

Определение инвариантных элементов структуры третьего переменного домена белка gp120 ВИЧ-1 методами молекулярного моделирования

Корноушенко Ю.В.*¹, Анищенко И.В.**², Тузиков А.В.#²,
Андрянов А.М.^¹

¹Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси, Минск,
220141, Республика Беларусь

²Объединенный институт проблем информатики, Национальная академия наук
Беларуси, Минск, 220012, Республика Беларусь

Аннотация. Методами молекулярного моделирования построены статические и динамические модели трехмерной структуры третьего переменного домена (петля V3) белка gp120 ВИЧ-1 для четырех различающихся по генетическим и биологическим свойствам модификаций вируса, циркулирующих в странах Восточной Европы, таких как Россия, Беларусь и Украина. Выполнен сравнительный анализ расчетных структур петли V3, позволивший установить ряд закономерностей в пространственной организации этого участка оболочки ВИЧ-1, образующего главную мишень для нейтрализующих антител, а также детерминанту, ответственную за внедрение вирусного генома в макрофаги и Т-лимфоциты. В результате показано, что, несмотря на генетическое разнообразие ВИЧ-1, петля V3 образует как минимум три консервативных структурных мотива, включающих аминокислоты белка gp120, критические для клеточного тропизма. Обнаруженные инвариантные элементы структуры петли V3 рассматриваются как перспективные мишени для создания новых противовирусных препаратов с широким диапазоном нейтрализующего действия.

Ключевые слова: ВИЧ-1, белок gp120, петля V3, трехмерная структура, компьютерное моделирование, консервативные структурные мотивы.

ВВЕДЕНИЕ

Белок *env* ВИЧ-1, являющийся этиологическим агентом СПИДа, в результате действия клеточной протеазы расщепляется на два домена, связанных между собой нековалентными взаимодействиями [1, 2]. Один из этих доменов – белок gp120, локализованный на поверхности вирусной частицы, принимает непосредственное участие в связывании вируса с клеткой-мишенью, а другой – трансмембранный компонент gp41, инициирует процесс слияния мембран, ведущий к проникновению вирусного генома в макрофаги и Т-лимфоциты [1, 2]. Специфические взаимодействия ВИЧ-1 с первичным рецептором вируса CD4 и с хемокиновыми корецепторами CCR5 и/или CXCR4 осуществляются через петли V1-V5 белка gp120. При этом особую роль в данном процессе играет третий переменный (V3) домен белка gp120 – петля V3,

*kornoushenko@iboch.bas-net.by

**anishchenko.ivan@gmail.com

#tuzikov@newman.bas-net.by

^andrianov@iboch.bas-net.by

образующая основную мишень для нейтрализующих антител, а также детерминанты, ответственные за клеточный тропизм и образование синцитиев [1–3]. Физико-химические свойства петли V3 объясняют тот факт, что в последние годы она стала объектом пристального внимания со стороны исследователей, занимающихся изучением принципов пространственной организации белков оболочки ВИЧ-1, знание которых необходимо для успешного выполнения проектов по созданию новых противовирусных препаратов [2, 3].

Впервые трехмерная структура белка gp120 ВИЧ-1, содержащего V3-домен, была определена методом рентгеноструктурного анализа Хуангом и соавторами [4]. Впоследствии этим методом были расшифрованы еще две структурные модели белка gp120 в комплексах с нейтрализующим антителом 412d и молекулой CD4 [5] и с CD4-связывающим участком антитела F105 [6]. Кроме того, в литературе описан ряд структурных комплексов пептидов петли V3 с Fab-фрагментами различных антител в кристалле [7–18], а также предложены модели V3-домена и его пептидов, построенные на основе данных спектроскопии ЯМР [19–36] и компьютерного моделирования [37–39].

Анализ данных литературы показывает, что они содержат противоречивую информацию о пространственной структуре петли V3 ВИЧ-1 (см., например, обзор [3]), что, очевидно, может быть объяснено высокой вариабельностью аминокислотной последовательности этого домена белка gp120 [40], обуславливающей значительные преобразования его структуры. Кроме того, в большинстве опубликованных работ проведены структурные исследования петли V3 ВИЧ-1 подтипа В, доминирующего в Северной Америке, Западной Европе и Австралии [41]. Однако для информационного обеспечения работ по конструированию анти-ВИЧ агентов с широким спектром терапевтического действия, основанного на блокаде петли V3, необходимо знание ее трехмерных структур в вирионах, циркулирующих в разных регионах мира.

Настоящая статья продолжает начатые нами ранее [38,42] теоретические исследования трехмерной структуры петли V3 в разных модификациях вируса. В этих исследованиях на основе сопоставления структурных моделей, построенных для консенсусных аминокислотных последовательностей петли V3 ВИЧ-1 подтипов А, В, С и D, было показано, что, несмотря на высокую конформационную подвижность, анализируемый домен белка gp120 образует ряд консервативных структурных мотивов, которые могут рассматриваться как перспективные мишени для создания эффективных противовирусных препаратов. Однако очевидно, что, перед практическим использованием петли V3 в качестве мишени для дизайна новых антивирусных средств, эти структурные данные, полученные для ее “искусственных” аминокислотных последовательностей, должны пройти всестороннее тестирование на природных изолятах ВИЧ-1.

Цель исследования: методами молекулярного моделирования построить трехмерные структуры петли V3 ВИЧ-1 для четырех различающихся по генетическим и биологическим свойствам вариантов ВИЧ-1 и провести их сравнительный анализ, направленный на выявление закономерностей в пространственной организации этого функционально важного участка белка gp120 оболочки ВИЧ-1.

Для достижения поставленной цели в работе решены следующие задачи:

1. Рассчитаны трехмерные структуры петли V3 для исследуемых вирионов ВИЧ-1 и выполнена оценка качества построенных молекулярных моделей.
2. Во всех случаях идентифицированы элементы вторичной структуры и нерегулярные участки петли V3.
3. Проведен сравнительный анализ расчетных структур в геометрических пространствах двугранных углов и декартовых координат атомов и идентифицированы структурно-жесткие сегменты V3-домена ВИЧ-1.

В результате показано, что мутации гена *env* на сегменте, кодирующем аминокислотную последовательность петли V3, инициируют ее существенную структурную реорганизацию. Однако, несмотря на различие пространственных форм в разных модификациях вируса, анализируемый участок белка gp120 образует три инвариантных элемента структуры, представленных β -изгибами полипептидной цепи, которые включают аминокислоты, критические для клеточного тропизма. В связи с этим высказано предположение о том, что именно этот тип вторичной структуры, часто используемый белками для реализации межмолекулярных взаимодействий [43], определяет специфичность связывания вируса с корцепторами чувствительных клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование пространственных структур петли V3 проводили в два этапа. На первом шаге расчетов применяли методы гомологичного моделирования. Нуклеотидные последовательности области гена *env*, соответствующей петле V3 белка gp120, для выбранных модификаций ВИЧ-1 заимствовали из базы данных Республиканского научно-практического центра (РНПЦ) эпидемиологии и микробиологии Министерства Здравоохранения Республики Беларусь и трансформировали их в аминокислотные последовательности (рис. 1) с помощью программы BioEdit (версия 7.0.9) [44]. При этом трехмерные структуры петли V3, установленные ранее с помощью спектроскопии ЯМР [32,34,35] и рентгеновской кристаллографии [4], представляли в расчетах шаблон, а ее первичные структуры – цель. Во всех случаях шаблон включал пять экспериментальных структур (“стартовых точек”). Краткие сведения об этих структурах приведены в табл. 1. Гомологичное моделирование выполняли с помощью компьютерной программы MODELLER [45,46]. В процессе моделирования налагали ограничения на геометрию дисульфидного мостика между инвариантными остатками Cys-1 и Cys-35 [47]. Для всех пар “стартовая точка”/цель генерировали набор структур, состоящий из 100 моделей, качество которых оценивали с помощью статистического потенциала DOPE, входящего в состав программных средств пакета MODELLER. На втором этапе расчетов из каждого набора отбирали лучшие по значению оценочной функции структуры, которые подвергали двухстадийной процедуре “имитационного отжига” в силовом поле Amber (набор параметров ff03) с использованием пакета Amber 10 [48]. Первую стадию расчетов проводили в вакууме, а вторую – в неявном растворителе; остальные параметры задавали одинаковыми в обоих случаях. В процессе отжига структуру нагревали до температуры 1000 К в течение 550 пс, после чего осуществляли расчет молекулярно-динамической траектории длительностью 100 пс в изотермических условиях. Далее структуру постепенно охлаждали до 0 К за интервал времени 800 пс; при этом общее время отжига составляло 1450 пс. Для численного решения уравнений движения использовали стандартную схему интегрирования “leapfrog” с шагом 0,5 пс на этапах нагрева и высокотемпературной динамики; на стадии охлаждения системы этот параметр равнялся 1,0 фс. Контроль температуры осуществляли с помощью термостата Ланжевена с частотой столкновений 10 пс^{-1} [48].

Вариант ВИЧ-1	5	10	15	20	25	30	35																												
N249-env-10	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	I	H	M	G	P	G	K	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
Мос-Det-Mn-10	C	I	R	P	N	N	N	T	R	T	S	I	R	I	G	P	G	Q	T	F	Y	A	L	G	G	V	I	G	D	I	R	R	A	H	C
N304-env	C	I	R	P	N	N	N	T	R	T	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	G	V	I	G	E	P	R	K	A	H	C
Scab-env-10	C	T	R	P	Y	N	N	T	R	K	G	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C

Рис. 1. Аминокислотные последовательности петли V3 для вариантов N249-env-10, Мос-Det-Mn-10, N304-env и Scab-env-10 ВИЧ-1. Желтым цветом выделены консервативные остатки петли V3.

Таблица 1. Структуры, использованные в качестве стартовых моделей для гомологичного моделирования петли V3 ВИЧ-1

№	Штамм вируса	Среда	Метод	Ссылка
1	HIV-MN	вода/трифторэтанол	ЯМР/компьютерное моделирование	[32]
2	HIV-Haiti	вода/трифторэтанол	ЯМР/компьютерное моделирование	
3	HIV-Haiti	Вода	ЯМР/компьютерное моделирование	[34]
4	HIV-MN	Вода	ЯМР/компьютерное моделирование	[35]
5	HIV-JR-FL	Кристалл	Рентгеноструктурный анализ	[4]

Полученные в результате “имитационного отжига” структуры с наименьшими значениями потенциальной энергии рассматривали как наиболее вероятные статические трехмерные модели петли V3 для соответствующих вариантов ВИЧ-1, а остальные четыре структуры использовали на завершающей стадии анализа для оценки динамических характеристик этого переменного домена белка gp120.

Для оценки качества построенных моделей привлекали программный комплекс PROCHECK [49]

Данные о двугранных углах ϕ , ψ аминокислотных остатков в оптимизированных моделях петли V3 использовали для определения элементов вторичной структуры. При идентификации β -изгибов использовали классификацию Хатчинсона и Торнтон [50], а также информацию о специфических межатомных расстояниях $C^{\alpha}_i \dots C^{\alpha}_{i+3}$, вычисленных из координат атомов расчетных структур.

Значение среднеквадратичного отклонения (RMSD) декартовых координат атомов (сRMSD) использовали в качестве меры подобия трехмерных структур, а для оценки их локального сходства в геометрическом пространстве двугранных углов привлекали величину RMSD между соответствующими углами (aRMSD) [51].

Расчеты выполняли на компьютерном кластере «СКИФ-ОИПИ» Объединенного института проблем информатики НАН Беларуси [52].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые вирионы ВИЧ-1 обозначены в базе данных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии как вирусные модификации N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Мос-Det-Mn-10. При этом вариант N304-env принадлежит к группе A1 подтипа А, широко распространенной в России, Беларуси и на Украине. В то же время штамм N249-env-10 ВИЧ-1 относится к подтипу В, также встречающемуся у ВИЧ-инфицированных, проживающих на территориях этих стран Восточной Европы, а вариант вируса Scab-env-10 представляет рекомбинантную форму CRF03_AB (по гену *env* – подтип В), играющую значительную роль в развитии пандемии ВИЧ-1 [53]. Наконец, изолят ВИЧ-1 Мос-Det-Mn-10 является уникальной рекомбинантной формой, относящейся по гену *env* к группе A1 подтипа А вируса [54].

Известно, что аминокислотная последовательность петли V3 детерминирует ряд биологических свойств ВИЧ-1, таких как способность образовывать синцитии и инфицировать определенные типы клеток, а также скорость репликации вируса [55]. Анализ аминокислотных последовательностей петли V3 показывает (см. рис. 1), что варианты N249-env-10 и Scab-env-10 представляют M-тропные штаммы ВИЧ-1. При этом модификация N249-env-10 вируса характеризуется высокой скоростью репликации и склонна к образованию синцитиев, а изоляты Scab-env-10 ВИЧ-1 не обладают этими биологическими свойствами. В то же время варианты N304-env и Мос-Det-Mn-10 предпочитают инфицировать T-клетки лимфоидного ряда, являются синцитийобразующими и высокорепликативными формами ВИЧ-1.

Таким образом, выбранные для исследования варианты ВИЧ-1 различаются по генетическим характеристикам и биологическим свойствам. Это обстоятельство придает дополнительный интерес к изучению трехмерных структур петли V3 в

рассматриваемых модификациях ВИЧ-1, а также к результатам их сравнительного анализа, направленного на выявление консервативных структурных мотивов в этом функционально значимом участке белка gp120 оболочки вируса.

На рис. 2 приведены наиболее вероятные трехмерные структуры петли V3 для вариантов N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 ВИЧ-1, построенные методами молекулярного моделирования на основе экспериментальных данных о ее аминокислотных последовательностях в этих модификациях вируса. Анализ расчетных структур свидетельствует о том, что они расположены в низкоэнергетических минимумах потенциальной поверхности петли V3 и удовлетворяют пространственным ограничениям на геометрию дисульфидного мостика Cys-1 – Cys-35, отвечая при этом общим критериям, традиционно используемым для оценки качества локальной геометрии структуры белковых молекул. Согласно результатам тестирования программой PROCHEK [49], во всех рассматриваемых структурах преобладающее число остатков локализовано в энергетически благоприятных областях карты Рамачандрана, а их двугранные углы χ_1 принимают значения, удовлетворяющие данным библиотеки ротамеров боковых цепей [56].

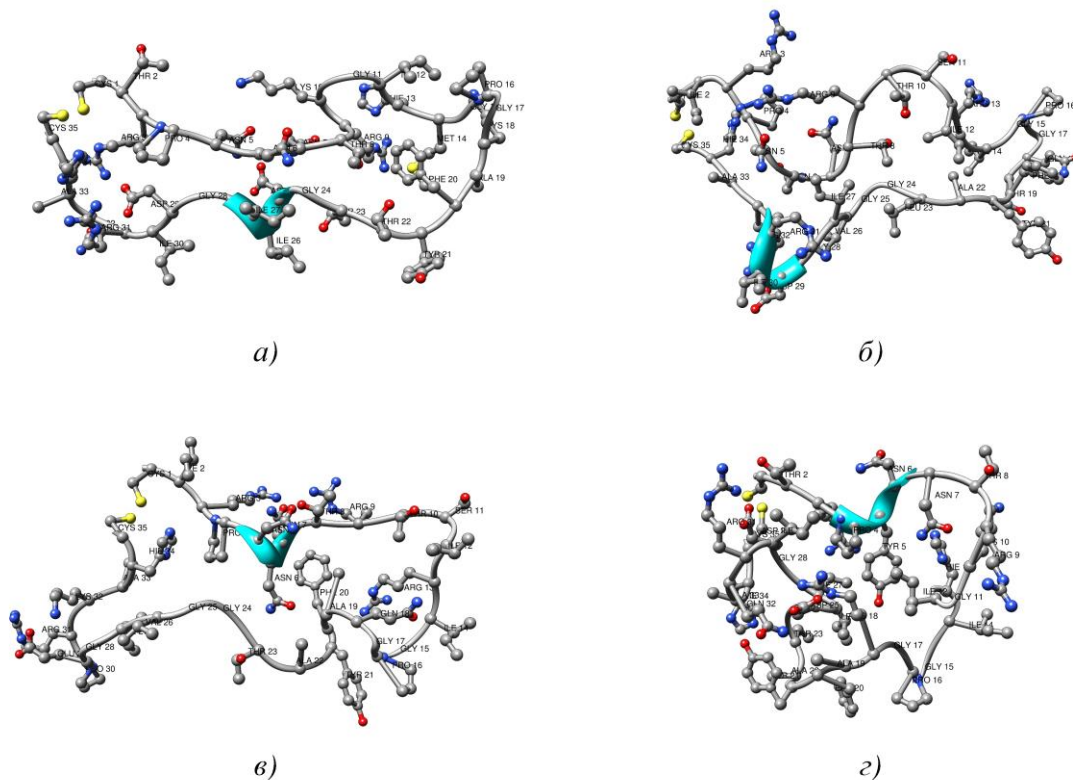


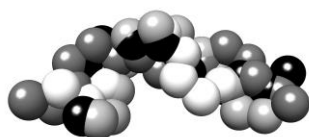
Рис. 2. Трехмерные структуры петли V3 для вариантов N249-env-10 (а), Moc-Det-Mn-10 (б), N304-env (в) и Scab-env-10 (г) ВИЧ-1.

Сравнительный анализ структур в геометрических пространствах декартовых координат атомов и двугранных углов указывает на значительные расхождения между ними. В наборе из всех возможных структурных пар величины cRMSD варьируют в интервале 5,1...8,7 Å, а соответствующие значения aRMSD изменяются в диапазоне 82...98° (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что в исследуемых вариантах ВИЧ-1 трехмерная структура петли V3 крайне чувствительна к мутациям нуклеотидной последовательности V3 варибельного района гена *env*, инициирующим существенную структурную реорганизацию анализируемого участка белка gp120 оболочки вируса.

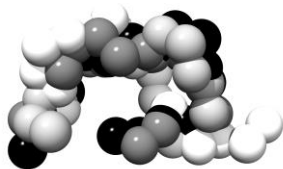
Таблица 2. Сравнительный анализ трехмерных структур петли V3 для вариантов N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 ВИЧ-1. Снизу от диагонали приведены величины cRMSD (Å), а сверху – соответствующие значения aRMSD (град).

Вариант ВИЧ-1	Moc-Det-Mn-10	N249-env-10	N304-env	Scab-env-10
Moc-Det-Mn-10	—	82	83	93
N249-env-10	5,1	—	98	91
N304-env	7,2	6,2	—	91
Scab-env-10	8,2	8,7	7,5	—

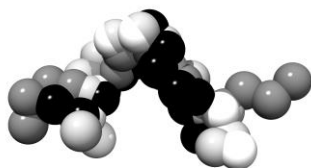
Аналогичный вывод был сделан нами в работе [42] в результате сравнительного анализа трехмерных структур петли V3, построенных методами молекулярного моделирования для консенсусных аминокислотных последовательностей V3-домена ВИЧ-1 подтипов А, В, С и D. Полученные в [42] данные показали, что петля V3 принимает разнообразные пространственные формы в различающихся вирионах ВИЧ-1, однако, несмотря на это, образует ряд инвариантных элементов структуры, которые могут рассматриваться как слабые звенья в системе защиты вируса. В связи с этим целесообразно сопоставить структуры отдельных фрагментов петли V3, реализующиеся в исследуемых вариантах ВИЧ-1. Сравнение трехмерных структур фрагментов различной длины петли V3 позволяет выделить 3 участка, имеющих наиболее близкую пространственную укладку во всех моделях анализируемого набора (рис. 3). Эти участки, один из которых располагается в центральной области 15–20 петли V3, а два других локализованы на ее N- и C- концевых сегментах 3–7 и 28–32, совпадают с теми, что были обнаружены нами в цитированной выше работе [42]. Этот результат, подтверждающий данные, полученные для консенсусных последовательностей петли V3 ВИЧ-1 с помощью методологических подходов, отличных от использованных в настоящем исследовании, представляет значительный интерес, поскольку указанные сегменты V3-домена ВИЧ-1 включают функционально важные аминокислоты белка gp120. Так, Arg-3 принимает участие в связывании вируса с молекулой CCR5 [57,58], а остаток Pro-4 встречается в большинстве модификаций ВИЧ-1, использующих корецептор CCR5 [57]. Кроме того, участок 3–7 включает один из потенциальных сайтов N-гликозилирования белка gp120 (консервативные остатки Asp в позициях 6 и/или 7 петли V3; рис. 1) [59], используемого вирусом для защиты от нейтрализующих антител [60, 61] и усиления его инфективности [62–65]. Центральная область 15–20 является неотъемлемой частью иммуногенной “короны” белка gp120, на долю которой приходится подавляющее число контактов с нейтрализующими антителами (см., например, [18]). Входящий в ее состав трипептид Gly-Pro-Gly, обнаруженный практически во всех известных последовательностях V3-домена [40], образует иммуногенную “верхушку” белка gp120, а остаток пролина участвует в клеточном тропизме [66,67]. В частности, в работе [66] было показано, что замена этого остатка на аланин приводит к заметным изменениям инфективности вируса. Сегмент 28-32 петли V3 содержит консервативный остаток Asp-29 [40], который оказывает влияние на интенсивность связывания CD4-активированного белка gp120 с корецептором CCR5 [68].



а)



б)



в)

Рис. 3. Совмещенные трехмерные структуры участков 3–7 (а), 15–20 (б) и 28–32 (в) петли V3 для вариантов N249-env-10, Мос-Det-Mn-10, N304-env и Scab-env-10 ВИЧ-1.

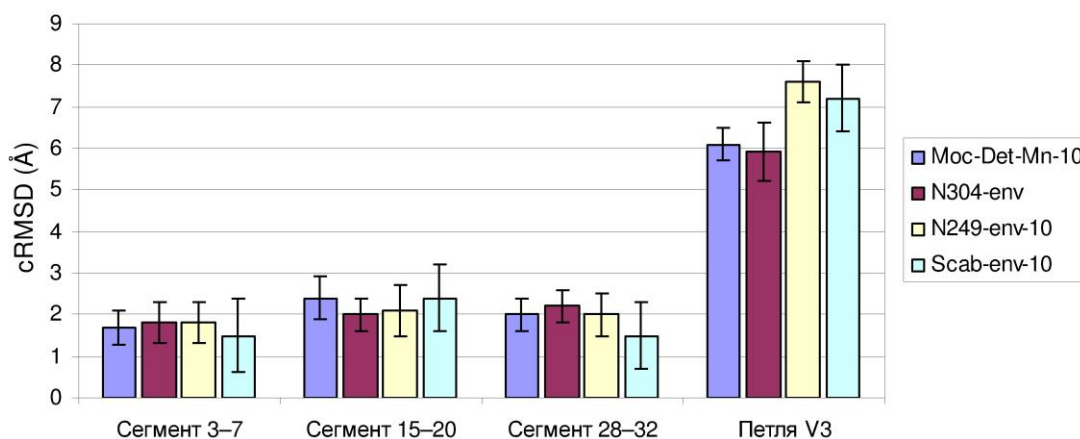
Следует, однако, отметить, что структурное сходство участков 3–7, 15–20 и 28–32 петли V3 ВИЧ-1 наблюдается только в пространстве декартовых координат атомов (табл. 3). Сравнивая их локальные структуры, можно заключить, что различия между ними являются статистически значимыми, а соответствующие значения aRMSD, усредненные по всем возможным структурным парам, составляют для сегментов 3–7, 15–20 и 28–32 соответственно 89, 96 и 93° (табл. 3). Данный факт означает, что подобные пространственные укладки анализируемых фрагментов петли V3 (рис. 3) формируются из разных локальных минимумов энергии входящих в их состав аминокислотных остатков, что свидетельствует об их высокой устойчивости, позволяющей сохранять трехмерную структуру в вариантах ВИЧ-1, различающихся по генетическим характеристикам и биологическим свойствам. Вероятно, консервативные структурные мотивы петли V3 используются вирусом в качестве “сигнальных” конформаций, необходимых для его узнавания рецепторами клеток-мишеней, а конформационная подвижность входящих в их состав аминокислот важна для реализации эффективных взаимодействий, способствующих надежной фиксации вирусной частицы на поверхности макрофагов и Т-лимфоцитов.

Таблица 3. Сравнительный анализ трехмерных структур фрагментов 3–7, 15–20 и 28–32 петли V3 для вариантов N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Мос-Det-Mn-10 ВИЧ-1.

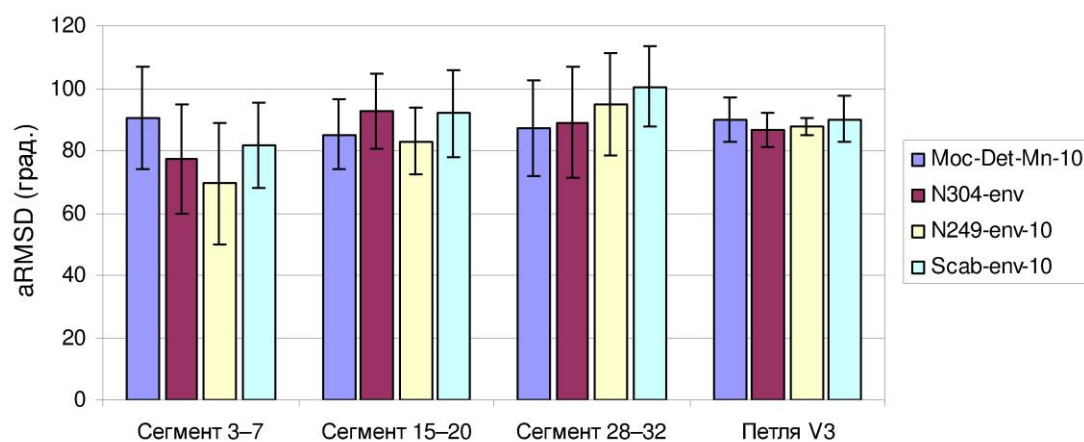
Фрагмент петли V3	<cRMSD>	cRMSD _{STD}	<aRMSD>	aRMSD _{STD}
3 – 7	1,8	0,40	89	10
15 – 20	2,3	0,63	96	13
28 – 32	1,9	0,70	93	10

Примечание: <cRMSD> и <aRMSD> – соответственно величины cRMSD (Å) и aRMSD (град), усредненные по всем возможным парам сравниваемых структур; cRMSD_{STD} и aRMSD_{STD} – соответствующие этим величинам стандартные отклонения.

Сравнительный анализ пяти динамических структур петли V3, рассчитанных для каждой из четырех исследуемых модификаций ВИЧ-1 (см. раздел “Методы”), приводит к выводу, аналогичному тому, который был сделан в результате сопоставления лучших по значению энергии представителей этих структурных ансамблей. Данные, приведенные на рис. 4, свидетельствуют о высокой конформационной подвижности петли во всех рассматриваемых наборах структур: средние значения cRMSD варьируют в интервале 5,9...7,6 Å, а соответствующие величины aRMSD составляют 87...90° (рис. 4).



а)



б)

Рис. 4. Значения cRMSD (а) и aRMSD (б), усредненные по пяти динамическим структурам петли V3 вариантов ВИЧ-1 N249-env-10, Moc-Det-Mn-10, N304-env и Scab-env-10. Приведены данные как для петли V3, так и для ее сегментов 3–7, 15–20 и 28–32. Вертикальными линиями показаны соответствующие величины стандартных отклонений.

Исследование динамических характеристик отдельных сегментов петли V3 разной длины показывает, что в большинстве случаев они также лабильны. Тем не менее, сравнение структур позволяет обнаружить ряд исключений из этого наблюдения, касающихся участков 3–7, 15–20 и 28–32, которые были идентифицированы выше как инвариантные элементы структуры V3-домена ВИЧ-1. Из анализа данных, представленных на рис. 4, следует, что эти участки

петли V3 не подвергаются существенным структурным преобразованиям в геометрическом пространстве декартовых координат атомов. В то же время, анализируя структурные изменения сегментов 3–7, 15–20 и 28–32 петли V3, необходимо отметить, что, несмотря на сохранение пространственных форм, их индивидуальные остатки обнаруживают значительный разброс двугранных углов основной цепи. При этом средние значения cRMSD изменяются от 1,5 до 2,4 Å, а величины aRMSD располагаются в диапазоне от 69 до 100° (рис. 4). Эти результаты согласуются с заключением, вытекающим из проведенного выше сопоставления статических моделей петли V3, согласно которому ее функционально важные сегменты 3–7, 15–20 и 28–32 могут сохранять сходные трехмерные структуры при различных конформационных состояниях их аминокислотных остатков.

Анализ двугранных углов в расчетных структурах показывает, что в исследуемых вариантах ВИЧ-1 петля V3 образует большое число β -изгибов полипептидной цепи (рис. 5), некоторые из которых были обнаружены на анализируемом участке белка gp120 с помощью спектроскопии ЯМР [32–35] и рентгеновской кристаллографии [4]. Согласно проведенным расчетам, в трех рассматриваемых модификациях вируса сегмент 4–7 петли V3 формирует конформацию β -изгиба, сходную со структурами, идентифицированными в этой области белка gp120 вирусных штаммов HIV-Haiti [32,34], HIV-MN [32, 35], HIV-Thailand и HIV-RF [33]. На участке 15–20 петли V3 в расчетных структурах вирусных модификаций N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 реализуются конформации одиночного или двойного β -изгибов (рис. 5), что согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [9], указывающими на то, что рассматриваемый фрагмент может принимать как минимум две конформации, одна из которых образует двойной β -изгиб, а другая – одиночный β -поворот. Исследование петли V3 ВИЧ-1 методами спектроскопии ЯМР показало, что на участке 15–20 вероятно появление и других конформационных состояний: динамической смеси двух конформеров – β -изгибов I и II [21–23], нестандартного β -поворота [24], а также двойного β -изгиба [25], аналогичного тому, который был обнаружен методом рентгеновской кристаллографии [10].

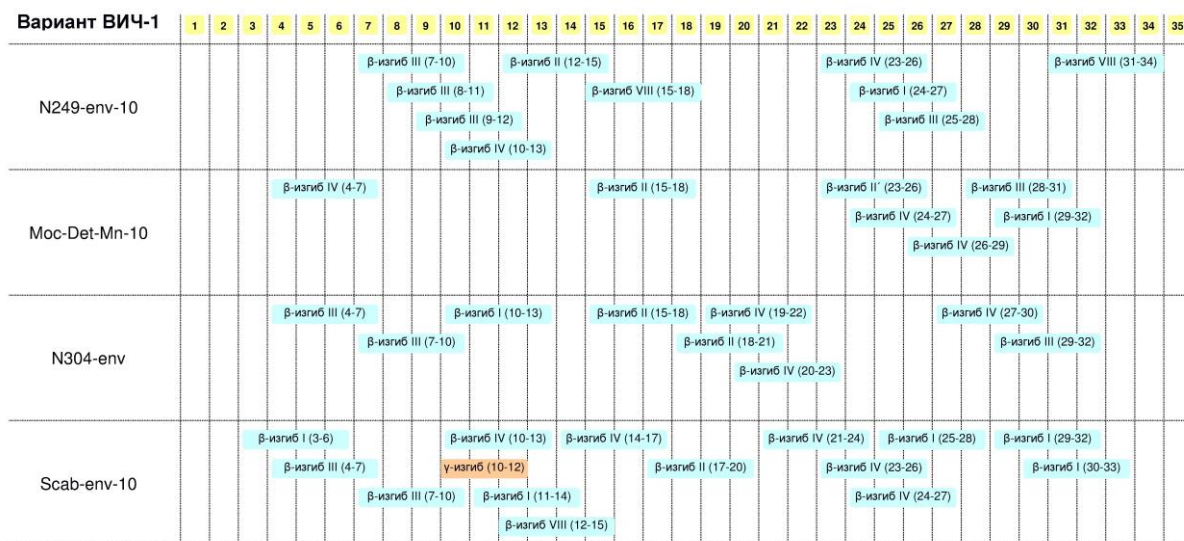


Рис. 5. Элементы вторичной структуры петли V3 для вариантов N249-env-10, Moc-Det-Mn-10, N304-env и Scab-env-10 ВИЧ-1.

По данным молекулярного моделирования, С-концевые фрагменты петли V3 вариантов N304-env, N249-env-10, Scab-env-10 и Moc-Det-Mn-10 ВИЧ-1 склонны к образованию свернутых структур – перекрывающихся β -изгибов (рис. 5), высокая вероятность реализации которых в этой области петли была предсказана на основе данных спектроскопии ЯМР и кругового дихроизма [69].

Завершая анализ вторичной структуры петли V3, необходимо отметить, что большинство аминокислот, критических для клеточного тропизма, локализовано в β -изгибах полипептидной цепи (рис. 5), которые, по-видимому, формируют структурную основу, обеспечивающую реализацию этого важного этапа репликационного цикла вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, структурные данные, полученные для вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Республике Беларусь, подтверждают результаты проведенного нами ранее конформационного анализа консенсусных последовательностей петли V3 ВИЧ-1 подтипов А, В, С и D [42] и согласуются с выводами, сделанными при изучении ее структур методами спектроскопии ЯМР и рентгеновской кристаллографии. Объединив результаты исследований, выполненных разными методами для различных модификаций вируса, можно утверждать, что, несмотря на генетическое разнообразие ВИЧ-1, петля V3 образует как минимум три консервативных структурных мотива, включающих функционально важные аминокислоты белка gp120, что объясняет ее исключительную роль в процессе клеточного тропизма. Очевидно, что эти инвариантные элементы структуры петли V3 ВИЧ-1 представляют “Ахиллесову пяту” вируса, и поэтому могут рассматриваться как перспективные мишени для создания эффективных лекарственных препаратов с широким диапазоном нейтрализующего действия.

Авторы выражают благодарность заведующему отделом клинической вирусологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Министерства Здравоохранения Республики Беларусь д.м.н. В.Ф. Еремину за предоставление данных о подтипах рассмотренных в работе вариантах ВИЧ-1 и нуклеотидных последовательностях областей гена *env*, кодирующих петлю V3 белка gp120.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект X10-017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hartley O., Klasse P.J., Sattentau Q.J. and Moore J.P. V3: HIV's Switch-Hitter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2005. V. 21. P. 171–189.
2. Sirois S., Sing T. and Chou K.C. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005. V. 6. P. 413–422.
3. Andrianov A.M. Human immunodeficiency virus-1 gp120 V3 loop for anti-acquired immune deficiency syndrome drug discovery: computer-aided approaches to the problem solving. *Expert Opin. Drug. Discov.* 2011. V. 6. P. 419–435.
4. Huang C.C., Tang M., Zhang M.Y., Majeed S., Montabana E., Stanfield R.L., Dimitrov D.S., Korber B., Sodroski J., Wilson I.A., Wyatt R. and Kwong P.D. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science*. 2005. V. 310. P. 1025–1028.
5. Huang C.C., Lam S.N., Acharya P., Tang M., Xiang S.H., Hussan S.S., Stanfield R.L., Robinson J., Sodroski J., Wilson I.A., Wyatt R., Bewley C.A. and Kwong P.D. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science*. 2007. V. 317. P. 1930–1934.
6. Chen L., Do Kwon Y., Zhou T., Wu X., O'Dell S., Cavacini L., Hessel A. J., Pancera M., Tang M., Xu L., Yang Z.-Y., Zhang M.-Y., Arthos J., Burton D.R., Dimitrov D.S.,

- Nabel G.J., Posner M.R., Sodroski J., Wyatt R., Mascola J.R. and Kwong P.D. Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science*. 2009. V. 326. P. 1123–1127.
7. Rini J.M., Stanfield R.L., Stura E.A., Salinas P.A., Profy A.T. and Wilson I.A. Crystal structure of a human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody, 50.1, in complex with its V3 loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 6325–6329.
 8. Ghiara J.B., Stura E.A., Stanfield R.L., Profy A.T. and Wilson I.A. Crystal structure of the principal neutralization site of HIV-1. *Science*. 1994. V. 264. P. 82–85.
 9. Stanfield R.L., Cabezas E., Satterthwait A.C., Stura E.A., Profy A.T. and Wilson I.A. Dual conformations for the HIV-1 gp120 V3 loop in complexes with different neutralizing Fabs. *Structure*. 1999. V. 7. P. 131–142.
 10. Stanfield R.L., Ghiara J.B., Saphire E.O., Profy A.T. and Wilson I.A. Recurring conformation of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop. *Virology*. 2003. V. 315. P. 159–173.
 11. Stanfield R.L., Gorny M.K., Williams C., Zolla-Pazner S. and Wilson I.A. Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure*. 2004. V. 12. P. 193–204.
 12. Ding J., Smith A.D., Geisler S.C., Ma X., Arnold G.F. and Arnold E. Crystal structure of a human rhinovirus that displays part of the HIV-1 V3 loop and induces neutralizing antibodies against HIV-1. *Structure*. 2002. V. 10. P. 999–1011.
 13. Stanfield R.L., Gorny M.K., Zolla-Pazner S. and Wilson I.A. Crystal structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) neutralizing antibody 2219 in complex with three different V3 peptides reveal a new binding mode for HIV-1 cross-reactivity. *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 6093–6105.
 14. Bell C.H., Pantophlet R., Schiefner A., Cavacini L.A., Stanfield R.L., Burton D.R. and Wilson I.A. Structure of antibody F425-B4e8 in complex with a V3 peptide reveals a new binding mode for HIV-1 neutralization. *J. Mol. Biol.* 2008. V. 375. P. 969–978.
 15. Dhillon A.K., Stanfield R.L., Gorny M.K., Williams C., Zolla-Pazner S. and Wilson I.A. Structure determination of an anti-HIV-1 Fab 447-52D-peptide complex from an epitaxially twinned data set. *Acta Crystallogr., Sect D*. 2008. V. 64. P. 792–802.
 16. Burke V., Williams C., Sukumaran M., Kim S., Li H., Wang X., Gorny M., Zolla-Pazner S. and Kong X. Structural basis of the cross-reactivity of genetically related human anti-HIV-1 mAbs: implications for design of V3-based immunogens. *Structure*. 2009. V. 17. P. 1538–1546.
 17. Totrov M., Jiang X., Kong X.P., Cohen S., Krachmarov C., Salomon A., Williams C., Seaman M.S., Cardozo T., Gorny M.K., Wang S., Lu S., Pinter A. and Zolla-Pazner S. Structure-guided design and immunological characterization of immunogens presenting the HIV-1 gp120 V3 loop on a CTB scaffold. *Virology*. 2010. V. 405. P. 513–523.
 18. Jiang X., Burke V., Totrov M., Williams C., Cardozo T., Gorny M.K., Zolla-Pazner S. and Kong X.P. Conserved structural elements in the V3 crown of HIV-1 gp120. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 955–961.
 19. Catasti P., Fontenot J.D., Bradbury E.M. and Gupta G. Local and global structural properties of the HIV_{MN} V3 loop. *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 2224–2232.
 20. Gupta G., Anantharamaiah G.M., Scott D.R., Eldridge J.H. and Myers G. Solution structure of the V3 loop of a Thailand HIV isolate. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1993. V. 11. P. 345–366.
 21. Vu H.M., de Lorimier R., Moody M.A., Haynes B.F. and Spicer L.D. Conformational preference of a chimeric peptide HIV-1 immunogen from the C4-V3 domains of gp120 envelope protein of HIV CANOA based on solution NMR: comparison to a related immunogenic peptide from HIV-1 RF. *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 5158–5165.

22. Vranken W.F., Budesinsky M. and Martins J.C. Conformational features of a synthetic cyclic peptide corresponding to the complete V3 loop of the RF HIV-1 strain in water and water/trifluoroethanol solutions. *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 236. P. 100–108.
23. Sarma A.V., Raju T.V. and Kunwar A.C. NMR study of the peptide present in the principal neutralizing determinant (PND) of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1997. V. 34. P. 83–98.
24. Tolman R.L., Bednarek M.A., Johnson B.A., Leanza W., Marburg S., Underwood D.J., Emini E.A. and Conley A.J. Cyclic V3 loop-related HIV-1 conjugate vaccines. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1993. V. 41. P. 455–466.
25. Jelinek R., Terry T.D., Gesell J.J., Malik P., Perham R.N. and Opella S. NMR structure of the principal neutralizing determinant of HIV-1 displayed in filamentous bacteriophage coat protein. *J. Mol. Biol.* 1997. V. 266. P. 649–655.
26. Vranken W.F., Fant F., Budesinsky M. and Borremans F.A.M. Conformational model for the consensus V3 loop of the envelope protein gp120 of HIV-1 in a 20% trifluoroethanol/water solution. *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 2620–2628.
27. Andrianov A.M. Global and local structural properties of the principal neutralizing determinant of the HIV-1 envelope protein gp120. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1999. V. 16. P. 931–953.
28. Andrianov A.M. Local structural properties of the V3 loop of Thailand HIV-1 isolate. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2002. V. 19. P. 973–990.
29. Andrianov A.M. and Sokolov Yu.A. Structure and polymorphism of the principal neutralization site of Thailand HIV-1 isolate. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2003. V. 20. P. 603–614.
30. Andrianov A.M. and Sokolov Yu.A. 3D structure model of the principal neutralizing epitope of Minnesota HIV-1 isolate. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2004. V.21. P. 577–590.
31. Andrianov A.M. Dual spatial folds and different local structures of the HIV-1 immunogenic crown in various virus isolates. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2004. V. 22. P. 159–170.
32. Andrianov A.M. and Veresov V.G. Determination of structurally conservative amino acids of the HIV-1 protein gp120 V3 loop as promising targets for drug design by protein engineering approaches. *Biochemistry (Moscow)*. 2006. V. 71. P. 906–914.
33. Andrianov A.M. Study on Conformational Homology of the HIV-1 gp120 Protein V3 Loop. Structural Analysis of the HIV-RF and HIV-Thailand Viral Strains. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2007. V. 1. P. 125–130.
34. Andrianov A.M. and Veresov V.G. Structural analysis of the HIV-1 gp120 V3 loop: application to the HIV-Haiti isolates. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2007. V. 24. P. 597–608.
35. Andrianov A.M. Determining the Invariant Structure Elements of the HIV-1 Variable V3 Loops: Insight into the HIV-MN and HIV-Haiti Isolates. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2008. V. 26. P. 247–254.
36. Andrianov A.M. Computational anti-AIDS drug design based on the analysis of the specific interactions between immunophilins and the HIV-1 gp120 V3 loop. Application to the FK506-binding protein. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2008. V. 26. P. 49–56.
37. Andrianov A.M. Immunophilins and HIV-1 V3 loop for structure-based anti-AIDS drug design. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2009. V. 26. P. 445–454.
38. Andrianov A.M. and Anishchenko I.V. Computational Model of the HIV-1 Subtype A V3 Loop: Study on the Conformational Mobility for Structure-Based Anti-AIDS Drug Design. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2009. V. 27. P. 179–194.
39. Andrianov A.M. and Anishchenko I.V. Computer-assisted anti-AIDS drug development: cyclophilin B against the HIV-1 subtype A V3 loop. *Health*. 2010. V. 2. P. 56–65.

40. 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. and Putney S.D. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science*. 1990. V. 249. P. 932–935.
41. Kartikeyan S., Bharmal R.N., Tiwari R.P. and Bisen P.S. *HIV and AIDS: Basic Elements and Priorities*. Netherlands: Springer, 2007. P. 428.
42. Andrianov A.M., Anishchenko I.V. and Tuzikov A.V. Discovery of novel promising targets for anti-AIDS drug developments by computer modeling: application to the HIV-1 gp120 V3 loop. *J. Chem. Inf. Model.* 2011. V. 51. P. 2760–2767.
43. Smith, J.A. and Pease L.J. Reverse turns in peptides and proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1980. V. 8. P. 315–399.
44. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html> (accessed 28 December 2011).
45. Sali A. and Blundell T.L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. P. 779–815.
46. Fiser A., Do R.K. and Sali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*. 2000. V. 9. P. 1753–1773.
47. Leonard C.K., Spellman M.W., Riddle L., Harris R.J., Thomas J.N. and Gregory, T.J. Assignment of intra-chain disulfide bond and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 10373–10382.
48. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Kolossváry I., Wong K.F., Paesani F., Vanicek J., Wu X., Brozell S.R., Steinbrecher T., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Mathews D.H., Seetin M.G., Sagui C., Babin V. and Kollman P.A. *AMBER 10*. San Francisco: University of California, 2008.
49. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. and Thornton J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 1993. V. 26. P. 283–291.
50. Hutchinson E.G. and Thornton J.M. PROMOTIF – a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 212–220.
51. Sherman S.A. and Johnson M.E. Derivation of locally accurate spatial protein structure from NMR data. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1993. V. 59. P. 285–339.
52. Абламейко С.В., Абрамов С.М., Анищенко В.В., Медведев С.В., Парамонов Н.Н., Чиж О.П. *Суперкомпьютерные конфигурации СКИФ*. Минск: Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, 2005. 170 с.
53. Liitsola K., Laukkanen T., Mashkilleyson N., Brummer-Korvenkontio H., Vanhatalo J., Leinikki P., Salminen M.O., Tashkinova I., Momot O., Korovina G., Smolskaja T. and Chaplinskias S. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS*. 1998. V. 12. P. 1907–1919.
54. Eremin V.F., Gasich E.L. and Sasinovich S.V. A new unique recombinant HIV-1 isolated from child born from HIV-infected mother. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011. V. 27. P. 1323–1326.
55. Shankarappa R., Margolick J.B., Gange S.J., Rodrigo A.G., Upchurch D., Farzadegan H., Gupta P., Rinaldo C.R., Learn G.H., He X., Huang X.-L. and Mullins J.I. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virology*. 1999. V. 73. P. 10489–10502.
56. Dunbrack R.L.Jr. and Karplus M. Backbone-dependent rotamer library for proteins. Application to side-chain prediction. *J. Mol. Biol.* 1993. V. 230. P. 543–74.

57. de Parseval A., Bobardt M.D., Chatterji A., Chatterji U., Elder J.H., David G., Zolla-Pazner S., Farzan M., Lee T.H. and Galloway P.A. A highly conserved arginine in gp120 governs HIV-1 binding to both syndecans and CCR5 via sulfated motifs. *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 39493–39504.
58. Wang W.K., Dudek T., Zhao Y.J., Brumblay H.G., Essex M. and Lee T.H. CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998. V. 95. P. 5740–5745.
59. Ogert R.A., Lee M.K., Ross W., Buckler-White A., Martin M.A. and Cho M.W. N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J. Virol.* 2001. V. 75. P. 5998–6006.
60. McCaffrey R.A., Saunders C., Hensel M. and Stamatatos L. N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 3279–3295.
61. Teeraputon S., Louisirirojchanakul S. and Auewarakul P. N-linked glycosylation in C2 region of HIV-1 envelope reduces sensitivity to neutralizing antibodies. *Viral Immunol.* 2005. V. 18. P. 343–353.
62. Li Y., Rey-Cuille M.A. and Hu S.L. N-linked glycosylation in the V3 region of HIV type 1 surface antigen modulates coreceptor usage in viral infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2001. V. 17. P. 1473–1479.
63. Malenbaum S.E., Yang D., Cavacini L., Posner M., Robinson J. and Cheng-Mayer C. The N-terminal V3 loop glycan modulates the interaction of clade A and B human immunodeficiency virus type 1 envelopes with CD4 and chemokine receptors. *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 11008–11016.
64. Pollakis G., Kang S., Kliphuis A., Chalaby M. I., Goudsmit J. and Paxton W.A. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 13433–13441.
65. Polzer S., Dittmar M.T., Schmitz H., Meyer B., Muller H., Krausslich H.G. and Schreiber M. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology.* 2001. V. 11. P. 11–19.
66. Ivanoff L.A., Looney D.J., McDanal C., Morris J.F., Wong-Staal F., Langlois A.J., Petteway S.R.Jr. and Matthews T.J. Alteration of HIV-1 infectivity and neutralization by a single amino acid replacement in the V3 loop domain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1991. V. 7. P. 595–603.
67. Lee S.K., Pestano G.A., Riley J., Hasan A.S., Pezzano M., Samms M., Park K.J., Guyden J. and Boto W.M. A single point mutation in HIV-1 V3 loop alters the immunogenic properties of rgp120. *Arch. Virol.* 2000. V. 145. P. 2087–2103.
68. Hu Q., Napier K.B., Trent J.O., Wang Z., Taylor S., Griffin G.E., Peiper S.C. and Shattock R.J. Restricted variable residues in the C-terminal segment of HIV-1 V3 loop regulate the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J. Mol. Biol.* 2005. V. 350. P. 699–712.
69. Chandrasekhar K., Profy A.T. and Dyson H.J. Solution conformational preferences of immunogenic peptides derived from the principal neutralizing determinant of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 9187–9194.

Материал поступил в редакцию 12.12.2011, опубликован 30.12.2011.