โครงสร้าง พลศาสตร์และซอลเวชันของเอชไอวี-1 โปรทีเอสไวด์ไทป์กับสารยับยั้งโดยใช้การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

นางสาวกิติยาพร วิทยานรากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

STRUCTURE, DYNAMICS AND SOLVATION OF HIV-1 PROTEASE WILDTYPE COMPLEXED WITH INHIBITORS BY MOLECULAR DYNAMIC SIMULATIONS

Miss Kitiyaporn Wittayanarakul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic year 2006

Thesis Title	Structure, dynamics and salvation of HIV-1 protease wildtype complexed with inhibitors by molecular dynamic simulations
By	Miss Kitiyaporn Wittayanarakul
Field of Study	Chemistry
Thesis Advisor	Professor Supot Hannongbua, Ph. D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Pornthep Sompornpisut, Ph. D.
	Dr. Michael Feig, Ph. D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph. D.)

..... Thesis Advisor

(Professor Supot Hannongbua, Ph. D.)

..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Pornthep Sompornpisut, Ph. D.)

..... Thesis Co-advisor

(Michael Feig, Ph. D.)

..... Member

(Associate Professor Vudhichai Parasuk, Ph. D.)

..... Member

(Associate Professor Surapong Pinitglang, Ph. D.)

..... Member

(Assistant Professor Wasun Chantratita, Ph. D.)

กิติยาพร วิทยานรากุล: โครงสร้าง พลศาสตร์และซอลเวชันของเอชไอวี-1 โปรทิเอสไวด์ไทป์กับสารยับยั้งโดยการใช้การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (STRUCTURE, DYNAMICS AND SOLVATION OF HIV-1 PROTEASE WILDTYPE COMPLEXED WITH INHIBITORS BY MOLECULAR DYNAMIC SIMULATIONS) อ.ที่ปรึกษา: ศ. ดร. สุพจน์ หารหนองบัว, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์, ดร. Michael Feig, 108 หน้า.

สารยับยั้งไวรัส human immunodeficiency ชนิด 1 โปรทิเอส (HIV-1 PR) เกือบทั้งหมดประกอบด้วย ไฮดรอกซิล-เอทิลลีน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการจำเรสซิดิวส์แอสปาร์ติคบริเวณเร่งของเอนไซม์ เป็นที่แน่ชัดว่าสัมพรรคภาพ ของการยึดเหนี่ยวมีส่วนสัมพันธ์กับสภาวะการแตกตัวเป็นไอออนที่เหมาะสมของโซ่ข้างของสารยับยั้งที่ยึดกับเรสซิดิวส์ สภาวะโปรโตเนชันของเรสซิดิวส์บริเวณเร่งยังไม่สามารถทราบได้แน่ชัด เราจึงตัดสินใจทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลและการคำนวณพลังงานอิสระแบบดั้งเดิมและแบบดัดแปลง เพื่อที่จะปรับปรุงการทำนายสภาวะโปรโตเนชันของสารประกอบเชิงซ้อนกับยาทั้งหกชนิดซึ่งประกอบด้วย โลพินาเวียร์ (LPV), ริโทนาเวียร์ (RTV), ซาควินาเวียร์ (SQV), อินดินาเวียร์ (IDV), แอมพรินาเวียร์ (APV) และ เนลฟินาเวียร์ (NFV) จึงได้ทำการจำลองระบบของของทุกสภาวะโปรโตเนชันที่เป็นไปได้ของเรสซิดิวส์บริเวณเร่ง ซึ่งประกอบด้วยโมโนโปรโตเนตที่แอสปาร์ติคที่ตำแหน่ง 25 (D25) และที่ โปรโตเนตที่แอสปาร์ติคที่ตำแหน่ง 25' (D25'), ไดโปรโตเนชัน (D25,25') และ อันโปรโตเนชัน (D-) ของระบบสารประกอบเชิงซ้อนสารยับยั้งกับเอนไซม์ การคำนวณพลังงานเสรี ($\Delta G_{binding}$) โดยใช้วิธีแบบมาตรฐานและแบบลูกผสมของ กลศาสตร์โมเลกุลปัวร์ซองโบลทซ์แมน หรือ เจอเนอรัลไลซ์และ โซลเวนท์แอสเซสสิเบิล เซอเฟสเอเรีย (MMPB(GB)/SA) การศึกษานี้ ได้พิจารณา $\Delta G_{binding}$ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโปรโตเนชันที่ $pH = 7$ ผลการศึกษาพบว่า วิธี MMPB/SA แบบลูกผสมให้ประโยชน์เพียงเล็กน้อยในการให้ค่าสัมบูรณ์พลังงานอิสระ ขณะที่การใช้การประมาณค่าเจนเนอรัลไลซ์ บอร์น กระทบความถูกต้องของการคำนวณสัมพรรคภาพการยึดจับอย่างมีนัยสำคัญ บนพื้นฐานของ $\Delta G_{binding}$ และ การวิเคราะห์วิธีการคำนวณพบว่า โมโนโปรโตเนชันเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ สารยับยั้งทั้ง 6 ชนิดกล่าวคือ D25 สำหรับ LPV, SQV และ IDV และ D25' สำหรับ RTV, APV และ NFV การศึกษานี้ยังได้ขยายขอบเขตเพื่อทำนายการกลายพันธุ์ระดับโมเลกุลที่เนื่องมาจากการใช้ยายับยั้ง เอชไอวี-1 โปรทิเอสทั้ง 6 ชนิด และการใช้ยาโอเซลทามิเวียร์เพื่อยับยั้งไข้หวัดที่ทำงานที่เอนไซม์นิวรามินิเดส โดยใช้พลังงานอิสระยึดจับดีคอมโพสิชันเป็นเกณฑ์ ผลการทำนายเรซิดิวส์ที่คาดว่าจะเกิดการกลายพันธุ์สำหรับทั้งสองกรณีสอดคล้องเป็นอย่างดีกับข้อมูลทางการแพทย์สำหรับการดื้อยาในระดับสูงและปานกลาง

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต กิติยาพร วิทยานรากุล

สาขาวิชา เคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (1) , (2)

4572605123: MAJOR CHEMISTRY

KEYWORD: Molecular dynamics simulations, Free energy calculation, Protonation state, Mutation, MMPB(GB)SA, hybrid MMPB(GB)SA

KITIYAPORN WITTAYANARAKUL: STRUCTURE, DYNAMICS AND SOLVATION OF HIV-1 PROTEASE WILDTYPE COMPLEXED WITH INHIBITORS BY MOLECULAR DYNAMIC SIMULATIONS. THESIS ADVISOR: PROF. SUPOT HANNONGBUA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. PORNTHEP SOMPORNPISUT, Ph.D., MICHAEL FEIG, Ph.D., 108 pp.

Almost all of the human immunodeficiency virus type I protease (HIV-1 PR) inhibitors contain a hydroxyl-ethylene moiety, which plays an essential role in recognition of the enzyme through the aspartic active site residues. Apparently, the affinity of the binding is associated with a proper ionization state of the sidechain of the inhibitor-bound residues. The protonation state of the active site residues is not clearly understood. We decided to carry out molecular dynamics simulations and conventional and modified free energy calculations to improve a prediction of the protonation state of the HIV-1 PR in complex with six HIV-1 PR drugs including Lopinavir (LPV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV), Indinavir (IDV), Amprenavir (APV), and Nelfinavir (NFV). All possible protonation states of the active site residues including monoprotonated at Asp25 (D25), monoprotonated at Asp25' (D25'), diprotonation (D25,25'), and unprotonation (D-), were used to set up the system of HIV-1 PR-drug complexes for the simulations. The binding free energy ($\Delta G_{binding}$) was computed using a standard and hybrid methods of molecular mechanic Poisson Boltzmann or Generalized Born, and solvent accessible surface area (MMPB (GB)/SA). In this study, the $\Delta G_{binding}$ due to the protonation change at $pH = 7$ was also taken into account. Comparison among the method used, the hybrid MMPB/SA approach offers a slightly advantage in reproducing absolute binding free energies whereas the use of Generalized Born approximation significantly affects the accuracy of the computed binding affinities. Based on the $\Delta G_{binding}$ and the computational analysis, monoprotonation is the optimal state for the 6 drugs, D25 for LPV, SQV, and IDV and D25' for RTV, APV, and NFV. The study was extended to predict molecular mutation due to the HIV-1 PR complexed with the 6 inhibitors and the influenza neuraminidase complexed with oseltamivir using the decomposition binding free energy as a criteria. The predicted mutation residues for both cases are in good agreement with the high and intermediate level of resistant reported clinically.

Department Chemistry Student's signature Kittiyaporn Wittayanarakul

Field of study Chemistry Advisor's signature S. Hannongbua

Academic year 2006 Co-advisor's signature

Co-advisor's signature Michael Feig

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all I would like to special thank my supervisor, Prof. Dr. Supot Hannongbua, he is more than advisor who gives me only the knowledge within the books but he also teaches, encourages and supports me for everything which are not able to described within one page here. I would say that I will not able to have a good opportunity for education without his favour.

I am also deeply grateful to my co-advisor, Assist. Prof. Dr. Pornthep Sompornpisut, for many advices and encourages throughout these years of work. My appreciation also goes to Dr. Vannajan Sanghirun-Lee. They gave me the knowledge of using program in the first 3 years I have never forgotten.

Especially thank to Dr. Michael Feig, who is my co-advisor when I was doing research at Michigan State University. He has a lot of patience and devoted his time to teach me step by step when I worked there. I will not forget his kindness to give me more and more experiences as I have never had. I genuinely express here my gratitude for his guidance and support throughout these years of my work. My appreciation also goes to Dr. Seiichiro Tanizaki for teaching and discussion.

My gratitude also goes to the chairman and entire committees, Assoc. Prof. Dr. Sirirat Kokpol, Assoc. Prof. Dr. Vudhichai Parasuk, Assoc. Prof. Dr. Surapong Pinitglang, and Assist. Prof. Dr. Wasun Chantratita, who read and reread quickly in order to help me finalize the study in a timely manner. Especially, their comments and suggestions are also useful and led me to improve it.

I am gratefully thanks to Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph. D. program which provided financial support for my thesis. Also, my appreciation goes to Computational Chemistry Unit Cell (CCUC) at the Department of Chemistry, Chulalongkorn University and Department of Chemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, USA for providing me the all computational facilities.

I would like also to express, truly from my heart, my deep gratitude to my beloved parents, Kaewmaneewan and Paiboon Wittayanarakul, for all their love, support and encouragement during the whole period of my study. My mom, always stands by me in the every moment of my life. My dad has an inspiration in order to see my success. These keep my life always going and never. They have grown me up and became who I am. I also offer this work to them.

Finally, I would like to express special thank to all my friends, all teachers, and all my co-workers, who are not stated here. Everyone is a part of my colourful life.

CONTENTS

Pages

Pages

Pages

LIST OF TABLES

Pages

LIST OF FIGURES

Pages

LIST OF ABBREVIATIONS

CHAPTER 1		Section
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome	1.1
HIV	Human immunodeficiency virus	1.1
Asp	Aspartic	1.1
ORF	Open reading frames	1.2
RT	Reverse transcriptase	1.2
PR	Protease	1.2
RNA	Ribonucleic acid	1.3
DNA	Deoxyribonucleic acid	1.3
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS	1.3
WHO	World health Organization	1.3
Gp	Glycloprotein	1.3.1
CD4	Cluster of differentiation	1.3.1
ENV	Envelope	1.3.1
Gag	group-specific antigen	1.3.1
Pol	Polymerase	1.3.1
Tat	Transactivator	1.3.1
Rev	Regulator of viral express	1.3.1
Vif	Viral infectivity	1.3.1
Vpr	Viral protein	1.3.1
Vpu	Viral protein U	1.3.1
Nef	Negative-regulation factor	1.3.1
FDA	Food and Drug Administration	1.5
LPV	Lopinavir	1.5
RTV	Ritonavir	1.5
SQV	Saquinavir	1.5
IDV	Indinavir	1.5
APV	Amprenavir	1.5
NFV	Nelfinavir	1.5
TPV	Fosamprenavir	1.5
FPV	Fosamprenavir	1.5

		Section
DRV	Darunavir	1.5
ATV	Atazanavir	1.5
HAART	Highly active antiretroviral therapy	1.6
MMPB/SA	Molecular mechanic Poisson Boltzmann/solvent accessible surface area	1.7
MMGB/SA	Molecular mechanic Generalized Born/solvent accessible surface area	1.7
MMGBMV/SA	Molecular mechanic Generalized Born molecular volume/solvent accessible surface area	1.7

CHAPTER 2

MD	Molecular dynamics simulations	2.1
BPTI	Bovine pancreatic trypsin inhibitor	2.1
F	Force	2.1.1
m	Mass	2.1.1
a	Acceleration	2.1.1
r	distance	2.1.1
E	Potential function	2.1.1
v	Velocity	2.1.1
E_{bonded}	Bonded term	2.1.2
$E_{non\text{-}bonded}$	Non-Bonded term	2.1.2
k	Force constant	2.1.3.1
ΔG_{bind}	Binding free energy	2.2
ΔH	Enthalpic term	2.2
ΔS	Entropic term	2.2
K_{eq}	Equilibrium constant	2.2
q	Charge	2.2.1.2
SASA	Solvent accessible surface area	2.2.1.3
I	Moment of initia	2.2.1.4

CHAPTER 3

		Section
FEP	Free energy perturbation	3.1
D25	monoprotonated at aspartic25	3.1
D25'	monoprotonated at aspartic25'	3.1
D25,25'	monoprotonated at both of aspartic 25 and aspartic 25'	3.1
D-	Unprotonation	3.1
TI	Thermodynamic integration	3.1
PDB	Protein Data Bank	3.2.1
$\Delta G_{association}$	Gibbs energy of protein-ligand association	3.1
$\Delta G_{solvation}$	Solvation binding free energy	3.1
$\Delta G_{free(D25 \rightarrow D25,25')}$	Free energy change from D25 to D25,25'	3.3.2
$\Delta G_{(EnzH \rightarrow Enz')}$	Free energy change from protonated apartate enzyme to deprotonated aspartate enzyme	3.3.2
$\Delta G_{(AspH \rightarrow Enz')}$	Free energy change from protonated free apartate to deprotonated free aspartate	3.3.2

CHAPTER 4

DC	Decomposition energy	4.1
N	Neuraminidase	4.1
ΔG_{res}	Binding free energy change between individual residue and inhibitor	4.2
ΔG_{res}	Binding free energy change between individual residue and inhibitor	4.2
$\langle \Delta G^{res+inhibitor} \rangle$	average binding free energy between individual residue located on the protein and inhibitor	4.2
$\langle \Delta G^{res} \rangle$	average binding free energy of individual residue	4.2
$\langle \Delta G^{inhibitor} \rangle$	average binding free energy of inhibitor	4.2
OTV	Oseltamivir	4.3.2
RMSD	Root mean square displacement	4.3.3