

E92A 是 HIV-1 整合酶耐药突变 N155S 的活性回复突变*

李 杉 刘 斌 李春华 谭建军 张小轶** 王存新**

(北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124)

摘要 HIV-1 整合酶是目前抗艾滋病药物研发的重要靶点之一, 整合酶的耐药突变是导致整合酶抑制剂类药物治疗失败的主要原因, 但突变产生耐药性的机理仍不清楚. 本工作通过人工构建突变型整合酶, 测试其活性和耐药性, 对整合酶的耐药机理进行初步探索. 构建整合酶的突变型包括 E92A、N155S 两种单突变及 E92A/N155S 双突变. 通过基因工程操作引入突变、构建质粒、表达纯化得到整合酶蛋白. 用基于磁珠的整合酶链转移 ELISA 测试整合酶的链转移活性, 用 S-1360 和 Raltegravir 两种抑制剂测试整合酶的耐药性. 另外, 用 Autodock 软件做了 S-1360 和整合酶核心区(包括野生型和突变型)的分子对接. 结果表明, N155S 突变使整合酶链转移活性下降约 80%, 而 E92A/N155S 双突变仅使活性下降约 42%, 这表明 N155S 突变基础上的 E92A 突变可使整合酶的活性大幅回复. E92A 和 E92A/N155S 对不同的抑制剂可产生不同的耐药性, 它们对 Raltegravir 的耐药性强于对 S-1360. 突变对整合酶活性和耐药性的影响主要是通过改变整合酶活性中心结构实现的, E92A 突变可能导致其与周围残基静电相互作用减弱, 间接影响到 D64 和 D116 残基, 产生活性回复作用.

关键词 人免疫缺陷病毒(HIV), 整合酶, 耐药性, 回复突变

学科分类号 Q71, R966

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00300

整合酶(integrase, IN)是 HIV-1 病毒复制周期中必需的酶之一, 在 HIV-1 侵入宿主细胞之后, 逆转录酶以病毒 RNA 为模板合成 cDNA, 整合酶会依次通过 3' 加工和链转移反应将 cDNA 整合到宿主细胞的染色体 DNA 上, 形成 HIV-1 前病毒^[1]. 由于人类细胞中无整合酶的类似物, 故 IN 被认为是抗艾滋病药物研发的理想靶点^[2-3]. 针对 HIV-1 整合酶这一靶点, 目前已开发出多种抑制剂作为治疗艾滋病的药物, 其中 S-1360 是第一个进入临床研究的整合酶链转移抑制剂(integrase strand transfer inhibitor, INSTI)类药物, 后由于其在人体内的关键代谢产物不稳定而产生毒性, 于 2005 年终止临床实验^[4-6]. 2007 年, Raltegravir (RAL, 商品名 Isentress, 曾用名 MK-0518)被美国 FDA 批准上市, 是第一个上市的此类药物. 2012 年, FDA 批准了复方药物 Stribild, 它含有一种整合酶抑制剂 Elvitegravir(EVG).

大多数抗 HIV-1 药物会导致 HIV-1 病毒产生

耐药突变, 进而使药物的治疗效果降低, 整合酶抑制剂也不例外^[7-8]. HIV-1 整合酶上的第 92 位和 155 位氨基酸残基是整合酶耐药突变的高发位点^[9-10], N155H、E92Q 是导致 RAL、EVG 等治疗失败的主要耐药突变, 在治疗失败的病人血液中, 具有 E92Q/N155H 双突变的 HIV-1 占相当大的比例^[8-11]. 在稍早期一些实验阶段的药物治疗中, 也曾观察到 N155S 突变^[12], 此突变也会带来很强的耐药性并产生交叉耐药, 对其进行了体外酶学实验及分子模拟方面的一些研究后^[13-15], 发现此突变还对其他一些

* 国家自然科学基金资助项目(31100523, 21173014, 31171267), 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2009CB930203), 科技部国际合作资助项目(2010DFA31710)和北京市教委面上项目(KM201310005030).

** 通讯联系人. Tel: 010-67392724

王存新. E-mail: cxwang@bjut.edu.cn

张小轶. E-mail: zhangxiaoyi@bjut.edu.cn

收稿日期: 2013-06-28, 接受日期: 2013-10-22

抑制剂有耐药性, 包括一种二酮酸类抑制剂(L-841、411)及两种吡啶草酰胺类抑制剂(L-870、810 和 L-870、812)^[13]. 量子力学研究表明, N155S 突变的整合酶核心区与一种二酮酸类抑制剂的结合能低于野生型的^[14]. 另外, 在未接受抑制剂治疗的病人中 N155S 突变几乎不出现, 它的出现与抑制剂的治疗有强相关性^[15]. 对 S-1360 产生的耐药机理也有研究, 发现其耐药性与 Loop 区柔性有关^[16]. 但确切的 HIV-1 整合酶耐药突变导致耐药性产生的机理现在仍然不清楚. 对耐药性的研究是目前 HIV-1 整合酶抑制剂研究中的重点. 研究发现, 大部分耐药突变都会导致病毒复制能力下降, 其中整合酶上的突变使整合酶活性降低, 而在一个耐药突变基础上, 另一个突变则有可能使整合酶活性提高, 即有活性回复的功能, 例如, 现已发现 E138K 可使 G118R 突变丧失的活性回复^[17].

本工作用人工引入突变的方法构建了 E92A、N155S、E92A/N155S 突变型的整合酶, 并测试了野生型整合酶和这几种突变型整合酶的链转移活性, 以及 S-1360 和 Raltegravir 对此活性的抑制率. 此外还用分子对接的方法进行结构信息方面的分析.

1 材料与方法

1.1 材料

野生型 HIV-1 整合酶 DNA 序列来自 HIV HXB2CG 病毒株 (GenBank accession number: K03455); pMD 18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司; 基因操作的工具酶均购自 New England Biolabs 公司; 引物和寡核苷酸链的合成修饰由上海生工生物技术公司完成; 碱性磷酸酶标记的地高辛抗体购自 Sigma 公司; 用 Bio-Rad 680 型酶标仪测定吸光度(A_{405}); 蛋白质电泳仪为 Bio-Rad 公司产品; 镍琼脂糖凝胶购自北京韦氏博慧色谱科技公司; S-1360 由北京工业大学生命科学与生物工程学院药物合成研究室合成; Raltegravir 购自美科美(北京)生物医学科技有限公司.

1.2 整合酶蛋白的表达与纯化

在野生型 HIV-1 整合酶 DNA 的基础上, 用重叠 PCR 的方法分别构建出含有 E92A、N155S、E92A/N155S 突变的整合酶表达载体, 所用引物见表 1 中 P 系列项目. 以 E92A 的引入为例, 以野生型 HIV-1 整合酶 DNA 为模板, 分别以 P_F 、 P_{E92A_R} 、

P_{E92A_F} 和 P_R 为引物进行 PCR, 纯化所得 DNA, 合并作为下一步模板, 用 P_F 和 P_R 为引物进行 PCR, 纯化 DNA 产物, 通过 T-A 克隆连接到 pMD-18T 中, 转化 BL21 鉴定测序正确后, 用 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切获取整合酶基因片段, 连接到同样经过酶切的 pET-28a(+)表达载体. 野生型和突变型整合酶质粒分别转化到 *Escherichia coli* BL21(DE3)宿主菌中, 用 IPTG 诱导表达, 离心收集菌体, 重悬于含 0.3 g/L 溶菌酶的缓冲液 A (20 mmol/L HEPES, 1 mol/L NaCl, 2 mmol/L 巯基乙醇, 5 mmol/L imidazole, pH 8.0)中, 超声细胞破碎后离心, 收集上清, 利用重组整合酶上的多聚组氨酸标签用镍琼脂糖凝胶进行亲和层析, 收集含有目的蛋白的洗脱液, 用缓冲液 B (20 mmol/L HEPES, 1 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10% glycerol, pH 8.0)进行透析, 分装后 -80°C 保存^[18-19].

1.3 整合酶链转移活性测定

将寡核苷酸 dE、dA、tE、tA(序列和修饰见表 1)分别用灭菌双蒸水溶解, dE 与 dA、tE 与 tA 分别按等摩尔量混匀, 95°C 加热 3 min 变性后缓慢冷却至室温, dE/A 形成双链结构的供体 DNA, tE/A 形成靶 DNA. 用 $1\times$ 反应缓冲液 (25 mmol/L PIPES, 10 mmol/L 巯基乙醇, 0.1 g/L BSA, 5% 甘油, 10 mmol/L MnCl_2) 洗 96 孔透明微孔板 1 次, 每孔加入 $25\ \mu\text{l}$ $2\times$ 反应缓冲液、1.5 pmol 供体 DNA、15 pmol 靶 DNA、800 ng 整合酶, 用灭菌双蒸水补足 $50\ \mu\text{l}$ 反应体积, 混匀后 37°C 孵育 1 h. 加入 $1.5\ \mu\text{l}$ 链霉亲和素磁珠及 $51.5\ \mu\text{l}$ 结合缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 2 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 0.1% Tween 20), 振荡混匀, 20°C 孵育 15 min, 每隔 5 min 振荡混匀 1 次. 将微孔板置于板式磁珠收集器上 90 s, 弃上清. 用 PBST (PBS 缓冲液加入 0.05% Tween 20) 洗磁珠 3 次. 加入 $100\ \mu\text{l}$ 碱性磷酸酶标记的地高辛抗体 (用 PBS 1:5 000 稀释), 振荡混匀, 37°C 孵育 30 min. 用 PBST 洗磁珠 3 次, 将磁珠转移到新的微孔板中, 加入 $100\ \mu\text{l}$ 显色底物缓冲液 (6.7 mmol/L pNPP, 0.1 mol/L Na_2CO_3 , 2 mmol/L MgCl_2 , pH 9.5), 避光显色 30 min, 每孔加入 $20\ \mu\text{l}$ 2 mol/L NaOH 终止显色, 用酶标仪测定波长 405 nm 处的吸光度值(A_{405})^[20]. 设置不加整合酶的试验作为对照.

Table 1 The sequences and modifications of oligonucleotides used in experiments^[20]

Oligonucleotide	Sequence (5' → 3')	Modifications
P _F	CTG CAT ATG ^a TTC CTG GAC GGT ATC GAC AAG	
P _R	CCG GGA TCC ^b CTA ^c ATC CTC ATC CTG TCT ACT TGC	
P _{E92A_F}	GAA GTT ATT CCA GCA GCA ^d ACA GGG CAG GAA ACA	
P _{E92A_R}	TGT TTC CTG CCC TGT TGC ^e TGC TGG AAT AAC TTC	
P _{N155S_F}	GTA ATA GAA TCT ATG AGC ^f AAA GAA TTA AAG AAA	
P _{N155S_R}	TTT CTT TAA TTC TTT GCT ^g CAT AGA TTC TAT TAC	
dE	ACC CTT TTA GTC AGT GTG GAA AAT CTC TAG CA	5' biotin
dA	ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA AAA G	
tE	ATG TGG AAA ATC TCT AGC GAT	3' digoxin
tA	ATC GCT AGA GAT TTT CCA CAT	

^a The *Nde* I restriction site and the AUG initiation codon; ^b The *Bam*H I restriction site; ^c The reverse sequence of the UAG termination codon; ^d The codon of Ala 92 for introducing the E92A site mutation; ^e The reverse sequence of Ala 92 codon; ^f The codon of Ser 155 for introducing the N155S site mutation; ^g The reverse sequence of Ser 155 codon.

1.4 抑制剂抑制率测定

步骤同整合酶链转移活性测试，不同处是在加入整合酶前向反应体系中加入 5 μ l 用 DMSO 稀释的整合酶抑制剂，需设置加相同体积 DMSO 的对照组。

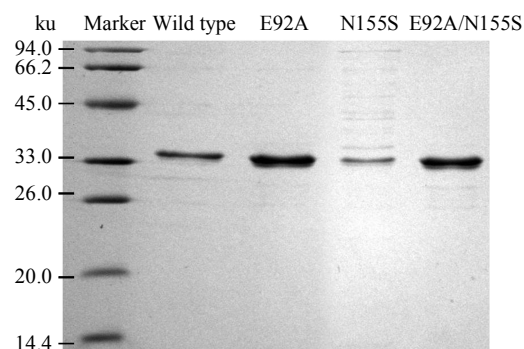
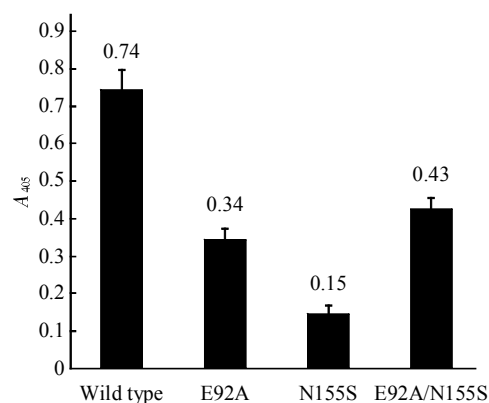
1.5 分子对接

所用软件为 AutoDock 4.2。野生型整合酶核心区结构源自 PDB 数据库中 1QS4 的 A 链，用 Jackal 程序将缺失的 141~144 号残基补齐。突变型整合酶的结构是在野生型结构基础上用 Sybyl 8.1 程序将对应氨基酸替换得到，替换后需用共轭梯度法和最陡下降法对结构做优化。小分子抑制剂 S-1360 用 ChemOffice 软件画出，存为 PDB 文件。其他操作按 Autodock 的 User Guide 手册进行，搜索算法选用 Lamarckian Genetic Algorithm。

2 结果与讨论

2.1 野生型及 3 种突变型整合酶的表达纯化与活性测试

纯化后重组蛋白的 SDS-PAGE(凝胶中丙烯酰胺含量为 15%)见图 1，所得蛋白质分子质量与 HIV-1 整合酶相符。活性测试结果见图 2，在野生型、E92A、N155S、E92A/N155S 4 种整合酶中，野生型的活性最高，E92A 突变使整合酶活性下降 54%，N155S 突变使活性下降接近 80%，而 E92A/N155S 双突变的活性仅下降 42%。

**Fig. 1** SDS-PAGE analysis of purified integrase proteins**Fig. 2** Strand transfer activity of integrases

The strand transfer activity is tested using magnetic beads based ELISA assay.

在临床病例中, 整合酶基因上的 N155S 突变不单独出现^[15], 据推测可能是此突变导致酶活性大幅下降, 病毒复制能力丧失所导致, 这与实验结果中的 N155S 突变型整合酶活性相符. 而 Raltegravir 引起的三种主要耐药突变之一 N155H 是会单独出现的^[16], 这表明 N155H 突变的整合酶活性有可能比 N155S 高. 实验中 E92A 突变使整合酶活性降低, 说明此位点与整合酶的催化功能有一定相关性. E92A 突变没有在临床上直接被观察到, 但 E92Q 是重要的耐药突变, 它是整合酶对 Raltegravir 的二级耐药突变, 是对 Elvitegravir 的主要耐药突变^[17]. 由于谷氨酸是带电荷残基, 丙氨酸和谷氨酰胺是不带电荷的残基, 故 E92A 与 E92Q 有一定的相似性, E92A 也有可能是一个耐药突变. E92Q 可在临床中以单突变存在, 本实验中 E92A 活性下降但仍保留约 1/3 活性, 这也印证了此两种突变相似的可能性. E92A/N155S 双突变型整合酶的活性虽然比野生型降低了约 50%, 但与 N155S 单突变相比, 它的活性大幅提高. 此结果表明, E92A 是 N155S 的回复突变, 这与临床中 E92Q 是 Raltegravir 主要耐药突变 N155S 的二级突变相符.

2.2 S-1360、Raltegravir 对野生型及 3 种突变型整合酶的抑制效果

在测整合酶链转移活性的试验中加入终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 S-1360 或 Raltegravir, 根据测得的信号可算出两种抑制剂在此浓度下对整合酶的抑制率, 结果见表 2. 在此浓度下, 2 种抑制剂对野生型 HIV-1 整合酶链转移活性基本可以完全抑制, 其抑制率接近或达到 90%. 对 E92A 突变型整合酶的抑制率少量下降, 分别为 69%和 84%, 这表明 E92A 突变引发了一定的耐药性. N155S 突变型由于其活性太低, 阴性和阳性的信号没有区别, 所以无法得出抑制率. S-1360 和 Raltegravir 对 E92A/N155S 双突变型整合酶的抑制率分别为 51%

与 66%, 比对 E92A 的抑制率又有相当的下降, 表明 E92A/N155S 双突变型整合酶的耐药性比 E92A 单突变型强. 临床中 Raltegravir 治疗失败的病例中, E92Q/N155S 耐药突变出现的比例是很高的, 这与本实验的结果相符.

2.3 突变型整合酶对 S-1360、Raltegravir 的耐药性

为了精确表征突变引发的耐药性, 测试了抑制剂在梯度浓度下对整合酶的抑制率, 梯度浓度设置为: 0.04、0.2、1、5、25 和 125 $\mu\text{mol/L}$, 结果如图 3. 从图 3 可以看出抑制剂对野生型整合酶抑制效果最好, 对 E92A 稍弱, 对 E92A/N155S 抑制效果大幅降低, 这与 2.2 中的结果一致. 根据图 3 中的结果计算出半数抑制浓度(IC_{50}), 结果见表 3.

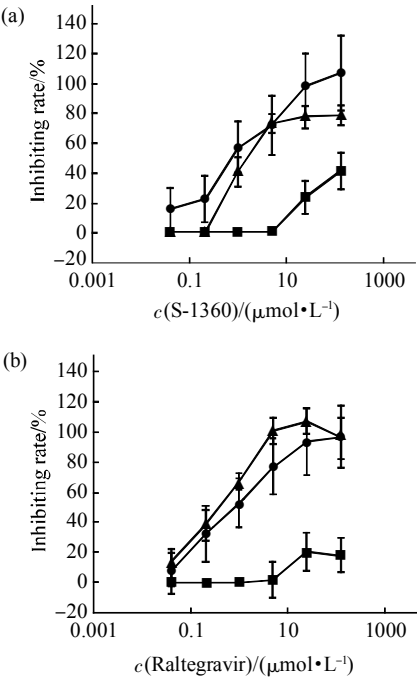


Fig. 3 Inhibiting rate of S-1360 and Raltegravir to integrases
The concentrations of the inhibitors from left to right are 0.04, 0.2, 1, 5, 25, and 125 $\mu\text{mol/L}$. Each dot is gained by the mean value of four repeat experiments. (a) Inhibiting curves of S-1360 to integrases. (b) Inhibiting curves of Raltegravir to integrases. $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: Wild type; $\bullet$ — $\bullet$: E92A; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: E92A/N155S.

Table 2 Inhibiting rate of S-1360 and Raltegravir to integrases			%
	S-1360 ¹⁾	Raltegravir ¹⁾	
Wild type	84.9 $\pm$ 12.8	90.8 $\pm$ 13.4	
E92A	68.6 $\pm$ 13.9	84.1 $\pm$ 15.8	
N155S	— ²⁾	— ²⁾	
E92A/N155S	50.7 $\pm$ 17.6	65.7 $\pm$ 14.7	

¹⁾ The concentration of S-1360 and Raltegravir is 25 $\mu\text{mol/L}$. ²⁾ The activity of N155S integrase is too low for inhibition rate testing.

Table 3 IC_{50} value of S-1360 and Raltegravir to integrases			$\mu\text{mol/L}$
	S-1360	Raltegravir	
Wild type	16.2	0.0772	
E92A	1.68	3.29	
N155S	— ¹⁾	— ¹⁾	
E92A/N155S	1670 ²⁾	21700 ²⁾	

¹⁾ The activity of N155S integrase is too low for inhibition rate testing; ²⁾ Because the inhibiting rates to E92A/N155S integrase are all in low level, these two IC_{50} values are not precise.

S-1360 和 Raltegravir 对野生型整合酶的 IC_{50} 分别为 $16.2 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.0772 \mu\text{mol/L}$, 与已有报道相符^[6, 21]. S-1360 和 Raltegravir 对 E92A 突变型整合酶的 IC_{50} 分别为 $1.68 \mu\text{mol/L}$ 和 $3.29 \mu\text{mol/L}$, 两者区别不大, Raltegravir 抑制效果低于 S-1360, 表明 E92A 对 Raltegravir 的耐药性比对 S-1360 稍强. 耐药突变位点是在临床中的抑制剂治疗中发现的, 不同的抑制剂产生的耐药突变不完全相同, E92Q 是 Raltegravir 的二级耐药突变, 是 Elvitegravir 的主要耐药突变. E92A/N155S 双突变型整合酶对 S-1360 和 Raltegravir 有很强的耐药性, 这与 2.2 中的结果亦相符. 对同一抑制剂, 将突变型的 IC_{50} 值除以野生型的 IC_{50} 值, 得到 IC_{50} fold, 如图 4, 它可以作为某突变对某抑制剂产生的耐药性的表征. 从此图可得出: E92A/N155S 对此两种抑制剂产生的耐药性比 E92A 强, 此两种突变对 Raltegravir 的耐药性强于对 S-1360.

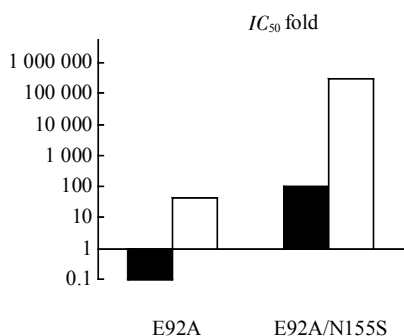


Fig. 4 Resistances of E92A and E92A/N155S integrases to S-1360 and Raltegravir

The resistance is quantified by IC_{50} fold. The IC_{50} fold of a mutation to a inhibitor is calculated as (IC_{50} of the inhibitor to the mutated type integrase) / (IC_{50} of the inhibitor to the wild type integrase). ■: S-1360; □: Raltegravir.

2.4 E92A 和 N155S 突变的分子对接分析

目前 HIV-1 整合酶全酶的三维结构还没有被解析出来, 但组成 HIV-1 整合酶的三个结构域, 即 N 端结构域(NTD, 1~49 号残基)、核心结构域(CCD, 50~212 号残基)、C 端结构域(CTD, 213~288 号残基), 已分别被解析出 X-ray 结构. 若结合结构信息对回复突变进行分析, 则可能得出对揭示整合酶催化机理、抑制剂作用机理、耐药突变耐药机理有帮助的结论.

图 5 显示了 S-1360 与野生型及 E92A、N155S、E92A/N155S 突变型 HIV-1 整合酶核心区

的分子对接结果. 野生型核心区结构源自 PDB 1QS4^[22], 各突变型核心区结构是在野生型的基础上, 用 Sybyl 程序将对应氨基酸替换, 再用共轭梯度法和最陡下降法优化得到的. 将所得结构用 Autodock 程序与 S-1360 做对接即得到复合物的结构.

从图 5a 可知, 组成 DDE 催化基序的 D64、D116、E152^[23] 3 个残基与 2 个 Mg^{2+} 螯合, D64、D116 与一个 Mg^{2+} 螯合, D116、E152 与另一个 Mg^{2+} 螯合, S-1360 上的二酮结构及呋喃环上的氧可很好地与 2 个 Mg^{2+} 螯合, 以阻止底物(病毒 DNA)在此区域结合. 图 5b 显示的是含有 N155S 突变的对接构象, 相对于图 5a 中的野生型构象, 图 5b 中催化中心的构象有较大变化, 2 个 Mg^{2+} 的位置和距离与野生型整合酶中的都不同, 由于 Mg^{2+} 是整合酶催化的关键辅因子, 这种变化可能是导致 N155S 突变型活性降低的主要原因. N155 残基在序列上与整合酶催化关键残基 DDE 基序中的 E152 间隔 2 个残基, 而此处整合酶的二级结构是 α 螺旋, 每 3 个残基旋转一周, 所以 E152 和 N155 在空间上是相邻的, N155 位于催化中心, 此处的突变改变了它与周围残基及 Mg^{2+} 的相互作用力, 进而改变了此处的构象, 最终使整合酶的催化活性产生很大变化. 在此结构中 S-1360 也不能同时与 2 个 Mg^{2+} 发生螯合, 这导致了耐药性的产生.

图 5c 为 E92A 突变的整合酶核心区与 S-1360 对接构象, 它的催化中心构象也与野生型有很大差别. E92 与整合酶活性中心有一定距离, 在野生型构象中, E92 中的氧原子与 Mg^{2+} 的最短距离为 $7.9 \text{\AA}$, 它不直接螯合金属离子, 但可能通过长程的静电力起作用. 另外, 整合酶活性中心的构象比较松散, D64、D116、E152 三个催化关键残基在序列上相距较远, 并且各自在不同的二级结构区域上, D64 位于 $\beta 1$ 片段上, D116 位于 $\beta 4$ 上, E152 位于 $\alpha 4$ 上. 而 E92 位于 $\alpha 1$ 上, $\alpha 1$ 与 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 在空间上是相邻的, E92 的突变可能导致它与 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 上空间相邻残基(包括 $\beta 1$ 上的 C65、H67, $\beta 4$ 上的 N117、S119)的相互作用力改变, 进而引起距离的变化. 同时 α 螺旋、 β 片层内部残基间是相对较刚性的, 所以这种变化通过 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 间接影响到了 D64、D116. 综上所述, E92 位的突变可能通过远程静电力影响 Mg^{2+} 和间接影响催化关键残基两条途径影响整合酶活性中心结构, 但由于都不是强

烈的直接影响,所以对整合酶活性、耐药性的改变有限.图 5d 中 E92A/N155S 双突变整合酶核心区的构象与野生型仍有很大不同,这是两个突变共同

影响的结果,但活性中心结构改变的程度并不比两种单突变大.

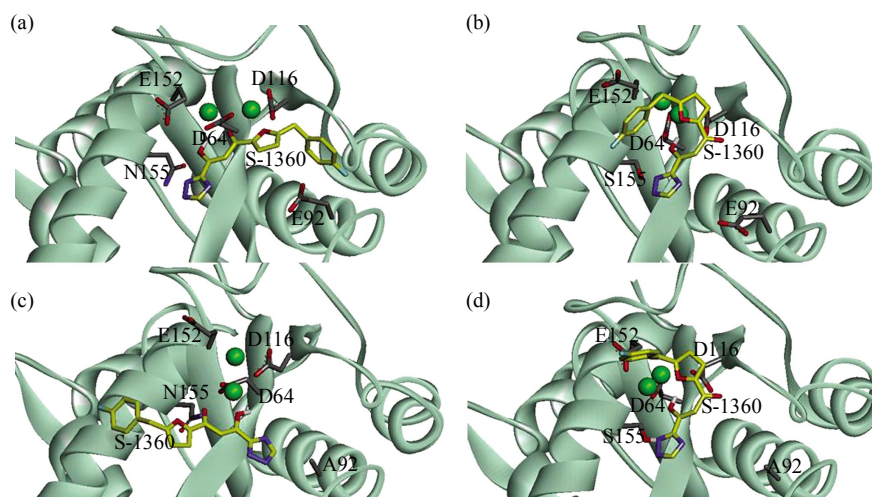


Fig. 5 Complex model of S-1360 and integrase central catalytic domain

These models are gained by Autodock 4.2. Integrase central catalytic domain (CCD) model is from PDB 1QS4. Integrase CCD are colored by dark green, Mg^{2+} cations are colored by bright green, inhibitors (S-1360) are colored by yellow (only carbon atoms). (a) Wild type; (b) With N155S substitution; (c) E92A; (d) E92A/N155S.

3 结 论

耐药突变型的整合酶其活性都有不同程度的损失,这在临床和体外实验中都能观察到^[13, 24].不同的突变或突变组合对活性及耐药性影响的程度不同. HIV-1 整合酶基因的变异有几条频繁采用的路径,先形成主要耐药突变,然后在此基础上累加二级突变,最终达到一个合适的活性/耐药性比值,使抑制剂失效,同时并不妨碍病毒的复制^[1]. 本工作通过人工引入突变加体外活性测试的方法发现了 E92A 是 N155S 的活性回复突变, E92A/N155S 双突变型整合酶的链转移活性是 N155S 单突变型的 3 倍,文献报道含有整合酶 G118R/E138K 双突变的 HIV-1 病毒的复制能力是 G118R 单突变的 9 倍^[17],结果是类似的.

从 2.4 结果推断,整合酶活性的损失和耐药性产生的原因有可能是相同的,即突变使活性中心的构象发生变化,使 Mg^{2+} 的位置发生变化,这种变化一方面使它与 DNA 底物的结合能提高,导致活性降低,另一方面也使抑制剂与包含 Mg^{2+} 的整合酶结合能提高,产生耐药性. E92A 和 N155S 突变都会使活性中心的结构改变, E92A 导致的改变较

小, N155S 导致的改变较大,它们使整合酶活性降低的幅度也与此相符. 对于 E92A/N155S 双突变,链转移活性测试表明它的活性高于 E92A 和 N155S 单突变. 分子对接结果显示,此双突变造成的整合酶活性中心的结构变化并不比两个单突变大,至少两个 Mg^{2+} 间的距离变化上如此. 按临床中耐药突变在病人体内的发展顺序,我们认为,此双突变中 E92A 突变是在 N155S 突变基础上产生的,则可以说 E92A 突变使 N155S 突变丧失的活性大幅回复,对比突变前后的两个残基,谷氨酸是带电残基,丙氨酸是非极性残基,另外的实验表明 E92Q 突变也会使 N155S 的活性回复,但程度小于 E92A(结果未显示),谷氨酰胺为极性不带电残基. 这表明,带有 N155S 耐药突变的整合酶中, 92 位的氨基酸极性越弱,整合酶活性越高. 根据这个规律和结构信息推测 E92A 的回复突变机理如下: E92A 突变使该残基与空间相邻的其他残基间的静电相互作用减弱,间接影响到位于活性中心的 D64 和 D116 两个催化关键残基的空间结构,加上突变后的残基对 Mg^{2+} 的静电吸引降低,使活性中心的结构布局更接近于野生型整合酶,导致活性回复. 这些理论推断还需要分子动力学模拟来验证,目前这部分工作

正在进行中。

单一的耐药突变一般不足以造成整合酶抑制剂的治疗失败，它往往在产生耐药性的同时大幅降低了整合酶的活性。而在此突变基础上叠加出现的突变若可使丧失的活性回复，则将形成既有耐药性又有高复制能力的病毒株，最终导致治疗失败。因此，回复突变的出现在整合酶耐药突变的发展中非常重要。本工作发现，E92A 突变是耐药突变 N155S 的活性回复突变，其回复作用超过临床中常见的 E92Q，原因可能是丙氨酸的疏水性大于谷氨酰胺，对活性中心的改变更多，这对揭示整合酶的耐药性机理，研发下一代 HIV-1 整合酶抑制剂有一定意义。另外，蛋白质工程研究中常需对目的蛋白某一方面的性能进行改造，往往改造的同时，会影响目的蛋白另一方面的性能，以至于得不偿失。本研究提出的关于活性回复突变的弥补机制对指导蛋白质工程实践也具有一定的借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] Craigie R, Bushman F D. HIV DNA integration. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, **2**(7): a006890
- [2] Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. Cell, 1991, **67**(6): 1211-1221
- [3] Pluymsers W, De Clercq E, Debyser Z. HIV-1 integration as a target for antiretroviral therapy: a review. Curr Drug Targ Infect Dis, 2001, **1**(2): 133-149
- [4] Huang M, Grant G H, Richards W G. Binding modes of diketo-acid inhibitors of HIV-1 integrase: a comparative molecular dynamics simulation study. J Mol Graph Model, 2011, **29**(7): 956-964
- [5] Palmisano L. Role of integrase inhibitors in the treatment of HIV disease. Exp Rev Anti-infect Ther, 2007, **5**(1): 67-75
- [6] Fikkert V, Hombrouck A, Van Remoortel B, *et al.* Multiple mutations in human immunodeficiency virus-1 integrase confer resistance to the clinical trial drug S-1360. AIDS, 2004, **18**(15): 2019-2028
- [7] Arts E J, Hazuda D J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, **2**(4): a007161
- [8] Geretti A M, Armenia D, Ceccherini-Silberstein F. Emerging patterns and implications of HIV-1 integrase inhibitor resistance. Curr Opin Infect Dis, 2012, **25**(6): 677-686
- [9] Mouscadet J F, Delelis O, Marcelin A G, *et al.* Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: a structural perspective. Drug Res Upd, 2010, **13**(4-5): 139-150
- [10] Malet I, Delelis O, Valantin M A, *et al.* Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2008, **52**(4): 1351-1358
- [11] Quashie P K, Mesplede T, Wainberg M A. Evolution of HIV integrase resistance mutations. Curr Opin Infect Dis, 2013, **26**(1): 43-49
- [12] Hazuda D J, Anthony N J, Gomez R P, *et al.* A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**(31): 11233-11238
- [13] Zahm J A, Bera S, Pandey K K, *et al.* Mechanisms of human immunodeficiency virus type 1 concerted integration related to strand transfer inhibition and drug resistance. Antimicrob Agents Chemother, 2008, **52**(9): 3358-3368
- [14] Alves C N, Marti S, Castillo R, *et al.* A quantum mechanic/molecular mechanic study of the wild-type and N155S mutant HIV-1 integrase complexed with diketo acid. Biophysical J, 2008, **94**(7): 2443-2451
- [15] Lataillade M, Chiarella J, Kozal M J. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. Antiviral Therapy, 2007, **12**(4): 563-570
- [16] 张小铁, 李春华, 谭建军, 等. S-1360 引起 HIV-1 整合酶多位点耐药突变的机理. 北京工业大学学报, 2007, **33**(9): 965-969
Zhang X Y, Li C H, Tan J J, *et al.* J Beijing Univ Technol, 2007, **33**(9): 965-969
- [17] Bar-Magen T, Sloan R D, Donahue D A, *et al.* Identification of novel mutations responsible for resistance to MK-2048, a second-generation HIV-1 integrase inhibitor. J Virology, 2010, **84**(18): 9210-9216
- [18] Grandgenett D P, Bera S, Pandey K K, *et al.* Biochemical and biophysical analyses of concerted (U5/U3) integration. Methods, 2009, **47**(4): 229-236
- [19] Jenkins T M, Hickman A B, Dyda F, *et al.* Catalytic domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: Identification of a soluble mutant by systematic replacement of hydrophobic residues. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**(13): 6057-6061
- [20] He H Q, Ma X H, Liu B, *et al.* A novel high-throughput format assay for HIV-1 integrase strand transfer reaction using magnetic beads. Acta Pharm Sin, 2008, **29**(3): 397-404
- [21] Marinello J, Marchand C, Mott B T, *et al.* Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. Biochemistry, 2008, **47**(36): 9345-9354
- [22] Goldgur Y, Craigie R, Cohen G H, *et al.* Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**(23): 13040-13043
- [23] Dyda F, Hickman A B, Jenkins T M, *et al.* Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. Science, 1994, **266**(5193): 1981-1986
- [24] Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, *et al.* Evolution of raltegravir resistance during therapy. J Antimicrob Chemother, 2009, **64**(1): 25-32

E92A Is an Activity Recovery Mutation of HIV-1 Integrase Drug Resistance Mutation N155S*

LI Shan, LIU Bin, LI Chun-Hua, TAN Jian-Jun, ZHANG Xiao-Yi**, WANG Cun-Xin**

(College of Life Science and Bio-engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract HIV-1 integrase (IN) is an important drug target of current anti-AIDS research and drug development. The drug resistance mutations (DRMs) are the main reason of integrase inhibitor therapy failure, but the drug resistance mechanism remains unclear. We introduced mutations artificially into HIV-1 integrase, tested the activity and drug resistance of individual mutations, and analyzed the integrase drug resistance mechanism preliminarily. The mutations involved contain two single mutations, E92A and N155S, and a double mutation, E92A/N155S. These mutations were obtained using genetic engineering methods, and these recombinant proteins were prepared after prokaryotic expression and protein purification. The strand-transfer activity of the integrases was tested by a magnetic beads based ELISA. S-1360 and Raltegravir were used for drug resistance testing. Besides, molecular docking was performed to study the complex of S-1360 and HIV-1 integrase central catalytic domain (including wild type and mutated type) using Autodock. The main results are as follows: N155S mutation decreases about 80% of the integrase strand transfer activity, while E92A/N155S only decreases about 42%. It indicates that, the E92A mutation on the base of N155S mutation increased the integrase activity observably. Besides, E92A and E92A/N155S mutations exhibit different drug resistance to different inhibitors, and they are more resistant to Raltegravir than to S-1360. A mutation could cause structural change of the integrase catalytic center domain, and the structural change eventually influences the activity and drug resistance. As to E92A, it may reduce the electrostatic interaction to the amino acids around it, and influences D64 and D116 indirectly, which are key amino acids of catalytic center domain. This may give a rational explanation to activity recovery of N155S caused by E92A.

Key words human immunodeficiency virus (HIV), integrase, drug resistance, activity recovery mutation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00300

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31100523, 21173014, 31171267), National Basic Research Program of China (2009CB930203), International Cooperation Project of Ministry of Science and Technology of China (2010DFA31710), and Beijing Municipal Education Commission (KM201310005030).

**Corresponding author. Tel: 86-10-67392724

WANG Cun-Xin. E-mail: cxwang@bjut.edu.cn

ZHANG Xiao-Yi. E-mail: zhangxiaoyi@bjut.edu.cn

Received: June 28, 2013 Accepted: October 22, 2013