

Yeni Tasarlanan ve Daha Önceden Çalışılmış Bazı Anti-HIV İntegraz Ligandlarının Autodock Vina ile HIV-1 İntegraz Enzimi Katalitik Öz Bölgesine Yerleştirilmesi ve Analizleri

Yrd. Doç. Dr. Selami ERCAN

*Batman Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik anabilim Dalı, BATMAN
selami.ercan@batman.edu.tr*

ÖZET

Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) modern dünyanın en önemli hastalıklarından biridir. Bu hastalığa insan immün yetmezlik virüsü (HIV) neden olmaktadır. HIV-1 integrase enzimi diğer çalışılan enzimler proteaz ve ters transkriptaza göre daha geç ilgi görmüştür. Geliştirilen ilaçlara sürekli direnç oluşması yeni ilaç adaylarının bulunmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada HIV-1 integrase enziminin katalitik öz bölgesinin bir modeli hazırlanarak moleküler dinamik simülasyonu ile davranışları incelendi. Bu model hedef alınarak, yeni geliştirilen 6 ligandın yanı sıra, bilinen ancak HIV-1 integrase inhibitör adayları olarak ilk defa kullanılan 4 ligand ve daha önce teorik ve/veya uygulamalı olarak çalışılan 32 ligand yerleştirildi. Yerleştirilen ligandların proteinle etkileşimleri incelendi. Yeni geliştirilen ligandlardan LGA, LGD ve LGE'nin ortalamasının üzerinde bir yerleştirme skoruna sahip olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: İntegraz, Anti-HIV ilaç tasarımı, Ligand yerleştirme, Moleküler Dinamik Simülasyonu

ABSTRACT

Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS) is the one of most important pandemic of modern world. Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the causative agent of this disease. HIV-1 integrase have attracted lately than the other studied enzymes protease and reverse transcriptase. It is a needful to develop new drug candidates due to continuously growth of drug resistance. A catalytic core domain model of HIV-1 integrase was created and the behaviors of protein was examined by molecular dynamics simulation. By targeting this model, besides 6 newly designed ligands, 4 known but used for the first time ligands and 32 previously theoretical and/or in vitro studied ligands were docked. Interactions of docked ligands with protein were inspected. Among the designed ligands it is seen LGA, LGD and LGE have docking scores of above average.

Keywords: Integrase, Anti-HIV drug design, Docking, Molecular Dynamics Simulation,

1. Giriş

HIV (Human Immunodeficiency Virus, insan immün yetmezlik virüsü) retrovirüslerin lentivirüs cinsinin bir üyesidir. HIV enfeksiyonu, etken virüsün etkisiyle bağışıklık sisteminin giderek baskılandığı kronik bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan virüs (HIV), lentivirüs ailesine mensup bir retrovirüstür. Retrovirüsler, tek sarmallı RNA içeren zarflı virüslerdir. Ters transkriptaz enzimi aracılığı ile genetik materyallerini çift sarmallı DNA'ya çevirip konakçı kromozomuna entegre etme özelliklerine sahiptir.

Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) modern dünyanın en önemli hastalıklarından biridir [1,2]. The Joint United Nations Program on HIV/AIDS [3] 2010 raporuna göre dünyada 33.3 milyon insan HIV virüsü ile yaşamaktadır. Bunların 30.8 milyonunu yetişkinler oluştururken HIV virüsü ile yaşayan kadın sayısı 15.9 milyondur. İki bin dokuz yılında 2.6 milyon insanın yeni enfekte olduğu ve bunların 370 000'inin çocuk olduğu öngörülmektedir. Aynı yılda AIDS hastalığından ölenlerin sayısının 1.8 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayı çocuklarda ise 260 000 olarak bildirilmiştir. HIV virüsünden etkilenenlerin sayısında 2001-2009 arasında 33 ülkede %25'in üzerinde azalma görülmüştür.

Ekim 2007'de U.S Food and Drug Administration'ın (FDA) Raltegravir'i (RGV) kabul etmesi kullanılan HIV hedefleri listesine integrazı (IN) içererek şekilde genişletti. RGV'nin ilaca dirençli HIV ile enfekte olan hastalar için değerli bir kurtarma tedavisi olmasına rağmen, RGV'ye karşı direnç de rapor edilmiştir [4,5]. Diğer onaylanan HIV-1 integraz inhibitörleri Elvitegravir (EVG) ve Dolutegravir (DTG) yakın zamanda piyasaya çıkmıştır.

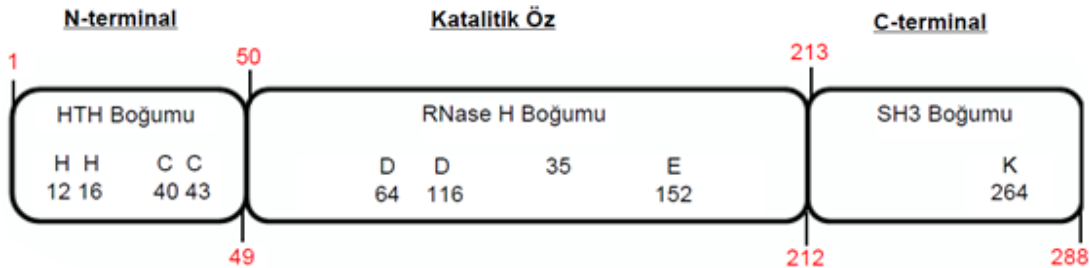
İntegraz, pol geninin son kısmı tarafından sentezlenen 288 aminoasit kalıntısı olan bir proteindir. IN viral proteaz aracılığıyla meydana gelen kırılma ile Gag-Pol polipeptid öncülünün bir parçası olarak üretilir [2,6].

HIV-1 IN gerekli ilgiyi geç görmüştür. Sonradan gelen bu ilginin sebebinin çoğu Merk firması ve ortak çalışanlarının HIV-1 IN'ı terapötik bir hedef olduğunu klinik olarak doğrulamasındandır. HIV-1 integrazın başlıca görevi, HIV-1 gen ekspresyonu ve viral

replikasyon için ihtiyaç duyulan bir basamak olan yeni transkribe edilmiş HIV-1 cDNA'nın konak hücre DNA'sına yerleşme işlemini katalizlemektir [7].

IN enzimi, viral DNA'nın parçalanması ve yeniden birleştirilmesinde aktif olarak görev almaktadır. Böylece proviral DNA'nın konak hücre genomuna birleştirilmesi sağlanmaktadır. IN, konak DNA'sını kesme işleminin "kes-ve-yapıştır" operasyonunu ve proviral genomunun kesilmiş bu uçlara bağlanmasını katalizler. İntegraz retrovirüslere çok fazla özgü olan bir fonksiyonu icra eder, zira insan hücresi kendi genomlarının içinde DNA'nın herhangi bir parçasını kesip yapıştırmaya ihtiyaç duymaz. Bu, integras inhibisyonunun ilaç terapisi için iyi bir hedef olabileceği anlamına gelir, çünkü insan hücrelerinin normal operasyonlarını engelleyecek gibi görünmemektedir.

HIV-1 integras enzimi N-terminal bölgesi (NTD; 1-49 kalıntıları), katalitik öz bölgesi (CD; 50-212 kalıntıları) ve C-terminal bölgesi (CTD; 213-288 kalıntıları) [8,9] olarak isimlendirilen üç bölgeden (Şekil 1.) oluşan 32 kDa'luk bir enzimdir [8,10]. N-terminal bölgesi çinko iyonu ile koordine olmuş heliks bir bohça şeklindedir ve IN'in dimerleşmesine katılır. Mg^{2+} veya Mn^{2+} gibi divalent bir metal iyonu bağlayan D,D-35-E motifi (ASP64, ASP116 ve GLU152) içeren katalitik öz bölgesi kataliz için kritik role sahiptir. IN'in aktif bölgesinde avian sarcoma virüsü (ASV) integrasında olduğu gibi iki metal iyonu bulundurduğu düşünülmese rağmen aydınlatılmış HIV-1 IN x-ray yapısında tek bir metal olduğu görülmüştür. Bunun yanında, ikinci metalin sadece HIV-1 IN bir substrata bağlandığında mevcut olduğu önerilmektedir. C-terminal bölgesi ise dimerleşmede yer alır ve aynı zamanda LTR DNA'yı bağlar [6,9,10]. Her üç bölge de 3'-işleme ve DNA zincir transfer reaksiyonları için gereklidir ancak ayrışma ve spesifik olmayan alkoli gerçekleştirme için katalitik öz bölgesi yeterlidir [11].



Şekil 1. HIV-1 integrasın bölgeleri

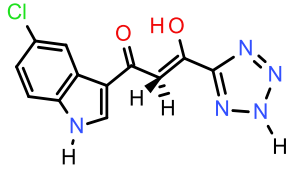
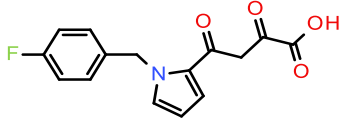
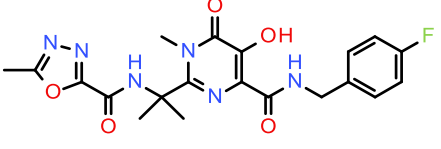
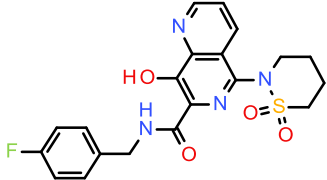
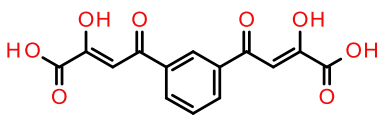
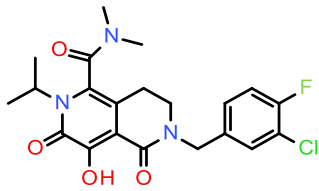
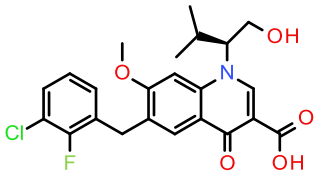
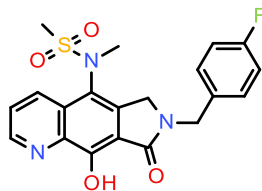
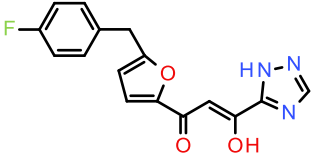
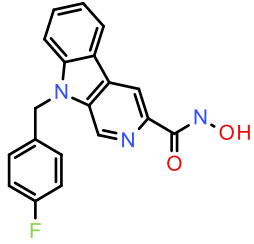
İntegraz haloenziminin kristalografik çalışmaları düşük çözünürlük ve çözelti içinde kümeleşme isteği nedeniyle zor olmasına rağmen integrazın katalitik öz bölgesinin çözünürlüğünü arttırarak kriztalizasyonu kolaylaştıran bazı mutasyonlar açıklanmıştır [12, 13]. Her ne kadar, şu anda HIV integrazın tam uzunluktaki üç boyutlu yapısı mevcut olmasa da kesilmiş proteinin N-terminal-katalitik öz bölgeleri [14] ve katalitik öz-C-terminal [15] kısımları için x-ray destekli üç boyutlu yapıları yayınlanmış ve bunlar Protein Data Bank'ta [16] rapor edilmiştir [17]. Bu çalışmada kullanılacak protein modelinin hazırlanmasında katalitik öz bölgesi içeren 1BL3.pdb [18] kristal yapısından, 1WJA [19] NMR yapısından, N-terminal-katalitik öz bölgesi içeren 1K6Y ve katalitik öz-C-terminal bölgesi içeren 1EX4 kristal yapılarından yararlandı.

İlaç araştırması ve geliştirmesi (R&D: research and development) geniş kapsamlı, pahalı, zaman alıcı ve riskle doludur. Fikir halindeki bir ilacın markete gelmesi 12 yıl ve bunun için harcanan paranın ortalama 800 milyon \$'dan fazla olduğu hesaplanmaktadır. Bu nedenle ilaç araştırması ve geliştirilmesinde araştırma süresini kısaltmak ve pahalılığını düşürmek için birçok yeni teknoloji geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD) böyle evrimsel teknolojilerden biridir [20]. Ligand yerleştirme işlemi ve Moleküler Dinamik Simülasyonu da CADD'in ayaklarındanlardır. İlk yerleştirme algoritmasının 1980'lerde Kuntz ve arkadaşları tarafından bulunmasından beri çok sayıda değişik yerleştirme yaklaşımı ve aracı geliştirilmiştir [21]. Moleküler yerleştirme, reseptör-ligand komplekslerinin yapı öngörüsü olarak tanımlanabilir. Reseptör genellikle protein veya protein oligomeri, ligand ise küçük bir molekül veya başka bir proteindir. Moleküler yerleştirmeyle sanal taramanın ilaç keşfindeki önemi giderek artmaktadır. Böyle bir sanal tarama genellikle üç basamakta gerçekleştirilir. İlk olarak, moleküler yerleştirme programı bir hedef proteinin ve tarama kütüphanelerinden bir bileşiğin kompleksi için en uygun yapıyı ön görür. İkinci olarak, kompleksler bağlanma enerjisi kuvvetlerine göre skorlandırılırlar. Son olarak, yerleştirme skorlarına göre sınıflandırma yapılır ve sanal tarama sonuçlarından en iyi derecedekiler seçilirler [22]. Böylece, moleküler yerleştirme bir ilaç geliştirme basamağının en önemli ayaklarından birini teşkil eder.

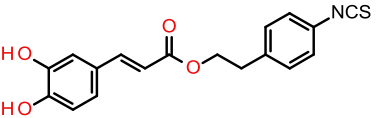
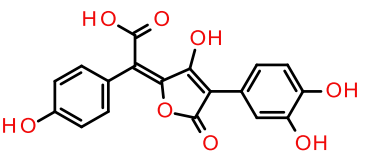
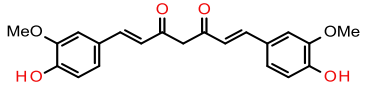
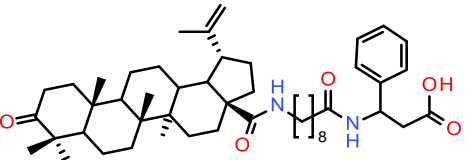
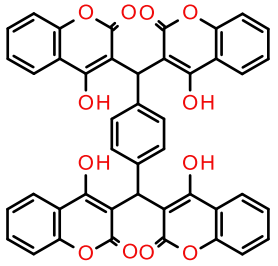
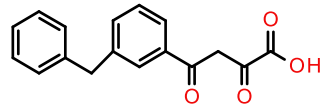
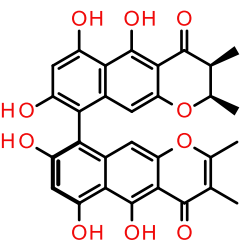
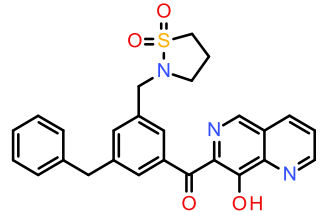
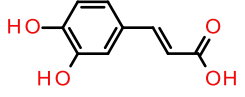
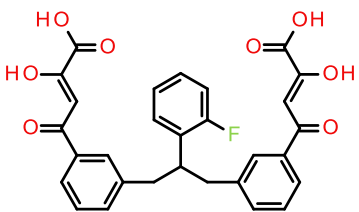
Autodock Vina (Vina) [23] skorumlama fonksiyonu olarak bilgi-tabanlı potansiyeller ve empirik skorumlama fonksiyonlarının kombinasyonunu kullanmaktadır. Yöntem empirik bilgileri reseptör-ligand komplekslerinin konformasyonel deneyimlerinden ve deneysel affinite hesaplamalarından almaktadır. Autodock Vina genetik algoritmalar, parçacık-yığılma optimizasyonu ve benzetimli tavlama gibi algoritmaları içeren skoastik global iyileştirme yaklaşımlarını kullanmaktadır. Autodock4 ile uyumlu olduğundan bu programın araçlarını kullanması bir avantaj olarak görülmektedir [23].

Bu çalışmada Autodock Vina programı ile 40 ligand HIV-1 IN CCD'e yerleştirilmiştir. Kullanılan ligandların 31 tanesi daha önce teorik ve/veya deneysel olarak çalışılmıştır. Bu ligandlar geniş bir ligand kütüphanesinden IC₅₀ değeri baz alınarak seçilmiştir [24-43]. Bunlara ek olarak daha önce HIV-1 integras inhibitörü olarak çalışılmamış folik asit, metotreksat, pemetreksed ve tetrahidroksisikloheksan-1-karboksilik acid ile birlikte, tasarladığımız beş ligand da eklenerek toplam 40 ligand çalışmada kullanıldı (Tablo 1.)

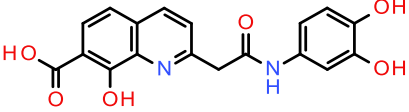
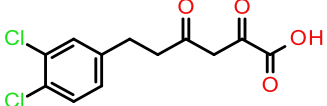
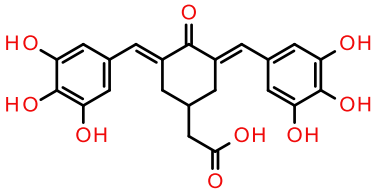
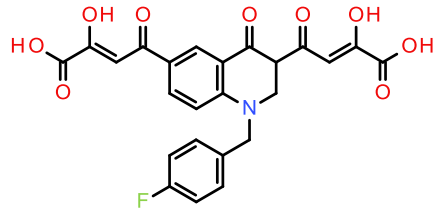
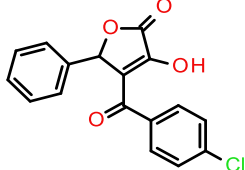
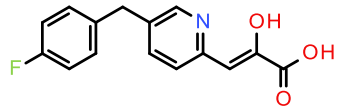
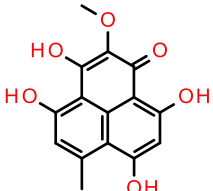
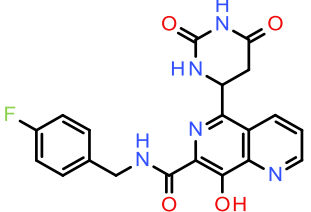
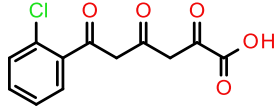
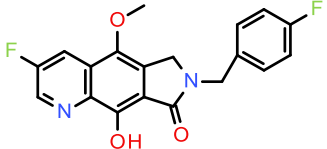
Tablo 1. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L01	 <p>(Z)-3-(5-kloro-1H-3-indol-3-il)-3-hidroksi-1-(2H-tetrazol-5-il)prop-2-en-1-on</p>	L06	 <p>4-[1-(4-florofenil)metil]pirrol-2-yl]-2,4-dioksobütanoik asit (L-731988)</p>
L02	 <p>N-[2-[4-[(4-florofenil)metilkarbamoyl]-5-hidroksi-1-metil-6-oksopirimidin-2-il]propan-2-il]-5-metil-1,3,4-oksadiazol-2-karboksamid (Raltegravir)</p>	L07	 <p>5-(1,1-dioksotiazinan-2-il)-N-(4-florofenil)metil]-8-hidroksi-1,6-naftiridin-7-karboksamid (L870810)</p>
L03	 <p>(2Z, 2'Z)-4,4'-benzen-1,3-diilbis(2-hidroksi-4-oksobüt-2-enoyk asit)</p>	L08	 <p>(5E)-2-(3-kloro-4-florofenil)metil]-5-[dimetilamino(hidroksi)metiliden]-6-propan-2-il-3,4-dihidro-2,6-naftiridin-1,7,8-trion (MK0536)</p>
L04	 <p>6-[(3-kloro-2-florofenil)metil]-1-(1-hidroksi-3-metilbütan-2-il)-7-metoksi-4-oksokinolin-3-karboksilik asit (Elvitegravir)</p>	L09	 <p>N-[7-(4-florofenil)metil]-9-hidroksi-8-okso-6H-pirrol[3,4-g]kinolin-5-il]-N-metilmetsülfonamid (GS9160)</p>
L05	 <p>(Z)-1-[5-(4-florofenil)metil]furan-2-il]-3-hidroksi-3-(1H-1,2,4-triazol-5-il)prop-2-en-1-on (s-1360)</p>	L10	 <p>9-(4-florofenil)metil]-N-hidroksipirido [3,4-b]indol-3-karboksamid (pica)</p>

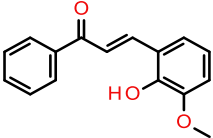
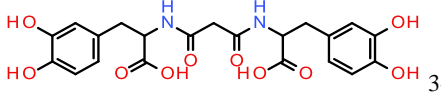
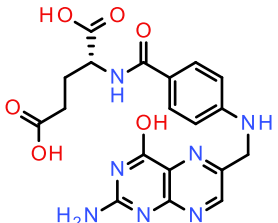
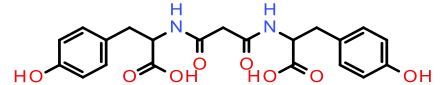
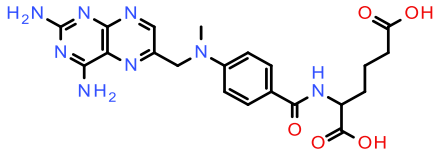
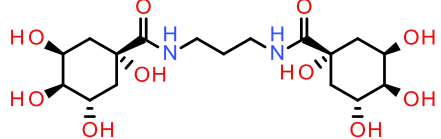
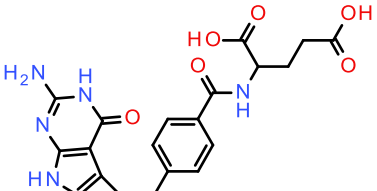
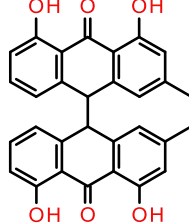
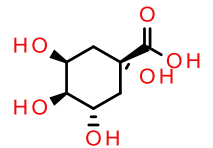
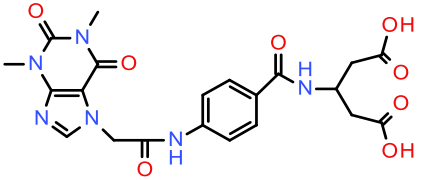
Tablo 1.. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar (Devamı)

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L11	 <p>2-(4-izotiyosyanatofenil)etil (2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoat</p>	L16	 <p>(2E)-2-[4-(3,4-dihidroksifenil)-3-hidroksi-5-oksofuran-2-iliden]-2-(4-hidroksifenil)asetik asit</p>
L12	 <p>(1E,6E)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion</p>	L17	 <p>3-(9-((1R,3aS,5aR,11aR)-5a,5b,8,8,11a-pentametil-9-okso-1-(prop-1-en-2-il)jikosahidro-1H-siklopenta[a]krisen-3a-karboksamido)-3-fenil propanoik asit</p>
L13	 <p>3-[[4-[bis(4-hidroksi-2-oksokromen-3-il)metil]fenil]-(4-hidroksi-2-oksokromen-3-il)metil]-4-hidroksikromen-2-on</p>	L18	 <p>4-(3-benzilfenil)-2,4-dioksobütanoik asit</p>
L14	 <p>5,6,8-trihidroksi-2,3-dimetil-9-(5,6,8-trihidroksi-2,3-dimetil-4-okso-2,3-dihidrobenzo[g]kromen-9-il)benzo[g]kromen-4-on</p>	L19	 <p>(3-benzil-5-((1,1-dioksidoizotiazolidin-2-il)metil)fenil)(8-hidroksi-1,6-naftiridin-7-il)metanon</p>
L15	 <p>(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilik asit</p>	L20	 <p>(2Z,2'Z)-4,4'-((2-(2-florofenil)propan-1,3-diil)bis(3,1-fenilen))bis(2-hidroksi-4-oksobüt-2-enoikasit)</p>

Tablo 1. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar (Devamı)

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L21	 <p>2-((3,4-dihidroksifenil)amino)-2-oksoetil-8-hidroksikinolin-7-karboksilik asit</p>	L26	 <p>6-(3,4-diklorofenil)-2,4-dioksoheksanoik asit</p>
L22	 <p>2-((3E,5E)-4-okso-3,5-bis(3,4,5-trihidroksibenziliden)sikloheksil)asetik asit</p>	L27	 <p>(2Z,2'Z)-4,4'-(1-(4-florobenzil)-4-okso-1,2,3,4-tetrahidrokinolin-3,6-diil)bis(2-hidroksi-4-oksobut-2-enoik asit)</p>
L23	 <p>4-(4-klorobenzoil)-3-hidroksi-5-fenilfuran-2(5H)-on</p>	L28	 <p>(Z)-3-[5-[(4-florofenil)metil]-2-piridil]-2-hidroksi-prop-2-enoik acid</p>
L24	 <p>3,4,7,9-tetrahidroksi-2-metoksi-6-metil-fenalen-1-on</p>	L29	 <p>5-(2,6-diokso-1,3-diazinan-4-il)-N-[(4-florofenil)metil]-8-hidroksi-1,6-naftiridin-7-karboksamid</p>
L25	 <p>6-(2-klorofenil)-2,4,6-trioksoheksanoik asit</p>	L30	 <p>3-floro-7-(4-florobenzil)-9-hidroksi-5-metoksi-6H-pirrolo[3,4-g]kinolin-8(7H)-on</p>

Tablo 1. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar (Devamı)

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L31	 <p>(E)-3-(2-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenilprop-2-en-1-on</p>	LGA	 <p>(3,4-dihidroksifenil)-2-[[3-[[1-(3,4-dihidroksifenil)metil]-2-hidroksi-2-okso-etil]amino]-3-okso-propanoil]amino]propanoik asit</p>
L32	 <p>2-[[4-[(2-amino-4-okso-1H-pteridin-6-il)metilamino]benzoil]amino]pentandioik asit</p>	LGB	 <p>2-[[3-[[2-hidroksi-1-[(4-hidroksifenil)metil]-2-okso-etil]amino]-3-okso-propanoil]amino]-3-(4-hidroksifenil)propanoik asit</p>
L33	 <p>2-[[4-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil-metil-amino]benzoil]amino]heksandioik asit</p>	LGC	 <p>(3S,5S)-1,3,4,5-tetrahidroksi-N-[3-[[3-(3R,5R)-1,3,4,5-tetrahidroksisikloheksankarbonil]amino]propil]sikloheksankarboksamid</p>
L34	 <p>2-[[4-[[2-(2-amino-4-okso-3,7-dihidropirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)etil]benzoil]amino]pentandioik asit</p>	LGD	 <p>10-(4,5-dihidroksi-2-metil-10-okso-9H-antrasen-9-il)-1,8-dihidroksi-3-metil-10H-antrasen-9-on</p>
L35	 <p>(3S,5S)-1,3,4,5-tetrahidroksisikloheksan-1-karboksilik asit</p>	LGE	 <p>3-[[4-[[2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)asetil]amino]benzoil]amino]pentandioik asit</p>

2. Materyal

Bu çalışmada yapıların üç boyutlu gösteriminde Chimera [44], DS Visualizer [45] ve MGL Tools [46] programları kullanıldı. Ligandların 2 boyutlu yapıları Symyx [45] programı ile çizilip DSVisualizer programı ile üç boyutlu olarak kaydedildiler. Ligandların optimizasyonunda Gasussian03 [47] ile AMBER [48] paket programı içinde yer alan Sander programları kullanıldı. Protein modelinin hazırlanması, moleküler dinamik çalışmaları ve analizleri için AMBER11 paket programı kullanıldı. Ligandlar için General Amber Force Field (GAFF) atom tipinin belirlenmesi, bunlar için yük ve parametre hesaplanmasında AMBER içindeki Antechamber programından faydalandı. Atom yükleri AM1-BCC [49] metoduyla hesaplandı. Moleküler dinamik hesaplamalar için gerekli olan parametre ve topoloji dosyaların hazırlanmasında, sisteme çözücü ve iyon eklenmesinde AMBER paketi içindeki Xleap programı kullanıldı. Zamana bağlı enerji değişimleri Perl ile yazılmış ve AMBER programı içinde yer alan process_mdout.perl scripti ile yapıldı. Zamana bağlı RMSD ve bağ uzunlukları değişimi AMBER'in içinde bulunan PTRAJ programı kullanılarak yapıldı. Zamana bağlı enerji ve RMSD değişimleri Xmgrace grafik programı [50] ile gerçekleştirildi. Ligand yerleştirme çalışmaları AutoDock Vina 1.2 programı ile gerçekleştirildi. Moleküler Dinamik çalışmalarının bir bölümü Intel tabanlı i7 işlemciye sahip, Linux işletim sistemli bilgisayarlarda yürütüldü.

3. Metot

Çalışmada kullanılacak 45-223 arasındaki kalıntıları içeren HIV-1 integras katalitik öz bölgesi modelinin hazırlanması için 45-49 arasındaki kalıntılar 1WJA ve 1K6Y yapılarından ve 213-223 arası kalıntılar ise 1EX4 yapısından alınarak katalitik öz bölgesi yapısı içeren 1BL3.pdb'ye eklendi. Katalitik bölge kalıntıları olan 50-212 dışındaki kalıntılar (45-49 ve 213-223) proteinin serbest uçlarının katalitik bölgenin yapısını fazla değiştirmemesi için yapıya eklendi.

Protein yapısının ligand yerleştirme işlemine hazırlanması için bir moleküler dinamik simülasyonuna tabi tutuldu. Hazırlanan model önce 4000 adımda minimize edildi. Her biri

100 000 adımdan oluşan 4 ayrı basamakta protein 0 K'den 400 K'e ısıtıldı ve 10 ns boyunca moleküler dinamik işlemleri uygulandı.

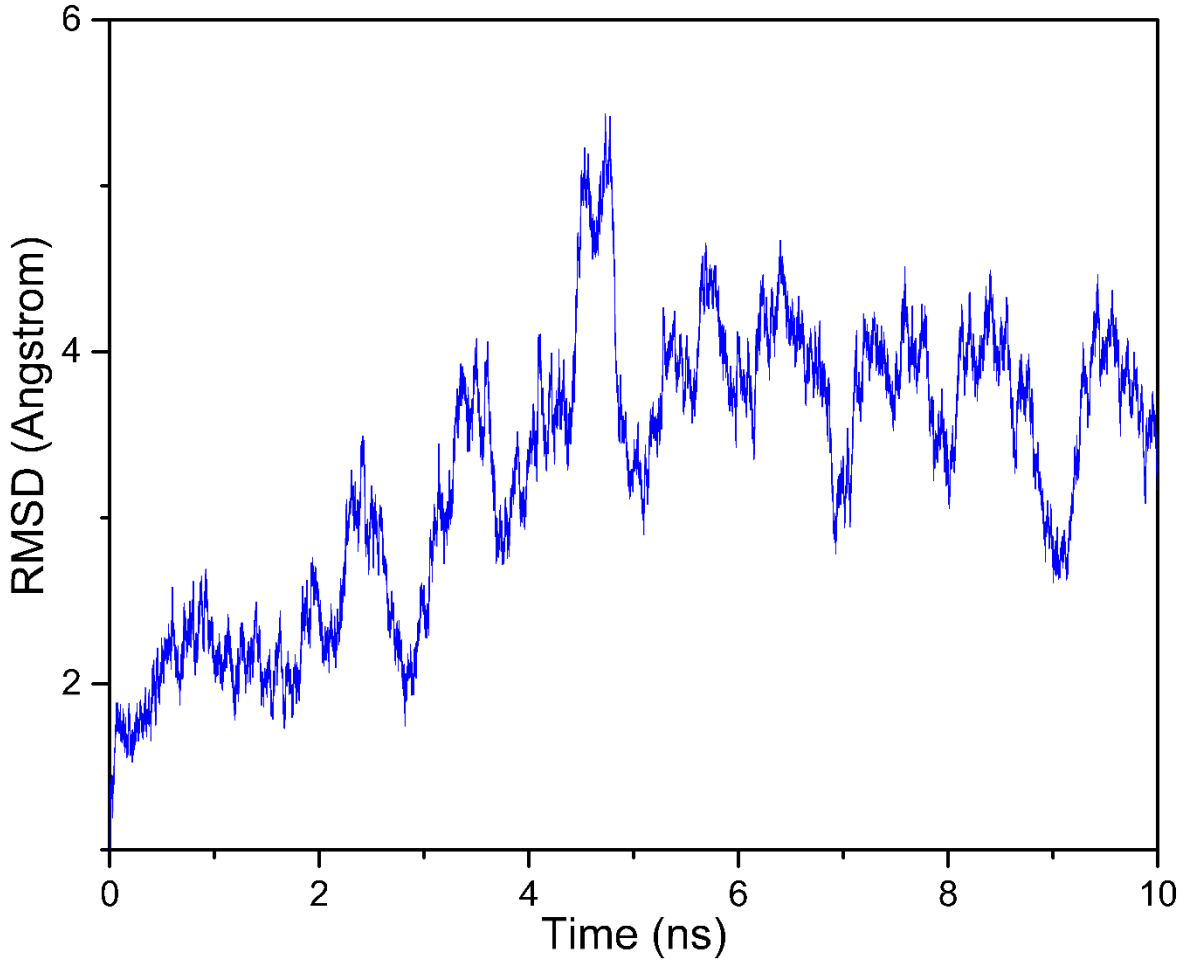
Moleküler dinamik çalışmaları sabit basınç altında yapıldı. SHAKE [51] algoritması uygulanarak hidrojen titreşimleri engellendi. Uzak etkileşimlerin hesaplama zamanını arttırmaması için *cut off* mesafesi 10 Å olarak alındı. Basınç değeri 1 atm olarak sabitlendi ve her 2 ps aralığında basıncın gevşemesi sağlandı. Sıcaklık değerlerinin düzenlenmesi için Langevin termostatu seçilerek her 250 adımda koordinat ve enerji değerleri kaydedildi. Moleküler dinamik çalışmaları 10 ns süreyle yürütüldü.

Ligandlar incelendiğinde çoğu yapıda karboksilik asit, bazılarında ise diketo gruplarının bulunduğu görülmektedir. Fizyolojik şartlar göz önüne alınarak karboksilik grubu içeren yapılar için karboksilat formları seçildi.

Bütün ligandlar önce Gaussian03 programı ile AM1 düzeyinde minimize edildikten sonra Antechamber ile yük ve parametre dosyaları hazırlandı. Her ligandın Xleap programında topoloji ve koordinat dosyaları ile birlikte kütüphane dosyaları oluşturularak yapılar pdb formatında kaydedildi. MGL Tools programı ile ligandlar ve protein dosyaları hazırlandı. Proteinin yerleştirme işlemine hazırlanması için yapıdaki tüm sular silindir. Aminoasit atom yükleri program tarafından yüklendi. Ligandlara ise Gasteiger yükleri ilave edilerek dönebilen ve hareketsiz kalan atomlar belirlenip dosyalar kaydedildi. Vina proteinin grid hesaplamalarını otomatik yapar ve bilgisayara her hangi bir çıktı dosyası kaydetmez. Vina programı ile her bir ligand için 20 tane yerleştirme sonucu alındı.

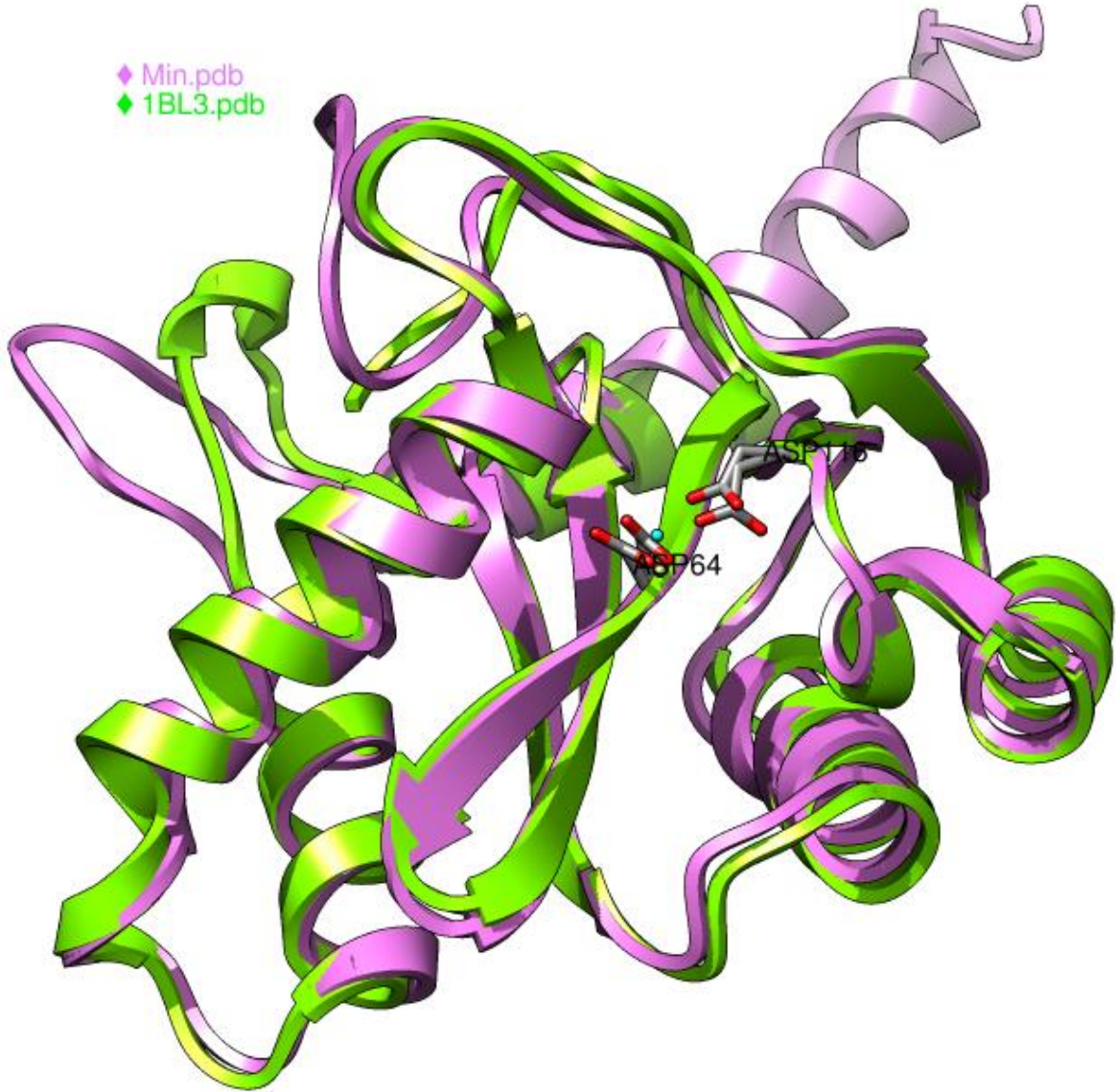
4. Bulgular Ve Tartışma

Bir moleküler dinamik simülasyonun başarılı olup olmadığını gösteren önemli araçlardan biri zamana bağlı olarak değişen protein atom koordinatlarının MD başlangıç koordinatlarına karşı kök ortalamalarının kare sapmaları (RMSD) grafiğidir. Grafikteki değişimin küçük olması yapının da kararlı bir hale geldiğini gösterir.

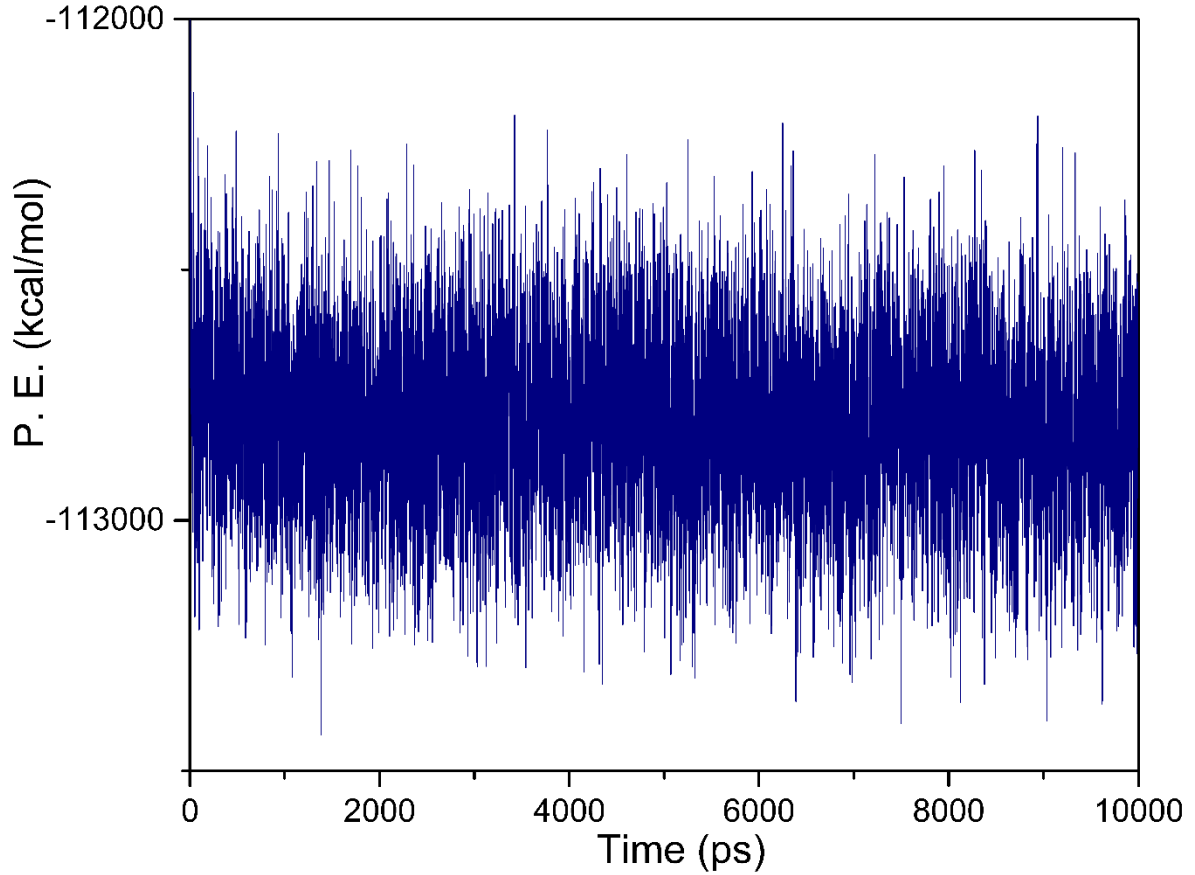


Şekil 2. Katalitik öz bölgesinin moleküler dinamik sonucu elde edilen RMSD grafiği

Şekil 2.'de gösterilen modelin RMSD grafiğinde çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir. Yapıdaki hareketli kısa ilmeklerden dolayı bazı zaman aralıklarında grafikte yükselme ve alçalma gözlenirken genel olarak belirli bir aralıkta bu değişimler olmaktadır. Bu moleküler dinamik simülasyonu analizlerinden elde edilen en düşük enerjili yapılardan biri olan Min.pdb yapısı ile proteinin kristal yapılarının üst üste karşılaştırıldığı Şekil 3'ten de anlaşılmaktadır. Görüldüğü gibi yapının hareketli olan ilmekleri dışında kalan protein yapısı oldukça stabil kalmıştır. Zamana karşı çizilen potansiyel enerji grafiği de enerjinin belirli bir aralıkta kaldığını göstermektedir (Şekil 4).

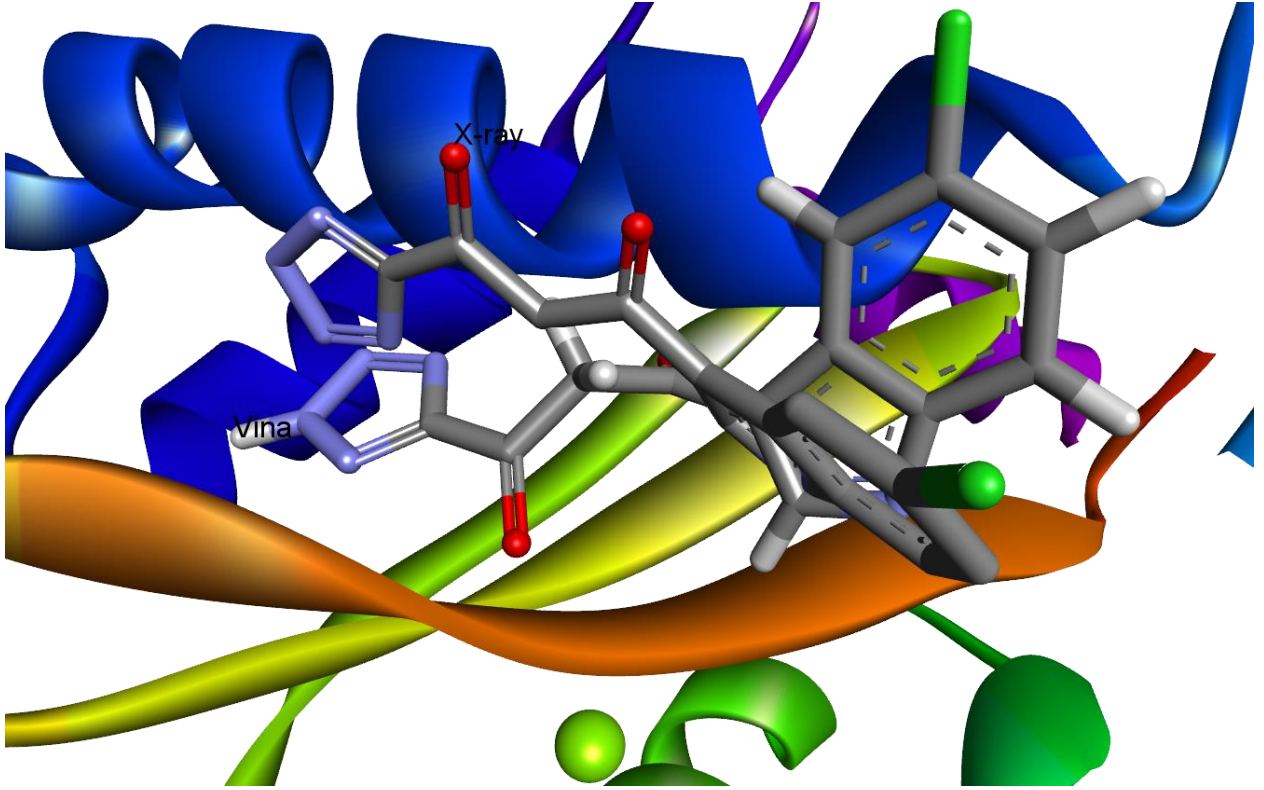


Şekil 3. Protein modelinin moleküler dinamik simülasyonundan elde edilen düşük enerjili bir yapısı (Min.pdb) ile katalitik öz bölgesi kristal yapısının (1BL3.pdb) üst üste çakıştırılması



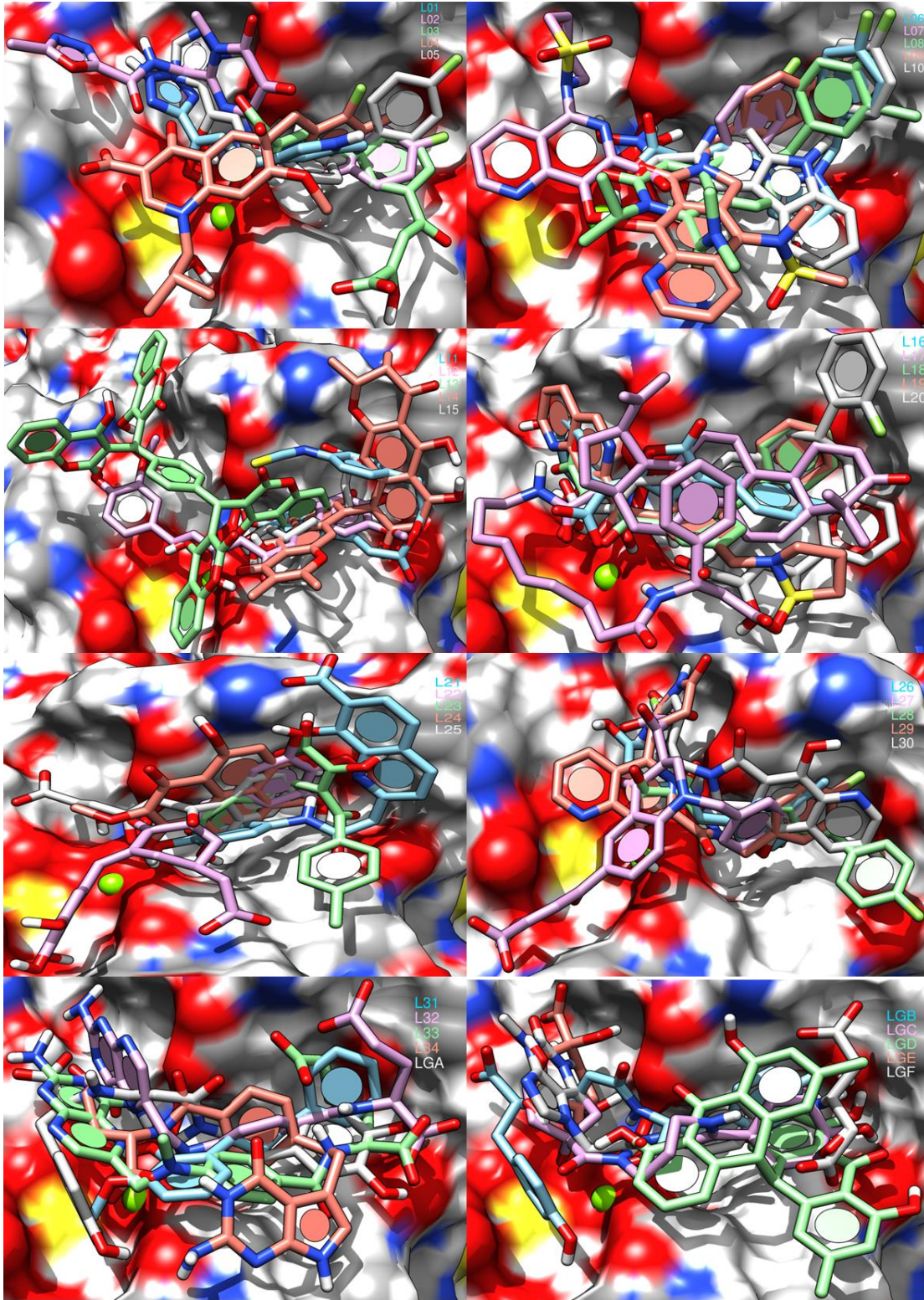
Şekil 4. Moleküler dinamik simülasyonu süresince sistemin potansiyel enerji grafiği

İntegraz enzimi ile ilgili ilk yıllara ait kristal yapı çalışmalarında sadece 1QS4.pdb yapısında bir liganda (5CITEP) rastlanmıştır. Dolayısı ile kristal yapıda bulunan bu ligand ile birlikte anti-HIV ilaç tasarımında integras önemli ilgi görmeye başlamıştır. Çalışmanın güvenilirliği bakımından 5 CITEP ligandı 1QS4 yapısına Vina ile yerleştirilerek programın doğru bir yerleştirme yapıp yapamadığını test etme imkanı bulmaktayız. Yapılan yerleştirme çalışması sonucu her ne kadar atomlar farklı yönlenim içerisinde olsa da Vina'nın ligandı X-ray yapısı ile aynı doğrultuda yerleştiği gözlenmektedir (Şekil 5.).



Şekil 5. Vina ile yerleştirilen 5CITEP ligandının yerleştirilme ve proteinin krsital yapısındaki konumu

Toplam 40 ligand Autodock Vina programı HIV-1 integraza başarılı bir şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 6.). Ligandların yerleştirilme skorları Tablo 2.'de verilmiştir. Hesaplanan yerleştirme skorları aynı zamanda Vina programının o ligand için hesapladığı bağlanma enerjisini ifade etmektedir. Buna göre ligandlar arasında en iyi bağlanan -8 kcal/mol ile L19 ligandı ilk sırayı yer almaktadır.



Şekil 6. HIV-1 katalitik öz bölgesine yerleştirilen ligandların yerleşme bölgeleri ve konumları

Tablo 2. Ligandların katalitik öz bölgesine Autodock Vina programı ile yerleştirilme skorları

Ligandlar	Vina Skorları	Ligandlar	Vina Skorları	Ligandlar	Vina Skorları	Ligandlar	Vina Skorları
L01	-5.8	L11	-5.4	L21	-6.4	L31	-5.3, 2
L02	-7.2	L12	-6.2	L22	-6.8	L32	-6.6
L03	-5.5	L13	-7.7	L23	-6.1	L33	-6.2
L04	-6.4	L14	-7.6	L24	-5.5	L34	-5.9
L05	-6.5	L15	-4.9	L25	-5.8	L35	-4.6
L06	-5.6	L16	-6.4	L26	-5.7	LGA	-6.8
L07	-7.2	L17	-5.5	L27	-6.6	LGB	-6.2
L08	-6.3	L18	-6.2	L28	-5.7	LGC	-6.0
L09	-6.4	L19	-8.0	L29	-7.5	LGD	-7.4
L10	-6.6	L20	-6.8	L30	-6.3	LGE	-6.6

5CITEP ligandı kristal yapıda proteinle Asp116, Gln148, Ile151, Glu152, Asn155 ve Lys159 ile van der Waals etkileşimi, THR66 ile hidrojen bağı ve LYS156 ile pi-kasyon etkileşimi yapmaktadır. X-ray yapısında 5CITEP yapısının Mg²⁺ iyonu ile etkileşmediği görülmektedir. Aynı durum Godwin ve arkadaşları [52] tarafından yapılan moleküler dinamik simülasyonunda da gözlenmiştir.

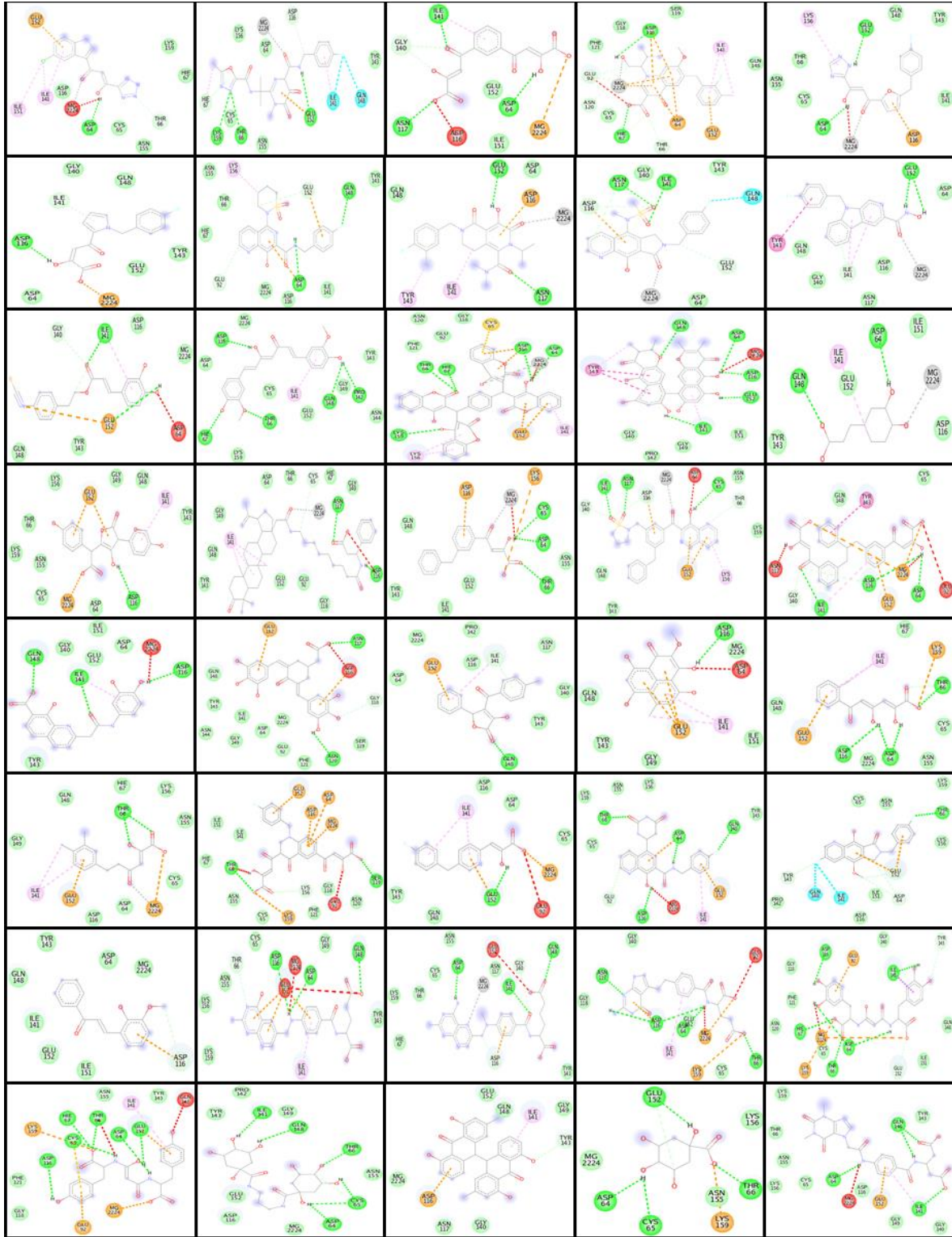
Son yıllarda HIV-1 PFV intasome enziminin ligand içeren kristal yapılarının elde edilmesi, HIV-1 integras-vDNA-ligand etkileşimleri hakkında oldukça aydınlatıcı bilgiler sunmuştur [53]. Bu kristal yapılarda Raltegravir ve Elvitegravir'in Tyr143, Gln146 ve Pro145 ile etkileştikleri gözlenmektedir. Çalışmamızda yapılan analizlere göre Raltegravir Thr66, Glu152 ve Lys159 ile hidrojen bağları oluştururken, Ile141 ile pi-alkil ve Hie67 kalıntısı ile hem pi-pi hem de pi-alkil etkileşiminde bulunmaktadır. Ligand Asp64, Cys65, Asp116, Asn155 ve Lys156 kalıntıları ile vdW etkileşimi yapmaktadır. Elvitegravir Hie67 ve Asp116 ile hidrojen bağları yapmakta, Cys65, Gly118, Ser119, Phe121 ve Gln148 ile vdW etkileşimleri içinde bulunmaktadır. Dikkat edildiğinde bu sonuçlar kristal yapıdaki etkileşimler ile uyuşmamaktadır ancak kristal yapının viral DNA içerdiği ve bunun da ligandın proteine yerleşmesinde ve etkileşimlerinde önemli değişiklikler meydana getireceğini vurgulamak gerekir. Yapının DNA ile etkileşmesi ile oyuk boyutu değişecektir ve DNA'nın ligandın bazı protein kalıntılarına ulaşmasını engelleyecek olması yerleştirmeyi farklılaştıracaktır.

En iyi yerleştirme skoru veren L19 ligandı; Cys65, Asn117 ve Ile141 ile hidrojen bağları oluşturmakta, Asp116, Gly140, Tyr143, Gln148 Asn155 ve Lys159 kalıntıları ile vdW etkileşimi yapmaktadır. Lys156 kalıntısı ligandın naftiridin halkası ile pi-alkil etkileşiminde bulunmaktadır.

Bütün yerleştirme skorlarının büyüklükleri ortalama olarak -6.305'tir. İlk defa HIV-1 integras inhibitörü olarak kullanılan ligandlardan L33, L34 ve L35 ortalamanın altında skor verirken L32 bu ortalamayı geçmektedir. Yeni tasarlanan ligandlardan LGB ve LGC ortalamanın altında kalırken LGA, LGD ve LGE ortalamanın üzerinde yer almış ve LGD en iyi skoru veren 5. ligand olmuştur. Yeni tasarlanan ligandların etkileşimleri Tablo 3'te verilmiştir.

	H Bağı	Van der Waals	n-alkil	n--sigma
LGA	Thr66, Asp64, Ile141, Hie67, Asp116	Gly118, Phe121, Asn120, Cys65, Gly40, Gln148, Ile151		Ile141
LGB	Asp64, Cys65, Thr66, Hie67, Asp116, Glu152	Gly118, Phe121, Tyr143, Asn155	Ile141	
LGC	Asp64, Cys65, Thr66, Ile141, Gln148	Asp116, Pro142, Tyr143, Gly149, Glu152, Asn155		
LGD		Asn117, Gly140, Gln148, Gly149, Glu152		
LGE	Asp64, Cys65, Thr66, Glu152	Asn155, LYS156		
LGF	Asp64, Ile141, Gln148	Cys65, ThR66, AsP116, Gly140, Tyr143, Gly149, Asn155, Lys156, Lys159		

Ligand yerleştirilme skorları ve etkileşimler dikkate alındığında Vina'nın etkileşimden ziyade ligandın aktif bölgedeki yerleşimini öncelik alarak yerleştirme işlemini yaptığını söyleyebiliriz. Bütün ligand-protein etkileşimlerini tek tek vermek uzun ve kafa karıştırıcı olacağından bütün ligand protein etkileşimleri Şekil 7.'de sunulmuştur.



Etkileşimler
van der Waals
İstenen yük, Pi-Donör H bağı, Pi anyon
Hidrojen bağı
Pi-sülfür
Pi-pi, pi-pi T şekilli etkileşim, Pi-sigma
Pi-alkil
İstenmeyen donör-donör, akseptör-akseptör ve negatif-negatif, metal-donör
Metal-akseptör
Halojen
Karbon hidrojen bağı

Şekil 7. Ligandların, yerleştirilme sonucu katalitik öz bölgesi kalıntıları ile oluşturdukları etkileşimler

5. Sonuç

Özellikle virüslerin ilaçlara karşı sürekli direnç geliştirmesi ve meydana gelen mutasyonlar yeni nesil ilaçların bulunması ve var olan ilaçların iyileştirilmesi elzemdir. Bu çalışmada daha önce çalışılan ligandlardan (2'si onaylanmış HIV-1 integras ilacı) 32 tane, inhibitör olarak HIV-1 integraza karşı ilk kez denenilen 4 ligand ve yeni tasarlanan 6 ligand Vina programı ile başarılı bir şekilde enzime yerleştirilmiştir. Bunun sonucunda L19 ligandının en iyi skoru elde ettiği belirlenmektedir. İlk kez kullanılan ligandların ve yeni tasarlanan ligandların genel olarak daha önce çalışılan ligandlarla karşılaştırıldığında sonuçlarının ümit verici olduğu görülmektedir. Daha doğru bir değerlendirme için reseptör-ligand komplekslerinin moleküler dinamik simülasyonu ile ligandların serbest bağlanma enerjilerinin hesaplanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Marchand, C. Johnson, A. A. Semenova, E. Pommier, Y. 2006. Mechanisms and inhibition of HIV Integration, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, Vol. 3, No. 2 253-260.
- [2] Delelis, O. Carayon, K. Saib, A. Deprez, E. and Mouscadet, J-F. 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase, *Retrovirology*, 5: 114
- [3] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), 2010. GLOBAL REPORT UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC, Geneva, Switzerland. 20/12/2012.
- [4] Charpentier, C. Karmochkine, M. Laureillard, D. Tisserand, P. Bélec, L. Weiss, L. Si-Mohamed, A. Piketty, C. 2008. Drug resistance profiles for the HIV integrase gene in patients failing raltegravir salvage therapy, *HIV Medicine*, 9: 765-770.
- [5] Cooper, D. A. Steigbigel, R. T. Gatell, J. M. Rockstroh, J. K. Katlama, C. Yeni, P. Lazzarin, A. Clotet, B. Kumar, P. N. Eron, J. E. Schechter, M. Markowitz, M. Loutfy, M. R. Lennox, J. L. Zhao, J. Chen, J. Ryan, D. M. Rhodes, R. R. Killar, J. A. Gilde, L. R. Strohmaier, K. M. Meibohm, A. R. Miller, M. D. Hazuda, D. J. Nessel, M. L. DiNubile, M. J. Isaacs, R. D. Tepler, H. Nguyen, B. and the BENCHMRK Study Teams. 2008. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection, *The New England Journal of Medicine*, 359:355-365.
- [6] Hindmarsh, P. Leis, J. 1999. Retroviral DNA Integration, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 63, No.4, p.836-843.
- [7] Westby, M. Nakayama, G. R. Butler, S. L. Blair, W. S. 2005. Cell-based and biochemical screening approaches for the discovery of novel HIV-1 inhibitors, *Antiviral Research*, 67 121-140.

- [8] Karki, R. G. Tang, Y. Burke, T. R. Jr. And Nicklaus M. C. 2004. Model of full-length HIV-1 integrase complexed with viral DNA as template for anti-HIV drug design, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 18: 739–760.
- [9] Bera, S. Pandey, K. K. Vora, A. C. and Grandgenett, D. P. Molecular Interactions between HIV-1 Integrase and the Two Viral DNA Ends within the Synaptic Complex that Mediates Concerted Integration. 2009. *Journal of Molecular Biology*, 389, 183–198.
- [10] Nunthaboot, N. Pianwanit, S. Parasuk, V. Ebalunode, J. O. Briggs, J. M. and Kokpol, S. 2007. Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Molecular Dynamics Simulations of HIV-1 Integrase/Inhibitor Complexes, *Biophysical Journal*, 93, 3613-3626.
- [11] Chen, J. Neamati, N. MacKerell, Jr. A. D. 2002. Structure-Based Inhibitor Design Targeting HIV-1 Integrase, *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2, 217-234.
- [12] King, P. J. 2000. Analyses of an L-Chicoric Acid-Resistant Variant of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase, *Phd Thesis*, University of California, Irvine.
- [13] Craigie R. 2011. Integrase Mechanism And Function, in HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design (ed N. Neamati), *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/9781118015377.ch3 p.23-33.
- [14] Wang, J. Y. Ling, H. Yang, W. Craigie, R. 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: Implications for domain organization in the intact protein. *European Molecular Biology Organization Journal*, 20, 7333-7343.
- [15] Chen, J. C. Krucinski, J. Miercke, L. J. Finer-Moore, J. S. Tang, A. H. Leavitt, A. D. Stroud, R. M. 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: A model for viral DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, USA, 97, 8233-8238.
- [16] Berman, H. M. Westbrook, J. Feng, Z. Gilliland, G. Bhat, T. N. Weissig, H. Shindyalov, I. N. Bourne, P. E. 2000, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242.
- [17] Parrill A. L. 2003. HIV-1 Integrase Inhibition: Binding Sites, Structure Activity Relationships and Future Perspectives, *Current Medicinal Chemistry*, 10, 1811-1824,
- [18] Maignan, S. Guilloteau, J.P. Zhou-Liu, Q. Clement-Mella, C. Mikol, V. 1998. Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases. *Journal of Molecular Biology*, 282: 359-368.
- [19] Cai, M. Zheng, R. Caffrey, M. Craigie, R. Clore, G. M. and Gronenborn, A. M. 1997. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase, *Nature Structural Biology*, Vol:4, Number: 7 pp:567-577.
- [20] Tang, Y. Zhu, W. Chen, K. Jiang, H. 2006. New Technologies in Computer-Aided Drug Design: Toward Target Identification and New Chemical Entity Discovery, *Drug Discovery Today: Technologies, Medicinal Chemistry*, Vol. 3, No. 3.
- [21] Kuntz, I. D. Blaney, J. M. Oatley, S. J. Lange, R. Ferrin, T. E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, 161, 269-288.
- [22] Onodera, K. Satou, K. and Hirota, H. 2007. Evaluations of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47, 1609-1618.
- [23] Trott, O. Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461.

- [24] Makhija, T. M. & Kulkarni, V. M. 2002. 3D-QSAR and molecular modeling of HIV-1 integrase inhibitors, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16: 181–200.
- [25] Dayam, R. and Neamati, N. 2004. Active site binding modes of the β -diketoacids: a multi-active site approach in HIV-1 integrase inhibitor design, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 6371–6381.
- [26] Mustata, G. I. Brigo, A. and Briggs, J. M. 2004. HIV-1 integrase pharmacophore model derived from diverse classes of inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 1447–1454.
- [27] Yuan, H. Parrill, A. 2005. Cluster analysis and three-dimensional QSAR studies of HIV-1 integrase inhibitors, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23, 317–328.
- [28] Dayam, R. Deng, J. Neamati, N. 2006. HIV-1 Integrase Inhibitors: 2003-2004 Update, *Medicinal Research Reviews*, Vol. 26, No. 3, 271-309.
- [29] Kawasuji, T. Fuji, M. Yoshinaga, T. Sato, A. Fujiwara, T. and Kiyama, R. 2006. A platform for designing HIV integrase inhibitors. Part 2: A two-metal binding model as a potential mechanism of HIV integrase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8420–8429.
- [30] Alves, C. N. Marti, S. Castillo, R. Andres, J. Moliner, V. Tunon, I. And Silla, E. 2007a. Calculation of binding energy using BLYP/MM for the HIV-1 integrase complexed with the S-1360 and two analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 3818–3824.
- [31] Alves, C. N. Marti, S. Castillo, R. Andres, J. Moliner, V. Tunon, I. and Silla, E. 2007b. A Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Study of the Protein–Ligand Interaction for Inhibitors of HIV-1 Integrase, *Chemistry: A European Journal*, 13, 7715–7724.
- [32] Dubey, S. Satyanarayana, Y. D. Lavania, H. 2007. Development of integrase inhibitors for treatment of AIDS: An overview, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 1159-1168.
- [33] Fossey, C. Huynh, N-T. Vu, A-H. Vidu, A. Zarafu, I. Laduree, D. Schmidt, S. Laumond, G. & Aubertin, A-M. 2007. Synthesis and anti-HIV evaluation of hybrid-type prodrugs conjugating HIV integrase inhibitors with d4t by self-cleavable spacers containing an amino acid residue, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(5): 608–619.
- [34] Loizidou, E. Z. Zeinalpour-Yazdi, C. D. Christofides, T. Kostrikis, L. G. 2009. Analysis of binding parameters of HIV-1 integrase inhibitors: Correlates of drug inhibition and resistance, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4806–4818.
- [35] Nair, V. Uchil, V. Chi, G. Dams, I. Cox, A. 2007. Biologically-Validated HIV Integrase Inhibitors with Nucleobase Scaffolds: Structure, Synthesis, Chemical Biology, Molecular Modeling, and Antiviral Activity, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 26:665–668.
- [36] Dayam, R. Gundla, R. Al-Mawsawi, L. Q. Neamati, N. 2008. HIV-1 Integrase Inhibitors: 2005-2006 Update, *Medicinal Research Reviews*, Vol. 28, No. 1, 118-154.
- [37] De Luca, L. Barreca, M. L. Ferro, S. Iraci, N. Michiels, M. Christ, F. Debyser, Z. Witvrouw, M. and Chimirri, A. 2008. A refined pharmacophore model for HIV-1 integrase inhibitors: Optimization of potency in the 1H-benzylindole series, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 2891–2895.
- [38] Pace, P. Spieser, S. A. H. Summa, V. 2008. 4-Hydroxy-5-pyrrolinone-3-carboxamide HIV-1 integrase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 3865–3869.
- [39] Donghi, M. Kinzel, O. D. Summa, V. 2009. 3-Hydroxy-4-oxo-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-2-carboxylates—A new class of HIV-1 integrase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 1930–1934.
- [40] Healy, E. F. Sander, J. King, P. J. Robinson Jr, W. E. 2009. A docking study of L-chicoric acid with HIV-1 integrase, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27, 584-589.

- [41] Liu, M. Cong, X. J. Li, P. Tan, J. J. Chen, W. Z. Wang, C. X. 2009. Study on the Inhibitory Mechanism and Binding Mode of the Hydroxycoumarin Compound NSC158393 to HIV-1 Integrase by Molecular Modeling, *Biopolymers*, Volume: 91, Number: 9, 700-709.
- [42] Sechi, M. Carta, F. Sannia, L. Dallochio, R. Dessi, A. Al-Safi, R. I. Neamati, N. 2009. Design, synthesis, molecular modeling, and anti-HIV-1 integrase activity of a series of photoactivatable diketo acid-containing inhibitors as affinity probes, *Antiviral Research*, 81, 267–276.
- [43] McColl, D. Chen, D. J. 2010. Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: Bringing IN a new era of antiretroviral therapy, *Antiviral Research* 85, 101–118.
- [44] Pettersen, E. F. Goddard, T. D. Huang, C. C. Couch, UCSF G. S. Greenblatt, D. M. Meng, E. C. Ferrin, T. E. 2004. Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *Journal of Computational Chemistry*, (13):1605-12.
- [45] Accelrys Software Inc. 2011 Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.1, San Diego: Accelrys Software Inc.
- [46] Morris, G. M. Huey, R. Lindstrom, W. Sanner, M. F. Belew, R. K. Goodsell, D. S. Olson, A. J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility, *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 30, No. 16, 2785–2791.
- [47] Frisch, M. J. Trucks, G. W. Schlegel, H. B. Scuseria, G. E. Robb, M. A. Cheeseman, J. R. Montgomery, Jr. J. A. Vreven, T. Kudin, K. N. Burant, J. C. Millam, J. M. Iyengar, S. S. Tomasi, J. Barone, V. Mennucci, B. Cossi, M. Scalmani, G. Rega, N. Petersson, G. A. Nakatsuji, H. Hada, M. Ehara, M. Toyota, K. Fukuda, R. Hasegawa, J. Ishida, M. Nakajima, T. Honda, Y. Kitao, O. Nakai, H. Klene, M. Li, X. Knox, J. E. Hratchian, H. P. Cross, J. B. Bakken, V. Adamo, C. Jaramillo, J. Gomperts, R. Stratmann, R. E. Yazyev, O. Austin, A. J. Cammi, R. Pomelli, C. Ochterski, J. W. Ayala, P. Y. Morokuma, K. Voth, G. A. Salvador, P. Dannenberg, J. J. Zakrzewski, V. G. Dapprich, S. Daniels, A. D. Strain, M. C. Farkas, O. Malick, D. K. Rabuck, A. D. Raghavachari, K. Foresman, J. B. Ortiz, J. V. Cui, Q. Baboul, A. G. Clifford, S. Cioslowski, J. Stefanov, B. B. Liu, G. Liashenko, A. Piskorz, P. Komaromi, I. Martin, R. L. Fox, D. J. Keith, T. Al-Laham, M. A. Peng, C. Y. Nanayakkara, A. Challacombe, M. Gill, P. M. W. Johnson, B. Chen, W. Wong, M. W. Gonzalez, C. and Pople, J. A. 2004. Gaussian 03, Revision C.02, *Gaussian, Inc.* Wallingford CT.
- [48] Case, D.A. Darden, T. A. Cheatham III, T.E. Simmerling, C. L. Wang, J. Duke, R. E. Luo, R. Walker, R. C. Zhang, W. Merz, K. M. Roberts, B P. Wang, B. Hayik, S. Roitberg, A. Seabra, G. Kolossváry, I. Wong, K. F. Paesani, F. Vanicek, J. Liu, J. Wu, X. Brozell, S. R. Steinbrecher, T. Gohlke, H. Cai, Q. Ye, X. Wang, J. Hsieh, M.-J. Cui, G. Roe, D. R. Mathews, D. H. Seetin, M. G. Sagui, C. Babin, V. Luchko, T. Gusarov, S. Kovalenko, A. and Kollman, P.A. 2010. *AMBER 11*, University of California, San Francisco.
- [49] Wang, J. Wang, W. Kollman, P. A. and Case, D. A. 2006. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25, 247-260.
- [50] Grace, 2012. <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace.13/01/2012>.
- [51] Ryckaert, J. P. Cicotti, G. and Berendsen, H. J. C. 1977. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes, *Journal of Computational Physics*, 23, 327-341.
- [52] Godwin C. G. Pais, Xuechun Zhang, Christophe Marchand, Nouri Neamati, Kiriana Cowansage, Evguenia S. Svarovskaia, Vinay K. Pathak, Yun Tang, Marc Nicklaus, Yves Pommier, and Terrence R. Burke, Jr. 2002. Structure Activity of 3-Aryl-1,3-diketo-Containing Compounds as HIV-1 Integrase Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 3184-3194.
- [53] Hare, S., Gupta, S.S., Valkov, E., Engelman, A., Cherepanov, P. 2010 Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer, *Nature* 464: 232-236.