

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

***IDENTIFICAREA UNOR NOI INHIBITORI AI INTEGRAZEI
RETROVIRALE ȘI CARACTERIZAREA EFECTULUI ACESTORA
ASUPRA RECOMBINĂRII V(D)J
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DENISA MARGINĂ

Student-doctorand:

MUȘAT MIHAELA GEORGIANA

ANUL 2021

CUPRINS

INTRODUCERE. OBIECTIVELE LUCRĂRII	4
PARTEA GENERALĂ	
1. Noțiuni generale	6
1.1 Interacțiuni compușilor chimici cu ADN.....	6
1.2 Integraza retrovirală	6
1.3 Recombinaza RAG	7
1.4 Inhibitori de integrază care au potențial de interferență cu RAG1&2	9
CONTRIBUȚII PERSONALE	
2 Materiale și metode	10
2.1 Purificarea proteinelor	10
2.2 Studiile in silico de docare a compușilor	10
2.3 Evaluarea citotoxicității	10
2.4 Testul de infecție cu pseudoparticule virale VSVG-HIV-1	11
2.5 Obținerea mutațiilor integrazei HIV-1 folosiți testele de infecție cu pseudoparticule 11	
2.6 Evaluarea recombinării în limfocite preB v-Abl	12
2.7 Compușii chimici.....	12
2.8 Vizualizarea ADN și cuantificarea gelurilor de electroforeză.....	12
3 Metode de fluorescență folosite pentru investigarea interacțiunii compușilor cu ADN și proteine	13
3.1 Metodă bazată pe detecția de fluorescență aplicată pentru identificarea inhibitorilor de legare integrază-LTR	15
3.2 Metodă de fluorescență pentru identificarea inhibitorilor procesării 3'	16
4 Identificarea unor noi compuși chimici inhibitori ai integrazei HIV-1	18
4.1 Testarea unei colecții de compuși chimici pentru potențialul de inhibiție a integrazei HIV-1 18	
4.2 Efectul inhibitorilor integrazei în testele de infecție cu pseudoparticule virale.....	20
4.3 Investigarea mecanismului de acțiune al inhibitorilor integrazei HIV-1	21
5 Evaluarea potențialului de interferență a inhibitorilor integrazei HIV-1 cu recombinarea V(D)J	22
6 Analiza in silico a interacțiunii inhibitorilor sintetici ai integrazei HIV-1 cu recombinaza RAG1	24
7 Compuși naturali inhibitori ai integrazei HIV-1	25
7.1 Activitatea compușilor naturali identificați ca inhibitori ai integrazei HIV-1 în testul de infecție cu pseudoparticule virale	26

8	Analiza in silico a interacțiunii compușilor naturali în cadrul intazomului HIV-1	27
9	Potențialul de interferență asupra recombinării mediate de RAG1&RAG2 al compușilor naturali inhibitori ai integralei HIV-1	28
10	Analiza in silico a interacțiunii compușilor naturali inhibitori ai integralei HIV-1 cu recombinaza RAG1	30
11	Concluzii generale și caracterul original al cercetărilor.....	31
12	BIBLIOGRAFIE.....	34

INTRODUCERE. OBIECTIVELE LUCRĂRII

Virusul imunodeficienței umane 1 (HIV-1) este agentul etiologic al sindromului imunodeficienței umane (SIDA), o boală devastatoare care în cei aproape 40 de ani de la identificare a revendicat aproape 33 de milioane de vieți conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS). La sfârșitul lui 2019, OMS estimează un număr de 38 de milioane de oameni care trăiesc cu HIV-1 [1]. Cu toate că terapia antiretrovirală disponibilă poate reduce încărcătura virală în sângele pacienților până la un nivel nedecelabil, virusul persistă în țesuturi rezervor, având informația genetică integrată în genomul limfocitelor T CD4+ și macrofagelor cu viață lungă [2].

Integraza virusului HIV-1 este enzima responsabilă pentru inserarea materialului genetic viral în genomul celulei gazdă. Inhibiția integrazei retrovirale poate preveni răspândirea virusului precum și persistența în țesuturi, unde eficiența celorlalte medicamente este limitată. Inhibitorii integrazei HIV-1 utilizați în prezent în terapie sunt (în ordinea aprobării): raltegravir [3], elvitegravir [3], dolutegravir [4], bictegravir [5–7] și cabotegravir [8]. Toți acești compuși au în comun trei atomi donori de electroni (oxigen sau azot), doi dintre ei veciniali, iar al treilea aflat în poziție β (după modelul grupărilor β -dicetoacid), precum și un nucleu aromatic halogenat, toate acestea fiind elemente esențiale pentru activitate.

Lucrarea de față își propune trei obiective principale:

- Dezvoltarea unor noi metode de screening pentru investigarea interacțiunii dintre compuși chimici și ADN sau proteine și identificarea de noi molecule cu activitate biologică. Dintre acestea au fost analizate mai departe în detaliu clase chimice cu efect asupra integrazei HIV-1
- Testarea sistematică a unor seturi de compuși chimici și identificarea de noi potențiali inhibitori ai integrazei HIV-1 precum și a mecanismului lor de acțiune
- Studiarea efectului inhibitorilor integrazei HIV-1 asupra recombinazei RAG1 în teste enzimatică și în culturi celulare.

Noile metode propuse pentru investigarea interacțiunii cu ADN și/sau proteine sunt bazate pe detecția în fluorescență, ceea ce oferă avantajele unei sensibilități și unei specificități mai mari, comparativ cu alte protocoale experimentale.

Într-o primă metodă, legarea non-covalentă de ADN a fost estimată, prin măsurarea diminuării unui semnal fluorescent, proporțională cu concentrația de compus investigat. În acest scop au fost exploatare două mecanisme: competiția pentru legarea de ADN cu fluoroforul SybrGold și poziționarea compusului în apropierea unui fluorofor legat covalent de ADN.

Următoarele două metode evidențiază legarea compușilor chimici testați de proteine țintă, în speță integraza HIV-1. Astfel, a fost pusă în evidență pe de o parte legarea enzimei de substratul său specific și pe de altă parte activitatea catalitică a integrazei HIV-1 de procesare 3', folosind molecule de ADN marcate fluorescent, ce conțin secvența de recunoaștere LTR.

Procedeele dezvoltate au fost aplicate în teste de screening a mai mult de 800 de compuși de sinteză sau naturali purificați, aparținând unei varietăți de clase chimice. Au fost astfel identificați compuși inhibitori ai legării integrazei HIV-1 de ADN viral, ai procesării 3', precum și inhibitori ce funcționează în ambele etape. Potențialul citotoxic al compușilor identificați a fost studiat în culturi celulare de fibroblaste umane.

Studii *in silico* de docare pe structura intazomului HIV-1, publicată recent, au servit la formularea unor ipoteze asupra potențialului mecanism de acțiune, alături de date experimentale obținute folosind mutații ai integrazei.

Potențialul inhibitor al activității recombinazei RAG1 în complex cu RAG2 a fost studiat pentru toți compușii confirmați în testele enzimatică și celulare anterioare. Efectul acestora a fost demonstrat în reacția *in vitro* dată de enzimele purificate și confirmat de asemenea prin experimente pe culturi de limfocite murine preB.

Studii anterioare au demonstrat faptul că inhibitorii transferului catenar de tip β -dicetoacid pot inhiba activitatea diferitelor polinucleotidil transferaze ce au în comun domeniul RHază H, care conține triada catalitică de aminoacizi DDE(D). Inhibitorii de integrază care interferează cu activitatea RAG1 și metnazei (enzimă implicată în rezistența la chimioterapie) sugerează că este necesară supravegherea posibilelor efecte adverse la pacienții tratați, dar de asemenea deschide oportunitatea identificării unor noi căi terapeutice pentru cancere refractare. Mai mult decât atât, inhibiția integrazelor retrovirale înrudite cum ar fi cea a HTLV-1 și a altor nucleaze dependente de o împachetare de tip RNază H, cum este terminaza HMCV, poate extinde spectrul terapeutic al inhibitorilor de transfer catenar.

1. Noțiuni generale

1.1 Interacțiuni compușilor chimici cu ADN

Studierea și înțelegerea interacțiunilor dintre compuși chimici și macromolecule biologice (ADN și proteine) este importantă pentru chimia medicinală dar și pentru variate alte domenii științifice. Identificarea potențialelor ținte farmacologice precum și estimarea afinității compușilor chimici față de acestea, constituie primul pas în dezvoltarea de noi strategii terapeutice. Progresele recente în metodologiile de sinteză, purificare și confirmare a structurii au ajutat la creșterea considerabilă a numărului de compuși chimici disponibili pentru testarea interacțiunii cu sisteme biologice.

Compușii care interacționează necovalent cu ADN se ancorează de grupările fosfat și/sau de heterociclurile nucleotidelor prin legături de hidrogen, interacțiuni de tip π - π , electrostatice sau van der Waals. Aceste molecule se leagă reversibil și se inserează printre perechile de baze sau în curbura ADN. Agenții intercalatori își inserează o grupare plană aromatică între două nucleotide adiacente, ducând de multe ori la perturbări ale structurii tridimensionale și la modificarea proprietăților mecanice ale moleculelor de ADN (rigiditate, torsiune). O a doua categorie de compuși care leagă ADN sunt cei care au afinitate de legare în curbura mică a ADN, cum ar fi distamicina și netropsina [9] sau în curbura mare a ADN (*triplex-forming oligonucleotides* [10]). În consecință, este alterată formarea complexelor dintre proteine și ADN, necesară pentru buna funcționare a unor procese celulare critice cum ar fi repararea, împachetarea genomului, replicarea sau transcripția, ceea ce duce la moarte celulară.

Țintirea proceselor asociate ADN rămâne o strategie importantă în terapia cancerului. Modularea selectivității medicamentelor, minimizarea citotoxicității acestora asupra țesuturilor sănătoase precum și înlăturarea rezistenței la terapie rămân în continuare obiectivele majore ale acestei arii de cercetare.

1.2 Integraza retrovirală

Materialul genetic al virusului HIV-1 este reprezentat de două molecule de ARN monocatenar care se regăsesc asociate cu alte enzime și proteine virale, dintre care cele mai relevante din punct de vedere farmacologic sunt revers-transcriptaza și integraza.

În citosolul celulei infectate, moleculele de ADN viral sintetizate prin revers-transcriere devin parte a unui complex nucleoproteic așa numit de pre-integrare (PIC) [11].

În acest complex ADN viral este procesat de integraza retrovirală. Aceasta se leagă specific sub formă dimerizată de secvențe localizate la ambele capete ale ADN viral, denumite LTR („*long terminal repeats*”) și în prima etapă de procesare 3' catalizează eliminarea unei dinucleotide, cu eliberarea unei grupări hidroxil reactive. Complexul nucleoproteic astfel format, care cuprinde integraza tetramerizată legată de cele două capete de ADN viral procesat, este transportat din citosol la nivelul membranei nucleare. Cele două catene virale activate 3' atacă câte o catenă de ADN genomic gazdă, la 5 nucleotide distanță una față de cealaltă (**Figura 1.1**). Mecanismele celulare de reparare a ADN genomic completează zonele monocatenare rămase în urma inserției [11,12].

1.3 Recombinaza RAG

RAG1 alături de RAG2, reprezintă un element cheie pentru generarea unui repertoriu divers al efectorilor sistemului imun adaptativ. Gena care codifică regiunea variabilă a imunoglobulinelor și receptorilor celulelor T este asamblată din 3 segmente și anume V, D și J fiecare aflat într-un grup (locus) de segmente genice, aflate la distanțe mari în genom. Acest proces se numește recombinare V(D)J și este catalizat de complexul enzimatic RAG1/RAG2 împreună cu alte proteine accesorii, care recunosc și taie la nivelul unor secvențe semnal specifice denumite RSS (*recombination signal sequence*), secvență semnal pentru recombinare) care flanchează segmentele genice V, D și J (**Figura 1.1**). O secvență RSS este alcătuită dintr-o porțiune de 9 perechi de baze (nonamer), bogată în A/T și o regiune conservată de 7 perechi de baze (heptamer), separate printr-o regiune mai puțin conservată de 12 sau 23 de perechi de baze (de unde și clasificarea 12RSS sau 23RSS). Heptamerul este întotdeauna urmat de regiunea codificatoare a segmentului V, D sau J, iar recombinarea se produce într-o manieră strict orchestrată, întotdeauna între un segment flancat de 12RSS și unul flancat de 23RSS (regula 12/23). Genele codificatoare pentru regiunile variabile ale lanțului greu al imunoglobulinelor și a lanțului β al receptorilor limfocitelor T sunt primele asamblate prin recombinare, prin alăturarea unui segment D și a unui segment J, urmată de alăturarea unui segment V lângă cel DJ asamblat. În continuare, regiunile variabile ale lanțului ușor al imunoglobulinelor și ale lanțului α al receptorilor limfocitelor T sunt asamblate prin recombinarea unui segment V și a

unui segment J. Unitatea funcțională enzimatică pentru recombinare este un heterotetramer, care conține 2 subunități RAG1, fiecare asociată cu câte o subunitate RAG2.

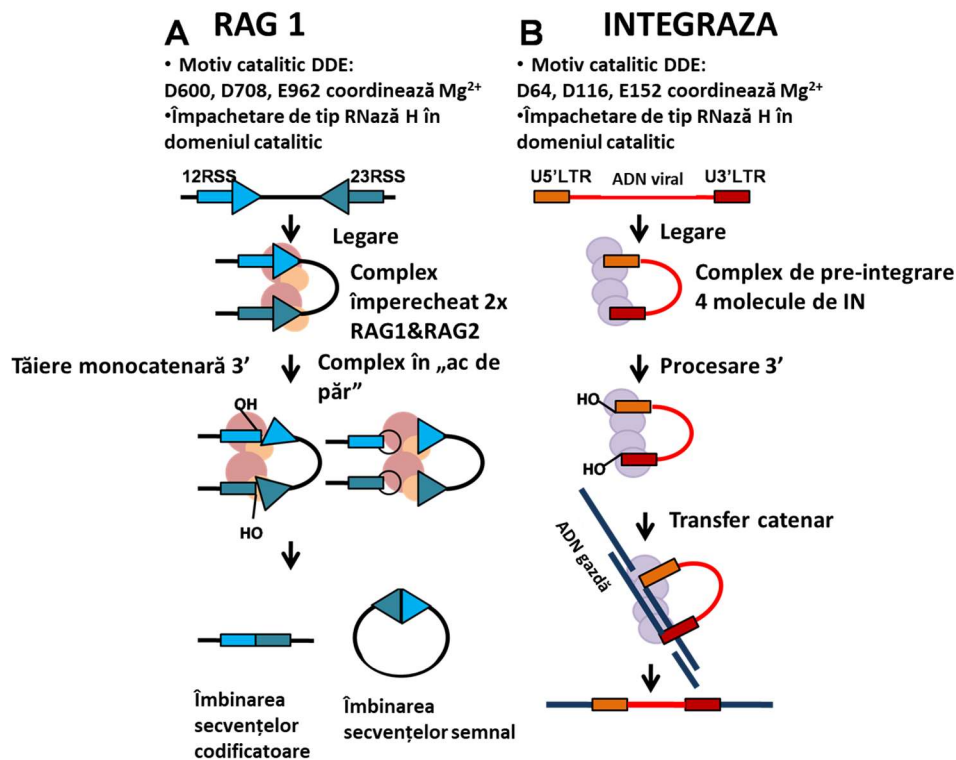


Figura 1.4. Asemănări și deosebiri între mecanismul recombinazei RAG1 și cel al integrezei HIV-1

Heterotetramerul leagă o pereche 12/23 RSS și formează un complex sinaptic, iar legarea este facilitată de îndoirea ADN determinată de proteine accesorii din familia HMGB (*high mobility group proteins*) [13,14]. RAG1 taie între capătul heptamerului și regiunea codificatoare a segmentului V, D sau J, legătura fosfodiestică a unei singure catene, cu eliberarea grupării hidroxil activate 3' la capătul segmentului codificator și a fosfatului liber la capătul heptamerului (capătul semnal). În etapa următoare gruparea hidroxil activă acționează ca nucleofil și atacă cea de-a doua catenă, formând un intermediar ce conține un ester fosfat ciclic (structura așa-numită “în ac de păr”) la capătul codificator (**Figura 1.1**).

După reacție, complexul RAG1&RAG2 menține capetele ADN tăiate în proximitate, în timp ce enzimele de reparare aparținând complexului NHEJ, deschid structura circulară și atașează cele două capete codificatoare cu eliminarea și/sau adăugarea de nucleotide (acest lucru contribuie la creșterea variabilității). De asemenea cele două capete semnal sunt unite, dar de data aceasta fără modificări [15].

1.4 Inhibitori de integrază care au potențial de interferență cu RAG1&2

Posibilitatea ca raltegravir să interfere cu activitatea RAG1&2 având în vedere similaritățile structurale dintre cele două enzime a fost luată în considerare înainte ca raltegravir să fie introdus ca parte a terapiei antiretrovirale. Un prim studiu a arătat că 5-CITEP și derivatul de tip beta-dicetoacid L-708,906 au inhibat activitatea enzimatică a RAG1 *in vitro* [16,17].

Un studiu ulterior a indicat un mod de inhibiție similar pentru elvitegravir, în ceea ce privește legarea 12RSS, tăierea monocatenară și formarea structurii intermediare “în ac de păr”. De asemenea elvitegravir a inhibat funcția RAG atât în culturi celulare cât și pe animale [18].

Eficacitatea și profilul de siguranță pentru inhibitorii de transfer catenar aflați la acest moment în terapie, este monitorizată prin studii clinice și rapoarte de caz. În general reprezentanții acestei clase de antiretrovirale au fost considerați bine tolerați și foarte eficienți în reducerea încărcăturii virale la adulți [19]. Totuși, un studiu implicând 78 de pacienți tratați cu noile antiretrovirale, a arătat o rată crescută a prevalenței limfomului non-Hodgkin în această populație de până la 20 de ori și o instalare rapidă a acestui tip de cancer după instaurarea regimului antiretroviral. O posibilă explicație ar putea fi faptul că răspunsul virologic mai accentuat decât în cazul pacienților care nu au dezvoltat limfom poate facilita căi de proliferare anormală în limfocite [20].

Posibilele reacții adverse imunologice corelate asociate inhibitorilor de transfer catenar pot fi investigate în contextul sistemului imun în dezvoltare la nou-născuți și copii. Inhibitorii integrazei sunt aprobați pentru tratamentul copiilor începând de la 4 săptămâni (raltegravir) sau de la 6 ani (combinația elvitegravir/cobicistat/emtricitabina/tenofovir și dolutegravir). Aceste medicamente pot preveni infecția la nou-născuți de la mame infectate cu HIV-1 prin prevenirea integrării ADN viral. Studiul clinic NCT01854775 evaluează profilul farmacocinetic, activitatea antivirală și potențialele efecte adverse ale combinației elvitegravir/ cobicistat/ emtricitabină/ tenofovir alafenamidă fumarat (Genvoya®), administrată la pacienți până la vârsta de 18 ani. În baza unor rezultate preliminare, FDA a raportat o scădere a numărului limfocitelor CD4+ la 23 de copii, cu vârste între 6 și 12 ani, începând cu a doua săptămână de tratament, persistând până la 24 săptămâni. După 48 de săptămâni, această scădere a fost mai redusă decât inițial. Cu toate acestea diferența raportat la nivelul de bază la 24 de săptămâni a fost minimă. Etiologia acestor observații rămâne încă neelucidată, fiind nevoie de mai multe date pentru a trage o concluzie[21,22].

2 Materiale și metode

2.1 Purificarea proteinelor

Proteinele RAG1, RAG2, HMGB au fost purificate după expresie în celule prin cromatografie de afinitate. Integraza virusului HIV-1 fuzionată cu proteina de tip *Zn finger* E2C și având o secvență de 6 histine la capătul N-terminal a fost descrisă anterior [23]. Proteina a fost exprimată în *Escherichia coli*, tulpina BL21.

În scopul purificării RAG1 și RAG2 au fost folosite plasmide care conțin secvențele de ADN corespunzătoare unor părți ale acestora, esențiale pentru menținerea *in vitro*. Aceste zone conțin domeniul central al proteinelor, localizat între aminoacizii 384-1008 în cazul RAG1 și între aminoacizii 1 și 383 în cazul RAG2. În vederea purificării, proteinele RAG1 și RAG2 au fost fuzionate la capătul N-terminal cu proteina de legare a maltozei (*maltose binding protein*, MBP). Pentru simplificare, în capitolul de REZULTATE, se va omite ”MBP-” și „domeniul central” când se va face referire la folosirea proteinelor purificate în testele enzimaticice *in vitro*.

2.2 Studiile in silico de docare a compușilor

Pentru studiul de docare asupra integralei a fost folosit modelul intazomului realizat de dr. Marius Surleac pornind de la structura publicată anterior [11]. În cazul simulărilor ce implică RAG1 a fost folosită structura dimerului RAG1 așa cum a fost determinată în cristalul complexului RAG1&2 (cod PDB 4wwx) [24]. Structura 3D a liganzilor a fost obținută folosind Avogadro, iar pentru calculele de docare a fost folosit AutoDockVina. Sarcinile parțiale Gasteiger au fost calculate pentru proteină și liganzi folosind AutoDock Tools [25]. Pentru fiecare compus au fost efectuate 5 runde de docare, în care proteina a fost menținută rigidă, iar ligandul liber. Rezultatele au fost analizate folosind PyMol [26].

Analiza bioinformatică a compușilor a fost realizată în colaborare cu dr. Marius Surleac și dr. Andrei Jose Petrescu de la Institutul de Biochimie al Academiei Române, Departamentul de Bioinformatică și Biochimie Structurală.

2.3 Evaluarea citotoxicității

Citotoxicitatea compușilor a fost evaluată folosind kitul CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (G3580-Promega). Procentul de viabilitate a fost determinat

prin normalizarea absorbantei în prezența compușilor la cea a controlului cu celule tratate doar cu DMSO.

Testele de citotoxicitate au fost efectuate în colaborare cu dr. Gabriela Chirițoiu de la Institutul de Biochimie al Academiei Române, Departamentul de Biologie Celulară Moleculară.

2.4 Testul de infecție cu pseudoparticule virale VSVG-HIV-1

Celule Hek293T menținute în mediu DMEM cu 10% ser fetal bovin au fost co-transfectate cu o combinație de trei plasmide, anume psPAX2, pLenti CMV Puro Luc și pMD2.G, în raport de 3:3:1 (HIV-1 gagpol : luciferaza: anvelopa VSVG). După 48 de ore de incubare, supernatantul conținând pseudoparticulele virale a fost recoltat și filtrat de reziduuri celulare. Un alt set de celule Hek293T au fost distribuite în plăci de 96 de godeuri și au fost inoculate cu pseudoparticule virale și incubate timp de 12 ore, în mediu în care au fost adăugați compușii de studiat sau doar DMSO (proba control). După 12 ore mediul de cultură a fost schimbat, menținând în continuare aceeași concentrație de compuși. La 96 de ore post-inoculare celulele au fost lizate și a fost determinată activitatea luciferazei folosind kitul Bright-Glo®Luciferase Assay System (E2620, Promega). În paralel a fost determinată viabilitatea celulelor infectate în absență și în prezență de compuși, folosind testul MTS.

Testul de infecție cu pseudoparticule virale a fost efectuat în colaborare cu drd. Andrei Juncu și dr. Ionuț Popescu de la Institutul de Biochimie al Academiei Române, Departamentul de Glicoproteine Virale.

2.5 Obținerea mutațiilor integralei HIV-1 folosiți testele de infecție cu pseudoparticule

Mutațiile punctiforme au fost introduse în plasmidul psPAX2 care codifică gena HIV-1 gag-pol (descriș mai sus) prin tehnica de amplificare, folosind o polimerază cu grad înalt de fidelitate: Phusion DNA polimeraza (ThermoScientific®). Gena gag-pol a fost separată din plasmid prin digestie cu enzima BglII (la 37 °C, timp de 2 ore), iar fragmentul a fost izolat, purificat și supus circularizării în prezența ligazei T4 (ThermoScientific®, la 16°C, peste noapte). Fragmentul astfel circularizat a fost amplificat, folosind oligonucleotide specifice pentru fiecare mutație ce s-a dorit a fi introdusă.

2.6 Evaluarea recombinării în limfocite preB v-Abl

Celulele murine v-Abl preB (linia A70, oferită de dr. Larry Sleckman, Duke University) în cultură au fost induse cu 3 μM imatinib în prezență de 0,1% DMSO (proba de control netratat) sau compuși. După 72 de ore de incubare celulele au fost recoltate și au fost supuse extracției de ADN genomic. Cantități egale de ADN genomic purificat au fost amplificate prin metoda de *nested* PCR, iar produșii de reacție au fost vizualizați prin electroforeză în gel de agaroză.

2.7 Compușii chimici

O serie de 490 de compuși chimici de sinteză aparținând unei librării de screening anti-HIV-1 comerciale (din aproximativ 21000 de compuși) au fost achiziționați de la compania Chemdiv.

Derivații de stirilchinoline noi, inclusiv compusul 25 și FZ41, derivatul OATC3 și derivatul THQBS4 au fost obținuți în laboratorul Institutului Leton de Sinteză Organică (strada Aizkraukles, nr 21, Riga, LV-1006) sub conducerea domnului Dr. Edgars Ābele. Sinteza, purificarea și identificarea acestora au fost în totalitate efectuate în cadrul acestui laborator. Compușii au fost identificați prin spectre ^1H RMN și/sau ^{13}C RMN. Compușii au fost puși la dispoziție pentru teste în urma colaborării cu grupul condus de Dr. Edgars Ābele.

Complecșii Gd, Tb, Sm și Eu cu 5-hidroxi flavona și 1,10-fenantrolina au fost sintetizați și caracterizați în cadrul Catedrei de Chimie Anorganică de către Prof dr. Valentina Uivaroshi și Asist. dr. Alexandra Ticea și puși la dispoziție prin amabilitatea acestora.

Compușii naturali purificați au fost puși la dispoziție în urma colaborării cu grupul de cercetare condus de dr. Judith Hohmann, aparținând Departamentului de Farmacognozie al Universității din Szeged, Ungaria.

2.8 Vizualizarea ADN și cuantificarea gelurilor de electroforeză

Produșii ADN obținuți prin diverse tehnici de amplificare PCR, precum și cei obținuți din reacțiile enzimatiche descrise în capitolele următoare au fost vizualizați prin separare electroforetică în gel de poliacrilamidă sau agaroză, după caz, urmată de colorare cu SybrGreen®, SybrGold® în cazul gelurilor de poliacrilamidă și bromură de etidiu în cazul gelurilor de agaroză. Gelurile au fost vizualizate după colorare la PharoFX® (BioRad®).

3 Metode de fluorescență folosite pentru investigarea interacțiunii compușilor cu ADN și proteine

Legarea unor complecși ai lantanidelor de ADN a fost studiată prin două metode experimentale cu detecție de fluorescență. Prima se bazează pe dezlocuirea intercalatorului SybrGold® de pe moleculele ADN de către complecși, prin competiție pentru legarea non-covalentă în curbura ADN și în consecință diminuarea fluorescenței acestuia. Fluorescența ADN colorat cu SybrGold® în prezența complecșilor 5-hidroxi flavonei și 1,10-fenantrolinei cu Gd, Tb, Sm și respectiv Eu a fost vizualizată și cuantificată după separarea prin electroforeză și scanarea gelului de poliacrilamidă la fluorimetru (**Figura 3.1**). Constantele de legare pentru cei patru complecși investigați au avut valori în domeniul micromolar și anume $8,4 \pm 3,5 \mu\text{M}$ și $13 \pm 4,6 \mu\text{M}$ în cazul complecșilor cu Tb și respectiv Sm, urmate îndeaproape de valorile corespunzătoare complecșilor cu Gd și Eu ($18,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$ și respectiv $22,4 \pm 5,4 \mu\text{M}$) (**Tabel 3.1**) [27].

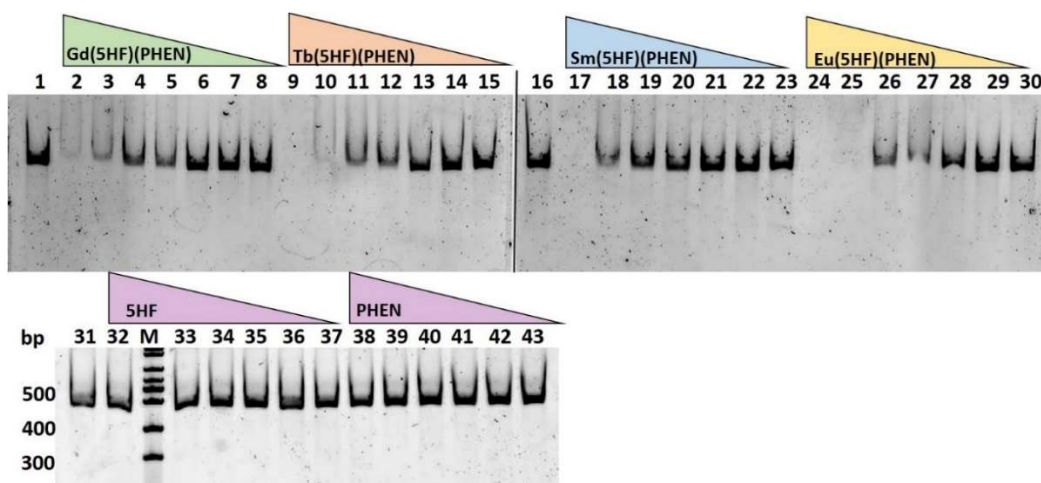


Figura 3.1. Electroforeză în gel de poliacrilamidă pentru determinarea potențialului de legare de ADN a complecșilor lantanidelor. Molecule de ADN cu lungime de 450 perechi de baze au fost incubate cu diverse concentrații din fiecare complex. Probele au fost supuse electroforezei, iar gelurile au fost colorate cu SYBR Gold® și vizualizate folosind PharosFX® (BioRad) la lungimea de undă de excitație 488 nm. Benzile 1, 16 și 31: ADN incubat doar cu DMSO, benzile 2-8: complexul Gd, 2:150 μM , 3:60 μM , 4: 30 μM , 5: 15 μM , 6: 6 μM , 7: 3 μM , 8: 1,5 μM ; benzile 9-15: complexul Tb, 9: 150 μM , 10: 60 μM , 11: 30 μM , 12: 15 μM , 13: 6 μM , 14: 3 μM , 15: 1,5 μM ; benzile 17-23: complexul Sm, 17: 150 μM , 18: 60 μM , 19:

30 μM , 20: 15 μM , 21: 6 μM , 22: 3 μM , 23: 1,5 μM ; benzile 24-30: complexul Eu, 24: 300 μM , 25: 150 μM , 26: 60 μM , 27: 30 μM , 28: 15 μM , 29: 6 μM , 30: 3 μM , benzile 32-37: 5-hidroxi flavona (5HF), 32: 300 μM , 33: 150 μM , 34: 60 μM , 35: 30 μM , 36: 15 μM , 37: 6 μM ; benzile 38-43: 1,10-fenantrolina (PHEN), 38: 300 μM , 39: 150 μM , 40: 60 μM , 41: 30 μM , 42: 15 μM , 43: 6 μM .

Cea de-a doua metodă se bazează pe diminuarea fluorescenței emise de fluoroforul Alexa488 legat covalent de o moleculă de ADN în urma interacțiunii complexelor cu nucleotidele adiacente fluoroforului (**Figura 3.2**). Procentul de diminuare a fluorescenței a fost proporțional cu concentrația de complex adăugată. Prin această metodă a fost posibilă în plus urmărirea dinamicii de legare a complexelor în funcție de timpul de incubare. Efectul inițial de diminuare a fluorescenței după 10 minute de incubare a avut valori apropiate pentru complexii Tb, Gd și Sm: $45 \pm 6\%$, $44 \pm 5\%$, și respectiv $46 \pm 8\%$ la 100 μM și ușor mai scăzut pentru complexul Eu ($40 \pm 11\%$ at 100 μM).

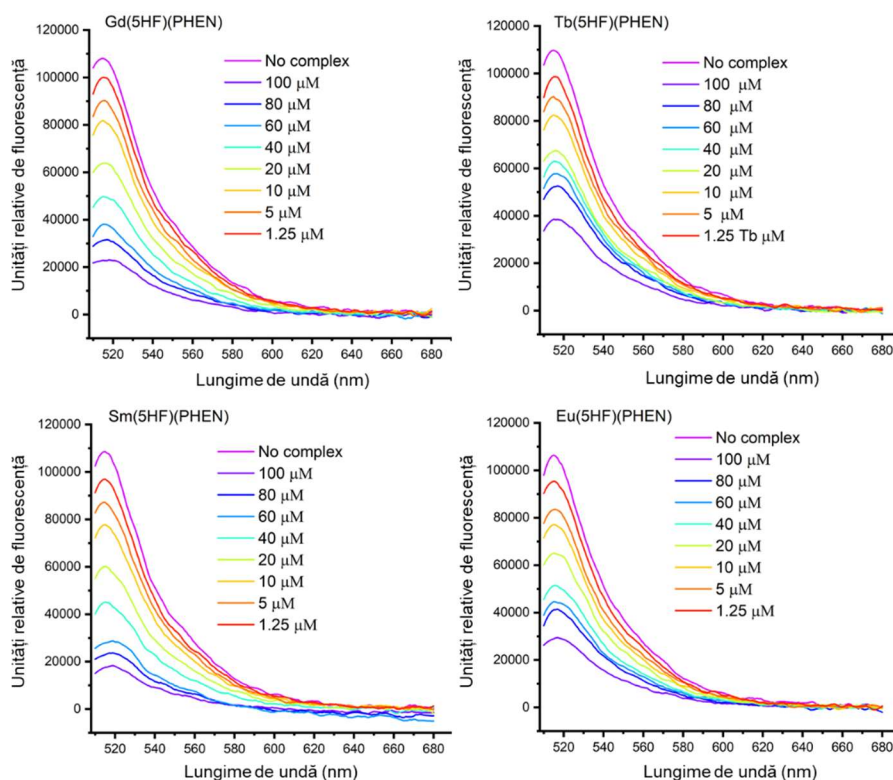


Figura 3.2. Spectre de fluorescență corespunzătoare ADN marcat cu Alexa488. ADN marcat de 27 perechi de baze a fost incubat cu variate concentrații de complecși ai lantanidelor, la 37°C. Spectrele au fost înregistrate după 6 ore la $\lambda_{\text{excitare}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisie}}=510\text{-}680 \text{ nm}$, iar spectrul corespunzător probelor fără ADN marcat a fost ulterior scăzut.

Perioade de incubare mai lungi au arătat diferențe în dinamica de legare a complexilor. Complexul Sm atinge saturația după 6 ore, fără a înregistra o creștere a efectului de diminuare la toate concentrațiile testate, în timp ce alți complecși au creșteri moderate a efectului de diminuare după 6 ore, dar doar la concentrații mai mari de 20 μM .

Valorile constantelor de legare estimate prin această metodă au urmat aceeași tendință ca cele obținute prin metoda cu SybrGold®, iar complexul cu ADN este stabil până la 24 de ore de incubare. Complexul cu Sm a demonstrat una din cele mai mici constante de legare în ambele metode (Tabel 3.1) [27].

Tabel 3.1. Valori K_{50} obținute prin cele două metode descrise: electroforeză în gel de poliacrilamidă cu detecție prin SYBR® Gold (incubare 20 min) și diminuarea fluorescenței prin legarea de ADN marcat covalent cu Alexa488 (incubare 24h). Valorile K_{50} au fost calculate prin aplicarea funcției Hill 1 (Origin®).

	Metoda electroforetică însoțită de colorare SYBR® Gold	ADN marcat cu Alexa488 fluorescență citită în plăci de 96 de godeuri
Complex	K_{50} (μM)	K_{50} (μM)
Sm(5HF)(PHEN)	$13 \pm 4,6$	$28,8 \pm 3,8$
Eu(5HF)(PHEN)	$22,4 \pm 5,4$	$43,7 \pm 16,6$
Gd(5HF)(PHEN)	$18,8 \pm 6,3$	$29,5 \pm 5,3$
Tb(5HF)(PHEN)	$8,4 \pm 3,5$	$54,6 \pm 11,6$

3.1 Metodă bazată pe detecția de fluorescență aplicată pentru identificarea inhibitorilor de legare integrază-LTR

O a doua aplicație a metodelor de fluorescență a fost identificarea prin screening a unor compuși sintetici inhibitori a două etape esențiale pentru activitatea integrazei HIV-1: legarea de ADN substrat (LTR) și procesarea capătului 3' în vederea inserării ADN substrat (viral) în genomul gazdă. Testul de screening pentru inhibiția legării ADN folosește molecule scurte de ADN cu secvența specifică de recunoaștere a integrazei (LTR), marcate cu fluoroforul Alexa488. Integraza este adsorbită pe suprafața unor plăci de 96 de godeuri, în care este adăugată o soluție tampon ce conține ADN substrat marcat fluorescent, în prezența și în absența

compușilor investigați. Inhibiția etapei de legare a LTR a fost estimată ca raportul dintre procentul de legare (fluorescența citită după îndepărtarea soluției de reacție) în prezența compusului și în prezența doar a DMSO.

Pentru validare, au fost testați compuși cunoscuți ca inhibitori ai legării integralei precum derivatul de stirilchinolină FZ41 și *compusul 25* [28], pentru care s-a estimat o valoare a concentrației inhibitorii 50 (CI50) de $19,84 \pm 3 \mu\text{M}$ și respectiv $28,4 \pm 4,1 \mu\text{M}$. Cu excepția studiului făcut de Han și colaboratorii săi [29], niciun alt studiu anterior nu a descris compuși cu activitate inhibitorie asupra legării integralei de substratul său ADN.

3.2 Metodă de fluorescență pentru identificarea inhibitorilor procesării 3'

Testul de screening pentru inhibiția procesării 3' folosește substrat ADN (LTR) marcat la un capăt cu un fluorofor donor pe o catenă și un fluorofor acceptor pe cealaltă catenă, astfel încât între cei doi se observă fenomenul de FRET, manifestat prin scăderea fluorescenței donorului și creșterea fluorescenței emise de acceptor. În urma procesării 3' integraza îndepărtează două nucleotide de la capătul 3' unde este atașat acceptorul, ceea ce se traduce prin scăderea eficienței FRET observate. Astfel diferența între eficiența FRET (estimată prin intensitatea fluorescenței donorului) în prezența și în absența integralei este proporțională cu activitatea enzimatică (**Figura 3.3**). Metoda nou dezvoltată bazată pe FRET s-a dovedit mai sensibilă prin comparație cu cea consacrată de detecție a fragmentelor de ADN tăiat prin separare în gel de poliacrilamidă. Metodele de screening astfel dezvoltate și optimizate au fost validate prin testarea unor inhibitori cunoscuți ai integralei HIV-1 și anume derivatul de tip dicetoacid L-708,906 și derivații de stirilchinolină FZ41 și *compusul 25* [28,30]. Derivații de stirilchinolină au avut CI50 simialre cu cele obținute în cazul inhibiției legării de ADN, fapt susținut de mecanismul de acțiune sugerat de studii anterioare pentru această clasă de compuși. Rezultatele obținute în cazul acestora au fost în concordanță cu datele publicate în literatură. Aceste teste enzimatică vor fi aplicate în capitolele ce urmează pentru identificarea unor noi compuși inhibitori ai integralei HIV-1 dintr-o librărie comercială de compuși sintetici precum și dintr-o colecție de compuși naturali.

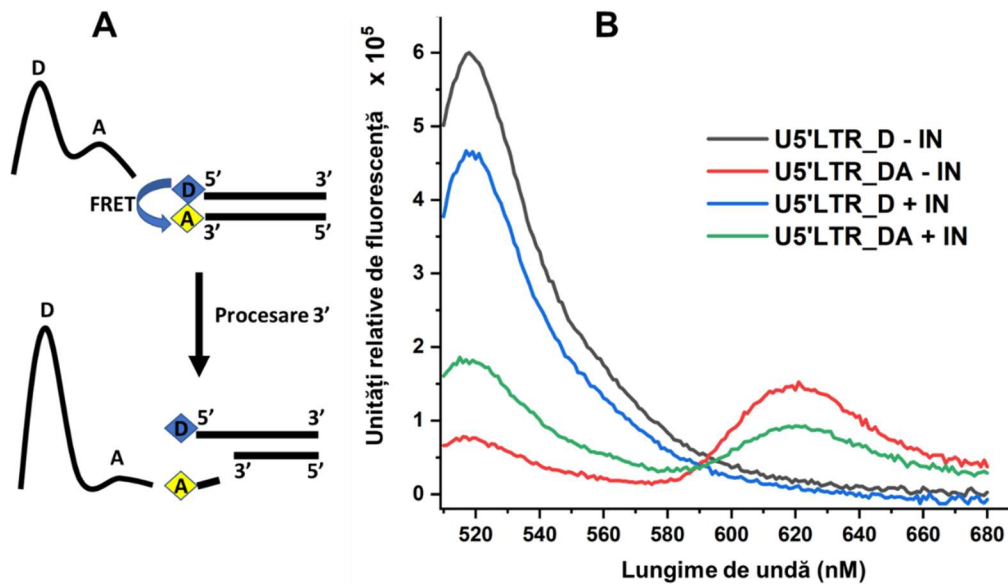


Figura 3.3 Evidențierea procesării 3' folosind o pereche de fluorofori pentru FRET. (A) Schemă ilustrând poziționarea fluoroforilor pe substratul ADN U5'LTR de 27 de perechi de baze. În urma procesării 3' acceptorul este îndepărtat din proximitatea donorului, iar FRET este anulat. (B) Exemplu de spectru înregistrat în absența sau în prezența integraziei. Fluoroforul donor a fost excitat la $\lambda = 490$ nm, iar emisia de fluorescență a fost înregistrată între 510 și 680 nm. Integraza a fost incubată în prezența a 200 nM ADN în soluție tampon (20mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 7.5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5% PEG4000 și 10% DMSO), timp de 24 de ore la 37°C.

4 Identificarea unor noi compuși chimici inhibitori ai integralei HIV-1

4.1 Testarea unei colecții de compuși chimici pentru potențialul de inhibiție a integralei HIV-1

Un set de 555 de compuși chimici aparținând a 33 de familii chimice au fost testați pentru potențialul inhibitor asupra integralei HIV-1 în etapele de legare a ADN și de procesare 3', prin metodele bazate pe detecția în fluorescență descrise în capitolul anterior. Compușii testați au în comun caracteristici structurale prin care pot teoretic interacționa în zona catalitică a integralei HIV-1. În urma testelor de screening efectuate la 100 μM au fost identificați 6 compuși cu activitate inhibitorie modestă asupra legării LTR (între 35% și 41% inhibiție), 24 compuși cu activitate inhibitorie asupra procesării 3' (între 40% și 92%) și 5 derivați de tip stirilchinolină cu activitate inhibitorie dublă asupra legării ADN și catalizei. Valorile CI50 pentru cei mai activi dintre inhibitorii procesării 3' au fost în general mai mari de 30 μM (majoritatea cuprinse între 30 și 100 μM). Cei mai potenți compuși având valori CI50 mai mici de 30 μM au fost derivați de oxoacetamido-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-carboxilat (OATC), izochinolintrionă (IQT) și stirilchinolină (SQ). Alte clase de compuși activi au fost derivați de 1,2,3,4-tetrahidrochinoxalin-6-sulfonamidă (THQS), derivați de 1,2,3,4-tetrahidrochinoxalin-6-il-benzensulfonamidă (THQBS), derivați de (1,2,3,4-tetrahidrochinoxalin-6-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) metil) benzensulfonamidă (THQOBS), derivați de sulfonil-1,4-dihidro-2,3-chinoxalindionă (SDHQ), și derivați de 6,7,8,9,10,12 hexahidroazepino[2,1-b]chinazolin-2-il) oxalamidă (HQO) și derivați de fenilsulfoniletil oxalamidă (PSEO). Doar în cazul derivaților de stirilchinolină au putut fi estimate valorile CI50 pentru legarea ADN, în general mai mari de 60 μM , cu excepția SQ5 (2,6 μM) (**Tabel 4.1**).

Toți inhibitorii identificați prin screening au fost testați pentru potențialul citotoxic în culturi celulare de fibroblaste umane Hek293T. O parte din compușii cu cea mai mare activitate inhibitorie asupra integralei au fost toxici la concentrații mai mari de 40 μM . Această concentrație prag a fost aleasă în continuare pentru testarea activității antivirale în culturi celulare.

Tabel 4.1. Activitatea inhibitorie a compușilor selectați. Valori CI50 ale celor mai activi compuși selectați în testele de screening de legare și procesare 3'. Toate valorile reprezintă media obținută în urma a trei experimente independente, precum și deviația standard.

Compus	CI50 Legare (μM)	CI50 Procesare 3' (μM)
L-708,906	-	$27,98 \pm 3,6$
OATC2	-	$7,84 \pm 1,8$
OATC1	-	$26,84 \pm 3,2$
IQT1	-	$15,25 \pm 3$
THQBS2	-	$61,23 \pm 30,2$
THQBS3	-	$43,84 \pm 4,5$
THQBS1	-	$54,77 \pm 8,3$
SDHQ1	-	$54 \pm 5,9$
THQS3	-	$61,35 \pm 2,4$
THQS2	-	$99,43 \pm 12,7$
THQS1	-	$31,94 \pm 5,7$
THQOBS3	-	$34,06 \pm 5,5$
THQOBS4	-	$64 \pm 5,73$
THQOBS2	-	$131,2 \pm 23,0$
THQOBS1	-	$47,8 \pm 3,8$
PSEO1	-	$41,8 \pm 5,1$
PSEO4	-	$64,34 \pm 9,7$
PSEO2	-	$68,28 \pm 4,2$
PSEO3	-	$91,2 \pm 11,2$
HQO1	$30,9 \pm 3,3^*$	-
DPMO2	$114,9 \pm 34,7$	-
OATC3	-	$59,63 \pm 4,4$
FZ41	$19,84 \pm 3$	$12,06 \pm 1,7$
Compus 25	$28,4 \pm 4,1$	$28,66 \pm 3,4$
SQ2	-	$8,28 \pm 2,05$
SQ1	$70,2 \pm 6,88$	$6,27 \pm 0,55$
SQ4	$77,72 \pm 2,42$	$4,4 \pm 0,47$
SQ3	$61,2 \pm 6,9$	$6,29 \pm 0,84$
SQ5	$2,58 \pm 2,66$	$29,66 \pm 6,4$

4.2 Efectul inhibitorilor integrazei în testele de infecție cu pseudoparticule virale

Pseudoparticulele virale sunt particule derivate de la retrovirusuri sau rhabdovirusuri care sunt alcătuite din glicoproteine heteroloage de anvelopă și cărora le lipsesc gene esențiale pentru multiplicarea virală. Aceste particule se obțin și se folosesc cu riscuri minime *in vitro* ca surogate care mimează infecția cu un virus potențial periculos. În acest context se poate studia efectul unor compuși de interes farmacologic, utilizând o genă a cărei expresie permite monitorizarea gradului de infecție (uzual se folosește gena luciferazei, a cărei expresie determină biotransformarea unui substrat chemiluminiscent) [31,32].

Potențialul antiviral a fost testat asupra celulelor infectate cu pseudoparticule ce conțin anvelopa virusului stomatitei veziculare, gena codificatoare pentru complexul gag-pol al HIV-1 și gena raportoare a luciferazei. În aceste condiții infecția celulelor duce la inserția secvenței de ADN din interiorul pseudoparticulelor și expresia luciferazei. Gradul de infecție este cuantificat prin citirea chemiluminiscenței obținute în urma activității luciferazei. Cei mai potenți inhibitori în acest test au fost derivați de 1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidă și de oxoacetamido-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-carboxilat. În ciuda inhibiției demonstrate asupra enzimei purificate, derivații de stirilchinolină (cu excepția SQ5) nu au avut activitate asupra infecției cu pseudoparticule în culturi celulare (**Tabel 4.2**). Totuși, indicele de selectivitate (raportul dintre concentrația citotoxică 50% și concentrația inhibitorie 50%) este mic, majoritatea compușilor demonstrând activitate la o concentrație la care citotoxicitatea este ridicată.

Tabel 4.2. Valorile CI50 în experimentele de infecție cu pseudoparticule VSGV-HIV-1, precum și concentrațiile la care compușii sunt citotoxici în proporție de 50% (CC50).

Compus	CI50 (μM)	CC50 (μM)	Indice de selectivitate (CC50/IC50)
Raltegravir	0,00228 \pm 0,00025	>0,125	> 54,82
Dolutegravir	0,00066 \pm 0,00009	>0,125	> 192,3
L-708,906	0,31 \pm 0,058	>5	> 16,1
OATC2	19,04 \pm 1,67	63,7 \pm 1,5	3,3
OATC1	38,65 \pm 2,2	>100	> 2,6
THQS1	16,3 \pm 5	49,74 \pm 2,42	3,1

Compus	CI50 (μM)	CC50 (μM)	Indice de selectivitate (CC50/IC50)
THQS2	60,9 \pm 10,36	>200	3,3
THQBS2	22,44 \pm 0,36	64,4 \pm 1,73	2,9
THQBS3	21,34 \pm 1,9	60,4 \pm 0,5	2,8
THQOBS3	38,79 \pm 1,55	83,85 \pm 5,7	2
OATC3	10,03 \pm 3,6	19,9 \pm 1,3	~2,2
PSEO4	33,04 \pm 1,58	46,93 \pm 2,12	1,4
SQ5	26,6 \pm 3,5	> 100	> 3,8
SQ4	24,7 \pm 17,8	23,65 \pm 5,2	0,96

4.3 Investigarea mecanismului de acțiune al inhibitorilor integrazei HIV-1

Mecanismul de acțiune al noilor inhibitori a fost investigat prin introducerea unor mutații cheie în gena integrazei folosită la asamblarea pseudoparticulelor. Mutațiile au fost alese dintre cele cunoscute ca fiind responsabile de rezistența la medicamente de tip dicetoacid, precum raltegravir și elvitegravir (N155H, E92Q și S119R) [3,33] sau la inhibitori cu mecanism alosteric, de tip terț-butil chinolinelor (W131C și H171Q) [34,35]. În urma testelor de infecție cu pseudoparticulele ce conțin diferitele mutații a fost observată o rezistență modestă doar în cazul mutantului N155H pentru doi dintre compușii analizați (reducere a activității inhibitorii cu 34% și respectiv 31%, comparativ cu activitatea asupra integrazei „wild type”). Acest lucru indică un mecanism diferit de cel al inhibitorilor consacrați, ceea ce oferă o alternativă la terapiile la care virusul dezvoltă rezistență.

În urma experimentelor *in vitro* a fost validată o nouă metodă de screening pentru potențiali inhibitori ai integrazei HIV-1 și mai mult decât atât au fost identificate noi structuri chimice ce pot fi dezvoltate pentru găsirea unor noi terapii antiretrovirale. Compușii identificați în testele de screening și confirmați în experimentele pe culturi celulare pot sta la baza unor viitoare studii structură-activitate pentru îmbunătățirea activității și reducerea toxicității.

5 Evaluarea potențialului de interferență a inhibitorilor integraziei HIV-1 cu recombinația V(D)J

Recombinaza RAG1 și integraza HIV-1 au în comun elemente structurale cheie ale domeniului catalitic, precum și aspecte ale mecanismului de acțiune, ceea ce justifică investigarea interferenței inhibitorilor integraziei cu activitatea complexului RAG1&RAG2. În acest scop compușii au fost testați prin două metode.

Prima metodă presupune evidențierea activității enzimatice a complexului RAG1&RAG2 asupra unei secvențe scurte de ADN substrat ce conține o pereche de secvențe de recunoaștere 12RSS și 23RSS. În urma tăierii specifice de către RAG1&RAG2, fragmentele de ADN rezultate au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, colorate cu Sybr Gold® și cuantificate pentru estimarea activității enzimatice. Potențialul inhibitor al compușilor a fost testat în aceste condiții la concentrații de 25, 50, 75, 100 și 250 μM . Cel mai potent inhibitor al integraziei, derivatul de oxoacetamido-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-carboxilat, OATC2, s-a dovedit și unul dintre cei mai potenți inhibitori ai RAG1&RAG2 (74% inhibiție la 100 μM). Derivații de stirilchinolină SQ4, SQ3 și SQ5 precum și derivatul de izochinolintrionă au avut o activitate inhibitorie similară. Restul derivaților de stirilchinolină și compusul OATC1 au avut procente de inhibiție comparabile cu dicetoacidul L-708,906 (între 32% și 41% la 100 μM). Toți ceilalți compuși identificați în testele de screening pe integrază au demonstrat o inhibiție redusă a activității RAG1&RAG2.

A doua metodă s-a bazat pe evidențierea procesului de recombinație V(D)J ce are loc în culturi de limfocite preB, prin tehnica de „nested PCR”, folosind oligonucleotide specifice locusului *k*. Recombinarea este indusă într-o linie de limfocite preB murine transformate prin incubarea cu imatinib. Fragmentele de ADN obținute în urma amplificării prin PCR, ce corespund recombinării între segmentele V_k și J_{k1} , respectiv V_k și J_{k2} au fost separate prin electroforeză în gel de agaroză și evidențiate cu bromură de etidiu. Nivelul de recombinație a fost estimat prin cuantificarea benzilor corespunzătoare recombinării între V_k și J_{k2} obținute, în prezența compușilor investigați, iar procentul de inhibiție a fost calculat prin raportare la celulele expuse la 1% DMSO. Dintre compușii cu cea mai mare activitate inhibitorie asupra integraziei, OATC2 și IQT1 au interferat cel mai mult cu recombinația V_k și J_{k2} (30% și respectiv 38%, la 40 μM). Derivații de stirilchinolină nu au avut niciun efect asupra recombinării, în ciuda

inhibiției enzimatice ridicate observată anterior. Această observație este în concordanță cu lipsa activității pe culturi celulare infectate cu pseudoparticule, ceea ce indică probleme de biodisponibilitate pentru această clasă de compuși (**Figura 5.1**).

Derivatul de oxoacetamido-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-carboxilat OATC3 și derivatul de 1,2,3,4-tetrahidrochinoxalin-6-sulfonamidă THQBS2 au fost cei mai activi inhibitori ai infecției cu pseudoparticule virale și au avut o interferență redusă asupra activității RAG atât în testele enzimaticе cât și în testele celulare, cu procente de inhibiție mai mici comparativ cu raltegravir și dolutegravir (**Figura 5.1**). Studii amănunțite de tip structură-activitate sunt necesare, având în vedere inhibiția RAG demonstrată de derivații lor înrudiți OATC2 și THQBS3. Aceste două clase de compuși au cel mai mare potențial de a fi dezvoltate ca noi terapii antiretrovirale ce nu au efecte adverse asupra recombinării și implicit răspunsului imun.

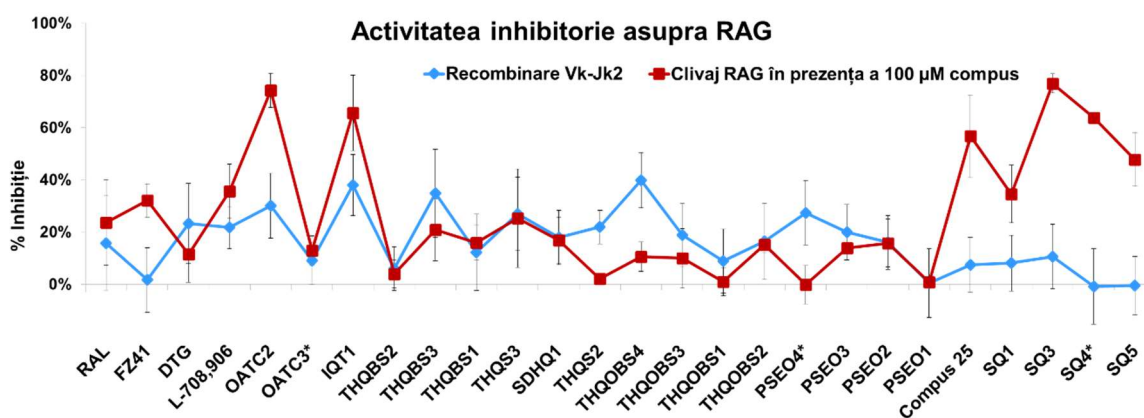


Figura 5.1. Histogramă ilustrând estimarea semicantitativă a procentului de inhibiție relativ la control în absență de compus. Fiecare valoare reprezintă media obținută din 3 experimente independente. Comparație între activitatea inhibitorie asupra RAG în testele enzimaticе la 250 μM compus și în testele pe culturi celulare v-Abl preB la 40 μM compus (*compus testat la 20 μM; RAL=raltegravir; DTG=dolutegravir)

6 Analiza in silico a interacțiunii inhibitorilor sintetici ai integrazii HIV-1 cu recombinaza RAG1

Simulările de docare au arătat că inhibitorii integrazii HIV-1 care acționează asupra triadei DDE(D), au de asemenea afinitate asupra centrului catalitic al RAG1. Conformațiile de docare selectate au arătat interacțiuni cu aminoacizi cheie precum D708, E962, R848 și H795 care pot explica interferența compușilor cu tăierea ADN mediată de RAG demonstrată în experimente anterioare *in vitro* și *ex vivo*. Cu toate acestea, ținând cont că aceste simulări au fost efectuate folosind dimerul RAG1 în absența ADN, este posibil ca zonele de legare identificate să nu fie accesibile în urma formării complexului sinaptic. Acest argument este susținut de faptul că L-708,906 inhibă tăierea mediată de RAG mai eficient atunci când este adăugat proteinei înaintea substratului [36]. Analiza arată că derivatul de stirilchinolină FZ41 are o afinitate similară cu dicetoacizii, iar inhibitorii alosterici de tip terț-butilchinolină au o afinitate semnificativ redusă asupra centrului catalitic.

Analiza de docare a inhibitorilor integrazii HIV-1 identificați în testele enzimatică a arătat diferite afinități pentru centrul catalitic al RAG1, în concordanță cu datele experimentale. Astfel majoritatea compușilor care nu au demonstrat o interferență semnificativă cu activitatea enzimatică a RAG1, au avut un număr mai redus de interacțiuni cu aminoacizii zonei catalitice și/sau conformații aflate în general la distanțe mai mari de 4 Å. Acesta a fost cazul derivaților de fenilsulfoniletil oxalamidă, 1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidă, (1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) metil) benzensulfonamidă și derivaților de 1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-il-benzensulfonamidă. În cazul derivaților de oxoacetamido-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-carboxilat, numărul aminoacizilor de interacțiune precum și distanțele față de compușii analizați au fost în concordanță cu procentele de inhibiție obținute *in vitro*, ceea ce validează rezultatele analizei de docare. În cazul stirilchinolinelor, conformațiile de docare sugerează un mecanism complex de inhibiție, care implică interferența cu legarea ADN sau cu poziționarea optimă a ADN în domeniul catalitic.

Mecanismul propus în urma simulărilor este cel al interacțiunii cu domeniul RNază H, mai exact în apropierea triadei catalitice DDE, prin interferența cu poziționarea optimă a ADN în centrul catalitic.

7 Compuși naturali inhibitori ai integrazii HIV-1

Un set de 260 de compuși naturali purificați dintr-o varietate de clase chimice au fost supuși testelor de screening implicând integreza HIV-1. Dintre aceștia gosipitrin, frangulina A, quercetina, protoapigenona 1'-O-propargileter, metil esterul acidului cafeic, acidul rozmarinic, ramnetina și liriidenina au fost identificați ca inhibitori modești ai legării integrazii de LTR, cu valori ale CI50 între 34 și 72 μM . Acidul gliciretinic, 2-metoxi-stipandrona și rotenona au fost inhibitori ai procesării 3', iar acidul elagic a inhibat modest atât legarea de LTR cât și cataliza. În plus, melanina de sinteză s-a dovedit inhibitor al integrazii HIV-1 atât asupra legării de LTR cât și asupra procesării 3', cu valori ale CI50 de 5,1 $\mu\text{g/ml}$ și respectiv 3,4 $\mu\text{g/ml}$ (**Tabel 7.1**).

Compușii identificați aparțin unei varietăți de clase chimice: flavone (gosipitrina, quercetina, ramnetina), protoflavone (protoapigenona 1'-O-propargileter), polifenoli (acidul elagic, metil esterul acidului cafeic, acidul rozmarinic), antrachinone (frangulina A), triterpene (acidul gliciretinic), izoflavone (rotenona), naftichinone (2-metoxi-stipandrona) și alcaloizi oxoaporfirici (liriidenina).

În experimentele pe culturi celulare de fibroblaste umane Hek283T, bazate pe testul cu MTS, rotenona, 2-metoxi-stipandrona, protoapigenona-1-O'-propargileter și liriidenina au fost citotoxice la toate concentrațiile testate, în timp ce restul compușilor au avut un impact mai redus asupra viabilității celulare la concentrații până la 40 μM . Melanina nu a fost citotoxică la niciuna din concentrațiile testate.

Tabel 7.1. Valorile CI50 obținute prin titrarea compușilor naturali identificați în etapa de screening

Compus	CI50 Procesare 3' (μM)	CI50 Legare ADN (μM)
Acid elagic	118,06 \pm 6,67	54,38 \pm 21,18
Metil esterul acidului cafeic		64,54 \pm 4,18
Acid rozmarinic	-	55,05 \pm 3,08
Frangulina A	-	42,98 \pm 3,18
Gosipitrin	-	55,41 \pm 7,89
Quercetina	-	34,16 \pm 4,4
Ramnetina	-	68,89 \pm 35,93

Compus	CI50 Procesare 3' (μM)	CI50 Legare ADN (μM)
Protoapigenona 1'-O-propargileter	-	$60,58 \pm 11,88$
Rotenona	$67,2 \pm 6,7$	-
Acid gliciretinic	$16,24 \pm 1,17$	-
Liriodenina	-	$71,75 \pm 42,58$
2-metoxi-stipandrona	$32,08 \pm 8,97$	-

7.1 Activitatea compușilor naturali identificați ca inhibitori ai integrazii HIV-1 în testul de infecție cu pseudoparticule virale

În testul de infecție cu pseudoparticule virale, protoapigenona 1'-O-propargileter, liriodenina, acidul elagic și frangulina A au avut valori ale CI50 între 0,6 și 3,7 μM . În cazul ramnetinei, acidului gliciretinic și gosipitrinei, CI50 a fost între 13 și 40 μM , iar pentru ceilalți compuși a fost peste 100 μM . Concentrațiile citotoxice au fost apropiate de concentrațiile eficiente pentru toți compușii testați, cu excepția frangulinei A (Tabel 7.2).

Tabel 7.2. Valorile estimate pentru CI50 (concentrația inhibitorie 50%) și CC50 (concentrația citotoxică 50%) în testul de infecție cu pseudoparticule virale VSVG-HIV-1

Compus	CI50 (μM)	CC50 (μM)	Indice de selectivitate (CC50/IC50)
Acid elagic	$3,7 \pm 1,2$	$9,03 \pm 0,64$	2,4
Metil esterul acidului cafeic	> 100	~ 100	~ 1
Acid rozmarinic	~ 100	~ 100	~ 1
Gosipitrin	~ 40	~ 40	~ 1
Quercetin	~ 100	~ 100	~ 1
Ramnetin	$12,77 \pm 0,7$	$17 \pm 1,7$	1,3
Protoapigenona 1'-O-propargileter	$1 \pm 0,53$	$1,32 \pm 0,65$	1,3
Acid gliciretinic	$39,3 \pm 13,2$	$43,2 \pm 6,3$	1,1
Frangulina A	$0,61 \pm 0,32$	3	5
Liriodenina	$2,73 \pm 0,64$	$3,07 \pm 0,64$	1,1

8 Analiza in silico a interacțiunii compușilor naturali în cadrul intazomului HIV-1

Mecanismul de acțiune a fost investigat prin docarea compușilor pe structura intazomului HIV-1. Conformațiile de docare sunt grupate în trei zone principale: în domeniul catalitic, în apropierea triadei DDE, la interfața de dimerizare, între monomerul interior și cel exterior și la interfața de interacțiune dintre ADN și domeniul *Zn finger* de la capătul N-terminal. Aceste zone de interacțiune explică inhibiția catalizei și legării de ADN.

O parte a conformațiilor de docare a fost localizată în interiorul moleculei de ADN, fără a avea contacte semnificative cu proteina. Acest lucru este datorat interacțiunii dintre compus și nucleotide, care însă nu este informativă asupra mecanismului de inhibiție. Astfel, au fost analizate doar acele zone de docare care prezintă majoritar interacțiuni cu proteina și care pot oferi indicii asupra modalității de inhibiție.

În cazul tuturor compușilor s-a observat o probabilitate ridicată de docare în apropierea zonei catalitice, reflectată de numărul semnificativ de conformații identificate în acea zonă. Acest lucru ar putea sugera un mecanism de inhibiție bazat pe competiția cu aminoacizii DDE pentru coordonarea Mg^{2+} și interferența cu geometria moleculară necesară catalizei. Cu toate acestea, în testele enzimatiche doar acidul gliciretinic, acidul elagic și gosipitrina au arătat o inhibiție modestă a etapei de procesare 3', în timp ce în cazul celorlalți compuși a predominat inhibiția etapei de legare a ADN. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că în cadrul conformațiilor de docare identificate în apropierea triadei DDE compușii nu au un contact intim cu reziduurile implicate direct în cataliză. Compușii se localizează la distanțe în general mai mari de 3,5-4 Å de aminoacizii zonei catalitice și nu prezintă un număr mare de interacțiuni puternice cu proteina (de exemplu prin legături de hidrogen). Toate acestea sunt în concordanță cu activitatea inhibitorie modestă a compușilor naturali asupra etapelor de tăiere monocatenară și de transfer catenar observată experimental.

9 Potențialul de interferență asupra recombinării mediate de RAG1&RAG2 al compușilor naturali inhibitori ai integralei HIV-1

În mod asemănător compușilor sintetici, interferența compușilor naturali cu activitatea recombinazei a fost testată în condițiile reacției catalizate de enzime purificate și în culturi de limfocite preB. Compușii au fost testați la concentrații de 10, 20, 40, 60, 80 și 100 μM asupra enzimelor purificate și la 5 μM (în cazul compușilor foarte citotoxici) sau 40 μM în testele celulare. Reacția de tăiere a substratului ADN ce conține o pereche de secvențe de recunoaștere 12/23RSS a fost evidențiată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă cu detecție în fluorescență. Recombinarea V(D)J în locusul k ce codifică lanțul ușor al imunoglobulinelor a fost studiată în culturi de limfocite murine preB modificate, care exprimă RAG prin incubarea cu imatinib. Produsul de recombinare a fost evidențiat prin amplificare prin PCR și separarea fragmentelor rezultate în gel de agaroză, vizualizat de asemenea prin fluorescență.

În reacția de tăiere a ADN substrat mediată de complexul RAG1&RAG2 purificate, acidul rozmarinic, gosipitrina, acidul elagic și liriodenina au arătat procente de inhibiție la 100 μM mai mari comparativ cu L-708,906 și raltegravir, între 43% și 75%. O inhibiție similară cu cea a derivaților de tip dicetoacid a fost observată pentru quercetina, ramnetina, protoapigenona 1'-O-propargileter și frangulina A, între 24% și 29% la 100 μM . Acidul gliciretinic a demonstrat o influență minimă asupra activității RAG1&RAG2.

În experimentele celulare, acidul rozmarinic la 40 μM , frangulina A la 5 μM și liriodenina la 5 μM nu au interferat cu recombinarea V(D)J. Ramnetina la 5 μM , acidul gliciretinic la 40 μM , gosipitrina la 40 μM , quercetina la 40 μM și acidul elagic la 40 μM au avut procente de inhibiție similare cu cele ale raltegravirului și dolutegravirului (între 11% și 26%). Protoapigenona 1'-O-propargileter la 5 μM a avut cel mai mare procent de inhibiție (38%) a recombinării, însă o influență redusă asupra reacției de tăiere a ADN. Acest lucru poate fi explicat de citotoxicitatea înaltă manifestată în culturi celulare. Pe de altă parte acidul rozmarinic la 40 μM și melanina la 3,2 și 10,6 $\mu\text{g/ml}$ nu au avut nicio influență asupra recombinării, însă au avut procente semnificative de inhibiție asupra reacției de tăiere a ADN substrat. Această observație sugerează o disponibilitate redusă a compușilor la nivelul nucleului celulelor (**Figura 9.1**).

În concluzie, ansamblul testelor enzimaticе și pe culturi celulare indică frangulina A ca cel mai promițător compus inhibitor al integrazei HIV-1, cu indicele de selectivitate cel mai mare și care nu influențează procesul de recombinare în limfocite preB. Frangulina A este ramnozida emodinei, un derivat de antrachinonă, iar agliconul a fost studiat anterior ca antitumoral *in vitro*. Activitatea antivirală a frangulinei A a fost investigată aici pentru prima dată. Studii amănunțite de tip structură-acțiune sunt necesare pentru optimizarea activității antivirale și citotoxicității acestui compus.

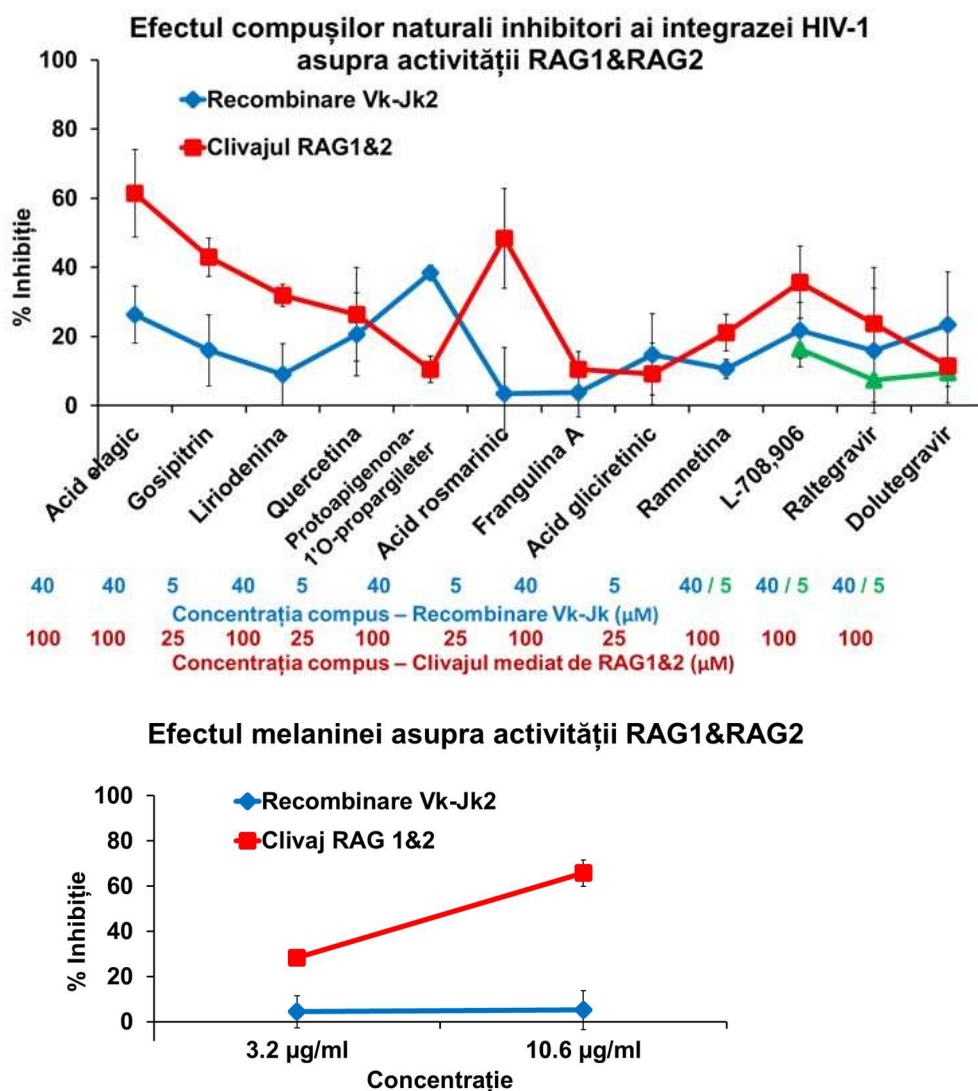


Figura 9.1. Efectul compușilor naturali inhibitori ai integrazei HIV-1 asupra activității proteinelor RAG1&RAG2 *in vitro*. Comparație între inhibiția clivajului enzimatic și inhibiția recombinării în locusul *k* al limfocitelor pre B murine

10 Analiza in silico a interacțiunii compușilor naturali inhibitori ai integrazei HIV-1 cu recombinaza RAG1

Potențialul mecanism de acțiune al compușilor naturali identificați ca inhibitori ai activității complexului de recombinare RAG1& RAG2 a fost investigat prin analiza *in silico* de docare pe structura dimerului RAG1. În urma a 5 runde de docare au fost obținute 100 de conformații, dintre care cele mai relevante pentru analiză au fost considerate cele din zona catalitică, în apropierea triadei catalitice DDE (D600, D708 și E962). Cei trei aminoacizi complexează cationi de Mg^{2+} care sunt esențiali procesului de tăiere a ADN. Conformațiile de docare în această zonă pot sugera faptul că inhibitorii analizați acționează prin intermediul grupărilor lor donoare de electroni, care competiționează cu aminoacizii triadei DDE pentru coordonarea Mg^{2+} , interferând astfel cu geometria necesară substituției nucleofile.

Probabilitatea de docare în zona aleasă (numărul de conformații aflate în zona de interes din cele 100 obținute) a fost corelată cu activitatea inhibitorie a compușilor asupra tăierii ADN mediată de proteinele RAG1&RAG2. Astfel, acidul elagic, gosipitrina și acidul rozmarinic au avut procente de inhibiție la 250 μM de 74%, 68%, respectiv 67% și probabilitate de docare de 40%, 49% și respectiv 39%. Compușii cu activitate inhibitorie modestă, anume ramnetina, quercetina, protoapigenona-1-O'-propargileter și frangulina A, cu procente de inhibiție la 250 μM de 44%, 49%, 41% și respectiv 42%, au avut probabilități de docare de 34%, 29%, 31% și respectiv 28%. Acidul gliciretinic a avut cel mai mic procent de inhibiție la 250 μM și corespunzător, cea mai mică probabilitate de docare în apropierea triadei catalitice, de 20%. Liriodenina este singurul compus pentru care cele două procente nu se corelează, acesta demonstrând o inhibiție de 74% la 250 μM și o probabilitate de docare în zona catalitică de doar 13%. În acest caz, ținând cont și de structura compusului, este posibil ca liriodenina să nu acționeze prin complexarea Mg^{2+} , ci printr-un alt mecanism, la interfața de legare a ADN.

În zona catalitică, cei mai importanți aminoacizi de contact, cu care compușii stabilesc potențiale legături de hidrogen sunt: H795, R848, M849, N965, G601, Y935, E959, precum și aminoacizii triadei catalitice DDE. O serie de compuși stabilesc de asemenea interacțiuni de tip π - π /p- π , π - π și p- π cu H795 și Y935.

11 Concluzii generale și caracterul original al cercetărilor

În prima parte a lucrării sunt prezentate noi metode de investigare a legării non-covalente a compușilor de ADN și respectiv a inhibiției enzimatică a integrezei HIV-1. Acestea au fost bazate pe măsurarea unui semnal fluorescent, proporțional cu legarea compusului sau cu activitatea acestuia asupra enzimei. Metoda de detecție oferă avantajul unei înalte sensibilități și specificități. Protocoalele au fost optimizate pentru volume mici de reacție ceea ce a permis testarea rapidă a unui număr mare de compuși. Legarea de ADN prin intercalare printre nucleotide a fost demonstrată pentru complecși ai lantanidelor Tb, Sm, Eu și Gd cu 5-hidroxi-flavona și 1,10-fenantrolina prin două strategii: competiția cu un cunoscut fluorofor intercalator SybrGold și diminuarea fluorescenței unui fluorofor legat covalent de ADN. Astfel au fost estimate constante de legare între 8,4 μM și 22,4 μM și respectiv 29 μM și 54,6 μM în cel de-al doilea caz. Complecșii formați cu ADN sunt stabili cel puțin 24 de ore, ceea ce sugerează o afinitate ridicată. Metodele descrise pot fi, de asemenea, ușor scalabile pentru testarea unui număr mai mare de compuși simultan.

Metode bazate pe detecția de fluorescență au fost de asemenea dezvoltate și optimizate pentru studierea primelor două etape în activitatea integrezei HIV-1 *in vitro*. Legarea ADN LTR marcat fluorescent este evidențiată printr-un protocol adaptat din literatură și optimizat în plăci de 96 de godeuri ce au integreza HIV-1 adsorbită pe suprafață. Investigarea procesării 3' a fost posibilă prin aplicarea unei tehnici bazate pe fenomenul de FRET. În acest scop a fost elaborată o metodă originală, ce folosește substrat ADN cu secvența LTR, marcat la un capăt cu un fluorofor donor pe o catenă și pe cealaltă catenă cu un fluorofor acceptor, între care apare fenomenul de FRET. Prin acțiunea integrezei HIV-1, dinucleotida ce are atașat fluoroforul acceptor este îndepărtată din proximitatea donorului și, drept consecință, fluorescența acestuia din urmă crește (fenomenul de FRET este anulat). Activitatea catalitică a enzimei este estimată prin diferența între eficiența FRET în absența integrezei și eficiența FRET în prezența acesteia.

A doua parte a cercetărilor este dedicată identificării unor noi inhibitori ai integrezei HIV-1, folosind metodele descrise anterior. Potențialul acestora de a interfera cu activitatea proteinei RAG1 a fost de asemenea investigat. Activitatea enzimatică a RAG1 în complex cu RAG2 a fost pusă în evidență atât prin teste enzimatică cât și prin teste celulare pe limfocite preB.

În urma tuturor experimentelor prezentate, cele mai active clase chimice identificate sunt derivați de oxoacetamido-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-carboxilat și de 1,2,3,4-tetrahidrochinoxalin-6-il-benzensulfonamidă. Dintre compușii naturali, derivatul de antrachinonă frangulina A este cel mai relevant compus identificat. Pentru toți aceștia s-a observat activitate antiretrovirală asupra infecției cu pseudoparticule și interferență redusă a activității RAG, atât în testele enzimaticе cât și în cele celulare, cu procente de inhibiție mai mici comparativ cu raltegravir și dolutegravir. Proprietățile farmacocinetice și farmacodinamice pot fi îmbunătățite prin studii amănunțite de tip structură-acțiune. Aceste clase de compuși au cel mai mare potențial de a fi dezvoltate ca noi terapii antiretrovirale care nu au efecte adverse asupra recombinației și implicit răspunsului imun.

Mecanismul de inhibiție investigat atât pentru compușii de sinteză cât și pentru cei naturali, implică legarea în domeniul RNază H, în apropierea triadei catalitice DDE și a fost arătat prin analiza de docare în structura dimerului RAG1. Compușii cu un astfel de mecanism deschid calea către studierea și altor ținte terapeutice. Astfel de molecule pot fi puncte de plecare pentru studii structură-activitate prin care specificitatea este optimizată împotriva integrazei virusului HTLV-1, responsabil pentru un tip agresiv de leucemie sau împotriva metnazei, enzimă implicată în mecanismele de rezistență la medicamente antitumorale ce țintesc ADN.

Cercetările ce implică evidențierea interacțiunii dintre compuși chimici și ADN sau proteine, studiile legate de mecanismul de inhibiție a recombinazei RAG1, precum și descrierea celor mai relevanți inhibitori ai integrazei HIV-1 identificați în literatură au fost publicate în 3 articole cotate ISI [27],[37],[11], însumând un factor de impact de aproape 9.

Obiectivele propuse în teza de doctorat au fost îndeplinite folosind o combinație de tehnici și cunoștințe legate de variate domenii precum biofizică, biochimie, biologie moleculară, biologie celulară și bioinformatică, ceea ce subliniază caracterul interdisciplinar al cercetărilor.

Rezultatele prezentate constituie o bază solidă pentru continuarea cercetărilor în direcții relevante și de actualitate:

- Folosirea metodelor de investigație dezvoltate în cadrul tezei a interacțiunii dintre compuși și ADN pentru identificarea unor noi compuși cu potențial antitumoral
- Identificarea de noi structuri chimice având noi mecanisme de inhibiție asupra integrazei virusului HIV-1, prin testele de screening dezvoltate și optimizate în cadrul tezei

- Studiarea impactului inhibitorilor integralei HIV-1 asupra recombinării V(D)J mediată de proteinele RAG1&RAG2, în vederea estimării potențialelor efecte adverse asupra sintezei de imunoglobuline și receptori ai limfocitelor T
- Optimizarea structurilor identificate în testele enzimaticice și celulare prin metode bioinformaticice și studii structură-activitate
- Extinderea spectrului de acțiune al compușilor cu afinitate în domeniul RNază H asupra altor potențiale ținte farmacologice, precum integraza virusului HTLV-1, metnaza sau terminaza HMCV

12 BIBLIOGRAFIE

1. World Health Organization. HIV/AIDS Facts Sheet [Internet]. [cited 2021 Mar 10].
2. Wong JK, Yukl SA. Tissue reservoirs of HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2016.
3. Di Santo R. Inhibiting the HIV integration process: Past, present, and the future. Vol. 57, *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. p. 539–66.
4. U.S. Food & Drug Administration. HIV Timeline and History of Approvals [Internet].
5. Gallant J, Lazzarin A, Mills A, Orkin C, Podzamczar D, Tebas P, et al. Bictegravir, emtricitabine, and tenofovir alafenamide versus dolutegravir, abacavir, and lamivudine for initial treatment of HIV-1 infection (GS-US-380-1489): a double-blind, multicentre, phase 3, randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet*. 2017;390(10107):2063–72.
6. Wohl DA, Yazdanpanah Y, Baumgarten A, Clarke A, Thompson MA, Brinson C, et al. Bictegravir combined with emtricitabine and tenofovir alafenamide versus dolutegravir, abacavir, and lamivudine for initial treatment of HIV-1 infection: week 96 results from a randomised, double-blind, multicentre, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet HIV*. 2019;6(6):e355–63.
7. Molina JM, Ward D, Brar I, Mills A, Stellbrink HJ, López-Cortés L, et al. Switching to fixed-dose bictegravir, emtricitabine, and tenofovir alafenamide from dolutegravir plus abacavir and lamivudine in virologically suppressed adults with HIV-1: 48 week results of a randomised, double-blind, multicentre, active-controlled, phas. *Lancet HIV*. 2018;5(7):e357–65.
8. Margolis DA, Gonzalez-Garcia J, Stellbrink HJ, Eron JJ, Yazdanpanah Y, Podzamczar D, et al. Long-acting intramuscular cabotegravir and rilpivirine in adults with HIV-1 infection (LATTE-2): 96-week results of a randomised, open-label, phase 2b, non-inferiority trial. *Lancet*. 2017;390(10101):1499–510.
9. Zimmer C, Wähnert U. Nonintercalating DNA-binding ligands: Specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. Vol. 47, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1986. p. 31–112.
10. Thuong NT, Hélène C. Sequence-Specific Recognition and Modification of Double-

- Helical DNA by Oligonucleotides. Vol. 32, *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1993. p. 666–90.
11. Ciubotaru M, Musat MG, Surleac M, Ionita E, Petrescu AJ, Abele EA and R. The Design of New HIV-IN Tethered Bifunctional Inhibitors Using Multiple Microdomain Targeted Docking [Internet]. Vol. 26, *Current Medicinal Chemistry*. 2019. p. 2574–600.
 12. Neamati N. HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design. *HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2011.
 13. Kim MS, Chuenchor W, Chen X, Cui Y, Zhang X, Zhou ZH, et al. Cracking the DNA Code for V(D)J Recombination. *Mol Cell*. 2018;70(2):358-370.e4.
 14. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*. 2002;108(6):781–94.
 15. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):251–63.
 16. Goldgur Y, Craigie R, Cohen GH, Fujiwara T, Yoshinaga T, Fujishita T, et al. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13040–3.
 17. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* (80-). 2000;287(5453):646–50.
 18. Nishana M, Nilavar NM, Kumari R, Pandey M, Raghavan SC. HIV integrase inhibitor, Elvitegravir, impairs RAG functions and inhibits V(D)J recombination. *Cell Death Dis*. 2017 Jun 1;8(6):e2852.
 19. de Miguel R, Montejano R, Stella-Ascariz N, Arribas JR. A safety evaluation of raltegravir for the treatment of HIV. *Expert Opin Drug Saf*. 2018;17(2):217–23.
 20. Huhn GD, Badri S, Vibhakar S, Tverdek F, Crank C, Lubelchek R, et al. Early development of non-hodgkin lymphoma following initiation of newer class antiretroviral therapy among HIV-infected patients - implications for immune reconstitution. *AIDS Res Ther*. 2010;7:44.
 21. Gilead Sciences. sNDA 207561/S-014. Genvoya

- (elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir alafenamide). Clinical and Cross-Discipline Team Leader Review [Internet].
22. Natukunda E, Gaur AH, Kosalaraksa P, Batra J, Rakhmanina N, Porter D, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of single-tablet elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir alafenamide in virologically suppressed, HIV-infected children: a single-arm, open-label trial. *Lancet Child Adolesc Heal*. 2017;
 23. Tan W, Zhu K, Segal DJ, Barbas CF, Chow SA. Fusion proteins consisting of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the designed polydactyl zinc finger protein {E2C} direct integration of viral {DNA} into specific sites. *J Virol*. 2004;78(3):1301–13.
 24. Kim MS, Lapkouski M, Yang W, Gellert M. Crystal structure of the V(D)J recombinase RAG1-RAG2. *Nature*. 2015;518(7540):507–11.
 25. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785–91.
 26. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. Schrödinger LLC. 2014;http://www.pymol.org.
 27. Munteanu AC, Musat MG, Mihaila M, Badea M, Olar R, Nitulescu GM, et al. New heteroleptic lanthanide complexes as multimodal drugs: Cytotoxicity studies, apoptosis, cell cycle analysis, DNA interactions, and protein binding. *Appl Organomet Chem*. 2020;35(1):e6062.
 28. Zouhiri F, Mouscadet JF, Mekouar K, Desmaële D, Saviouré D, Leh H, et al. Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture. *J Med Chem*. 2000;43(8):1533–40.
 29. Han Y-S, Xiao W-L, Quashie PK, Mesplède T, Xu H, Deprez E, et al. Development of a fluorescence-based HIV-1 integrase DNA binding assay for identification of novel HIV-1 integrase inhibitors. *Antiviral Res*. 2013;98(3):441–8.
 30. Pluymers W, Pais G, Van Maele B, Pannecouque C, Fikkert V, Burke Jr. TR, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integration by diketo derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(10):3292–7.
 31. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, et al. Hepatitis C

- virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(12):7271–6.
32. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med.* 2003;197(5):633–42.
 33. Francesca Ceccherini-Silberstein, Isabelle Malet, Roberta D’Arrigo, Andrea Antinori, Anne-Genevieve Marcelin C-FP. Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. *AIDS Rev.* 2009;11(1):17–29.
 34. Gupta K, Turkki V, Sherrill-Mix S, Hwang Y, Eilers G, Taylor L, et al. Structural Basis for Inhibitor-Induced Aggregation of HIV Integrase. *PLOS Biol.* 2016 Dec 9;14(12):e1002584.
 35. Tsiang M, Jones GS, Niedziela-Majka A, Kan E, Lansdon EB, Huang W, et al. New Class of HIV-1 Integrase (IN) Inhibitors with a Dual Mode of Action. *J Biol Chem.* 2012 Jun 15;287(25):21189–203.
 36. Melek M, Jones JM, O’Dea MH, Pais G, Burke TR, Pommier Y, et al. Effect of HIV integrase inhibitors on the RAG1/2 recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):134–7.
 37. Muşat MG, Niţulescu GM, Surleac M, Tsatsakis A, Spandidos DA, Margină D. HIV-1 integrase inhibitors targeting various DDE transposases: Retroviral integration versus RAG-mediated recombination (Review). *Mol Med Rep.* 2019;20(6):4749–4762.