

## شبیه‌سازی برهمکنش آنزیم انتگراز HIV-1 با مهارکنندگان آن به کمک روش دینامیک ملکولی

محمد رضا دایر<sup>۱\*</sup>

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

پذیرش: ۵ بهمن ۹۴

دریافت: ۵ تیر ۱۳۹۴

### چکیده

طراحی و استفاده از مهارکنندگان آنزیمی علیه آنزیم‌های ویروسی یکی از راه‌های نوین و کارآمد در درمان بیماری‌های ویروسی است. این مهارکنندگان از طریق غیرفعال کردن آنزیم‌های حیاتی می‌توانند چرخه تکثیر ویروس‌ها را مختل و با محدود کردن جمعیت آنها از انتشار عفونت‌های ویروسی جلوگیری کنند. در این زمینه آنزیم انتگراز ویروس HIV-1 دارای اهمیت ویژه‌ای است. تاکنون برای این انتگراز سه مهارکننده طراحی، تأیید و جهت استفاده درمانی معرفی شده است که عبارتند از، رالتگراویر، الویتگراویر و دولوتگراویر. در تحقیق حاضر و به منظور مطالعه مکانیسم ملکولی عملکرد این مهارکنندگان، ابتدا به کمک روش داکینگ هر کدام از این مهارکنندگان در جایگاه مناسب روی آنزیم قرار داده شدند و پس از انتخاب بهترین حالت اتصال دارو کمپلکس‌های حاصل جداگانه به مدت ۱۰ نانو ثانیه در شرایط شبه طبیعی شبیه‌سازی شدند تا برهم‌کنش مهارکننده‌ها با انتگراز مطالعه شود. نتایج حاصل نشان می‌دهد که داروی دولوتگراویر نسبت به سایر داروها اثرات برجسته‌تری بر ساختار انتگراز اعمال می‌کند. این مهارکننده همچنین باعث کاهش انعطاف‌پذیری پروتئین به خصوص در ناحیه ویژه لوپ (باقیمانده‌های ۱۴۰ تا ۱۵۰) می‌گردد که این امر منجر به کاهش تمایل اتصال انتگراز به DNA ویروس می‌شود. بر اساس یافته‌های این تحقیق به نظر می‌رسد که ساختار دولوتگراویر می‌تواند مدل مناسبی برای طراحی آنالوگ‌های ساختاری کارآمدتر باشد.

**کلمات کلیدی:** ایدز، شبیه‌سازی دینامیک ملکولی، انتگراز، مهارکنندگان، رالتگراویر، الویتگراویر، دولوتگراویر.

\* نویسنده مسئول: محمد رضا دایر

آدرس: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۱۰۴۵

پست الکترونیک: [mrdayer@scu.ac.ir](mailto:mrdayer@scu.ac.ir)

## مقدمه

ایدز یا سندرم نقص ایمنی اکتسابی یک بیماری پیشرونده سیستم ایمنی است. این بیماری حاصل فعالیت ویروسی به نام HIV-1 در بدن انسان بوده که باعث تخریب شدید دستگاه ایمنی می شود (۱۴). ویروس HIV یک ویروس RNA دار تک رشته‌ای بوده و دارای سه آنزیم مهم می باشد که عبارتند از، ۱- پروتئاز (PR) ۲- ترانس کریپتاز معکوس (RT) و ۳- انتگرز (IN). پس از ورود ویروس به سیتوپلاسم سلول میزبان در ابتدا آنزیم ترانس کریپتاز معکوس از روی RNA ویروسی ملکول DNA را می سازد و سپس این DNA ویروس به کمک آنزیم انتگرز و به صورت کمپلکس قبل از انتگراسیون یا PIC به درون هسته سلول میزبان منتقل می شود. این دو واکنش فاصله زمانی چند ساعتی دارند و در تمام این مدت آنزیم انتگرز به DNA متصل باقی می ماند (۱).

فرآیند الحاق یا انتگراسیون DNA ویروسی به درون ژنوم سلول میزبان طی دو مرحله انجام می شود: ۱- پردازش ناحیه 3': در این مرحله یک واکنش هیدرولیز اندونوکلازی روی دو انتهای 3' مربوط به DNA دو رشته‌ای ویروس در محل توالی چهارتایی حفاظت شده CAGT صورت می گیرد که طی آن دی نوکلئوتید GT از این توالی چهارتایی جدا و انتهای 3'-OH آزاد ایجاد می شود. این مرحله درون سیتوپلاسم سلول میزبان صورت می گیرد و نتیجه آن تشکیل یک کمپلکس نوکلئوپروتئینی به نام کمپلکس قبل از انتگراسیون (PIC) است. این کمپلکس سپس به درون هسته سلول میزبان مهاجرت کرده و در آنجا مرحله دوم انتگراسیون انجام می شود.

۲- انتقال رشته DNA: در این مرحله گروه 3'-OH فعال شده در مرحله قبل به فسفات 5' اسکلت DNA سلول

میزان حمله می کند. این واکنش به طور هماهنگ توسط هر دو انتهای DNA ویروس روی مناطق خاصی از DNA سلول میزبان که توسط پنج جفت باز مشخص می شوند صورت می گیرد. نتیجه این واکنش ایجاد پیوند کووالان بین DNA ویروس و DNA سلول میزبان و ملحق شدن (یا انتگراسیون) آن‌ها به هم است. در پایان این مرحله، آنزیم‌های مسئول تعمیر سلول میزبان نوکلئوتیدهای مفقود را جایگزین می کنند.

در ادامه از روی DNA ویروسی ملحق شده به ژنوم سلول میزبان و توسط فرآیند رونویسی، RNA ویروسی ساخته می شود. پس از آن توسط فرآیند ترجمه، پروتئین‌های ویروسی به صورت پیش ساز سنتز و نهایتاً توسط آنزیم پروتئاز از هم جدا می شوند و آنزیم‌های مورد نیاز ویروس به همراه پروتئین‌های کپسید میها و چرخه عفونی شدن ویروس HIV کامل می شود (۱۳).

آنزیم انتگرز ویروس ایدز با وزن ملکولی ۳۲ کیلو دالتون، دارای سه دمین مشخص در ساختار فضائی می باشد که این دمین‌ها به کمک روش‌های بیوشیمیایی و هیدرولیز توسط پروتئازها شناسایی شده‌اند (۵). این دمین‌ها عبارتند از: ۱- دمین انتهای آمینی (NTD) که شامل اسیدهای آمینه ۱ تا ۵۰ است. این دمین دارای موتیف بسیار حفاظت شده HHCC است که در انتگرز همه رتروویروس‌ها وجود دارد. یک یون فلزی روی  $(Zn^{+2})$  نیز به این دمین متصل است. این دمین حاوی دو هیستیدین و دو سیستئین است که یون  $Zn^{+2}$  به آن‌ها متصل می شود. دومین NTD در ایجاد اشکال مولتی مری آنزیم نقش دارد. اگرچه نقش دقیق این دمین مشخص نیست ولی وجود آن برای فعالیت انتگرز کاملاً ضروری است. ۲- دمین مرکزی کاتالیتیک (CCD) که شامل اسیدهای آمینه ۵۰ تا ۲۱۲ بوده و فعالیت کاتالیتیکی آنزیم را بر عهده دارد. این دمین

تا به امروز ساختار بلورشناسی کاملی برای کمپلکس DNA و انتگراز گزارش نشده است ولی ساختارهایی برای هر کدام از دمین‌ها به صورت منفرد یا به صورت جفت جفت (CCD همراه با CTD و CCD همراه با NTD) تعیین و در بانک اطلاعاتی پروتئین یا PDB با آدرس [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb) ذخیره شده است.

یکی از راه‌های مبارزه با بیماری ایدز و جلوگیری از شیوع ویروس مربوطه طراحی و ساخت دارو برای مهار آنزیم‌های آن می‌باشد. از آنجائی که کاربرد درمانی مهارکنندگان آنزیم پروتئاز (PR) و ترانس کریپتاز معکوس (RT) به دلیل عوارض جانبی شدید و نیز مقاومت دارویی ایجاد شده محدود شده است لذا مطالعه مکانیزم عمل داروها می‌تواند راهی برای شکستن مقاومت دارویی یا کاهش عوارض جانبی پیش‌رو بگذارد.

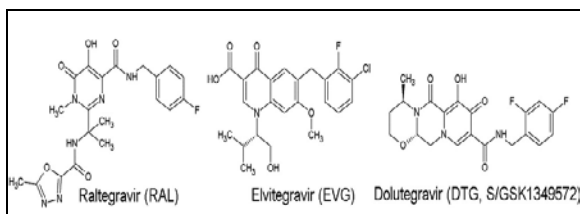
نظربه اینکه عمل آنزیم انتگراز برای ورود DNA ویروسی به ژنوم سلول میزبان کاملاً ضروری است و بدون آن عملاً مرحله عفونی شدن ایجاد نمی‌شود، همچنین به دلیل عدم وجود آنزیم انتگراز جایگزین در سلول‌های میزبان، ساخت و کاربرد مهارکننده‌گان این آنزیم نسبت به سایر آنزیم‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. این مهارکنندگان در درجه اول ممکن است فرآیند انتقال رشته (ST) و در درجه دوم فرآیند پردازش انتهایی<sup>3</sup> را متوقف می‌کند و از این طریق باعث توقف چرخه عفونی شدن می‌شود. مشکل و معضل مهم در کارآمدی این داروها وقوع موتاسیون سریع و مداوم در ژنوم HIV است که دلیل آن خطای بالا در عمل آنزیم ترانس کریپتاز معکوس می‌باشد. این موتاسیون‌های پی در پی باعث ایجاد گونه‌هایی از آنزیم می‌شود که در مقابل این داروها مقاوم هستند. از میان مهارکنندگان موجود برای مهار آنزیم انتگراز می‌توان

دارای موتیف سه تایی DD35E می‌باشد که موقعیت جایگاه فعال را مشخص می‌کنند و حذف هر کدام از آن‌ها منجر به از بین رفتن فعالیت آنزیم می‌شود. این موتیف معمولاً در آنزیم‌های پلی‌نوکلئوتیدیل ترانسفرازها یافت می‌شود. بعلاوه یک لوپ نزدیک به موقعیت جایگاه فعال در باقیمانده‌های ۱۴۰ تا ۱۵۲ نیز وجود دارد (۱). این لوپ ساختار بی‌نظمی دارد و کنفورماسیون‌های بسیار متفاوتی را از خود نشان می‌دهد، که حاکی از انعطاف پذیر بودن این ساختار جهت تسهیل اتصال آنزیم به DNA است. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که موتاسیون گلیسین‌های ۱۴۰ و ۱۴۹ انعطاف‌پذیری این لوپ را کاهش می‌دهند و فعالیت کاتالیتیکی آنزیم را کم می‌کنند.

این دمین دارای جایگاه اندونوکلئاز و پلی‌نوکلئوتیدیل ترانسفرازی است. مطالعات بلورشناسی نشان می‌دهد که در ساختار دوم این دمین پنج صفحه بتا و شش ماریپیچ آلفا وجود دارد. دو یون منیزیم ( $Mg^{+2}$ ) نیز در این دمین دیده می‌شوند. یک یون  $Mg^{+2}$  در اتصال با اتم‌های اکسیژن  $Asp^{64}$  و  $Asp^{116}$  و یون  $Mg^{+2}$  دیگر در اتصال با اتم‌های اکسیژن  $Asp^{64}$  و  $Glu^{152}$  می‌باشد و به این ترتیب هر دوی این یونها در اتصال آنزیم به DNA نقش دارند (۷). به علاوه آمینواسیدهای  $Tyr^{143}$ ,  $Lys^{159}$ ,  $Gln^{148}$  نیز در اتصال DNA به آنزیم انتگراز نقش دارند (۳ و ۶).

۳- دمین انتهایی کربوکسیل (CTD) سومین دومین آنزیم بوده که شامل اسیدهای آمینه ۲۱۲ تا ۲۸۸ می‌باشد. این دمین می‌تواند به‌طور غیر اختصاصی به DNA متصل شود، لذا حذف این دمین منجر به از بین رفتن فعالیت‌های آنزیم می‌شود. این دمین نسبت به سه دمین دیگر کمترین حفاظت‌شدگی را دارد.

Triipill نیز بر پایه مهار دوتایی IN و RT بوده و دارای مهارکننده انتگرز به نام DTG (50 میلی گرم) است. این دارو سد محکم تری در برابر مقاومت‌های ویروسی ایجاد می‌کند و برای کسانی که به رژیم درمانی RAL و EVG جواب نمی‌دهند بسیار مناسب است (۱۷).



شکل ۱: ساختار شیمیایی سه مهارکننده مهم انتگرز

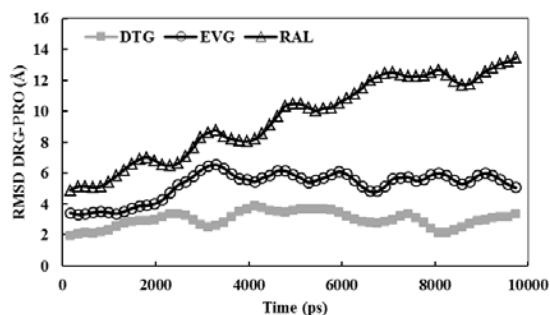
### مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا انرژی ساختار بلوری آنزیم انتگرز با استفاده از بسته نرم افزاری گرومکس تا مقدار کمتر ۳۰۰ کیلوژول برمول به حداقل رسانده شد تا ساختار بهینه تر آن برای انجام دینامیک ملکولی بدست آید. پس از آن با استفاده از نرم افزار Hex عمل داکینگ داروها در این ساختار انجام شد تا جایگاه اتصال آنها مشخص شود. سپس بهترین ساختارهای بدست آمده برای کمپلکس آنزیم دارو که بیشترین انرژی اتصال را دارند استخراج و مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله بعد ساختار ملکولی داروها با مختصات فضائی جدید (حاصل از داکینگ) را در سایت <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg> فرمت گرومکس تبدیل کردیم. با داشتن این فایل‌های ساختاری برای داروها و ساختار بهینه شده آنزیم، شبیه سازی‌های اصلی تحقیق به کمک بسته نرم‌افزاری گرومکس انجام گردید. شبیه سازی‌ها در جعبه پر شده از آب، در فشار یک اتمسفر و دمای ۳۷ درجه انجام می‌شود. لازم به ذکر است که داروها به‌طور جداگانه و در شرایط مشابه در کمپلکس با آنزیم به مدت ۱۰ نانوثانیه شبیه سازی شده و نتایج شبیه سازی هر یک پیکوثانیه در فایل مسیر ضبط شدند. داده‌ها با استفاده از

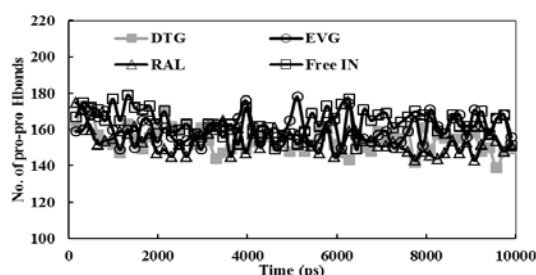
به سه مهارکننده مهم اشاره نمود که کاربرد درمانی وسیعی دارند. این مهارکنندگان عبارتند از رالتگرایر (RAL)، الویتگرایر (EVG) و دولوتگرایر (DTG) با ساختمان شیمیائی نشان داده شده در شکل ۱ می‌باشند که هر سه این مهارکنندگان از طریق اتصال به دو یون  $Mg^{+2}$  موجود در جایگاه فعال آنزیم اثرات مهارتی خود را اعمال می‌کنند. داروی RAL اولین بار در سال 2007 توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) به‌عنوان مهارکننده آنزیم انتگرز در درمان بیماری ایدز مورد تأیید قرار گرفت (۱۵و۸). مصرف روزانه این دارو ۴۰۰ میلی گرم است که معمولاً همراه با مهارکننده ترانس کریپتاز معکوس اثرات بهتری نشان می‌دهد (۲)، هرچند که بعضی از بیماران در برابر درمان با RAL مقاومت نشان می‌دهند. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که دو عامل اصلی در ایجاد مقاومت به RAL وجود دارند، ۱- وقوع موتاسیون دوتایی گلیسین ۱۴۰ و گلوتامین ۱۴۸ در آنزیم انتگرز ۲- حضور موتاسیون تکی مانند آسپاراژین ۱۵۵ یا موتاسیون تیروزین ۱۴۳ (۱۰). به‌منظور کاهش مقاومت به RAL در ماه اوت سال ۲۰۱۲ میلادی سازمان غذا و داروی آمریکا قرص چهارگانه EVG را تأیید کرده است که این قرص با دوز مصرفی ۱۵۰ میلی گرم و یکبار در روز اثرات مشابهی با دوز مصرفی ۴۰۰ میلی گرم دوبار در روز RAL دارد (۱۲). قرص چهارگانه EVG هر دو آنزیم RT و IN را مهار می‌کند (۹). تحقیقات انجام شده نشان داد که EVG و RAL مکانیسم عمل مشابهی دارند با این تفاوت که EVG بر خلاف RAL با اسید آمینه تیروزین ۱۴۳ در آنزیم انتگرز برهم کنش ندارد (۴). بنابراین EVG می‌تواند برای موتاسیون مقاومت‌زای تیروزین ۱۴۳ بجای RAL استفاده شود (۱۱). دومین قرص با شیوه مصرفی یکبار در روز با عنوان 572-

به جایی کمتر DTG در طی شبه‌سازی و استقرار بیشتر آن حکایت می‌کند. این یافته می‌تواند به معنی اتصال محکم‌تر و پایداری بیشتر DTG به آنزیم باشد. داروی EVG در این بین نسبت به DTG از ثبات کمتری برخوردار می‌باشد.



نمودار ۲: تغییرات RMSD دارو نسبت به پروتئین در طی شبه‌سازی ۱۰ نانوثانیه‌ای در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر

مقایسه تعداد پیوندهای هیدروژنی: همان‌طور که در نمودار ۳ نمایان است و نیز با استفاده از نتایج حاصل از تست آماری t جفتی که نتایج آن در جدول‌های ۱ و ۲ آمده مشخص می‌شود تعداد پیوندهای هیدروژنی داخل ملکولی (پروتئین-پروتئین) در حضور داروها نسبت به حالت آزاد کاهش پیدا می‌کند. که در این میان DTG و RAL مشابه یکدیگر عمل می‌کنند و تفاوت معنی‌داری با هم ندارند ( $P\text{-Value}=0.465$ ).



نمودار ۳: تغییرات تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین-پروتئین در حضور و عدم حضور دارو پس از ۱۰ نانوثانیه شبه‌سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر

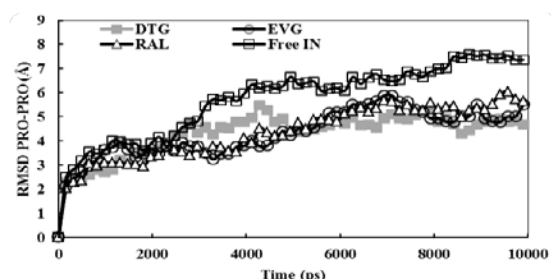
جدول ۱: میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین-پروتئین در

حالت‌های مختلف شبه‌سازی	
حالت‌های موجود	Mean±SD
DTG	154.74±7.30
EVG	160.41±7.16
RAL	153.90±6.99
Free IN	164.52±7.43

نرم افزارهای اکسل و نیز SPSS تحلیل و از طریق انجام نتایج تست آماری t جفتی با هم مقایسه شدند. نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار استاندارد گزارش می‌شوند و ( $P\text{-Value}<0.05$ ) به عنوان سطح معنی‌داری لحاظ می‌گردد.

## نتایج

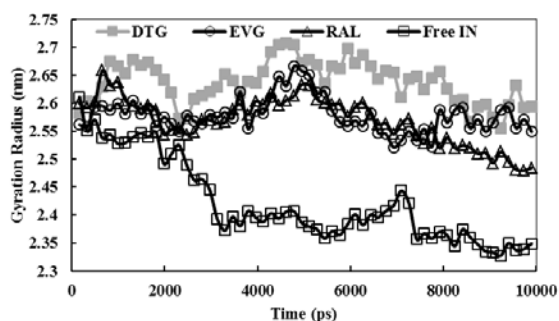
مقایسه انحراف معیار جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین (RMSD): نمودار ۱ تغییرات RMSD پروتئین-پروتئین برای آنزیم انتگرز در حضور و غیاب داروها نشان داده شده‌اند. همان‌طوریکه ملاحظه می‌شود همه منحنی‌ها از زمان ۴ نانوثانیه به بعد مسطح می‌شوند. نمودار ۱ بیان می‌کند که: ۱- روند شبه‌سازی صحیح بوده و ساختار پروتئین تحت تأثیر حضور مهار کننده‌ها به میزان قابل ملاحظه‌ای تغییر می‌کند ۲- در حضور داروها میزان تغییرات ساختاری ایجاد شده در پروتئین محدودتر می‌باشند.



نمودار ۱: تغییرات RMSD پروتئین-پروتئین در طی شبه‌سازی ۱۰ نانوثانیه‌ای در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر

نمودار ۲ منحنی تغییرات RMSD داروهای RAL، EVG و DTG نسبت به پروتئین در طی شبه‌سازی را نشان می‌دهد. در این نمودار مشاهده می‌شود که تغییرات RMSD داروی RAL نسبت به بقیه مهار کنندگان بیشتر می‌باشد که این نشانه عدم ثبات در اتصال به جایگاه اتصال و نوسان بیشتر آن می‌باشد. از طرف دیگر نمودار RMSD داروی DTG نسبت به بقیه داروها پایین‌تر می‌باشد که این از جا

**مقایسه شعاع چرخشی:** همان طور که نمودار ۵ نشان می دهد و با استفاده از نتایج تستهای آماری t جفتی که در جدول های ۵ و ۶ نیز آمده مشخص است که شعاع چرخشی انتگرال در حضور سه داروی موجود نسبت به آنزیم آزاد افزایش پیدا کرده است. در این میان شعاع چرخشی انتگرال در حضور DTG نسبت به دو داروی دیگر افزایش بیشتری نشان می دهد.



نمودار ۵: تغییرات شعاع چرخشی انتگرال در حضور و عدم حضور دارو پس از ۱۰ نانوثانیه شبیه سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر

جدول ۵: میانگین تغییرات شعاع چرخشی انتگرال در حالت های مختلف شبیه سازی

حالت های موجود	Mean±SD
DTG	2.64±0.04
EVG	2.58±0.03
RAL	2.56±0.04
Free IN	2.39±0.04

جدول ۶: مقایسه تغییرات شعاع چرخشی انتگرال در حالت های مختلف شبیه سازی

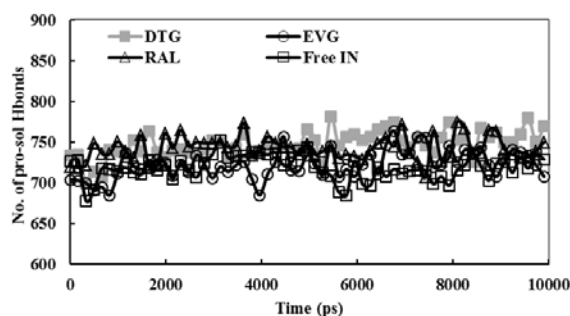
مقایسه حالت های موجود	P-Value
DTG-EVG	0.01<
DTG-RAL	0.01<
EVG-RAL	0.01<
DTG-Free IN	0.01<
EVG-Free IN	0.01<
RAL-Free IN	0.01<

**مقایسه سطح قابل دسترس حلال آلی آنزیم:** همان طور که در نمودار ۶ مشخص است و از نتایج تستهای آماری t جفتی که در جدول های ۷ و ۸ آمده اند مشخص است که در حضور RAL سطح قابل دسترس حلال آلی کاهش پیدا می کند. از طرف دیگر در حضور EVG و DTG این سطح افزایش نشان می دهد که میزان افزایش در حضور DTG بیشتر می باشد.

جدول ۲: مقایسه پیوندهای هیدروژنی پروتئین-پروتئین در حالت های مختلف شبیه سازی

مقایسه حالت های موجود	P-Value
DTG-EVG	0.01<
DTG-RAL	0.564
EVG-RAL	0.01<
DTG-Free IN	0.01<
EVG-Free IN	0.01<
RAL-Free IN	0.01<

همان طور که در نمودار ۴ دیده می شود و براساس نتایج تستهای آماری t جفتی که در جدول های ۳ و ۴ آورده شده مشخص می شود که تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین-حلال در حضور داروها نسبت به حالت آزاد آنزیم افزایش پیدا می کند. که در این میان DTG با EVG و RAL (0.063=P-Value) مشابه یکدیگر بوده و تفاوت معنی داری نشان نمی دهند.



نمودار ۴: تغییرات در تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین-حلال در حضور و عدم حضور دارو پس از ۱۰ نانوثانیه شبیه سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر

جدول ۳: میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین-حلال در

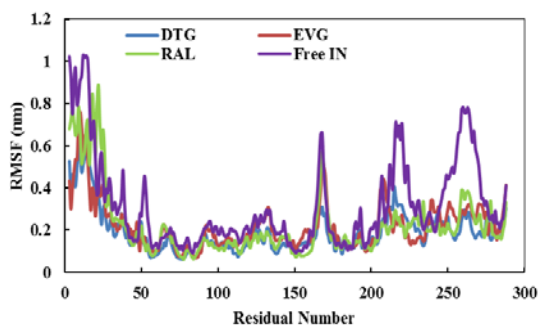
حالت های مختلف شبیه سازی	
حالت های موجود	Mean±SD
DTG	739.70±67.50
EVG	714.69±68.53
RAL	734.77±66.33
Free IN	711.03±61.93

جدول ۴: مقایسه پیوندهای هیدروژنی پروتئین-حلال در حالت های مختلف شبیه سازی

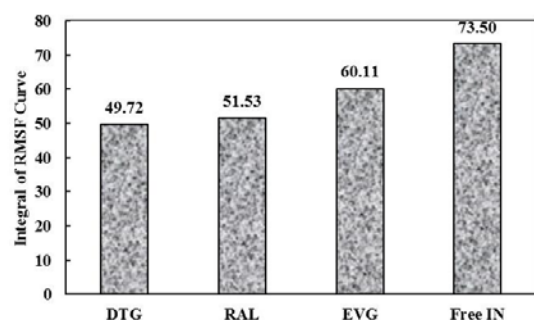
مقایسه حالت های موجود	P-Value
DTG - EVG	0.01<
DTG - RAL	0.063
EVG - RAL	0.01<
DTG - Free IN	0.01<
EVG - Free IN	0.234
RAL - Free IN	0.01<

انعطاف‌پذیری ناحیه ویژه لوپ در حضور DTG نسبت

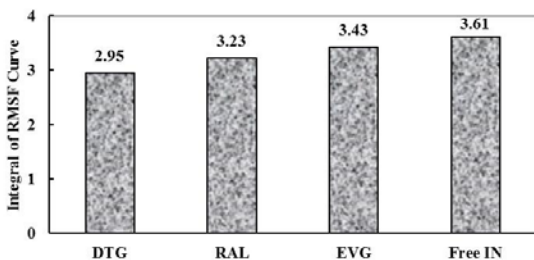
به دو داروی دیگر کاهش بیشتری نشان می‌دهد.



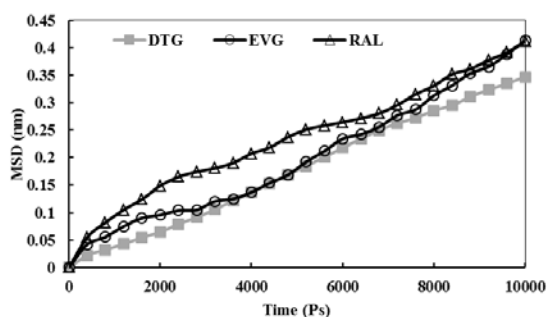
نمودار ۷: میزان میانگین نوسانات اتم‌های کربن انتگراز در حضور و عدم حضور دارو پس از ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر



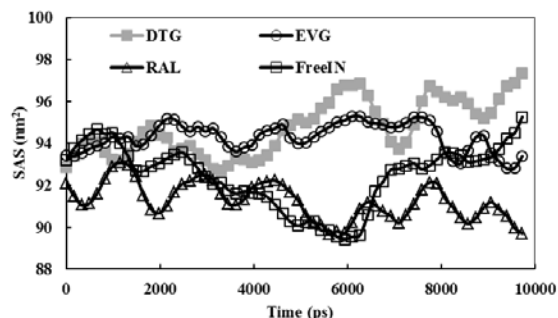
نمودار ۸-الف: مقایسه میزان میانگین نوسانات اتم‌های کربن انتگراز در حضور و عدم حضور دارو پس از ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر



نمودار ۸-ب: مقایسه میزان میانگین نوسانات اتم‌های کربن ناحیه ویژه لوپ آنزیم انتگراز در حضور و عدم حضور دارو پس از ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر



نمودار ۹: جابه‌جایی متوسط مربع داروها پس از ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر



نمودار ۶: تغییرات سطح قابل دسترس حلال آلی آنزیم انتگراز در حضور و عدم حضور دارو پس از ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در دمای ۳۷ درجه و فشار یک اتمسفر

جدول ۷: میانگین تغییرات سطح قابل دسترس حلال آلی در حالت‌های مختلف شبیه‌سازی

حالت‌های موجود	میانگین $\pm$ انحراف معیار استاندارد
DTG	70/1 $\pm$ 62/94
EVG	25/4 $\pm$ 27/94
RAL	30/1 $\pm$ 33/91
Free IN	76/1 $\pm$ 43/92

جدول ۸: مقایسه تغییرات سطح قابل دسترس حلال آلی در حالت‌های مختلف شبیه‌سازی

مقایسه حالت‌های موجود	P-Value
DTG – EVG	0.204
DTG – RAL	0.01<
EVG – RAL	0.01<
DTG – Free IN	0.01<
EVG – Free IN	0.01<
RAL – Free IN	0.01<

میزان نوسانات ریشه میانگین مربعات (RMSF)

کربن‌های آلفا: میزان تغییرات RMSF کربن‌های آلفا در طی شبیه‌سازی در یک پروتئین مانند آنزیم انتگراز شاخص خوب و قابل قبولی برای میزان انعطاف‌پذیری پروتئین طی شبیه‌سازی است. هر قدر میزان RMSF یک کربن آلفا بیشتر باشد، آن باقیمانده انعطاف‌پذیری‌تر است. همان‌طور که در نمودارهای ۷ و ۸-الف دیده می‌شود، انعطاف‌پذیری آنزیم انتگراز در حضور DTG نسبت به دو داروی دیگر کمتر می‌شود، در نتیجه انتظار می‌رود فعالیت آنزیم در حضور این مهارکننده محدودتر شود. در اینجا همچنین، تأثیر داروها بر RMSF اتم‌های کربن لوپ انتگراز مورد مطالعه قرار می‌گیرد. همان‌طور که در نمودار ۸-ب دیده می‌شود

### متوسط مربع جابه‌جایی (MSD) دارو طی شبیه

**سازی:** نمودار تغییرات MSD طی شبیه سازی سرعت و میزان نفوذ دارو به درون انتگرال را نشان می‌دهد. هر چه منحنی MSD کندتر و پایین‌تر باشد نشان دهنده نفوذ کمتر دارو و هر چه منحنی تیزتر و بالاتر باشد نشان دهنده نفوذ بیشتر دارو به درون انتگرال طی شبیه سازی است. همان‌طور که مشخص است میزان نفوذ DTG به درون انتگرال در مقایسه با دو داروی دیگر کمتر است. این یافته بدین معنی است که DTG سریعاً محل اتصال خود در انتگرال را یافته و به آن متصل می‌شود. این یافته تأییدی برای یافته‌های و ادعاهای ما در خصوص نمودار RMSD دارو-پروتئین است.

### بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طوریکه اشاره شد دو دسته دارو برای مهار آنزیم انتگرال HIV-1 وجود دارد. یک دسته مهارکننده فرآیند پردازش ناحیه 3' توسط آنزیم انتگرال را مهار می‌کنند و دسته دیگر انتقال رشته DNA ویروسی به درون DNA سلول میزبان را متوقف می‌کنند. سه داروی RAL، EVG و DTG از جمله مهارکنندگان معروف HIV-1 هستند که در درمان بیماری ایدز استفاده می‌شوند. هر سه این داروها از مسیر مشابهی باعث مهار آنزیم انتگرال HIV-1 می‌شوند.

همان‌طوریکه از نمودار شماره 1 مشخص است انتگرال در حضور هر سه دارو کاهش می‌یابد. این منحنی‌ها نشان می‌دهند که این داروها با الگوئی شبیه مهارکنندگان غیررقابتی تغییرات ساختاری آنزیم را مهار می‌کنند بگونه‌ای که تا پایان شبیه سازی متصل به انتگرال باقی می‌ماند و اجازه نمی‌دهند آنزیم ماکزیم تغییرات ممکن را تجربه کند.

تغییرات RMSD دارو (نمودار شماره 2) نشان می‌دهد که از میان سه داروی استفاده شده RAL بیشترین

افزایش و DTG کمترین افزایش در RMSD را سبب می‌شود. بنابراین می‌توان ادعا کرد که RAL در طی مدت 10 نانوثانیه شبیه سازی، نمی‌تواند در جایگاه اتصالی مستقر شود. از اینرو نمی‌توان گفت که RAL یک داروی قوی برای مهار آنزیم می‌باشد. از طرف دیگر DTG به سرعت در محل اتصال خود مستقر شده و با پیشرفت شبیه سازی جابجا نمی‌شود.

اطلاعات به‌دست آمده از نمودار ۳ و جدول‌های ۱ و ۲ بیانگر این مطلب است که RAL و DTG به یک میزان باعث کاهش تعداد پیوندهای هیدروژنی درون ملکولی می‌شوند ( $P\text{-Value} = 0.465$ ) ولی هر دو نسبت به EVG این پیوندها را بیشتر کاهش می‌دهند. از اینرو می‌توان گفت که RAL و DTG باعث ناپایداری ساختاری آنزیم انتگرال می‌شوند. از طرف دیگر یافته‌های ما (نمودار ۴ و جدول‌های ۳ و ۴) نشان می‌دهند که RAL و DTG پیوندهای هیدروژنی برون ملکولی (یا پروتئین-حلال) را به یک میزان افزایش می‌دهند و تفاوت معنی‌داری باهم ندارند ( $P\text{-Value} = 0.063$ ).

نمودار شماره ۵ و جدول‌های ۵ و ۶ تأثیر داروها بر شعاع چرخشی آنزیم انتگرال در طی شبیه سازی را نشان می‌دهند. همان‌طور که واضح است در حضور داروها شعاع چرخشی آنزیم افزایش می‌یابد. بر اساس این یافته‌ها، DTG بطور معنی‌دار شعاع چرخشی انتگرال را بیشتر از سایر داروها افزایش می‌دهد. بدین ترتیب مشخص می‌شود که DTG بیشترین تغییرات را در ساختار سوم انتگرال اعمال کرده و منجر به باز شدن ساختار انتگرال می‌شود.

نمودار شماره ۶ و جدول‌های ۷ و ۸ تغییرات ایجاد شده در سطح قابل دسترس حلال آلی در طی شبیه سازی را نشان می‌دهند. اطلاعات حاصل نشان می‌دهد که در حضور RAL سطح قابل دسترس حلال آلی کاهش



تحقیقات آزمایشگاهی هم‌خوانی داشته و به همین خاطر است که DTG در حال حاضر به‌عنوان جایگزین مناسبی برای RAL و EVG برای غلبه بر مقاومت دارویی ویروس معرفی شده و مراحل نهائی آزمایشات بالینی را طی می‌کند.

### منابع

1. Almerico, A.M., Tutone, M., Ippolito, M., Lauria A. (2007). Molecular Modelling and QSAR in the Discovery of HIV-1 Integrase Inhibitors. *Current Computer-Aided Drug Design* 3:214-233
2. Eron, J.J. Jr, Rockstroh, J.K., Reynes, J., Andrade-Villanueva, J., Ramalho-Madruga, J.V., Bekker, L.G., Young, B., Katlama, C., Gatell-Artigas, J.M., Arribas, J.R., Nelson, M., Campbel, H., Zhao, J., Rodgers, A.J., Rizk, M.L., Wenning, L., Miller, M.D., Hazuda, D., DiNubile, M.J., Leavitt, R., Isaacs, R., Robertson, M.N., Sklar, P., Nguyen, B.Y. (2011). Raltegravir once daily or twice daily in previously untreated patients with HIV-1: a randomised, active-controlled, phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases* 11:907-15
3. Esposito, D., Craigie, R. (1998). Sequence specificity of viral end DNA binding by HIV-1 integrase reveals critical regions for protein-DNA interaction. *European Molecular Biology Organization Journal* 17:5832-43
4. Hare, S., Gupta, S.S., Valkov, E., Engelman, A., Cherepanov, P. (2010). Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464:232-6
5. Jenkins, T.M., Esposito, D., Engelman, A., Craigie, R. (1997). Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photo-crosslinking. *European Molecular Biology Organization Journal* 16:6849-59
6. Johnson, B.C., Métifiot, M., Pommier, Y., Hughes, S.H. (2012). Molecular dynamics approaches estimate the binding energy of HIV-1 integrase inhibitors and correlate with in vitro activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56:411-9
7. Marchand, C., Johnson, A.A., Karki, R.G., Pais, G.C., Zhang, X., Cowansage, K.,

ولی در حضور EVG و DTG به‌میزان مشابهی افزایش می‌یابد (P-Value = 0.204) که در این میان تأثیر DTG بیشتر می‌باشد. در نتیجه می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که در حضور DTG ساختار انتگرز بازتر می‌شود. این ویژگی DTG می‌تواند به منزله قوی‌تر اثر مهارتی آن تفسیر شود. بخصوص اینکه تأثیر DTG بر تعداد پیوندهای هیدروژنی، تغییرات شعاع چرخشی انتگرز و تغییرات سطح قابل دسترس حلال آلی با یکدیگر کاملاً هم‌خوانی دارد.

نمودارهای شماره ۷ و ۸-الف و ۸-ب RMSF اتم‌های کربن انتگرز در حضور و غیاب داروها نشان می‌دهد که در حضور هر سه دارو، انعطاف‌پذیری انتگرز کاهش می‌یابد هرچند که در حضور DTG انعطاف‌پذیری ساختار کلی آنزیم و همچنین انعطاف‌پذیری لوپ انتگرز کاهش بیشتری نشان می‌دهد. از طرف دیگر با توجه به اینکه انعطاف‌پذیری لوپ تأثیر زیادی بر قدرت اتصال آنزیم به DNA ویروسی دارد، لذا با کاهش انعطاف‌پذیری این ناحیه ویژه توسط DTG، میل اتصال انتگرز به DNA ویروس کاهش بیشتری خواهد یافت.

پیشرفت تغییرات MSD (نمودار ۹) برای DTG با زمان کندتر از بقیه داروها می‌باشد که این از اتصال سریع و محکم DTG به جایگاه اتصالی و نفوذ کمتر آن حکایت می‌کند. از طرف دیگر تندتر بودن پیشرفت منحنی RAL با زمان نشان از عدم استقرار آن در جایگاه اتصالی دارد. روند تغییرات MSD با تغییرات RMSD برای برهمکنش دارو با پروتئین هم‌خوانی کامل داشته و قوی‌تر بودن اتصال DTG نسبت به دو داروی دیگر را تأیید می‌کند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که DTG نسبت به RAL و EVG داروی قوی‌تری می‌باشد. نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از

- bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *Journal of Medicinal Chemistry* **51**:5843-55.
16. Vajragupta, O., Boonchoong, P. (2002). New leads of hiv-1 integrase inhibitors. *Pharmaceutical Science* **29**:1-10
  17. van Lunzen, J., Maggiolo, F., Arribas, J.R., Rakhmanova, A., Yeni, P., Young, B., Rockstroh, J.K., Almond, S., Song, I., Brothers, C., Min, S. (2012). Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naive adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. *The Lancet Infectious Diseases* **12**:111-8
  - Patel, T.A., Nicklaus, M.C., Burke, T.R. Jr, Pommier, Y. (2003). Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C280S). *Molecular Pharmacology* **64**:600-9
  8. Marchand, C., Maddali, K., Métifiot, M., Pommier, Y. (2009). HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **9**:1016-37
  9. Marchand, C. (2012). The elvitegravir Quad pill: the first once-daily dual-target anti-HIV tablet. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **21**:901-4
  10. Métifiot, M., Maddali, K., Naumova, A., Zhang, X., Marchand, C., Pommier, Y. (2010). Biochemical and pharmacological analyses of HIV-1 integrase flexible loop mutants resistant to raltegravir. *Biochemistry* **49**:3715-22
  11. Métifiot, M., Vandegraaff, N., Maddali, K., Naumova, A., Zhang, X., Rhodes, D., Marchand, C., Pommier, Y. (2011). Elvitegravir overcomes resistance to raltegravir induced by integrase mutation Y143. *AIDS*, **25**:1175-8
  12. Molina, J.M., Lamarca, A., Andrade-Villanueva, J., Clotet, B., Clumeck, N., Liu, Y.P., Zhong, L., Margot, N., Cheng, A.K., Chuck, S.L. (2012). Efficacy and safety of once daily elvitegravir versus twice daily raltegravir in treatment-experienced patients with HIV-1 receiving a ritonavir-boosted protease inhibitor: randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority study. *The Lancet Infectious Diseases* **12**:27-35
  13. Savarino, A. (2007). In-Silico docking of HIV-1 integrase inhibitors reveals a novel drug type acting on an enzyme/DNA reaction intermediate. *Retrovirology* **4**:21-36
  14. Sepkowitz, K.A. (2001). AIDS--the first 20 years. *The New England Journal of Medicine* **344**:1764-72
  15. Summa, V., Petrocchi, A., Bonelli, F., Crescenzi, B., Donghi, M., Ferrara, M., Fiore, F., Gardelli, C., Gonzalez, Paz. O., Hazuda, D.J., Jones, P., Kinzel, O., Laufer, R., Monteagudo, E., Muraglia, E., Nizi, E., Orvieto, F., Pace, P., Pescatore, G., Scarpelli, R., Stillmock, K., Witmer, M.V., Rowley, M. (2008). Discovery of raltegravir, a potent, selective orally

## Simulation of HIV-I Integrase Interaction with its Inhibitors Using Molecular Dynamic Methods

*Dayer, M.R.\*<sup>1</sup>*

*1. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science,  
Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran*

*Received Date: 26 June 2015*

*Accepted Date: 25 January 2016*

---

### **Abstract**

*Application of newly designed enzyme inhibitors against viral enzymes is one of the modern and effective approaches in viral diseases treatment. Such inhibitors, by inactivating vital enzymes and interrupting viral proliferation, prevent the spread of infection. In this context, the HIV-1 integrase is of special importance. So far, three inhibitors against integrase were designed, approved and used clinically named: Raltegravir, Elvitegravir, and Dolutegravir. In present work and in order to study the action mechanisms for these inhibitors we at first performed serial docking experiments to find the best binding sites for these inhibitors and to extract their complexes with integrase. Next we simulated these complexes for 10ns period at native conditions to study inhibitors-integrase interactions. Our results indicate that Dolutegravir in contrast to other inhibitors exert more prominent effects on integrase structure. This inhibitor also reduced protein flexibility especially in protein flexible loop (residues 140 to 152) the phenomenon that leads to decreased affinity of integrase for viral DNA. Our findings confirmed that chemical structure of Dolutegravir seems to be a good candidate to constructing more effective analogues.*

**Keywords:** *AIDS, Molecular Dynamic Simulation, Integrase, Inhibitors, Raltegravir, Elvitegravir, Dolutegravir.*

---

*\*Corresponding author: Dayer, M.R.*

*Address: Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.*

*Tel: 06133331045*

*Email: mrdayer@scu.ac.ir*