

Molecular Docking Study of HIV-1 Protease with Triterpenoides Compounds from Plants and Mushroom

Mokhtar Nosrati¹, Mandana Behbahani^{2*}

1- University of Isfahan, Isfahan, Iran.

2- Department of Microbial Biotechnology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Received: 24 Nov 2014, Accepted: 28 Jan 2015

Abstract

Background: Because of the reported high ability of virulence and medicinal resistance of HIV-1 virus during the last decades, many investigations have been performed concerning discovery and the introduction of anti-HIV-1 drugs. The results of numerous researches have shown that drugs and protease inhibitory compounds mainly containing plant derivatives specially terpenoids may control HIV-1 infection very effectively. The aim of this research is the bioinformatical study of HIV-1 protease inhibition by standard drugs and triterpenoides from plant and mushroom.

Materials and Methods: This is a descriptive-analytic study. In the present study, the structure of drugs, triterpene compounds, and HIV-1 protease enzyme was received from the databases such as Chem Spider, PubChem, Human Metabolome Database (HMDB), and Protein Data Bank (PDB). After that, molecular docking was performed by iGRMDOCK 2.1 software

Results: The results confirmed that the interactions of the triterpene compounds like the standard drugs were in three safeguarded and catalytic areas including central domain, flap and carboxylic terminal domain specially amino acids Asp25, Asp27, Ala28, Asp29 and Asp30 in active sites of HIV-1 protease. Also, The study of the interactions of these areas showed that there is a direct correlation between the strength of the interactions and IC50 values of these compounds.

Conclusion: Finally, with due attention to the high effectiveness and the proprietary function of triterpenoides, we can conclude that these compounds may be considered as effective HIV-1 antiprotease drugs.

Keywords: Bioinformatic, Triterpenoid, Docking, HIV-1 virus

*Corresponding Author:

Address: Department of Microbial Biotechnology, Isfahan University, Isfahan, Iran

Email: ma_behbahani@yahoo.com

بررسی داکینگ مولکولی آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 با ترکیبات تری ترپنوئیدی با منشأ گیاهی و قارچی

مختار نصرتی^۱، ماندانا بهبهانی^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل توان بالای عفونت‌زایی و مقاومت‌های دارویی گزارش شده در ویروس HIV-1 طی سال‌های اخیر، پژوهش‌های زیادی در خصوص کشف و معرفی داروهای ضد ویروس HIV-1 انجام شده است. نتایج بررسی‌های متعدد نشان داده است که داروها و ترکیبات مهارکننده پروتئاز که سهم عمده‌ای از آنها را مشتقات گیاهی به ویژه ترپنوئیدها تشکیل می‌دهند، در کنترل عفونت ناشی از ویروس HIV-1 بسیار موثر می‌باشند. هدف از این پژوهش بررسی بیوانفورماتیکی مهار آنزیم پروتئاز HIV-1 به وسیله‌ی داروهای استاندارد و ترکیبات تری ترپنوئیدی با منشأ گیاهی و قارچی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به روش توصیفی-تحلیلی انجام گرفت. برای انجام این بررسی بیوانفورماتیکی، ساختار مربوط به داروها، ترکیبات تری ترپنی و آنزیم پروتئاز HIV-1 به ترتیب از پایگاه داده‌های Chem spider، Pubchem، HMDB و PDB دریافت شد. سپس داکینگ مولکولی به وسیله نرم افزار iGEMDOK2.1 انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که محل برهم‌کنش ترکیبات تری ترپنی همانند داروهای استاندارد، سه ناحیه حفاظت شده و کاتالیتیکی دومین مرکزی، فلاپ و دومین انتهای کربوکسیل خصوصاً اسید آمینه‌های Gly27-Ala28-Asp25-ASP29-Asp30 واقع در جایگاه فعال پروتئاز HIV-1 می‌باشد. هم‌چنین بررسی برهم‌کنش‌های این نواحی نشان داد که استحکام میان‌کنش‌های ایجاد شده در این مناطق ارتباط مستقیمی با مقادیر IC50 این ترکیبات دارد.

نتیجه‌گیری: در پایان با توجه به اثر بخشی بالا و عمل اختصاصی تری ترپنوئیدها می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیبات می‌توانند به عنوان داروهای موثر ضد پروتئاز HIV-1 مطرح شوند.

واژگان کلیدی: بیوانفورماتیک، ترپنوئید، داکینگ، ویروس HIV-1

* نویسنده مسئول: دانشگاه اصفهان، دانشگاه اصفهان، گروه بیوتکنولوژی میکروبی

مقدمه

ایدز یکی از بیماری‌های مخرب سیستم ایمنی انسان است که به وسیله ویروس HIV ایجاد می‌شود. این ویروس بر اساس سازماندهی ژنتیکی و توان عفونت‌زایی به دو گروه HIV-1 و HIV-2 تقسیم شده است که ویروس HIV-1 به علت پراکنش وسیع جهانی و قابلیت بالای عفونت‌زایی بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است (۱). این ویروس با اتصال به سلول‌های CD4⁺ موجود در سیستم ایمنی سیکل عفونی خود را شروع می‌کند. یکی از آنزیم‌های بسیار مهم در تکمیل سیکل عفونی ویروس HIV-1 آنزیم پروتئاز است که با ایجاد برش در پلی پروتئین‌های ویروسی بیان شده در سلول میزبان موجب شکل‌گیری پروتئین‌های فعال ویروسی می‌گردد (۲).

این آنزیم جزو آسپارتیک پروتئازها بوده و از لحاظ ساختاری به صورت یک همودایمر فعالیت می‌کند. هر مونومر این آنزیم دارای ۹۹ اسید آمینه بوده که به صورت دو صفحه بتا ناهمسو و یک ماریچ آلفا سازماندهی شده است. جایگاه فعال این آنزیم بین دو مونومر وجود داشته که دارای توالی حفاظت شده Asp25-Thr26-Gly27 می‌باشد. باقیمانده Asp25 در هر مونومر به عنوان اسید آمینه‌های کاتالیکی عمل می‌کند. به همین دلیل این ناحیه از آنزیم، هدف برخی داروهای ضد پروتئاز قرار گرفته است (۲، ۳). به علت نقش ضروری آنزیم پروتئاز در تکمیل چرخه عفونی ویروس HIV-1 داروهای هم‌چون: داروناویر (Darunavir)، ایندیناویر (Indinavir)، نفلیناویر (Nelfinavir)، آمپرناویر (Amprenavir) و تپیراناویر (Tipranavir) به عنوان داروهای پیشرو در درمان عفونت HIV-1 مطرح شده‌اند (۴).

از جمله رهیافت‌های مهم و نوین در زمینه طراحی و ساخت داروهای جدید، بررسی‌های بیوانفورماتیکی می‌باشد. با توجه به هزینه بالای کار آزمایشی‌های بالینی و آزمایشگاهی، وقت گیر بودن و احتمال بروز خطا، امروزه تکنی‌های مختلف بیوانفورماتیکی در طراحی داروهای جدید استفاده می‌شود. داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی، تعیین نقطه هدف و بررسی‌های پایداری شیمیایی از مهم‌ترین روش‌های

بیوانفورماتیکی استفاده شده در طراحی دارو می‌باشند. در این بین داکینگ مولکولی از جایگاه ویژه‌ای در روند طراحی داروهای جدید، بررسی و مقایسه اثر بخشی آنها برخوردار است (۵). در این تکنیک می‌توان با در نظر گرفتن حالت‌های مختلف مولکول‌های مورد نظر در فضای سه بعدی نحوه میان‌کنش آنها را بررسی کرد و عوامل موثر در برهم‌کنش درگیرانه‌تر و مهم از لحاظ دارو شناختی را تعیین نمود. بررسی‌های بیوانفورماتیکی با ابزار داکینگ مولکولی طی سال‌های اخیر منجر به بررسی دقیق مکانیسم مقاومت‌های دارویی و نیز معرفی ترکیبات جدید با پتانسیل مهار تکثیر، ورود و توقف فعالیت آنزیم‌های کلیدی ویروس HIV-1 شده است (۶، ۷).

یکی از راهکارهای نوین درمانی عفونت HIV-1 غیر از طراحی و سنتز شیمیایی مهارگرهای پروتئاز این ویروس، جستجوی مهار کننده‌های این آنزیم در بین ترکیبات طبیعی به منظور دستیابی به داروهایی با کمترین اثرات جانبی است (۷). تا کنون پژوهش‌های زیادی جهت شناسایی، جداسازی و معرفی ترکیبات طبیعی با قابلیت مهار آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 صورت گرفته‌اند و ترکیبات متنوعی از گروه‌های فلاونوئیدی، آلکالوئیدی و ترپنوئیدی به عنوان مشتقات گیاهی مهارگر پروتئاز HIV-1 مطرح شده‌اند (۸). در این بین ترپنوئیدها به ویژه تری ترپنوئیدها به علت تنوع بالا، IC50 پایین و حضور در سلسله‌های گیاهی، جانوری و میکروارگانیسم‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۹-۱۳).

ترپنوئیدها عمده‌ترین ترکیبات ثانویه گیاهی را شامل شده که تاکنون بیش از ۳۶۰۰۰ نوع از آنها گزارش شده است (۱۴-۱۸). این ترکیبات دارای خواص متعدد دارویی هم‌چون ضد سرطانی (۱۹)، ضد اکسیدان (۲۰)، ضد التهاب (۲۱)، ضد ویروسی (۲۲) و ضد باکتریایی (۲۳) بوده‌اند به طوری که ارزش اقتصادی تجارت داروهای مبتنی بر ترکیبات ترپنی در آمریکا حدود ۱۲ بلیون دلار در سال ۲۰۰۲ برآورد شده است. این ترکیبات دارای واحدهای ساختاری ۵ کربنه مشترکی به نام ایزوپرن هستند که بر اساس تعداد اتم کربن و واحدهای ایزوپرنی موجود در ساختار ترپنوئیدها آنها را طبقه‌بندی می‌کنند (۲۴).

ترکیبات طی بررسی‌های عملی ثابت شده و IC50 آنها گزارش شده است.

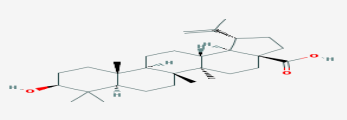
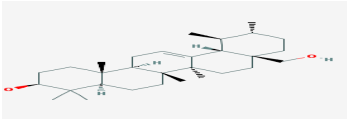



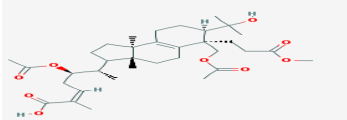

مواد و روش‌ها

جمع آوری داده‌ها:

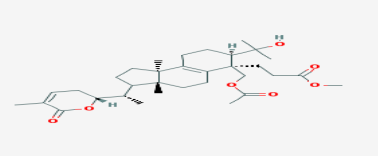
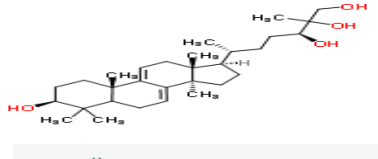
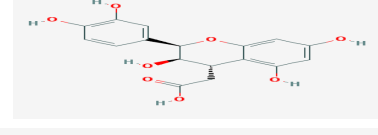
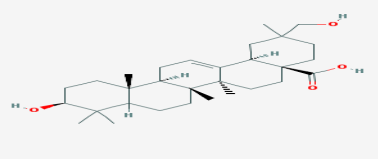

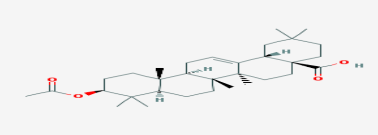
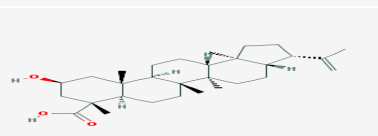
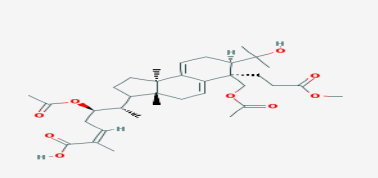
این پژوهش به شیوه توصیفی - تحلیلی انجام شد. در این مطالعه برهم کنش ۱۵ ترکیب تری تریپنی که قبلاً طی بررسی‌های عملی مختلف قابلیت مهار آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 از طریق آنها به اثبات رسیده بود، به شرح جداول ۱ و ۲ مورد بررسی قرار گرفت. به منظور دست یابی به ساختار ۲ و ۳ بعدی آنها، از سه پایگاه داده‌ای مربوط به ترکیبات شیمیایی شامل HMDB، Chempider و Pubchem استفاده شد. براساس IC50 تری تریپنوئیدهای مورد بررسی آنها را در دو گروه الف و ب طبقه بندی نموده که اطلاعات مربوط به ساختار دو بعدی و IC50 این ترکیبات به ترتیب در جداول ۱ و ۲ ذکر شده است.

تا کنون چندین ترکیب تریپنی گیاهی، قارچی یا نیمه سنتزی با قابلیت مهار آنزیم پروتئاز HIV-1 معرفی شده‌اند که قسمت اعظمی از آنها را تری تریپنها تشکیل می‌دهند (۱۳-۱۵). این ترکیبات دارای ۶ واحد ایزوپرنی و ۳۰ اتم کربن بوده که تاکنون ۴۰۰۰ نوع از آنها معرفی شده است. مسیر بیوسنتزی این ترکیبات از موالونیک اسید شروع شده و علاوه بر گیاهان در برخی قارچ‌ها مثل *Ganoderma colossus* و نیز در بدن جانوران و در ساختار ترکیباتی هم‌چون هورمون‌های استروئیدی و پروستاگلاندین‌ها وجود دارند (۱۶، ۱۷). از تری تریپنوئیدها خواص متعدد دارویی هم‌چون ضد التهاب، ضدباکتری، ضد ویروس و ضد سرطانی گزارش شده است (۲۱-۱۸). در این مطالعه به بررسی بیوانفورماتیکی مهار آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 از طریق ۱۵ ترکیب تری تریپنی طبیعی می‌پردازیم. هدف از این پژوهش معرفی نواحی مهم و اسید آمینه‌های کلیدی در روند مهار پروتئاز ویروس HIV-1 است. لازم به ذکر است که قابلیت مهار پروتئاز HIV-1 به وسیله‌ی این

جدول ۱. تری تریپنوئیدهای گروه الف با IC50 کمتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر

ردیف	نام ترکیب	IC50	منبع	ساختار دو بعدی
۱	Betulinic acid	۲.۵	<i>Cratoxylum arborescens</i>	
۲	Uvaol	۳.۵	<i>Crataegus pinatifida</i>	
۳	Colossolactone G	۵	<i>Ganoderma colossus</i>	
۴	Schisanlactone A	۵	<i>K. longipedunculata</i>	
۵	Oleanolic acid	۶.۳	<i>Panax ginseng</i>	
۶	Ursolic acid	۸.۹	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	
۷	Colossolactone V	۹	<i>Ganoderma colossus</i>	

جدول ۲. تری ترینوئید های گروه الف با IC50 بیشتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر

ردیف	نام ترکیب	IC50	منبع	ساختار دو بعدی
۱	Colossolactone VII	۱۳.۸	<i>Ganoderma colossum</i>	
۲	Ganoderiol F	۲۴	<i>Ganoderma Lucidum</i>	
۳	Dryopteris acids A	۲۶.۵	<i>Dryopteriscrassirhizoma</i>	
۴	Mesenbryan themoidgenic acid	۲۸	<i>Stauntonia obovatifoliola</i>	
۵	Colossolactone VIII	۳۱.۴	<i>Ganoderma colossum</i>	
۶	3-O-acetyloleanolic acid	۳۸	<i>Stauntonia obovatifoliola</i>	
۷	Dryopteris acids B	۴۴.۵	<i>Dryopteriscrassirhizoma</i>	
۸	Colossolactone VI	۱۰۰	<i>Ganoderma colossum</i>	

منظور مشاهده دقیق ساختار دوم، سوم و وضعیت قرار گیری اسید آمینه‌ها، جایگاه فعال آنزیم و تبدیل فرمت mol تری ترینوئیدها به فرمت pdb از نرم افزار Python 1.5 Viewer استفاده گردید.

جهت مقایسه عملکرد ترکیبات تری ترینی مذکور شده و دستیابی به نتایج قابل اطمینان برهم کنش مولکولی، ۱۰ داروی تأیید شده مهارکننده پروتئاز HIV-1 به شرح جدول ۳ مورد مطالعه قرار گرفت. ساختار مربوط به

جهت دستیابی به ساختار کامل آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 از پایگاه داده‌های پروتئین (PDB) به آدرس WWW.pdb.org استفاده شد. به علت تعداد بالای ساختارهای گزارش شده مرتبط با این آنزیم در مطالعه حاضر از ساختار کامل آنزیم پروتئاز HIV-1 که قبلاً در مطالعات بیوانفورماتیکی مشابه مورد بررسی قرار گرفته بود، استفاده نمودیم. ساختار ذکر شده به شماره دسترسی 1-HXW در پایگاه داده‌های پروتئین (PDB) دریافت شد. به

برهمکنش ۲۰۰ (آنگستروم) با قابلیت بررسی میان کنش‌های هیدروژنی-الکتروستاتیکی و واندروالسی در کل جایگاه فعال آنزیم انجام شد و نتایج حاصل با هم مقایسه گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از این بررسی حاکی از برهم‌کنش‌های مستحکم داروهای استاندارد در سه منطقه حفاظت شده دومین مرکزی، فلاپ آنزیمی (حلقه‌های سنجاق سری ورودی جایگاه فعال) و دومین انتهای کربوکسیل می‌باشد. میان‌کنش‌های ایجاد شده در این نواحی که غالباً از نوع واندروالسی می‌باشند، در خصوص این داروها در دو منطقه دومین مرکزی و فلاپ قوی‌تر می‌باشد و اتصال به نواحی ذکر شده با انرژی کمتری صورت می‌گیرد. نتایج به دست آمده در مورد این ترکیبات در جدول ۴ خلاصه شده است.

از بررسی تری ترپنوئیدهای مورد مطالعه نیز نتایج مشابهی حاصل شد، به طوری که برهم‌کنش‌های مستحکم این متابولیت‌ها در دو منطقه حفاظت شده دومین مرکزی و فلاپ آنزیمی صورت گرفت. اما اتصال این ترکیبات با دومین انتهای کربوکسیل میان‌کنش‌های مستحکمی را ایجاد نکرد. داده‌های به دست آمده در خصوص داکینگ مولکولی این ترکیبات که در جدول ۵ ذکر شده است نشان دهنده ارتباط مستقیم بین قدرت میان‌کنش‌های ایجاد شده با پروتئاز HIV-1 و IC50 می‌باشد. به طوری که هرچه IC50 ترکیب پایین‌تر باشد برهم‌کنش با دو ناحیه ذکر شده به همان نسبت قوی‌تر است. بررسی انرژی برهمکنش و IC50 تری ترپنوئیدها نشان داد که ترکیباتی با IC50 کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی لیتر با انرژی کمتر از ۳۰- کیلوگرم بر مول به دو منطقه اول و دوم متصل شده که با افزایش IC50 میزان این نیز انرژی افزایش می‌آید.

مقایسه داده‌های مرتبط با اسید آمینه‌های کلیدی و مکانیسم مهار پروتئاز از طریق ترکیبات تری ترپنوئیدی و داروهای استاندارد که در جداول ۶ و ۷ خلاصه شده است، نشان داد که ارتباط مستقیمی بین تمایل اتصال به اسید

این داروها از پایگاه داده‌ای Drug Bank به آدرس www.drugbank.ca دریافت شد و مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۳. داروهای استاندارد مورد مطالعه

ردیف	نام دارو	شماره دسترسی در Drug Bank	نوع دارو
۱	Tipranavir	DB00932	آلی- فنیل پروپانوئید
۲	Amprenavir	DB00701	آلی- بنزنوئید
۳	Indinavir	DB00224	آلی-بنزنوئید-فنیل پروپیل آمین
۴	Nelfinavir	DB00220	آلی-آنالوگ پپتیدی
۵	Darunavir	DB01264	آلی-بنزن سولفونامید-آنالوگ پپتیدی
۶	Lopinavir	DB01601	آلی-بنزنوئید-فنتیل آمین
۷	Atazanavir	DB01072	آلی-آنالوگ پپتیدی
۸	Saquinavir	DB01232	آلی-آنالوگ پپتیدی
۹	Telaprevir	DB05521	آلی-آنالوگ پپتیدی
۱۰	Ritonavir	DB00503	آلی-آنالوگ پپتیدی

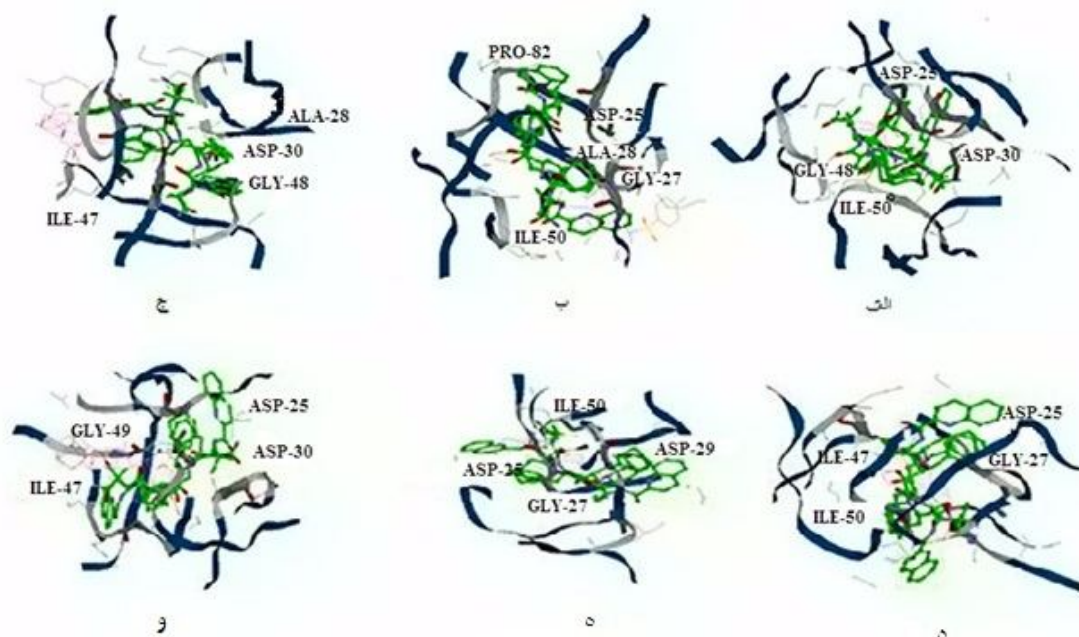
انجام داکینگ مولکولی

در این پژوهش به منظور بررسی برهم‌کنش مولکولی بین ترکیبات تری ترپنی و آنزیم پروتئاز از نرم افزار اختصاصی داکینگ مولکولی iGEMDOCK 2.1 استفاده شد. این نرم افزار امکان مشاهده سه بعدی نحوه میان‌کنش تری ترپن‌ها و آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1، اسید آمینه‌های مشارکت کننده در میان‌کنش و گروه‌های عاملی فعال در روی مولکول‌های تری ترپنی را فراهم می‌آورد.

در مطالعه حاضر به منظور به حداقل رساندن خطای تمامی شرایط داکینگ در مورد ترکیبات تری ترپنی و داروهای استاندارد اعم از نرم افزارهای استفاده شده، تعداد دفعات برهم‌کنش، ناحیه بررسی برهم‌کنش، آنزیم پروتئاز مورد مطالعه و سرعت انجام داکینگ یکسان در نظر گرفته شد. طی این بررسی داکینگ مولکولی بین تری ترپنوئیدها و داروهای مهارگر پروتئاز HIV-1 با روش داکینگ استاندارد، تعداد دفعات برهم‌کنش ۷۰، قطر ناحیه

ترکیباتی با IC50 کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی لیتر قابلیت ایجاد میان کنش های قوی با این اسید آمینه ها را دارند. نحوه میان کنش و قرارگیری ترکیبات تری ترپنوئیدی با IC50 کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی لیتر و داروهای استاندارد در شکل ۱ نشان داده شده است که حاکی از تشابه مکانیسمی ترکیبات مورد بررسی با داروهای رایج مورد استفاده در روند مهار آنزیم پروتئاز می باشد.

آمینوهای Asp25, Gly27, Ala28, Asp29, Asp30, Ile47, Gly49, Ile50 و IC50 این ترکیبات وجود دارد. لازم به ذکر است که همگی این اسید آمینه ها در نواحی کاتالیک و حفاظت شده آنزیمی قرار دارند. در این بین اتصال به دو اسید آمینه شده جایگاه فعال و نقش کلیدی در کاتالیز آنزیمی ارتباط دقیق تری با IC50 تری ترپنوئیدها دارد. به طوری که فقط



شکل ۱. نحوه میان کنش و طرز قرار گیری داروهای استاندارد و ترکیبات تری ترپنی در جایگاه فعال آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 (الف، ب و ج: به ترتیب به داروناویر، نفلیناویر و آمپرناویر مربوط می باشند؛ د، خ، ی: به ترتیب به بوتیلینیک اسید، یوانول و کولوسولاکتون جی مربوط می باشند)

جدول ۴. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین داروهای استاندارد و آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1

اسید آمینه های مشترک در برهم کنش داروهای استاندارد و پروتئاز HIV-1																				
ردیف	نام دارو	انرژی کل برهمکنش	انرژی ناشی از هیدروژنی	انرژی ناشی از پیوندهای الکتروستاتیکی	انرژی ناشی از پیوندهای واندروالسی	اسید آمینه های مشترک در برهم کنش داروهای استاندارد و پروتئاز HIV-1														
						8 Asp	25 Gly	27 Ala	28 Asp	29 ASP	30 Ile	47 Gly	48 Gly	49 Ile	50 Gly	52 Phe	53 Ile	54 Phe	81 Ile	84 Asp
۱	Darunavir	-۹۰.۶۳	-۱۹.۷	۰	-۷۰.۹۳	-۳.۳	-۵	-۸۶	۰	-۵۹	-۷۶	-۱۳	۰	-۱۳	-۷۶	-۵۹	۰	-۱۳	-۷۶	
۲	Amprenavir	-۸۹.۵۷	۰	۰	-۸۹.۵۷	-۶.۶	-۴	-۰.۵	۰	۲۲.۲	-۱۰.۸	-۹.۴	۰	-۹.۴	-۱۰.۸	۲۲.۲	۰	-۹.۴	-۱۰.۸	
۳	Atazanavir	-۲۰.۱۸	۰	۰	-۲۰.۱۸	۰	۰	-۷.۱	۰	۰	۰	۰	-۱۳	۰	۰	۰	۰	-۱۳	۰	
۴	Nelfinavir	-۸۰.۷۳	۰	۰	-۸۰.۷۳	-۱.۶	۰	۰	۰	-۲.۳	-۳.۳	-۱۳.۴	-۸.۳	-۳.۳	-۱۳.۴	-۲.۳	-۱۳.۴	-۳.۳	-۱۳.۴	
۵	Lopinavir	-۱۴۸.۹۷	-۲۰.۳۴	۰	-۱۲۸.۶۳	-۴.۱	-۶.۱	۰	۰	-۱۷.۱	-۱۴.۷	-۴.۳	-۱۵.۳	-۱۴.۷	-۱۷.۱	-۱۵.۳	-۱۱.۴	-۲۷.۴	-۱۵.۶	
۶	Indinavir	-۱۰۱.۴۲	۰	۰	-۱۰۱.۴۲	-۶	۰	۰	۰	-۲۱.۹	-۸	-۱۰.۶	-۷.۴	-۱۰.۶	-۲۱.۹	-۷.۴	-۲۶.۳	-۷.۲	-۶.۳	
۷	Ritonavir	-۱۴۰.۹۶	۰	۰	-۱۴۰.۹۶	۰	۰	۰	۰	-۱۱.۴	-۲۷.۵	-۱۵.۸	-۱۳.۴	-۲۷.۵	-۱۱.۴	-۱۵.۸	-۱۳.۴	-۱۷	-۹.۸	
۸	Saquinavir	-۹۹.۵	۰	۰	-۹۹.۵	-۴	-۳	۰	۰	۰	-۱۲.۱	-۸	-۴.۱	-۱۲.۱	۰	-۴.۱	-۱۱.۷	-۱۳	-۱۲.۳	
۹	Tipranavir	-۱۳۴.۲۲	-۲۱.۴۳	۰	-۱۱۲.۷۹	-۴.۵	-۷	۰	۰	-۹.۹	-۱۴.۸	-۱۷.۲	-۵.۲	-۱۷.۲	-۹.۹	-۱۴.۸	-۶.۱	-۹	-۸	
۱۰	Telaprevir	-۹۸.۰۰	۰	۰	-۹۸.۰۰	-۵	-۴.۶	-۳.۱	۰	۰	-۱۳.۸	-۱۳.۳	-۷.۸	-۱۳.۳	-۱۳.۸	-۷.۸	-۹.۲	-۱۱	-۴.۹	

جدول ۵. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین ترکیبات تری ترونی و آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1

اسید آمینه های مشترک در برهم‌کنش دارو های استاندارد و پروتئاز HIV-1																Ic50	آنزیمی ناشی از پیوندهای واندروالسی	آنزیمی ناشی از پیوندهای الکتروستاتیکی	آنزیمی ناشی از پیوندهای هیدروژنی	آنزیمی کل برهمکنش	نام دارو	ردیف
Arg 8	Asp 25	GLY 27	Ala 28	Asp 29	ASP 30	Ile 47	Gly 48	Gly 49	Ile 50	Gly 52	Phe 53	Ile 54	Pro 81	Ile 84								
-۱	-۴.۲	-۱۲.۳	-۱۲.۴	-۷.۸	-۷.۳	-۱۱.۲	-۵.۲	-۷.۲	-۱۲.۶	.	.	.	-۲.۱	-۳.۱	۲.۵	-۹۴.۶۳	.	.	-۹۴.۶۳	۷	۱	
۲	۸	-۹۱.۲	.	.	-۹۱.۲	۳.۵	-۳	-۱.۷	.	.	-۳.۴	-۱۰.۸	-۷.۴	-۴.۵	-۱۰.۲	-۶.۴	-۷.۱	-۱۱.۲	-۹.۹	-۳.۱	.	
۳	۹	-۶۴.۶۵	.	.	-۶۴.۶۵	۵	-۳	-۱۰.۴	-۶.۱	-۳	-۹.۴	-۵.۹	.	-۴.۲	-۳.۱	-۲.۳	.	
۴	۱۴	-۶۹.۷	.	.	-۶۹.۷	۵	-۳.۱	.	-۲	.	.	-۹.۶	-۴.۲	-۳.۶	-۸.۵	-۵.۲	.	-۴.۱	-۳	-۲.۲	.	
۵	۳	-۶۴.۳	.	.	-۶۴.۳	۶.۳	-۲.۲	.	-۱.۹	.	.	-۸.۳	-۳.۸	-۵.۴	-۸.۴	-۵.۹	.	-۳.۳	-۲	-۲	.	
۶	۱۵	-۷۱.۲	.	.	-۷۱.۲	۷.۸	-۷.۳	-۳.۱	-۷.۸	-۷.۳	-۴.۲	.	-۲.۹	-۱.۷	-۱.۶	.	
۷	۶	-۹۸.۹	.	.	-۹۸.۸	۸.۹	-۲	.	.	-۳.۳	-۲.۱	-۶.۶	-۳.۱	-۴.۳	-۶.۵	-۳.۹	.	-۲.۷	-۲.۱	.	.	
۸	۱۰	-۹۷.۴۳	.	.	-۹۷.۴۳	۹	.	.	.	-۴	.	-۵.۴	-۳.۳	-۴.۶	-۵.۸	-۸	.	-۲.۴	-۲	.	.	
۹	۱۲	-۷۰.۱	.	.	-۷۰.۱	۱۳.۸	-۳.۲	-۲.۲	-۳.۳	-۶.۹	-۵.۶	-۳.۳	.	-۲.۴	-۱.۵	.	.	
۱۰	۴	-۴۲	.	.	-۴۲	۲۶.۵	-۲.۲	-۳.۲	-۴.۴	-۶.۸	۸.۱	-۳.۳	.	-۲.۳	-۱.۲	.	.	
۱۱	۲	-۴۱	.	.	-۴۱	۲.۸	.	-۸	.	.	-۳.۱	-۴.۱	.	-۵.۵	-۴.۴	-۸	.	-۲.۲	-۱.۹	.	.	
۱۲	۱۳	-۴۳	.	.	-۴۳	۳۱.۴	-۴	-۳.۶	-۳.۱	-۳.۳	-۴.۱	.	.	-۲.۲	.	-۱.۹	.	
۱۳	۱	-۸۸.۳	.	.	-۸۸.۳	۲.۸	-۴.۳	.	.	-۸.۴	-۹	-۳.۴	-۱.۱	-۳.۱	-۴.۴	.	.	-۲.۱	.	-۱.۲	.	
۱۴	۵	-۹۱.۳۳	.	.	-۹۱.۳۳	۴۴.۵	.	.	.	-۸.۹	-۱۲	-۲.۷	-۱.۱	.	-۲	-۲	
۱۵	۱۱	-۳۹	.	.	-۳۹	۱۰۰	-۸.۸	-۲.۳	.	-۸.۲	-۱.۹	.	.	.	

جدول ۶. مجموع انرژی های ناشی از برهم کنش دارو های استاندارد و آنزیم پروتئاز HIV-1 در نواحی اول (-Asp29-Ala28-Gly27-Asp25) (Asp30)، دوم (Ile47-Gly48-Gly49-Ile50) و سوم (Pro81-Ile84)

ردیف	نام دارو	انرژی برهمکنش در ناحیه اول	انرژی برهم کنش در ناحیه دوم	انرژی برهم کنش در ناحیه سوم
۱	Darunavir	-۲۵.۷	-۲۶.۵	-۸.۳
۲	Amprenavir	-۱۷.۶	-۴۲.۴	-۱۰.۶
۳	Atazanavir	-۲۳	۰	۰
۴	Nelfinavir	-۴۲.۶	-۲۷.۳	-۱.۶
۵	Lopinavir	-۶۲.۴	-۵۱.۴	-۱۰.۲
۶	Indinavir	-۴۲.۲	-۴۷.۹	-۶
۷	Ritonavir	-۴۳.۴	-۶۸.۱	۰
۸	Saquinavir	-۴۶.۴	-۲۴.۲	-۷
۹	Tipranavir	-۳۳.۱	-۵۳.۱	-۱۱.۵
۱۰	Telaprevir	-۲۵.۱	-۳۳.۹	-۹.۶

جدول ۷. مجموع انرژی های ناشی از برهم کنش تری ترینوئیدها و آنزیم پروتئاز HIV-1 در نواحی اول (-Asp29-Ala28-Gly27-Asp25) (Asp30)، دوم (Ile47-Gly48-Gly49-Ile50) و سوم (Pro81-Ile84)

ردیف	تری ترینوئید	IC50	انرژی برهم کنش در ناحیه اول	انرژی برهم کنش در ناحیه دوم	انرژی برهم کنش در ناحیه سوم
۱	Betulinic acid	۲.۵	-۴۴	-۳۶.۲	-۵.۲
۲	Uvaol	۳.۵	-۳۷.۷	-۳۲.۹	-۴.۷
۳	Colossolactone G	۵	-۱۵.۵	-۲۸.۹	-۳
۴	Schisanlactone A	۵	-۱۴.۵	-۲۵.۹	-۳.۱
۵	Oleanolic acid	۶.۳	-۱۲.۶	-۲۵.۹	-۲.۲
۶	Ganoderiol F	۷.۸	-۹.۷	-۲۵.۵	۰
۷	Ursolic acid	۸.۹	-۸.۷	-۲۱.۴	-۲
۸	Colossolactone V	۹	-۸.۲	-۱۹.۹	۰
۹	Colossolactone VII	۱۳.۸	-۷.۲	-۱۵.۸	-۴.۵
۱۰	Dryopteris acids A	۲۶.۵	-۶.۹	-۱۴.۹	-۵.۴
۱۱	Mesenbryan themoidgenic acid	۲۸	-۶.۹	-۱۴.۲	-۵.۸
۱۲	Colossolactone VIII	۳۱.۴	-۳.۹	-۱۴.۱	۰
۱۳	3-O-acetyloleanolic acid	۳۸	-۳.۳	-۱۲.۱	-۴.۳
۱۴	Dryopteris acids B	۴۴.۵	-۲	-۳.۸	۰
۱۵	Colossolactone VI	۱۰۰	-۱.۹	۰	-۱۱.۱

بحث

نتیجه این بررسی نشان داد که ترکیبات تری ترینوئیدی مورد مطالعه می توانند آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 را به طور موثر مهار نمایند. این ترکیبات از طریق برهم کنش با اسید آمینه های کلیدی جایگاه فعال این آنزیم می توانند این

اسید آمینه ها را به طور موثر طی روند کاتالیز مهار نموده و مانع از فعالیت آنزیم شوند. در این پژوهش ارتباط مستقیمی بین تمایل اتصال ترکیبات تری ترپنی طبیعی به مناطق حفاظت شده آنزیم پروتئاز و IC50 این ترکیبات مشاهده گردید. تا کنون بررسی های زیادی در خصوص معرفی نواحی کاتالیزی

اصلی را در هیدرولیز پلی پروتئین‌های ویروسی و ایجاد پروتئین‌های فعال ایفا می‌کند فقط از طریق ترکیباتی با تمایل و اختصاصیت بالا شناسایی و مهار می‌گردد (۳۰). در این بررسی مشاهده گردید که تنها ترکیباتی که IC50 کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند می‌توانند میان‌کنش‌های مستحکمی را با این اسید آمینه ایجاد نموده و موجب مهار عملکرد پروتئاز ویروس HIV-1 گردند.

لذا با توجه به برهم‌کنش مستحکم ترکیبات تری تریپتی طبیعی با نواحی حفاظت شده آنزیمی و قابلیت عملکرد اختصاصی می‌توان این ترکیبات را به عنوان داروهای موثر ضد پروتئاز HIV-1 معرفی نمود که به علت منشأ طبیعی و احتمال ایجاد اثرات جانبی کمتر در صورت تقویت برهم‌کنش‌های ایجاد شده طی فرایندهای شیمیایی و زیست تبدیلی‌های میکروبی می‌توانند جایگزین‌های مناسبی برای داروهایی باشند که ویروس HIV-1 به آنها مقاوم شده است.

اگر چه کارایی بالای روش‌های بیوانفورماتیکی به ویژه داکینگ مولکولی در پیش‌بینی اثر بخشی ترکیبات دارویی مختلف به اثبات رسیده است، اما این تکنیک در خصوص معرفی ترکیبات موثر در مهار تکثیر ویروس HIV-1 از محدودیت‌های ذیل برخوردار است: ۱- طرز قرار گیری مولکول‌ها در فضای واقعی نسبت به حالت شبیه سازی شده متفاوت است، ۲- تعداد و حالت مولکول‌های که با مولکول هدف وارد واکنش می‌شوند در حالت شبیه سازی شده با حالت واقعی متفاوت است و ۳- هم‌چنین ممکن است مولکول مورد بررسی نتواند در حالت واقعی به سهولت با مولکول‌های هدف وارد واکنش شود.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات ترتیپتی مورد بررسی می‌توانند ضمن میان‌کنش با اسید آمینه‌های مهم واقع در فلاپ آنزیمی و

حفاظت شده آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 انجام شده است (۲۴-۲۲). نتایج این مطالعات نشان داده که توالی‌های بسیار حفاظت شده‌ای در مناطق ۳۰ تا ۳۸ و ۷۵ تا ۸۴ و سه ناحیه کاتالیک بسیار مهم در آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 وجود دارند که شامل دومین مرکزی (Asp25-Gly27-Ala28) (Asp29-Asp30)، ناحیه فلاپ (Ile47-Gly48-Gly49) (Ile50) و دومین انتهای کربوکسیل (Pro81-Ile84) می‌باشد. یکی از نواحی مهم جایگاه فعال که کمتر مورد توجه قرار گرفته نواحی سنجاق سری موسوم به فلاپ آنزیمی است (۲۴)، این قسمت از جایگاه فعال به عنوان تکیه‌گاه سوبسترا (پلی پروتئین‌های ویروسی) و مهارکننده‌ها عمل می‌نماید. هر فلاپ دارای سه ناحیه مشخص می‌باشد، از جمله: ۱- توالی در دسترس محیط که جایگاه اسید آمینه‌های lys55, Met46, Phe53 می‌باشد ۲- ناحیه آبگریز درونی که محل اسید آمینه‌های Leu54, Leu56, Leu47 است و ۳ - توالی غنی از گلايسين که اسید آمینه‌های Gly48, Gly49, Gly51, Gly52 را در بر می‌گیرد. ناحیه غنی از گلايسين و Leu50 منعطف‌ترین ناحیه از آنزیم پروتئاز را تشکیل می‌دهند که در فعالیت کاتالیک این آنزیم نقش به سزایی دارند (۲۹-۲۶). به علت اهمیت ناحیه فلاپ و سایر مناطق ذکر شده، بر هم‌کنش‌های ایجاد شده بین ترتیپتیوها و جایگاه فعال آنزیم با تمرکز بر این مناطق بررسی شد و مشاهده گردید که قدرت برهم‌کنش‌های ایجاد شده در مناطق بسیار حفاظت شده خصوصاً ناحیه دومین مرکزی به شدت تابع IC50 است. در این بین ارتباط IC50 و تمایل اتصال به دو اسید آمینه Asp25, Gly27 به ویژه Asp25 از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا این دو اسید آمینه در منطقه بسیار حفاظت شده و کاتالیک آنزیم قرار دارند. بسیاری از داروهای سنتزی معرفی شده در سال‌های اخیر از جمله Darunavir که در رده‌ی آنالوگ‌های پپتیدی طبقه‌بندی می‌شود با هدف اتصال به Asp25 طراحی شده‌اند. این اسید آمینه که در واقع نقش

8. Ma C, Miyashiro H, Hattori M, Shimotohno K. Screening of Chinese and Mongolian traditional medicines for the inhibitory activity on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Trad Med.* 1995;12:418-9.
9. Yang SS, Cragg GM, Newman DJ, Bader JP. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of natural products.* 2001;64(2):265-77.
10. Kaur R, Kharb R. Anti HIV potential of medicinally important plant. *International Journal of Pharma & Bio Sciences.* 2011;2(3).
11. Nakamura N, Hattori M. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization. *Chemical & pharmaceutical bulletin.* 2000; 48(11):1681-8.
12. Kleinwächter P, Anh N, Kiet TT, Schlegel B, Dahse H-M, Härtl A, et al. Colossolactones, New Triterpenoid Metabolites from a Vietnamese Mushroom *Ganoderma colossum* §. *Journal of natural products.* 2001;64(2):236-9.
13. El Dine RS, El Halawany AM, Ma C-M, Hattori M. Anti-HIV-1 protease activity of lanostane triterpenes from the vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. *Journal of natural products.* 2008;71(6):1022-6.
14. Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal Research Reviews.* 2004;24(1):90-114.
15. Cassels BK, Asencio M. Anti-HIV activity of natural triterpenoids and hemisynthetic derivatives 2004–2009. *Phytochemistry Reviews.* 2011; 10(4): 545-64.
16. Wang G, Tang w, Bidigare R. *natural products.* 1997. p. 197-227.
17. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry.* 2011; 72(6): 435-57.
18. Baglin I, Mitaine-Offer A-C, Nour M, Tan K, Cave C, Lacaille-Dubois M-A. A review of natural and modified betulinic, ursolic and

دومین مرکزی موجب مهار آنزیم پروتئاز ویروس HIV-1 گردند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و اساتید گروه آموزشی بیوتکنولوژی میکروبی دانشکده فن آوری‌های نوین دانشگاه اصفهان کمال تشکر و قدر دانی را دارند.

منابع

1. Ramalingam M, Karthikeyan S, Kumar DS. Docking Studies of HIV-1 Protease with Phytochemicals from *Mappia Foetida*. *International Journal of Computer Applications.* 2012; 43(4):16-22.
2. Luo M, Capina R, Daniuk C, Tuff J, Peters H, Kimani M, et al. Immunogenicity of sequences around HIV-1 protease cleavage sites: Potential targets and population coverage analysis for a HIV vaccine targeting protease cleavage sites. *Vaccine.* 2013;31(29):3000-8.
3. Ganguly AK, Alluri SS, Wang C-H, Antropow A, White A, Caroccia D, et al. Structural optimization of cyclic sulfonamide based novel HIV-1 protease inhibitors to picomolar affinities guided by X-ray crystallographic analysis. *Tetrahedron.* 2014;70(18):2894-904.
4. Alexander W, Jiri V. Inhibitors of HIV-1 protease a major success of structure-assisted drug design. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998; 27:249–84.
5. Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? An introduction and overview. 2000.p.83-100.
6. Mukesh B, Rakesh K. Review on Molecular docking. *Ijrap.* 2011;2(6):1746-51.
7. Grinter SZ, Zou X. Challenges, Applications, and Recent Advances of Protein-Ligand Docking in Structure-Based Drug Design. *Molecules.* 2014; 19(7):10150-76.

echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2003;3(6):525-39.

19. Topcu G, Ertas A, Kolak U, Ozturk M, Ulubelen A. Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. *Arkivoc*. 2007; 7:195-208.

20. Recio MdC, Giner RM, Mániz S, Ríos JL. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta medica*. 1995; 61(2):182-5.

21. Charles M. Effects of Triterpenoids on Herpes Simplex Virus Type 1 (Hsv-1) In Vitro. 2012; 1: 140-1.

22. Angeha JE, Huangb X, Swana GE, Möllmanb U, Sattlerb I, Eloffa JN. Novel antibacterial triterpenoid from *Combretum padoides* [Combretaceae]. *Arkivoc*. 2007;9:113-20.

23. Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, Kimani J, Krausa P, Newell H, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(9):1758-9.

24. Karlsson AC, Deeks SG, Barbour JD, Heiken BD, Younger SR, Hoh R, et al. Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human

immunodeficiency virus type 1 protease gene. *Journal of virology*. 2003;77(12):6743-52.

25. Hepler NL, Scheffler K, Weaver S, Murrell B, Richman DD, Burton DR, et al. IDEPI: Rapid Prediction of HIV-1 Antibody Epitopes and Other Phenotypic Features from Sequence Data Using a Flexible Machine Learning Platform. *PLoS computational biology*. 2014;10(9):e1003842-3.

26. Rose RB, Craik CS, Douglas NL, Stroud RM. Three-dimensional structures of HIV-1 and SIV protease product complexes. *Biochemistry*. 1996;35(39):12933-44.

27. Freedberg DI, Ishima R, Jacob J, Wang YX, Kustanovich I, Louis JM, et al. Rapid structural fluctuations of the free HIV protease flaps in solution: relationship to crystal structures and comparison with predictions of dynamics calculations. *Protein science*. 2002;11(2):221-32.

28. Karthik S, Senapati S. Dynamic flaps in HIV-1 protease adopt unique ordering at different stages in the catalytic cycle. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2011;79(6):1830-40.

29. Manikrao A, Mahajan N, Jawarkar R, Khatale P, Kedar C, Thombare S. Docking Analysis of Darunavir as HIV Protease Inhibitors. *Journal of Computational Methods in Molecular Design*. 2012;2(1):39-43.