет наблюдаемый феномен устойчивости ВИЧ-1 протеазы к существующим ингибиторам.

*D. B. Kovalsky, V. M. Dubina, A. I. Kornelyuk*

Molecular dynamics simulation study of effect of the conservative Leu10→Ile mutation on intramolecular mobility of HIV-1 protease

**Summary**

*HIV-1 protease remains a major target for the design of anti HIV/AIDS drugs. However there are an emergence of drug resistant virus strains that carry mutations within protease gene. In order to study molecular basis of the drug resistance it is essential to understand contribution of point mutations to overall resistance. Distal mutations has little impact on the protease conformation however could effect its molecular dynamics. In present study we investigated effect of Leu10 → Ile mutation on molecular dynamics of HIV-1 protease. A 10ns-long trajectory was computed to be further compared with that of wild type protease. A significantly impaired conformational fluctuations of the mutant protease suggests that Leu10 → Ile mutation has increased stability of the tertiary structure. Redistribution of the RMS fluctuations along with an alteration of the direction of slow correlated motions of the protease indicate the effect of the Leu10 → Ile mutation on molecular dynamics of the HIV-1 protease. Liaison between modified dynamics and drug resistance is discussed.*

*Д. Б. Ковальський, В. М. Дубина, О. І. Корнелюк*

Дослідження впливу консервативної мутації Leu10→Ile на внутрішньомолекулярну рухливість ВІЛ-1 протеази методом молекулярної динаміки

**Резюме**

*ВІЛ-1 протеаза є головною мішенню при створенні антиретровірусних препаратів для терапії ВІЛ/СНІДу. Однак при використанні інгібіторів з'являються резистентні штами вірусу, які мають мутації в структурі протеази. При вивченні молекулярних механізмів стійкості ВІЛ-1 протеази до інгібіторів необхідно враховувати внесок окремих точкових мутацій до сумарного ефекту резистентності. Дистальні мутації (такі, що не контактують з інгібітором) мало впливають на конформацію ВІЛ-1 протеази, але можуть суттєво змінювати молекулярну динаміку білка. У даній роботі вивчали вплив дистальної мутації Leu10 → Ile на конформаційну рухливість ВІЛ-1 протеази. Для цього здійснено моделювання молекулярної динаміки мутанта Leu10 → Ile ВІЛ-1 протеази протягом 10 нс. Зроблено порівняння отрима-*

*них результатів з даними для нативної протеази. Суттєве зменшення середньоквадратичного відхилення C<sub>α</sub> атомів мутанта Leu10 → Ile свідчить про зростання стабільності просторової структури ВІЛ-1 протеази протягом вивченого часового інтервалу. Перерозподіл середньоквадратичних флуктуацій атомів відносно їхніх позицій, а також зміна напрямку повільних рухів протеази свідчать про вплив цієї мутації на динаміку ВІЛ-1 протеази, який спричинює збільшення конформаційної жорсткості. Обговорено ймовірний вплив зміни молекулярної динаміки на стійкість протеази до інгібіторів.*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Wlodawer A., Erickson J. W. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease // *Annu. Rev. Biochem.*—1993.—62.—P. 543—585.
2. Boden D., Markowitz M. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors // *Antimicrob. Agents and Chemother.*—1998.—42, N 11.—P. 2775—2783.
3. Chen Z., Li Y., Schock H., Hall D., Chen E., Kuo L. Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 37.—P. 21433—21436.
4. Hansson T., Oosterbrink C., van Gunsteren W. Molecular dynamics simulation // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—2002.—12.—P. 190—196.
5. Ковальський Д. Б., Каниболоцький Д. С., Дубина В. Н., Корнелюк А. И. Конформаційні зміни ВИЧ-протеази: вплив протонірованості активного центра на конформацію ВИЧ-1-протеази в воді // *Укр. біохім. журн.*—2002.—74, № 6.—С. 135—138.
6. Kovalsky D., Dubyna V., Kanibolotsky D., Mark A., Kornelyuk A. A molecular dynamics study of the structural stability of HIV-1 protease under physiological conditions: The role of Na<sup>+</sup> ions in stabilizing the active site // *Proteins.*—2004.—54, N 4.—P. 780—788.
7. Rose R. B., Craik C. S., Stroud R. M. Domain flexibility in retroviral proteases: structural implications for drug resistant mutations // *Biochemistry.*—1998.—37.—P. 2607—2621.
8. Ohtaka H., Schon A., Freire E. Multidrug resistance to HIV-1 protease inhibition requires cooperative coupling between distal mutations // *Biochemistry.*—2002.—42.—P. 13659—13666.

УДК 577.322

Надійшла до редакції 23.04.04