

بینش مولکولی رفتار داروهای بوسیپروویر، سیمپروویر و ونیپروویر در میان کنش با پروتئاز NS3/4A ویروس هپاتیت C در دو حالت وحشی و جهش یافته A156G: شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

هانیه سالاری¹، پرویز عبدالمالکی^{2*}

1- کارشناسی ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: صندوق پستی: 14115-154، ایمیل: parviz@modares.ac.ir

پذیرش: 1402/11/23

دریافت: 1401/10/28

چکیده

سرین پروتئاز NS3/4A ویروس هپاتیت C یک هدف دارویی مهم برای درمان بیماران مبتلا به ویروس هپاتیت C است. با این حال، جهش اسید آمینه‌های آن به‌ویژه A156G به‌طور معمول منجر به ظهور سریع مقاومت دارویی می‌شود. داروهای بوسیپروویر، سیمپروویر و ونیپروویر از داروهای تأییدشده FDA، پروفایل‌های مقاومتی متمایز در برابر جهش A156G پروتئاز NS3/4A ویروس هپاتیت C از خود نشان می‌دهند. به‌منظور نشان‌دادن رفتار هریک از این داروها در میان‌کنش با پروتئاز NS3/4A در حالت وحشی و جهش یافته A156G شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و محاسبات انرژی آزاد اتصال بر هریک از داروها در میان‌کنش با پروتئاز NS3/4A در هر دو حالت وحشی و جهش یافته انجام شد. محاسبات انرژی آزاد اتصال مبتنی بر مکانیک مولکولی مساحت سطح پواسون - بولتزمن نشان داد که تمایل‌های اتصال هریک از داروها در میان‌کنش با پروتئاز NS3/4A در حالت وحشی تا حدود زیادی بیشتر از میان‌کنش با پروتئاز در حالت جهش یافته A156G است. محاسبه چشم‌اندازهای انرژی آزاد (FEL) مشخص کرد که در حضور هریک از داروها در میان‌کنش با پروتئاز وحشی و جهش یافته حوضه‌های انرژی بیشتری در مقایسه با پروتئاز در حالت آزاد تشکیل می‌شود. امیدواریم داده‌های ما بتواند بینش‌های مفیدی را برای طراحی یک داروی بازدارنده کارآمد جدید برای درمان بیماران مبتلا به ویروس هپاتیت C ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: ویروس هپاتیت C، پروتئاز NS3/4A، نوع جهش یافته، نوع وحشی.

1- مقدمه

هپاتیت C یک بیماری پیچیده کبدی است. این بیماری به دلیل ماهیت گسترده و بار جهانی آن، همواره توجه زیادی را برای بینش عامل ایجادکننده آن، ویروس هپاتیت C (HCV) و توسعه رویکردهای درمانی جدید به خود جلب کرده است. حتی پس از گذشت بیش از 30 سال از کشف آن، HCV همچنان عامل اصلی نگرانی و بار بزرگی بر سیستم‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان است. سازمان جهانی بهداشت تخمین می‌زند که حداقل 3 درصد از جمعیت جهان به‌طور مزمن به HCV آلوده هستند. تخمین زده می‌شود که سالیانه 3 تا 4 میلیون عفونت جدید در جهان رخ می‌دهد [1-3].

این ویروس در دو مرحله باعث عفونت می‌شود، اول شامل حمله حاد است که چند هفته طول می‌کشد و اگر درمان نشود ممکن است برای مدت طولانی باقی بماند که هپاتیت C مزمن نامیده می‌شود. این عفونت مزمن اغلب ممکن است به بیماری مزمن کبدی منجر شود که در نهایت ممکن است به نارسایی کبدی منجر شود. عفونت مداوم ویروس با HCV اغلب منجر به سیروز و کارسینوم کبدی می‌شود [4].

هپاتیت C یک ویروس RNA تک‌رشته‌ای است که متعلق به خانواده فلاویویریدها است. در سال 1989 HCV به‌عنوان عامل اصلی هپاتیت C شناسایی شد [5]. HCV یک ویروس کوچک (55-65 نانومتر)، کروی‌شکل، پوشش‌دار، ویروس RNA کبدی که باعث هپاتیت حاد و مزمن در انسان می‌شود [6]. این یک زنجیره پروتئینی متشکل از 3010 اسید آمینه را کد می‌کند و حاوی پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری می‌باشد [7؛ 8]. HCV متشکل از یک ژنوم RNA مثبت تک‌رشته‌ای 9,6 کیلوبایتی با 50 ناحیه ترجمه‌نشده (UTR) است که به‌عنوان یک محل ورودی ریبوزوم داخلی عمل می‌کند، یک قاب خواندن باز و منفرد که

پلی‌پروتئینی از حدود 3000 اسید آمینه و 30 UTR را کد می‌کند. این پلی‌پپتید پس از ترجمه به‌وسیله پپتیدازهای سلول میزبان (پروتئازها) برای تولید سه پروتئین ساختاری به نام‌های E1، E2، Core و به‌وسیله پروتئین‌های ویروسی که هفت پروتئین غیرساختاری (NS) به نام‌های NS2، NS3، NS4a، NS4b، NS4a، NS4b، NS5B را تولید می‌کنند، جدا می‌شود [9-13]. براساس قیاس با ویروس‌های RNA رشته‌ای مثبت مرتبط، همانندسازی با استفاده از یک واسطه RNA رشته‌ای منفی رخ می‌دهد و به‌وسیله پروتئین‌های NS کاتالیز می‌شود که یک کمپلکس رپلیکاز مرتبط با غشای سیتوپلاسمی را تشکیل می‌دهند [14].

پروتئاز سرین NS3/4A هپاتیت C یک پروتئین کلیدی متشکل از یک زیرواحد کاتالیزوری (یک سوم N-ترمینال از پروتئین NS3) و یک کوفاکتور فعال‌کننده (پروتئین NS4A) است که چهار مکان شناخته‌شده را در امتداد پلی‌پروتئین ویروسی هیدرولیز می‌کند، بنابراین پروتئین غیرساختاری تولید می‌کند که برای بلوغ ویروس، تکثیر RNA و در نتیجه همانندسازی ویروس ضروری هستند [15-18].

نکته مهم، برش پروتئولیتیک پلی‌پروتئین HCV به پروتئین‌های غیرساختاری مانند NS4A، 4B، 5A و 5B بیشتر به‌وسیله پروتئاز NS3/4A کاتالیز می‌شود. سه‌گانه کاتالیزوری HCV NS3 شامل سه اسید آمینه ضروری، یعنی His57، Asp81 و Ser139 است که در کاتالیز اسید-باز روی پپتیدهای هدف نقش دارند و به‌شدت در بین تمام توالی‌های مشتق‌شده از HCV حفظ می‌شوند [19]. علاوه بر این، یک کوفاکتور پپتیدی متصل (NS4A) فعالیت پروتئاز را تقریباً 1000 برابر افزایش می‌دهد [20]. DDAها ملکول‌های کوچکی هستند که هدف آنها پروتئین‌های خاص در چرخه سلولی ویروس می‌باشد [21]. در سال 2011، اولین موج از DAAsها، مهارکننده‌های پروتئاز NS3/4A تلاپرویر و بوسپرویر در

دسترس قرار گرفت. ارتباط این مهارکننده‌های پروتئاز با PEGIFN- α /RBV باعث بهبود نرخ پاسخ ویروسی پایدار در بین بیماران مبتلا به عفونت ژنوتیپ 1 HCV شد [24-22].

درمان فعلی ضد HCV شامل استفاده طولانی مدت از داروهای ضد ویروسی است که با پاکت‌های اتصال سویسترای NS3/4A تعامل دارند، اما این مناطق اتصال با چندین جهش رایج مانند R155K/Q، Q80K/R، A156T و D168A/V/T/H در نهایت می‌تواند باعث مقاومت دارویی، تغییر نحوه عملکرد و ایجاد واکنش‌های نامطلوب دارویی شود [21؛ 25-27].

چه در محیط آزمایشگاهی و چه در موارد بالینی شش جایگاه جهش عمده که شامل موقعیت‌های 36، 54، 155، 156، 168 و 170 در پروتئاز NS3 می‌باشد، گزارش شده است که درصد مقاومت متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. در این بین جهش‌های تک جایگاه R155، A156 و D168 نسبت به تمامی مهارکننده‌ها در پیشرفت‌های بالینی مقاومت نشان داده‌اند [21-22].

هدف از این مطالعه بررسی رفتار داروی‌های بوسپروویر، ونیپروویر و سیمپروویر در میان‌کنش با پروتئاز NS3/4A در دو حالت وحشی و جهش‌یافته A156G با استفاده از روش‌های شبیه‌سازی داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

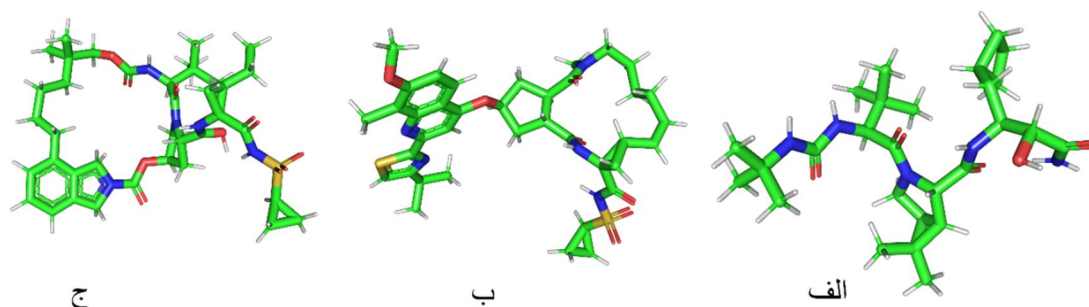
1-2 آماده‌سازی ساختار پروتئاز NS3/4A در دو حالت وحشی و جهش‌یافته (A156G)

در این پژوهش ساختار سه‌بعدی پروتئاز NS3/4A از بانک اطلاعاتی پروتئین (<https://www.rcsb.org>) با کد 6CVW استخراج شد. در حالت وحشی مولکول‌های اضافه شامل آب، یون‌ها و لیگاند موجود در ساختار حذف شد و جعبه شبیه‌سازی به اندازه $7/9 \times 7/9 \times 7/9$ نانومتر برای انجام شبیه‌سازی آماده شد. جعبه شبیه‌سازی شامل پروتئاز NS3/4A، آب و یون سدیم و کلر می‌باشد. برای پروتئاز در حالت جهش‌یافته با استفاده از وب سرور CHARMM_GUI (www.charmm-gui.org) مدل جهش‌یافته پروتئاز NS3/4A با جایگزینی اسیدآمینه آلانین با اسیدآمینه گلیسین در موقعیت 156 پروتئاز NS3/4A از پروتئین حالت وحشی آن (6CVW) ساخته شد. در ادامه همانند حالت وحشی جعبه شبیه‌سازی شامل پروتئاز جهش‌یافته، آب و یون‌های سدیم و کلر با استفاده از ماژول‌های گرومکس به اندازه $7/9 \times 7/9 \times 7/9$ نانومتر ایجاد شد.

برای هریک از سیستم‌های آماده شده به منظور بررسی پایداری ساختار حالت وحشی و جهش‌یافته پروتئاز به مدت 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با شرایط یکسان به صورت جداگانه انجام شد.

2-2 آماده‌سازی ساختار لیگاندها

ساختار سه داروی انتخابی شامل بوسپروویر، سیمپروویر و ونیپروویر به فرمت SDF از تارنمای PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شد. سپس هریک از ساختارها با استفاده از نرم‌افزار کایمرا [28] به فرمت PDB تبدیل شدند (شکل 1). پارامترهای توپولوژی هریک از داروها با استفاده از تارنمای swissparam (www.swissparam.ch) به دست آمد.



شکل 1 ساختار سه بعدی داروهای انتخابی
الف - بوسپرویر؛ ب - سیمپرویر؛ ج - ونپرویر

2-3 شبیه سازی داکینگ مولکولی

در این مطالعه برای انجام داکینگ از وب سرور CBdock استفاده شد [29]. این روش پنج مود اتصال مختلف را براساس پارامتری به نام عدد وینا (میزان تمایل مولکول کوچک برای اتصال به پروتئین) کلاسه بندی می کند. براساس عدد وینا بهترین کمپلکس دارویی در هر سری از ران داکینگ مولکولی به عنوان ساختار اولیه برای انجام شبیه سازی ها برگزیده شد. ساختار پروتئاز NS3/4A در هر دو حالت وحشی و جهش یافته به دست آمده از 100 نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی کلاسیک برای محاسبه های داکینگ مولکولی استفاده شدند.

2-4 شبیه سازی دینامیک مولکولی

برای درک رفتار هریک از داروهای انتخابی بر پروتئاز NS3/4A در هر دو حالت وحشی و جهش یافته روی هریک از کمپلکس های به دست آمده از محاسبه های داکینگ مولکولی به مدت 100 نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی انجام شد. در ادامه خروجی تمام مسیر هریک از محاسبه های شبیه سازی دینامیک مولکولی برای آنالیز رفتار لیگاندها استفاده شد.

تمام شبیه سازی ها با استفاده از بسته ی نرم افزاری گرومکس 2023 [30] و پارامترهای میدان نیروی چارم 36 [31] انجام شد. در آغاز با استفاده از موتور دینامیک

مولکولی، مرحله کمیته سازی انرژی با استفاده از الگوریتم STEEP انجام گرفت.

سپس مرحله تعادل سازی هریک از سیستم ها روی خروجی مرحله کمیته سازی انرژی در جامعه آماری NVT برای رسیدن هریک از سیستم های شبیه سازی به دمای پایدار و تنظیم شده 300 کلوین به مدت 1000 پیکوثانیه با استفاده از الگوریتم های برندنس ترموستات [32] انجام شد.

در ادامه هریک از سیستم ها به طور جداگانه در دمای 300 کلوین و فشار 1 اتمسفر در جامعه آماری NPT در طول 1000 پیکوثانیه با استفاده از الگوریتم پارینلو رحمان بارسات [33] تحت فشار قرار گرفتند.

سرانجام در مرحله پایانی شبیه سازی به منظور پایدار سازی سیستم ها، شبیه سازی دینامیک مولکولی به مدت 100 نانو ثانیه و با اعمال شرایط مرزی دوره ای (PBC) انجام گرفت. الگوریتم LINCS [34] برای محدود کردن تمام طول پیوندها در شبیه سازی و الگوریتم PME [35] برای میان کنش های الکتروستاتیک با محدوده برهم کنش های غیرپیوندی 1 نانومتر تنظیم و محاسبه شد.

3- نتایج و بحث

3-1 پایداری ساختار پروتئاز NS3/4A در دو حالت

وحشی و جهش یافته A156G

برای سنجش پایداری و فشردگی ساختاری هریک از ساختارهای وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A در

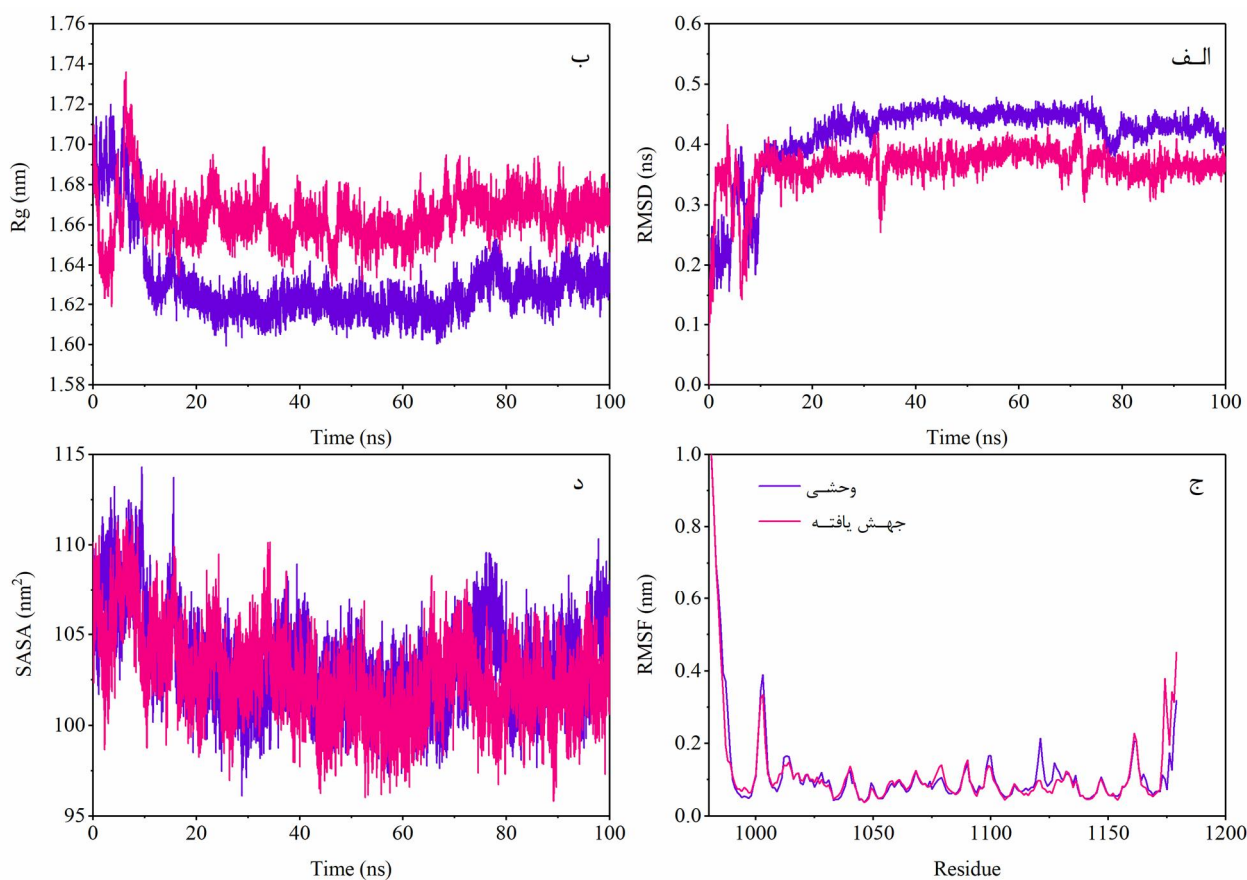
شاخص و معیاری برای همگرایی و فشردگی ساختاری پروتئین استفاده می‌شود [36]. میانگین مقادیر Rg برای نوع وحشی و ساختار جهش یافته پروتئاز NS3/4A به ترتیب 1/63 و 1/66 نانومتر بود. شکل 2-ب نمودار Rg را در طول شبیه‌سازی برای نوع وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A نشان می‌دهد.

محاسبات RMSF را برای نوع وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A اندازه‌گیری کردیم تا اثر جهش A156G را بر ثبات و رفتار دینامیکی ساختار پروتئاز NS3/4A بررسی کنیم. براساس شکل 2-ج ساختار جهش یافته نوسان‌های به نسبت مشابهی با نوع وحشی دارد. مقدار نوسان اسید آمینه در موقعیت 156 پروتئاز NS3/4A، 0/78 و 0/81 نانومتر برای ساختارهای نوع وحشی و جهش یافته محاسبه شد.

حالت آزاد بعد از 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنالیزهای متفاوتی همچون RMSD، شعاع ژیراسیون (Rg) و برای مطالعه انعطاف‌پذیری ریزجوه‌های تشکیل‌دهنده ساختار محاسبات RMSF انجام گرفت.

آنالیز جابه‌جایی اتم‌های کربن آلفا یا RMSD پروتئاز در طی شبیه‌سازی با میانگین مقدار 0/41 و 0/36 نانومتر پایداری ساختاری پروتئاز NS3/4A را در هر دو حالت نشان می‌دهد (شکل 2-الف). براساس شکل 2-الف نوسان‌های RMSD برای هر دو حالت وحشی و جهش یافته بعد از گذشت 10 نانوثانیه ابتدایی ساختار به پایداری مطلوب رسیده و تا پایان شبیه‌سازی ادامه دارد.

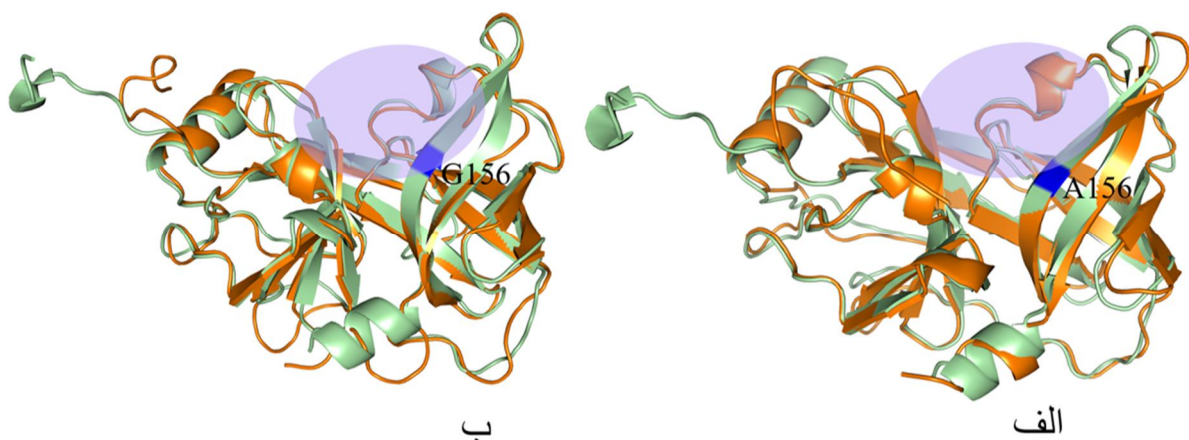
همگرایی و فشردگی ساختار وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A با تجزیه و تحلیل Rg در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی محاسبه شد. محاسبات Rg به‌عنوان



شکل 2 الف- تغییرات RMSD اتم‌های کربن آلفا؛ ب- شعاع ژیراسیون؛ ج- RMSF اتم‌های کربن آلفا و سطح در دسترس حلال پروتئاز NS3/4A در دو حالت وحشی و جهش یافته در طول 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

دو ساختار پروتئاز نوع وحشی و جهش یافته مقدار SASA به نسبت یکسانی در طول شبیه سازی داشتند. شکل 3 تراز ساختاری پروتئاز NS3/4A وحشی و جهش یافته قبل و بعد از 100 نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی را نشان می دهد. براساس با آنالیزهای انجام شده هریک از ساختارهای پروتئاز بعد از 100 نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی پایدار هستند. در نتیجه برای محاسبه های داکینگ مولکولی مناسب می باشند.

محاسبات سطح در دسترس [37] پروتئاز در طول هریک از شبیه سازی ها نیز اندازه گیری و نتایج آن در شکل 2-د به تصویر کشیده شد. تجزیه و تحلیل سطح قابل دسترس حلال (SASA) برای تخمین سطح یک مولکول زیستی در تعامل با مولکول های حلال آن استفاده می شود. میانگین مقادیر SASA برای نوع وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A به ترتیب 102/72 و 103/42 نانومتر مربع بود. براساس شکل 2-د و میانگین مقدار SASA، هر



شکل 3

الف- ساختار پروتئاز NS3/4A در حالت وحشی ؛ ب- جهش یافته قبل (رنگ سبز) و بعد (رنگ نارنجی) از 100 نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی. بیضی بنفش رنگ نشان دهنده جایگاه اتصال داروها است.

بوسپروویر، سیمپروویر و ونیپروویر با حالت وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A در جدول 1 ارائه شده است. براساس جدول 1 داروی بوسپروویر در میان کنش با هر دو ساختار وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A بیشترین تمایل اتصال را از خود نشان داد.

2-3 نتایج داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی در واقع روشی است که در آن موده های اتصال مولکول های مختلف نسبت به هم مطالعه می شوند و همچنین برهم کنش های بین آنها نیز پیش بینی می شود. در نهایت میزان تمایل مولکول ها برای اتصال به یکدیگر برآورد می شود [38]. تمایل اتصال بین هریک از داروهای

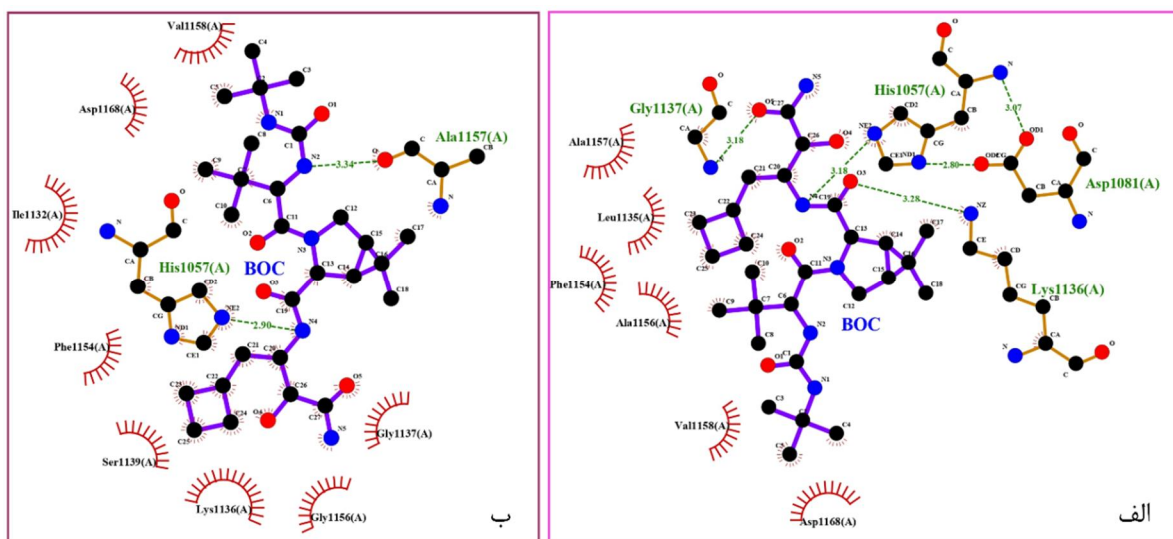
جدول 1 انرژی اتصال به دست آمده از محاسبات داکینگ مولکولی برای هریک از داروها در میان کنش با پروتئاز

A156G در NS3/4A در حالت وحشی و جهش یافته

انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	دارو-پروتئاز
-5/1	بوسپروویر - پروتئاز جهش یافته
-5/6	بوسپروویر - پروتئاز وحشی
-4/3	سیمپروویر - پروتئاز جهش یافته
-3/4	سیمپروویر - پروتئاز وحشی
-2/5	ونپروویر - پروتئاز جهش یافته
-5/0	ونپروویر - پروتئاز وحشی

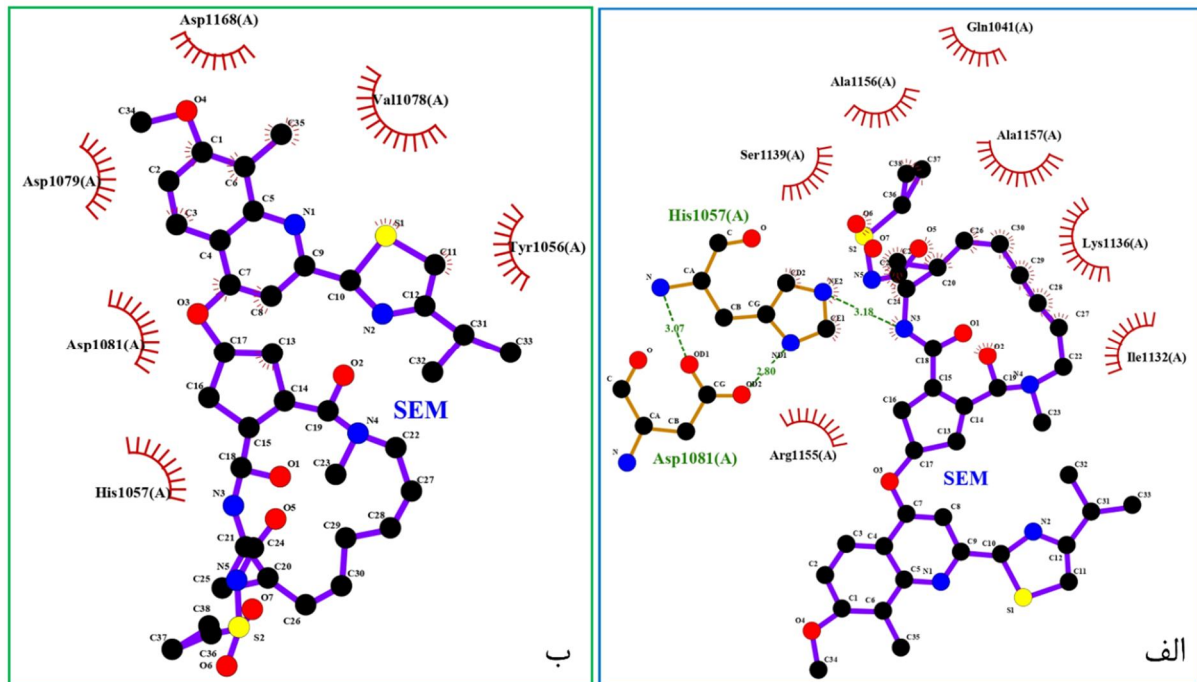
به خصوص با سه گانه کاتالیزوری تشکیل می دهند. رزیجوه های ASP1081, HIS1057, GLY1137 و ALA1157 بیشتر درگیر در پیوندهای هیدروژنی هستند. SER 1139 میان کنش های هیدروفوبیک با داروها تشکیل می دهد [19; 40]. با توجه به نتایج محاسبات داکینگ انتظار می رود رفتار هریک از داروها روی پروتئاز NS3/4A متفاوت باشد.

با استفاده از نرم افزار لیگ پلات (LIGPLOT) [39] پیوندهای اثرگذار در میان کنش بین هریک از داروهای انتخابی با پروتئاز NS3/4A در دو حالت وحشی و جهش یافته از محاسبات به دست آمده از شبیه سازی داکینگ مولکولی شکل های 4، 5 و 6 به تصویر کشیده شد. همان طور که از شکل های به دست آمده با استفاده از نرم افزار LIGPLOT مشخص است، هریک از داروها میان کنش های هیدروفوبیک و پیوندهای هیدروژنی



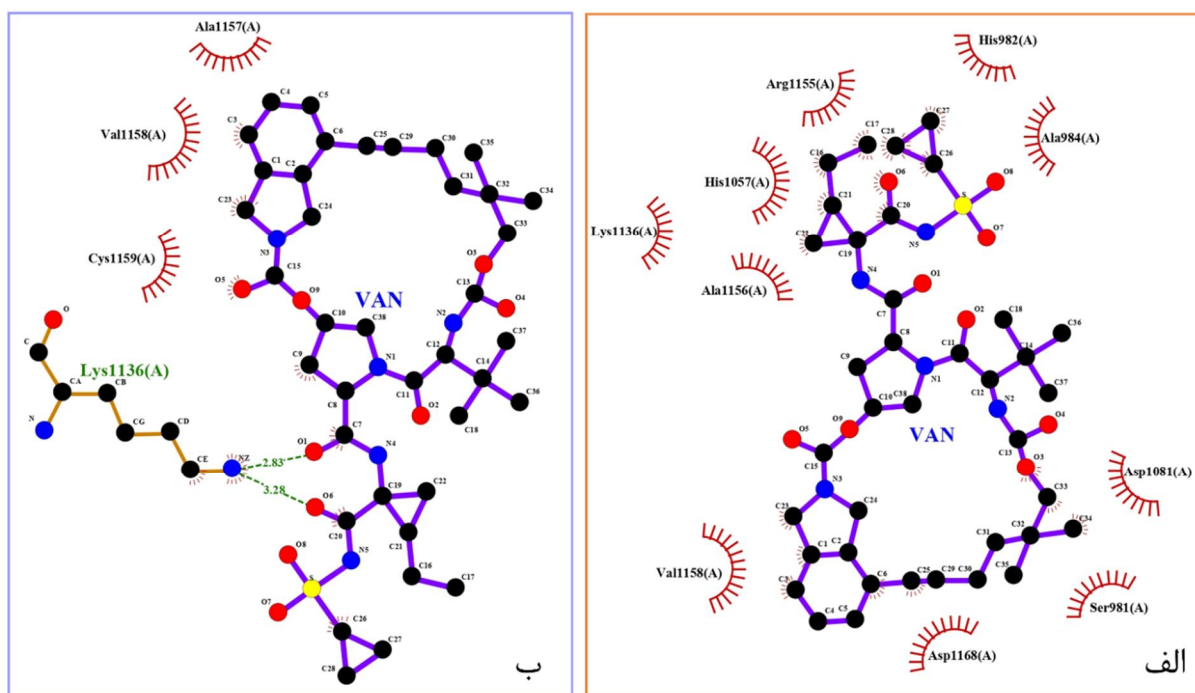
شکل 4 الف- برهم کنش بوسپروویر با رزیجوه های پاکت اتصالی NS3/4A در حالت وحشی؛ ب- جهش یافته به دست آمده از محاسبات داکینگ مولکولی. خطوط نقطه های سبز پیوندهای هیدروژنی را نشان می دهند. قوس های قرمز

بیان‌کننده آمینواسیدهای درگیر در میان‌کنش‌های هیدروفوبیک با آسکوربیک‌اسید می‌باشند. اتم‌های اکسیژن، نیتروژن و کربن به ترتیب با قرمز، آبی و سیاه نمایش داده شده‌اند. خطوط قهوه‌ای پیوندهای غیرلیگاندی و خطوط آبی پیوندهای لیگاند را نشان می‌دهند. اتم‌های با خطوط پرتویی نمایانگر اتم‌های درگیر در میان‌کنش‌های هیدروفوبیک می‌باشند.



شکل 5

الف - برهم‌کنش سیمپرویر با رزیجوهای پاکت اتصال NS3/4A در حالت وحشی ؛ ب - جهش یافته به دست آمده از محاسبات داکینگ مولکولی. خطوط نقطه‌های سبز پیوندهای هیدروژنی را نشان می‌دهند. قوس‌های قرمز بیان‌کننده آمینواسیدهای درگیر در میان‌کنش‌های هیدروفوبیک با آسکوربیک‌اسید می‌باشند. اتم‌های اکسیژن، نیتروژن، کربن و سولفور به ترتیب با قرمز، آبی، سیاه و زرد نمایش داده شده‌اند. خطوط قهوه‌ای پیوندهای غیرلیگاندی و خطوط آبی پیوندهای لیگاند را نشان می‌دهند. اتم‌های با خطوط پرتویی نمایانگر اتم‌های درگیر در میان‌کنش‌های هیدروفوبیک می‌باشند.



شکل 6

الف- برهم کنش و نیپرویر با رزیجوهای پاکت اتصال NS3/4A در حالت وحشی؛ ب- جهش یافته به دست آمده از محاسبات داکینگ مولکولی. خطوط نقطه‌های سبز پیوندهای هیدروژنی را نشان می‌دهند. قوس‌های قرمز بیان‌کننده آمینواسیدهای درگیر در میان‌کنش‌های هیدروفوبیک با آسکوریک اسید می‌باشند. اتم‌های اکسیژن، نیتروژن، کربن و سولفور به ترتیب با قرمز، آبی، سیاه و زرد نمایش داده شده‌اند. خطوط قهوه‌ای پیوندهای غیرلیگاندی و خطوط آبی پیوندهای لیگاند را نشان می‌دهند. اتم‌های با خطوط پرتویی نمایانگر اتم‌های درگیر در میان‌کنش‌های هیدروفوبیک می‌باشند.

سازی جدا شود، باید نمودار RMSD یا جابه‌جایی کلی ساختار دارو دچار تغییر نوسان‌های بسیار شدیدی می‌شد و یا اگر نمودار تغییرات شدیدی را به تصویر کشید، نشان از خارج شدن لیگاند از پاکت اتصال خود می‌باشد. در مطالعه حاضر براساس با آنالیز RMSD اتم‌های سنگین هریک از داروها به‌طور جداگانه محاسبه شد و نتایج نشان داد که هریک از داروها در پاکت اتصال خود در تمام طول شبیه‌سازی قرار داشته‌اند. نوسان‌های به‌نسبت زیادی در نمودار RMSD کمپلکس سمپرویر در میان‌کنش با پروتئاز در حالت وحشی مشاهده می‌شود که با توجه به مشاهده ساختار کمپلکس و قرار داشتن دارو در پاکت

3-3 شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئاز NS3/4A

_دارو

در این بخش برای بررسی، پایداری ساختار هریک از کمپلکس‌های پروتئاز NS3/4A-دارو، تأثیر حرکات دارو در میان‌کنش با پروتئاز در جایگاه اتصال و تأثیر تغییرات کنفورماسیون پروتئاز به مدت 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد.

برای بررسی پایداری بودن دارو در پاکت اتصال علاوه بر مشاهده دینامیک دارو در پاکت اتصال، محاسبات RMSD اتم‌های سنگین دارو در طی شبیه‌سازی آنالیز و مورد شد. اگر دارو از جایگاه یا پاکت اتصال خود در طول شبیه-

اتصال در طول شبیه‌سازی می‌توان بیان کرد که دارو در حال بررسی حالت‌های مختلف اتصال با پاکت اتصالی پروتئاز در طول شبیه‌سازی می‌باشد (شکل 7- الف).

علاوه بر این، محاسبات RMSD یا جابه‌جایی اتم‌های کربن آلفای پروتئاز در هر دو حالت در طی شبیه‌سازی نیز مشخص کرد که تغییرات RMSD پروتئاز در حالت کمپلکس با داروهای ذکر شده نوسان‌های شدیدی از خود نشان نداده‌اند و این نوسان‌ها اثر منفی بر اتصال دارو به پروتئاز نداشته است. در نتیجه ساختار هریک از کمپلکس‌ها در طول شبیه‌سازی پایدار می‌باشد و آنالیزها و محاسبات دیگری که از اطلاعات به دست آمده از مسیر شبیه‌سازی انجام شده مورد اعتماد و قابل اتکا می‌باشند (شکل 7 - ب).

مقایسه میانگین تغییرات RMSD اتم‌های کربن آلفای پروتئاز در هریک از حالت‌های وحشی و جهش‌یافته مشخص می‌کند که در هر دو حالت پروتئاز در حالت بدون لیگاند تغییرات به نسبت کمتری در مقایسه با کمپلکس با هریک از داروها دارد (شکل‌های 2 و 7).

به منظور بررسی فشردگی و همگرایی ساختار پروتئاز در هریک از ساختارهای کمپلکس محاسبات شعاع ژیراسیون انجام شد و نتایج آن در شکل 7 - ج ارائه شد. براساس با این محاسبات در هر دو حالت وحشی و جهش‌یافته ساختار پروتئاز همگرایی به نسبت مشابهی را در میان‌کنش با هریک از داروها نشان داد هر چند پروتئاز وحشی در میان‌کنش با بوسپرویر نوسان‌های به نسبت متفاوتی را در 40 نانوثانیه آخر شبیه‌سازی ارائه داد.

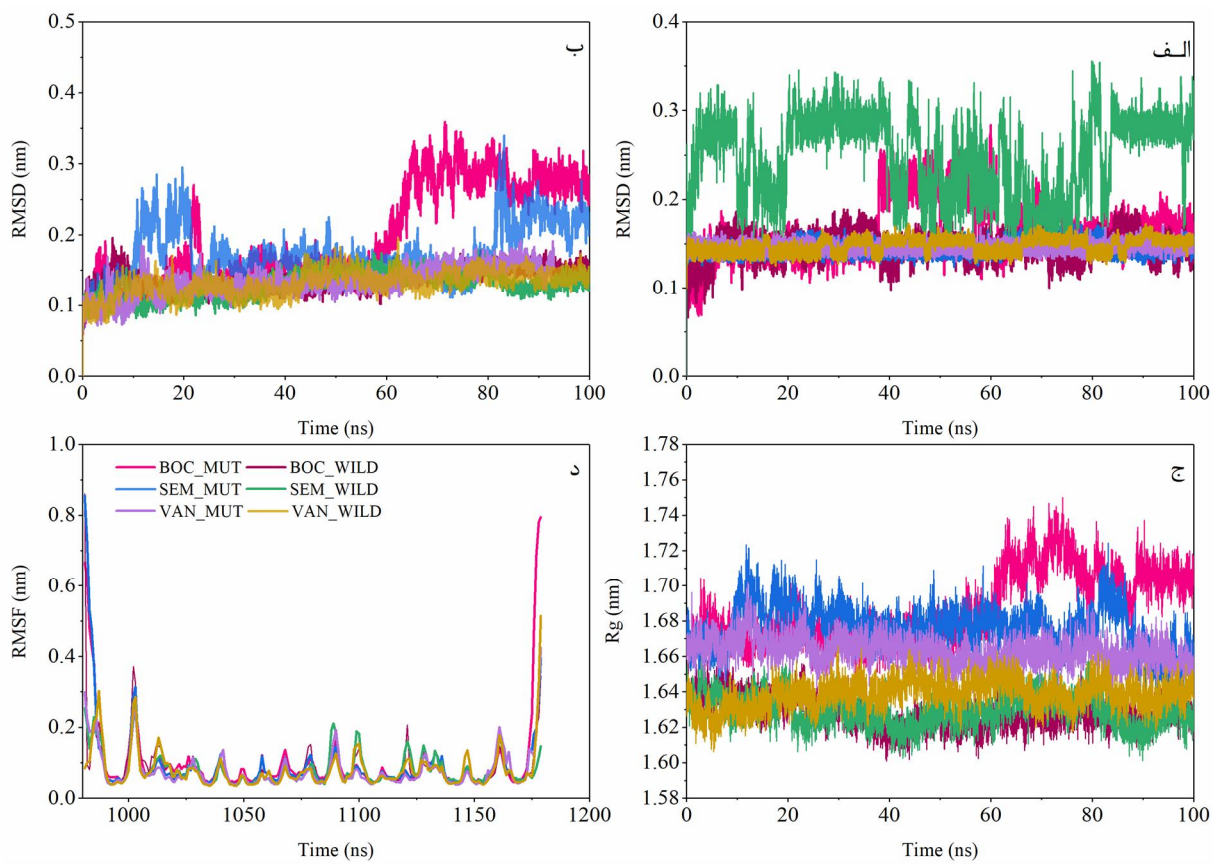
از طرفی در حالت وحشی این پایداری ساختاری تا حدی بیشتر از حالت جهش‌یافته پروتئاز مشاهده شد.

میانگین مقدار شعاع ژیراسیون در حالت وحشی برای داروهای بوسپرویر، سیمپرویر و ونیپرویر به ترتیب برابر با 1/62، 1/63 و 1/63 نانومتر می‌باشد در حالی که در حالت جهش‌یافته مقادیر میانگین به ترتیب برابر با 1/68، 1/67 و 1/66 نانومتر سنجش شد. مقادیر میانگین شعاع ژیراسیون برای پروتئاز در حالت بدون حضور دارو که در بالا گزارش شد، برابر با 1/63 و 1/66 نانومتر به ترتیب برای حالت وحشی و جهش‌یافته آن اندازه‌گیری شد.

با توجه به شکل‌های 2- ب و شکل 7- ج همچنین مقادیر میانگین به دست آمده از تمام سیستم‌های شبیه‌سازی شده مشخص است که پروتئاز در موقعیت بدون حضور دارو فشردگی ساختاری بهتری نسبت به زمانی که در میان‌کنش با داروها است، دارد.

به منظور اینکه مشخص شود آیا هریک از داروها در میان‌کنش با پروتئاز در هر دو حالت وحشی و جهش‌یافته بر انعطاف‌پذیری هریک از آمینواسیدهای ساختار پروتئاز تأثیری داشته است، محاسبات RMSF یا ریشه میانگین نوسان‌های مربع اتم‌های کربن آلفای پروتئاز NS3/4A به طور جداگانه محاسبه شد. نتایج در شکل 7 - د گزارش شد.

با توجه به شکل مشخص است که NS3/4A نوسان‌های کمتری در حضور ونیپرویر در هر دو حالت وحشی و جهش‌یافته نشان می‌دهد. بجز نوسان‌های آمینواسیدهای نواحی N و C انتهایی پروتئاز (که با مولکول‌های آب بیشتری در میان‌کنش هستند) در هر دو حالت وحشی و جهش‌یافته دامنه نوسان آمینواسیدهای پروتئاز مشابه و بین 0/03 تا 0/4 نانومتر می‌باشد.



شکل 7

الف - تغییرات RMSD هر یک از داروها؛ ب - RMSD اتم‌های کربن آلفای پروتئاز NS3/4A؛ ج - شعاع ژیراسیون؛ د - RMSF اتم‌های کربن آلفا پروتئاز NS3/4A در دو حالت وحشی و جهش یافته در طول 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی با وجود دینامیکی که دارند، خارج نمی‌شوند (شکل‌های 7- الف و ب، شکل 8- الف).

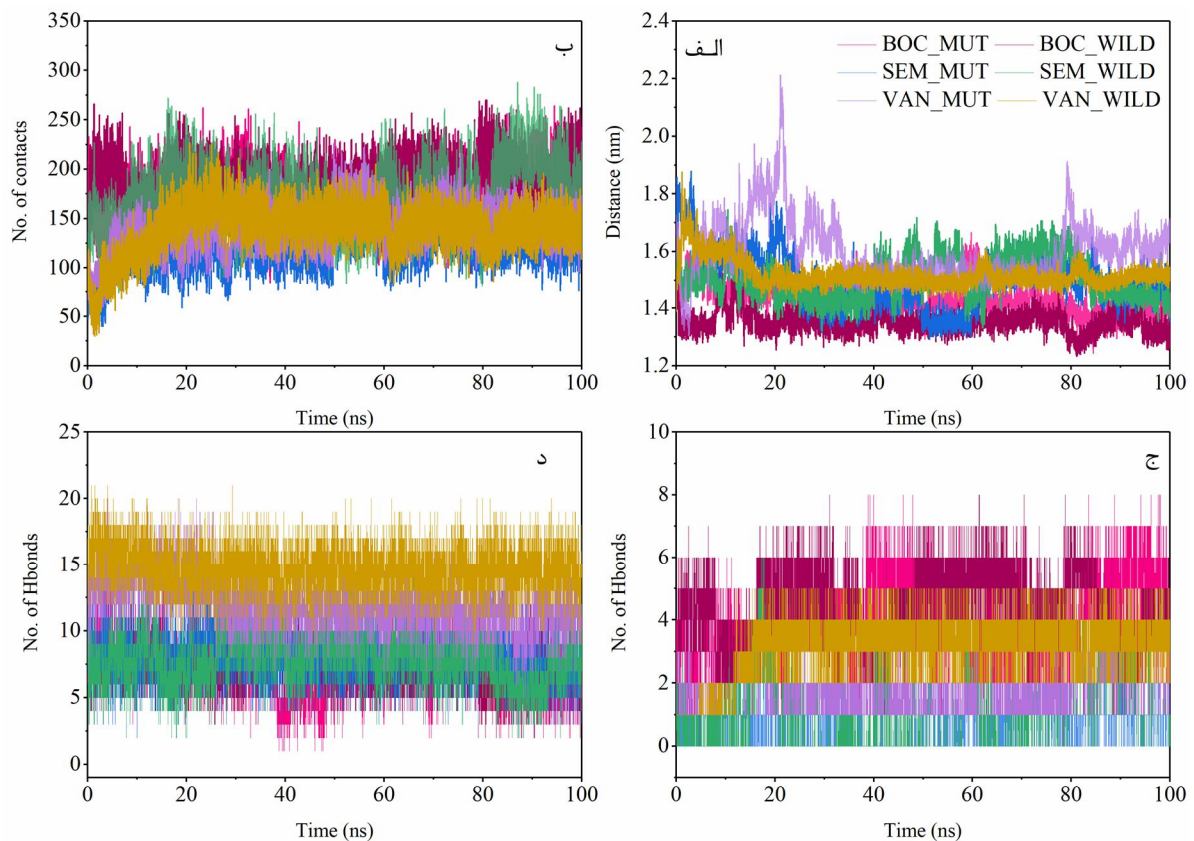
شکل 8 - ب تعداد پیوندهای تشکیل شده بین هر یک از داروها و پروتئاز را در طول زمان شبیه‌سازی نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل مشخص است، در بازه 20 نانوثانیه اول شبیه‌سازی تعداد میان‌کنش‌های تشکیل شده بین داروها و پروتئاز افزایش یافته و سپس شاهد تغییرات به نسبت یکنواخت در تعداد میان‌کنش‌های تشکیل شده بین آنها هستیم.

داروی بوسیپروویر بیشترین میان‌کنش را با هر دو حالت وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A در طول شبیه‌سازی نشان داد. از طرفی داروی ونیپروویر کمترین میان‌کنش را با پروتئاز تشکیل می‌دهد. همچنین آنالیز

براساس با نتایج به دست آمده فاصله مرکز جرم هر یک از داروها نسبت به مرکز جرم پروتئاز در هر دو حالت وحشی و جهش یافته اندازه‌گیری و نتایج آن در شکل 8 - الف ارائه شد. براساس با این آنالیز داروها تغییرات فاصله تقریباً مشابهی در پاکت اتصالی خود داشتند. در حالت وحشی داروی سیمیپروویر تغییرات یکنواختی را نشان دادند، اما در حالت جهش یافته داروی ونیپروویر تغییرات فاصله بیشتری را به ویژه در 20 نانوثانیه ابتدایی شبیه‌سازی نشان داد. این نوسان‌های فاصله بین داروها و پروتئاز می‌تواند نشان‌دهنده دینامیک برهم‌کنش‌های پیوندی باشد. این آنالیز براساس با آنالیز RMSD نشان می‌دهد که داروها در پاکت اتصالی خود قرار دارند و در طول

محاسبات داکینگ نیز نشان داد که ونیرویر کمترین میان کنش را با پروتئاز دارد. الگوهای پیوند هیدروژنی مهم هستند و می توانند بر ساختار و عملکرد پروتئین در هر کمپلکسی تأثیر بگذارند. شکل 8 ج سهم پیوندهای هیدروژنی بین هریک از داروها با پروتئاز را در میان کنش بین آنها نشان می دهد. براساس با محاسبات پیوند هیدروژنی، داروی بوسیرویر بیشترین پیوند هیدروژنی را با پروتئاز در هر دو حالت وحشی و جهش یافته تشکیل می دهد. حداکثر 8 پیوند هیدروژنی بین آنها تشکیل می شود. از سوی دیگر، مولکول های آب در جایگاه اتصال لیگاندها نقش مهمی در تشکیل و جداسازی پیوندهای

هیدروژنی بین پروتئین و لیگاند بازی می کنند. براساس شکل 8- د تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین داروی ونیرویر با مولکول های آب بیشتر از دو داروی دیگر می باشد که انتظار می رود بر رفتار دارو در میان کنش با پروتئاز تأثیر بگذارند. تعداد پیوندهای هیدروژنی بین هریک از داروها و پروتئاز NS3/4A کمتر از پیوند هیدروژنی بین داروها و مولکول های آب است. نتایج محاسبات پیوند هیدروژنی نشان می دهد که تعداد پیوندهای هیدروژنی بین هر دارو با پروتئاز NS3/4A در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی متفاوت است و وجود مولکول های آب در جایگاه اتصال بر تفاوت این اعداد تأثیر پررنگی دارد.

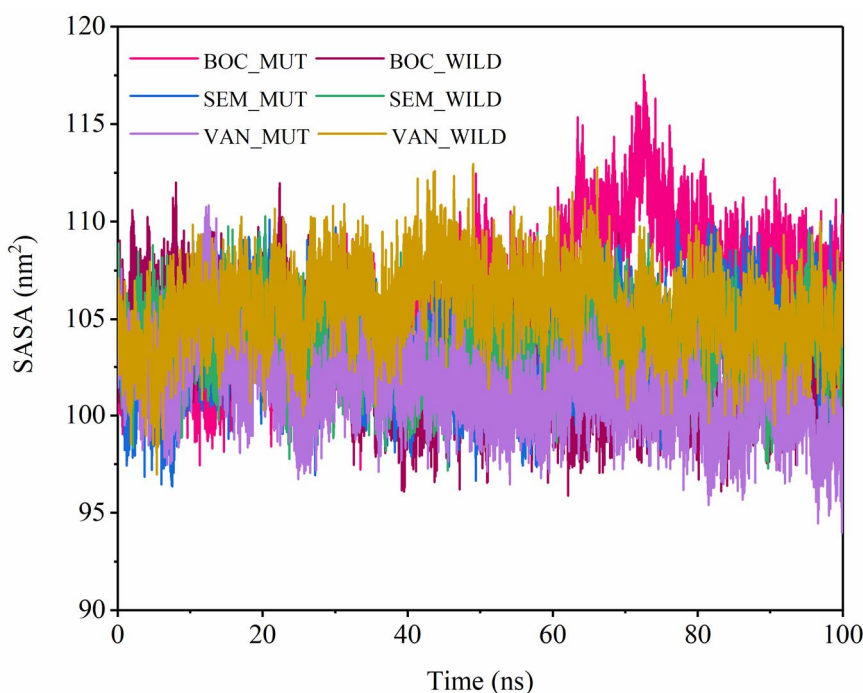


شکل 8

الف - فاصله مرکز جرم هریک از داروها نسبت به مرکز جرم پروتئاز NS3/4A؛ ب - تعداد پیوندهای تشکیل شده بین هریک از داروها با پروتئاز؛ ج - تعداد پیوند هیدروژنی هریک از داروها با پروتئاز و تعداد پیوند هیدروژنی تشکیل شده بین هریک از داروها با مولکول های آب در هر دو حالت وحشی و جهش یافته پروتئاز در طول 100 نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی.

وحشی و جهش یافته نوسان‌های مشابهی را نشان دادند (شکل 9). مقدار میانگین سطح در دسترس پروتئاز در کمپلکس با داروهای بوسیپروویر، سیمپروویر و ونیپروویر در حالت وحشی به ترتیب برابر با 102/64، 103/51 و 105/54 نانومتر مربع و در حالت جهش یافته برابر با 105/83، 103/51 و 101/33 نانومتر مربع اندازه‌گیری شد.

با استفاده از محاسبات سطح در دسترس حلال که با ماژول gmX sasa اندازه‌گیری شد، سطح پروتئاز NS3/4A که با مولکول‌های حلال آب در طول شبیه‌سازی در تعامل بودند، سنجش شد. براساس این محاسبه، دامنه تغییرات سطح در دسترس حلال در هر دو حالت وحشی و جهش یافته بین 95 تا 118 نانومتر مربع اندازه‌گیری شد. هریک از داروها در میان‌کنش با پروتئاز در هر دو حالت



شکل 9 سطح در دسترس پروتئاز NS3/4A در حضور دارو در دو حالت وحشی و جهش یافته در طول 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

NS3/4A در طی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد. براساس شکل 10 اسیدهای آمینه مناطق 150-160 ساختار جهش یافته در میان‌کنش با داروی ونیپروویر سهم بیشتری از تغییرات ساختار دوم در طول شبیه‌سازی دارند. جدول 2 درصد ساختارهای دوم ساختارهای نوع وحشی و جهش یافته پروتئاز NS3/4A را نشان می‌دهد. همان‌طور که از جدول 2 و شکل 10 مشخص است، داروهای سیمپروویر و ونیپروویر در هر دو حالت وحشی و جهش یافته تغییرات به نسبت بیشتری را در ساختار پروتئاز

با توجه به شکل 9 و میانگین داده‌های به دست آمده از سطح در دسترس پروتئاز در هریک از کمپلکس‌ها می‌توان بیان کرد که برهم‌کنش‌های پروتئاز-دارو به نسبت پایدار هستند و کمپلکس‌ها ساختار کلی ثابتی را در طول شبیه‌سازی حفظ کرده‌اند. نتایج RMSD تأییدی بر این یافته می‌باشد (شکل 7).

به منظور مشاهده تغییرات دینامیکی ساختار دوم پروتئین، تجزیه و تحلیل ساختار دوم پروتئین‌ها برای بررسی پایداری ساختاری و محتوای ساختار دوم پروتئاز

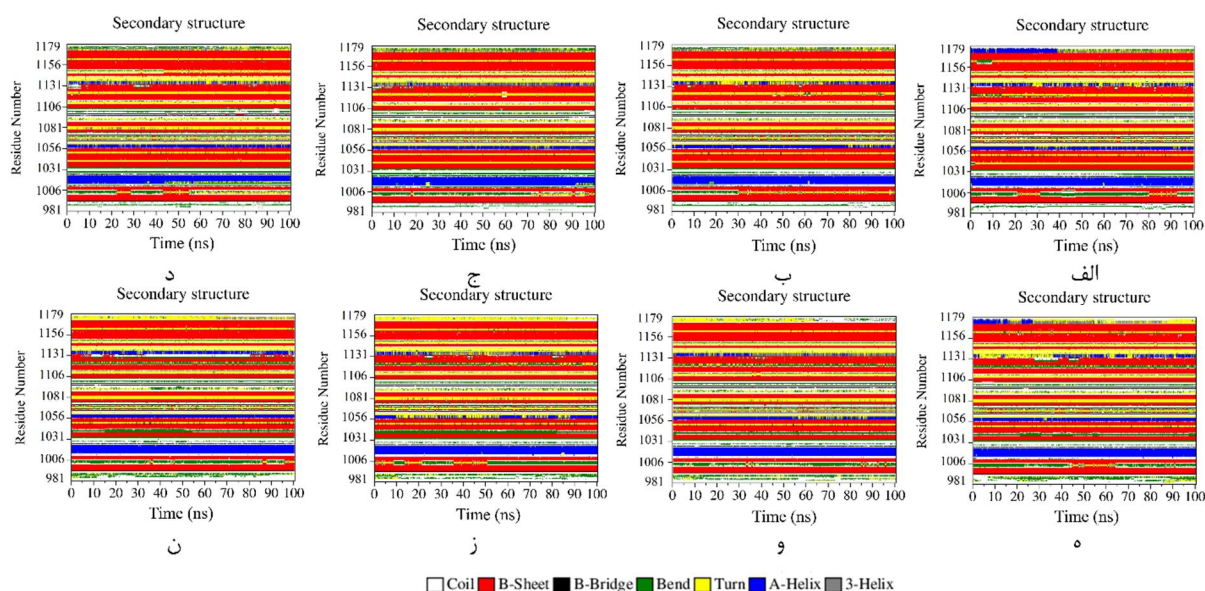
اعمال می‌کند. از طرفی در حالت وحشی داروها اثر به نسبت بیشتری بر درصد کل تغییرات ساختاری بر پروتئاز نشان داده‌اند. همان‌طور که از شکل 10 مشخص است، ناحیه C ترمینال در هر دو حالت کمپلکس پروتئاز - دارو نسبت به حالت آزاد پروتئاز بیشترین تغییرات را به خود اختصاص داده است.

جدول 2 درصد ساختار دوم پروتئاز NS3/4A در حالت آزاد و کمپلکس با داروهای انتخابی در طول 100 نانوثانیه

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

Structure*	Coil	B-Sheet	B-Bridge	Bend	Turn	A-Helix	3-Helix
پروتئاز وحشی آزاد	0/68	0/23	0/41	0/03	0/08	0/14	0/09
پروتئاز وحشی - بوسپرویر	0/69	0/22	0/43	0/03	0/07	0/15	0/08
پروتئاز وحشی - سیمپرویر	0/67	0/22	0/41	0/03	0/09	0/15	0/07
پروتئاز وحشی - ونیپرویر	0/67	0/22	0/42	0/03	0/09	0/15	0/07
پروتئاز جهش یافته‌ی آزاد	0/65	0/23	0/40	0/03	0/11	0/13	0/08
پروتئاز جهش یافته - بوسپرویر	0/65	0/24	0/41	0/03	0/10	0/13	0/08
پروتئاز جهش یافته - سیمپرویر	0/65	0/23	0/41	0/03	0/11	0/14	0/07
پروتئاز جهش یافته - ونیپرویر	0/64	0/24	0/39	0/03	0/12	0/13	0/09

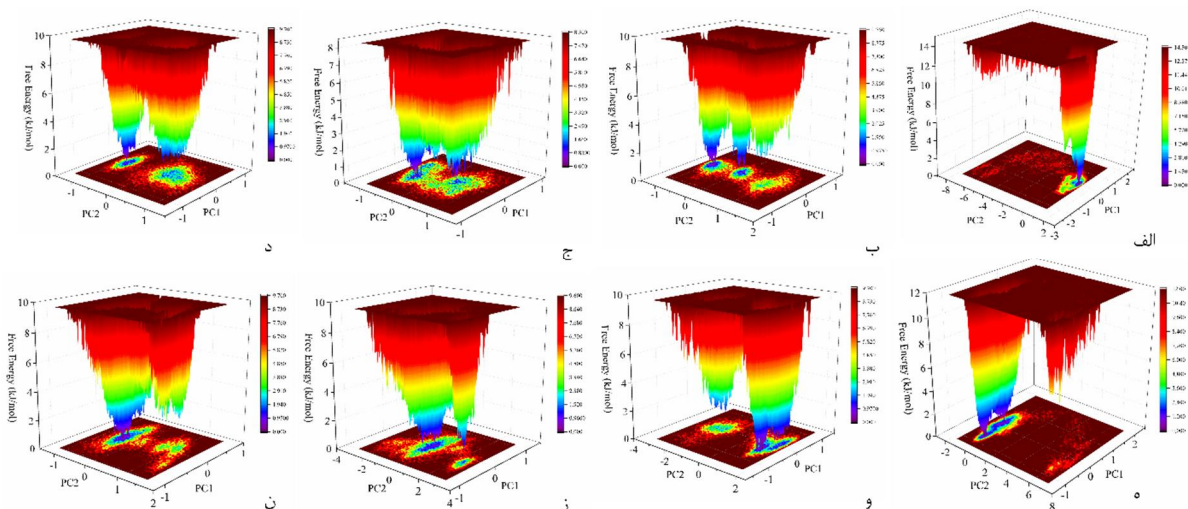
* Structure = A-Helix + B-Sheet + B-Bridge + Turn



شکل 10 تغییرات ساختار دوم پروتئاز NS3/4A در حالت وحشی و جهش یافته در حضور داروهای انتخابی در طول 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. الف - پروتئاز NS3/4A وحشی آزاد؛ ب - پروتئاز وحشی - بوسپرویر؛ ج - پروتئاز وحشی - سیمپرویر؛ د - پروتئاز وحشی - ونیپرویر؛ ه - پروتئاز NS3/4A جهش یافته آزاد؛ و - پروتئاز جهش یافته - بوسپرویر؛ ز - پروتئاز جهش یافته - سیمپرویر؛ ن - پروتئاز جهش یافته - ونیپرویر

حالت آزاد نشان می‌دهد. ساختار کمپلکس حوضه‌های بیشتری از صورت‌بندی‌ها را نسبت به ساختار پروتئاز در حالت آزاد نشان می‌دهد. این حوضه‌ها جمعیتی از حالت‌های ساختاری مطلوب را نشان می‌دهند. تفاوت‌های توزیع ساختاری بین ساختار نوع وحشی و جهش‌یافته پروتئاز NS3/4A نشان‌دهنده جابه‌جایی جمعیت بین ساختار پروتئاز NS3/4A در حالت آزاد و میان‌کنش با هریک از داروها است. کمپلکس دارویی بوسیپروویر در میان‌کنش با پروتئاز سه حوضه از حالت‌های ساختاری مطلوب را در سراسر مسیر شبیه‌سازی تشکیل داد که این موضوع می‌تواند نشان دهد صورت‌بندی‌های پروتئازی بیشتری در این کمپلکس انرژی پایدار دارند و سایر صورت‌بندی‌ها ناپایدارند.

محاسبه چشم‌اندازهای انرژی آزاد (Free Energy Landscape (FEL)) با استفاده از PC1 و PC2 به دست آمده از تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی PCA (Principal Component Analysis) به عنوان مختصات واکنش برای نشان دادن آثار هریک از داروها بر حالت‌های مختلف ساختاری موجود در پروتئاز NS3/4A در طول شبیه‌سازی MD انجام شد. نتایج آن در شکل 11 ارائه شده است. هریک از ساختارهای پروتئاز در هر دو حالت وحشی و جهش‌یافته الگوی متفاوتی از محاسبات FEL را نشان می‌دهد. مناطقی با حداقل انرژی که با رنگ آبی نشان داده شده‌اند، صورت‌بندی پروتئاز را که از نظر انرژی و پایداری ساختاری مطلوب هستند، نشان می‌دهند. براساس شکل 11 ساختار پروتئاز در میان‌کنش با هریک از داروها تفاوت‌های چشمگیری را در مقایسه با



شکل 11 چشم‌انداز انرژی آزاد (FEL) پروتئاز NS3/4A در دو حالت وحشی و جهش‌یافته در میان‌کنش با دارو در طول 100 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. الف- پروتئاز NS3/4A وحشی آزاد؛ ب- پروتئاز وحشی- بوسیپروویر؛ ج- پروتئاز وحشی- سیمپروویر؛ د- پروتئاز وحشی- ونیپروویر؛ ه- پروتئاز NS3/4A جهش‌یافته آزاد؛ و- پروتئاز جهش‌یافته- بوسیپروویر؛ ز- پروتئاز جهش‌یافته- سیمپروویر؛ ن- پروتئاز جهش‌یافته- ونیپروویر

از روش مکانیک مولکولی مساحت سطح پواسون-بولتزمن (MM-PBSA) برای تخمین انرژی آزاد اتصال هر

تفاوت‌های اتصال ناشی از اتصال هریک از داروها به پروتئاز در هر دو حالت وحشی و جهش‌یافته بررسی شد.

فرایند اتصال را چنین میان‌کنش‌ها به خود اختصاص داده- اند. در نتیجه، حفظ پایداری ساختاری هریک از کمپلکس- ها به قدرت این میان‌کنش‌ها وابسته است. بنابراین هر عاملی که باعث تضعیف این میان‌کنش‌ها شود، می‌تواند بر پایداری ساختاری هریک از این کمپلکس‌های پروتئاز و دارو اثر منفی داشته باشد [40؛ 41].

یک از کمپلکس‌ها استفاده شد. نتایج محاسبه‌های انرژی آزاد اتصال در جدول 3 ارائه شده است. براساس با سهم‌های گزارش شده برای هریک از انرژی‌های اثرگذار در انرژی اتصال آزاد بین پروتئاز و داروها، در بیشتر کمپلکس‌ها میان‌کنش‌های هیدروفوبیک (واندروالسی) نقش بیشتر و کلیدی‌تری در فرایند اتصال بازی می‌کنند. نقش کلیدی و نیروی اصلی پیش‌برنده در

جدول 3 انرژی‌های آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول) و درصد سهم هریک از انرژی‌ها برای هریک از کمپلکس‌های دارو-پروتئاز NS3/4A (±انحراف استاندارد)

	^a ΔE Van der Waal	^b ΔE Electrostatic	^c ΔE Solvation; Polar	^d ΔE SASA	^e ΔG Binding
پروتئاز وحشی - بوسپرویر	158/760	66/101	-143/437	18/57	-105/669 ±19/716
پروتئاز وحشی - سیمپرویر	184/238	46/257	-151/392	20/895	-90/320 ±18/413
پروتئاز وحشی - ونیپرویر	201/867	60/105	-183/555	21/582	-98/843 ±25/651
پروتئاز جهش‌یافته - بوسپرویر	312/183	36/576	-284/415	35/653	-44/012 ±15/637
پروتئاز جهش‌یافته - سیمپرویر	168/685	330/499	-424/367	25/181	-72/351 ±23/681
پروتئاز جهش‌یافته - ونیپرویر	144/532	138/736	-201/717	18/54	-66/307 ±19/688

a = Van der Waal energy, b = Electrostatic energy, c = Polar solvation energy, d = SASA energy, e = Binding energy

براساس با نتایج به‌دست‌آمده از محاسبات انرژی آزاد اتصال داروی بوسپرویر بیشترین انرژی آزاد اتصال را با پروتئاز NS3/4A در حالت وحشی نشان داد و در حالت مقایسه هریک از کمپلکس‌ها در حالت وحشی و جهش‌یافته مشاهده می‌شود که هریک از داروها در میان‌کنش با پروتئاز در حالت وحشی تمایل اتصال بیشتری را نسبت به حالت جهش‌یافته نشان دادند. رفتار به نسبت متفاوت داروها با پروتئاز در هر دو حالت به احتمال زیاد به ساختار شیمیایی داروها مربوط می‌شود [42-45]. مطالعات متفاوت نشان می‌دهد که

بنابراین شبکه پیوندهای هیدروژنی و میان‌کنش‌های هیدروفوبیک در اتصال بین دارو و پروتئین در پاکت اتصال نقش دارند. براساس این خروجی‌ها اغلب میان‌کنش‌های هیدروفوبیک نگه‌دارنده دارو در جایگاه اتصال به شمار می‌آیند و رزیزجوه‌های هیدروفوبیک سازندگان اصلی پاکت اتصال می‌باشند و در نگهداری دارو در جایگاه اتصال نقش کلیدی را بازی می‌کنند و همچون چسبی مانع از جداشدن دارو از پاکت اتصال می‌شوند. در نتیجه پایداری کمپلکس‌های دارویی را در طی زمان شبیه‌سازی حفظ می‌کنند.

مشخص کرد که میان‌کنش هر یک از داروها با پروتئاز NS3/4A در حالت وحشی تمایل اتصال بیشتری در مقایسه با میان‌کنش با پروتئاز جهش‌یافته A156G دارند. بنابراین ایجاد جهش در پروتئاز تمایل اتصال دارو را کاهش داده و مانع عملکرد مناسب دارو می‌شود. براساس محاسبه‌های انجام‌شده میان‌کنش‌های هیدروفوبیکی (واندروالسی) نقش بیشتر و کلیدی‌تری در فرایند اتصال بازی می‌کنند. امیدواریم نتایج ما بتواند به طراحی مهارکننده‌های مناسب در جهت مهار ویروس هپاتیت C کمک کند.

منابع

- [1] Sharma SS, Razdan K, Kumar A, Naik SA, Kaur G. Wrath of Hepatitis C in Jammu: A Hospital Based Population Study.
- [2] Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2007;13(17):2436.
- [3] Organization WH. Hepatitis C—global prevalence (update). *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 1999;74(49):425-7.
- [4] Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*. 2008;103(5):1283-97.
- [5] Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *Journal of hepatology*. 2009;51(5):939-48.
- [6] Yu X, Qiao M, Atanasov I, Hu Z, Kato T, Liang TJ, et al. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*. 2007;367(1):126-34.
- [7] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine*. 2005;11(7):791-6.
- [8] Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *Journal of virology*. 1999;73(12):9718-25.

تغییرات ساختاری داروها می‌تواند منجر به درجه‌های مختلف مقاومت در برابر انواع مختلف جهش در پروتئاز شود. پژوهش‌های گزارش‌شده نشان می‌دهند که جایگزین‌های R155 و D168 احتمالاً به جای مولکول‌های خطی با ترکیب‌های ماکروسیکلک مرتبط هستند. درمقابل، جهش در A156، V36، و T54 بیشتر با مقاومت ترکیب‌های خطی نسبت به ترکیب‌های ماکروسیکلک مرتبط است [21، 44، 46-47].

براساس نتایج ما بوسیپرویر با یک ترکیب خطی تغییرات به‌نسبت متمایزتری نسبت به دو داروی ماکروسیکلک از خود نشان داد. بنابراین پروتئاز در برابر داروی بوسیپرویر مقاومت بیشتری نسبت به دو داروی دیگر نشان می‌دهد.

4- نتیجه‌گیری

ویروس هپاتیت C عامل اصلی سیروز کبدی و سرطان کبد است. سرین پروتئاز NS3/4A ویروس هپاتیت C پروتئین‌های غیر ساختاری را تولید می‌کند که برای بلوغ ویروس، تکثیر RNA و تکثیر ویروس ضروری می‌باشند. جهش‌های نقطه‌ای در پروتئاز NS3/4A باعث ایجاد مقاومت دارویی می‌شود. در این پژوهش با استفاده از روش‌های محاسباتی مانند شبیه‌سازی داکینگ مولکولی و دینامیک مولکولی رفتار سه داروی بوسیپرویر، سیمپرویر و ونیپرویر را در میان‌کنش با پروتئاز NS3/4A در دو حالت وحشی و جهش‌یافته A156G مطالعه شده است. نتایج ما از شبیه‌سازی داکینگ مولکولی نشان داد که داروی بوسیپرویر تمایل اتصال قوی‌تری در میان‌کنش با پروتئاز NS3/4A در هر دو حالت وحشی و جهش‌یافته در مقایسه با دو داروی دیگر نشان داد. داده‌های به‌دست‌آمده از محاسبه‌های انرژی آزاد اتصال مبتنی بر مکانیک مولکولی مساحت سطح پواسون- بولتزمن نتایج داکینگ مولکولی را تأیید می‌کند. محاسبه‌های انرژی آزاد همچنین

- [20] Sardana VV, Blue JT, Zugay-Murphy J, Sardana MK, Kuo LC. An Uniquely Purified HCV NS3 Protease and NS4A21–34 Peptide Form a Highly Active Serine Protease Complex in Peptide Hydrolysis. *Protein expression and purification*. 1999;16(3):440-7.
- [21] Romano KP, Ali A, Aydin C, Soumana D, Özen A, Deveau LM, et al. The molecular basis of drug resistance against hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors. *PLoS pathogens*. 2012;8(7):e1002832.
- [22] Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(13):1207-17.
- [23] Poordad F, McCone Jr J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(13):1195-206.
- [24] Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(25):2405-16.
- [25] Boonma T, Nutho B, Darai N, Rungrotmongkol T, Nunthaboot N. Exploring of paritaprevir and glecaprevir resistance due to A156T mutation of HCV NS3/4A protease: molecular dynamics simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2022;40(12):5283-94.
- [26] Meewan I, Zhang X, Roy S, Ballatore C, O'Donoghue AJ, Schooley RT, et al. Discovery of new inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A protease and its D168A mutant. *Acs Omega*. 2019;4(16):16999-7008.
- [27] Guo Z, Prongay A, Tong X, Fischmann T, Bogen S, Velazquez F, et al. Computational study of the effects of mutations A156T, D168V, and D168Q on the binding of HCV protease inhibitors. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2006;2(6):1657-63.
- [28] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-12.
- [29] Liu Y, Grimm M, Dai W-t, Hou M-c, Xiao Z-X, Cao Y. CB-Dock: A web server for cavity
- [9] Luik P, Chew C, Aittoniemi J, Chang J, Wentworth Jr P, Dwek RA, et al. The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(31):12712-6.
- [10] Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(22):10583-7.
- [11] Akeno N, Blackard JT, Tomer Y. HCV E2 protein binds directly to thyroid cells and induces IL-8 production: a new mechanism for HCV induced thyroid autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2008;31(4):339-44.
- [12] Chung RT, Monto A, Dienstag JL, Kaplan LM. Mutations in the NS5A region do not predict interferon-responsiveness in American patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. *Journal of medical virology*. 1999;58(4):353-8.
- [13] Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in virus research*. 2004;63:72-181.
- [14] Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, Roingeard P. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *Journal of virology*. 2002;76(8):4073-9.
- [15] Reddy U, Tandon H, Pradhan MK, Adhikesavan H, Srinivasan N, Das S, et al. Potent HCV NS3 Protease Inhibition by a Water-Soluble Phyllanthin Congener. *ACS omega*. 2020;5(20):11553.
- [16] Chatel-Chaix L, Baril M, Lamarre D. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors: A light at the end of the tunnel. *Viruses*. 2010;2(8):1752-65.
- [17] Romano KP, Laine JM, Deveau LM, Cao H, Massi F, Schiffer CA. Molecular mechanisms of viral and host cell substrate recognition by hepatitis C virus NS3/4A protease. *Journal of virology*. 2011;85(13):6106-16.
- [18] Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology journal*. 2011;8(1):1-10.
- [19] Naeem A, Waheed Y. Sequence analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 3-4A serine protease and prediction of conserved B and T cell epitopes. *Biomedical Reports*. 2017;7(6):563-6.

- [40] Behrard E, Barzegari E. Insights into resistance mechanism of hepatitis C virus nonstructural 3/4A protease mutant to boceprevir using umbrella sampling simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019.
- [41] Pan D, Xue W, Zhang W, Liu H, Yao X. Understanding the drug resistance mechanism of hepatitis C virus NS3/4A to ITMN-191 due to R155K, A156V, D168A/E mutations: a computational study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2012;1820(10):1526-34.
- [42] Jiang Y, Andrews SW, Condroski KR, Buckman B, Serebryany V, Wenglowksy S, et al. Discovery of danoprevir (ITMN-191/R7227), a highly selective and potent inhibitor of hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(5):1753-69.
- [43] Xue W, Pan D, Yang Y, Liu H, Yao X. Molecular modeling study on the resistance mechanism of HCV NS3/4A serine protease mutants R155K, A156V and D168A to TMC435. *Antiviral research*. 2012;93(1):126-37.
- [44] Xue W, Wang M, Jin X, Liu H, Yao X. Understanding the structural and energetic basis of inhibitor and substrate bound to the full-length NS3/4A: insights from molecular dynamics simulation, binding free energy calculation and network analysis. *Molecular Biosystems*. 2012;8(10):2753-65.
- [45] Pilot-Matias T, Tripathi R, Cohen D, Gaultier I, Dekhtyar T, Lu L, et al. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ABT-450. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):988-97.
- [46] Guan Y, Sun H, Pan P, Li Y, Li D, Hou T. Exploring resistance mechanisms of HCV NS3/4A protease mutations to MK5172: insight from molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Molecular BioSystems*. 2015;11(9):2568-78.
- [47] Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *Journal of hepatology*. 2011;55(1):192-206.
- detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020;41(1):138-44.
- [30] Berendsen HJ, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer physics communications*. 1995;91(1-3):43-56.
- [31] Bjelkmar P, Larsson P, Cuendet MA, Hess B, Lindahl E. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. *Journal of chemical theory and computation*. 2010;6(2):459-66.
- [32] Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*. 2007;126(1):014101.
- [33] Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*. 1981;52(12):7182-90.
- [34] Hess B, Bekker H, Berendsen HJ, Fraaije JG. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*. 1997;18(12):1463-72.
- [35] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*. 1993;98(12):10089-92.
- [36] Lobanov MY, Bogatyreva N, Galzitskaya O. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*. 2008;42:623-8.
- [37] Shukla R, Tripathi T. Molecular dynamics simulation of protein and protein–ligand complexes. *Computer-aided drug design*. 2020:133-61.
- [38] Murray CW, Baxter CA, Frenkel AD. The sensitivity of the results of molecular docking to induced fit effects: application to thrombin, thermolysin and neuraminidase. *Journal of computer-aided molecular design*. 1999;13:547-62.
- [39] Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering, design and selection*. 1995;8(2):127-34.

Molecular insight into the behavior of Boceprevir, Simeprevir, and Vaniprovir drugs in interaction with Hepatitis C virus NS3/4A serine protease in both wild-type and A156G mutant states: molecular dynamics simulation.

Hanieh Salari¹, Parviz Abdolmaleki^{2*}

1- MSc., Department of Biophysics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Parviz Abdolmaleki, P.O.Box: 14115-111
Email: parviz@modares.ac.ir

Received:2023/1/18

Accepted: 2024/2/12

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) NS3/4A Serine protease is an important drug target for treating patients with hepatitis C virus. However, its amino acid mutations, particularly A156G, commonly lead to the rapid emergence of drug resistance. Bosiprevir, simiprevir, and viniprevir drugs approved by the FDA show distinct resistance profiles against the HCV NS3/4A protease. In order to show the behavior of each of these drugs in the interaction with the protease in the wild type and A156G mutant, molecular dynamics simulation and binding free energy calculations were performed. MMPBSA-based binding free energy calculations showed that the binding affinity of each of the drugs in the interaction with NS3/4A protease in the wild type is significantly more than the interaction with the protease in the A156G mutant state. Free energy landscape (FEL) calculations revealed that in the presence of each of the drugs, more basins of conformations are formed. We hope that our data can provide useful insights for the design of a new effective inhibitory drug for the treatment of patients with the hepatitis C virus.

Keywords: Hepatitis C virus; NS3/4A protease; Mutation type; wild type