

КОНФОРМАЦИЯ ПЕТЛИ V3 БЕЛКА GP 120 HIV-1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСНОГО ШТАММА HIV-HA1T1

© А. М. Андрианов

*Институт биоорганической химии НАН Республики Беларусь, Минск;
электронный адрес: andrianov@iboch.bas-net.by*

С использованием данных спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) методами математического моделирования построена структурная модель, описывающая конформационные свойства петли V3 белка gp 120 вируса иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1) в геометрическом пространстве углов внутреннего вращения. Определены элементы вторичной структуры и конформации нерегулярных участков фрагмента, образующего основную антигенную детерминанту вируса, а также детерминанты клеточного тропизма и образования синцития. На основе совместного анализа полученных результатов с данными более ранних исследований идентифицированы структурно консервативные аминокислоты петли V3 — перспективные «мишени» для создания противовирусных препаратов методами белковой инженерии. В частности, показано, что в списке конформационно жестких остатков присутствует Asp-25, определяющий взаимодействие вируса с первичным рецептором CD4 клеточной мембраны, и Arg-3, играющий ключевую роль при его связывании с корецептором CCR-5 и с синдеканами — протеогликанами гепарансульфата. Результаты работы обсуждаются с учетом данных литературы о биологической активности индивидуальных аминокислотных остатков петли V3 белка gp 120 HIV-1.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека типа 1, белок gp120, петля V3, конформация, компьютерное моделирование, спектроскопия ЯМР.

Принятые сокращения: HIV-1 — вирус иммунодефицита человека типа 1, ИДЭ — иммунодоминантный эпитоп, ОАД — основная антигенная детерминанта, ТФЭ — трифторэтанол.

Изучение пространственной структуры белков оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1) представляет собой важную задачу, решение которой может обеспечить конструктивную основу для создания противовирусных препаратов. Существенным препятствием на пути достижения этой цели является высокий уровень вариабельности белков оболочки HIV-1. Поэтому в настоящее время усилия исследователей направлены на выявление консервативных участков вируса и установление их роли в процессе его функционирования. В частности, было обнаружено, что основная антигенная детерминанта (ОАД) HIV-1 петля V3 белка gp120 образует гипервариабельный фрагмент (LaRosa et al., 1990), который, однако, проявляет тенденцию к сохранению отдельных аминокислот на N- и C-концах, а также в центральной области, формирующей иммунодоминантный эпитоп (ИДЭ) HIV-1 (Javaherian et al., 1990). Иммунохимические свойства петли V3 позволяют рассматривать ее в качестве перспективного фрагмента, на основе которого возможно создание лекарственных средств для профилактики и лечения СПИДа (Hartley et al., 2005). Так, многочисленные эксперименты (см., например: Javaherian et al., 1989; Gorny et al., 1993) свидетельствуют о том, что антитела, нейтрализующие вирусную активность, взаимодействуют только с ее консервативной областью. Связывание антител блокирует внедрение вируса в клетку, но не предотвращает его взаимодействия с первичным рецептором CD4 (Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996;

Dettin et al., 2003). Наряду с ИДЭ анализируемый участок белка gp120 формирует главные детерминанты, ответственные за клеточный тропизм и образование синцития (Shioda et al., 1992; Milich et al., 1993; Chavda et al., Yamashita et al., 1994; Mammano et al., 1995). Присутствие консервативных аминокислот, входящих в состав биологически активных участков фрагмента, указывает на высокую вероятность их вклада в формирование функциональных особенностей вируса, которые проявляются на различных этапах его репликационного цикла.

Важная роль петли V3 в процессах нейтрализации вируса, клеточного тропизма и слияния клеток объясняет тот факт, что в последние годы она стала объектом пристального внимания со стороны исследователей, занимающихся разработкой лекарственных препаратов методами белковой инженерии (Hartley et al., 2005; Sirois et al., 2005). Очевидно, что успешная реализация таких исследований невозможна без наличия данных о тонких деталях ее структуры.

В результате рентгеноструктурного анализа белка gp120 трехмерная структура петли V3 не была установлена из-за технических трудностей (Kwong et al., 1998). В то же время известно несколько структурных моделей (Rini et al., 1993; Ghiara et al., 1994, 1997; Stanfield et al., 1999, 2003, 2004), описывающих конформации ее синтетических фрагментов в кристалле в комплексе с нейтрализующими антителами. Согласно этим моделям, ИДЭ HIV-1 (гексапептид Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe) может

принимать как минимум две конформации, одна из которых образует двойной β -изгиб II—III (Ghiara et al., 1994, 1997; Stanfield et al., 2003), а другая — одиночный β -поворот I (Stanfield et al., 1999). Рентгеновские исследования химерного риновируса MN-III-2 (Ding et al., 2002), содержащего главный иммуногенный участок HIV-1, свидетельствуют о том, что, будучи встроенным в чужеродную пептидную цепь, он принимает конформацию двойного β -изгиба I—I, напоминающую структуру, описанную ранее для гексапептида петли V3 (Stanfield et al., 1999). Анализ петли V3, выполненный с помощью методов спектроскопии ЯМР, показал, что в водном растворе она образует неупорядоченную конформацию с ярко выраженной популяцией реверсивных изгибов на инвариантном тетрапептиде Gly-Pro-Gly-Arg (Chandrasekhar et al., 1991; Gupta et al., 1993; Tolman et al., 1993; Catasti et al., 1995; Vranken et al., 1996; Vu et al., 1996; Jelinek et al., 1997; Sarma et al., 1997). Однако их количественная идентификация привела к неоднозначным результатам. Так, согласно данным ряда работ (Gupta et al., 1993; Catasti et al., 1995), конформационные параметры центрального дипептида Pro-Gly отвечают структуре β -изгиба II. Дальнейшие исследования показали, что на рассматриваемом участке петли V3 вероятно реализация и других состояний: динамической смеси двух конформеров — β -изгибов I и II (Chandrasekhar et al., 1991; Vranken et al., 1996; Vu et al., 1996; Sarma et al., 1997), нестандартного β -поворота (Tolman et al., 1993), а также двойного β -изгиба (Jelinek et al., 1997), аналогичного тому, который был обнаружен методом рентгеновской кристаллографии (Ghiara et al., 1994, 1997; Stanfield et al., 2003).

Таким образом, анализ литературы показывает, что она содержит недостаточную, а в отдельных случаях и противоречивую информацию о принципах пространственной организации ОАД HIV-1. Кроме того, в большинстве цитированных работ проведены структурные исследования петли V3 HIV-MN, принадлежащей штамму вируса, выделенному у вирусоносителей из Миннесоты (США). Очевидно, что для информационного обеспечения работ, связанных с получением лекарственных препаратов и использующих данные о пространственной структуре и конформационных свойствах петли V3 HIV-1 (Sirois et al., 2005), весьма актуальным представляется изучение принципов ее структурной организации в вирионах, циркулирующих в разных регионах мира.

Результаты, представленные в статье, являются продолжением начатых нами ранее теоретических исследований пространственной структуры ОАД HIV-1, базирующихся на данных спектроскопии ЯМР (Andrianov, 1999, 2002, 2004a, 2004b; Андрианов, 2002; Андрианов, Соколов, 2003; Andrianov, Sokolov, 2003, 2004). В предыдущих сообщениях была представлена информация о конформационных свойствах петли V3 в вирусных штаммах HIV-Thailand, HIV-MN и HIV-RF.

Цель настоящей работы заключалась в определении по данным спектроскопии ЯМО локальной структуры (конформаций индивидуальных аминокислотных остатков) ОАД белка gp120 в вирионах HIV-Haiti и в построении на этой основе структурной модели, описывающей ее конформационные свойства в геометрическом пространстве углов внутреннего вращения. Для достижения этой цели был осуществлен расчет локальной структуры ОАД HIV-Haiti в водном растворе и в смеси вода/трифторэтанол (7 : 3) на основании данных спектроскопии ЯМР (Catasti et al., 1996), установлены элементы вторич-

ной структуры и конформации нерегулярных сегментов, выполнен сравнительный анализ конформаций петли V3 в двух растворителях и идентифицированы конформационно жесткие аминокислоты фрагмента — перспективные «мишени» для создания противовирусных препаратов методами белковой инженерии.

В пользу представленной схемы исследования, предусматривающей определение конформационно жестких аминокислот ОАД HIV-Haiti и последующий анализ ее структурно-функциональных связей, свидетельствуют выводы ряда экспериментальных работ (Ivanoff et al., 1991; Shioda et al., 1992; Ghiara et al., 1997; Cabezas et al., 2000; Yang et al., 2004), согласно которым отдельные «точечные» аминокислотные замены в петле V3 могут оказывать заметное влияние на инфективность вируса, его иммуногенность и кросс-реактивность нейтрализующих антител.

Материал и методика

Для определения локальной структуры ОАД HIV-Haiti был применен метод, предложенный Шерманом с сотрудниками (Sherman et al., 1987). Этот метод использует вероятностную модель конформации белка и осуществляет прямой (без построения трехмерной структуры) расчет взвешенных средних значений двугранных углов молекулы по данным спектроскопии ЯМР, статистический анализ которых проводится с учетом эмпирической функции распределения углов внутреннего вращения. Расчеты выполняли с помощью компьютерной программы CONENMR-2 (Andrianov, 2002). При этом на основе спектральной информации о d-связях (Wuthrich et al., 1982) определяли для каждого аминокислотного остатка область его локализации в пространстве (ϕ и ψ) (рис. 1), а затем, принимая во внимание дополнительную экспериментальную информацию, вычисляли наиболее вероятные значения двугранных углов и стандартных отклонений (Sherman et al., 1987).

В табл. 1 приведен использованный в расчетах набор данных спектроскопии ЯМР (Catasti et al., 1996), включа-

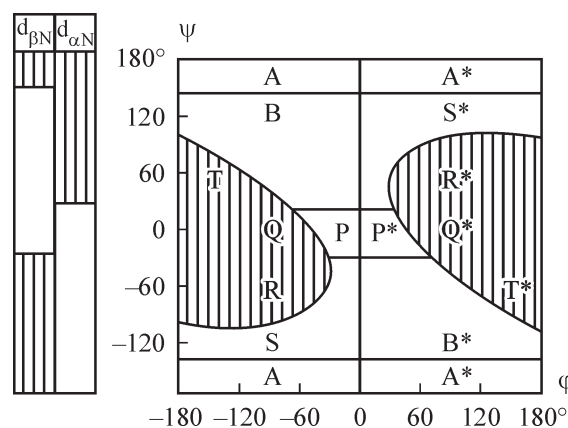


Рис. 1. Диаграмма взаимосвязи межпротонных расстояний $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ и d_{NN} с областями конформационного пространства (ϕ и ψ).

Заштрихованы интервалы углов ϕ и ψ , для которых ожидается проявление соответствующих d-связей в спектрах ядерного эффекта Оверхаузера. Пространство (ϕ и ψ) разделено на области таким образом, чтобы каждой из них мог быть поставлен в соответствие специфический набор d-связей. Так, в области B ожидается проявление только $d_{\alpha N}$ -связей, в области R — d_{NN} - и $d_{\beta N}$ -связей и т. д. См. раздел «Материал и методика».

Данные спектроскопии ЯМР (Catasti et al., 1996), использованные для расчета локальной структуры петли V3 белка gp120 HIV-Haiti в водном растворе (I) и в смеси вода/ТФЭ (II)

Остаток ^a	d-связи ^{b-г}						Остаток ^a	d-связи ^{b-г}					
	I			II				I			II		
	d _{αN}	d _{NN}	d _{βN}	d _{αN}	d _{NN}	d _{βN}		D _{αN}	d _{NN}	d _{βN}	d _{αN}	D _{NN}	d _{βN}
C-1	0	0	0	0	0	0	A-19	+	0	0	+	+	+
T-2	+	0	0	0	0	0	F-20	+	+	0	+	+	0
R-3	—	—	—	—	—	—	Y-21	+	+	0	+	+	0
P-4	+	—	0	+	—	0	A-22	+	?	0	+	+	+
N-5	0	0	0	0	0	0	T-23	+	+	0	+	0	0
D-6	0	+	0	0	+	+	G-24	+	+	—	+	?	—
N-7	+	+	0	0	+	0	D-25	+	+	0	0	?	0
T-8	+	+	0	+	?	0	I-26	+	+	+	+	?	0
R-9	+	+	0	+	?	0	I-27	+	+	0	+	+	0
K-10	+	?	0	+	?	+	G-28	+	+	—	+	?	—
S-11	+	+	0	+	0	+	N-29	+	+	0	+	+	0
I-12	—	—	—	—	—	—	I-30	+	+	0	+	0	0
P-13	+	—	0	+	—	+	R-31	+	+	0	+	+	0
M-14	+	0	0	+	?	+	Q-32	+	?	0	0	+	0
G-15	—	—	—	—	—	—	A-33	+	?	0	+	+	+
P-16	+	—	0	0	—	0	H-34	0	0	0	0	0	0
G-17	+	+	—	+	0	—	C-35	—	—	—	—	—	—
K-18	+	0	0	+	+	0							

^a Аминокислотная последовательность представлена в однобуквенном коде. Здесь и далее используется нумерация остатков «изолированной» петли V3 белка gp120 HIV-Haiti. ^b d-связи между соседними по цепи остатками i и $i + 1$. С помощью знаков «+» и «0» представлены данные о наличии ($d \leq 3.3 \text{ \AA}$) и отсутствии ($d > 3.3 \text{ \AA}$) кросс-пиков в спектрах ядерного эффекта Оверхаузера. ^в «—» — d-связи нет из-за отсутствия протонов, необходимых для ее образования (например, протона NH в остатке пролина). ^г «?» — кросс-пик не идентифицирован вследствие низкого разрешения сигналов протонов в спектрах ядерного эффекта Оверхаузера.

ющий в себя сведения о расстояниях $d_{\alpha N}$, d_{NN} и $d_{\beta N}$ (Wuthrich et al., 1982) между соседними по цепи аминокислотными остатками. Поскольку выбранный для исследования метод анализирует информацию о межпротонных контактах по наличию d-связи ($d \leq 3.3 \text{ \AA}$) или ее отсутствию ($d > 3.3 \text{ \AA}$) (Sherman et al., 1987), при формировании набора экспериментальных данных расстояния $d_{\alpha N}$, d_{NN} и $d_{\beta N}$ были разделены в соответствии с этими критериями на две группы, представленные в табл. 1 знаками «+» и «0» соответственно.

На заключительном этапе расчетов полученные данные об углах внутреннего вращения индивидуальных аминокислотных остатков использовали для идентификации элементов регуляторной вторичной структуры, β -изгибов и неупорядоченных сегментов полипептидной цепи.

Для отнесения аминокислотных остатков к различным типам регуляторных вторичных структур рассматривали интервалы величин углов ϕ и ψ , приведенные Смитом с сотрудниками (Smith et al., 1996).

При идентификации β -изгибов применяли классификацию Льюиса с сотрудниками (Lewis et al., 1973).

Сопоставление локальных структур ОАД HIV-Haiti в водном растворе и в смеси вода/трифторэтанол (ТФЭ)

проводили с привлечением среднеквадратичных отклонений двугранных углов ($\langle A \rangle$) (Шерман и др., 1989). Для расчета величины A использовали соотношение:

$$A = \left(1 / M \sum_{m=1}^M (\theta_m - \theta'_m)^2 \right)^{1/2},$$

где M — общее число двугранных углов, θ_m и θ'_m — их величины в рассматриваемых структурах.

Поскольку точность σ определения углов ϕ и ψ , достигаемая с помощью вероятностного подхода (Sherman et al., 1987), составляет 25° (Sherman, Johnson, 1993), отклонения, превышающие 75° (3σ), рассматривали как статистически значимые для выявления достоверных различий между конформациями аминокислотных остатков в сравниваемых структурах (Kar et al., 1994).

Наряду с величиной A для сопоставления структур привлекали дополнительный критерий — распределение χ^2 (Худсон, 1967), с помощью которого осуществляли проверку «нулевой» гипотезы о подобии вариационных рядов (ϕ и ψ) при уровне достоверности, равном 0.99.

Результаты и обсуждение

Анализ двугранных углов петли V3 HIV-Haiti в водном растворе (табл. 2) позволяет выделить три «вытянутых» β-участка (остатки 2—4, 12—14 и 32—34), два фрагмента искаженной α-спирали (7—9 и 26—31) и три β-изгиба, один из которых локализован на сегменте 4—7, а два — в центральной области 15—20, формирующей ИДЭ вируса (рис. 2). Как было показано ранее (Andrianov, 2004a), в этой области петли V3 наиболее вероятно реализация нескольких конформеров со свернутой формой полипептидной цепи. Согласно результатам этого исследования, данный участок ОАД HIV-Haiti является метастабильным олигопептидом, образующим ансамбль структур, в состав которого наряду с доминирующей конформацией (двойной β-изгиб IV—IV; рис. 2) входят и минорные конформеры (подробнее см.: Andrianov, 2004a). Величины углов внутреннего вращения аминокислотных остатков, расположенных на сегментах 10—12 и 21—25 петли V3 HIV-Haiti, свидетельствуют о том, что в водном растворе они принимают неупорядоченную конформацию (рис. 2).

Изучение локальной структуры петли V3 HIV-Haiti в смеси вода/ТФЭ показывает (табл. 2), что изменение окружения фрагмента приводит к его существенной структурной реорганизации. Как видно на рис. 2, область 7—14 петли, образующая в водном растворе комбинацию из спирального, неупорядоченного и вытянутого сегментов, преобразуется в протяженный β-участок. Добавление ТФЭ инициирует образование α-спирали на участке 31—34, что подтверждает отмеченную ранее (Andrianov, 1999) тенденцию к формированию на С-конце петли V3 «свернутых» структур и согласуется с результатами исследований пептидов ОАД HIV-1 методами спектроскопии ЯМР и кругового дихроизма (Chandrasekhar et al., 1991). Изменение физико-химических свойств среды затрагивает и центральную область петли V3 HIV-Haiti (гексапептид Gly-Pro-Gly-Lys-Ala-Phe), определяющую специфику связывания вируса с антителами (Javaherian et al., 1990). Как было отмечено выше, результаты исследования конформационных свойств фрагмента Gly-Pro-Gly-Lys-Ala-Phe с помощью методов молекулярной механики и квантовой химии показали (Andrianov, 2004a), что в водном растворе он образует набор конформеров, в котором преобладает конформация двойного β-изгиба (рис. 2, 3). Последующее изучение конформационных свойств фрагмента в смеси вода/ТФЭ позволило заключить (Andrianov, 2004b), что в этом случае на данном участке вероятно реализация только одного

кластера структур с более компактными (по сравнению с водным раствором) формами пептидного остова (рис. 3, б; 4, б), а в лучшей по значению энергии конформации его основная цепь описывается последовательностью из трех нестандартных β-изгибов (рис. 2, 4). В связи с этим отметим, что конформации двойного и тройного β-изгибов были идентифицированы ранее на гомологичном участке белка gp120 HIV-MN соответственно в водном растворе и в смеси вода/ТФЭ (Andrianov, Sokolov, 2004). Подобный «архитектурный ансамбль» был найден в петле V3 белка gp120 HIV-1 в работе Вранкена с сотрудниками (Vranken et al., 2001), в которой выполнены исследования ее конформационных свойств в 20%-ном растворе ТФЭ/вода.

Сопоставление вторичных структур ОАД белка gp120 HIV-Haiti в водном растворе и в смеси вода/ТФЭ позволяет выявить наличие только одного консервативного сегмента, расположенного на N-конце петли V3: на рис. 2 видно, что в обоих случаях N-концевой тетрапептид, включающий в себя один из потенциальных участков N-гликозилирования белка gp120 (Ogert et al., 2001), образует конформацию β-изгиба III. В связи с этим отметим, что именно этот элемент вторичной структуры был идентифицирован ранее на рассматриваемом сегменте петли V3 в вирусных штаммах HIV-MN (Andrianov, 1999) и HIV-Thailand (Andrianov, 2002). По-видимому, структура β-изгиба наблюдаемая на данном участке, выполняет роль «сигнальной конформации», необходимой для его узнавания гликозилтрансферазой (Smith, Pease, 1980). Наличие элемента структуры, общего для разных штаммов вируса, представляет значительный интерес, так как процесс N-гликозилирования белка gp120 является одним из основных механизмов, используемых вирусом для защиты от нейтрализующих антител (McCaffrey et al., 2004; Teeraputon et al., 2005) и усиления его инфективности (Malenbaum et al., 2000; Li et al., 2001; Pollakis et al., 2001; Polzer et al., 2001).

Таким образом, согласно проведенным расчетам, за исключением участка N-гликозилирования, петля V3 HIV-Haiti формирует в водном растворе и в смеси вода/ТФЭ разные вторичные структуры (рис. 2). Очевидно, это является следствием конформационных переходов, которым подвергаются аминокислотные остатки фрагмента в результате изменения окружающей его среды. Действительно, сравнительный анализ локальных структур ОАД HIV-Haiti (рис. 5) указывает на наличие существенных расхождений между конформациями отдельных остатков: 15 аминокислот испытывают значительные структурные преобразования, а разброс в углах

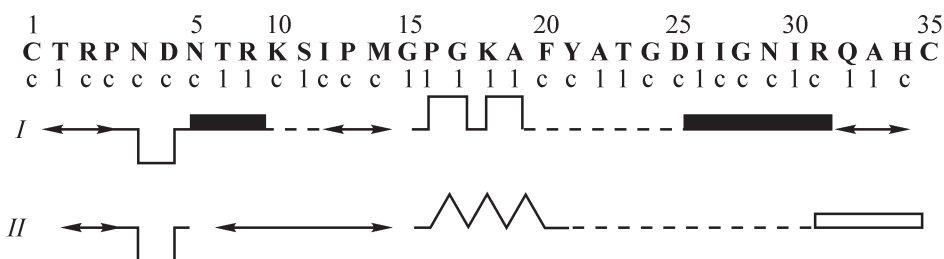


Рис. 2. Элементы вторичной структуры петли V3 белка gp120 HIV-Haiti в водном растворе (I) и в смеси вода/ТФЭ (II).

Двойная стрелка — «вытянутая» конформация, черные прямоугольники — «свернутая» конформация, штриховая линия — нерегулярная конформация, двойная «башня» — двойной β-изгиб IV—IV, «трезубец» — тройной β-изгиб IV—IV—IV, «колодец» — β-изгиб III, белый прямоугольник — правая α-спираль, с — остатки, сохраняющие конформации; 1 — аминокислоты, различия между конформациями которых статистически значимы.

Таблица 2

**Локальная структура петли V3 белка gp120 HIV-Haiti в водном растворе (I)
и в смеси вода/ТФЭ (II)**

Остаток	Область ^a		Двугранные углы ^b (град)			
			I		II	
	I	II	$\phi \pm \Delta$	$\psi \pm \Delta$	$\phi \pm \Delta$	$\psi \pm \Delta$
C-1	P	P	-60 ± 18	-5 ± 26	-60 ± 18	-5 ± 26
T-2	B	P	-100 ± 32	135 ± 28	-60 ± 18	-5 ± 26
R-3	B	B	-100 ± 32	135 ± 28	-100 ± 32	135 ± 28
P-4	B	B	-50 ± 15	130 ± 12	-50 ± 15	130 ± 12
N-5	P	P	-60 ± 18	-5 ± 26	-60 ± 18	-5 ± 26
D-6	Q	R	-85 ± 26	-5 ± 20	-65 ± 29	-35 ± 18
N-7	T	Q	-90 ± 25	20 ± 22	-85 ± 26	-5 ± 20
T-8	T	B	-90 ± 25	20 ± 22	-100 ± 32	135 ± 28
R-9	T	B	-90 ± 25	20 ± 22	-100 ± 32	135 ± 28
K-10	B	A	-100 ± 32	135 ± 28	-105 ± 33	160 ± 19
S-11	T	A	-90 ± 25	20 ± 22	-105 ± 33	160 ± 19
I-12	B	B	-100 ± 32	135 ± 28	-100 ± 32	135 ± 28
P-13	B	A	-50 ± 15	130 ± 12	-50 ± 16	160 ± 18
M-14	B	B	-100 ± 32	135 ± 28	-100 ± 32	135 ± 28
G-15	R	R	-100 ± 32	-45 ± 23	-100 ± 32	-45 ± 23
P-16	B	P	-50 ± 15	130 ± 12	-50 ± 15	-20 ± 22
G-17	R	Q*	-100 ± 32	-45 ± 23	100 ± 29	0 ± 31
K-18	B	T	-100 ± 32	135 ± 28	-90 ± 25	20 ± 22
A-19	B	K	-100 ± 32	135 ± 28	-75 ± 26	-10 ± 10
F-20	T	T	-90 ± 25	20 ± 22	-90 ± 25	20 ± 22
Y-21	T	T	-90 ± 25	20 ± 22	-90 ± 25	20 ± 22
A-22	B	K	-100 ± 32	135 ± 28	-75 ± 26	-10 ± 10
T-23	T	B	-90 ± 25	20 ± 22	-100 ± 32	135 ± 28
G-24	R*	R*	100 ± 32	45 ± 23	100 ± 32	45 ± 23
1	2	3	4	5	6	7
D-25	T	Q	-90 ± 25	20 ± 22	-85 ± 26	-5 ± 20
I-26	K	B	-75 ± 26	-10 ± 10	-100 ± 32	135 ± 28
I-27	T	T	-90 ± 25	20 ± 22	-90 ± 25	20 ± 22
G-28	R*	R*	-100 ± 32	45 ± 23	100 ± 32	45 ± 23
N-29	T	T	-90 ± 25	20 ± 22	-90 ± 25	20 ± 22
I-30	T	B	-90 ± 25	20 ± 22	-100 ± 32	135 ± 28
R-31	T	T	-90 ± 25	20 ± 22	-90 ± 25	20 ± 22
Q-32	B	Q	-100 ± 32	135 ± 28	-85 ± 26	-5 ± 20
A-33	B	K	-100 ± 32	135 ± 28	-75 ± 10	-10 ± 10
H-34	P	P	-60 ± 18	-5 ± 26	-60 ± 18	-5 ± 26
C-35	—	—	—	—	—	—

^a Области пространства (ϕ и ψ), установленные по данным о d-связях, наблюдаемых в спектрах ядерного эффекта Оверхаузера (табл. 1). Для аминокислот с частичным отнесением сигналов протонов (табл. 1), а также для остатков Gly-24 и Gly-28 из всех возможных структурных вариантов указаны области с наибольшей априорной вероятностью (Sherman et al., 1987). Для остатков Gly-15 и Gly-17 приведены конформации, найденные в результате энергетической оптимизации геометрических параметров фрагмента Gly-Pro-Gly-Lys-Ala-Phe (Andrianov, 2004a, 2004b).

^b Взвешенные средние значения двугранных углов ϕ и ψ и стандартные отклонения Δ для соответствующих областей пространства (ϕ и ψ).

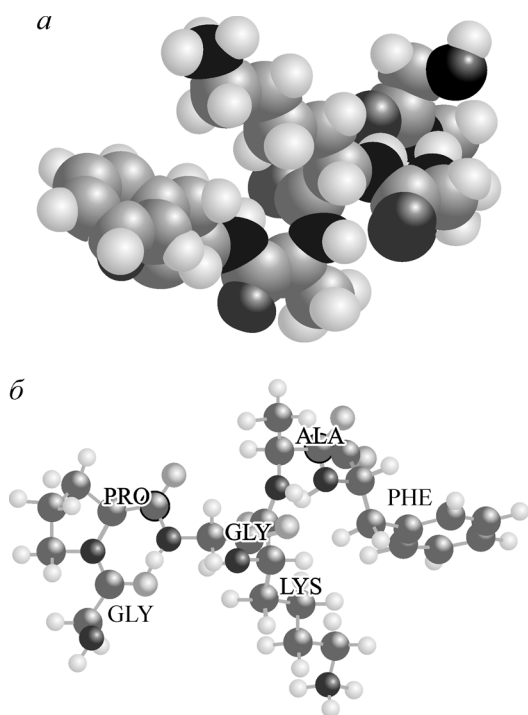


Рис. 3. Изображение поверхности (а) и пространственная укладка полипептидной цепи (б) главного иммуногенного участка белка gp120 HIV-Haiti в водном растворе.

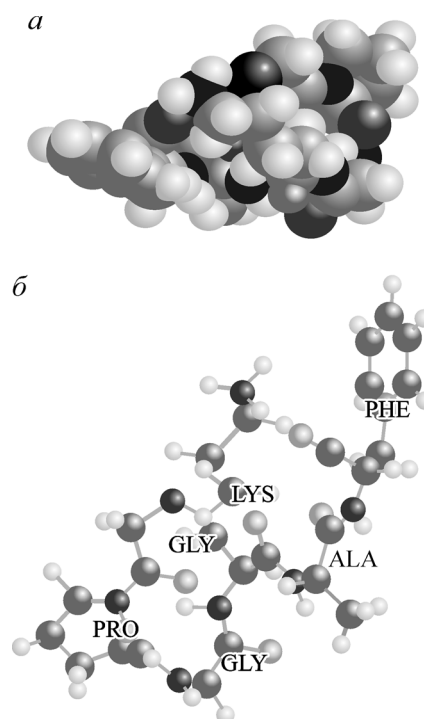


Рис. 4. Изображение поверхности (а) и пространственная укладка полипептидной цепи (б) главного иммуногенного участка белка gp120 HIV-Haiti в смеси вода/ТФЭ.

внутреннего вращения свидетельствует о том, что различия между ними статистически значимы. Этот вывод подтверждает количественное сравнение структур с использованием критериев математической статистики. Так, расчет величин среднеквадратичных отклонений двугранных углов (A), выполненный для всех остатков фрагмента и его разных сегментов, показывает, что существенные конформационные изменения затрагивают как концевые области петли V3, так и ее центральный участок 15—20. Величина A , вычисленная для всех

остатков фрагмента, составляет 62.8° и близка к значению, характерному для конформационных состояний полипептидной цепи, отобранных случайным образом (Sherman, Johnson, 1993). Данный факт свидетельствует о наличии систематических сдвигов между углами ϕ и ψ сравниваемых конформаций, что подтверждает анализ вариационных рядов (ϕ и ψ) в двух структурах, выполненный с помощью критерия χ^2 .

Сравнивая конформации петли V3 в водном растворе и в смеси вода/ТФЭ, следует обратить внимание на

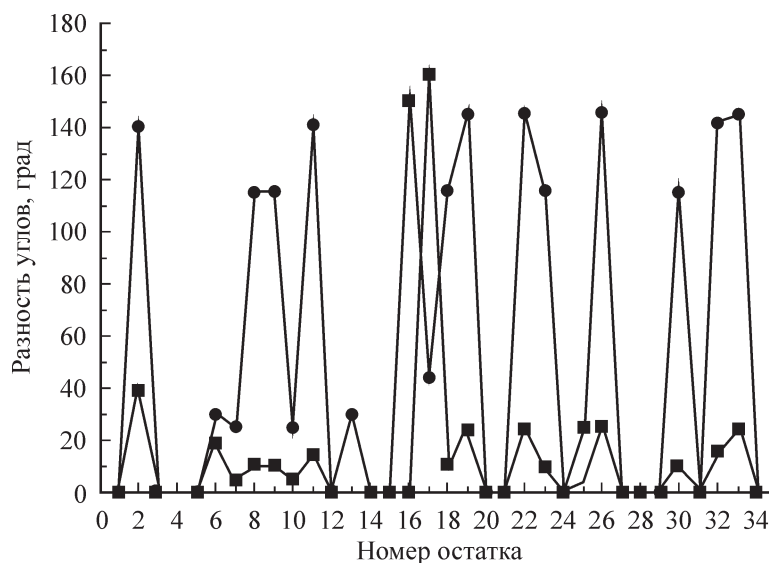


Рис. 5. Разности двугранных углов аминокислотных остатков петли V3 HIV-Haiti в водном растворе и в смеси вода/ТФЭ. Черные квадраты — разность углов ϕ , черные кружки — разность углов ψ .

тот факт, что, несмотря на выявленные структурные различия, более 50 % остатков сохраняют конформационные параметры (рис. 2, 5). В связи с этим возникает следующий вопрос: какова степень подвижности аминокислот, входящих в функционально активные сайты ОАД HIV-Haiti? Как видно на рис. 2, 5, в центральном сегменте Gly-Pro-Gly-Lys-Ala-Phe петли V3, на долю которого приходится подавляющее число контактов с нейтрализующими антителами (Ghiara et al., 1994), только один остаток Phe сохраняет величины углов внутреннего вращения. Для остальных пяти аминокислот наблюдаются статистически значимые расхождения, ведущие к структурной реорганизации гексапептида. Как было отмечено выше, в смеси вода/ТФЭ (7 : 3) этот гексапептид образует более компактную по сравнению с водным раствором форму основной цепи (рис. 3, 4). Среди аминокислот, изменяющих конформации, необходимо выделить консервативный остаток Pro-16. Величины двугранных углов этого остатка, близкие к аналогичным величинам, приведенным в табл. 2 для водного раствора, были получены нами при исследовании трехмерных структур главного иммуногенного участка белка gp120 в вирусных штаммах HIV-Thailand (Andrianov, Sokolov, 2003), HIV-MN (Andrianov, Sokolov, 2004), HIV-RF и HIV-Haiti (Andrianov, 2004a). Было показано (Andrianov, 2004a), что в водном растворе остаток Pro-16, располагаясь в области В пространства (ϕ и ψ), проявляет определенную гибкость пептидной цепи, реализующуюся в структурных переходах между двумя соседними минимумами, один из которых соответствует «вытянутой» конформации (HIV-MN и HIV-Haiti), а другой — конформации М (HIV-Thailand и HIV-RF). Возможность таких структурных преобразований была отмечена автором ранее (Andrianov, 1999) при изучении конформационных свойств пептида gp70 — синтетической молекулы, имитирующей аминокислотную последовательность петли V3 HIV-MN. Склонность остатка Pro к локализации в области В конформационного пространства подтверждают результаты рентгеноструктурного анализа пептидов петли V3, связанных с Fab-фрагментами моноклональных антител (Ghiara et al., 1994, 1997; Stanfield et al., 2003). В указанных структурных моделях величины двугранных углов остатка Pro соответствуют области В пространства (ϕ и ψ). Однако результаты настоящего исследования показывают, что при определенных условиях окружения инвариантный остаток Pro может подвергаться значительным структурным преобразованиям: согласно проведенным расчетам, в смеси вода/ТФЭ анализируемый остаток белка gp120 HIV-Haiti расположен в области Р карты Рамачандрана (табл. 2), что согласуется с опытными данными о структуре пептидов петли V3 в комплексе с моноклональными антителами (Stanfield et al., 1999). Конформационные приоритеты остатка Pro-16 и высокая частота его появления в соответствующей позиции петли V3 HIV-1 (LaRosa et al., 1990) дают основание предполагать что он является неординарным участником событий, происходящих в течение жизненного цикла вируса. Безусловно, важная роль в этих событиях принадлежит и инвариантным остаткам Gly-15 и Gly-17, повышенная конформационная лабильность которых позволяет фрагменту, образуемому ИДЭ вируса, адекватно реагировать на изменения окружающей среды.

Проведенные исследования показывают, что добавление в водный раствор ТФЭ инициирует конформационные изменения ИДЭ HIV-Haiti, и это свидетельствует

о высокой чувствительности его локальной структуры к условиям окружающей среды. Этот вывод согласуется с данными работы автора (Andrianov, 2004a), в которой высокая лабильность входящих в состав фрагмента аминокислотных остатков была постулирована в результате сравнительного анализа его конформаций в разных штаммах вируса в водном растворе. Вероятно, конформационная «мимикрия» фрагмента, образующего главный иммуногенный участок HIV-1, объясняет факт специфичности связывания белка gp120 с антителами: известно, что антитела, нейтрализующие вирионы одного штамма HIV-1, могут быть неактивными по отношению к другим вирусным частицам (Skinner et al., 1988).

Среди аминокислот, способствующих проникновению вируса в клетку (Shioda et al., 1992; Milich et al., 1993; Chavda et al., 1994; Mammano et al., 1995; Wu et al., 1996; Wang et al., 1998), локальную структуру сохраняют Arg-3, Pro-13, Gly-24 и Asp-25, в то время как Ser-11, Ala-19, Thr-23 и Gln-32 проявляют повышенную конформационную лабильность полипептидной цепи (рис. 5). В списке структурно консервативных аминокислот выделим остаток Asp-25, определяющий взаимодействие вируса с первичным рецептором CD4 клеточной мембраны (Shioda et al., 1992; Milich et al., 1993; Chavda et al., 1994; Mammano et al., 1995; Wu et al., 1996), а также остаток Arg-3, играющий ключевую роль при его связывании как с корцептором CCR-5 (Wang et al., 1998; Bobard et al., 2005), так и с синдеканами — протеогликами гепарансульфата (Bobard et al., 2005). Наряду с Arg-3 и Asp-25 среди конформационно жестких аминокислот присутствует остаток Pro-4, встречающийся практически во всех расшифрованных первичных структурах вирионов, которые используют для проникновения в клетку корцептор CCR-5 (Wang et al., 1998). Изменения окружения фрагмента не оказывают влияния и на конформацию остатка Asn-29. Этот факт представляет интерес в связи с полученными недавно данными (Pohlmann et al., 2004), свидетельствующими о том, что аминокислота в данной позиции петли V3 обезьяньего вируса иммунодефицита макаки входит в состав детерминанты клеточного тропизма. Исследование С-концевой области петли V3 HIV-1 (Hu et al., 2005) подтвердило это заключение: остаток Asn-29 стабилизирует ее конформацию и влияет на интенсивность связывания CD4-активированного белка gp120 с корцептором CCR5. Среди структурно консервативных аминокислот отметим также остатки в позициях 10, 12 и 14 петли V3 HIV-1 (рис. 2, 5), которые вносят важный вклад во взаимодействие вируса с моноклональными антителами 447-52D (Sharon et al., 2003; Stanfield et al., 2004; Rosen et al., 2005), проявляющими широкий спектр нейтрализующей активности (Zolla-Pazner et al., 2004). Величины двугранных углов Lys-10, Ile-12 и Met-14, близкие к аналогичным величинам, приведенным в табл. 2, были получены автором при изучении конформационных свойств петли V3 HIV-MN (Andrianov, 2005). Вероятно, структурная жесткость этих остатков представляет собой одну из причин, объясняющих способность антитела 447-52D к нейтрализации различающихся вирусных частиц (Zolla-Pazner et al., 2004). Исследование влияния аминокислотных замен на процесс слияния клеток позволило идентифицировать в петле V3 субтипа В HIV-1 шесть остатков (позиции 3, 6, 26, 29, 31 и 33), критических для образования синцития (Suphaphiphat, 2004). Как видно на рис. 2, четыре из них сохраняют конформации в водном растворе и в смеси вода/ТФЭ.

Из анализа данных, приведенных на рис. 2, следует, что структурно консервативные аминокислоты распределены вдоль полипептидной цепи ОАД HIV-Haiti неравномерно: большая часть остатков, сохраняющих конформации, сосредоточена на ее N- и C-концевых участках, образующих «ствол» петли V3 (Cormier, Dragic, 2002). В то же время центральная область петли, формирующая иммуногенную «корону» вируса (Cormier, Dragic, 2002), проявляет ярко выраженную конформационную подвижность (рис. 2). Очевидно, консервация конформационных состояний аминокислот в «стволовой» части петли V3 HIV-1 создает условия, необходимые для внедрения вируса в клетку, тогда как лабильность иммуногенной «короны» способствует его противодействию нейтрализующим антителам.

Аминокислотные остатки петли V3, сохраняющие конформации в разных условиях окружения, представляют собой перспективные «мишени» для проведения исследований по синтезу ее химически модифицированных форм с повышенной иммуногенностью и кросс-реактивностью нейтрализующих антител. При этом в центре внимания исследователей, занимающихся созданием лекарственных средств, должны находиться как структурно консервативные остатки, входящие в биологически активные участки петли V3, так и те из них, функциональная роль которых к настоящему времени не установлена. В пользу этого утверждения свидетельствуют результаты последних работ, указывающие на причастность петли V3 к формированию нейтрализующего эпитопа, отличного от ИДЭ вируса (Lusso et al., 2005), а также к образованию центра связывания HIV-1 с агглютинином слюны человека — ингибитором вирусной инфекции (Wu et al., 2004).

Предложенная модель дает структурное обоснование приведенных в литературе экспериментальных данных о биологической активности ее индивидуальных аминокислотных остатков и обеспечивает продуктивный базис для более глубокого понимания механизмов функционирования вируса. Поэтому она может быть использована в дальнейших исследованиях для изучения взаимосвязи между структурой и функцией фрагмента, его динамикой и окружающей средой, что является необходимой основой для информационного обеспечения работ по конструированию эффективных противовирусных препаратов.

В заключение отметим, что результаты настоящего исследования подтверждают сделанные ранее выводы (Kar et al., 1994), согласно которым знание точной локальной структуры основной цепи белковой молекулы содержит важную информацию о структурно-функциональных связях белков даже в тех случаях, когда их полная пространственная структура в растворе неизвестна.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект X06-020).

Список литературы

Андрианов А. М. 2002. Структура и конформационные свойства иммунодоминантного эпитопа белка gp120 HIV-Thailand. Молекуляр. биол. 36 (4) : 715—724.
 Андрианов А. М., Соколов Ю. А. 2003. Модель трехмерной структуры иммунодоминантного эпитопа белка gp120 HIV-Thailand. Биофизика. 48 (4) : 628—634.

Худсон Д. 1967. Статистика для физиков. Лекции по теории вероятностей и элементарной статистике. Москва: Мир. 242 с.

Шерман С. А., Андрианов А. М., Ахрем А. А. 1989. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. Минск: Наука и техника. 240 с.

Андрианов А. М. 1999. Global and local structural properties of the principal neutralizing determinant of the HIV-1 envelope protein gp120. J. Biomol. Struct. Dynam. 16 : 931—953.

Андрианов А. М. 2002. Local structural properties of the V3 loop of Thailand HIV-1 isolate. J. Biomol. Struct. Dynam. 19 : 973—990.

Андрианов А. М. 2004a. Dual spatial folds and different local structures of the HIV-1 immunogenic crown in various virus isolates. J. Biomol. Struct. Dynam. 22 : 159—170.

Андрианов А. М. 2004b. Structure and polymorphism of the HIV-1 principal neutralizing epitope. In: Proc. of the IV Internat. conf. on bioinformatics of genome regulation and structure. Novosibirsk, Russia. 1 : 235—238.

Андрианов А. М. 2005. Conformational preferences of the HIV-1 principal neutralizing determinant. J. Biomol. Struct. Dynam. 23 : 267—282.

Андрианов А. М., Соколов Ю. А. 2003. Structure and polymorphism of the principal neutralization site of Thailand HIV-1 isolate. J. Biomol. Struct. Dynam. 20 : 603—614.

Андрианов А. М., Соколов Ю. А. 2004. 3D structure model of the principal neutralizing epitope of Minnesota HIV-1 isolate. J. Biomol. Struct. Dynam. 21 : 577—590.

Bobard M., Parseval A., Elder J., Gallay P. 2005. HIV-1 exploits host sulfations to facilitate its entry into human cells. In: Abstr. of the 12th conf. on retroviruses and opportunistic infections. Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts (<http://www.retroconference.org/2005/CD/Abstracts/24697.htm>).

Cabezas E., Wang M., Parren P. W., Stanfield R., Satterthwaite A. C. 2000. A structure-based approach to a synthetic vaccine for HIV-1. Biochemistry. 39 : 14 377—14 391.

Catasti P., Bradbury E. M., Gupta G. 1996. Structure and polymorphism of the HIV-1 variable loops. J. Biol. Chem. 271 : 8236—8242.

Catasti P., Fontenot J. D., Bradbury E. M., Gupta G. 1995. Local and global properties of the HIV_{MN} V3 loop. J. Biol. Chem. 270 : 2224—2232.

Chandrasekhar K., Profy A. T., Dyson H. J. 1991. Solution conformational preferences of immunogenic peptides derived from the principal neutralizing determinant of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120, Biochemistry. 30 : 9187—9194.

Chavda S. C., Griffin P., Han-Liu Z., Keys B., Vekony M. A., Cann A. J. 1994. Molecular determinants of the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120 responsible for controlling cell tropism. J. Gen. Virol. 75 : 3249—3253.

Cormier E. G., Dragic T. 2002. The crown and the stem V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with CCR5 coreceptor. J. Virol. 76 : 8953—8957.

Dettin M., Ferranti P., Scarinci C., Picariello G., Di Bello C. 2003. Is the V3 loop involved in HIV binding to CD4? Biochemistry. 42 : 9007—9012.

Ding J., Smith A. D., Geisler S. C., Ma X., Arnold G. F., Arnold E. 2002. Crystal structure of a human rhinovirus that displays part of the HIV-1 V3 loop and induces neutralizing antibodies against HIV-1. Structure. 10 : 999—1011.

Ghiara J. B., Ferguson D. C., Satterthwaite A. C., Dyson H. J., Wilson I. A. 1997. Structure-based design of a constrained peptide mimic of the HIV-1 V3 loop neutralization site. J. Mol. Biol. 266 : 31—42.

Ghiara J. B., Stura E. A., Stanfield R. L., Profy A. T., Wilson I. A. 1994. Crystal structure of the principal neutralization site of HIV-1. Science. 264 : 82—85.

Gorny M. K., Xu J.-Y., Karwowska S., Buchbinder A., Zolla-Pazner S. 1993. Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120. J. Immunol. 150 : 635—643.

- Gupta G., Anantharamaiah G. M., Scott D. R., Eldridge J. H., Myers G. 1993. Solution structure of the V3 loop of a Thailand HIV isolate. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 11 : 345—366.
- Hartley O., Klasse P. J., Sattentau Q. J., Moore J. P. 2005. V3 : HIV's Switch-Hitter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 21 : 171—189.
- Hu Q., Napier K. B., Trent J. O., Wang Z., Taylor S., Grif-fin G. E., Peiper S. C., Shattock R. J. 2005. Restricted variable residues in the C-terminal segment of HIV-1 V3 loop regulate the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J. Mol. Biol.* 350 : 699—712.
- Ivanoff L. A., Looney D. J., McDanal C., Morris J. F., Wong-Staat F., Lang A. J., Petteway S. R., Jr., Matthews T. J. 1991. Alteration of HIV-1 infectivity and neutralization by a single amino acid replacement in the V3 loop domain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 7 : 595—603.
- Javaherian K., Langlois A. J., LaRosa G. J., Profy A. T., Bolognesi D. P., Herlihy W. C., Putney S. D., Matthews T. J. 1990. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science.* 250 : 1590—1593.
- Javaherian K., Langlois A. J., McDanal C., Ross K. L., Eckler L. L., Jellis C. L., Profy A. T., Rusche J. R., Bolognesi D., Putney S. D., Matthews T. J. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 6768—6772.
- Jelinek R., Terry T. D., Gesell J. J., Malik P., Perham R. N., Opella S. 1997. NMR structure of the principal neutralizing determinant of HIV-1 displayed in filamentous bacteriophage coat protein. *J. Mol. Biol.* 266 : 649—655.
- Kar L., Sherman S. A., Johnson M. E. 1994. Comparison of protein structures in solution using local conformations derived from NMR data: application to cytochrome c. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 12 : 527—558.
- Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R. W., Sodroski J., Hendrickson W. A. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 393 : 648—659.
- 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., Putney S. D. 1990. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science.* 249 : 932—935.
- Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A. 1973. Chain reversals in proteins. *Biochim. biophys. acta.* 303 : 211—229.
- Li Y., Rey-Cuille M. A., Hu S. L. 2001. N-linked glycosylation in the V3 region of HIV type 1 surface antigen modulates coreceptor usage in viral infections. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 17 : 1473—1479.
- Lusso P., Earl P. L., Sironi F., Santoro F., Ripamonti C., Scarlatti G., Longhi R., Berger E. A., Burastero S. E. 2005. Cryptic nature of a conserved, CD4-inducible V3 loop neutralization epitope in the native envelope glycoprotein oligomer of CCR5-restricted, but not CXCR4-using, primary human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* 79 : 6957—6968.
- Malenbaum S. E., Yang D., Cavacini L., Posner M., Robinson J., Cheng-Mayer C. 2000. 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.* 74 : 11 008—11 014.
- Mammano F., Salvatori F., Ometto L., Panozzo M., Chieco-Bianchi L., DeRossi A. 1995. Relationship between the V3 loop and the phenotypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates from children perinatally infected with HIV-1. *J. Virol.* 69 : 82—92.
- McCaffrey R. A., Saunders C., Hensel M., Stamatos L. 2004. 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.* 78 : 3279—3295.
- Milich L., Margolin B. H., Swanstrom R. 1993. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J. Virol.* 67 : 5623—5634.
- Ogert R. A., Lee M. K., Ross W., Buckler-White A., Martin M. A., Cho M. W. 2001. 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.* 75 : 5998—6006.
- Pohlmann S., David C., Meister S., Leslie G. J., Otto C., Reeves J. D., Puffer B. A., Papkalla A., Krumbiegel M., Marzi A., Lorenz S., Munch J., Doms R. W., Kirchhoff F. 2004. Amino acid 324 in the simian immunodeficiency virus SIVmac V3 loop can confer CD4 independence and modulate the interaction with CCR5 and alternative coreceptors. *J. Virol.* 78 : 3223—3232.
- Pollakis G., Kang S., Kliphuis A., Chalaby M. I. M., Goudsmit J., Paxton W. A. 2001. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR5 coreceptor utilization. *J. Biol. Chem.* 276 : 13 433—13 441.
- Polzer S., Dittmar M. T., Schmitz H., Meyer B., Muller H., Krausslich G., Schreiber M. 2001. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology.* 11 : 11—19.
- Rini J. M., Stanfield R. L., Stura E. A., Salinas P. A., Profy A. T., Wilson I. A. 1993. Crystal structure of a human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody, 50.1, in complex with its V3 loop. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90 : 6325—6329.
- Rosen O., Chill J., Sharon M., Kessler N., Mester B., Zolla-Pazner S., Anglister J. 2005. Induced fit in HIV-neutralizing antibody complexes: evidence for alternative conformations of the gp120 V3 loop and the molecular basis for broad neutralization. *Biochemistry.* 44 : 7250—7258.
- Sarma A. V., Raju T. V., Kunwar A. C. 1997. NMR study of the peptide present in the principal neutralizing determinant (PND) of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 34 : 83—98.
- Sharon M., Kessler N., Levy R., Zolla-Pazner S., Goralach M., Anglister J. 2003. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure.* 11 : 225—236.
- Sherman S. A., Andrianov A. M., Akhrem A. A. 1987. Method of determining protein conformations by the two-dimensional nuclear Overhauser enhancement spectroscopy data. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 4 : 869—884.
- Sherman S. A., Johnson M. E. 1993. Derivation of locally accurate spatial protein structure from NMR data. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59 : 285—339.
- Shioda T., Levy J. A., Cheng-Mayer C. 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89 : 9434—9438.
- Sirois S., Sing T., Chou K. C. 2005. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 : 413—422.
- Skinner M. A., Langlois A. J., McDanal C. B., McDougal J. A., Bolognesi D. P., Matthews T. J. 1988. Neutralizing antibodies to an immunodominant envelope sequence do not prevent gp120 binding to CD4. *J. Virol.* 62 : 4195—4200.
- Smith J. A., Pease L. J. 1980. Reverse turns in peptides and proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8 : 315—399.
- Smith L. J., Bolin K. A., Schwalbe H., McArthur M. W., Thornton J. M., Dobson C. M. 1996. Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations. *J. Mol. Biol.* 255 : 494—606.
- Stanfield R. L., Cabezas E., Satterthwait A. C., Stura E. A., Profy A. T., Wilson I. A. 1999. Dual conformations for the HIV-1 gp120 V3 loop in complexes with different neutralizing Fabs. *Structure.* 7 : 131—142.
- Stanfield R. L., Ghira J. B., Saphire E. O., Profy A. T., Wilson I. A. 2003. Recurring conformation of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop. *Virology.* 315 : 159—173.
- Stanfield R. L., Gorny M. K., Williams C., Zolla-Pazner S., Wilson I. A. 2004. Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure.* 12 : 193—204.

- Suphaphiphat P.* 2004. Characterization of HIV gp120 interaction with CCR5 coreceptor. http://www.aids.harvard.edu/conferences/events/2004/word_aids_04_present/2Suphaphiphat.pdf.
- Teeraputon S., Louisirojchanakul S., Auewarakul P.* 2005. N-linked glycosylation in C2 region of the HIV-1 envelope reduces sensitivity to neutralizing antibodies. *Viral Immunol.* 18 : 343—353.
- Tolman R. L., Bednarek M. A., Johnson B. A., Leanza W., Marburg S., Underwood D. J., Emini E. A., Conley A. J.* 1993. Cyclic V3 loop-related HIV-1 conjugate vaccines. *Int. J. Pept. Protein Res.* 41 : 455—466.
- Trkola A., Dragic T., Arthos J., Binley J. M., Olson W., Allaway G. P., Cheng-Mayer C., Robinson J., Maddon P. J., Moore J. P.* 1996. CD-4 dependent, antibody sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR 5. *Nature.* 384 : 184—187.
- Vranken W. F., Budesinsky M., Martins J. C., Fant F., Boulez K., Gras-Masse H., Borremans F. A. M.* 1996. 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.* 236 : 100—108.
- Vranken W. F., Fant Budesinsky M., Borremans F. A. M.* 2001. Conformational model for the consensus V3 loop of the envelope protein gp120 of HIV-1 in a 20 % trifluoroethanol/water solution. *Eur. J. Biochem.* 268 : 2620—2628.
- Vu H. M., de Lorimier R., Moody M. A., Haynes B. F., Spicer L. D.* 1996. 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.* 35 : 5158—5165.
- Wang W.-K., Dudek T., Zhao Y.-J., Brumblay H. G., Essex M., Lee T.-H.* 1998. CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 5740—5745.
- Wu L., Gerard N. P., Wyatt R., Choe H., Parolin C., Ruffin N., Borsetti A., Cardoso A. A., Desjardin E., Newman W., Gerard C., Sodroski J.* 1996. CD-4 induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR 5. *Nature.* 384 : 179—183.
- Wu Z., Golub E., Abrams W. R., Malamud D.* 2004. gp340 (SAG) binds to the V3 sequence of gp120 important for chemokine receptor interaction. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 20 : 600—607.
- Wuthrich K., Wider G., Wagner G., Braun W.* 1982. Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* 155 : 311—319.
- Yamashita A., Yamamoto N., Matsuda J., Koyanagi Y.* 1994. Cell type-specific heterogeneity of the HIV-1 V3 loop in infected individuals: selection of virus in macrophages and plasma. *Virology.* 204 : 170—179.
- Yang Z.-Y., Chakrabarti B. K., Xu L., Welcher B., Kong W.-P., Leung K., Panet A., Mascola J. R., Nabel G., J.* 2004. Selective modification of variable loops alters tropism and enhances immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 envelope. *J. Virol.* 78 : 4029—4036.
- Zolla-Pazner S., Zhong P., Volsky B., Williams C., Nyambi P., Gorny M.* 2004. The cross-clade neutralizing of a human monoclonal antibody is determined by the GPGR V3 motif of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 20 : 1254—1258.

Поступила 5 XII 2005

CONFORMATION OF THE HIV-1 GP120 V3 LOOP. STRUCTURE FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE HIV-HAITI VIRAL STRAIN

A. M. Andrianov

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 5/2 Academician Kuprevich Str., Minsk 220141, Belarus;
e-mail: andrianov@iboch.bas-net.by

The structural model describing the conformational preferences of the HIV-Haiti gp120 V3 loop in geometric space of dihedral angles was generated in terms of NMR spectroscopy data using the methods of computer modeling. The elements of secondary structure and conformations of irregular stretches were deciphered for the fragment making the virus principal neutralizing determinant as well as the determinants of cell tropism and syncytium formation. The structurally conserved amino acids of the HIV-1 V3 loop, that may present the forward-looking targets for AIDS drug design, were identified based on the combined analysis of the results obtained with those derived previously. In particular, it was demonstrated that the register of these amino acids comprises Asn-25 critical for virus binding with primary cell receptor CD4 as well as Arg-3 critical for utilization of CCR5 coreceptor and heparan sulfate proteoglycan syndecans. The results obtained are discussed in conjunction with the literature data on the biological activity of individual amino acid residues of the HIV-1 gp120 V3 loop.

Key words: human immunodeficiency virus type 1, protein gp120, V3 loop, conformation, computer modeling, NMR spectroscopy.