

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ ВИРУСОЛОГИИ

УДК 577.2

МЕХАНИЗМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1
К НУКЛЕОЗИДНЫМ И НЕНУКЛЕОЗИДНЫМ ИНГИБИТОРАМ
ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

© 2011 г. Г. Н. Николенко^{1, 2*}, А. Т. Котелкин³, С. Ф. Орешкова^{1*}, А. А. Ильичев^{1, 4}

¹Отдел Иммунотерапевтических препаратов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия

²National Cancer Institute, National Institutes of Health, HIV Drug Resistance Program, Frederick, Maryland 21702, USA

³Howard University Hospital, Center for Sickle Cell Disease, Washington, DC 20001, USA

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090, Россия

Поступила в редакцию и принята к печати 10.08.2010 г.

Глобальная эпидемия СПИДа, вызываемая вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-1), распространяется вот уже более 25 лет, вовлекая в ряды инфицированных ежегодно более 2 миллионов человек. В силу уникальных биологических особенностей вирус необычайно быстро эволюционирует, приобретая лекарственно-устойчивые мутации. Селекция резистентных вариантов ВИЧ происходит настолько быстро, что в настоящее время нет таких лицензионных препаратов, к которым не было бы выявлено лекарственной устойчивости вируса. Это создает серьезные препятствия в борьбе с эпидемией. Данная работа посвящена обзору научной литературы в области лекарственной устойчивости ВИЧ к нуклеозидным (NRTI) и ненуклеозидным (NNRTI) ингибиторам обратной транскриптазы — одного из ключевых ферментов жизненного цикла вируса. Обсуждаются основные механизмы противовирусного действия этих ингибиторов, часто встречающиеся мутации обратной транскриптазы, коррелирующие с развитием лекарственной устойчивости, а также молекулярные аспекты механизмов резистентности ВИЧ к NRTI и NNRTI. Особое внимание уделено недавно выявленной роли вирусной РНКазы (RNase H) в обеспечении устойчивости вируса к ингибиторам обратной транскриптазы. Детально проанализирован недавно предложенный механизм развития резистентности, связанной с мутациями в С-концевом районе обратной транскриптазы, в состав которого входит каталитический сайт РНКазы и аминокислоты структурного кластера, обеспечивающие его правильное расположение относительно субстрата. Комплексный анализ факторов, влияющих на резистентность вируса, важен для понимания механизмов развития лекарственной устойчивости ВИЧ, что позволит оптимизировать дизайн новых противовирусных препаратов и повысить эффективность терапии.

Ключевые слова: ВИЧ-1, лекарственная устойчивость, механизм лекарственной устойчивости, нуклеозидные и ненуклеозидные ингибиторы, обратная транскриптаза, РНКазы; коннектор, дискриминация, фосфорилиз, аффинность.

MECHANISMS OF HIV-1 DRUG RESISTANCE TO NUCLEOSIDE AND NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS, by G. N. Nikolenko^{1, 2*}, A. T. Kotelkin³, S. F. Oreshkova^{1*}, A. A. Ilyichev^{1, 4} (¹Department of Immunotherapeutic Compounds, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia, *e-mail: gnikolenko@comcast.net, sv_oresh@mail.ru; ²National Cancer Institute, National Institutes of Health, HIV Drug Resistance Program, Frederick, Maryland 21702, USA; ³Howard University Hospital, Center for Sickle Cell Disease, Washington, DC 20001, USA; ⁴Novosibirsk State University, Novosibirsk 630090 Russia). Global AIDS epidemics caused by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has existed for more than 25 years and involved more than 2 million newly infected people annually. The major obstacle in combating the global epidemics is a rapid evolution of the virus by the selection of drug resistance mutations. In this review, we have summarized scientific achievements in the field of reverse transcriptase drug resistance to licensed antiviral drugs — nucleoside (NRTI) and non-nucleoside (NNRTI) inhibitors. Principal mechanisms of their antiviral action, major drug resistance mutations, and molecular aspects of classic resistance mechanisms of HIV to NRTIs and NNRTIs are described. Recently discovered role of RNase H activity in development of drug resistance to reverse transcriptase inhibitors is a focus for the detailed discussion. New dual resistance mechanism to NRTIs and NNRTIs asso-

Принятые сокращения: ABC — абакавир; AZT — зидовудин; BP (binding pocket) — связывающий карман; ddI — диданозин; DLV — делавирдин; d4T — ставудин; EFV — эфавиренз; ETR — этравирин; FTC — эмтрицитабин; NNRTI — ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; NRTI — нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; NVP — невирапин; TAM (thymidine analog mutations) — мутации тимидиновых аналогов; TNF — тенофовир; 3TC — ламивудин; ВИЧ-1 — вирус иммунодефицита человека 1 типа.

* Эл. почта: gnikolenko@comcast.net; sv_oresh@mail.ru

ciated with the reverse transcriptase mutations in the C-terminal region, which includes RNase H and connection domains, is analyzed. Comprehensive analysis of the factors affecting the HIV drug resistance is important for the understanding molecular mechanisms of resistance for the improvement of drug design and anti-HIV therapy.

Keywords: HIV-1, drug resistance, resistance mechanism, nucleoside and non-nucleoside inhibitors, reverse transcriptase, RNase H, connection, discrimination, excision, affinity.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита типа 1 (ВИЧ-1) представляет собой инфекционный агент, вызывающий у человека синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). По последним данным Всемирной Организации Здравоохранения, в мире число ВИЧ-инфицированных составляет около 33.4 млн. человек, а число умерших – 2.0 млн., причем количество вновь инфицированных продолжает расти и в 2008 г. составило 2.7 млн. человек (www.unaids.org).

В последние годы достигнуты значительные успехи в разработке новых терапевтических агентов и стратегии лечения ВИЧ-инфекции. Основными мишенями разрабатываемых лекарственных препаратов против ВИЧ-1 служат жизненно-важные ферменты вируса: обратная транскриптаза, протеаза и интегразы, – а также белки оболочки и рецепторы на поверхности Т-лимфоцитов. В период с 1987 по 2008 г. разрешено применение 18 лекарственных препаратов, ингибирующих обратную транскриптазу ВИЧ-1, – это нуклеозидные и нуклеозидные ингибиторы (соответственно NRTI и NNRTI); с 1995 по 2006 г. – 11 препаратов, ингибирующих протеазу вируса; с 2003 по 2007 г. – 2 препарата, препятствующих проникновению вируса в клетку; в 2007 г. – ингибитор интегразы. В настоящее время в США официально используется около 30 различных терапевтических препаратов (<http://www.fda.gov/oashi/aids>). На начальной стадии лечения рекомендуется использование комбинации одного или двух нуклеозидных аналогов, одного нуклеозидного аналога и/или одного ингибитора протеазы (<http://aidsinfo.nih.gov>). Хотя лекарственные препараты против ВИЧ-1-инфекции не могут излечить заболевание, они существенно замедляют патологические процессы, улучшают качество жизни больных и снижают уровень смертности [1]. В глобальном масштабе, благодаря постоянному расширению спектра анти-ВИЧ-1 препаратов, достигнуты значительные успехи: обеспечение лечением нуждающихся увеличилось с 7% в 2003 г. до 42% в 2008 г., а трансмиссию вируса от матери к ребенку удалось снизить с 90% в 2004 г. до 55% в 2008 г. (www.unaids.org).

Несмотря на существенный прогресс в разработке и использовании лекарственных препаратов против ВИЧ-1, вызываемые ими побочные эффекты, а именно: непереносимость и токсичность при дли-

тельном применении, а также несоблюдение режима приема препаратов – сильно снижают эффективность их действия. Другая проблема связана с особенностями жизненного цикла вируса, обуславливающими высокую скорость его адаптации. Вирус реплицируется с высокой скоростью – до 10^{10} вирусных частиц в день в организме взрослого человека [2], с высоким уровнем ошибок при обратной транскрипции (5×10^{-5}), что составляет примерно одну мутацию на каждый цикл репликации [3, 4], обладая при этом высокой частотой рекомбинации [5]. Принимая во внимание размер генома ВИЧ-1 (около 10000 н.) при выполнении простых вычислений, можно предположить, что каждый день в организме взрослого пациента могут генерироваться все возможные точечные мутации вируса, а в присутствии противовирусного препарата неизбежно произойдет отбор лекарственно-устойчивых вариантов вируса. Дополнительные трудности в борьбе с инфекцией возникают из-за трансмиссии лекарственно-устойчивых штаммов ВИЧ, причем в отдельных регионах 10–20% вновь инфицированного контингента заражено именно такими штаммами [6].

Около половины всех лекарственных препаратов против ВИЧ-1 ингибируют полимеразную активность обратной транскриптазы. Разработка лекарственных препаратов, направленных на специфическое блокирование активности вирусной РНКазы, продолжается не один год, но до сих пор не увенчалась успехом из-за их высокой токсичности [7]. Используемые для лечения ингибиторы обратной транскриптазы подразделяют на две группы: нуклеозидные аналоги (NRTI), и нуклеозидные аналоги (NNRTI) (рис. 1).

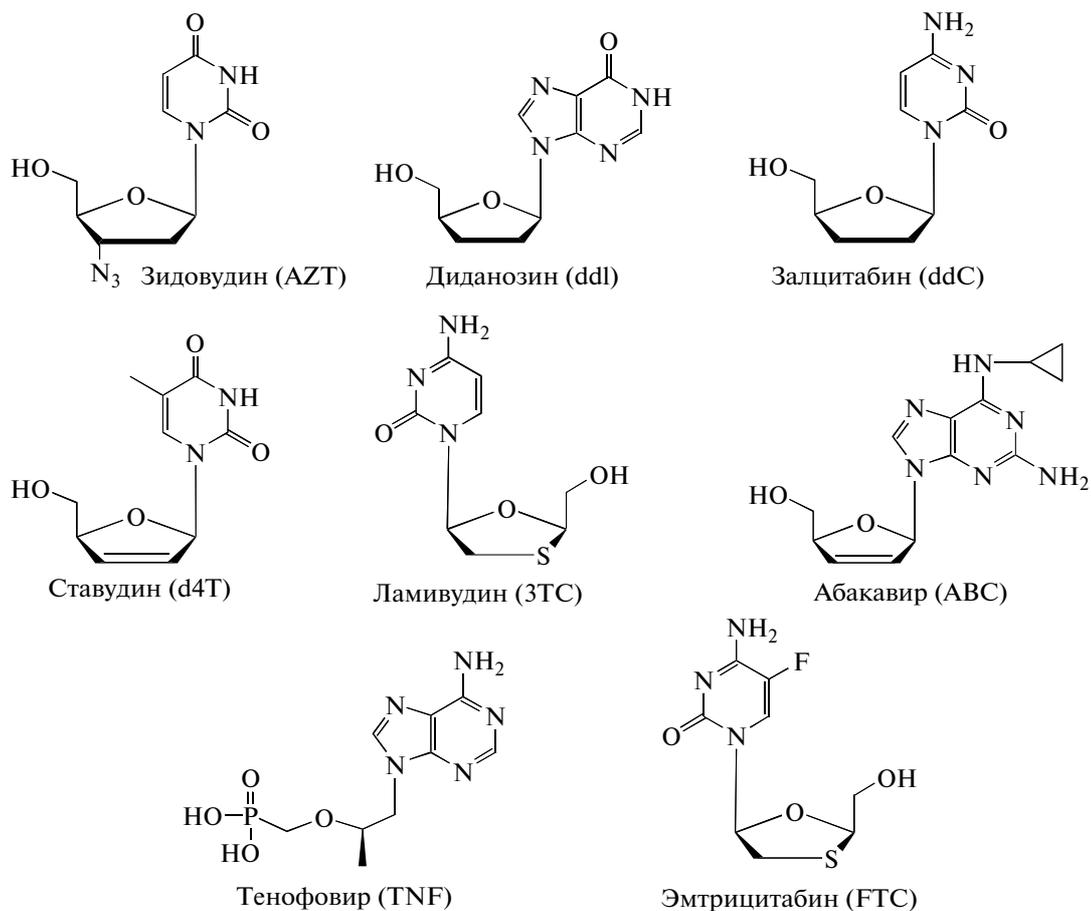
Настоящий обзор посвящен современному состоянию научных исследований по изучению механизмов устойчивости ВИЧ-1 к NRTI и NNRTI обратной транскриптазы. Продолжение научных исследований в этом направлении важно для повышения эффективности существующих методов лечения и выработки новых стратегий терапии СПИД.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1

Вследствие исключительно важной роли в жизненном цикле вируса обратная транскриптаза до сих

а

Нуклеозные ингибиторы (NRTI)



б

Ненуклеозные ингибиторы (NNRTI)

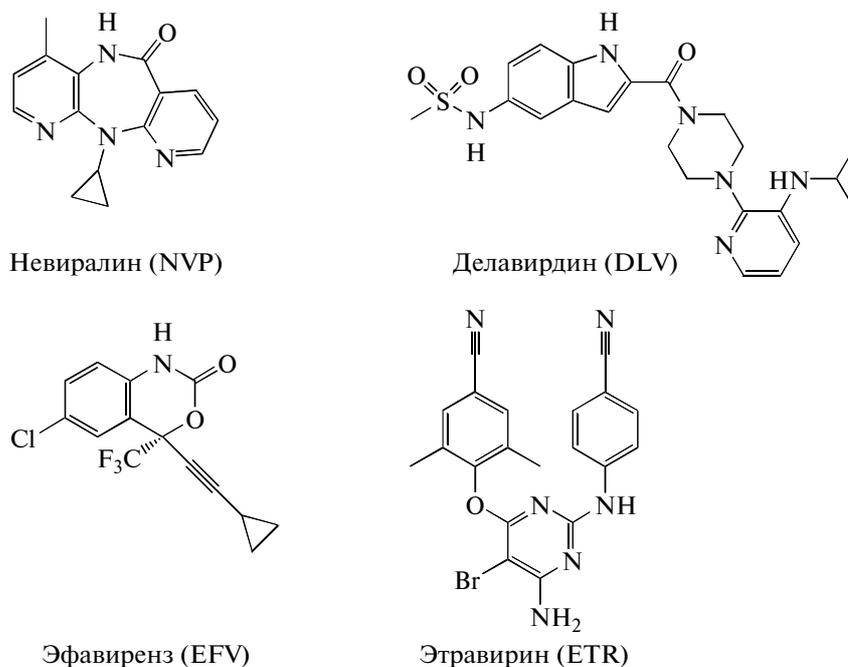


Рис. 1. Структура нуклеозидных (а) и ненуклеозидных (б) ингибиторов обратной транскриптазы, рекомендованных для лечения пациентов, инфицированных ВИЧ-1.

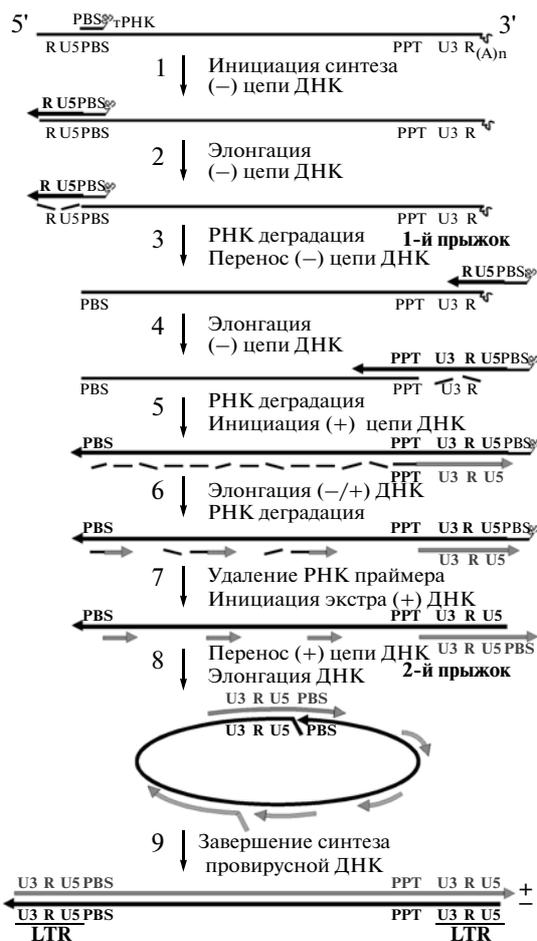


Рис. 2. Схема процесса обратной транскрипции генома ВИЧ-1. Каждая вирусная частица содержит две положительные копии РНК-генома (тонкая горизонтальная линия). Обратная транскрипция инициируется вблизи 5'-конца генома, с использованием в качестве праймера упакованной в вирусную частицу хозяйской тРНК, которая частично комплементарна вирусной последовательности, называемой сайт инициации репликации (primer binding site, PBS). 1 – Синтез “минус”-цепи ДНК (толстая черная горизонтальная стрелка) продолжается до 5'-конца вирусного генома, формируя “минус”-стоп ДНК продукт (–ssDNA); 2 – ДНК-синтез сопровождается РНК-деградацией (ломаная тонкая линия), приводя к экспозиции оцДНК; 3 – это способствует гибридизации 3'-концевого R-района с гомологичным, или вторым РНК-геномом, в результате чего происходит перенос “минус”-цепи ДНК, называемый первый прыжок, и элонгация “минус”-цепи ДНК продолжается; 4 – когда синтез “минус”-цепи ДНК проходит через полипуриновый тракт (PPT), специфическое разрезание РНК формирует уникальный полипуриновый праймер для инициации синтеза “плюс”-цепи ДНК (толстая серая горизонтальная стрелка); 5 – синтез “плюс”-цепи ДНК инициируется и продолжается в направлении U5 района с использованием в качестве матрицы “минус”-цепи ДНК; 6 – между тем, синтез “минус”-цепи продолжается с использованием РНК-генома, при этом РНК-матрица удаляется РНКазой обратной транскриптазы; 7 – продукты РНК-деградации, как предполагают, поставляют РНК-праймеры всему геному для множественной инициации синтеза “плюс”-цепи ДНК. Синтез “плюс”-цепи ДНК, инициированный с PPT-праймера, останавливается после копирования PBS, принадлежащего тРНК, формируется “плюс”-стоп ДНК продукт (+ssDNA), а тРНК удаляется благодаря РНКазной активности; 8 – экспозиция этого одноцепочечного участка ДНК способствует переносу “плюс”-цепи ДНК на гомологичный участок уже синтезированной “минус”-цепи ДНК, происходит так называемый второй прыжок, и синтез “плюс”-цепи ДНК продолжается; 9 – синтез “плюс”-цепи ДНК завершается, и в результате последующей репарации и лигирования кольцевого промежуточного продукта формируется двуцепочечную провирусная ДНК с длинными концевыми повторами (LTRs).

пор остается главной мишенью при разработке лекарственных препаратов против ВИЧ-1. Обратная транскриптаза – это многофункциональный фермент класса трансфераз, который осуществляет ДНК- и РНК-зависимый синтез ДНК (обратная

транскрипция), обладает активностью РНКазы (RNase H), расщепляя РНК, входящую в состав ДНК·РНК дуплекса, а также осуществляет смену матрицы, что абсолютно необходимо на нескольких ключевых стадиях вирусной репликации (рис. 2). И

полимеразная, и РНКазная активности требуются для преобразования одноцепочечной вирусной РНК в двуцепочечную провирусную ДНК, которая встраивается в геном хозяина.

Подобно всем ДНК-полимерадам, обратная транскриптаза способна функционировать только при наличии затравки, или праймера. Зрелый фермент представляет собой гетеродимер (рис. 3а), состоящий из двух субъединиц: р66, размером 66 кДа (560 а.о.), и р51, размером 51 кДа (440 а.о.) [8, 9], — которые имеют одинаковый N-конец и образуются в результате протеолитического расщепления Gag-Pol полипротеина. Большая субъединица, р66, состоит из двух пространственно разобнесенных доменов: полимеразного (1–426 а.о.) и РНКазного (427–560 а.о.), — каждый из которых обладает каталитической активностью. Полимеразный домен дополнительно разделен на поддомены, названия которым даны из-за сходства трехмерной структуры обратной транскриптазы с правой рукой: “пальцы” (fingers, 1–85 и 118–155 а.о.), “ладонь” (palm, 86–117 и 156–236 а.о.), “большой палец” (thumb, 237–318 а.о.) и коннектор (connection, 319–426 а.о.) [10–12]. Малая субъединица р51 содержит те же самые поддомены, что и р66 (за исключением РНКазного, который отщепляется вирусной протеазой), однако третичная структура малой субъединицы отличается от большой субъединицы, в результате чего р51 не имеет каталитической активности, а выполняет роль структурного каркаса.

Каталитический сайт полимеразации сформирован тремя консервативными аминокислотами D110, D185 и D186, которые координируют два двухвалентных иона магния [13]. Несколько дополнительных консервативных аминокислот формируют dNTP-связывающий сайт: R72 и K65 связывают β- и γ-фосфат входящего dNTP, Y115 взаимодействует с дезоксирибозой, а Q151 — непосредственно с 3'-ОН входящего dNTP [10].

РНКазный домен содержит восемь аминокислот, консервативных для всех бактериальных и ретровирусных ферментов: D443, G444, E478, D498, S499, H539, Q545 и D549, — четыре из которых необходимы для формирования каталитического сайта вирусной РНКазы (D443, E478, D498 и D549), координируя два двухвалентных катиона магния [14]. Желоб для связывания нуклеиновой кислоты формируется многочисленными аминокислотами таким образом, что нуклеиновая кислота контактирует как с полимеразным, так и с РНКазным каталитическими участками, расположенными на расстоянии 17–18 н. друг от друга [10]. Взаимодействие фермента как с матрицей, так и с праймером обеспечивает правильное расположение субстрата, что очень важно для реализации акта катализа.

НУКЛЕОЗИДНЫЕ И НЕНУКЛЕОЗИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Механизм полимеризации ДНК, осуществляемый обратной транскриптазой ВИЧ-1, аналогичен таковому для других ДНК-полимераз [15, 16] и включает следующую последовательность этапов (рис. 4а): 1) связывание фермента с комплексом матрица–праймер, 2) связывание с этим комплексом dNTP и двухвалентных катионов магния (Mg^{2+}), 3) конформационные изменения фермента, 4) формирование фосфодиэфирной связи между 3'-концевой ОН-группой праймера и α-фосфатом dNTP, 5) высвобождение пиррофосфата, 6) транслокация удлиненного праймера из донорного в акцепторный сайт и продолжение полимеризации или высвобождение матрицы–праймера из транскрипционного комплекса.

Первые лекарства против ВИЧ-инфекции разрабатывались как ингибиторы обратной транскрипции и представляли собой нуклеозидные аналоги. NRTI по структуре аналогичны природным нуклеозидам, а функционально могут быть либо конкурентными ингибиторами, либо альтернативными субстратами обратной транскриптазы. Главная отличительная особенность NRTI — отсутствие в их структуре 3'-ОН группы в дезоксирибозе/псевдосахаре, что обеспечивает их ингибирующее действие в качестве терминирующего субстрата, так как их включение в ДНК приводит к обрыву растущей цепи. Противовирусная активность NRTI проявляется только в трифосфатной форме (NRTI-TP), что требует участия клеточных киназ [17]. На данный момент времени утверждено 8 NRTI, предназначенных для лечения ВИЧ-инфицированных (рис. 1а).

Позднее разработаны ненуклеозидные ингибиторы, NNRTI, которые, в отличие от NRTI, не требуют внутриклеточной модификации для реализации активности. Они инактивируют обратную транскриптазу по принципу аллостерического ингибирования, взаимодействуя с определенным районом фермента, расположенным в р66-субъединице на расстоянии около 10 Å от ДНК-полимеразного сайта и получившим название NNRTI-связывающего кармана (NNRTI-binding pocket, NNRTI-BP). Этот сайт формируется аминокислотами большой субъединицы обратной транскриптазы: L100, K101, K103, V106, T107, V108, V179, Y181, Y188, V189, G190, F227, W229, L234, Y318 — и аминокислотным остатком E138 малой субъединицы [12, 18]. В целом NNRTI представляют собой группу небольших гидрофобных молекул (около 600 Да), весьма разнообразных по химической структуре. NNRTI ингибируют вирусную репликацию, главным образом, на этапе обратной транскрипции. Связывание NNRTI

FDA (US Food and Drug Administration) как средства против ВИЧ-1 и предложены к использованию ведущими фирмами на фармацевтическом рынке: невирапин (NVP), делавирдин (DLV), которые относятся к первому поколению ингибиторов; эфавиренз (EFV) и этравирин (ETR), которые представляют второе и третье поколение NNRTI (рис. 1б).

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К NRTI И NNRTI И ХАРАКТЕРНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫЕ МУТАЦИИ

На основании данных биохимических и структурных исследований предложено два основных механизма устойчивости ВИЧ-1 к NRTI — это дискриминация и фосфорилиз. В соответствии с механизмом дискриминации лекарственно-устойчивые мутации влияют на включение трифосфорилированной формы ингибитора, NRTI-TP, в растущую ДНК-цепь. Появление таких мутаций в ферменте снижает эффективность процесса полимеризации (K_{pol}/K_d), что может быть результатом либо снижения константы скорости включения ингибитора (K_{pol}), либо увеличения константы диссоциации комплекса обратной транскриптазы с NRTI (K_d) [21, 22]. Основные лекарственно-устойчивые мутации, запускающие механизм дискриминации, — это M184V, первоначально идентифицированная при селекции вируса с ЗТС [23]; K65R и L74V, соответствующие появлению устойчивости к тенофовиру (TNF) и дидезоксинуклеозидным аналогам [24, 25]; Q151M в сопровождении мутаций A62V, V75I, F116Y — так называемые мутации комплекса Q151M, обуславливающие множественную устойчивость к NRTI [26, 27]. Все вышеперечисленные мутации располагаются внутри или в непосредственной близости от dNTP-связывающего сайта фермента. Так, при замене M184V изменяются параметры взаимодействия фермента с рибозным кольцом входящего dNTP, при K65R и L74V — с трифосфатным остатком входящего dNTP, а мутации комплекса Q151M (с дополнительными заменами A62V, V75I, F77L и F116Y) изменяют архитектуру dNTP-связывающего сайта [10].

В соответствии с механизмом фосфорилиза лекарственно-устойчивые мутации обратной транскриптазы способствуют удалению 3'-терминирующего NRTI в присутствии физиологических концентраций пирозината или АТР, которые служат акцепторным субстратом реакции [28, 29]. В результате атаки фосфодиэфирной связи между терминирующим аналогом и праймером происходит присоединение аналога к акцепторному субстрату, после чего следует его удаление с конца цепи; в результате образуется динуклеотидполифосфат (или, в случае

пирозинатного акцептора, NTP) и свободная ОН-группа на 3'-конце праймера, который теперь способен участвовать в следующем акте полимеризации (рис. 4б). Лекарственно-устойчивые мутации, с помощью которых реализуется механизм фосфорилиза, возникают главным образом в ответ на лечение тимидиновыми аналогами и называются мутациями тимидиновых аналогов, TAM (thymidine analog mutations), к ним относятся M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y, K219Q/E [30–32]. Эти мутации, расположенные в относительном отдалении от dNTP-связывающего сайта обратной транскриптазы, в поддоменах “палец” и “ладонь” (рис. 3б,в), способствуют связыванию с АТР и тем самым повышают эффективность реакции фосфорилиза [33].

Исследование механизмов устойчивости ВИЧ-1 к NNRTI как на структурном, так и на биохимическом уровне показали, что возникающие лекарственно-устойчивые мутации в транскриптазе снижают аффинность фермента к NNRTI [34–36]. Большинство лекарственно-устойчивых мутаций к NNRTI расположено внутри или вблизи NNRTI-связывающего сайта (NNRTI-BS) (рис. 3б,в). Эти мутации бывают как единичными, так и в комбинации с другими мутациями. Их подразделяют на группу основных, или первичных, мутаций — они обеспечивают высокую степень устойчивости — и дополнительных, или вторичных, мутаций — они сопутствуют основным и усиливают устойчивость вируса к NNRTI. Наиболее часто встречаются единичные мутации Y181C и K103N, вызывающие высокую устойчивость к NNRTI [37–39]. Мутации K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H и G190A/S/E обуславливают высокий уровень устойчивости вируса к невирапину (NVP), а уровень устойчивости к эфавирензу (EFV) по сравнению с диким типом вируса повышается в два (V106A, Y181C), шесть (G190A), двадцать (K103N) раз и более, чем в пятьдесят раз (Y188L, G190S) [37, 40–42]. Вторичные мутации L100I, K101P, P225H, F227L, M230L, K238T, которые встречаются в основном в комбинации с первичными мутациями, синергетически усиливают устойчивость вируса к NVP и EFV [43]. Этравирин (ETR), NNRTI третьего поколения, эффективен против вирусов, несущих одиночные или двойные мутации, однако неэффективен против вирусов с многочисленными мутациями устойчивости [40–42]. Мутации в позициях 181 и 190 транскриптазы обуславливают развитие высокой ETR-устойчивости вируса, а комбинации вышеупомянутых мутаций с редкими мутациями: V179F, F227C, L234I, L318F — увеличивают устойчивость вируса к ETR еще на 1–2 порядка. Такой же эффект наблюдается и для комбинации K103N с L100I и K101P [40, 44]. Со структурной точки зрения мута-

ции Y181C, Y188L и F227L, локализованные в гидрофобном центре NNRTI-ВР, приводят к потере ключевых контактов с ароматическим кольцом NNRTI [12]; мутация L100I изменяет архитектуру ВР [45], а G190A привносит в него выпуклость — за счет увеличения длины бокового радикала [46, 47], создавая пространственные препятствие для связывания NNRTI с обратной транскриптазой; мутация K103N значительно снижает константу ассоциации с NVP [48, 49].

В настоящее время при традиционном лечении СПИДа рекомендуется использовать комбинацию трех разных препаратов (два NRTI и NNRTI/ингибитор протеазы), поэтому фенотип лекарственной устойчивости вируса реализуется за счет множественных мутаций в обратной транскриптазе. Механизмы дискриминации и фосфоролиза, а также NNRTI-устойчивости зачастую реализуются совместно и не являются взаимоисключающими.

РОЛЬ ВИРУСНОЙ РНКазы В ПРОЦЕССЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Использование активности РНКазы в инфекционном цикле — это уникальная стратегия ВИЧ-1, предназначенная для копирования одноцепочечного РНК-генома в дцДНК, поскольку на первом этапе ДНК-синтеза “минус”-цепь ДНК остается спаренной с РНК вируса. Активность РНКазы “освобождает” от РНК-партнера вновь синтезированную ДНК, которая теперь становится доступной для использования в качестве матрицы для синтеза второй цепи ДНК — “плюс”-цепи.

Полимеразная и РНКазная активности функционально взаимосвязаны (рис. 2). Во время синтеза “минус”-цепи ДНК вирусная РНКазы начинает деградацию РНК-генома (такую активность РНКазы называют зависимой от полимеризации) [50, 51]. Однако в силу того, что скорость полимеризации значительно выше, чем скорость зависимого от полимеризации гидролиза РНК [16, 52], этой активности РНКазы недостаточно для полной деградации РНК-генома [16, 53]. Обратная транскриптаза обладает также способностью гидролизовать геномную РНК, оставшуюся связанной с “минус”-цепью ДНК, независимо от полимеризации (такую активность РНКазы называют “независимой от полимеризации”) [54]. Деградация РНК-генома путем независимой от полимеризации активности РНКазы, а также вытесняющей полимеризации — важное звено в обеспечении эффективного синтеза “плюс”-цепи ДНК [53, 55–57]. Независимая от полимеризации активность РНКазы необходима для формирования праймера в районе полипуринового тракта (РРТ), где происходит инициация синтеза “плюс”-цепи ДНК

[58, 59]. Кроме того, РНКазная активность необходима для удаления тРНК и РРТ-праймера после их использования. Существует множество примеров, указывающих на необходимость четкой координации между скоростью полимеризации, с одной стороны, и активностью и специфичностью вирусной РНКазы во время обратной транскрипции — с другой. Например, усиленная бесконтрольная деградация РНК-матрицы может приводить к преждевременной диссоциации праймера и терминации синтеза. С другой стороны, ослабленная активность РНКазы может способствовать замедлению синтеза “плюс”-цепи ДНК из-за присутствия остатков РНК-матрицы на “минус”-цепи, а изменение специфичности вирусной РНКазы может влиять на формирование РРТ-праймера и его последующее удаление, приводя к формированию нефункциональных концевых повторов вирусного генома. Необходимость переноса синтезированной ДНК-цепи с РНК-матрицы в процессе вирусной репликации также требует строго координированного взаимодействия полимеразной и РНКазной активности обратной транскриптазы [6]. Аминокислоты полимеразного домена могут влиять на структуру РНКазного домена и его функции как непосредственно, так и опосредованно: через взаимодействие с нуклеиновой кислотой. Так, изолированный домен РНКазы не активен, однако его нуклеазная активность восстанавливается в присутствии субъединицы р51 или поддоменов “большой палец” и коннектор [60]. Другой пример — это участие аминокислот коннектора в формировании захватывающего праймер участка РНКазы (RNaseH primer grip): они контактируют с ДНК-праймером (G359, A360 и H361 в р66 субъединице и K395 и E396 в р51 субъединице) и/или РНК-матрицей (K390 в р51 субъединице) вблизи каталитического сайта РНКазы [61]. Мутации аминокислот в захватывающем праймер участке РНКазы приводят к уменьшению ее активности и изменению специфичности гидролиза РНК, что снижает эффективность удаления РРТ и/или переноса цепи, а также инициации синтеза ДНК [62–64].

Все вышесказанное свидетельствует о важной роли вирусной РНКазы в процессе обратной транскрипции и необходимости функционально скоординированной взаимосвязи между обоими доменами обратной транскриптазы — полимеразным и РНКазным — для успешного осуществления репликации. Это фундаментальное свойство обратной транскриптазы легло в основу гипотезы о том, что во время селективного отбора под давлением анти-ВИЧ препарата мутации возникают и закрепляются в обоих функциональных доменах фермента [65].

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К NRTI, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ МУТАЦИЯМИ В С-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

В работе Николенко с соавторами [65] предложен новый механизм лекарственной устойчивости к NRTI. Согласно предложенной гипотезе, действию NRTI противостоят мутации обратной транскриптазы, “работающие” в соответствии с механизмом фосфорилиза, и тогда баланс между активностью РНКазы и эффективностью фосфорилиза становится важной детерминантой лекарственной устойчивости к этим препаратам (рис. 5). Реакция фосфорилиза включенного в ДНК нуклеозидного аналога — это критическая стадия, определяющая дальнейший успех обратной транскрипции и, как следствие, выживаемость вируса. Поскольку фосфорилиз — это кинетически медленная реакция, обратная транскрипция останавливается до момента ее завершения, а в это время РНКазы продолжает разрушать РНК-матрицу. В зависимости от конкретного соотношения между активностью РНКазы и эффективностью фосфорилиза события могут развиваться по следующим сценариям.

Если РНК разрушена до такой степени, что фермент уже не может оставаться связанным с субстратом — РНК-ДНК-дуплексом — и реинициировать полимеризацию, то дуплекс диссоциирует, и полимеризация прекращается, что приводит к гибели вируса (рис. 5, левая панель — чувствительный фенотип).

Если фермент содержит мутации, ускоряющие фосфорилиз, то при завершении фосфорилиза полимеризация еще связана с РНК-ДНК-дуплексом, размер которого соответствует субстрату, — в результате полимеризация продолжается после разблокирования 3'-конца праймера (рис. 5, средняя панель — устойчивый фенотип).

Альтернативой мутациям в домене полимеразы (ускоряющим фосфорилиз) могут быть мутации, снижающие активность РНКазы, что увеличивает время жизни РНК-ДНК-дуплекса и тем самым позволяет продолжать полимеризацию после разблокирования праймера (рис. 5, правая панель — устойчивый фенотип). Таким образом, снижение активности РНКазы увеличивает пребывание заблокированного полимеризационного комплекса в необходимой для возобновления полимеризации конформации — вплоть до завершения реакции фосфорилиза.

Предложенный механизм и вклад вирусной РНКазы в развитие устойчивого к нуклеозидным аналогам фенотипа ВИЧ-1 подтвержден в экспериментах на культуре клеток. Показано, что у вирусов с мутациями в каталитическом сайте РНКазы,

D549N и H539N, и в захватывающем праймер участке РНКазы повышен уровень лекарственной устойчивости к AZT, а наличие в одном ферменте мутаций, снижающих активность РНКазы и усиливающих эффективность фосфорилиза, приводит к синергетическому эффекту — существенному усилению устойчивости [65, 66].

Участие С-концевого района обратной транскриптазы в ходе развития лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к NRTI подтверждено и при анализе клинических изолятов вируса [67]. Рекомбинантные вирусы, содержащие С-концевые районы обратной транскриптазы от пациентов, принимающих NRTI-терапию, обладали значительно большей устойчивостью к AZT (дополнительное увеличение в 20–40 раз) по сравнению с контрольными вирусами, несущими С-концевые районы обратной транскриптазы от пациентов, не получавших лечения. В этой работе впервые показано, что мутации в С-концевом районе фермента значительно увеличивают устойчивость к NRTI, в особенности в комбинации их с TAM, и селекционируются у пациентов, принимающих NRTI. Идентифицированы мутации, ответственные за увеличение лекарственной устойчивости, которые располагаются в коннекторе обратной транскриптазы: E312Q, G335C/D, N348I, A360V/I, V365I, A376S. Вирусы, несущие эти мутации были устойчивыми к AZT и содержали низкоактивную РНКазу. Эти результаты вполне согласуются с описанным выше механизмом [67].

Мутации С-концевого района обратной транскриптазы, устойчивые к NRTI, также возникали при селекции *in vitro* [68]. При давлении возрастающей концентрацией AZT дикий тип вируса приобрел сначала классические TAM, а затем две дополнительные мутации: в коннекторе (A371V) и РНКазе (Q509L), — которые повышали устойчивость вируса к AZT, а также приводили к появлению перекрестной устойчивости — против ЗТС, АВС и TNF [68].

Механизм действия С-концевых мутаций обратной транскриптазы исследован также на биохимическом уровне. Присутствие в обратной транскриптазе вируса описанных выше мутаций коннектора: E312Q, G335C/D, N348I, A360V/I, V365I, A376S значительно усиливало устойчивость вируса к AZT и существенно снижало активность его РНКазы [69]; кроме того, увеличивалась эффективность реакции фосфорилиза *in vitro*, в которой используется РНК-, но не ДНК-матрица, что подтверждает гипотезу о роли мутаций, снижающих активность РНКазы, в обеспечении лекарственной устойчивости. Аналогичные результаты получены в независимых исследованиях для мутаций N348I, A360V и Q509L, усиливающих лекарственную устойчивость вируса к AZT, снижающих активность РНКазы и способствующих

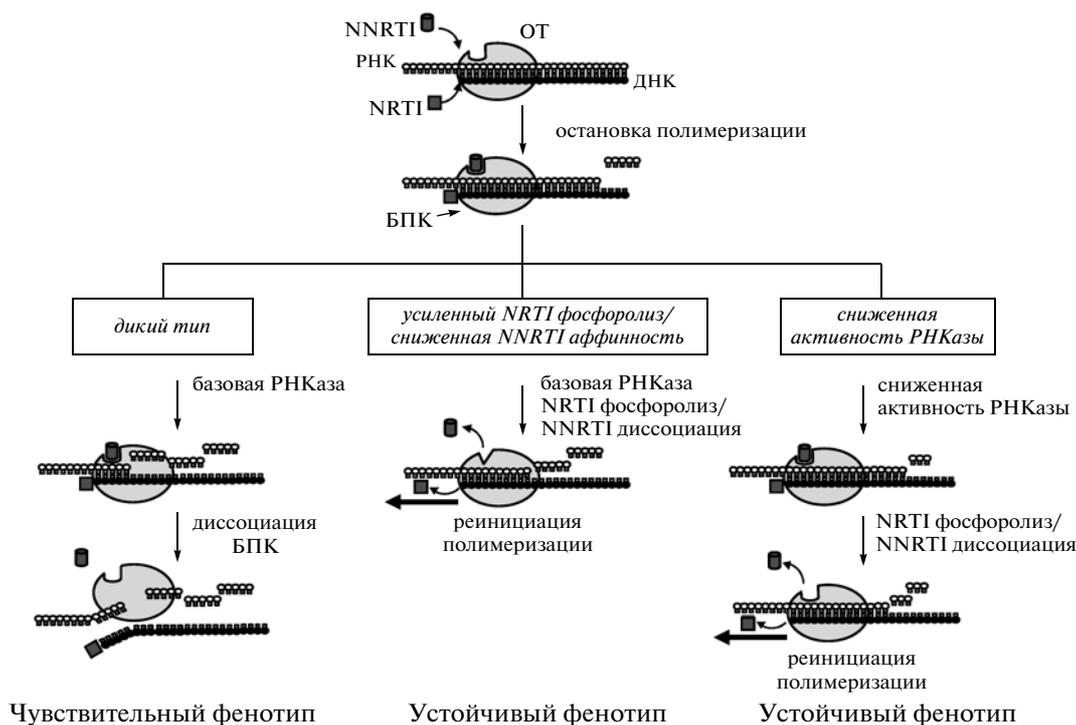


Рис. 5. Механизм ингибирования репликации ВИЧ-1, обусловленный действием нуклеозидных и нуклеозидных ингибиторов (для простоты последовательные этапы обратной транскрипции в присутствии NRTI и NNRTI показаны на одной схеме). ДНК-праймер и РНК-матрица (соответствуют белым и черным цепочкам), обратная транскриптаза, (ОТ, большой серый овал), NRTI и NNRTI (серый квадрат и цилиндр соответственно) показаны схематически. Толстая стрелка обозначает последовательные события во время репликации ВИЧ-1 в присутствии ингибитора. Однажды начавшись, полимеризация продолжается до тех пор, пока NRTI/NNRTI не свяжется с комплексом обратная транскриптаза–субстрат, формируя блокированный полимеризационный комплекс (БПК). Левая панель представляет события, соответствующие дикому типу обратной транскриптазы, приводящие к лекарственно-чувствительному фенотипу. Средняя и правая панели представляют события, соответствующие обратной транскриптазе с усиленной способностью к фосфорилизу/сниженной аффинностью к NNRTI и сниженной активностью РНКазы, приводящие к лекарственно-устойчивому фенотипу. Последовательные этапы обратной транскрипции в присутствии ингибитора включают в себя формирование БПК, остановку полимеризации, РНК-деградацию и последовательную диссоциацию комплекса в случае лекарственно-чувствительного фенотипа или фосфорилиз/диссоциацию ингибитора и продолжение полимеризации в случае лекарственно-устойчивого фенотипа.

реакции фосфорилиза [70–72]. Показано, что эти мутации ослабляли связывание мутантного фермента с субстратом в ориентации, благоприятной для деградации РНК, но не в ориентации способствующей полимеризации и фосфорилизу. Как результат, активность РНКазы снижалась, и равновесие между активностью РНКазы и реакцией фосфорилиза смещалось, приводя в конечном итоге к увеличению лекарственной устойчивости вируса.

Если снижение активности РНКазы способствует фосфорилизу и увеличению лекарственной устойчивости, то усиление активности РНКазы оказывает противоположный эффект. Доказательство этого получено в экспериментах, в которых использованы высокие концентрации EFV, при которых ускоряется РНК-деградация [73]. В присутствии EFV эффективность фосфорилиза существенно

снижалась, причем исключительно на РНК·ДНК-, но не на ДНК·ДНК-субстрате.

Есть данные, свидетельствующие о том, что мутации в С-концевом районе фермента влияют не только на активность РНКазы и тем самым на лекарственную устойчивость вируса, но могут оказывать влияние и на реакцию фосфорилиза, но посредством уже других механизмов. Так, например, при наличии мутации N348I увеличивается процессивность синтеза ДНК [71]. Другой пример – мутация G333D, наличие которой восстанавливает способность TAM к эффективному фосфорилизу в присутствии мутации M184V и увеличивает устойчивость вируса как к AZT, так и к ЗТС. Показано, что замена G333D способствует более прочному связыванию фермента с субстратом в противовес влиянию

M184V-мутации, ослабляющей это взаимодействие [74].

Новый механизм устойчивости к NRTI базируется на экспериментальных результатах, подтверждающих важность С-концевого района обратной транскриптазы в обеспечении лекарственной устойчивости ВИЧ-1. В ряде работ проведен сравнительный анализ аминокислотной последовательности коннектора и РНКазного домена обратной транскриптазы из вирусных изолятов, выделенных из групп пациентов, получавших и не получавших лечения. Мутации в этом районе фермента, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к ингибиторам обратной транскриптазы, а также лечением и/или присутствием классических лекарственно-устойчивых мутаций, систематизированы в таблице. РНКазный домен обратной транскриптазы характеризуется высокой степенью полиморфизма — 35.3% [75], но при этом треть С-концевого района обратной транскриптазы, включающего в себя коннектор и РНКазный домен, консервативна к заменам, независимо от подтипа вируса и статуса лечения [76]. Консервативные районы, переменные не более чем на 5%, представляют собой: (1) захватывающий праймер участок РНКазы, причем формирующие его аминокислотные остатки РНКазного домена консервативны, а принадлежащие коннектору — переменны (за исключением консервативной Н361 позиции); (2) каталитический сайт РНКазы [14] и аминокислоты 492–511 и 535–553, непосредственно к нему примыкающие; (3) район протеолитического расщепления обратной транскриптазы, расположенный между коннектором и РНКазным доменом (438–445 а.о.); (4) район обратной транскриптазы, который взаимодействует с вирусной интегразой (387–430 а.о) [77]. Ряд статистически достоверных аминокислотных замен R358K, G359S, A360T, A360V, K366R, A371V, K390R, A400T, I506L, K527N, K530R, Q547K [76], A554T/L/K, K558R/G/E [75] выявлен в группе прошедших лечение пациентов, причем представительство I326V, T470N и K512R уменьшалось, а K527N, A371V, K530R и G359S увеличивалось в 5–10 раз по сравнению с группой не получавших лечения пациентов, замены A360V, A371V, K390R и A400T идентифицированы в группе пациентов, принимавших только AZT [76]. Присутствие мутаций в позициях L469, L491, Q524 и K527 [78] и 322, 356, 359 [79] строго коррелировало с присутствием TAM, а в позициях 438, 359 и 371 — также с присутствием NNRTI-устойчивых мутаций [79]. В работе [72] детально проанализирована роль мутации N348I, частота встречаемости которой в группе пациентов, принимавших лечение, достигает 12.1% по сравнению с 0.8% в контрольной группе. Для сравнения: уровень стандартных TAM в группе про-

шедших лечение пациентов увеличивается до 13–32%, а мутации M184V — до 50%. В результате показано, что при лечении мутация N348I возникает одной из первых, еще до селекции TAM, и ассоциирована с: (1) наличием стандартных мутаций устойчивости к тимидиновым аналогам — M41L и T215Y/F, к цитидиновым аналогам — M184V, и NNRTI-устойчивых мутаций — K103N и Y181C/I; (2) лечением AZT или NVP; (3) увеличением устойчивости к AZT, 3TC, NVP и EFV; (4) снижением эффективности лечения, выраженной через количество копий вируса, что сравнимо с эффектом, наблюдаемым в анти-ВИЧ-1-терапии при селекции индивидуальных TAM [80, 81].

Важно отметить, что выявление новых мутаций, возникающих в ходе лечения СПИДа, зависит от критериев статистической достоверности, выбираемых исследователями. Например, при использовании жесткого статистического критерия (значения $P < 0.01$ и дополнительное требование 95%-ной гомологии по определенной аминокислотной позиции в группе не получавших лечение или 100%-ная консервативность данной позиции в любой из групп) выявлены только три ассоциированные с лечением аминокислотные замены в С-концевом районе обратной транскриптазы: R284K, N348I и K451R [80]. В таком представлении две стандартные лекарственно-устойчивые мутации в полимеразном домене (K65R и Q151M) также не удовлетворяли критерию статистически достоверно встречаемых. По-видимому, в действительности, количество ассоциированных с лечением мутаций в С-концевом районе обратной транскриптазы гораздо больше, однако достоверно определить это можно только при использовании большей выборки клинических образцов.

Таким образом, анализ С-концевого района обратной транскриптазы позволил выявить ряд мутаций, ассоциированных с лечением и селекцией стандартных лекарственно-устойчивых мутаций, что подтверждается фенотипическими и биохимическими тестами.

МЕХАНИЗМ ПЕРЕКРЕСТНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К NRTI И NNRTI, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ МУТАЦИЯМИ В С-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

Как описано в первых разделах обзора, перекрестная лекарственная устойчивость к ингибиторам одного класса достаточно распространена, поскольку соединения одного класса ингибируют обратную транскрипцию аналогичным образом. Перекрестная устойчивость к разным классам инги-

Мутации С-концевого района обратной транскриптазы, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к NRTI и NNRTI

Мутация	Частота встречаемости*, %	Устойчивость к ингибиторам**	Ассоциация с лечением***	Ссылка
R284K	1.5/3.7	н.д.	+	80
E312Q	н.д.	AZT	н.д.	67, 69, 87
I326V	17.2/6.4	н.д.	+	76
G333C/D	н.д.	AZT, ЗТС, NVP	н.д.	67– 69, 71, 74, 85, 87
N348I	0.1–0.8/4.2–12.1	AZT, DLV, NVP, EFP	+	67, 69, 71, 72, 80, 81, 85, 86
R358K	5.4–9.2/10.9–18.7	н.д.	+	71, 76
G359S	3.4–6.0/12–16.4	н.д.	+	69, 71, 76, 79
A360V	0/9.1	AZT, NVP, EFP	+	67, 69, 71, 76, 78, 79, 85, 87
A365I	н.д.	AZT, ЗТС	н.д.	67, 69, 87
K366R	4.6/16.7	н.д.	+	76
T369I	н.д./16	AZT, NVP	+	86
A371V	2.3–5.4/12.7–22.6	AZT	+	71, 76, 78, 79, 80, 87
A376S	н.д.	AZT, NVP	н.д.	67, 69, 85, 87
K390R	27.6/40.9	н.д.	+	76
E399D	н.д./15	AZT, NVP	+	86, 88
A400T	43.2/69	AZT	+	76, 80
R448K	0/2.5	н.д.	+	75
K451R	2.1/6.2	н.д.	+	80
T470N	6.5/0.6	н.д.	+	76
K476Q/R	0/0.8	н.д.	+	66
I505V	0/0.8	н.д.	+	75
I506L	0/6.9	н.д.	+	76
Q509I/L/K/R	4/9	AZT, ЗТС	+	70, 75, 80, 81, 87
K512R	8.6/0	н.д.	+	76, 79
K527N	1.1/17.2	н.д.	+	76
K530R	1.1/12.1	н.д.	+	76
Q547K	0/6.9	н.д.	+	76
A554T/L/K	н.д.	н.д.	+	75
K558R/G/E	0/21	н.д.	+	75

Примечание. н.д. – нет данных.

* Цифра или группа цифр перед наклонной чертой соответствуют частоте встречаемости мутации у пациентов, не получавших лечения, после черты – у пациентов, прошедших лечение.

** Указан ингибитор обратной транскриптазы, к которому в тесте на культуре клеток показана устойчивость.

*** Наличие достоверных различий в частоте встречаемости мутации у прошедших лечение пациентов по сравнению с группой пациентов, не получавших лечения, либо данных, строго подтверждающих указанную мутацию как лекарственно-устойчивую, обозначено как позитивная ассоциация с лечением (+).

биторов, связанная с мутациями полимеразного домена, — довольно редкое явление, описанное только для замен Y181C/I, G190S/A/E и Q145L/M [82–84]. В последнее время более пристальным интересом пользуется С-концевой район обратной транскриптазы, и в настоящее время в литературе уже описан ряд мутаций в коннекторе и РНКазном домене, коррелирующих с появлением у ВИЧ-1 перекрестной устойчивости к NRTI и NNRTI. Это замены A360V/I, G335C, Q475A, Y501A, D549N [85], N348I [72, 81, 85–87], A376S [85, 87], Q509L [87], T369I [86], E399D [86, 88]. Феномен перекрестной лекарственной устойчивости к NRTI и NNRTI представляет исключительный интерес. Известно, что NNRTI оказывают множество эффектов на жизненный цикл вируса [89], а также модулируют разнообразные аспекты функционирования обратной транскриптазы. Кроме ингибирования полимеризации, NNRTI стимулируют [73, 90–93] или ингибируют [93] активность РНКазы, вызывают изменение ее специфичности [90] и скорости накопления вторичных продуктов РНК-гидролиза [73, 91], способствуют преимущественному связыванию обратной транскриптазы с субстратом в ориентации, которая благоприятна для РНК-деградации [94–96]. Некоторые NNRTI также влияют на формирование функционального гетеродимера обратной транскриптазы [97–99]. Так показано, что NNRTI не влияют непосредственно на изолированный РНКазный домен, а все наблюдаемые эффекты являются результатом изменения характера взаимодействий между различными доменами, а возможно, и субъединицами фермента и субстратом [93]. Объяснение явления перекрестной устойчивости ВИЧ-1 к обоим классам ингибиторов обратной транскриптазы предложено в работе [85], в которой биохимические и структурные концепции причин устойчивости ВИЧ-1 к лекарственным препаратам дополнены функциональным компонентом, суть которого — влияние активности вирусной РНКазы. В этой работе показано, что баланс между деградацией РНК-матрицы и NRTI-фосфороллизом/NNRTI-диссоциацией обеспечивает условия для развития лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к обоим классам ингибиторов обратной транскриптазы [85].

Согласно описанному механизму, как NRTI, так и NNRTI нарушают аналогичные этапы процесса обратной транскрипции (рис. 5): они блокируют обратную транскрипцию путем формирования неспособного к полимеризации комплекса фермент–субстрат–ингибитор, который в конечном итоге распадается благодаря независимой от полимеризации деградации РНК-матрицы, — и обратная транскрипция прерывается. Полимеризация возобновится при условии, что NRTI (включенный в ДНК-

цепь) претерпит фосфороллиз, а NNRTI (связанный с ферментом) диссоциирует. Поэтому, чтобы успешно продолжить полимеризацию (т.е. стать лекарственно-устойчивой), обратной транскриптазе приходится либо (1) повышать эффективность фосфороллиза (NRTI)/снижать аффинность к аналогу (NNRTI) (рис. 5, средняя панель), либо (2) медленнее разрушать РНК-матрицу (рис. 5, правая панель); причем при реализации обеих возможностей вероятность успешного осуществления обратной транскрипции возрастает. Первая возможность реализуется при селекции мутаций полимеразного домена, усиливающих фосфороллиз (TAM) или снижающих аффинность к NNRTI [49], что подробно описано в литературе. Вторая возможность реализуется при селекции мутаций, снижающих активность РНКазы, которые располагаются в С-концевом районе обратной транскриптазы. Доказано, что при снижении активности РНКазы РНК-ДНК-субстрат остается интактным в течение временного интервала, необходимого для фосфороллиза AZT и d4T, встроенных в конец цепи ДНК [65]. Аналогично, снижение активности РНКазы обеспечивает сохранение достаточно интактного РНК-ДНК-субстрата в течение времени, необходимого для диссоциации NNRTI и последующего возобновления полимеризации. Таким образом, снижение активности РНКазы приводит как к NRTI-, так и к NNRTI-устойчивости ВИЧ-1. Вышеописанный механизм перекрестной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к NRTI и NNRTI основан на действии мутаций, возникающих в коннекторе и РНКазном домене обратной транскриптазы вируса. Рекомбинантные вирусы, содержащие обратную транскриптазу вирусов пациентов, проходивших анти-ВИЧ-1 терапию, проявляли повышенную устойчивость как к AZT (NRTI), так и к NVP и EFV (NNRTI), если в коннекторе обратной транскриптазы присутствовали мутации N348I, G335C, A360V и A376S [85]. Кроме того, в вирусах, содержащих эти мутации, снижена активность РНКазы [69], а степень увеличения их устойчивости к NRTI строго коррелирует со степенью увеличения устойчивости к NNRTI [85], что, безусловно, служит дополнительным фактом в поддержку предлагаемого механизма. Следует отметить, что аффинность обратной транскриптазы к NNRTI — это критический параметр, значение которого определяет, будет ли снижение активности РНКазы влиять на устойчивость. Например, мутация D549N в каталитическом сайте РНКазы усиливала устойчивость ВИЧ-1 к низко-аффинным NNRTI (NVP, DLV), в то время как в комбинации со снижающими аффинность стандартными NNRTI-устойчивыми мутациями она усиливала устойчивость вируса и к высоко-аффинным NNRTIs (EFV, ETR) [85]. В целом, снижение активности

РНКазы больше влияет на усиление NRTI-, чем NNRTI-устойчивости. Например, 10 мутаций захватывающего праймер участка РНКазы усиливали NRTI-устойчивость, но только две из них — устойчивость к NNRTI [85]. Интересно отметить, что многие стандартные NNRTI-устойчивые мутации снижают не только аффинность фермента к ингибитору, но и его РНКазную активность [100–104]. В свете описанного механизма можно предположить, что снижение активности РНКазы представляет собой одно из звеньев механизма обеспечения устойчивости. Поскольку сами ингибиторы усиливают деградацию РНК, противодействие этому путем селекции мутаций, снижающих РНКазную активность, благоприятствует выживаемости вируса.

Мутации перекрестной лекарственной устойчивости к NRTI и NNRTI могут влиять и на другие свойства обратной транскриптазы. Например, показано, что мутации T369I и N348I, коррелирующие с развитием перекрестной устойчивости ВИЧ-1, влияют на стабильность гетеродимера обратной транскриптазы [86]. Хотя прямой корреляции между стабильностью гетеродимера фермента и NNRTI-устойчивостью пока не выявлено [105], вопрос о необходимости изучения взаимосвязи между димеризацией обратной транскриптазы, активностью вирусной РНКазы и лекарственной устойчивостью ВИЧ-1 бесспорен.

Возникновение и селекция у вариантов ВИЧ-1 мутаций, обеспечивающих устойчивость к обоим классам ингибиторов обратной транскриптазы, согласуется с описанным выше механизмом лекарственной устойчивости. Функциональные связи между полимеразным и РНКазным доменами обратной транскриптазы, и в частности между полимеризацией ДНК и деградацией РНК, играют важную роль как в жизненном цикле вируса, так и в приобретении им лекарственной устойчивости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с использованием противовирусных препаратов широко распространены лекарственно-устойчивые мутации обратной транскриптазы ВИЧ-1. Например, применение AZT и других NRTI приводит к селекции TAM, усиливающих процесс фосфорилиза. Так что разработка лекарственных препаратов, противостоящих фосфорилизу или ингибирующих его, становится одним из очевидных направлений в преодолении лекарственной устойчивости ВИЧ-1. По-видимому, такими соединениями могут быть задействованные в реакции фосфорилиза негидролизующие аналоги АТФ — устойчивые к гидролизу динуклеотидтетрафосфаты, а также аналоги пирофосфата [106]. Другая стратегия — разра-

ботка таких ингибиторов, которые являются плохими субстратами реакции фосфорилиза при их встраивании в ДНК в качестве терминаторов. Такая возможность продемонстрирована на модифицированных по 4'- и 5'-позициям производных рибозы и на так называемых отсроченных терминаторах, которые останавливают синтез ДНК только после присоединения нескольких нуклеотидов вслед за ингибитором [106–108].

Наличие многочисленных данных по структуре ВИЧ-1 и понимание механизмов лекарственной устойчивости вируса к NNRTI уже позволило значительно улучшить дизайн лекарственных препаратов этого класса [109–111]. Один из примеров — это разработка внутренне подвижных соединений, которые способны эффективнее связываться с мутантным ферментом путем формирования компенсаторных взаимодействий. А создание лекарственных препаратов, в структуре которых будет заложено высокое сродство к ним обратной транскриптазы, позволит преодолеть проблемы специфичности и токсичности, а также возможных влияний на развитие лекарственной устойчивости со стороны мутаций, снижающих активность РНКазы.

Следует отметить, что встречаемость идентифицированных недавно лекарственно-устойчивых мутаций, расположенных в коннекторе и РНКазном домене обратной транскриптазы, таких, как N348I, T369I и E399D, достигает 10–16% в вирусных образцах, выделенных от пациентов, принимающих антивирусные препараты. Эти цифры сравнимы с теми, которые характерны для стандартных лекарственно-устойчивых мутаций, у которых эффект лекарственной устойчивости выражен гораздо сильнее. Можно предполагать, что вышеприведенные мутации могут обеспечивать селективные преимущества содержащим их вирусам, способствуя эффективной селекции высоко-устойчивых мутаций. Тщательный анализ этих мутаций в контексте клинических исследований поможет оценить их вклад в развитие лекарственной устойчивости ВИЧ.

Авторы благодарят за плодотворное долготлетнее сотрудничество в области лекарственной устойчивости ВИЧ-1 доктора В.К. Патак (Dr. V.K. Pathak) и доктора К.А. Делвикс-Франкенберри (Dr. K.A. Delviks-Frankenberry).

Работа частично поддержана внутренней исследовательской программой НИИ Национального Института Рака Научно-исследовательского Центра Рака (National Cancer Institute, Center for Cancer Research). Содержание этой публикации не обязательно отражает взгляды и установки Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Department of Health and Human Services), и упоминание коммерческих названий, продуктов и органи-

заций не подразумевает их предпочтения государственными организациями США.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palella F.J., Delaney K.M., Moorman A.C., et al. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **338**, 853–860.
2. Perelson A.S., Neumann A.U., Markowitz M., Leonard J.M., Ho D.D. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. **271**, 1582–1586.
3. Mansky L.M. 1996. Forward mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 in a T lymphoid cell line. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **12**, 307–314.
4. Svarovskaia E.S., Cheslock S.R., Zhang W.H., Hu W.S., Pathak V.K. 2003. Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity. *Front. Biosci.* **8**, D117–D134.
5. Hu W.S., Rhodes T., Dang Q., Pathak V. 2003. Retroviral recombination: Review of genetic analyses. *Front. Biosci.* **8**, D143–D155.
6. SPREAD programme. 2008. Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS*. **22**, 625–635.
7. Schultz S.J., Champoux J.J. 2008. RNase H activity: Structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Res.* **134**, 86–103.
8. di Marzo Veronese F., Copeland T.D., de Vico A.L., et al. 1986. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science*. **231**, 1289–1291.
9. Lowe D.M., Aitken A., Bradley C., et al. 1988. HIV-1 reverse transcriptase: crystallization and analysis of domain structure by limited proteolysis. *Biochemistry*. **27**, 8884–8889.
10. Huang H.F., Chopra R., Verdine G.L., Harrison S.C. 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: Implications for drug resistance. *Science*. **282**, 1669–1675.
11. Jacobomolina A., Ding J.P., Nanni R.G., et al. 1993. Crystal-structure of Human Immunodeficiency Virus Type-1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 angstrom resolution shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 6320–6324.
12. Kohlstaedt L.A., Wang J., Friedman J.M., Rice P.A., Steitz T.A. 1992. Crystal structure at 3.5 angstrom resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*. **256**, 1783–1790.
13. Larder B.A., Purifoy D.J., Powell K.L., Darby G. 1987. Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature*. **327**, 716–717.
14. Davies J.F., 2nd, Hostomska Z., Hostomsky Z., Jordan S.R., Matthews D.A. 1991. Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. **252**, 88–95.
15. Wohrl B.M., Krebs R., Goody R.S., Restle T. 1999. Refined model for primer/template binding by HIV-1 reverse transcriptase: Pre-steady-state kinetic analyses of primer/template binding and nucleotide incorporation events distinguish between different binding modes depending on the nature of the nucleic acid substrate. *J. Mol. Biol.* **292**, 333–344.
16. Kati W.M., Johnson K.A., Jerva L.F., Anderson K.S. 1992. Mechanism And Fidelity Of Hiv Reverse-Transcriptase. *J. Biol. Chem.* **267**, 25988–25997.
17. Schinazi R.F., Hernandez-Santiago B.I., Hurwitz S.J. 2006. Pharmacology of current and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses. *Antiviral. Res.* **71**, 322–334.
18. Ding J., Das K., Hsiou Y., et al. 1998. Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 1095–1111.
19. Ren J., Esnouf R., Hopkins A., et al. 1995. The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design. *Structure*. **3**, 915–926.
20. Das K., Sarafianos S.G., Clark A.D., Jr., et al. 2007. Crystal structures of clinically relevant Lys103Asn/Tyr181Cys double mutant HIV-1 reverse transcriptase in complexes with ATP and non-nucleoside inhibitor HBV 097. *J. Mol. Biol.* **365**, 77–89.
21. Sarafianos S.G., Das K., Clark A.D., Jr., et al. 1999. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 10027–10032.
22. Gao H.Q., Boyer P.L., Sarafianos S.G., Arnold E., Hughes S.H. 2000. The role of steric hindrance in 3TC resistance of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.* **300**, 403–418.
23. Tisdale M., Kemp S.D., Parry N.R., Larder B.A. 1993. Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 5653–5656.
24. Margot N.A., Isaacson E., McGowan I., et al. 2002. Genotypic and phenotypic analyses of HIV-1 in anti-retroviral-experienced patients treated with tenofovir DF. *AIDS*. **16**, 1227–1235.
25. St Clair M.H., Martin J.L., Tudor-Williams G., et al. 1991. Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. **253**, 1557–1559.
26. Shirasaka T., Kavlick M.F., Ueno T., et al. 1995. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 2398–2402.
27. Суханова А.Л., Рудинский Н.И., Богословская Е.В. и др. 2005. Полиморфизм области генома, кодирующей протеазу и обратную транскриптазу вариантов ВИЧ-1 подтипа А, распространенных на территории СНГ. *Молекуляр. биология*. **39**, 1063–1071.
28. Arion D., Kaushik N., McCormick S., Borkow G., Parniak M.A. 1998. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced

- sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*. **37**, 15908–15917.
29. Meyer P.R., Matsuura S.E., So A.G., Scott W.A. 1998. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 13471–13476.
 30. Larder B.A., Darby G., Richman D.D. 1989. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*. **243**, 1731–1734.
 31. Harrigan P.R., Kinghorn I., Bloor S., et al. 1996. Significance of amino acid variation at human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase residue 210 for zidovudine susceptibility. *J. Virol.* **70**, 5930–5934.
 32. Hooker D.J., Tachedjian G., Solomon A.E., et al. 1996. An in vivo mutation from leucine to tryptophan at position 210 in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to high-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J. Virol.* **70**, 8010–8018.
 33. Das K., Bandwar R.P., White K.L., et al. 2009. Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. *J. Biol. Chem.* **284**, 35092–35100.
 34. Ren J., Stammers D.K. 2008. Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus Res.* **134**, 157–170.
 35. Sarafianos S.G., Marchand B., Das K., et al. 2009. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J. Mol. Biol.* **385**, 693–713.
 36. Domaal R.A., Demeter L.M. 2004. Structural and biochemical effects of human immunodeficiency virus mutants resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1735–1751.
 37. Bacheler L., Jeffrey S., Hanna G., et al. 2001. Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J. Virol.* **75**, 4999–5008.
 38. Demeter L.M., Shafer R.W., Meehan P.M., et al. 2000. Delavirdine susceptibilities and associated reverse transcriptase mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients in a phase I/II trial of delavirdine monotherapy (ACTG 260). *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 794–797.
 39. Richman D.D., Havlir D., Corbeil J., et al. 1994. Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J. Virol.* **68**, 1660–1666.
 40. Vingerhoets J., Azijn H., Fransen E., et al. 2005. TMC125 displays a high genetic barrier to the development of resistance: evidence from in vitro selection experiments. *J. Virol.* **79**, 12773–12782.
 41. Lazzarin A., Campbell T., Clotet B., et al. 2007. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-2: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. **370**, 39–48.
 42. Madruga J.V., Cahn P., Grinsztejn B., et al. 2007. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. **370**, 29–38.
 43. Shafer R.W., Schapiro J.M. 2008. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev.* **10**, 67–84.
 44. Llibre J.M., Santos J.R., Puig T., et al. 2008. Prevalence of etravirine-associated mutations in clinical samples with resistance to nevirapine and efavirenz. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 909–913.
 45. Wang D.P., Rizzo R.C., Tirado-Rives J., Jorgensen W.L. 2001. Antiviral drug design: computational analyses of the effects of the L100I mutation for HIV-RT on the binding of NNRTIs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2799–2802.
 46. Hsiou Y., Das K., Ding J., Clark A.D., J et al. 1998. Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *J. Mol. Biol.* **284**, 313–323.
 47. Ren J., Nichols C.E., Chamberlain P.P., et al. 2004. Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 100, 106 and 108 and mechanisms of resistance to non-nucleoside inhibitors. *J. Mol. Biol.* **336**, 569–578.
 48. Hsiou Y., Ding J., Das K., et al. 2001. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J. Mol. Biol.* **309**, 437–445.
 49. Maga G., Amacker M., Ruel N., Hubscher U., Spadari S. 1997. Resistance to nevirapine of HIV-1 reverse transcriptase mutants: loss of stabilizing interactions and thermodynamic or steric barriers are induced by different single amino acid substitutions. *J. Mol. Biol.* **274**, 738–747.
 50. Furfine E.S., Reardon J.E. 1991. Reverse transcriptase.RNase H from the human immunodeficiency virus. Relationship of the DNA polymerase and RNA hydrolysis activities. *J. Biol. Chem.* **266**, 406–412.
 51. Peliska J.A., Benkovic S.J. 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. **258**, 1112–1118.
 52. DeStefano J.J., Buiser R.G., Mallaber L.M., et al. 1991. Polymerization and RNase H activities of the reverse transcriptases from avian myeloblastosis, human immunodeficiency, and Moloney murine leukemia viruses are functionally uncoupled. *J. Biol. Chem.* **266**, 7423–7431.
 53. DeStefano J.J., Mallaber L.M., Fay P.J., Bambara R.A. 1994. Quantitative analysis of RNA cleavage during RNA-directed DNA synthesis by human immunodeficiency and avian myeloblastosis virus reverse transcriptases. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3793–3800.
 54. Wisniewski M., Balakrishnan M., Palaniappan C., Fay P.J., Bambara R.A. 2000. The sequential mechanism of HIV reverse transcriptase RNase H. *J. Biol. Chem.* **275**, 37664–37671.
 55. DeStefano J.J., Mallaber L.M., Rodriguez-Rodriguez L., Fay P.J., Bambara R.A. 1992. Requirements for strand transfer between internal regions of heteropolymer

- templates by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J. Virol.* **66**, 6370–6378.
56. Fuentes G.M., Fay P.J., Bambara R.A. 1996. Relationship between plus strand DNA synthesis removal of downstream segments of RNA by human immunodeficiency virus, murine leukemia virus and avian myeloblastoma virus reverse transcriptases. *Nucl. Acids Res.* **24**, 1719–1726.
 57. Smith C.M., Smith J.S., Roth M.J. 1999. RNase H requirements for the second strand transfer reaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J. Virol.* **73**, 6573–6581.
 58. Huber H.E., Richardson C. C. 1990. Processing of the primer for plus strand DNA synthesis by human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **265**, 10565–10573.
 59. Luo G.X., Sharmeen L., Taylor J. 1990. Specificities involved in the initiation of retroviral plus-strand DNA. *J. Virol.* **64**, 592–597.
 60. Smith J.S., Gritsman K., Roth M.J. 1994. Contributions of DNA polymerase subdomains to the RNase H activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Virol.* **68**, 5721–5729.
 61. Sarafianos S.G., Das K., Tantillo C., et al. 2001. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J.* **20**, 1449–1461.
 62. Julias J.G., McWilliams M.J., Sarafianos S.G., et al. 2003. Mutation of amino acids in the connection domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that contact the template-primer affects RNase H activity. *J. Virol.* **77**, 8548–8554.
 63. Julias J.G., McWilliams M.J., Sarafianos S.G., Arnold E., Hughes S.H. 2002. Mutations in the RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase affect the initiation of DNA synthesis and the specificity of RNase H cleavage in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 9515–9520.
 64. Rausch J.W., Lener D., Miller J.T., et al. 2002. Altering the RNase H primer grip of human immunodeficiency virus reverse transcriptase modifies cleavage specificity. *Biochemistry.* **41**, 4856–4865.
 65. Nikolenko G.N., Palmer S., Maldarelli F., et al. 2005. Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: Balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 2093–2098.
 66. Delviks-Frankenberry K.A., Nikolenko G.N., Barr R., Pathak V.K. 2007. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-Azido-3'-deoxythymidine resistance. *J. Virol.* **81**, 6837–6845.
 67. Nikolenko G.N., Delviks-Frankenberry K.A., Palmer S., et al. 2007. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 317–322.
 68. Brehm J.H., Koontz D., Meteer J.D., et al. 2007. Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine. *J. Virol.* **81**, 7852–7859.
 69. Delviks-Frankenberry K.A., Nikolenko G.N., Boyer P.L., et al. 2008. HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations reduce template RNA degradation and enhance AZT excision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 10943–10948.
 70. Brehm J.H., Mellors J.W., Sluis-Cremer N. 2008. Mechanism by which a glutamine to leucine substitution at residue 509 in the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine resistance. *Biochemistry.* **47**, 14020–14027.
 71. Ehteshami M., Beilhartz G.L., Scarth B.J., et al. 2008. Connection domain mutations N348I and A360V in HIV-1 reverse transcriptase enhance resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine through both RNase H-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **283**, 22222–22232.
 72. Yap S.H., Sheen C.W., Fahey J., et al. 2007. N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance. *PLoS Med.* **4**, 1887–1900.
 73. Radzio J., Sluis-Cremer N. 2008. Efavirenz accelerates HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H cleavage, leading to diminished zidovudine excision. *Mol. Pharmacol.* **73**, 601–606.
 74. Zelina S., Sheen C.W., Radzio J., Mellors J.W., Sluis-Cremer N. 2008. Mechanisms by which the G333D mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase facilitates dual resistance to zidovudine and lamivudine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 157–163.
 75. Roquebert B., Wirten M., Simon A., et al. 2007. Relationship between mutations in HIV-1 RNase H domain and nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations in naive and pre-treated HIV infected patients. *J. Med. Virol.* **79**, 207–211.
 76. Santos A.F., Lengrubler R.B., Soares E.A., et al. 2008. Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS One.* **3**, e1781.
 77. Hehl E.A., Joshi P., Kalpana G.V., Prasad V.R. 2004. Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins. *J. Virol.* **78**, 5056–5067.
 78. Ntemgwa M., Wainberg M.A., Oliveira M., et al. 2007. Variations in reverse transcriptase and RNase H domain mutations in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates are associated with divergent phenotypic resistance to zidovudine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3861–3869.
 79. Cane P.A., Green H., Fearnhill E., Dunn D. 2007. Identification of accessory mutations associated with high-level resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS.* **21**, 447–455.
 80. Waters J.M., O'Neal W., White K.L., et al. 2009. Mutations in the thumb-connection and RNase H domain of HIV type-1 reverse transcriptase of antiretroviral treatment-experienced patients. *Antivir. Ther.* **14**, 231–239.
 81. Hachiya A., Kodama E.N., Sarafianos S.G., et al. 2008. Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to

- nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Virol.* **82**, 3261–3270.
82. Blanca G., Baldanti F., Paolucci S., et al. 2003. Nevirapine resistance mutation at codon 181 of the HIV-1 reverse transcriptase confers stavudine resistance by increasing nucleotide substrate discrimination and phosphorolytic activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 15469–15472.
 83. Paolucci S., Baldanti F., Campanini G., et al. 2007. NNRTI-selected mutations at codon 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase decrease susceptibility to stavudine and zidovudine. *Antiviral Res.* **76**, 99–103.
 84. Paolucci S., Baldanti F., Maga G., et al. 2004. Gln145Met/Leu changes in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to nucleoside and nonnucleoside analogs and impair virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4611–4617.
 85. Nikolenko G.N., Delviks-Frankenberry K.A., Pathak V.K. 2010. A Novel Molecular Mechanism of Dual Resistance to NRTIs and NNRTIs. *J. Virol.* **84**, 5238–5249
 86. Gupta S., Fransen S., Paxinos E., et al. 2006. Infrequent occurrence of mutations in the C-terminal region of reverse transcriptase modulates susceptibility to RT inhibitors. *Antivir. Ther.* **11**, S143.
 87. Hachiya A., Shimane K., Sarafianos S.G., et al. 2009. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res.* **82**, 115–121.
 88. Poveda E., de Mendoza C., Pattery T., et al. 2008. Phenotypic impact of resistance mutations on etravirine susceptibility in HIV patients with prior failure to non-nucleoside analogues. *AIDS.* **22**, 2395–2398.
 89. Sluis-Cremer N., Tachedjian G. 2008. Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res.* **134**, 147–156.
 90. Gopalakrishnan V., Benkovic S. 1994. Effect of a thiobenzimidazolone derivative on DNA strand transfer catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4110–4115.
 91. Palaniappan C., Fay P.J., Bambara R.A. 1995. Nevirapine alters the cleavage specificity of ribonuclease H of human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **270**, 4861–4869.
 92. Shaw-Reid C.A., Feuston B., Munshi V., et al. 2005. Dissecting the effects of DNA polymerase and ribonuclease H inhibitor combinations on HIV-1 reverse-transcriptase activities. *Biochemistry.* **44**, 1595–1606.
 93. Hang J.Q., Li Y., Yang Y., et al. 2007. Substrate-dependent inhibition or stimulation of HIV RNase H activity by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 341–350.
 94. Abbondanzieri E.A., Bokinsky G., Rausch J.W., et al. 2008. Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. *Nature.* **453**, 184–189.
 95. Grobler J.A., Dornadula G., Rice M.R., et al. 2007. HIV-1 reverse transcriptase plus-strand initiation exhibits preferential sensitivity to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **282**, 8005–8010.
 96. Liu S., Abbondanzieri E.A., Rausch J.W., Le Grice S.F., Zhuang X. 2008. Slide into action: dynamic shuttling of HIV reverse transcriptase on nucleic acid substrates. *Science.* **322**, 1092–1097.
 97. Srivastava S., Sluis-Cremer N., Tachedjian G. 2006. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase as an antiviral target. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 1879–1894.
 98. Tachedjian G., Moore K.L., Goff S.P., Sluis-Cremer N. 2005. Efavirenz enhances the proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor and reverse transcriptase homodimer formation. *FEBS Lett.* **579**, 379–384.
 99. Tachedjian G., Orlova M., Sarafianos S.G., Arnold E., Goff S.P. 2001. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors are chemical enhancers of dimerization of the HIV type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 7188–7193.
 100. Archer R.H., Dykes C., Gerondelis P., et al. 2000. Mutants of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors demonstrate altered rates of RNase H cleavage that correlate with HIV-1 replication fitness in cell culture. *J. Virol.* **74**, 8390–8401.
 101. Archer R.H., Wisniewski M., Bambara R.A., Demeter L.M. 2001. The Y181C mutant of HIV-1 reverse transcriptase resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors alters the size distribution of RNase H cleavages. *Biochemistry.* **40**, 4087–4095.
 102. Gerondelis P., Archer R.H., Palaniappan C., et al. 1999. The P236L delavirdine-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutant is replication defective and demonstrates alterations in both RNA 5'-end- and DNA 3'-end-directed RNase H activities. *J. Virol.* **73**, 5803–5813.
 103. Fan N., Rank K.B., Slade D.E., et al. 1996. A drug resistance mutation in the inhibitor binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase impairs DNA synthesis and RNA degradation. *Biochemistry.* **35**, 9737–9745.
 104. Wang J., Dykes C., Domaol R.A., et al. 2006. The HIV-1 reverse transcriptase mutants G190S and G190A, which confer resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, demonstrate reductions in RNase H activity and DNA synthesis from tRNA(Lys, 3) that correlate with reductions in replication efficiency. *Virology.* **348**, 462–474.
 105. Figueiredo A., Zelina S., Sluis-Cremer N., Tachedjian G. 2008. Impact of residues in the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket on HIV-1 reverse transcriptase heterodimer stability. *Curr. HIV Res.* **6**, 130–137.
 106. Jochmans D. 2008. Novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res.* **134**, 171–185.
 107. Boyer P.L., Julias J.G., Ambrose Z., et al. 2007. The nucleoside analogs 4'C-methyl thymidine and 4'C-ethyl thymidine block DNA synthesis by wild-type HIV-1 RT and excision proficient NRTI resistant RT variants. *J. Mol. Biol.* **371**, 873–882.

108. Boyer P.L., Julias J.G., Marquez V.E., Hughes S.H. 2005. Fixed conformation nucleoside analogs effectively inhibit excision-proficient HIV-1 reverse transcriptases. *J. Mol. Biol.* **345**, 441–450.
109. Das K., Clark A.D., Jr., Lewi P.J., et al. 2004. Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drug-resistant HIV-1 variants. *J. Med. Chem.* **47**, 2550–2560.
110. Freeman G.A., Andrews Iii C.W., 3rd, Hopkins A.L., et al. 2004. Design of non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with improved drug resistance properties. 2. *J. Med. Chem.* **47**, 5923–5936.
111. Hopkins A.L., Ren J., Milton J., et al. 2004. Design of non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with improved drug resistance properties. 1. *J. Med. Chem.* **47**, 5912–5922.