

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Васюченко Екатерина Павловна**

**Исследование молекулярных механизмов антимикробного действия  
метиленового синего методами компьютерного моделирования**

**1.5.2. Биофизика**

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
доктор физико-математических наук И.Б. Коваленко  
доктор биологических наук М.Г. Страховская

Москва – 2025

## Оглавление

<b>Введение .....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>	<b>13</b>
1.1. Методы молекулярного моделирования в задачах поиска лекарственных препаратов.....	13
1.2. Физико-химические свойства метиленового синего и его практическое применение в медицинской практике .....	21
1.3. Строение оболочечных вирусов и их жизненный цикл.....	27
1.3.1. Строение вириона коронавируса.....	27
1.3.2. Жизненный цикл коронавируса .....	31
1.3.3. Строение вириона флавивирусов и их жизненный цикл .....	35
1.4. Строение виропоринов SARS-CoV-2 и их роль в жизненном цикле коронавируса .....	40
1.4.1. Строение и функционирование виропоринов коронавируса, их роль в жизненном цикле вируса.....	40
1.4.2. Молекулярное моделирование виропоринов коронавирусов .....	44
1.4.3. Виропорины как мишени противовирусных препаратов .....	47
1.5. Противовирусная активность метиленового синего .....	49
<b>Глава 2. Материалы и методы.....</b>	<b>55</b>
2.1. Пространственные структуры объектов, используемых в работе .....	55
2.1.1. Модель молекулы метиленового синего и фталоцианина цинка ( $Zn-PcChol^{8+}$ ).....	55
2.1.2. Модель оболочки вириона коронавируса SARS-CoV-2 .....	57
2.1.3. Модели S белков и пентамера E белка коронавирусов.....	58
2.2 Метод броуновской динамики.....	59

2.3 Метод молекулярной динамики .....	63
2.4 Метод отбора зонтичных проб .....	68
2.5. Подбор параметров моделирования броуновской динамики.....	70
<b>Глава 3. Взаимодействие метиленового синего с оболочкой коронавируса SARS-CoV-2 .....</b>	<b>75</b>
3.1. Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с компонентами оболочки коронавируса .....	75
3.2. Моделирование взаимодействия метиленового синего с Е белком методом зонтичного отбора проб.....	88
<b>Глава 4. Взаимодействие метиленового синего с белковыми оболочками флавивирусов.....</b>	<b>98</b>
4.1. Создание молекулярных моделей белковых оболочек вируса Зика и вируса денге.....	98
4.2. Взаимодействие метиленового синего с белками оболочки флавивирусов .	99
<b>Заключение.....</b>	<b>107</b>
<b>Список сокращений .....</b>	<b>111</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>113</b>

## Введение

### Актуальность работы

С момента открытия вирусы находятся в центре внимания исследователей как в биологии, так и в медицине. В последнее время достигнуты значительные успехи в изучении структуры и функционирования вирусов, разработке эффективных средств борьбы с предотвращением и распространением вирусных инфекций. Тем не менее, по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) целый ряд возбудителей вирусной природы остаётся приоритетным для изучения. В список патогенов, способных с высоким риском вызвать эпидемии или пандемии, входят в том числе коронавирусы и flaviviruses. Инфекции, вызываемые рядом коронавирусов, быстро распространяются, плохо поддаются лечению, а при тяжелом течении заболевания приводят к летальному исходу. Так, коронавирусы MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 вызвали эпидемии и пандемию в XXI веке. К настоящему времени известно более 70 flaviviruses, многие из которых являются возбудителями опасных заболеваний, среди них быстро распространяющиеся вирус Зика (ZIKV) и вирус денге (DENV).

Синтезированный 150 лет назад, метиленовый синий нашёл широкое применение не только как краситель в промышленности и научных исследованиях, но и в качестве медицинского препарата. Метиленовый синий проявляет antimикробную активность в отношении широкого спектра патогенов, сыграл значительную роль в борьбе с малярией, в настоящее время применяется в качестве антисептика. При возбуждении соответствующими длинами волн метиленовый синий служит фотосенсибилизатором и используется в системе THERAFLEX MB-Plasma для фотодинамического обеззараживания плазмы крови. Наряду с другими оболочечными вирусами, коронавирусы и flaviviruses чувствительны к обработке метиленовым синим, причём как при фотоактивации, так и без дополнительного воздействия светом, однако, природа этих эффектов изучена недостаточно.

Современное развитие вычислительных мощностей позволяет создавать

молекулярные модели не только отдельных молекулярных компонентов вирусных частиц, но и крупномасштабные модели, например, целых оболочек вирионов. Так, в 2023 году была создана крупнозернистая модель оболочки вириона SARS-CoV-2. Подобные модели, несомненно, позволяют получить лучшее представление о строении и функционировании вирусов. В то же время, несмотря на очевидные преимущества таких моделей, они почти не применяются для исследования взаимодействий различных соединений с вирусными оболочками и поиска потенциальных противовирусных препаратов.

### **Степень разработанности проблемы**

Действие метиленового синего на коронавирусы вне клеток экспериментально показано в целом ряде работ. Морфологически это проявляется в лизисе мембранны оболочки вирусов и отрыве S белков. В культурах клеток метиленовый синий значительно снижает титры коронавирусов, а также вируса Зика и, в меньшей степени, вируса денге, как при предварительной обработке, так и после заражения клеток. Облучение видимым светом в процессе фотодинамической инактивации усиливает вирулицидные свойства метиленового синего в отношении коронавирусов и флавивирусов, хотя эти свойства в определённой степени проявляются и в отсутствие освещения. Однако, несмотря на доказанную эффективность метиленового синего в отношении оболочечных вирусов, молекулярные аспекты его взаимодействия с вирусными частицами остаются неясными.

Методы броуновской динамики позволяют моделировать процессы диффузационного связывания биомолекул и их электростатических взаимодействий. Применение многомасштабных подходов, например, через объединение методов молекулярной и броуновской динамики, позволяет получить высокую детализацию процессов на больших масштабах наблюдаемых явлений. Однако, такие подходы редко применяются для изучения механизмов действия биологически активных молекул.

В настоящей работе подходы молекулярной и броуновской динамики были

объединены для изучения молекулярных механизмов действия метиленового синего на вирусы. Использование крупнозернистых и полноатомных моделей целых оболочек коронавируса и флавивирусов позволило наиболее полно изучить процессы взаимодействия с ними метиленового синего. Применение метода броуновской динамики помогло проследить взаимодействие метиленового синего с вирусной оболочкой на начальных стадиях сближения, а применение молекулярной динамики – определить роль ионных, ароматических и других взаимодействий в связывании метиленового синего с вирусными белками.

## Цели и задачи

**Цель работы** заключается в выявлении методами компьютерного моделирования молекулярных механизмов взаимодействия метиленового синего с коронавирусами и флавивирусами, лежащих в основе его ингибирующего действия на функциональную активность белков вирусной оболочки.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Создать молекулярно-динамические модели структур оболочек коронавирусов и флавивирусов, а также молекулы метиленового синего, и рассчитать их электростатический потенциал;
2. Найти области связывания метиленового синего с оболочками коронавируса и флавивирусов методами броуновской динамики;
3. Получить количественные характеристики связывания метиленового синего с S белками оболочек коронавируса, участвующих в стадиях связывания к клеточными рецепторами;
4. Получить энергетические характеристики процессов прохождения метиленового синего через мембрану коронавируса без и со встроенным в нее виропорином методом полноатомной молекулярной динамики с отбором зонтичных проб;
5. Определить типы связей, образующимся при взаимодействии метиленового синего с аминокислотными остатками виропорина коронавируса;
6. Выявить электростатические взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками белка оболочки флавивирусов, лежащие в основе ингибирующего действия метиленового синего на процессы связывания вирусов с

клетками и слияния мембран.

## **Научная новизна**

В компьютерной модели удалось воспроизвести реализацию процесса взаимодействия метиленового синего с белками оболочки коронавирусов и флавивирусов и определить ключевые аминокислоты, контакты с которыми могут приводить к ингибированию функциональной активности вирусных структур. Методом броуновской динамики выявлены сайты связывания молекул метиленового синего на таких структурных компонентах оболочки коронавирусов, как S, E белки и отрицательно заряженные липиды мембранные оболочки. Применение метода броуновской динамики с использованием созданных моделей целых белковых оболочек вируса Зика и вируса денге позволило детально изучить взаимодействие с ними метиленового синего и выявить особенности молекулярного строения белков оболочки, существенные для проявления различий в связывании метиленового синего между этими двумя вирусами.

Получены энергетические характеристики взаимодействия метиленового синего с конкретными структурными элементами вирусной оболочки. Оценка энергии прохождения метиленового синего через ERGIC-подобную мембрану без и со встроенным в неё каналом виропорина SARS-CoV-2 позволила выявить высокий энергетический барьер на пути проникновения метиленового синего через мембрану. При наличии в мемbrane виропоринов найдена предпочтительная локализация молекул метиленового синего в центре канала, которая обеспечивается  $\pi$ - $\pi$  взаимодействиями с остатками фенилаланина.

## **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в разработке подхода к анализу взаимодействий заряженных молекул с оболочечными вирусами с использованием молекулярных пространственных моделей целых вирионов. Определены молекулярно-динамические характеристики процесса взаимодействия метиленового синего с вирусной частицей, что является необходимым для более

полного понимания природы его противовирусной активности.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанный подход может быть применен при разработке соединений с противовирусными свойствами для оценки активности и определения механизмов действия на оболочечные вирусы. Выявленные ключевые взаимодействия молекул метиленового синего с аминокислотными остатками виропорина могут помочь в разработке противовирусных соединений, нацеленных на эти вирусные канальные белки.

### **Методология и методы исследования**

В работе использованы крупнозернистая молекулярная модель оболочки вируса SARS-CoV-2, крупнозернистые и полноатомные модели компонентов вириона и молекулы метиленового синего. Работа выполнена с использованием компьютерного моделирования, включая проведение расчетов полноатомной и крупнозернистой молекулярной динамики, зоничной выборки в рамках неравновесной молекулярной динамики, а также броуновской динамики.

### **Объект и предмет исследования**

Объектами исследования являются молекулярные модели метиленового синего, оболочки коронавирусного вириона и белки вирусной оболочки и ее мембрана, а также модели белковых оболочек flavивирусов. Предметом исследования являются межмолекулярные взаимодействия метиленового синего с компонентами оболочки вируса.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Использование молекулярных моделей оболочек вирусов в сочетании с методом броуновской динамики позволяет выявлять области связывания заряженных молекул противовирусных соединений и анализировать их контакты с функционально значимыми компонентами.
2. Различия в распределении электростатического потенциала вокруг белков

оболочек flavивирусов определяет доступность их функциональных петель для электростатических взаимодействий с противовирусными соединениями.

3. Близкое пространственное расположение аминокислотных остатков со сходными физико-химическими свойствами в пентамерном виропорине коронавируса обуславливает образование многочисленных ионных и ароматических нековалентных связей с органическими катионами, что может делать виропорин чувствительной мишенью для этого типа соединений.

### **Степень достоверности и апробации результатов**

Достоверность результатов выполненной работы подтверждена публикацией 5 статей в рецензируемых журналах и сборниках, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index".

Материалы работы были представлены на семинарах сектора информатики и биофизики сложных систем кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, семинарах лаборатории «ИИ в биоинформатике и медицине» Института перспективных исследований проблем искусственного интеллекта МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на следующих международных и российских конференциях: «II Международная научно-практическая конференция «Математическое моделирование систем и процессов», Псков, Россия, 2023; «Математика. Компьютер. Образование», Пущино, Россия, 2024; «Ломоносов-2025», Москва, Россия, 2025.

В работе были использованы современные методы компьютерного моделирования и методики выполнения вычислительных экспериментов, соответствующие поставленным задачам.

**Личный вклад автора** заключается в анализе литературных данных, создании полноатомных мембранных систем со встроенными виропоринами, проведении и молекулярно-динамических расчетов и расчетов броуновской динамике, в анализе из результатов, включая анализ контактов метиленового синего в молекулярными структурами оболочки коронавируса, проведение кластерного анализа, анализа

взаимодействий молекулы метиленового синего с виропорином, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертации.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературных источников, состоящий из 209 наименований. Работа содержит 27 рисунков и 8 таблиц.

**Основные публикации Васюченко Екатерины Павловны по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):**

1. **Е. П. Васюченко**, М. Г. Страховская, И. Б. Коваленко, П. В. Фурсова, А. Б. Рубин. Особенности электростатического взаимодействия метиленового синего с белковой оболочкой флавивирусов //Математическая биология и биоинформатика. – 2025. – Т. 20. – №2. – С. 532–542. DOI: 10.17537/2025.20.532 (Импакт-фактор 0,391 (РИНЦ); 0,7 п.л./0,6 п.л.)
2. **Е. П. Васюченко**, Е. Г. Холина, В. А. Федоров, М. Г. Страховская, И. Б. Коваленко, А. Б. Рубин. Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с виропорином коронавируса SARS-CoV-2 //Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2025. – Т. 80. – №2. – С. 96–104. EDN: HQMVZK. (Импакт-фактор 0,306 (РИНЦ); 0,8/0,7 п.л.)
3. Kovalenko I., Kholina E., Fedorov V., Khruschev S., **Vasyuchenko E.**, Meerovich G., Strakhovskaya M. Interaction of Methylene Blue with Severe Acute Respiratory

Syndrome Coronavirus 2 Envelope Revealed by Molecular Modeling //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – No. 21. – P. 15909. **EDN:** JXMOHE. (Импакт-фактор 4,9 (JIF); 1,3/0,6 п.л.)

4. **Vasyuchenko E. P.**, Fedorov V. A., Kholina E. G., Khruschev S. S., Kovalenko I. B. Strakhovskaya M. G. Calculation of Electrostatic Potential Field of Coronavirus S Proteins for Brownian Dynamics Simulations //Supercomputing Frontiers and Innovations. – 2022. – Vol. 9. – No. 3. – P. 65-71. **EDN:** BZRMHI. (Импакт-фактор 0,178 (SJR); 0,5/0,4 п.л.)
5. **Vasyuchenko E. P.**, Orekhov P. S., Armeev G. A., Bozdaganyan M. E. CPE-DB: An open database of chemical penetration enhancers //Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – No. 1. – P. 66. **EDN:** ZBCZPS. (Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1/0,4 п.л.)

## **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность своим научным руководителям – Коваленко Илье Борисовичу и Страховской Марине Глебовне – за неоценимую помощь, поддержку и профессиональное руководство на всех этапах работы над диссертацией, за важную роль в формировании научного мышления и поддержку в подготовке публикаций. Автор выражает особую благодарность Страховской Марине Глебовне за глубокие экспертные консультации, внимание к деталям и вдохновляющие дискуссии, которые помогли глубже понять изучаемые процессы. Автор благодарит Коваленко Илью Борисовича за ценные методические рекомендации, помочь в интерпретации результатов и конструктивную критику, способствовавшую улучшению работы, а также своих коллег и соавторов Федорова Владимира Андреевича и Холину Екатерину Георгиевну за моральную поддержку и помочь при проведении расчетов и обработке результатов броуновской и молекулярной динамики.

Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры биофизики Биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, особенно заведующему кафедры Рубину Андрею Борисовичу и

заведующей сектором информатики и биофизики сложных систем Ризниченко Галине Юрьевне, за создание творческой рабочей атмосферы и ценные замечания, высказанные в ходе выступлений на семинарах сектора информатики и биофизики сложных систем.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Методы молекулярного моделирования в задачах поиска лекарственных препаратов

Развитие медицинской химии шло параллельно с развитием человеческой цивилизации и началось с использования известных лечебных свойств растений и частей животных. При этом заключение о лекарственных свойствах «препарата» принималось на основе его способности подавлять фенотипические проявления болезни. С развитием органической химии и возможностей структурного анализа органических веществ медицинская химия шагнула вперед. Теперь мы стали понимать, что лежит в основе физико-химических свойств того или иного вещества. Стало ясно, что эти вещества действуют на определенные структуры в клетках – чаще всего это белки. Вместе с развитием возможностей синтетической биологии это вызвало взрыв открытых лекарственных молекул. Механизмы их действия были не ясны, но в их эффективности никто не сомневался. Дальнейшее развитие структурной биологии дало нам огромные базы данных структур различных белков и это уже означало переход в эру рациональной разработки лекарственных препаратов, где молекула создается под конкретную мишень. Развитие вычислительных мощностей современных компьютеров и разнообразие программ компьютерного моделирования расширяют наши возможности в этой области. Рациональная разработка лекарственных препаратов основана на знании о мишени, в качестве которой обычно выбирается белок, активность которого необходимо либо усилить, либо подавить. У этого подхода есть свои преимущества и недостатки по сравнению с методом, основанным на фенотипическом подавлении симптомов болезни в организме или клеточной культуре. Среди преимуществ обычно выделяют возможность выяснить механизм действия вещества, высокую скорость скрининга больших библиотек химических соединений, а также возможность получить «лучшую молекулу» с очень высокой

энергией связывания. Однако, подход не лишен и минусов, самый главный из которых – это необходимость знания о мишени, в том числе о механизмах развития заболевания. Без имеющегося целевого белка рациональная разработка лекарственного препарата сильно осложняется, а иногда и становится невозможна. Второй важный недостаток обусловлен тем, что чаще всего моделируется отдельно взятый белок, без возможности учесть его окружение, и наблюдаемый в моделировании эффект не сможет быть достигнут в экспериментах *in vivo* [Kiriiri, Njogu, Mwangi, 2020].

Как было сказано выше, для рационального поиска лекарственных препаратов необходимо знание о пространственной структуре белковой мишени. Такие структуры получают экспериментальными методами, такими как рентгеноструктурный анализ, ядерный магнитный резонанс или криоэлектронная микроскопия, и собирают в базы данных, наиболее обширной из которых является Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Из-за ограничений данных методов на данный момент структуры некоторых белков определить трудно, поэтому параллельно развивались и методы предсказания структур на основе их гомологии. Теоретические основы, лежащие в основе этого подхода, основаны на том факте, что белки, которые имеют сходные остатки, имеют и сходные структуры. Предсказание структур шагнуло вперед после появления моделей машинного обучения от компании DeepMind под названием AlphaFold2, а затем и AlphaFold3 [Abramson и др., 2024]. Теперь, имея всего лишь аминокислотную последовательность белка, можно получить его структуру с точностью до 92%. Такой прогресс в биоинформационических методах не только вдохновляет, но и настораживает, поэтому создатели модели ввели в её публичную версию некоторые ограничения, к примеру невозможность прогнозировать структуры некоторых вирусов, включая человеческие. Следующей необходимой составляющей в рациональном поиске является наличие структуры малый молекулы, или лиганда. На данный момент существует множество как открытых, так и коммерческих библиотек химических веществ. Наиболее популярными из них являются базы данных PubChem [Kim и др., 2023], ZINC [Irwin, Shoichet, 2004], DrugBank [Knox и

др., 2024] и т.д. Таким образом, задача сводится к поиску соединения, которое наилучшим образом связывается с таргетным белком.

### *Молекулярный докинг*

Для решения задачи стыковки малой молекулы с белковой мишенью чаще всего применяют методы молекулярного докинга. Молекулярный докинг – это *in silico* метод для нахождение правильной позы лиганда внутри кармана связывания на белке и оценки силы этого связывания с использованием различных функций оценки для выбора наилучшей позы [Kuntz и др., 1982]. Методы молекулярного докинга направлены на подбор оптимального положения лиганда в активном центре белка. Для этого алгоритмы анализируют и комбинируют различные факторы – гидрофобные взаимодействия, стерическое соответствие и электростатические потенциалы – для расчёта энергии связывания комплекса [Diller, Merz, 2001]. Алгоритмы поиска могут быть направлены на слепой поиск, когда место связывания лиганда неизвестно, или на стыковку в заранее известный карман связывания. Оценка силы связывания и ранжирование поз малых молекул выполняется с помощью функции оценки. Функций оценки, как и алгоритмов поиска существует достаточно много [Adelusi и др., 2022], однако их можно разделить на три группы: эмпирические, основанные на силовых полях и основанные на знаниях. Несмотря на широкое применение методов молекулярного докинга, он нещен существенных минусов. Во-первых, нужно знать не только мишень, на которую должен действовать лиганд, но и место стыковки лиганда на поверхности белка. Во-вторых, отсутствие учета явного растворителя и невозможность добавить молекулы воды в сайт связывания. В-третьих, многие программы докинга в погоне за наилучшей позой лиганда способны генерировать конформации с далекими от равновесных значениями углов и торсионных углов, невозможных в реальности. Поэтому к результатам подобных вычислительных экспериментов следует относиться крайне внимательно.

## Молекулярная динамика

Второй большой группой методов являются методы молекулярной динамики (МД), основанные на физических законах. Сюда относят как равновесную МД, так и неравновесную, в которой к системе добавляют различные дополнительные потенциалы. Одной из главных проблем, которую может решить МД, является проблема равновесного состояния белка. Структуры, находящиеся в Protein Data Bank, в большинстве своем получены с использованием кристаллов, в котором конформация белка не является равновесной для растворимого нативного состояния. Использование подобных структур в молекулярном докинге может приводить к ошибочным результатам. В таком случае равновесную МД используют в качестве генератора нескольких равновесных конформаций белка, которые в дальнейшем используют для так называемого ансамблевого докинга [Adelusi и др., 2022]. Этот подход позволяет отчасти обходить ограничение молекулярного докинга, связанное со статичностью структуры белка. Кроме того, моделирование МД позволяет находить несколько конформаций белка, которые детерминируются связанными лигандами [Wang и др., 2014], и обнаруживать неизвестные сайты связывания, которые отсутствуют в кристаллической структуре [Strecker, Meyer, 2018].

Другой важной проблемой молекулярного докинга является тот факт, что полученный комплекс белка с лигандом в определенной конформации не гарантирует стабильности взаимодействия лиганда с белком и комплекса в целом. Для дальнейшей оценки полученных комплексов и поиска их локального минимума зачастую используют МД. Основными характеристиками, которые чаще всего получают из равновесных симуляций МД, являются среднеквадратичное отклонение (RMSD), среднеквадратичные флуктуации (RMSF) остатков в сайте связывания, радиус гирации (ROG), количество и стабильность водородных связей [Adelusi et al., 2022b]. В то время как RMSD лиганда показывает его стабильность в связанном состоянии, RMSF аминокислотных остатков в сайте связывания указывает на прочность взаимодействий белка с лигандом. Эти две характеристики

являются наиболее информативными.

Возможности МД не ограничиваются поиском локальных минимумов и отбором равновесных структур. Объединение МД с методами расчета MM-PBSA или MM-GBSA (молекулярная механика в сочетании с теорией Пуассона–Больцмана (PB) или обобщенной теорией Борна (GB) и площадью поверхности, доступной для растворителя (SA)), которые позволяют получить энергетические характеристики взаимодействия лиганда с его мишенью [Genheden, Ryde, 2015]. Однако, остается проблема связанная с невозможностью МД замести всё возможное координатное пространство. Дело в том, что некоторые конформационные переходы или межмолекулярные реакции имеют высокие энергетические барьеры, которые невозможно преодолеть в течение разумного времени симуляции МД, а значит получить энергию переходов таких состояний становиться сложно. Для решения этой проблемы разрабатываются различные методы для улучшения отбора проб, основанные на добавлении дополнительных потенциалов в систему, которые «выталкивают» ее из состояния равновесия. Наиболее распространенными из них являются метадинамика [Barducci, Bonomi, Parrinello, 2011], масштабированная МД, позволяющая ускорить расчет через увеличение масс атомов, искусственное повышение температуры, изменение потенциалов в силовых полях или через несколько путей одновременно, гауссово-ускоренная МД [Wang et al., 2021], МД взвешенного ансамбля [Zuckerman, Chong, 2017], адаптивная выборка для построения марковских моделей состояний [Bowman, Ensign, Pande, 2010] и зонтичный отбор проб [Torrie, Valleau, 1977]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения и подходит для решения различного рода задач, начиная от простых конформационных перестроек в белке, заканчивая сложным белок-белковыми взаимодействиями. Однако для всех методов МД характерно уменьшение скорости расчета с увеличением количества атомов в системе. Для расчета крупных систем часто используют крупнозернистую МД, в которой 2–4 атома объединяются в так называемые зёरна. Недавно было создано силовое поле Martini3 с существенным набором типов зёрен, которые позволяют более точно описывать малые молекулы [Souza et al., 2021].

## *Броуновская динамика*

Обособленно от описанных выше методов стоят методы броуновской динамики [Ermak, McCammon, 1978; Van Gunsteren, Berendsen, 1982], которые редко применяются для разработки лекарственных препаратов, но которые зарекомендовали себя в исследованиях белок-белковых комплексов. Эти методы позволяют моделировать процессы диффузии и расчета кинетики диффузионного связывания, при этом биомолекулы принимаются за твердые тела, а растворитель учитывается неявным образом. За счет низкой стоимости вычислений такие процессы можно моделировать на временных масштабах порядка миллисекунд всего за несколько часов расчетного времени. Из-за ограничений использования неявного учёта растворителя и допущения о жёсткости тела, возможность применения многомасштабных подходов, например через объединение методов молекулярной и броуновской динамик, может повысить точность метода. Примером такого подхода является работа по изучению взаимодействия белков электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата [Fedorov et al., 2019], выполненная на кафедре биофизики МГУ имени М.В. Ломоносова, и ряд других работ [Golla, Prajapati, Kleinekathöfer, 2021; Luty, El Amrani, McCammon, 1993; Zeller et al., 2017]. Конечно, такой подход не обошел и область разработки лекарств и на его основе был создан программный пакет SEEKR, который позволяет рассчитывать как кинетические, так и энергетические характеристики взаимодействий малых молекул с белками [Votapka et al., 2017], но, судя по всему, эти методы еще не обрели всеобщее доверие и распространенность.

Тем не менее броуновская динамика и сама по себе позволяет решать ряд весьма востребованных задач. Прежде всего это вычисление скорости ассоциации и аффинности связывания двух биомолекулярных объектов (в основном, белки и малые молекулы). Так, в отличии от молекулярного докинга, броуновская динамика способна воссоздавать путь связывания двух молекул и их сближение и изменение взаимной ориентации в основном под действием дальних электростатических взаимодействий. Такие подходы используются как в белок-

белковых взаимодействиях [Motiejunas et al., 2008], так и в лиганд-белковых [Sadiq et al., 2021]. В целом, в последнее время броуновская динамика помогла решить различные задачи по моделированию механизмов дезагрегации белков, динамики микротрубочек, взаимодействия белков электрон-транспортных цепей, а также между белками и ДНК [Muñiz-Chicharro et al., 2023].

### *Молекулярное моделирование для поиска противовирусных препаратов*

Сами по себе вычислительные эксперименты *in silico*, конечно, не приводят к открытию новых лекарственных препаратов. Наибольшую ценность имеют комплексные исследования, которые сочетают в себе и расчеты *in silico*, и эксперименты *in vitro* и *in vivo* [Adelusi et al., 2022a].

На фоне пандемии COVID-19 методы молекулярного моделирования стали особенно мощным инструментом для поиска противовирусных препаратов. Высокий интерес к этой тематике позволил исследователям по всему миру протестировать различные соединения на их способность ингибиовать противовирусные мишени коронавируса SARS-CoV-2. К примеру, в работе [Jin et al., 2020] использовался метод молекулярного докинга, который позволил идентифицировать пептидомиметик N3, который ингибирует протеазу M<sub>pro</sub> коронавируса, структура которой также была получена с помощью моделирования по гомологии. Дальнейшие эксперименты *in vitro* показали, что это соединение действительно является необратимым ингибитором протеазы, а кристаллизация этого белка в комплексе с N3 показала схожее расположение ингибитора в сайте связывания. В работе [Hu et al., 2021] проводился поиск ингибиторов TMPRSS2 – трансмембранный серин-протеазы 2, которая играет ключевую роль в проникновении коронавируса внутрь клетки-хозяина. Молекулярный докинг позволил сократить число малых молекул с 20 000 до 350, а с помощью дальнейших биохимических анализов было предложено 4 соединения на роль эффективных ингибиторов TMPRSS2.

Второй большой группой исследований являются работы по моделированию

взаимодействия лекарств, которые были обнаружены в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Такие работы позволяют понять механизмы действия лекарственных препаратов, особенности их взаимодействия с белками-мишениями, а также помогают в оптимизации таких молекул для улучшения их связывания. В работе [Tripathi et al., 2020] представлено комплексное исследование, сочетающее компьютерное моделирование с экспериментальными методами, для изучения взаимодействия тейкопланина с основной протеазой SARS-CoV-2 (3CLpro). Для поиска эффективных ингибиторов этого фермента авторы провели молекулярный докинг ряда одобренных клинических препаратов. Результаты исследования показали, что тейкопланин проявляет наибольшую ингибирующую активность среди протестированных соединений. Молекулярный докинг выявил оптимальное положение молекулы в активном центре протеазы, где она образует стабильные взаимодействия с ключевыми аминокислотами His41 и Cys145. Рассчитанная энергия связывания составила около –8,0 ккал/моль, что согласуется с экспериментальными данными и подтверждает высокий потенциал тейкопланина как ингибитора 3CLpro.

Комбинированный подход был использован в работе [Golla, Prajapati, Kleinekathöfer, 2021], это позволило детально изучить взаимодействие антибиотика фосфомицина с бактериальным порином OmpF и его мутантами. Авторы отмечают, что такой поход был бы полезен для проверки проницаемости новых соединений и изучения механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам. Упомянутые методы броуновской динамики необходимо отметить работы по изучению электростатического взаимодействия фотосенсибилизаторов с S белком коронавируса и с оболочкой SARS-CoV-2 [Fedorov et al., 2021; Fedorov et al., 2022], которые позволили выявить основные места связывания этих молекул и предположить некоторые механизмы их действия.

На данный момент кандидаты лекарственных препаратов, полученные с помощью молекулярного моделирования, так и не получили одобрения для использования в клинической практике. Однако, это скорее связано со стоимостью проведения клинических испытаний, чем с неадекватностью получаемых

результатов [Adelusi et al., 2022a]. Таким образом, методы молекулярного моделирования в совокупности с растущими вычислительными мощностями современных компьютеров представляются разумным перспективным подходом как для поиска новых лекарственных препаратов, так и для оптимизации и изучения механизмов действия существующих препаратов.

## 1.2. Физико-химические свойства метиленового синего и его практическое применение в медицинской практике

МС относится к тиазиновым красителям, в кристаллической форме представляет собой тёмно-зеленые кристаллы с бронзовым оттенком, а его водный и спиртовой раствор имеют тёмно-синий цвет. МС был впервые синтезирован немецким химиком Генрихом Каро в 1876 году и в последствии стал первым полностью синтетическим соединением, используемым в медицине [Gürsel et al., 2006]. С тех пор он широко применяется в медицинской практике в качестве диагностического и терапевтического агента.

В растворе МС чаще всего существует в виде хлорида, при этом молекула несёт один положительный заряд. Химическая структура МС представлена на Рисунке 1.2.1.

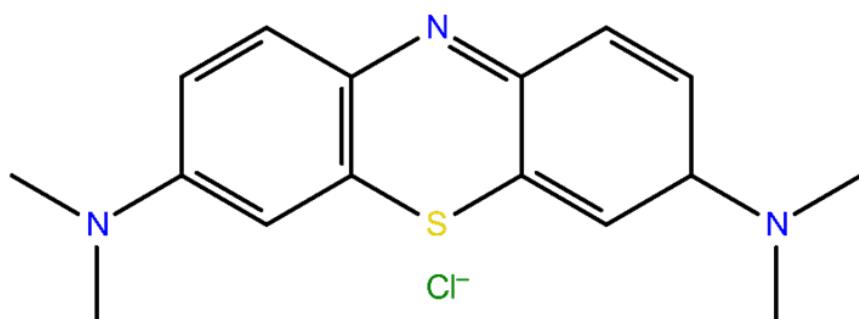


Рисунок 1.2.1. Химическая структура молекулы метиленового синего в виде растворимой соли хлорида.

Структура включает в себя три ароматических кольца, два из которых полностью углеродные, а одно включает в себя атомы сера и азота. По бокам молекулы располагаются две диметиламиновые группы. Квантово-механические расчеты электростатического потенциала МС показали, что единичный положительный заряд МС распределен на азотах диметиламиновых групп [Luger et al., 2018].  $pK_a$  молекулы МС составляет 3,8, следовательно, он является нейтральным при  $pH \leq 3,8$  и положительно заряженным при  $pH$  выше 3,8, в том числе и в физиологических растворах [Khan et al., 2022]. Молекулы МС способны вступать в окислительно-восстановительные реакции, при этом он может принимать два электрона и один протон переходя из катионной формы в нейтральную бесцветную форму (лейко-МС). При присутствии атомарного кислорода лейко-МС обратно окисляется до катиона [Bruchey, Gonzalez-L, 2008]. Таким образом, в водной кислородсодержащей среде МС находится преимущественно в окисленной форме в виде однозарядного катиона. В клетках МС может локализоваться в митохондриях, где является дополнительным переносчиком электрона с первого комплекса дыхательной цепи на цитохром С, уменьшая количество генерируемых активных форм кислорода. Благодаря этим свойствам МС используется в качестве нейропротектора при нейродегенеративных заболеваниях.

Широкое применение МС в медицине в значительной степени обусловлено его физико-химическими свойствами. Прежде всего, он имеет низкую молекулярную массу 319,85 г/моль, растворим в метаноле, 2-пропаноле, воде, этаноле, ацетоне и этилацетате [Salimi, Roosta, 2019]. Его растворимость в воде составляет 43,6 г/л при 25 °C [Pham, Kim, Ko, 2020].

Особый интерес представляют оптические свойства МС в связи с его способностью переходить в возбуждённое состояние при поглощении света. Спектры поглощения МС показывают наиболее интенсивный пик поглощения на длине волны около 664 нм, связанный с мономером МС. В форме димера пик поглощения смещается на длину волны 612 нм. В растворе присутствуют как мономерная, так и димерная формы МС, поэтому на спектре так же выделяют плечо

в области 612 нм с менее интенсивным поглощением [Tardivo et al., 2005]. Еще две полосы появляются в ультрафиолетовой области с пиками около 292 и 245 нм, они связаны с замещенными бензольными кольцами [Mondal, De Anda Reyes, Pal, 2017]. Спектр поглощения МС в различных растворителях представлен на Рисунке 1.2.2.

МС активируется светом в возбужденное синглетное состояние ( $^1\text{MC}$ ).  $^1\text{MC}$  может с одинаковой вероятностью переходить обратно в основное состояние или в возбужденное триплетное состояние  $^3\text{MC}$ .  $^3\text{MC}$  может реагировать с кислородом в процессах, опосредованных реакциями II типа, с образованием синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) и основного состояния МС или, альтернативно, в гораздо более медленном процессе с образованием супероксида и МС. Наиболее быстрая реакция

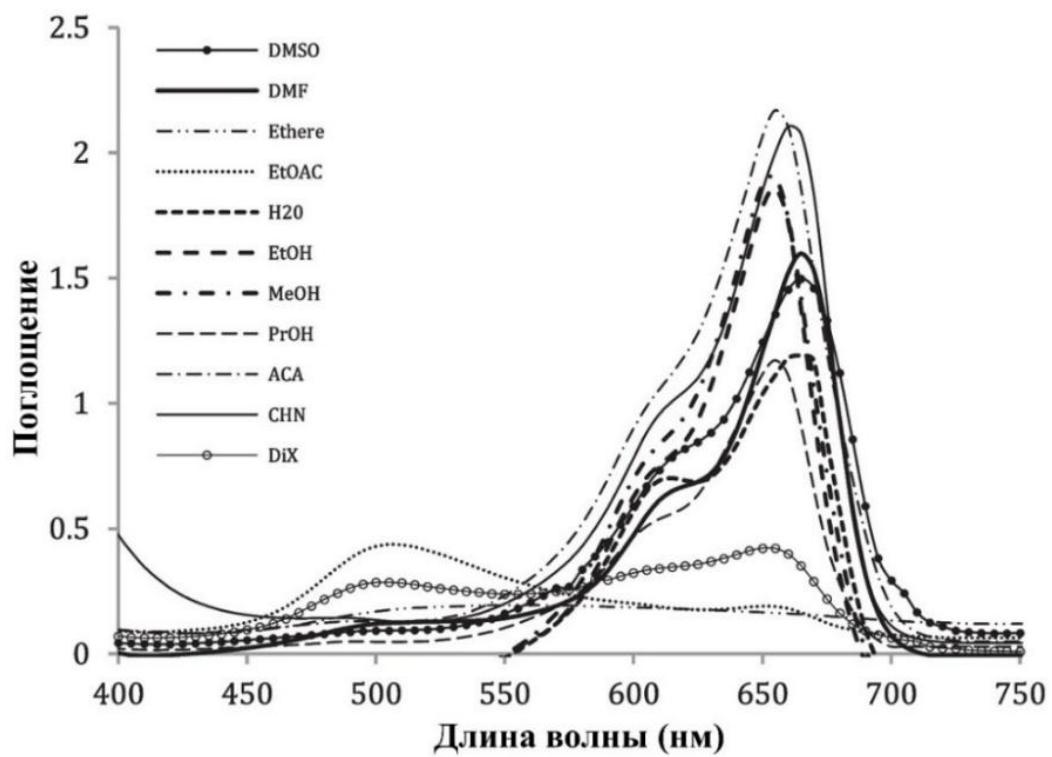


Рисунок 1.2.2. Электронный спектр поглощения  $3,13 \times 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup> раствора МС в различных растворителях при комнатной температуре  $\sim 25$  °C [Hemdan, 2023].

II типа происходит с образованием синглетного кислорода и основного состояния МС. Следует отметить, что это квантово-механически разрешенная реакция, поскольку кислород существует в триплетном состоянии молекулы в своем основном состоянии. Кислород в синглетном состоянии имеет энергию на 23 ккал выше, чем кислород в основном состоянии, и является очень сильным окислителем. Возбужденное триплетное состояние МС также может реагировать с кислородом с образованием супероксида, но его образование происходит гораздо медленнее, чем синглетный кислород. Альтернативно,  $^3\text{MC}$  также может реагировать в процессах типа I, с субстратом или растворителем, опосредуя перенос протона или электрона (Рисунок 1.2.3). Реакции I типа могут протекать в насыщенных воздухом водных растворах [Floyd, Schneider, Dittmer, 2004]. Отмечено, что МС является очень эффективным фотосенсибилизатором синглетного кислорода с зарегистрированным квантовым выходом, превышающим 0,55 [Bonneau et al., 1975].

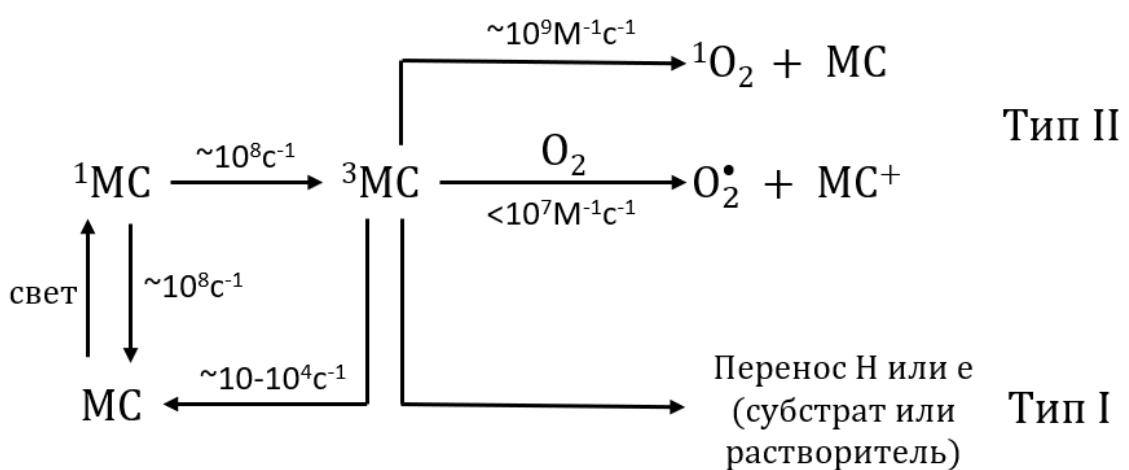


Рисунок 1.2.3. Схема основы фотохимии метиленового синего (по работе [Floyd, Schneider, Dittmer, 2004]). МС – основное состояние,  $^1\text{MC}$  – синглетное состояние,  $^3\text{MC}$  – триплетное состояние,  $^1\text{O}_2$  – синглетный кислород,  $\text{O}_2^\bullet$  – супероксид.

Физико-химические свойства и фотохимия МС дает основу для понимания его принципа действия в различных биологических системах, что в свою очередь обуславливает его практическое применение. Действие МС во многом обусловлено его способностью к генерации  $^1\text{O}_2$ . В свою очередь время жизни синглетного кислорода в воде составляет 4 мкс, а пробег – 125 нм, однако в клетках, где присутствует множество биомолекул, с которыми может взаимодействовать синглетный кислород, эти величины существенно ниже [Redmond, Kochavar, 2006].

Важным свойством МС является его высокая биодоступность и низкая токсичность. При пероральном приеме он позволяет получить до 50% биодоступности в различных тканях, при этом постоянный прием МС у крыс и мышей в дозах до 200 мг/кг/день пероральным путем в течение 13 недель не показал признаков токсичности. Такие дозы в тысячи, а иногда и в сотни тысяч раз больше клинически рекомендуемых. В качестве примера для человека внутривенный МС в дозах 1–5 мг/кг использовался в основном при метгемоглобинемии и отравлении цианидом без сообщений о серьезных побочных эффектах [Seghatchian, Struff, Reichenberg, 2011]. Биологические клеточные структуры, с которыми может взаимодействовать МС весьма разнообразны, однако их объединяет важное свойство – в основном это отрицательно заряженные структуры (нуклеиновые кислоты, мембранны), так как они легко взаимодействуют с положительно заряженным МС посредством электростатических сил.

Хорошо изучено взаимодействие МС с нуклеиновыми кислотами, а также влияние такого связывание на МС-опосредованное производство синглетного кислорода. Возбужденное синглетное состояние МС сильно подавляется связыванием МС с областями, богатыми цитозином и гуанином, но не с областями, богатыми аденином и тирозином. Уменьшение выхода возбужденного синглетного состояния привело к последующему уменьшению количества возбужденного триплетного состояния МС. Было отмечено, что время жизни  $^3\text{MC}$  было намного больше, когда кислород отсутствовал. Это наблюдение согласуется с переносом энергии от  $^3\text{MC}$  к кислороду с образованием  $^1\text{O}_2$  [Kelly, Van Der Putten, Mcconnell, 1987].

В качестве красителя для визуализации тканей органов человека МС был предложен довольно давно. Первое сообщение об использовании МС для визуализации параситовидных желез относится к 1971 году, когда после внутривенного введения высокой дозы вещества (5 мг/кг) хирурги заметили, что параситовидные железы постепенно меняли цвет (синий) в течение одного часа с последующим постепенным возвращением к норме через два с половиной часа [Dudley, 1971]. Более того, нормальная ткань параситовидной железы была окрашена только на периферии, в то время как аденомы полностью изменили цвет.

Одним из значимых свойств МС для медицинской практики является его способность к флуоресценции. Эта способность используется для визуализации различных биологических структур во время хирургических операций и других манипуляций. Так, недавно был предложен метод визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне (Near-infrared (NIR) imaging) с использованием молекул флуорофоров [Nguyen et al., 2018]. В свою очередь МС является одобренным и широко используемым флуорофором. Сообщалось об успешном применении МС в сочетании с NIR во время оперативных вмешательств на органы малого таза, щитовидной и параситовидной желез, а также во время операций по удалению поджелудочных нейроэндокринных опухолей и опухолей молочных желез [Cwalinski et al., 2020]. Такой подход позволяет использовать небольшие дозы (<2 мг/кг) МС и сводит побочные эффекты от его применения к минимуму.

МС широко используется в терапевтической практике как ингибитор синтазы оксида азота и гуанилатциклазы. Было обнаружено, что он улучшает гипотонию, связанную с различными клиническими состояниями [Bosoy et al., 2017]. Он также улучшает гипоксию и гипердинамическую циркуляцию при циррозе печени и тяжелого гепатопульмонального синдрома [Schenk et al., 2000], и приводит к временному и воспроизводимому улучшению артериального давления и сердечной функции при септическом шоке [Preiser et al., 1995]. МС в своей заряженной форме плохо проходит через клеточные мембранны из-за наличия заряда на нем при физиологических значениях рН. Однако, в специфических условиях при метгемоглобинемии внутри организма МС может вступать в окислительно-

восстановительные реакции, и восстановленная форма метиленового синего (MCH) приобретает способность проходить через липидные слои. Причем внутри клеток MCH снова способен окисляться до катиона MC, выступая в качестве переносчика электрона [Takeoka et al., 1997]. MC был первым синтетическим противомалярийным средством, использованным в конце 19-го и начале 20-го веков против всех типов малярии [Lu et al., 2018; Schirmer et al., 2003]. С появлением других противомалярийных средств, таких как хлорохин, применение MC отошло на второй план до тех пор, пока в некоторых регионах Африки возбудитель малярии *Plasmodium falciparum* не выработал устойчивость к этим препаратам [Ginimuge, Jyothi, 2010].

### **1.3. Строение оболочечных вирусов и их жизненный цикл**

#### **1.3.1. Строение вириона коронавируса**

Оболочечные вирусы составляют довольно обширную группу вирусов, часть из которых имеет ключевое значение для здравоохранения. Наиболее известные из них вирус гриппа, вирус иммунодефицита человека, вирус Эболы и коронавирусы. В 21 веке представители коронавирусов (CoV) оказались в центре внимания в связи со вспышками тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) в 2002-2003 годах [Peiris et al., 2003], ближневосточного респираторного синдрома (MERS) в 2012 году [De Groot et al., 2013] и пандемией COVID-19 [Zheng et al., 2020], которая побудила исследователей по всему миру к тщательному изучению строения и жизненного цикла ее возбудителя SARS-CoV-2. Коронавирусы MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 до сих пор остаются в приоритетными направлениями для исследования и разработки лекарственных препаратов по оценке Всемирной Организации Здравоохранения [WHO, дата доступа: май 2025]. Вирус SARS-CoV-2, а также вирусы SARS-CoV и MERS-CoV, относятся к роду *Betacoronaviruses*, входящему в семейство *Coronaviridae*. Они представляют собой одноцепочечные РНК-содержащие вирусы с положительной полярностью генома, то есть с их РНК

может непосредственно происходить трансляция вирусных белков. Основными мишениями для SARS-CoV-2 являются бронхиальные эпителиальные клетки, пневмоциты и эпителиальные клетки верхних дыхательных путей [Martines et al., 2020]. В целом, коронавирусы обычно вызывают только легкие симптомы воспаления верхних дыхательных путей и иногда желудочно-кишечного тракта. Напротив, инфекция высокопатогенными коронавирусами, включая SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV, вызывает тяжелые симптомы, подобные инфекциям, вызванным вирусами гриппа, которые могут прогрессировать до острых респираторных дистресс синдромов (ARDS), пневмонии, почечной недостаточности и смерти [Zhou et al., 2023].

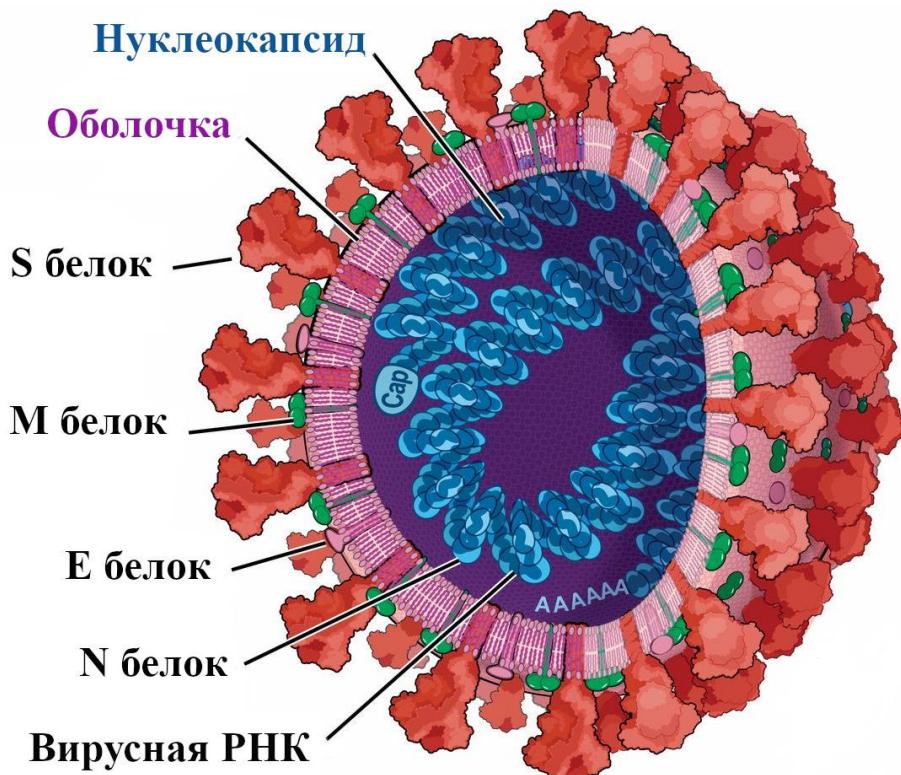


Рисунок 1.3.1. Схематичное строение вириона коронавируса SARS-CoV-2.

Внутренний нуклеокапсид показан синим цветом, мембрана внешней оболочки – розовым цветом. Структурные белки имеют следующие обозначения: S белок – красный цвет, M белок – зеленый цвет, E белок – розовый цвет, N белок – синий цвет [Bergmann, Silverman, 2020].

Оболочечные вирусы объединяет наличие внешней оболочки, состоящей из мембраны и встроенных в нее вирусных белков. Внутри этой оболочки находится нуклеокапсид, содержащий вирусный геном. Мембрана оболочки коронавируса происходит из мембран промежуточного компартмента аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума (ERGIC) клетки хозяина, которая участвует в почковании вирусных частиц [Saud et al., 2022]. Строение оболочечных вирусов и их жизненный цикл имеют общие черты. Здесь мы рассмотрим строение оболочечных вирусов на примере коронавируса SARS-CoV-2 (Рисунок 1.3.1). Стоит отметить, что геном коронавируса SARS-CoV-2 достаточно близок к коронавирусу SARS-CoV (82% идентичности последовательности), в то время как идентичность необходимых ферментов и структурных белков и вовсе превышает 90% [Naqvi et al., 2020]. Это позволяет использовать исследования SARS-CoV в качестве отличного фундамента для будущих исследований SARS-CoV-2 и понимании его сходств и отличий от ряда других коронавирусов.

Структурные белки SARS-CoV-2 включают белки шипа, или спайковые белки (S), белки оболочки (E) и мембранные белки (M), а также РНК-связывающий нуклеокапсидный белок (N). Сферические частицы коронавируса диаметром 80–120 нм окружены бислойной мембраной, липиды которой происходят из мембраны промежуточного компартмента эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (ERGIC) клеток-хозяина. Нуклеокапсидный (N) белок связывается с вирусной РНК и образует внутренний белковый капсид, который окружен внешней мембранный оболочкой. В мембрану оболочки коронавирусов встроены три других структурных белка: S, M и E [Satarker, Nampoothiri, 2020]. Спайковые S белки являются важнейшими функциональными структурами, обеспечивающими узнавание, связывание с рецепторами клеток хозяина, слияние мембран, вход вирусов в клетки [Li, 2016], в то время как M и E белки играют ключевую роль в сборке и почковании вируса [Ravi, Saxena, Panda, 2022; Schoeman, Fielding, 2019]. Согласно [Neuman et al., 2011], количество гомодимеров M белка в оболочке коронавируса оценивалось в 1100 экземпляров. Наличие «короны» вириона SARS-CoV-2 опосредуется присутствием  $26 \pm 15$  копий гомотримерных S белков длиной

около 1300 аминокислотных остатков и размером около 20 нм [Yao et al., 2020]. Е белок, который способен образовывать гомопентамерный виропорин, высоко экспрессируется в мембранах ЭПР, аппарата Гольджи и ERGIC инфицированных клеток [Santos-Mendoza, 2023], но представлен в вирусной оболочке только в нескольких копиях.

Эктодомены S белков (шипы) выступают за липидный бислой на 10–20 нм, образуя характерную «корону», которой и обязана своим названием данная группа вирусов. В вирионе обычно присутствует около 25 копий тримеров S белка [Simon et al., 2021]. В конформации, предшествующей слиянию с клеточной мембраной, S белок коронавирусов существует в виде гомотримера, его мономеры состоят из 1273 аминокислотных остатков, а его размер составляет примерно 180 кДа. Каждая из трех идентичных белковых цепей этого комплекса имеет четко выраженную доменную организацию, включающую два основных структурных элемента – верхний, называемый «головой», и нижний, называемый «ногой». S белок содержит две субъединицы, S1 и S2, опосредующие прикрепление и слияние мембран соответственно, которые разделены сайтом расщепления [Ou et al., 2020]. S1 субъединица включает в себя N-терминальный домен (NTD) и рецептор-связывающий домен (RBD), который имеет ключевое значение на начальных этапах жизненного цикла вируса. Именно он опосредует взаимодействие S белка с рецептором ACE2 на поверхности клетки-хозяина. S2 субъединица содержит следующие структурные домены: два гептадных повтора (HR1 и HR2), белок слияния (FP), трансмембранный домен (TMD) и С-терминальный домен (CTD). Место соединения «головы» и «ножки» шипа находится между HR1 и HR2 доменами. Каждый мономер в тримере S белка может находиться в «закрытом» и «открытом» состоянии. Когда S белок находится в «открытом» состоянии, он способен связываться с ACE2 рецептором, при этом это взаимодействие имеет в основном электростатическую природу [Xie et al., 2020]. Во время процесса этого «открытия» происходят конформационные перестройки в RBD домене, при этом в области этого домена образуется карман, который может выступать в качестве перспективного места связывания противовирусных препаратов, нацеленных на

ингибиции стадии проникновения вируса в клетку.

Матрицу оболочки коронавирусов образует гликозилированный структурный M белок, который состоит из 220–230 аминокислотных остатков, имеет три трансмембранных домена и обычно существует в форме функциональных димеров [Cao et al., 2022]. Этот белок представлен наибольшим числом копий в оболочке коронавируса и, взаимодействуя с другими белками оболочки и N белком, отвечает за сборку и поддержание формы и размера вирионов [Mahtarin et al., 2022].

В отличие от M белка, E белок в оболочке SARS-CoV-2 представлен всего несколькими копиями и преимущественно локализуется в мембранах эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и ERGIC инфицированной вирусом клетки. Небольшой (75 аминокислот) E белок с единственным гидрофобным доменом образует в мембранах гомопентамерные каналы, так называемые «виропорины» [Breitinger et al., 2022; Poggio et al., 2023].

Оболочка вируса SARS-CoV-2 обладает общим положительным зарядом, в основном из-за наличия более тысячи положительно заряженных молекул M белка, однако ее электростатическое поле крайне неоднородно и состоит из чередующихся областей положительного и отрицательного потенциала. Отрицательные участки электростатического потенциала генерируются в основном липидами мембраны фосфатидилинозитолом, фосфатидилсерином и кардилипином, а также отрицательно заряженными аминокислотами спайкового S белка. Отрицательно заряженные молекулы липидов склонны к образованию доменов в вирусной мемbrane, что приводит к существованию обширных отрицательно заряженных областей на поверхности оболочки вируса SARS-CoV-2 [Fedorov et al., 2022].

### **1.3.2. Жизненный цикл коронавируса**

Первым этапом процесса инфицирования является связывание вируса с поверхностью клетки-хозяина. Это происходит благодаря взаимодействию RBD домена вирусного S белка с ACE2 рецептором, который экспрессируется на

поверхности клеток дыхательных путей, альвеол, эндотелия сосудов и других тканей (Рисунок 1.3.2). Эти гомотримерные поверхностные гликопротеины играют решающую роль в распознавании рецепторов клеток, связывании вируса и проникновении в клетку хозяина. S белок был первым структурным белком SARS-CoV-2, который был предложен в качестве мишени лекарственных препаратов [Artese et al., 2020], и многие исследования для разработки вакцин, терапевтических и диагностических инструментов были сосредоточены на этом белке [Santos-Mendoza, 2023]. Проникновение вируса в клетку происходит путем эндоцитоза с образованием эндосомы. После связывания S белок подвергается протеолитическому расщеплению клеточными протеазами, в основном TMPRSS2. В жизненном цикле коронавируса SARS-CoV на этом этапе также ключевую роль играют протеазы CatB и CatL (катепсин B и L, соответственно), однако проникновение SARS-CoV-2 в основном зависит от TMPRSS2, а не от CatB и CatL, поскольку ингибирование одного лишь TMPRSS2 предотвращает проникновение SARS-CoV-2 и его развитие в клеточных линиях легких [Hoffmann et al., 2020]. Это расщепление активирует субъединицу S2, что приводит к высвобождению FP, слиянию вирусной и клеточной мембран и высвобождению вирусного генома в цитоплазму [V'kovski et al., 2021b].

На следующем этапе вирусная генетическая РНК (гРНК), имеющая положительную полярность, сразу же используется в качестве матрицы для синтеза вирусных белков в цитоплазме. SARS-CoV-2 имеет относительно большой геном (около 30 000 нуклеотидов), который кодирует не менее 14 открытых рамок считываивания (ORFs – open reading frame). гРНК коронавирусов содержит нетранслируемые участки на 5'- и 3'-концах, играющие ключевую роль в регуляции репликации вируса. 5'-конец содержит кэп-структуру (7-метилгуанозин), а 3'-конец характеризуется наличием полиаденинового хвоста. Эти элементы выполняют важные защитные функции, предотвращая деградацию вирусной РНК клеточными нуклеазами и обеспечивая стабильность генетического материала в цитоплазме инфицированной клетки. Консервативные последовательности в этих нетранслируемых участках содержат регуляторные элементы, критически важные

для репликации вирусного генома. С гРНК происходит транскрипция субгеномных РНК (сгРНК), кодирующих структурные белки, образование неструктурных белков, а также репликация новых гРНК (Рисунок 1.3.2). Ключевую роль в этих процессах играет мембрана эндоплазматического ретикулума, где образуются двумембранные везикулы, защищающие вирусную РНК от клеточных систем распознавания. По мере развития инфекции эти везикулы объединяются, образуя сложную сеть извитых мембран, служащих местом репликации вируса [Snijder et al., 2006]. Трансляция участков гРНК ORF1A и ORF1B приводит к образованию двух полипептидов (PP1A и PP1AB), которые затем расщепляются вирусными протеазами на шестнадцать неструктурных белков (nsp – non-structural protein). Неструктурные белки играют ключевую роль в жизненном цикле вируса и, в частности, образуют репликационно-транскрипционный комплекс, или RTC (replication-transcription complex), необходимый для дальнейших этапов жизненного цикла вируса и репликации вирусной РНК [V'kovski et al., 2021b].

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) играет центральную роль в биосинтезе клеточных липидов. В мембранах ЭПР и аппарата Гольджи основным липидом является фосфатидилхолин, за которым следует фосфатидилэтаноламин [Casares, Escribá, Rosselló, 2019]. На следующем этапе структурные белки – N, M, E и S белки – транспортируются через эндоплазматический ретикулум в ERGIC, где происходит сборка вирусных частиц. гРНК связывается с N белком, образуя комплексы рибонуклеопротеинов, затем N белок взаимодействует с M белком чтобы направить сборку новых вирионов в компартмент ERGIC [Bai et al., 2021]. Белок M функционирует как ключевой организатор сборки вирионов поскольку может взаимодействовать с другими структурными белками. Помимо взаимодействия с N белками, M белок координируется с E белком, направляя и удерживая S белки в местах сборки вирионов [Steiner et al., 2024]. E белок также обеспечивает изгиб мембраны, необходимый для почкования и формирование новых вирионов. В то время как большинство оболочечных РНК-вирусов используют везикулярный транспорт секреторного пути для достижения плазматической мембраны и почкования, бета-коронавирусы демонстрируют

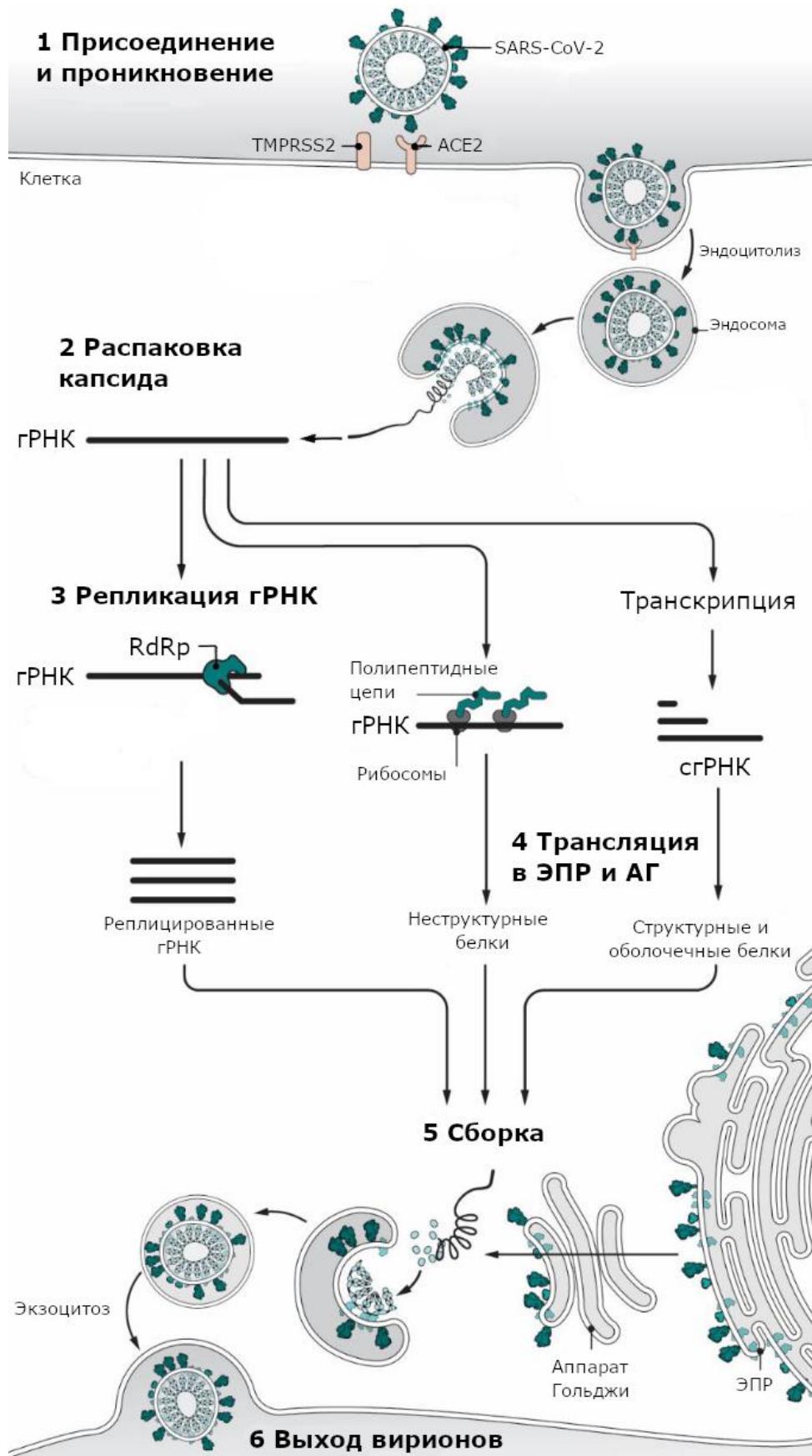


Рисунок 1.3.2. Основные стадии жизненного цикла коронавируса SARS-CoV-2

[Guy et al., 2020].

уникальный механизм выхода из клетки. Их вирионы покидают клетку посредством лизосомального экзоцитоза, регулируемого белком Arl8B (ADP-ribosylation factor-like protein 8B), что обеспечивает высвобождение вирусных частиц во внеклеточное пространство. Вирусные частицы перемещаются к аппарату Гольджи для посттрансляционных модификаций и в итоге достигают периферии [Ghosh et al., 2020].

SARS-CoV-2 содержит несколько вспомогательных белков (например, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8), которые не входят в структуру вириона, но необходимы для структурной целостности вирусной частицы. Они подавляют интерфероновый ответ, активируют убиквитин-протеасомную систему и способствуют апоптозу инфицированных клеток. Например, ORF6 ингибирует ядерный экспорт клеточных РНК. Эти механизмы позволяют вирусу более эффективно реплицироваться, а также уклоняться от иммунной системы. Вспомогательные белки коронавирусов представляют собой группу вирусных белков с высокой степенью изменчивости. Эти белки демонстрируют низкий уровень консервативности даже среди близкородственных видов, что свидетельствует об их быстрой эволюции. Считается, что основная роль этих белков заключается в регуляции взаимодействия вируса с организмом-хозяином, включая модуляцию иммунного ответа и определение вирулентных свойств патогена [V'kovski et al., 2021a]. Следует отметить, что молекулярные механизмы действия большинства вспомогательных белков остаются до конца не изученными. Это связано с отсутствием значимых гомологий как среди других коронавирусов, так и в базе данных известных белковых последовательностей. Такая уникальность существенно затрудняет процесс их функциональной характеристики и установления точной роли в жизненном цикле вируса [Liu et al., 2014].

### **1.3.3. Строение вириона флавивирусов и их жизненный цикл**

Небольшие сферические вирионы флавивирусов с диаметром около 50 нм

имеют строение, типичное для оболочечных вирусов. Геномная РНК окружена множественными копиями капсидного белка (С белок), образуя нуклеокапсидное ядро, которое, в свою очередь, окружено липидным бислоем, полученным из клетки-хозяина, и внешней гликопротeinовой оболочкой. У flaviviruses внешняя оболочка имеет икосаэдрическую симметрию и построена из 180 копий гликопротеинов M (мембранные белки) и E (белки оболочки). Последние организованы в 30 рафтов, каждый из которых состоит из трех димеров E белка. Каждый E белок имеет структурное разделение на домены (Рисунок 1.3.3.1).

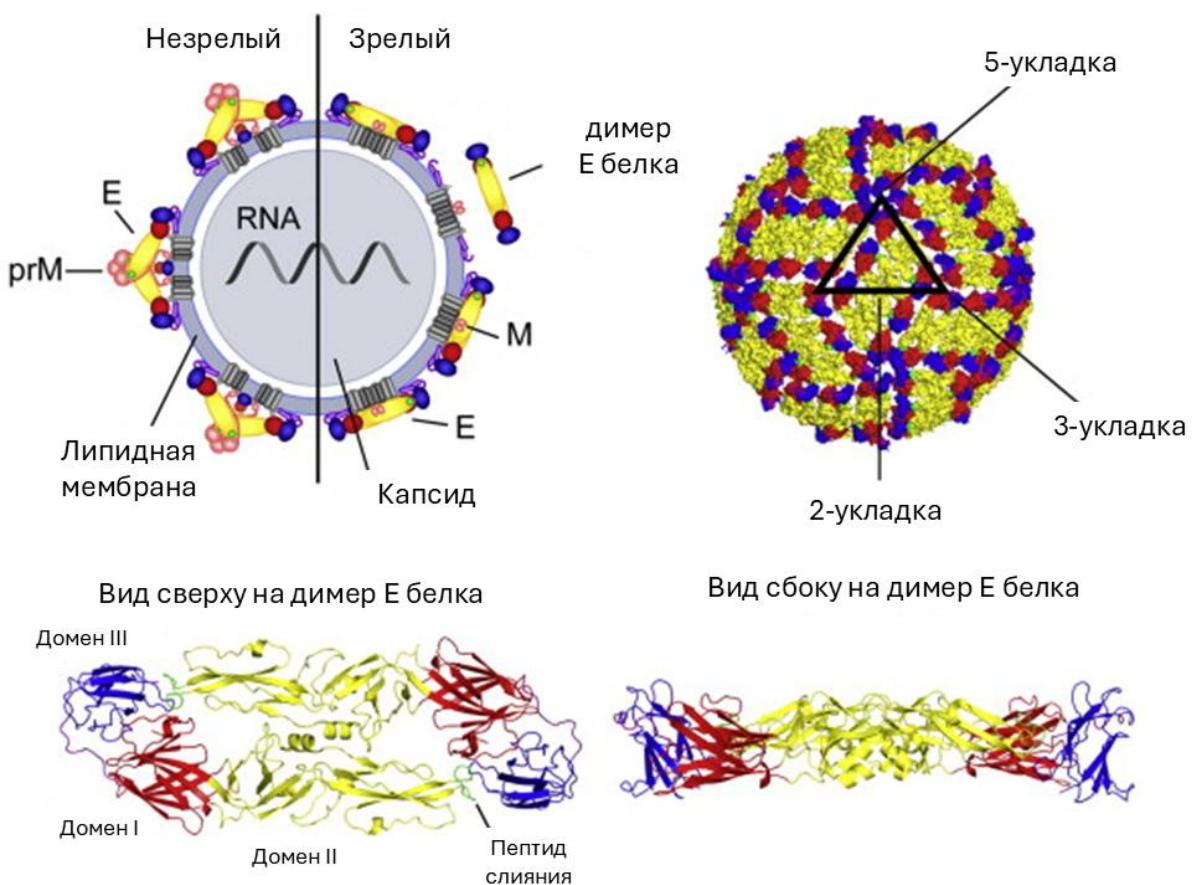


Рисунок 1.3.3.1. Строение вириона flaviviruses [Heinz, Stiasny, 2012]. Три домена белка E окрашены следующим образом: DIII — синий, DI — красный, DII — жёлтый, сливающий пептид — зелёный.

Организация 90 димеров E белка в белковую оболочку flaviviruses устроена таким образом, что существуют области вершин икосаэдра, в которых соединяются по пять димеров (5-укладка, или пятикратная симметрия), по три димера (3-

укладка, или трехкратная симметрия) и области сторон икосаэдра, который состоит из трех димеров E белка (2-укладка, или двухкратная симметрия) (Рисунок 1.3.3.1). Плотное расположение димеров E делает липидный бислой практически недоступным, следовательно, перед слиянием вирусной мембраны с клеткой-хозяином требуются серьезные конформационные изменения белков оболочки [Hasan et. al., 2018].

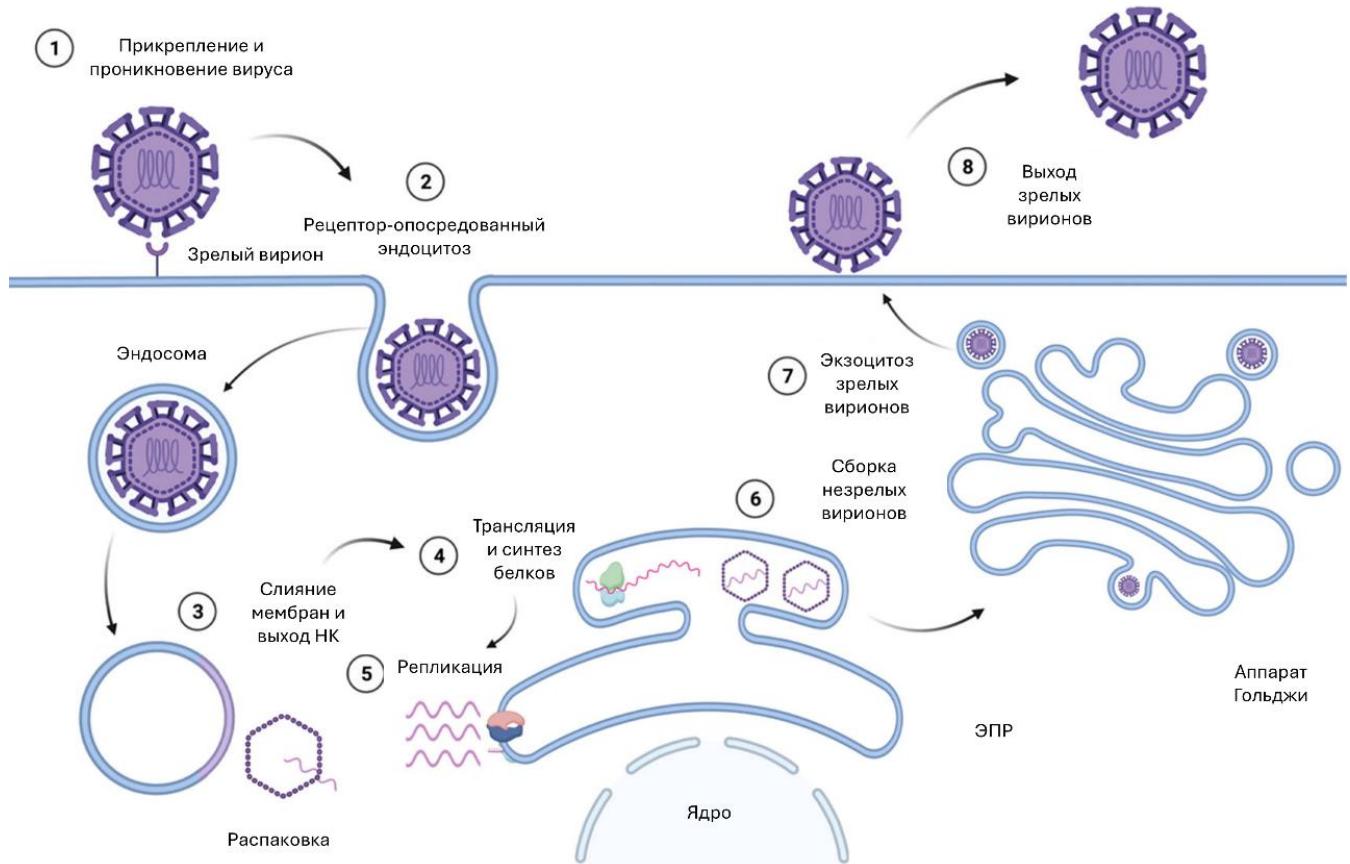


Рисунок 1.3.3.2. Жизненный цикл флавивирусов [Gomes Da Silva at. al., 2023].

Вирионы флавивирусов претерпевают существенные конформационные перестройки белков оболочки в процессе жизненного цикла вирусов, основные различия зрелых и незрелых форм вируса показаны на Рисунке 1.3.3.1. В процессе сборки на стадии почкования вирионов на мембранах ЭПР образуются неинфекционные незрелые вирионы, содержащие комплексы E и prM белков в вирусной мембране. После транспортировки этих частиц по пути экзоцитоза инфицированной клетки prM расщепляется клеточной протеазой – фурином, в транс-сети Гольджи, что в итоге приводит к высвобождению зрелых

инфекционных вирусов во внеклеточную жидкость [Heinz, Stiasny, 2012].

Основные стадии жизненного цикла flaviviruses представлены на Рисунке 1.3.3.2. Самым первым этапом в нём является процесс узнавания вирусом клеточной мембраны. За этот процесс отвечает так называемая ГАГ-связывающая петля E белка, которая узнает гликозамингликаны на поверхности клетки и взаимодействует с ними за счет электростатических взаимодействий [Kim et. al., 2017]. После этого происходит связывание E белка с рецепторами клетки и receptor-опосредованный эндоцитоз вирусной частицы. В отличии от коронавирусов flaviviruses могут использовать широкий ряд рецепторов клетки для проникновения внутрь, которые будут различаться в зависимости от тканеспецифичности инфекции. Среди таких рецепторов встречаются рецепторы ТАМ (Tyro3, Axl и Mer), TIM (T-клетки, иммуноглобин и муцин), AXL (тиrozинкиназа рецептора AXL) или DC-SIGN (специфическая внутриклеточная молекула адгезии дендритных клеток) [Bhagat, Kaur, Seth, 2021].

После образования эндосомы с вирионом происходит процесс слияния вирусной и эндосомальной мембран, который регулируется «гликановой» петлей в домене I. Эта петля имеет консервативный аминокислотный остаток гликозилированного аспарагина, и как считается, регулирует конформационные изменения и доступность петли слияния [Cheng et. al., 2022; Goo et. al., 2018]. Слияние мембран приводит к распаковке вирусного капсида и выходу генетического материала вируса в цитоплазму клетки. Далее происходит трансляция новых вирусных белков и репликация вирусной РНК [Gomes Da Silva at. al., 2023].

Сборка вирусных частиц и их созревание происходит в компартментах ERGIC, где вирусные белки собираются на мембране, формируя новый вирион. Сборка димеров E белков регулируется prM белками, которые собирают три E белка в комплекс prM-E белков. На данном этапе вирионы содержат 60 тримерных комплексов prM-E белков, липидную мембрану и нуклеокапсид, состоящий из РНК и С белков. Эти незрелые частицы не могут вызвать слияние мембран и поэтому не заразны. Процесс созревания имеет pH-зависимый характер (Рисунок 1.3.3.3.).

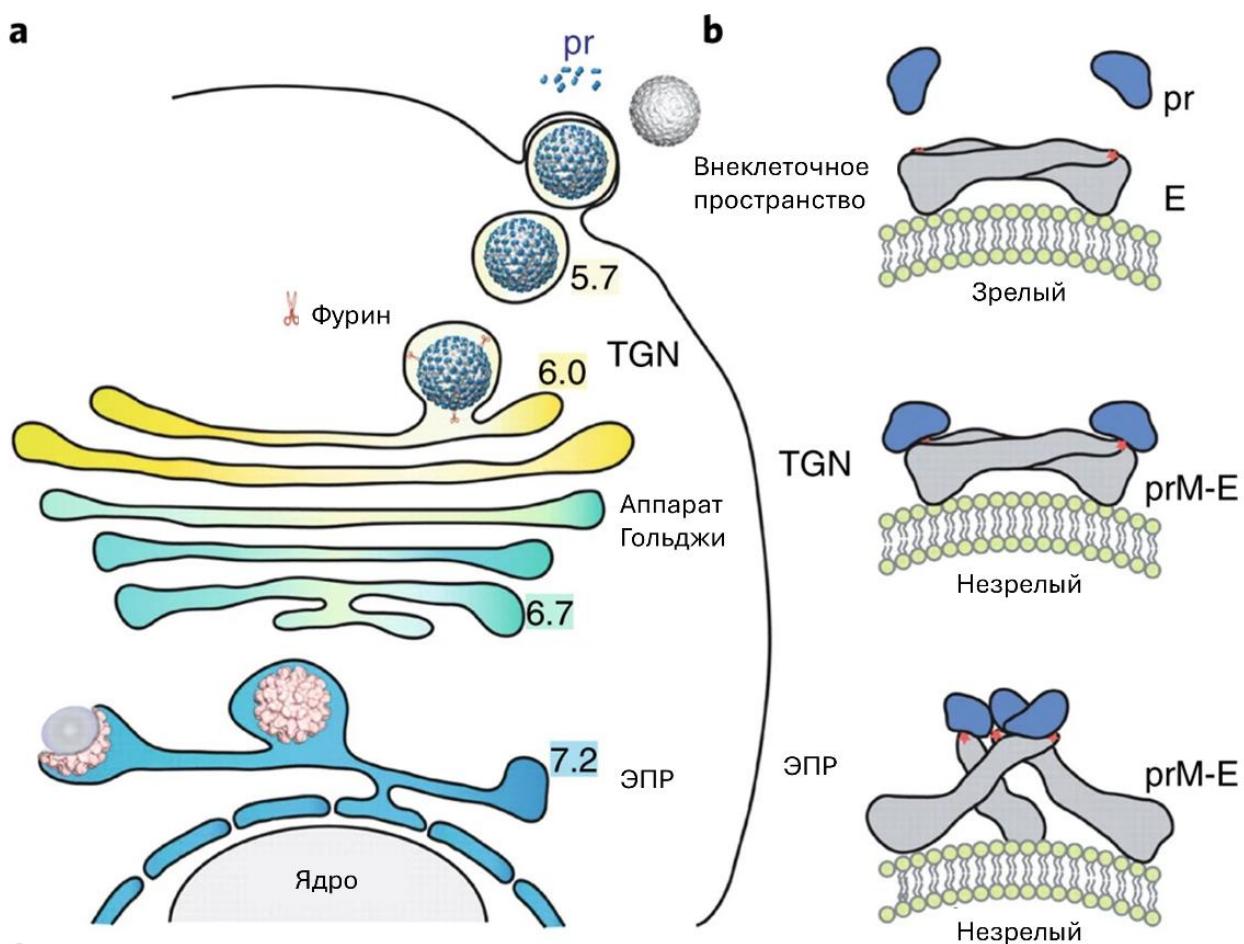


Рисунок 1.3.3.3. Конформационные изменения вирусных частиц в секреторном пути и конфигурация гликопротеинов на поверхности вириона в процессе созревания [Hasan et. al., 2018].

Незрелые вирионы переносятся через аппарат Гольджи в TNG (транс-сеть аппарата Гольджи), где подкисление pH вызывает конформационное изменение белков вириона и расщепление prM белков фурином, pr остается связанным с E белком до тех пор, пока вирион не выйдет во внеклеточную среду. Протеолитическая обработка prM необходима для жизненного цикла вируса, но полное созревание всех 60 тримерных комплексов prM-E белков не является обязательным требованием для инфекционности flaviviruses. [Hasan et. al., 2018].

## 1.4. Строение виропоринов SARS-CoV-2 и их роль в жизненном цикле коронавируса

### 1.4.1. Строение и функционирование виропоринов коронавируса, их роль в жизненном цикле вируса

Е белки являются высоко консервативными структурными белками, присутствующими во всех коронавирусах. Это достаточно маленькие белки длиной 75 аминокислотных остатков (в случае коронавируса SARS-CoV-2), которые состоят из трех доменов: гидрофильный N-концевой домен, гидрофобный трансмембранный домен и длинный гидрофильный C-терминальный домен. В отрицательно заряженном N-терминальном конце присутствуют два остатка глутаминовой кислоты (E7 и E8). Затем следует гидрофобный трансмембранный домен (TMD) богатый фенилаланинами (F20, F23, F26). За этой областью следует область C-терминального домена, богатая остатками аргинина и лизина (R39, K53, R61, K63, R70), здесь также присутствует остаток аспарагиновой кислоты (D72) [Schoeman, Fielding, 2019]. Таким образом, для Е белка можно выделить как положительно и отрицательно заряженные, так и гидрофобные области. На конце C-терминальной части белка также выделяют так называемый PDZ-домен, названный по первым буквам трех белков, у которых он был впервые обнаружен. PDZ-домен состоит из четырех аминокислот (DLLV) и представляет собой модуль белок-белкового взаимодействия, способный связываться с C-концевым доменом (CTD) целевых белков, включая адаптерные белки клеток хозяина. По-видимому, он играет роль в патогенезе вирусной инфекции [Shepley-McTaggart et al., 2021].

Когда активность пентамера Е белка была впервые изучена, он был описан как катион селективный ионный канал, состоящий из пяти мономеров [Wilson et al., 2004]. Дальнейшие исследования виропорина в искусственных мембранах и в клетках млекопитающих после рекомбинантной экспрессии подтвердили, что он является функциональным ионным каналом [Breitinger et al., 2021; Pervushin et al., 2009; Xia et al., 2021]. Белок Е высоко экспрессируется в инфицированных клетках

во время цикла репликации вируса, однако, в оболочке вириона представлен несколькими копиями. Виропорины выполняют функции ионного канала в процессе сборки вирусных частиц в промежуточном компартменте ERGIC и частично в аппарате Гольджи [Nieto-Torres et al., 2015]. Встроенный в мембрану Е белок ориентирован своим N-терминальным концом в просвете ERGIC, а C-терминальным концом в цитоплазму [Venkatagopalan et al., 2015].

Показано, что активность Е белка в качестве ионного канала увеличивает pH компартментов, в которых он присутствует [Cabrera-Garcia et al., 2021; Liao et al., 2006]. Заражение клеток Vero E6 вирусом SARS-CoV-2 приводит к подщелачиванию внутреннего содержимого ERGIC и лизосом, и это изменение pH связывают с функционированием образованных Е белками ионных каналов [Wang, Carreras-Sureda, Demaurex, 2023]. Предполагают также, что Е белки SARS-CoV-2, участвуя в деацидификации лизосом, предотвращают деградацию вирусных частиц [Miura et al., 2023]. Липиды мембранны являются частью архитектуры каналов, образованных Е белками, а липидный заряд сильно влияет на ионную селективность каналов, при этом в отрицательно заряженных мембранах (например, мембранны ERGIC содержат 20% отрицательно заряженных липидов) возрастает проницаемость Е каналов для катионов [Surya et al., 2023]. В работе [Xia et al., 2021] исследовалась катионная селективность виропорина с использованием очищенных виропоринов SARS-CoV-2, встроенных в бислойные липидные мембранны. Эти исследования показали, что в растворах с различными концентрациями катионов и аниона  $\text{Cl}^-$  в качестве противоиона канал проницаем как для  $\text{K}^+$ , так и для  $\text{Na}^+$  с одинаковой эффективностью. Канал также является проницаемым для двухвалентных катионов, таких как  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , однако их проницаемость ниже, чем у одновалентных ионов. В свою очередь, исследования виропоринов SARS-CoV-2, встроенных в мембранны, которые включают липиды с внутренней негативной кривизной, показали предпочтительный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в смешанных растворах  $\text{KCl}-\text{CaCl}_2$  [Verdiá-Báguena et al., 2021]. Было обнаружено, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  облегчают проникновение вирусов в клетки-хозяева, а их наличие имеет решающее значение для инфицирования вирусом SARS-CoV-2 [Zhou et al.,

2023]. Поскольку предполагаемая область канала в пентамере E белка идентична у SARS-CoV и SARS-CoV-2, скорее всего свойства ионного канала виропорина зависят от заряда и состава липидной мембраны, а также от зарядов на белке. Это было подтверждено для виропоринов SARS-CoV, встроенных в нейтральные или отрицательно заряженные искусственные мембранны [Verdiá-Báguena et al., 2013].

Поддержание мембранных градиентов и специфического ионного состава в определенных клеточных компартментах и органеллах имеет важное значение для клеточного гомеостаза. В свою очередь, виропорины, выполняющие роль ионных каналов, могут нарушать эти тонко сбалансированные системы и влиять на множественные клеточные процессы, включая внутриклеточный транспорт, передачу сигналов и индукцию гибели клеток путем апоптоза [Scott, Griffin, 2015]. Было показано, что виропорины как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2 образуют селективные каналы кальция, нарушая гомеостаз кальция, посредством выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных резервуаров, таких как комплексы митохондрий, ЭПР и аппарат Гольджи. Это в свою очередь вызывает активацию NLRP3-инфламмасомы SARS-CoV-2, что приводит к гиперпродукции IL-1 $\beta$  (интерлекин-1  $\beta$ ) и усилиению воспалительной реакции организма. Недавние исследования указывают на двойную роль E белка в регуляции NLRP3-инфламмасомы. С одной стороны, его активность в качестве виропорина, обеспечивающая трансмембранный транспорт ионов, может служить триггером активации этого воспалительного комплекса [Nieto-Torres et al., 2015]. С другой стороны, как показано [Yalcinkaya et al., 2021], действие E белка имеет выраженную стадийную зависимость: на начальных этапах инфекции наблюдается подавление ответа NLRP3 на вирусные нуклеиновые кислоты, тогда как на поздней стадии инфекции отмечается усиление активности NLRP3-инфламмасомы. Подобная двухфазная модуляция воспалительного ответа отражает сложную динамику взаимодействия вируса с иммунной системой хозяина на протяжении всего инфекционного процесса.

Таким образом ионная активность виропорина SARS-CoV-2 специфически коррелирует с усиленным повреждением легких, их отеком, развитием острого респираторного дистресс-синдрома и смертностью [Nieto-Torres et al., 2015; Xia et

al., 2021]. Тяжесть протекания заболевания у пациентов с COVID-19 была связана с дисбалансом электролитов, включая снижение концентрации калия, натрия и кальция в сыворотке крови. Проницаемость виропоринов для этих ионов может объяснять механизм нарушения баланса электролитов, а ингибиование ионной функции виропоринов ослаблять эти симптомы [Zhou et al., 2023].

Основной вклад виропоринов в жизненный цикл SARS-CoV-2 происходит на этапах сборки вирионов и их высвобождения из инфицированных клеток. Он оптимизирует сборку вирионов, а также влияет на вирусную патогенность. Несмотря на то, что белок N значительно увеличивает продукцию новых вирусных частиц, для их сборки достаточно только белков E и M [Ruch, Machamer, 2012]. Ключевая роль виропоринов E белка в процессе почкования вирионов различных коронавирусов показана в нескольких исследованиях *in vitro* [DeDiego et al., 2007; Fischer et al., 1998; Siu et al., 2008]. Работа [DeDiego et al., 2007] по изучению роли виропорина в жизненном цикле SARS-CoV проводилась с использованием рекомбинантного вируса с отсутствующим геном, кодирующим E белок. Исследование проводилось на клеточных линиях Vero E6, культуры клеток печени – Huh-7 и культуры энтероцитов тонкого кишечника – CaCo-2. Показано, что при отсутствии E белка титры вируса снижались в 20 раз в культуре Vero E6 и в 200 раз в культурах Huh-7 и CaCo-2, в экспериментах *in vivo* вирусная нагрузка рекомбинантных вирусов в легких и носоглотке была в 100-1000 раз меньше, чем аналогичная у вирусов дикого типа. Помимо этого, патогенез заболевания был значительно снижен. В работе [Fischer et al., 1998] на мышном коронавирусе (MHV) показано, что мутации в виропоринах приводят к дефектам в новых вирионах. В частности, 80–90% вирионов имеют вытянутую, «перетянутую» форму, в отличие от сферических частиц дикого типа. К тому же мутации в виропоринах приводят к снижению термостабильности вирусных частиц. Работа [Siu et al., 2008] также подтвердила необходимость наличия E белка для правильной сборки вирусных частиц коронавируса SARS-CoV. Функциональное значение E белка коронавирусов, по-видимому, заключается в регуляции структурной организации внешней оболочки. Его основная роль может заключаться в

поддержании оптимальных характеристик мембранны, в том числе ее текучести, что необходимо для приобретения вирусом характерной сферической формы. В случае SARS-CoV-2 (как и других представителей  $\beta$ -коронавирусов, включая SARS-CoV и MHV) E белок, вероятно, принимает участие в процессах завершения почкования новых вирусных частиц. Однако также сообщалось, что E белок участвует в регулировании местоположения S белков, направляя их в места сборки новых вирионов [Zhou et al., 2023].

При наличии нарушений в E белках или ингибировании виропорина, сборка вирионов нарушается, а рекомбинантные вирусные частицы, лишенные E белка, существенно снижают выработку новых вирусных частиц или формируют неправильные вирионы [Lu et al., 2006; Tomar, Krugliak, Arkin, 2021]. Было высказано предположение, что виропорины помогают создать отрицательную мембранный кривизну, которая необходима для закрытия и высвобождения вирусных частиц. По-видимому, виропорины сами по себе способны изгибать мембрану, что подтверждается некоторыми исследованиями по моделированию молекулярной динамики виропоринов, встроенных в мембрану [Mehregan et al., 2022; Monje-Galvan, Voth, 2021]. В дополнение к этому взаимодействие C-терминального конца M белка с E белками способствует поддержанию формы виропорина [Alsaadi, Neuman, Jones, 2020; El Omari et al., 2019]. Помимо этого, первые эксперименты на E белках различных коронавирусов подтвердили, что его экспрессия в клетках млекопитающих изменяет проницаемость мембранны [Liao et al., 2004; Liao et al., 2006].

#### **1.4.2. Молекулярное моделирование виропоринов коронавирусов**

Для понимания строения, функционирования виропорина и его роли в сборке коронавирусных частиц проводилось значительное количество исследований по моделированию поведения E белка и его пентамера внутри мембранны. В базе данных Protein Data Bank существуют две структуры трансмембранного участка

пентамера E белка (PDB ID: 7K3G и 8SUZ). На данный момент наиболее полной является структура пентамера E белка для SARS-CoV (PDB ID: 5X29), которая используется в таких исследованиях за счет высокого процента гомологии с E белком SARS-CoV-2 [Chen et al., 2024; Mehregan et al., 2022]. Также ее использовали в качестве шаблона для создания гомологичных моделей виропорина [Borkotoky, Banerjee, 2021; Cao et al., 2020]. Действительно, процент гомологии для последовательности E белка в этих организмах составляет 96%, а различия составляет делеция остатка глицина в положении 70 и три замены: T55S, V56F и E69R. Все замены находятся в C-терминальном домене белка. Результаты крупнозернистого моделирования показали, что такая модель E белка способна индуцировать искривление мембраны с образованием «ямки» в липидном бислой со стороны N-терминального конца [Mehregan et al., 2022]. Однако, добиться такой конформации ионного канала, при которой наблюдалось бы движение ионов или молекул воды через канал, не удалось, к тому же ограничения крупнозернистой модели не позволили детально изучить взаимодействие C-терминального конца с окружающими липидами мембранны.

Несмотря на высокий процент гомологии, замены с неполярной аминокислоты на ароматическую и с положительно заряженной на отрицательно заряженную аминокислоту могут иметь существенный вклад как во взаимодействие E белка с липидами мембранны, так и в функционирование белка, опосредованное этим взаимодействием. Отсутствие полноразмерной модели пентамера белка побудило исследователей к созданию предсказанных моделей виропорина. Так практически одновременно в конце февраля – начале марта 2020 году было создано две модели: первая – в лаборатории Фейга [Heo, Feig, 2020] (далее, модель Фейга), вторая – в лаборатории Коркина [Srinivasan et al., 2020] (далее, модель Коркина), которые различаются в положении C-терминального домена. В случае модели Коркина этот домен располагается аналогично структуре E белка SARS-CoV и направлен в сторону липидного бислоя, практически полностью повторяя его экспериментально полученную структуру, в то время как в модели Фейга этот домен расположен параллельно поверхности мембранны (Рисунок 1.4.2.1).

На данный момент две эти модели активно используются для моделирования свойств виропорина, однако, наличие двух моделей, очевидно, создает выбор между ними и попытки их сравнения были предприняты в исследовании [Monje-Galvan, Voth, 2021]. Это исследование двух полноатомных моделей виропоринов в липидном бислойе действительно показали существенные различия в поведении Е белка и его влиянии на мембрану. Модель Коркина показала способность к искривлению мембранны, такое же поведение демонстрировала и модель Е белка SARS-CoV (PDB ID: 5X29). В свою очередь модель Фейга не приводила к искривлению мембранны, кроме того, полноатомное молекулярное моделирование

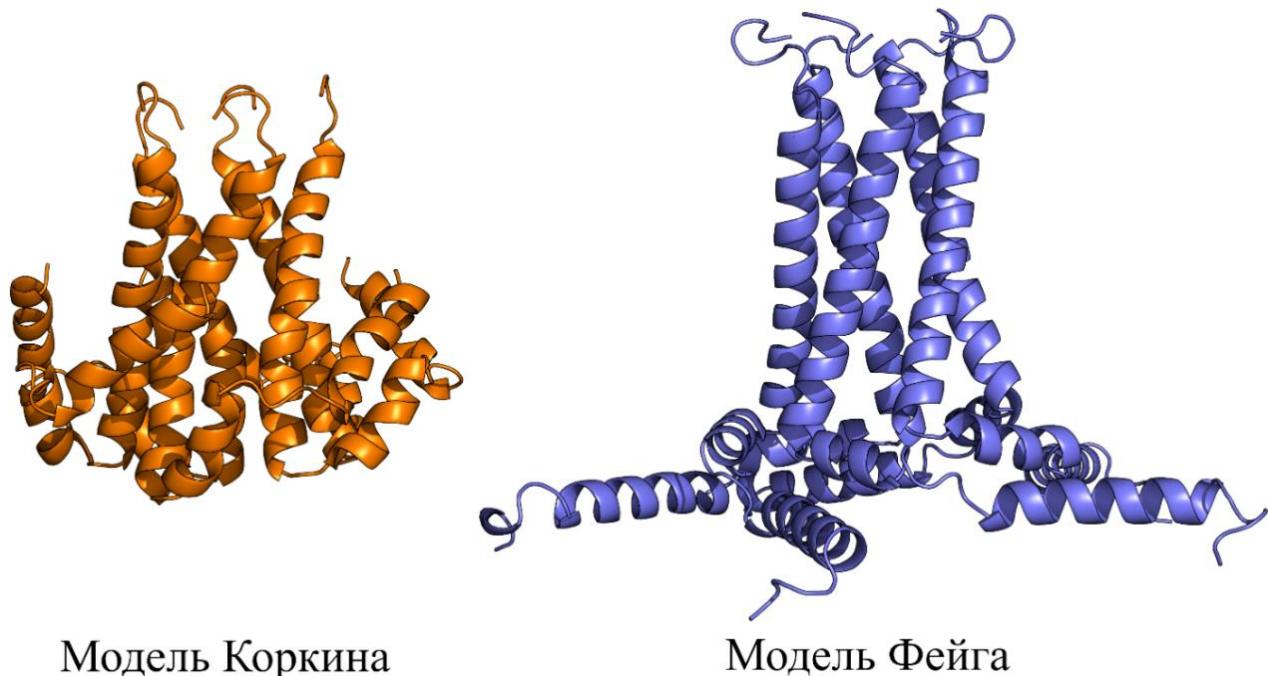


Рисунок 1.4.2.1. Сравнение двух полноатомных моделей виропорина SARS-CoV-2, полученных в лаборатории Коркина (слева) и в лаборатории Фейга (справа).

четырех пентамеров модели Е белка Фейга в мембране также не привела к такому эффекту [Collins et al., 2021]. Интересно, что не только пентамеры Е белка в определенной конформации, но и его мономеры способны искривлять мембрану. В работе [Kuzmin et al., 2022] показано, что мономерный и пентамерный белок Е

может напрямую генерировать мембранные кривизны, и эта функция может быть обусловлена наличием амфи菲尔ного С-концевого домена. С-концевой домен Е белка локализуется в выпуклой области мембраны, образуя потенциальную область для формирования вирионов, которая облегчает почкование вирионов.

Таким образом, Е белок играет ключевую роль не только в жизненном цикле коронавируса, но и в развитии патогенеза заболевания. Он влияет на эффективность выработки новых вирионов в клетке-хозяине, а также на правильную морфологию вирусных частиц. От его активности зависит тяжесть симптомов и смертность у пациентов с COVID-19.

#### **1.4.3. Виропорины как мишени противовирусных препаратов**

Ввиду своего вклада в развитие патогенеза заболевания и своей роли в жизненном цикле, виропорин коронавируса SARS-CoV-2 часто рассматривается в качестве мишени противовирусных препаратов. С развитием вычислительных мощностей и ростом разнообразия программ для молекулярного моделирования, в частности молекулярного докинга, всё большее количество работ посвящается компьютерному скринингу и поиску лекарственных препаратов для различных заболеваний, а также молекулярному моделированию взаимодействия белков с малыми молекулами с оценкой энергии их взаимодействия. COVID-19 способствовал волне работ по поиску противовирусных препаратов, направленных на разнообразные белки SARS-CoV-2. Виропорин не стал исключением. В Таблице 1.4.5.1 приведена информация о вычислительных экспериментах по поиску ингибиторов виропорина SARS-CoV-2 и малых молекулах, выдвинутых в качестве потенциальных кандидатов [Zhou et al., 2023].

Таблица 1.4.3.1. Потенциальные противовирусные препараты, нацеленные на Е белок SARS-CoV-2, найденные с помощью вычислительных экспериментов. Источник: [Zhou et al., 2023].

Класс соединения	Название соединения	Потенциальный механизм действия	Ссылка
Натуральные ингибиторы белка SARS-CoV-2	Синапновая кислота	Связывается в N-концевой поре виропорина	[Orfali et al., 2021]
	<i>Withania Somnifera</i>	Связываются с гидрофобным доменом в области поры виропорина и взаимодействуют с цепью D и цепью E в пентамерной структуре Е белка; связываются с N-концевым доменом (NTD) Е белка, блокируют канальную активность виропорина	[Alharbi, 2021]
	Рутин	Образует водородные связи с Е белком, ингибирует формирование оболочки SARS-CoV-2, сборку вириона и вирусный патогенез	[Bhowmik et al., 2020]
Натуральные ингибиторы белка SARS-CoV-2	Глицирризовая кислота, β-Босвеллевая кислота	Взаимодействует с Е белком, разрушает структуру Е белка	[Fatima, Alam, Khare, 2022]
Синтетические ингибиторы белка SARS-CoV-2	Ретиноевая кислота	Связывается с просветом канала виропорина и взаимодействует с 11 остатками белка, образуя стабильное взаимодействие через водородные связи с высокой энергией взаимодействия, блокируя канал и ингибируя функцию Е белка в качестве виропорина	[Dey, Borkotoky, Banerjee, 2020]
	ZINC23221929 и ZINC06220062*	Связываются через гидрофобные взаимодействия или водородные связи с Е белком, ингибируя активность ионного канала виропорина путем связывания с остатками	[Mukherjee, Harikishore, Bhunia, 2021]
	Урсодеоксихолат, Кенодезоксихолат	Связываются с трансмембранным доменом Е белка через водородную связь, разрушая водородные связи между соседними мономерами, чтобы разрушить структуру виропорина и способствуют проникновению ингибиторов в инфицированные вирусом клетки	[Gupta et al., 2021]

## Продолжение таблицы 1.4.3.1.

Другие	Доксициклин	Образует водородные связи с Leu31, Thr35, Val52 и Ser55 Е белков, блокируя канал виропорина	[Bhowmik et al., 2020]
	Нимболин А	Связывается с Е белком как ингибитор виропорина	[Borkotoky, Banerjee, 2021]

\*Идентификаторы малых молекул в базе данных ZINC ([zinc15.docking.org](http://zinc15.docking.org)).

Вычислительные эксперименты дают лишь потенциальные молекулы, для которых предполагается противовирусная активность. Однако, надежными доказательствами эффективности таких молекул остаются эксперименты *in vitro* и *in vivo*, которые позволяют валидировать результаты, полученные *in silico*. Экспериментальных исследований по ингибированию виропоринов не так много. Амантадин является широко известным ингибитором виропоринов. Эксперименты по оценке его действия на пентамер Е белка SARS-CoV показали только умеренную ингибирующую активность [Torres et al., 2007]. В дальнейших исследованиях амантадин и римантадин тестировались на рекомбинантных виропоринах в клетках HEK293. Оба вещества снижали активность виропоринов в анализе жизнеспособности клеток и электрофизиологических измерениях, при этом ингибирование римантадина было в пять раз сильнее, чем у амантадина [Breitinger et al., 2021]. Производное амантадина – мемантин, блокирует протонный канал M2 вируса гриппа. Это самый ранний противовирусный препарат, используемый для ингибирования вируса гриппа, который также имеет потенциал для использования в качестве ингибитора виропорина SARS-CoV-2 [Cao et al., 2021].

## 1.5. Противовирусная активность метиленового синего

Противовирусная активность МС в основном обусловлена его фотохимическими свойствами, а именно его способностью генерировать активные

формы кислорода при воздействии на него красным светом. МС используется в качестве фотосенсибилизирующего агента для фотодинамической инактивации вирусов в плазме крови [Saha et al., 2018]. Наиболее известным его применением является система *ATHERAFLEX MB Plasma* [Seghatchian, Struff, Reichenberg, 2011], которая используется для обеззараживания донорской плазмы от вирусов. Плазма, обработанная раствором МС, может клинически использоваться в течение 18 лет. *ATHERAFLEX MB Plasma* представляет собой надежный метод обеззараживания, при котором в донорской плазме создается концентрация 1 мкМ МС, а затем плазма подвергается воздействию света 590 нм в течение 20 минут. После этого МС и его метаболиты удаляются с помощью адсорбционной фильтрации. Это позволяет инактивировать большинство опасных патогенов, при этом сохраняя функциональную активность белков плазмы и коагуляционные факторы. Эта система показала свою эффективность в отношении как не оболочечных вирусов, так и оболочечных, таких как ВИЧ, вируса простого герпеса, цитомегаловируса, вирусов гриппа и коронавируса SARS-CoV.

Показано, что МС способен связываться с вирусными нуклеиновыми кислотами. После воздействия света МС переходит в возбужденное синглетное, а затем в триплетное состояние. Из триплетного состояния он переходит в основное, при этом генерируя активные формы кислорода, которые окисляют гуанозин и разрушают вирусную генетическую информацию, тем самым предотвращая репликацию вируса [Wagner, 2002; Wainwright, Mohr, Walker, 2007]. Эксперименты на ВИЧ показали, что МС также действует и на другие сайты, такие как оболочка вируса, белки оболочки и ферменты обратной транскриптазы, вероятно разрушая их по тому же механизму [Bachmann et al., 1995]. Подобная фотодинамическая терапия предлагалась в качестве лечения COVID-19 и инактивации коронавируса в дыхательных путях [Almeida, Faustino, Neves, 2020; Dias, Blanco, Bagnato, 2020]. Дыхательные пути являются первым местом инфицирования, после репликации в клетках лёгких вирус распространяется по всему организму. К тому же степень поражения лёгких определяет тяжесть течения болезни и вероятность смертельного исхода.

Наряду с фотодинамической инактивацией коронавирусов для МС показана способность ингибировать развитие вируса и в темноте в очень низких молярных концентрациях. Он способен ингибировать репликацию различных вирусов, включая SARS-CoV-2 [Gendrot et al., 2020; Svyatchenko et al., 2021], вирус Зика, вирус денге [Li et al., 2020] и вирус гриппа H1N1 [Cagno et al., 2021]. Он также был способен ингибировать проникновение псевдовируса, несущего шип SARS-CoV-2, в клетки, экспрессирующие ангиотензинпревращающий фермент типа 2 (ACE2), и был активен в ингибировании белок-белкового взаимодействия между RBD доменом S белка и ACE2 рецептора клетки хозяина [Bojadzic, Alcazar, Buchwald, 2021]. Концентрация МС, при которой подавляется активность 50% вирусных частиц, (IC50) против  $10^2$  TCID50 (Tissue culture infectious dose 50%) коронавируса SARS-CoV-2 составила 0,7 мкМ [Svyatchenko et al., 2021]. Инкубация зараженных бычьим коронавирусом (BCoV) клеток с раствором МС в концентрации 1–5 мкМ приводила к снижению титров коронавируса на 3 порядка [Zhukhovitsky et al., 2022a]. Модельные эксперименты, проведенные на кафедре биофизики [Fedorov et al., 2021], показали, что молекулы МС способны связываться с S белками преимущественно в месте сочленения «головы» шипа и его «ножки». Кроме того, МС способен проникать в карман, образованный RBD доменом, когда тот переходит в «открытое» состояние. Это отчасти может объяснять и темновую активность МС против коронавируса SARS-CoV-2. Важно отметить, что такая противовирусная активность МС в темноте позволяет применять это вещество для лечения вирусных заболеваний без применения фотодинамической терапии.

Для понимания того, как именно МС действует на целые вирионы коронавирусов, на примере BCoV, в работе [Zhukhovitsky et al., 2022b] была рассмотрена инактивация вирусных частиц молекулами фотосенсибилизаторов МС и октакис(холинил)фталоцианина цинка ( $Zn\text{-PcChol}^{+8}$ ) и изменение морфологии вирионов как при фотодинамическом действии, так и в темноте. Из этих двух соединений только МС показал «темновую» активность при низких концентрациях порядка 1 мкМ (Рисунок 1.5.1, нижняя панель). На верхней панели на Рисунке 1.5.1. приведены электронные микрофотографии вирионов BCoV до и

после воздействия на них раствора МС. Для ясности приведены только те микрофотографии, на которых изменения морфологии запечатлены наиболее наглядно. Эти результаты показали, что использование 1 мкМ раствора МС с последующим облучением приводит к разрушению оболочки вируса BCoV (Рисунок 1.5.1, верхняя панель – 2а), хотя характер этих изменений (прямой вирулицидный эффект или фотодинамический эффект) не до конца ясен, так как похожие изменения наблюдаются и при воздействии МС без дальнейшего облучения (Рисунок 1.5.1, верхняя панель – 4а). При фотодинамической инактивации вирионов наблюдается полная потеря S белков. Этот эффект, как предполагается, обусловлен связыванием МС в месте сочленения «головы» шипа и его «ножки» с последующим окислением аминокислот в этой области. Однако, ввиду ограничений молекулярного моделирования остается неясным, приводит ли действие МС к полной потере шипов или только его «головы».

Моделирование взаимодействий МС с шипами трех коронавирусов в работе [Fedorov et al., 2021] позволило выявить сайт связывания этого красителя на стыке ножки и головы S белка, прилегающего к домену гептадного повтора 2 (HR2). Этот сайт был общим для S белков SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. В S белке SARS-CoV-2 также было обнаружено, что МС проникает в карман, образованный RBD доменом в «открытом» состоянии, N-концевым доменом (NTD) и доменом гептадного повтора 1 (HR1). В этой части работы было подтверждено, что более половины контактов МС с оболочкой SARS-CoV-2 происходят с S белками. На основании результатов моделирования взаимодействия молекул МС с S белками в работе [Fedorov et al., 2021] можно сделать вывод, что связывание МС с RBD доменом может влиять на взаимодействие S белка с рецепторами ACE2 на клетке хозяине, тем самым снижая инфекционность вируса. Это соответствует выводам статьи [Bojadzic, Alcazar, Buchwald, 2021].

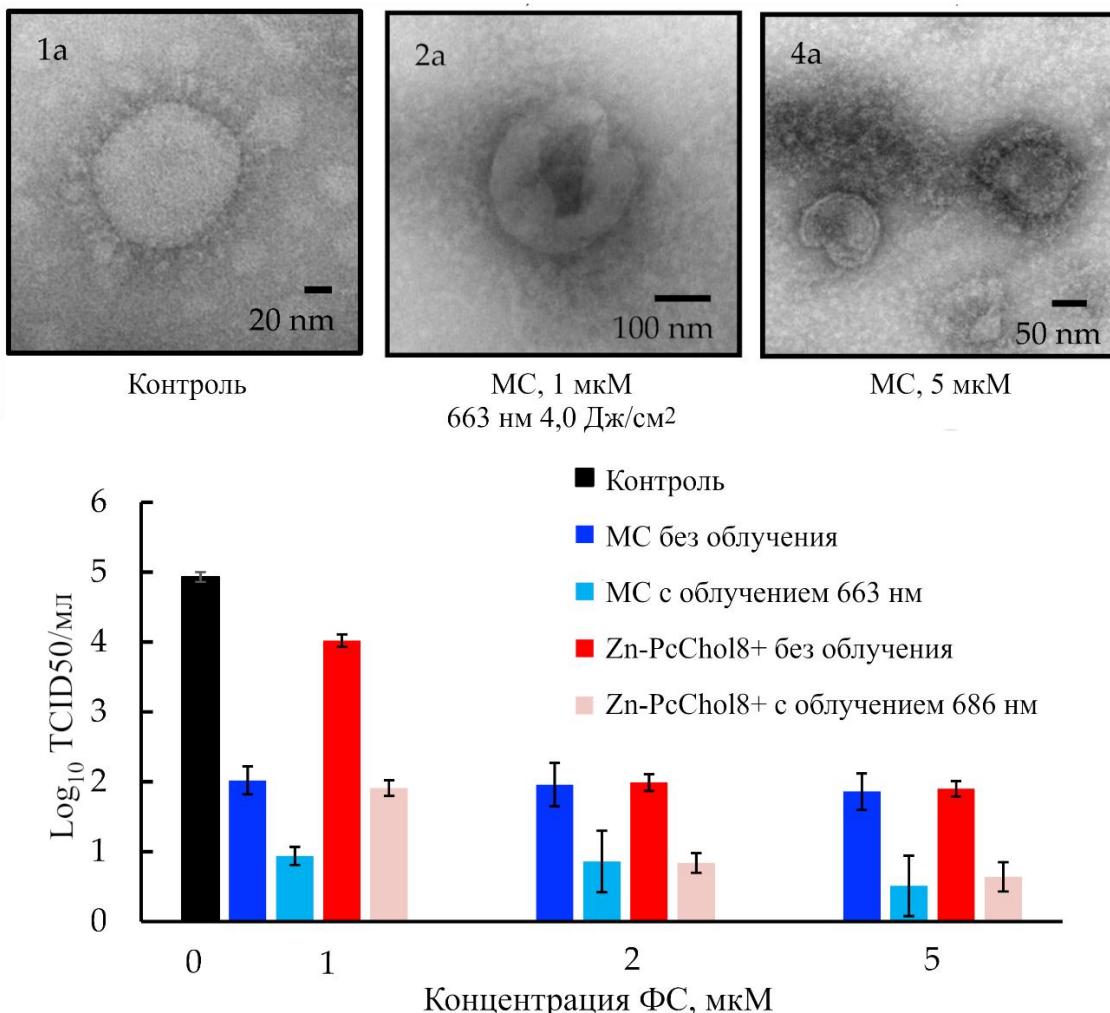


Рисунок 1.5.1. Влияние раствора МС на вирионы коронавируса BCoV [Zhukhovitsky et al., 2022a]. На верхней панели приведены электронные микрофотографии BCoV, негативно окрашенные 2% раствором уранилацетата. Микрофотография 1а – вирионы без воздействия МС, 2а – вирионы после 10-минутной инкубации с раствором МС в концентрации 1 мкМ и облучением 4,0 Дж/см<sup>2</sup>, 4а – вирионы после 10-минутной инкубации с раствором МС в концентрации 5 мкМ. На нижней панели показана гистограмма титров BCoV без фотосенсибилизаторов (ФС) и облучения (контроль), инкубированные в течение 10 мин с различными концентрациями ФС без дальнейшего облучения или облученные светодиодом 663 нм для МС или 686 нм для Zn-PcChol8+ в дозе 4,0 Дж/см<sup>2</sup>.

Таким образом, несмотря на наличие большого количества исследований, направленных на изучение противовирусного потенциала МС против коронавирусных инфекций и прояснение механизмов его действия, в этой области всё ещё остаются темные пятна. По-видимому, при фотодинамическом действии МС на вирусные частицы, он опосредует повреждение белков оболочки, в частности S белков, а также окисление липидов и разрушение мембранны вириона. МС также способен проходить сквозь мембрану и связываться с вирусной РНК, при окислении которой ингибируются внутриклеточные процессы трансляции и транскрипции. Механизм действия МС при темновой инактивации вирусов не так очевиден. По данным вычислительных экспериментов молекулы МС могут связываться с S белком в RBD домене и ингибировать взаимодействие S белка с ACE2 рецепторов. Однако, как его действие приводит к деформации вирионов и разрушению мембранны всё ещё не ясно.

## Глава 2. Материалы и методы

### **2.1. Пространственные структуры объектов, используемых в работе**

В данной работе в качестве объектов исследования используются пространственные структуры, входящие в состав внешней оболочки вириона коронавируса SARS-CoV-2, а также модели молекулы метиленового синего и фталоцианина цинка.

#### **2.1.1. Модель молекулы метиленового синего и фталоцианина цинка ( $Zn\text{-PcChol}^{8+}$ )**

Для работы использовалась как крупнозернистая, так и полноатомная модели молекулы МС. Пространственная полноатомная структура молекулы МС с общим зарядом +1 была получена с использованием веб-сервиса ATB (Automated Topology Builder) [Malde et al., 2011]. Создание крупнозернистой модели МС опиралось на две работы. В первой работе предлагалось разбиение на зёरна [Ileri Ercan et al., 2018], которое представлено на рисунке 2.1.1.1.

Распределение заряда в катионной форме молекулы МС составляет отдельную проблему. В крупнозернистых силовых полях для зёрен используются целочисленные заряды, тогда как в полноатомных силовых полях используются парциальные заряды, которые лучше отражают электростатические свойства молекул и аминокислотных остатков. Однако, работа, посвященная квантово-механическим расчетам молекулы МС, показала, что в катионной форме единичный заряд распределяется на боковых диметиламиновых группах молекулы [Luger et al., 2018]. На основе этих двух статей мы создали крупнозернистую модель молекулы МС в силовом поле MARTINI3 [Souza et al., 2021], которая состоит из 8 зёрен, единичный заряд молекулы МС распределен по зёрнам 7 и 8 (Рис. 2.1.1.1.) по 0,5 Кл на каждом.

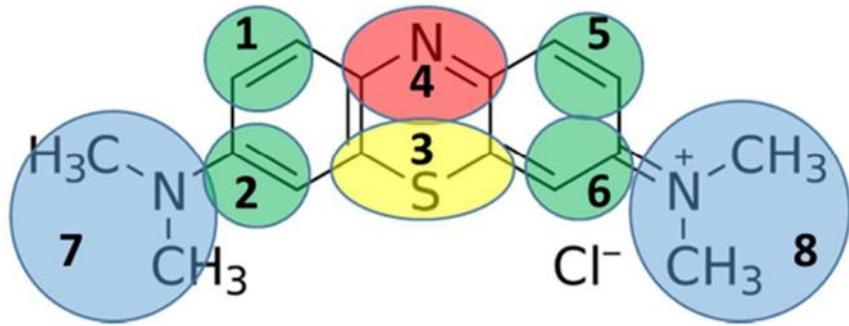


Рисунок 2.1.1.1. Схема картирования молекулы метиленового синего на зёрна в силовом поле Martini [Ileri Ercan et al., 2018].

После получения параметров топологии для крупнозернистой модели МС эти параметры были уточнены с помощью программы *Swary-CG* [Empereur-Mot et al., 2020]. Для этого проводилась молекулярная динамика полноатомной структуры молекулы МС в растворе в течение 400 нс с шагом по времени 2 фс с силовым полем GROMOS96 54a7 [Gunsteren van, 1996]. Термостатирование проводилось при температуре 303,15 К с использованием термостата V-rescale. Для поддержания давления в системе использовался баростат Парринелло-Рамана при давлении 1 бар. Затем программа *Swary-CG* проводит серию крупнозернистой молекулярной динамики и меняет константы жесткости и значения равновесных связей и углов до тех пор, пока они не будут соответствовать распределению соответствующих значений в полноатомной симуляции молекулярной динамики.

Для моделирования взаимодействия молекулы МС с пентамером Е белка SARS-CoV-2 полноатомная структура молекулы МС также была получена с использованием веб-сервиса ATB [Malde et al., 2011]. Топология молекулы была создана с использованием программного пакета Antechamber [Wang et al., 2001], реализованного в веб-сервисе CHARMM-GUI *Membrane Builder* [Feng et al., 2023]. Для расчета зарядов в Antechamber использовался метод AM1-BCC [Jakalian, Jack, Bayly, 2002] и силовое поле gaff2 [Wang et al., 2004]. После расчета параметров топология молекулы генерируется в полноатомном силовом поле CHARMM36m.

Модель молекулы Zn-PcChol<sup>8+</sup> была взята из работы [Orehkov et al., 2018]. Структура Zn-PcChol<sup>8+</sup> была использована в предварительных исследованиях, в которых изучалась возможность изменения параметров броуновской динамики на примерах S белков коронавирусов.

### **2.1.2. Модель оболочки вириона коронавируса SARS-CoV-2**

Крупнозернистая модель оболочки коронавируса SARS-CoV-2 была получена в лаборатории университета Гронингена [Pezeshkian et al., 2023]. Модель построена с использованием силового поля Martini 3 [Souza et al., 2021] и включает в себя все компоненты внешней оболочки вириона: S белки, M белки и E белки. M белок как основной белок оболочки представлен в 1003 копиях, S белок – в 25 копиях, E белок – в 2 копиях. Состав мембраны представлен нейтральными и отрицательно заряженными липидами, описанными в Таблице 2.1.2.1. Таким образом, содержание липидов и белков в крупнозернистой модели оболочки SARS-CoV-2 обычно отражает их известные физиологические уровни.

Таблица 2.1.2.1. Липидный состав мембраны крупнозернистой модели внешней оболочки коронавируса SARS-CoV-2.

Компонент мембранны	Тип липида CHARMM-GUI	Общий заряд одного липida	Содержание в мембране, %
POPC (пальмитоил-олеоил фосфатидилхолин)	POPC	0	59
POPE (пальмитоил-олеоил фосфатидилэтаноламин)	POPE	0	20
POPI (пальмитоил-олеоил фосфатидилинозитол)	POPI	-1	10

CHOL (холестерин)	Cholesterol	0	4,5
CDL2 (кардиолипин)	TOCL2	-2	4,5
POPS (пальмитоил-олеоил фосфатидилсерин)	POPS	-1	2

Таким образом, эта крупнозернистая модель является наиболее полной и точной моделью оболочки вириона. Общее количество частиц (зёрен) составило 2 миллиона, а требуемый объем оперативной памяти для расчетов электростатических взаимодействий – 108 Гб.

### 2.1.3. Модели S белков и пентамера E белка коронавирусов

В этой работе использовались трехмерные структуры S белков трех коронавирусов человека (MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2). Пространственная структура S белка SARS-CoV-2 была взята из работы [Woo et al., 2020]. Пространственные структуры S белков MERS-CoV, SARS-CoV были получены в лаборатории кафедры биофизики Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова как описано в работе [Fedorov et al., 2021]. Крупнозернистые модели структур S белков в силовом поле Martini 3, были получены с использованием программы Martinize2 (<http://cgmartini.nl>). Эти структуры были использованы в предварительных исследованиях, в которых изучалась возможность изменения параметров броуновской динамики и влияние изменения параметров на результаты моделирования.

Белок оболочки или E белок представляет собой пентамер, он является виропорином, встроенным в мембрану. На данный момент существует две экспериментально определенные структуры трансмембранныго домена виропорина SARS-CoV-2 [Mandala et al., 2020; Medeiros-Silva et al., 2023]. Однако, для пентамера E белка коронавируса SARS-CoV существует структура, полученная методом ядерного магнитного резонанса (PDB ID: 5X29) [Surya, Li, Torres, 2018].

Эта структура использовалась в качестве шаблона для построения модели пентамера E белка SARS-CoV-2 с применением метода моделирования по гомологии в лаборатории Дмитрия Коркина [Srinivasan et al., 2020]. Эта полученная пространственная модель была использована для исследования взаимодействия молекулы МС с каналом виропорина методами полноатомной молекулярной динамики.

## 2.2 Метод броуновской динамики

Метод броуновской динамики относится к разновидности методов стохастической динамики, в которой биологические молекулы представлены твердыми телами, совершающими поступательные и вращательные движения в растворителе. Метод основан на решении уравнения Ланжевена, которое для поступательного движения имеет вид:

$$m\ddot{r} = -\xi_{\text{тр}}\dot{r} + F(r) + f(t), \quad (2.2.1)$$

где  $m$  и  $r$  – масса и положение частицы, соответственно,  $\xi_{\text{тр}}$  – коэффициент вязкого трения частицы в среде,  $F(r)$  – внешняя сила, действующая на частицу,  $f(t)$  – случайная сила. Случайная сила описывает тепловое движение молекул раствора и их столкновение с частицей. Это сила представляет собой дельта-коррелированную случайную величину с нулевым математическим ожиданием.

Для небольших биологических молекул в нормальных условиях  $\frac{m}{\xi_{\text{тр}}} \approx 10^{-12}$  с.

При использовании достаточно большого шага по времени это позволяет пренебречь инерциальным членом  $m\ddot{r}$  в уравнении 2.2.1 и решать уравнение Ланжевена без него:

$$\xi_{\text{тр}}\dot{r} = F(r) + f(t). \quad (2.2.2)$$

Аналогичным образом можно получить уравнение Ланжевена для вращательного движения:

$$\xi_{\text{вр}}\dot{\alpha} = M(\alpha) + m(t), \quad (2.2.3)$$

где  $\alpha$  – угол поворота частицы вокруг рассматриваемой оси,  $\xi_{\text{вр}}$  – коэффициент

вязкого трения для вращательного движения вокруг рассматриваемой оси,  $M(\alpha)$  – внешняя сила,  $m(t)$  – случайная сила.

Гидродинамические взаимодействия броуновских частиц с растворителем учитываются введением коэффициента вязкого трения в уравнения движения. Для оценки этих коэффициентов молекула представляется как эллипсоид с равномерной плотностью и массой равной массе молекулы. Размеры такого эллипсоида используются для расчета коэффициентов вязкого трения с помощью уравнений Перрена [Perrin, 1936]. Гидродинамические взаимодействия между броуновскими частицами не учитываются.

Тогда как взаимодействие броуновских частиц с растворителем описывается посредством случайных сил и коэффициента трения, взаимодействия броуновских частиц между собой описывается в явном виде.

Для учета электростатических взаимодействий используется приближенный метод, предложенный в работе [Ermak, McCammon, 1978]. Для этого используется уравнение Пуассона-Больцмана [Fogolari, Brigo, Molinari, 2002], в котором учитываются диэлектрические свойства броуновских частиц и экранирование зарядов посредством перераспределения ионов вокруг молекулы:

$$\varepsilon_0 \nabla[\varepsilon(r) \nabla \varphi(r)] = -\rho - \sum_i C_i^\infty z_i q_p e^{\left[ -\frac{z_i q_p \varphi(r)}{kT} \right]}, \quad (2.2.4)$$

где  $\varepsilon_0$  – электрическая постоянная,  $\varepsilon(r)$  – диэлектрическая проницаемость среды,  $\varphi(r)$  – электростатический потенциал,  $\rho$  – объемная плотность фиксированных электрических зарядов (в молекуле белка),  $C_i^\infty$  – концентрация ионов в отсутствии электрического поля,  $z_i$  – заряд иона,  $q_p$  – заряд протона,  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – температура. Уравнение 2.2.4 линеаризуется:

$$\varepsilon_0 \nabla[\varepsilon(r) \nabla \varphi(r)] = -\rho + \sum_i \frac{C_i^\infty z_i^2 q_p^2 \varphi(r)}{kT} - \sum_i C_i^\infty z_i q_p, \quad (2.2.5)$$

где  $\sum_i C_i^\infty z_i q_p = 0$  из соображений электронейтральности раствора.

Для расчета электростатического потенциала реакционный объем системы разбивается на ячейки, в которых итерационно рассчитывается потенциал, с учетом

потенциала в соседних ячейках. Далее вычисляется электростатическая сила и ее момент, действующие на определенный заряд в белке, путем расчета градиента потенциала и величины заряда. Суммируя силу и ее момент для отдельных зарядов, рассчитывается электростатическая сила и ее момент для всей молекулы.

Процесс моделирования взаимодействия двух броуновских частиц можно разделить на два этапа. На первом этапе происходит свободная диффузия частиц на дальних расстояниях, а затем происходит их сближение за счет дальних электростатических взаимодействий с образованием диффузионно-столкновительного комплекса двух молекул. Критерием образования такого комплекса является заранее заданное пороговое значение их электростатического взаимодействия. В результате расчетов броуновской динамики можно получить ансамбль диффузионно-столкновительных комплексов, который позволяет выявить характерные места контакта молекул и их взаимную ориентации друг относительно друга при таких взаимодействиях [Khruschev et al., 2013].

В данной работе для изучения электростатического взаимодействия молекул МС с оболочкой коронавируса проводилась симуляция крупнозернистой броуновской динамики с использованием разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова программного обеспечения “ProKSim” (Protein Kinetics Simulator) [Khruschev et al., 2013]. Оболочка вириона SARS-CoV-2 была представлена в виде области с низкой диэлектрической проницаемостью ( $\epsilon = 2$ ) с фиксированными частичными зарядами. Водный растворитель (диэлектрическая проницаемость  $\epsilon = 80$ ), содержащий ионы, представлялся в неявном виде с ионной силой 100 мМ. Радиус отсечки электростатических взаимодействий составил 3,5 нм.

В моделировании вирион SARS-CoV-2 был помещен в центр виртуального реакционного объема с периодическими граничными условиями размером  $200 \times 200 \times 200$  нм. В каждом прогоне моделирования молекула МС случайным образом располагалась в объеме, не занятом вирионом. Моделирование продолжалось до тех пор, пока энергия электростатического притяжения между молекулой МС и вирионом не достигла заданного порога в 2 кТ. Окончательное

положение МС относительно вириона было записано для последующего анализа, а затем моделирование было возобновлено с еще одним случайным размещением МС. В общей сложности было получено 33 000 конфигураций комплексов МС и оболочки коронавируса SARS-CoV-2.

Для оценки взаимодействия между молекулой МС и конкретными компонентами оболочки мы считали, что контакт имел место, если какая-либо К3-частица МС приближалась к любой К3-частице оболочки на расстоянии 0,6 нм. Это расстояние было выбрано исходя из того, что оно должно быть минимальным, но для подавляющего большинства обнаруженных электростатических комплексов молекула МС будет контактировать хотя бы с одним из компонентов оболочки коронавируса. При пороговом расстоянии, равном 0,6 нм, и энергии электростатического притяжения более 2 кТ это требование выполнялось в 99,96% случаев. Чтобы охарактеризовать взаимодействие между компонентами оболочки и молекулой МС, мы разработали пользовательский скрипт на Python с использованием библиотеки MDAnalysis [Gowers et al., 2016]. Этот скрипт идентифицировал и подсчитывал конкретные компоненты вирусной оболочки, которые вступали в контакт с молекулой МС. Молекулярные структуры визуализировали с помощью программного обеспечения PyMOL версии 2.5 [DeLano].

Прежде чем проводить моделирование броуновской динамики взаимодействия молекул МС и с внешней оболочкой коронавируса, было проведено предварительное моделирование, в котором изучалась возможность увеличения шага сетки расчета поля электростатического потенциала до 2 Å. В этой части работы шаг сетки выступал в качестве параметра и был принят равным 1 Å или 2 Å. Молекулы S белков и Zn-PcChol<sup>8+</sup> были описаны как жесткие частицы, размещенные в объеме виртуальной реакции 30x30x30 нм с зеркальными граничными условиями, так что домены ТМ (трансмембранный) и СР (цитоплазматический) домены были вне объема реакции для имитации вирусной мембраны. Для каждого из трех S белков было получено 20000 комплексов белка с Zn-PcChol<sup>8+</sup>. В этом процессе молекула Zn-PcChol<sup>8+</sup> совершала свободную

диффузию до тех пор, пока энергия электростатического притяжения в таком комплексе будет не менее 8 кТ. Структура комплекса была затем сохранена для дальнейшего анализа.

### 2.3 Метод молекулярной динамики

Метод молекулярной динамики широко применяется для изучения биомолекулярных структур. В данном подходе используется подход классической механики, одним из основных понятий которой является понятие материальной точки. Атомы в молекулярной динамике представляются как материальные точки с массой и зарядом, соединенными пружинами, а их движение рассчитывается с помощью интегрирования уравнений Ньютона. Для системы из  $N$  атомов система уравнений принимает вид:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i, (i = 1, \dots, N), \quad (2.3.1)$$

где  $m_i$  – масса  $i$ -того атома,  $\mathbf{r}_i$  – его координаты,  $\mathbf{F}_i$  – действующие на него силы. Действующие силы определяются отрицательной производной потенциальной энергии системы:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_i^2}, \quad (2.3.2)$$

Среди алгоритмов интегрирования уравнений движения самым распространенным является алгоритм Верлеть [Verlet, 1967], и его модификация – алгоритм "прыжок лягушки" (leapfrog) [Hockney, Eastwood, 1981]. Leapfrog основан на временном сдвиге, поскольку положение и скорость отличаются на полуцелый шаг по времени. Положение и скорость связаны через вычисление скоростей на полуцелых временных шагах. Алгоритм leapfrog использует координаты  $\mathbf{r}$  в момент времени  $t$  и скорости  $\mathbf{v}$  в момент времени  $t - \frac{1}{2}\Delta t$ . Он обновляет координаты и скорости, используя внешнюю силу  $\mathbf{F}(t)$ , которая определяется позициями атомов в момент времени  $t$ , следующими выражениями:

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m} \mathbf{F}(t) \quad (2.3.3)$$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right). \quad (2.3.4)$$

Положение атома в момент времени  $\mathbf{r}(t)$  рассчитывается по уравнению 2.3.7, а скорость в момент времени  $\mathbf{v}(t)$  рассчитывается по уравнению:

$$\mathbf{v}(t) = \frac{1}{2} \left[ \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) + \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) \right]. \quad (2.3.5)$$

Интегратор leapfrog обладает точностью второго порядка и обеспечивает баланс между точностью и скоростью расчета.

Совокупность набора уравнений, используемых для расчета потенциальных энергий и их производных, а также равновесных длин связей, валентных углов и силовых констант, используемых в этом наборе уравнений представляют собой силовое поле. Потенциальная энергия в уравнении 2.3.2 складывается из энергии ковалентных и нековалентных взаимодействий:

$$U = U_{\text{ков.}} + U_{\text{неков.}} \quad (2.3.6)$$

Ковалентные взаимодействия включают в себя гармонические колебания ковалентных связей, углов между тремя атомами, торсионных углов между четырьмя атомами и неправильных торсионных углов. Эти углы используются для сохранения планарности некоторых химических групп, например, ароматических колец.

$$\begin{aligned} U_{\text{ков.}} = & \sum_{\text{связь}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{углы}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \\ & + \sum_{\text{торс.}} K_\varphi(1 - \cos(n\varphi - \varphi_0)) + \sum_{\text{непр.торс.}} K_\Psi(\Psi - \Psi_0)^2 \end{aligned} \quad (2.3.7)$$

где  $K_b$  – эффективная жесткость валентной связи,  $b$  – длина связи,  $b_0$  – равновесная длина связи,  $K_\theta$  – эффективная упругость валентного угла,  $\theta$  – значение валентного угла,  $\theta_0$  – равновесное значение угла,  $K_\varphi$  – константа для торсионного угла,  $\varphi$  – торсионный угол,  $\varphi_0$  – равновесное значение торсионного угла,  $K_\Psi$  – константа для неправильного торсионного угла,  $\Psi$  – значение неправильного торсионного угла,

$\psi_0$  – равновесное значение неправильного торсионного угла.

Нековалентные взаимодействия включают в себя две компоненты и описываются суммой электростатического потенциала и потенциала Леннарда-Джонса [Jones, 1924],

$$U_{\text{неков.}} = \sum_{i,j} \left( \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right), \quad (2.3.8)$$

где  $q_{i,j}$  – заряды атомов,  $\epsilon$  – диэлектрическая постоянная,  $r_{ij}$  – расстояние между взаимодействующими атомами,  $R_{ij}^{\min}$  – расстояние, на котором потенциал равен нулю.  $\epsilon_{ij}$  – глубина потенциальной ямы. Компонент потенциала Леннарда-Джонса  $r^{-6}$  соответствует притяжению между наведенными диполями,  $r^{-12}$  – отталкиванию на близких расстояниях.

Для моделирования биологических систем существует довольно много силовых полей, среди них GROMOS [Gunsteren van, 1996], CHARMM [Vanommeslaeghe et al., 2010], AMBER [Hornak et al., 2006; Lindorff-Larsen et al., 2010]. Кроме того, зачастую возникает необходимость в моделировании довольно крупных систем, расчет динамики которых занимает очень много вычислительных и временных ресурсов. В таких случаях нередко прибегают к крупнозернистой молекулярной динамике, в которой за материальные точки принимают не атомы, а группы атомов (обычно по 2–4 атома на зерно). Такой подход позволяет существенно сократить количество частиц в системе и увеличить временной шаг интегрирования. Для крупнозернистого моделирования чаще всего используют силовое поле Martini [Souza et al., 2021].

Начальные положения атомов биологической молекулы могут быть получены непосредственно из базы данных PDB (Protein Data Bank), в которой хранятся структуры, полученные экспериментальными методами, такими как рентгеноструктурный анализ или ядерный магнитный резонанс. Помимо этого, структуры белков можно получить посредством методов моделирования, например моделирование по гомологии или предсказание пространственных структур белков с помощью моделей нейронных сетей. Положения атомов в таких структурах

далеко не всегда соответствуют минимуму энергии, поэтому перед моделированием молекулярной динамики следует проводить минимизацию энергии. Чаще всего мы можем найти только локальный минимум энергии, для этого используется метод наискорейшего спуска, алгоритм этого метода является наиболее надежный и простым в реализации. Координаты  $N$  атомов системы задаются вектором  $\mathbf{r}$ , а также их начальное смещение  $\mathbf{h}_0$ . Затем рассчитывается сила  $\mathbf{F}$  и потенциальная энергия системы, а новые положения атомов рассчитываются по формуле:

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \frac{\mathbf{F}_n}{\max(|\mathbf{F}_n|)} h_n, \quad (2.3.9)$$

где  $h_n$  – максимальное смещение, а  $\mathbf{F}_n$  – сила, или отрицательный градиент потенциальной энергии, обозначение  $\max(|\mathbf{F}_n|)$  – это наибольшая скалярная сила для любого атома. Сила и энергия затем рассчитываются снова. Такие итерации происходят до тех пор, пока не выполнится одно из условий, заданное пользователем. Это может быть либо число итераций, либо заданный максимум силы, после которого минимизация энергии прекращается.

Моделирование молекулярно-динамических систем проводят в определенных условиях. Сама система может представлять собой микроканонический ансамбль, в котором постоянны количество частиц, энергия и объем (NVE), такой ансамбль часто используется для изучения изолированных систем, в которых возможен дрейф энергии. Для изучения фазовых переходов, когда может происходить изменение объема системы, используют изобарно-изотермический ансамбль (NPT). Иногда систему представляют как канонический ансамбль, где постоянными являются число частиц, объем и температура (NVT). Чаще всего на практике используют представления NPT или NVT. Такое представление наиболее соответствует экспериментальным условиям, в которых контролируется диапазон температуры и на систему действует определенное давление. К тому же, такие ансамбли позволяют решать наиболее распространенные задачи моделирования, такие как структурные свойства молекул и белков, их термодинамические характеристики и кинетические процессы, происходящие в системе.

Для контроля температуры используют алгоритмы термостатирования, например, термостат Беренсена [Berendsen et al., 1984], Нозе-Хувера [Hoover, 1985; Nosé, 2002] или V-rescale (velocity-rescaling) [Bussi, Donadio, Parrinello, 2007]. Эти алгоритмы сохраняют распределение скоростей частиц близкое к распределению Максвелла посредством добавления теплового шума. Для контроля давления используют баростаты, среди часто используемых – баростат Беренсена [Berendsen et al., 1984] и Парринелло-Рамана [Parrinello, Rahman, 1981]. Баростаты поддерживают давление в системе путем изменения объема, другими словами, путем изменения размеров ячейки, в которой находится система. Алгоритмы термостата и баростата Беренсена относительно быстрые и их используют для уравновешивания системы. Однако, они приводят к артефактам из-за перераспределения энергии молекулы с внутренних степеней свободы на поступательные движение всей системы на временах моделирования более 10 нс и при достаточно больших размерах системы [Шайтан, 2006].

Таблица 2.3.1. Параметры уравновешивания системы.

Этап	Шаг по времени, фс	Время уравновешивания	Позиционные ограничения, кДж/моль·нм <sup>2</sup>				
			Основная цепь белка	Боковые цепи белка	Липиды, атом фосфора головной группы	Липиды, дигедральные углы	МС
1	1	125 пс	4000	2000	1000	1000	10000
2	1	125 пс	2000	1000	400	400	10000
3	1	125 пс	1000	500	400	200	10000
4	2	500 пс	500	200	200	200	10000
5	2	500 пс	200	50	40	100	10000
6	2	500 пс	50	0	0	0	10000

В данной работе молекулярно-динамические расчеты проводились в программе GROMACS-2022.5 [Pál et al., 2020] по следующему протоколу. Для минимизации

систем использовался метод наискорейшего спуска. Уравновешивание мембранных систем происходило в шесть этапов с постепенным снятием позиционных ограничений в соответствии с протоколом CHARMM-GUI [Jo, Kim, Im, 2007]. На молекулу МС накладывался потенциал 10000 кДж/моль·нм<sup>2</sup>, так как в данном случае было важно сохранить положение молекулы в определенном положении от центра пентамера Е белка. Детали этапов уравновешивания представлены в Таблице 2.3.1.

Затем система моделировалась с использованием интегратора leapfrog и шагом по времени 2 фс. Температура поддерживалась с помощью термостата V-rescale и составляла 303.15 К, давление поддерживалось на уровне 1 бар с помощью семизотропного баростата Парринелло-Рамана.

## 2.4 Метод отбора зонтичных проб

Проблема расчета свободной энергии является одной из главных задач молекулярного моделирования, в частности расчет свободной энергии в молекулярно-динамических расчетах. Если система является эргодической, то за разумное время моделирования она сможет побывать в каждой точке конформационного пространства, и расчет свободной энергии переходов из одного состояния в другое не представляет затруднений. Энергию таких состояний можно рассчитать методами статистической физики, когда вероятность нахождения системы в том или ином положении пропорционально энергии этого состояния. Однако, на практике чаще всего рассматривают конформационные переходы с довольно большими энергетическими барьерами, равновесный переход через которые невозможен в рамках равновесного молекулярно-динамического расчета. Для решения этой проблемы существуют несколько методов неравновесной молекулярной динамики, одним из которых является метод отбора зонтичных проб, впервые предложенный в 1977 году [Torrie, Valleau, 1977]. Он позволяет замести всё конформационное пространство вдоль интересующей координаты реакции  $\xi$ , которая по своей сути является произвольно заданной функцией

атомных координат. Путь реакции перехода системы из состояния А в состояние В может быть описан одной или несколькими координатами реакции. К примеру, образование и диссоциация белкового комплекса может быть описана расстоянием между их центрами масс, это расстояние и будет выступать в качестве координаты реакции.

Чтобы замести всё конформационное пространство вдоль пути реакции, этот путь разбивается на окна, в каждом из которых рассчитывается молекулярная динамика системы с дополнительным «зонтичным» потенциалом, который накладывается на координату реакции:

$$V_j(\xi) = \frac{k}{2} (\xi - \xi_j)^2, \quad (2.4.1)$$

где  $V_j$  – дополнительный потенциал в  $j$  окне,  $\xi_j$  – значение на координате реакции с нулевым значением дополнительного потенциала,  $k$  – константа жесткости дополнительного потенциала. Далее молекулярная динамика системы рассчитывается в каждом отдельном окне. Дополнительный потенциал фиксирует систему в конкретном диапазоне на координатной прямой, который определяется константой жесткости  $k$ . Значение  $k$  должно быть подобрано так, чтобы смещеннное распределение положений системы внутри одного окна достаточно перекрывалось со смещенными распределениями в соседних окнах.

Благодаря известному дополнительному потенциалу  $V_j(\xi)$  становится возможным получить плотность вероятности нахождения системы во всех точках вдоль координаты реакции. Выборки, полученные в каждом окне, объединяются, что позволяет рассчитать потенциал средней силы (ПСС), который представляет собой изменение свободной энергии вдоль координаты реакции  $\xi$ . При добавлении к системе дополнительного потенциала свободная энергия несмещенной системы выражается формулой:

$$F(\xi) = -k_B T \ln p(\xi) - V(\xi) + C, \quad (2.4.2)$$

где  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – температура, а  $p(\xi)$  – плотность вероятности,  $V_j(\xi)$  – добавочный потенциал, С – произвольная константа, которая различается для каждого окна зонтичной выборки. Чтобы получить истинный несмещенный

профиль потенциала средней силы, необходимо вычесть из него добавочный потенциал и произвольную константу. Для этого используют статистический метод анализа взвешенных гистограмм (WHAM – Weighted Histogram Analysis Method) [Kumar et al., 1992].

В данной работе для отбора зонтичных проб использовали плагин PLUMED-2.9.0 [Tribello et al., 2014] для программы GROMACS-2022.5 [Páll et al., 2020]. В качестве координаты реакции была выбрана координатная ось OZ, нормальная к плоскости мембраны и направленная вдоль оси канала, с началом в центре масс пяти аминокислотных остатков (F26 в каждом из пяти мономеров Е белка) в начальный момент времени. Положение МС фиксировали вдоль оси OZ с помощью добавочного зонтичного потенциала, тогда как в плоскости мембраны молекула могла свободно перемещаться, взаимодействуя с аминокислотными остатками Е белка. Реакционный путь составил 8 нм и был разбит на 80 окон, в каждом из которых проводили молекулярно-динамический расчет в течение 200 нс с внешним зонтичным потенциалом 1000 кДж/моль/нм<sup>2</sup>, наложенным на координату реакции. При моделировании прохождения молекулы МС через мембрану в качестве координаты реакции была выбрана нормаль к плоскости мембраны, за центр – середина бислоя мембраны. Реакционный путь так же составил 8 нм и был разбит на 80 окон, в каждом из которых проводили молекулярно-динамический расчет в течение 200 нс с внешним зонтичным потенциалом 1000 кДж/моль/нм<sup>2</sup>, наложенным на координату реакции. Потенциал средней силы рассчитывали с использованием метода WHAM, как это реализовано в программе WHAM версии 2.0.10 [Grossfield, 2014].

## **2.5. Подбор параметров моделирования броуновской динамики**

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Vasyuchenko et al., 2022]. “ОЗУ (оперативное запоминающее устройство) обычного персонального компьютера позволяет проводить расчеты броуновской динамики взаимодействия противовирусных препаратов с отдельным белком коронавируса. Для оболочки

вириона SARS-CoV-2 объем занятой памяти составляет до 150 ГБ, что значительно превышает память типичного персонального компьютера. В стандартном протоколе для расчета броуновской динамики используется трехмерная сетка с шагом 1 Å для расчета поля электростатического потенциала. В этой части работы рассматривается возможность увеличения параметра шага сетки для расчета поля электростатического потенциала до 2 Å на примере расчета броуновской динамики для отдельных S белков SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 с молекулами Zn-Pcchol<sup>8+</sup>. Количество оперативной памяти, необходимое для хранения массивов электростатического потенциала и ее градиента примерно в 8 раз меньше при использовании сетки с шагом 2 Å по сравнению с сеткой с шагом 1 Å (Таблица 2.5.1). Из Таблицы 2.5.1 следует, что почти вся виртуальная память программы занята значениями электростатического потенциала и его градиентом.

Таблица 2.5.1. Количество памяти, занятое для расчета каждой системы S белка/Zn-Pcchol<sup>8+</sup> и параметры данных об электростатическом потенциале (ЭСП).

	Значение шага сетки для расчета ЭСП, Å	Количество ячеек на грань куба сетки	Размер массива значений ЭСП, МБ	Размер массива значений градиента ЭСП, МБ	Занятая виртуальная память, МБ
MERS-CoV	1	530	1136	3408	4586
SARS-CoV	1	542	1215	3645	4901
SARS-CoV-2	1	544	1228	3684	4955
MERS-CoV	2	266	144	431	595
SARS-CoV	2	272	154	460	635
SARS-CoV-2	2	272	154	460	635

Мы выполнили моделирование броуновской динамики, используя два значения шага сетки расчета электростатического потенциала, чтобы выявить различия во взаимодействии Zn-Pcchol<sup>8+</sup> с белками коронавируса. На рисунке 2.5.1 показаны

отдельные электростатические комплексы молекул Zn-Pcchol<sup>8+</sup> с S-белками MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 коронавирусов, рассчитанных с двумя

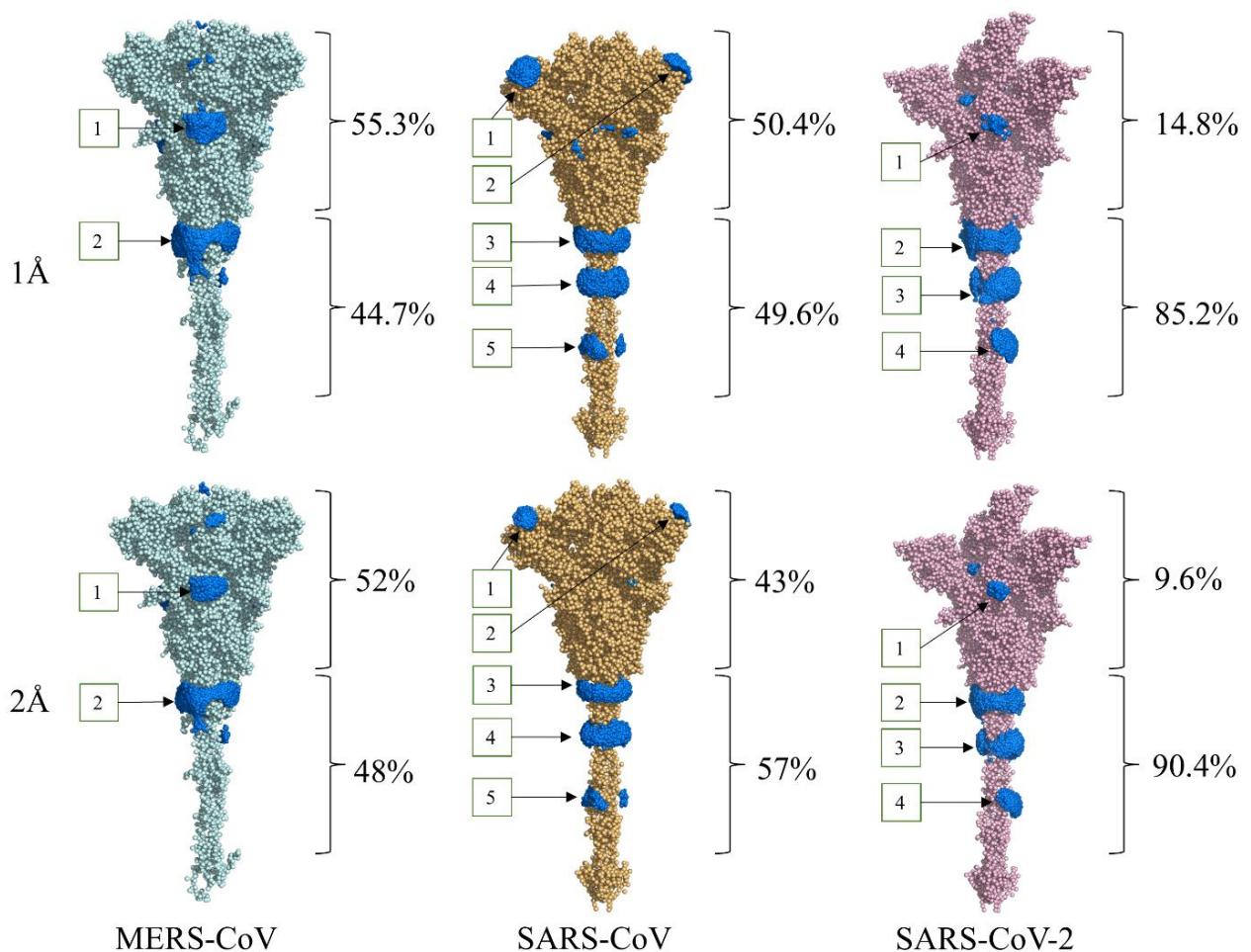


Рисунок 2.5.1. Комплексы молекул Zn-Pcchol<sup>8+</sup> с S белками исследуемых коронавирусов MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 при двух значениях шага сетки для расчета электростатического потенциала: 1 Å (верхний ряд) и 2 Å (нижний ряд). Позиции молекул Zn-Pcchol<sup>8+</sup>, полученные в отдельных моделях броуновской динамики, представлены атомами цинка (синие сферы). S белки представлены в виде крупнозернистых моделей, окрашенных соответственно, MERS-CoV – бледный голубой, SARS-CoV – светло-оранжевый, SARS-CoV-2 – светло-розовый. Изолированные сайты связывания Zn-Pcchol<sup>8+</sup> пронумерованы. Соотношение молекул Zn-Pcchol<sup>8+</sup>, связанных с «головой» и «ножкой» S белка коронавируса, приведено в процентах.

различными значениями расстояния шага сетки электростатического потенциала. Положение молекулы Zn-Pcchol<sup>8+</sup> в комплексе показано атомом цинка, визуализированным с помощью сферы синего цвета.

Видно, что молекулы Zn-Pcchol<sup>8+</sup> в основном связываются с белком в верхней части «ножки», в месте соединения «ножки» шипа с «головой», что согласуется с результатами предыдущих исследований [Fedorov et al., 2021]. Молекулы Zn-Pcchol<sup>8+</sup> распределены на поверхности S белков гетерогенно и образуют различные плотные области. Каждая область характеризуется средним попарным RMSD молекул друг относительно друга, и общим количеством молекул (Таблица 2.5.2). В целом, размер областей немного отличается (не более 0,3 Å). С увеличением шага сетки расчета электростатического потенциала, небольшие и мало заселенные области, расположенные на «голове» S белка коронавируса, исчезают, поэтому заселенность более плотных областей увеличивается.

Таблица 2.5.2. Процент структур, образующих индивидуальные области связывания, и средний попарный RMSD для каждой области в Å (значение, приведено в скобках).

	Значение шага сетки для расчета ЭСП, Å	Сайт связывания 1	Сайт связывания 2	Сайт связывания 3	Сайт связывания 4	Сайт связывания 5
MERS-CoV	1	15.7 (1.8)	44.7 (3.0)	-	-	-
	2	17.8 (1.8)	48.0 (2.9)	-	-	-
SARS-CoV	1	12.9 (1.5)	12.7 (1.4)	22.5 (2.7)	16.1 (2.4)	11.0 (2.3)
	2	14.9 (1.2)	12.7 (1.1)	22.9 (2.5)	28.8 (2.2)	5.4 (2.2)
SARS-CoV-2	1	9.7 (1.1)	47.4 (2.8)	25.1 (2.3)	12.8 (1.7)	-
	2	2.0 (1.1)	49.7 (2.7)	27.7 (2.2)	12.9 (1.4)	-

Результаты показывают, что увеличение шага сетки расчета электростатического потенциала приводит к небольшим изменениям в распределении молекул Zn-Pcchol<sup>8+</sup> на S белках коронавируса. Тем не менее, основные области связывания молекул могут быть найдены с использованием более грубого электростатического потенциального поля, которое требует меньше ресурсов памяти».

Эти расчеты позволили показать, что увеличение шага сетки расчета электростатического потенциала существенно не изменяет результаты моделирования броуновской динамики, что позволяет провести моделирование взаимодействия целой оболочки коронавируса SARS-CoV-2 с молекулами МС.

## Глава 3. Взаимодействие метиленового синего с оболочкой коронавируса SARS-CoV-2

### 3.1. Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с компонентами оболочки коронавируса

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Kovalenko et al., 2023]. «Электростатическое потенциальное поле оболочки вируса SARS-CoV-2 имеет гетерогенный характер с заметными областями как положительного, так и отрицательного потенциала (Рисунок 3.1.1). Эти негативные области электростатического потенциала в первую очередь генерируются отрицательно заряженными липидами и отрицательно заряженными аминокислотами в S и E белках, тогда как положительно заряженные области генерируются M белками.

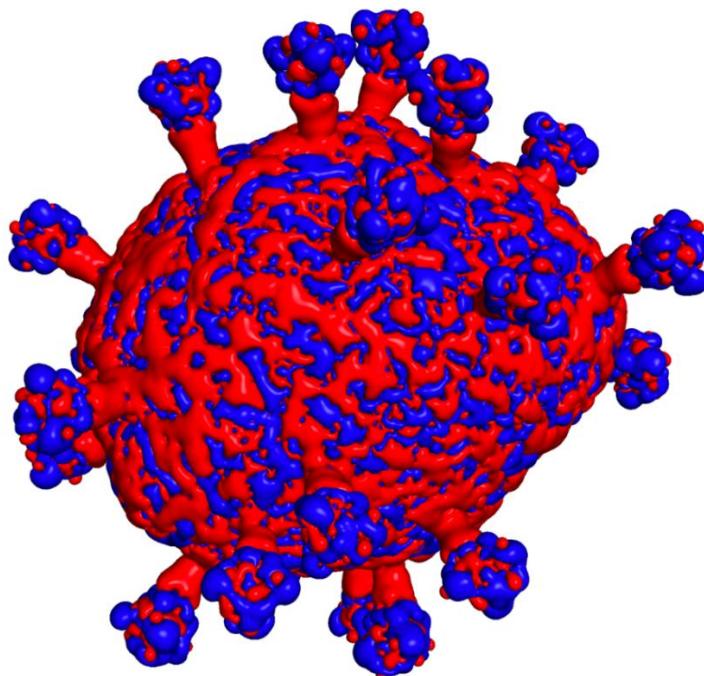


Рисунок 3.1.1. Поверхности электростатического потенциала оболочки SARS-CoV-2, окрашенная в красный ( $-1$  мВ) и синий ( $+1$  мВ) цвета.

В процессе расчета броуновской динамики каждая молекула МС случайным образом помещалась внутрь объема, не занятого вирионом, после чего приходила

в движение до образования столкновительного комплекса. Это соответствует экспериментальным условиям, когда краситель добавляется к вирусам до или сразу после этапа инфицирования клетки-хозяина. В работе были получены и проанализированы 33 тысячи диффузионно-столкновительных комплексов молекулы МС с оболочкой SARS-CoV-2 с энергией электростатического притяжения более 2 kT, полученной в результате независимых вычислительных экспериментов моделирования броуновской динамики (Рисунок 3.1.2). Модель молекулы МС несёт один положительный заряд, распределенный на диметиламиновых группах. Как можно предположить, связывание МС происходит посредством электростатического взаимодействия этих групп с отрицательными зарядами белков и липидных компонентов вирусной оболочки. Можно видеть, что сайты связывания МС на оболочке образуют обособленные области (Рисунок 3.1.2). В частности, существуют как области с высокой способностью связывания (Рисунок 3.1.3 А), так и обширные области на оболочке, где МС вообще не связывается (Рисунок 3.1.3 А, Б).

На рисунке 3.1.3 А показано, что Е белок, визуализированный белым цветом, является привлекательной мишенью для связывания МС. Остатки глютаминовой кислоты Е белка, экспонированные на поверхности вирусной мембранны, создают заметную область отрицательного потенциала (Рисунок 3.1.3 Ж). Кроме того, Е белки имеют тенденцию совместно локализовываться с отрицательно заряженными липидами, повышая локальный отрицательный электростатический потенциал вокруг Е белков. На рисунке 3.1.3 А показаны кластеры отрицательно заряженных липидов, состоящих из молекул кардиолипина (CDL2), пальмитоил-олеоилфосфатидилсерина (POPS) или пальмитоил-олеоилфосфатидилинозитола (POPI). По сравнению с отдельно расположенным отрицательно заряженными липидами, кластеры образуют значительно более интенсивные отрицательно заряженные области, которые эффективно притягивают молекулы МС. Можно обратить внимание, что положительно заряженные М белки относительно редко встречаются в таких областях.

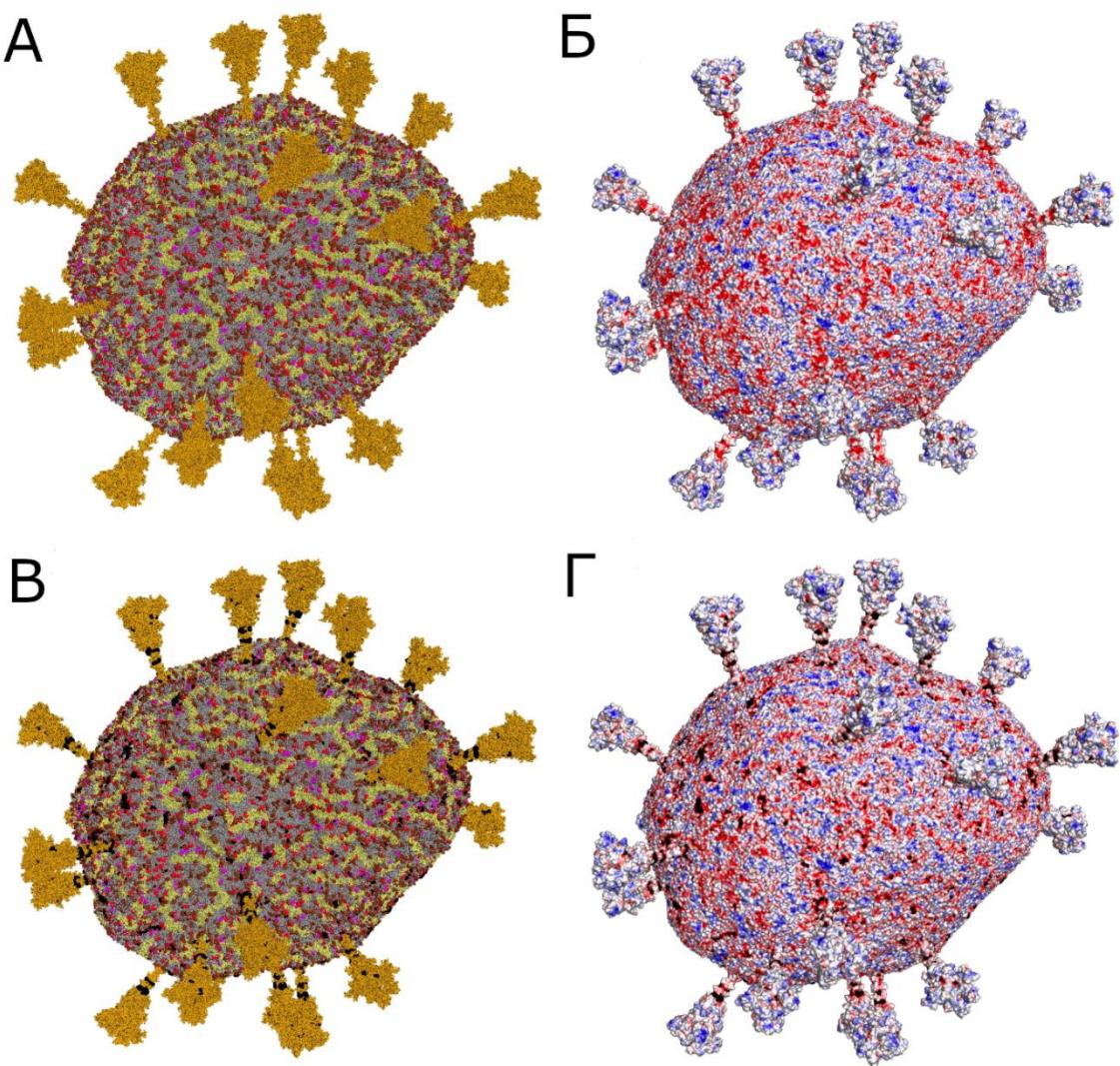


Рисунок 3.1.2. Связывание МС с оболочкой SARS-CoV-2. (А) Поверхность модели оболочки вириона, окрашенная в соответствии с типами компонентов оболочки: нейтральные липиды показаны серым цветом; отрицательно заряженные липиды окрашены в разные оттенки красного (молекулы POPI — в коричневый; POPS — в пурпурный; CDL2 — в красный); преобладающие белки окрашены в разные оттенки желтого (белки S — в охристый, белки M — бледно-желтый); показанная копия Е белка окрашена в белый цвет. (Б) Поверхность вириона, окрашенная его электростатическим потенциалом от  $-50$  мВ (красный) до  $+50$  мВ (синий). (В, Г) Диффузационно-столкновительные комплексы МС и вирусной оболочки с энергией электростатического притяжения более  $2$  кТ. На (В) цвет компонентов оболочки вириуса такой же, как на (А). Центры масс МС визуализируются в виде маленьких черных сфер.

Существование обширных областей, которые не связывают МС (Рисунок 3.1.3 Б, В, Д, Е), по-видимому, является неочевидным, поскольку оболочка коронавируса содержит большое количество отрицательно заряженных липидов, почти равномерно распределенных по всей мемbrane, которая, в принципе, может эффективно связывать положительно заряженные молекулы МС. Однако, как видно из распределения электростатического потенциала на поверхности оболочки SARS-CoV-2 (Рисунок 3.1.3 Д, Е), в этих областях существует значительное количество положительно заряженных областей, генерируемых М белками (показаны бледно-желтым цветом на Рисунке 3.2.3. Б, В), которые предотвращают связывание молекул МС с отрицательно заряженными липидами, прилегающими к ним, поскольку взаимодействие МС с такими мембранными фрагментами не может достичь энергии электростатического притяжения 2 kT и более.

Было подсчитано количество событий взаимодействия молекулы МС с каждым из компонентов оболочки коронавируса (Таблица 3.1.1). В случае одновременного контакта молекулы МС с несколькими молекулами оболочки коронавируса это событие было подсчитано для каждого типа вовлеченного компонента оболочки. В результате сумма отношений событий превысила 100%. В целом МС взаимодействовал с белками оболочки коронавируса в 64% случаев, а с липидами в 43% случаев. Почти 60% всех событий связывания МС произошло с шиповидными белками вирусной оболочки, тогда как краситель практически не связывался с М белками, которые присутствуют в оболочке коронавируса в количестве более тысячи копий (Рисунок 3.1.2 В, Г, Таблица 3.1.1). Взаимодействие молекулы МС с М белками опосредовано наличием отрицательно заряженных соседних липидов (CDL2 — 1,77%, POPI — 1,08%, POPS — 0,36%).

Напротив, МС хорошо связывается с Е белками. Однако, поскольку они присутствуют в оболочке только в двух копиях, процент связывания относительно общего числа событий невелик. Стоит обратить внимание, что Е белки окружены отрицательно заряженными липидами, что увеличивает их способность связывать молекулы МС. В частности, 7,5% событий связывания МС с Е белками относятся к одновременному взаимодействию с POPI, а 6,5% — с CDL2.

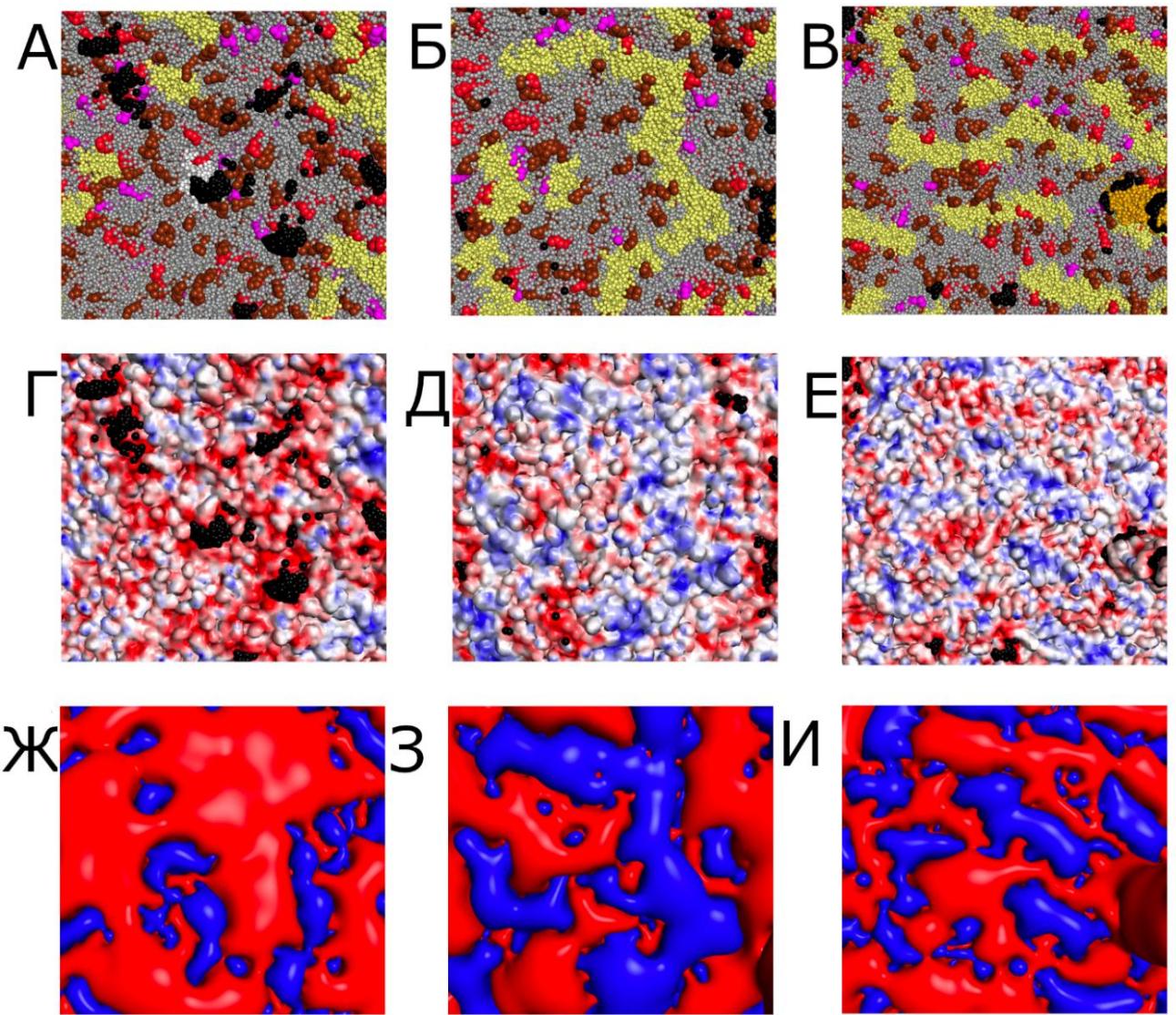


Рисунок 3.1.3. Фрагменты оболочки SARS-CoV-2 с различной способностью связывать МС: фрагмент 1 (А, Г, Ж) с высокой способностью связывать МС; фрагмент 2 (Б, Д, З) и фрагмент 3 (В, Е, И) с низкой способностью связывать МС. На (А–В) компоненты оболочки вируса окрашены так же, как на рисунке 3.2.2 А. На (Г–Е) поверхность оболочки вируса окрашена в соответствии с его электростатическим потенциалом от  $-50$  мВ (красный) до  $+50$  мВ (синий).

На (Г–Е) поверхность оболочки вируса окрашена в соответствии с его электростатическим потенциалом от  $-50$  мВ (красный) до  $+50$  мВ (синий).

Центры масс молекул МС визуализируются как черные сферы. На (Ж–И) визуализирована эквипотенциальная электростатическая поверхность  $-1$  мВ, создаваемая электрическими зарядами оболочки, окрашена в красный цвет,  $+1$  мВ — в синий цвет.

Как следует из Таблицы 3.1.1, значительная часть молекул МС связывается только с липидной фракцией оболочки. Наблюдаемое связывание МС с нейтральными липидами пальмитоил-олеоилфосфатидилэтаноламином (POPE), пальмитоил-олеоилфосфатидилхолином (POPC) и холестерином (CHOL) происходит за счет их совместной локализации с отрицательными липидами (POPS, POPI и CDL2).

Таблица 3.1.1. Контакты молекулы МС с компонентами оболочки SARS-CoV-2 с энергией электростатического притяжения более 2 кТ.

<b>Компоненты вирусной оболочки</b>		<b>Доля МС, %</b>
<b>Белки</b>	S	59,5
	M	3,2
	E	2,0
<b>Липиды</b>	POPI	17,7
	CDL2	28,2
	POPS	4,3
	POPC	31,0
	POPE	15,2
	CHOL	0,3

Для расчета доли молекул МС, которые взаимодействуют только с нейтральными липидами, но не взаимодействуют с отрицательно заряженными липидами, было рассчитано количество случаев, когда единственным партнером МС является один из нейтральных липидов. В частности, МС взаимодействует исключительно с нейтральными липидами только в 3,5% случаев, что в 15 раз меньше, чем при учете событий взаимодействия МС одновременно с отрицательно заряженными структурными компонентами оболочки коронавируса. Также стоит обратить внимание, что среди отрицательно заряженных липидов наибольший процент связывания с молекулами МС приходится на CDL2 (28,2%), который

имеет две полярные головки и, таким образом, становится привлекательной мишенью для МС. Однако треть контактов МС с CDL2 происходила за счет одновременного связывания как с CDL2, так и с POPI.

Известно, что МС может влиять на процесс слияния мембран из-за множественных участков связывания МС между (согласно аминокислотной последовательности) RBD и белком слияния (FP) и сразу после FP, а также рядом с доменом белка HR2 S [Fedorov et al., 2021]. С точки зрения влияния МС на стадию слияния мембран, способность этого катионного красителя связываться с отрицательно заряженными липидами представляется еще более важной. В симуляциях (таблица 3.2.1) молекулы МС легко связываются с отрицательно заряженными липидами или взаимодействует одновременно с отрицательно заряженными и нейтральными липидами. Хотя энергия электростатических комплексов, полученных в модели ( $2 \text{ kT}$ ), имеет тот же порядок, что и энергия тепловых флюктуаций, такие электростатические взаимодействия приводят к перераспределению молекул МС и создают областей с более высокой вероятностью контактов с МС.

Несмотря на то, что было проведено моделирование взаимодействия молекул МС только с липидами мембранны оболочки коронавируса, полученные результаты, при определенных допущениях, можно экстраполировать на взаимодействие МС с мембранами клеток хозяина. Считается, что движущей силой слияния является комбинация гидрофобных и электростатических эффектов [Villalaín, 2023]. Было показано, что домен слияния субъединицы S2 S белка SARS-CoV-2, который отвечает за связывание и взаимодействие с липидами в мембране клетки-хозяина, специфически взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами [Villalaín, 2023]. Поскольку те же типы липиды обеспечивают сайты связывания для МС, можно предположить, что МС потенциально может оказывать ингибирующее действие на процесс слияния, ингибируя связывание домена слияния S2 с отрицательно заряженными липидами мембранны хозяина.

В фотодинамических реакциях фотовозбуждённые молекулы МС генерируют активные формы кислорода, которые вызывают окисление ключевых биомолекул,

в первую очередь белков и ненасыщенных жирных кислот липидов вирусной оболочки, а также вирусных нуклеиновых кислот. Многочисленные сайты связывания МС, обнаруженные на модельной оболочке SARS-CoV-2 (Рисунок 3.1.3.2), помогают прояснить окислительное разрушение этой структуры. Действительно, можно увидеть наличие областей отрицательного потенциала, достаточных для связывания молекул катионного красителя как на S белках, так и на мембране (Рисунок 3.1.1 и Рисунок 3.1.2). Эти локализации молекул МС помогают фотогенерированным АФК достигать их молекулярных мишений.

При энергии электростатического притяжения 3 kT и выше удалось получить только 14 комплексов МС с оболочкой коронавируса, поскольку скорость образования таких комплексов оказалась крайне низкой. Одиннадцать комплексов образовались с S белками и один с M белком, а две молекулы МС контактировали только с липидами».

В предыдущей работе по изучению связывания МС с полноатомной структурой S белка были идентифицированы сайты связывания молекул МС на поверхности шипа [Fedorov et al., 2021]. В этом исследовании основными областями связывания МС являлись место соединения головы шипа и его ножки, а также область наибольшего отрицательного потенциала на голове S белка. Однако, использование изолированного S белка без мембранныго окружения накладывает свои ограничения. Так в нашем исследовании с использованием крупнозернистой модели оболочки SARS-CoV-2 была обнаружена еще одна область взаимодействия МС с S белком, которая находится на HR2 домене (Рисунок 3.1.4). Этот домен располагается на ножке шипа сразу после трансмембранныго домена, в месте, где она соприкасается с поверхностью мембраны. Эта область также богата остатками аминокислот, подверженными фотоокислению, такими как остатки тирозина, триптофана и т. д. Этот факт в свою очередь может объяснить экспериментально наблюдаемый эффект от воздействия света на культуру клеток, зараженных бычьим коронавирусом, в присутствии молекул МС, при котором вирионы теряют свою «корону» за счет потери S белков [Zhukhovitsky et al., 2022a]. Если в предыдущих исследованиях предполагалось, что потеря S белков обусловлена их

разрушением в области сочленения «головы» и «ножки», то результаты нашей работы свидетельствуют о том, что разрушение S белка может происходить в месте перехода трансмембранных доменов в HR2 домен, при этом вирион полностью теряет свои S белки вплоть до трансмембранных доменов.

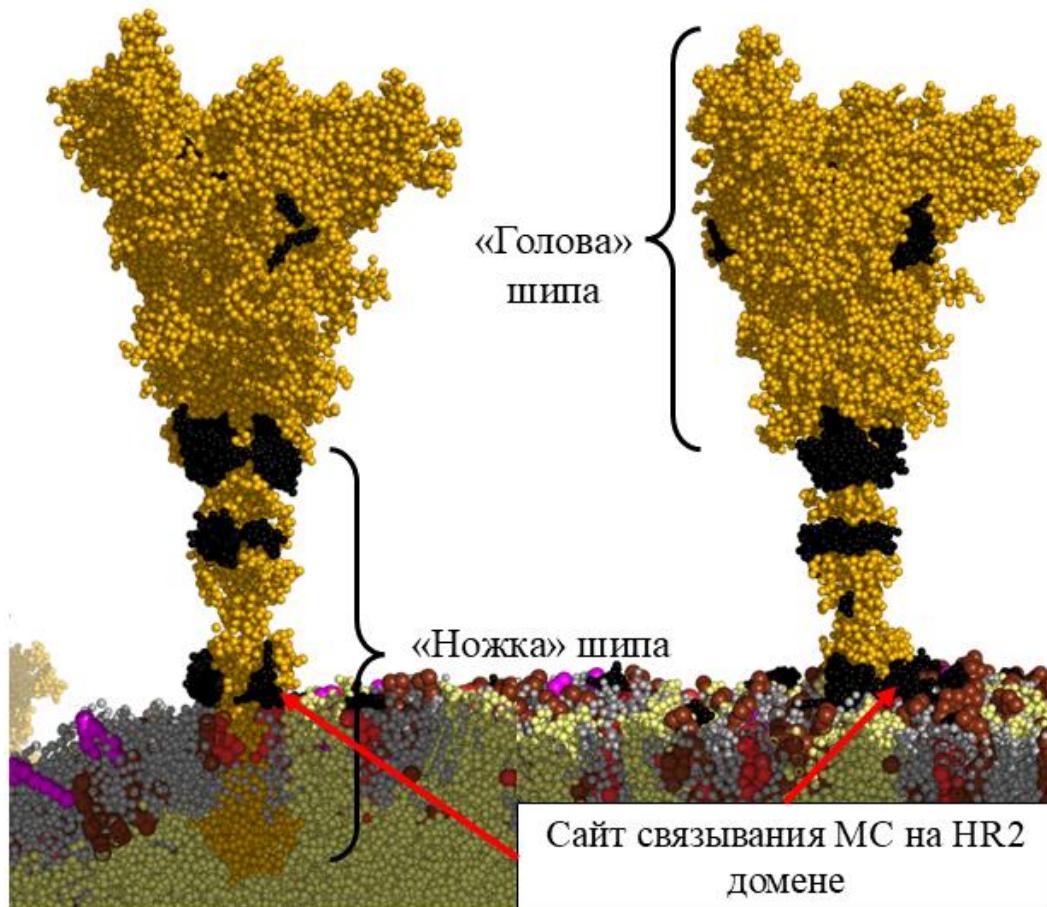


Рисунок 3.1.4. Связывание молекул МС на поверхности S белка. Структура S белка показана охристыми сферами, центры масс молекул МС показаны черными сферами, мембрана окрашена в соответствии с Рисунком 3.1.2. Красными стрелками указаны области связывания молекул МС на HR2 домене S белка.

Таблица 3.1.2. Распределение количества контактов молекулы метиленового синего с отрицательно заряженными липидами оболочки вириона SARS-CoV-2.

<b>Количество партнеров</b>	<b>POPI</b>	<b>POPS</b>	<b>CDL2</b>	<b>Доля МС, %</b>
1	0	0	1	<b>34</b>
1	0	1	0	<b>2,5</b>
1	1	0	0	<b>11</b>
2	0	1	1	<b>4</b>
2	0	0	2	<b>13</b>
2	2	0	0	<b>5</b>
2	1	1	0	<b>2</b>
2	1	0	1	<b>18</b>
3	1	1	1	<b>1,6</b>
3	1	0	2	<b>2</b>
3	2	1	0	<b>0,6</b>
3	2	0	1	<b>3</b>
3	3	0	0	<b>1</b>

В другом исследовании, выполненном в нашей лаборатории, изучалось взаимодействие фотосенсибилизатора фталоцианина цинка ( $ZnPcChol^{8+}$ ) с моделью оболочки коронавируса, используемой в настоящей работе [Fedorov et al., 2022]. В отличии от молекулы МС, имеющей единичный положительный заряд, молекула  $ZnPcChol^{8+}$  имеет заряд +8, поэтому способна активно создавать электростатические взаимодействия с компонентами оболочки коронавируса с энергиями порядка 8 kT. Доля молекул  $ZnPcChol^{8+}$ , взаимодействующих с компонентами оболочки вириона, и сравнение с аналогичным распределением молекул МС представлены в Таблице 3.1.3.

Таблица 3.1.3. Сравнение взаимодействия МС и ZnPcChol<sup>8+</sup> с компонентами оболочки SARS-CoV-2.

<b>Компоненты вирусной оболочки</b>		<b>Доля МС, %</b>	<b>Доля ZnPcChol<sup>8+*</sup>, %</b>
<b>Белки</b>	S	59,5	33,9
	M	3,2	8,4
	E	2,0	0,6
<b>Липиды</b>	Отрицательно заряженные	POPI	17,7
		CDL2	28,2
		POPS	4,3
	Нейтральные	POPC	31,0
		POPE	15,2
		CHOL	0,3

\*Данные получены из работы [Fedorov et al., 2022].

Можно заметить, что молекулы МС гораздо чаще взаимодействуют с белками оболочки и реже с липидами оболочки по сравнению с молекулами ZnPcChol<sup>8+</sup>. А именно, доля молекул МС, контактирующих с белками оболочки, составляет 64,7%, тогда как соответствующая доля молекул ZnPcChol<sup>8+</sup> составила 42,9%. Большое различие наблюдается во взаимодействии молекул фотосенсибилизаторов с S белком. Если молекула ZnPcChol<sup>8+</sup> взаимодействует с S белком примерно в трети случаев, то молекула МС взаимодействует с ним более чем в половине случаев. Стоит отметить, что так же, как и в случае с МС, большая доля контактов между ZnPcChol<sup>8+</sup> и M белками обусловлена взаимодействием ZnPcChol<sup>8+</sup> с другими компонентами оболочки, такими как отрицательно заряженные липиды и S белки. В силу меньшего размера молекулы МС доля контактов с M белком значительно ниже, чем в случае ZnPcChol<sup>8+</sup>.

Особое внимание следует обратить на E белок, который в модели внешней

оболочки представлен лишь двумя копиями. Расположенные преимущественно в мембранах аппарата Гольджи, ЭПР и ERGIC инфицированных клеток, пентамеры Е белка участвует в морфогенезе и сборке вируса и поддерживает структуру вирусных частиц посредством взаимодействия с М белком [Santos-Mendoza, 2023]. Несмотря на то, что вирусные оболочки формируются из мембран клеточных компартментов, где преимущественно экспрессируется Е белок, сами вирусные оболочки содержат лишь несколько копий Е белка. Была обнаружена значительная кольцевая область отрицательного потенциала вокруг входа в такой канал виропорина, который образован остатками глутаминовой кислоты Е белка и совместно локализованными отрицательно заряженными липидами. Эта область является весьма привлекательной для молекул МС (Рисунок 3.1.3 А). Проводимость канала Е белка зависит от общего заряда липидов мембранны клетки хозяина [Verdiá-Báguena et al., 2013] и может быть чувствительна к изменениям свойств заряда в результате связывания катионных молекул МС. В то время, когда молекулы ZnPcChol<sup>8+</sup> практически не взаимодействуют с ним (доля контактов 0,6%), молекулы МС относительно числа копий виропорина часто взаимодействуют с Е белком (доля контактов 2%). Такая селективность молекул МС к виропорину коронавируса SARS-CoV-2 подтверждает возможность рассмотреть Е белок как потенциальную мишень для ингибиования стадий жизненного цикла вируса, протекающих внутри клетки. Для оценки потенциала использования МС в качестве противовирусного препарата, нацеленного на виропорины коронавирусов, мы детально изучили его взаимодействие с мембраной оболочки коронавируса и с каналом пентамера Е белка.

*Моделирование взаимодействия метиленового синего с мембраной оболочки коронавируса*

Для получения энергетического профиля проникновения молекулы МС через мембрану была проведена серия молекулярно-динамических расчетов зонтичной выборки. Состав мембранны и соотношением липидов совпадает с таковым в

модели оболочки коронавируса.

Как видно из Рисунка 3.1.5. профиль свободной энергии прохождения МС через мембрану имеет симметричный характер. Ширина мембраны составляет примерно 4 нм, в области отрицательно заряженных фосфатных групп (2 и -2 нм на оси X) имеются небольшие локальные минимумы, обусловленные взаимодействием с ними положительно заряженной молекулы МС. На пути реакции существует энергетический барьер, максимум которого приходится на середину мембраны. В этой области катион МС окружен гидрофобными липидными хвостами, что обуславливает наличие энергетического барьера. Величина энергетического барьера прохождения МС через мембрану составляет 37,8 кДж/моль (15,2 кТ). Полученные данные свидетельствуют о том, что действие МС при фотодинамической инактивации вирусов направлено на окисление липидов, с которыми он связывается на поверхности мембраны за счет электростатического притяжения, однако проходить через мембрану он не может.

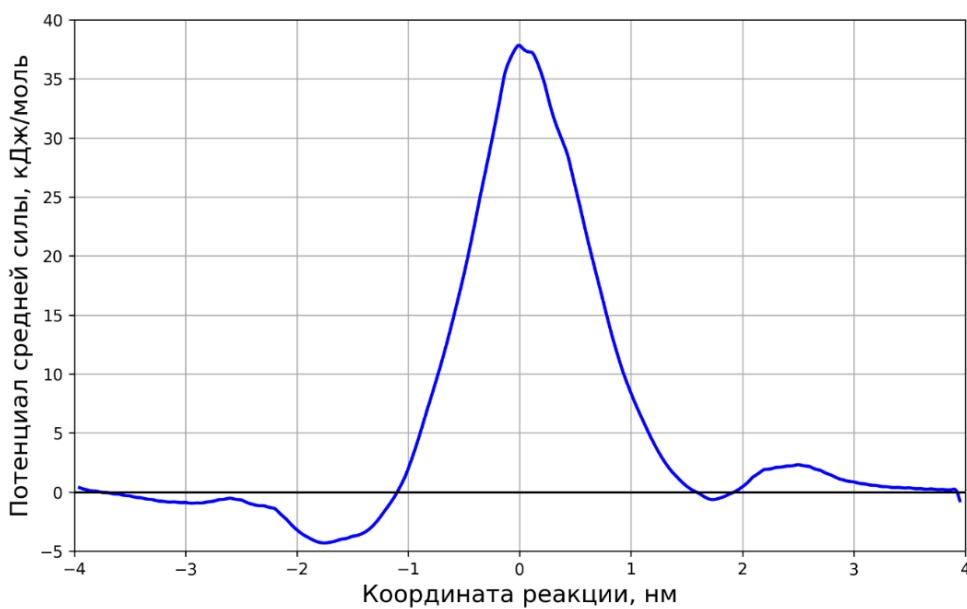


Рисунок 3.1.5. Потенциал средней силы прохождения молекулы МС через мембрану.

Состав плазматической мембраны отличается от состава ERGIC, но доля заряженных липидов в них принципиально не различается. Поэтому данные результаты можно интерпретировать и с точки зрения путей проникновения МС

внутрь клетки. Недавно была проведена похожая работа, в которой был получен профиль потенциала средней силы вдоль пути проникновения молекулы МС через бактериальную мембрану, которая отличается более выраженным зарядом и наличием липополисахаридов на внешнем липидном слое [Kholina, Kovalenko, Strakhovskaya, 2025]. В данном случае полученный энергетический барьер был существенно ниже и составил 19,8 кДж/моль (8кТ).

Несмотря на то, что МС достаточно трудно проникает сквозь мембрану клетки, а тем более через слои кожи, существуют исследования, в которых он применяется для заживления ран, лечения кожных инфекций и фотодинамической терапии рака кожи. Существуют химические усилители проникновения, или СРЕ (Chemical Penetration Enhancers) подобных активных веществ через кожу, которые повышают ее проницаемость, временно и обратимо изменяя ее барьерные свойства. Нами была создана первая база данных таких усилителей проникновения СРЕ-DB (Chemical Penetration Enhancers Database) [Vasyuchenko et. al., 2021]. Часть из этих соединения была протестирована и на проникновении МС в экспериментах *in vivo* [Rosado, Rodrigues, 2003]. При разработке лекарственных средств на основе органических катионов, подобных молекулам МС, стоит учитывать их способность проходить через мембрану и тестировать системы, включающие в том числе молекулы СРЕ для усиления их действия.

### **3.2. Моделирование взаимодействия метиленового синего с Е белком методом зонтичного отбора проб**

#### *Сравнение двух существующих моделей виропорина*

Для выполнения работы использовались две существующие модели виропорина SARS-CoV-2: первая получена в лаборатории Фейга [Heo, Feig, 2020], вторая – в лаборатории Коркина [Srinivasan et al., 2020]. Обращаясь к экспериментальным структурам трансмембранных доменов пентамера Е белка с

идентификаторами 8SUZ и 7K3G, можно обратить внимание на расположение боковых цепей трех аминокислотных остатков фенилаланина. В отличии от структуры 5X29 для коронавируса SARS-CoV, все остатки фенилаланина в структурах для SARS-CoV-2 обращены не внутрь канала, а экспонированы в липидное окружение виропорина. Учитывая высокую консервативность Е белка и разнообразие приписываемых ему ролей в жизненном цикле коронавируса, эти различия обусловлены скорее не видовыми особенностями, а конформационными. К сожалению, о различиях в конформации Е белка и их связи с выполняемыми функциями известно крайне мало. В свою очередь, более полные модели виропоринов вслед за структурой 5X29, имеют остаток Phe26, обращенный внутрь поры. Более того, этот остаток, по-видимому, является модулятором открытого и закрытого состояния виропорина [Sarkar, Saha, 2020]. Работа по моделированию поведения двух рассматриваемых моделей виропоринов в липидном окружении также подтвердила эту гипотезу [Monje-Galvan, Voth, 2021]. В течение микросекундной симуляции МД остаток Phe26 многократно менял свою ориентацию в канале.

Для оценки моделей Фейга и Коркина было проведено по три симуляции молекулярной динамики встроенного в мембрану виропорина. Прежде всего оценивалось состояние канала виропорина с помощью метода HOLA (Рисунок 3.2.1), впервые примененного в работе [Smart, Goodfellow, Wallace, 1993] и реализованного в программном пакете HOLA (<https://www.holeprogram.org/>). В случае модели Коркина ни в одной из симуляций пора не смогла сохранить изначальное широкое состояние с диаметром около 4–5 нм, к тому же ни в одной из симуляций не наблюдалось движение молекул воды или ионов внутри канала. Диаметр поры составил в среднем около 0,15 нм. Для сравнения размер молекулы воды составляет около 0,27 нм, иона кальция – 0,14 нм, иона натрия – 0,1 нм.

В случае модели Фейга из трех симуляций только в одной можно было идентифицировать полость канал, в двух других случаях пора «схлопывалась» на начальных временах симуляций. Однако, симуляция, в которой пору всё же удалось идентифицировать и визуализировать связана с возникшим артефактом

симуляции. В пору канала через два соседних мономера виропорина, проникла одна молекула фосфолипида, которая и держала канал открытым (Рисунок 3.2.1).

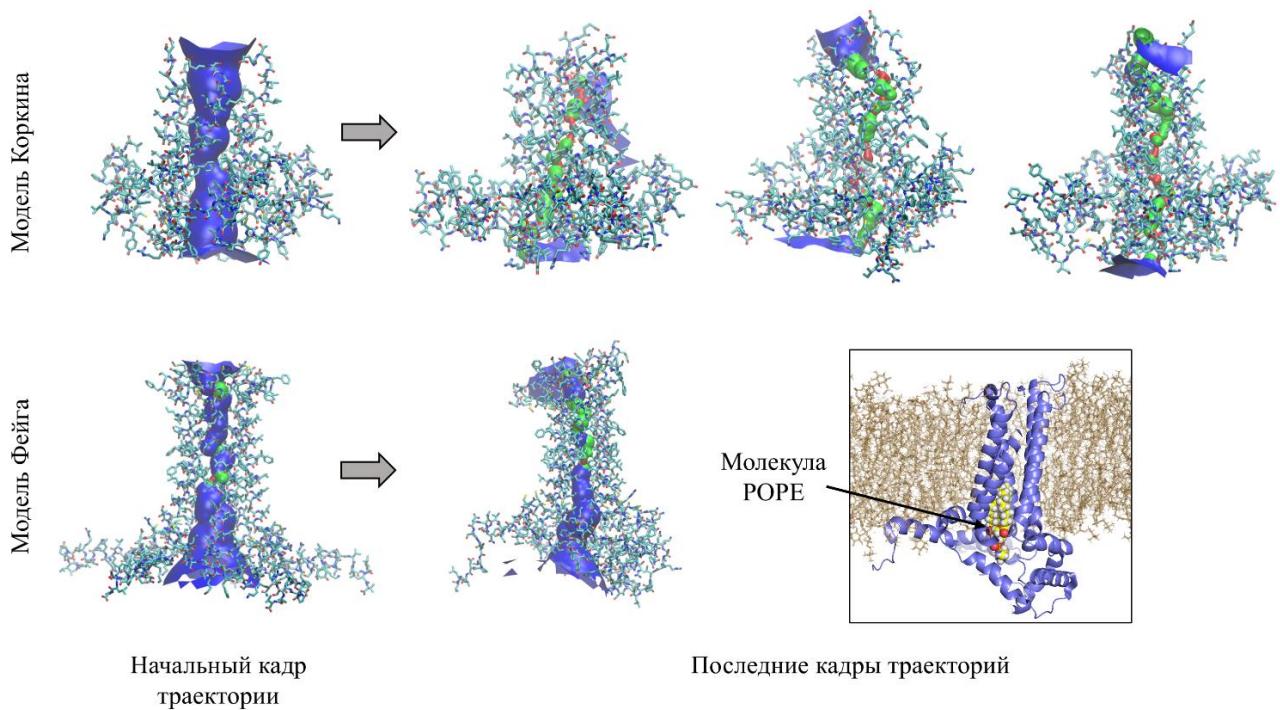


Рисунок 3.2.1. Визуализация поры виропорина, полученная с помощью метода HOLA и программы визуализации VMD, для первого и последних кадров траектории МД. В области канала, окрашенные синим цветом, может поместиться 2 и более молекул воды, в зеленые области – одна молекула, в красные же не может поместиться ни одной молекулы. Верхняя панель представляет собой результаты моделирования МД модели Коркина, нижняя панель – модели Фейга. Дополнительно представлена визуализация фосфолипида POPE внутри канала виропорина модели Фейга.

Результаты вычисления RMSF остатков мономеров виропорина совпадают в таковыми в работе [Monje-Galvan, Voth, 2021] и указывают на более нестабильные С-концевые области Е белка в случае модели Фейга, по сравнению с моделью Коркина. Кроме того, наблюдалось аналогичное искривление мембранны, когда в

нее был встроен виропорин модели Коркина. Как уже упоминалось, такое искривление мембранны в компартментах ERGIC может иметь важное функциональное значение в процессе сборки вирусных частиц внутри клетки-хозяина.

Основываясь на выводах из работы [Monje-Galvan, Voth, 2021] и на собственных данных из моделирования равновесных молекулярных динамик виропоринов в липидной бислой, можно предположить, что модель Коркина имеет более вероятную структуру, которая может выполнять роль ионного канала. Модель мономера Е белка Фейга была создана по гомологии и затем уточнена путем моделирования молекулярной динамики. Пентамер Е белка создавался по шаблону структуры виропорина SARS-CoV-2, но в описании протокола создания модели на портале GitHub ([github.com/feiglab/sars-cov-2-proteins](https://github.com/feiglab/sars-cov-2-proteins)) явно указывается то, что С-концевые участки мономеров были изъяты из мембранны вручную и расположены на ее поверхности. Учитывая полученные нами результаты молекулярной динамики, реалистичность модели Фейга можно поставить под сомнение. Предварительные расчеты зонтичной выборки с использованием модели Фейга также подтвердили это. Из-за особенностей организации пентамера в этой модели, липид также часто попадал в канал виропорина во время моделирования окон зонтичной выборки. По этой причине было невозможно получить доверительные результаты энергетического профиля прохождения метиленового синего через канал виропорина.

*Результаты моделирования зонтичного отбора проб с использованием  
модели Коркина*

Данный раздел написан с использованием материалов статьи [Васюченко Е. П. и др., 2025]. «Небольшой (75 аминокислот) Е белок с единственным гидрофобным доменом образует в мембранах гомопентамерные каналы, так называемые «виропорины» [Breitinger et al., 2022; Poggio et al., 2023]. Начальная стадия взаимодействия МС с каналом пентамера Е белка обусловлена наличием двух

соседних (7 и 8 а.о.) отрицательно заряженных остатков глутаминовой кислоты в петлях Е белков, выходящих в раствор. На полученном профиле ПСС, на пути проникновения молекулы МС через пору пентамера Е белка критических энергетических барьеров не выявлено. Наблюдались пять локальных минимумов энергии, самый глубокий из которых соответствовал положению 3 МС в центре белкового канала и составлял  $-13,56 \text{ кДж/моль}$  ( $-5,50 \text{ кT}$ ) (Рисунок 3.2.3). В этой части работы, для описания взаимодействий МС с аминокислотными остатками канала пентамера Е белка в минимумах ПСС, из траекторий молекулярной динамики были отобраны соответствующие положения МС (Рисунок 3.2.3). Для типичных конформаций МС с минимальными значениями ПСС были проанализированы взаимодействия молекул красителя с аминокислотными остатками канала пентамера Е белка. Всего было выявлено шесть типов нековалентных взаимодействий (Рисунок 3.2.4), в основном обусловленных наличием системы ароматических колец в структуре МС. Так, наблюдаемые  $\pi$ - $\pi$  стэкинг взаимодействия обусловлены перекрыванием р-орбиталей в  $\pi$ -сопряженных системах МС и остатков ароматических аминокислот тирозина и фенилаланина. При СН- $\pi$  взаимодействиях происходит взаимодействие  $\pi$ -электронного облака МС и электронного облака алкильных групп аланина, валина или лейцина. Другие типы  $\pi$ -взаимодействий включали S- $\pi$ , NH- $\pi$  и OH- $\pi$  взаимодействия. Кроме этого, существенную долю контактов между молекулами МС и аминокислотными остатками белка составляли неклассические водородные связи, образующиеся между водородами диметиламиновых групп и атомами кислорода белка. Такие связи гораздо слабее классических водородных связей, тем не менее их энергия находится в диапазоне 2–10 кДж/моль.

В области N-концов мономеров Е белка взаимодействие МС с аминокислотными остатками выражается в наличии двух минимумов ПСС (минимумы 1 и 2 на Рисунке 3.2.3) с энергиями  $-6,01$  и  $-7,54 \text{ кДж/моль}$ , соответственно. Энергетический барьер перехода из минимума 1 в минимум 2 и из второго в третий составляет  $\sim 4 \text{ кДж/моль}$  ( $2 \text{ кT}$ ). В первом локальном минимуме наблюдается взаимодействие молекулы МС с белком посредством СН- $\pi$

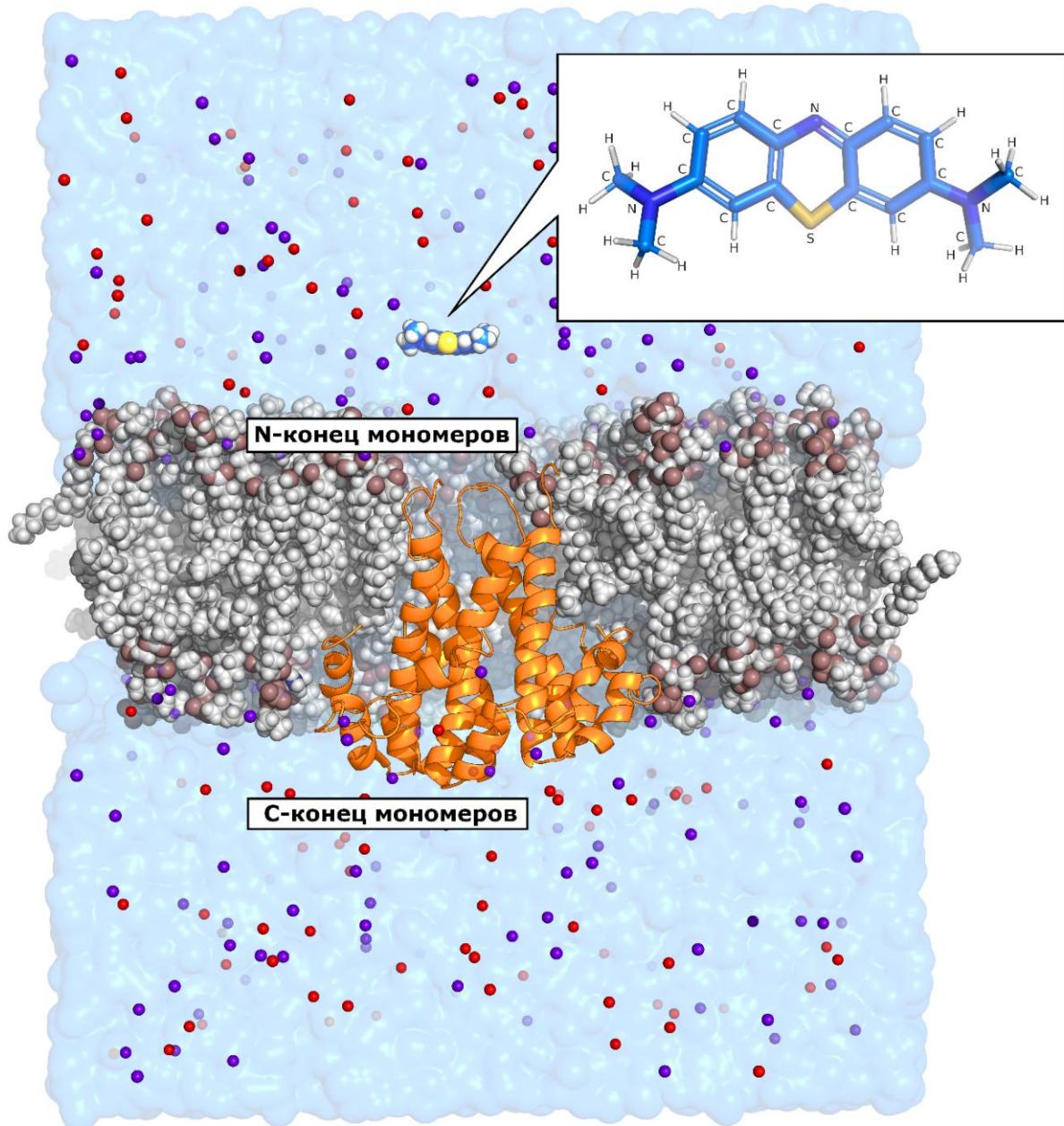


Рисунок 3.2.2. Визуализация молекулярно-динамических моделей метиленового синего и пентамера Е белка в мембране. Е белок представлен оранжевым цветом; атомы фосфатных групп липидов мембранные представлены светло-коричневыми сферами, остальные атомы – серыми сферами; ионы калия и хлора представлены фиолетовыми и красными маленькими сферами, соответственно. Состояние системы показано после этапа уравновешивания. Молекула метиленового синего расположена в центре первого окна зонтичной выборки.

взаимодействий и слабых неклассических водородных связей, поэтому этот минимум не столь глубок, и он не является препятствием для перехода МС в следующее состояние 2. Однако, во втором локальном минимуме подобного рода слабых взаимодействий становится больше и МС образует связи уже с пятью аминокислотными остатками.

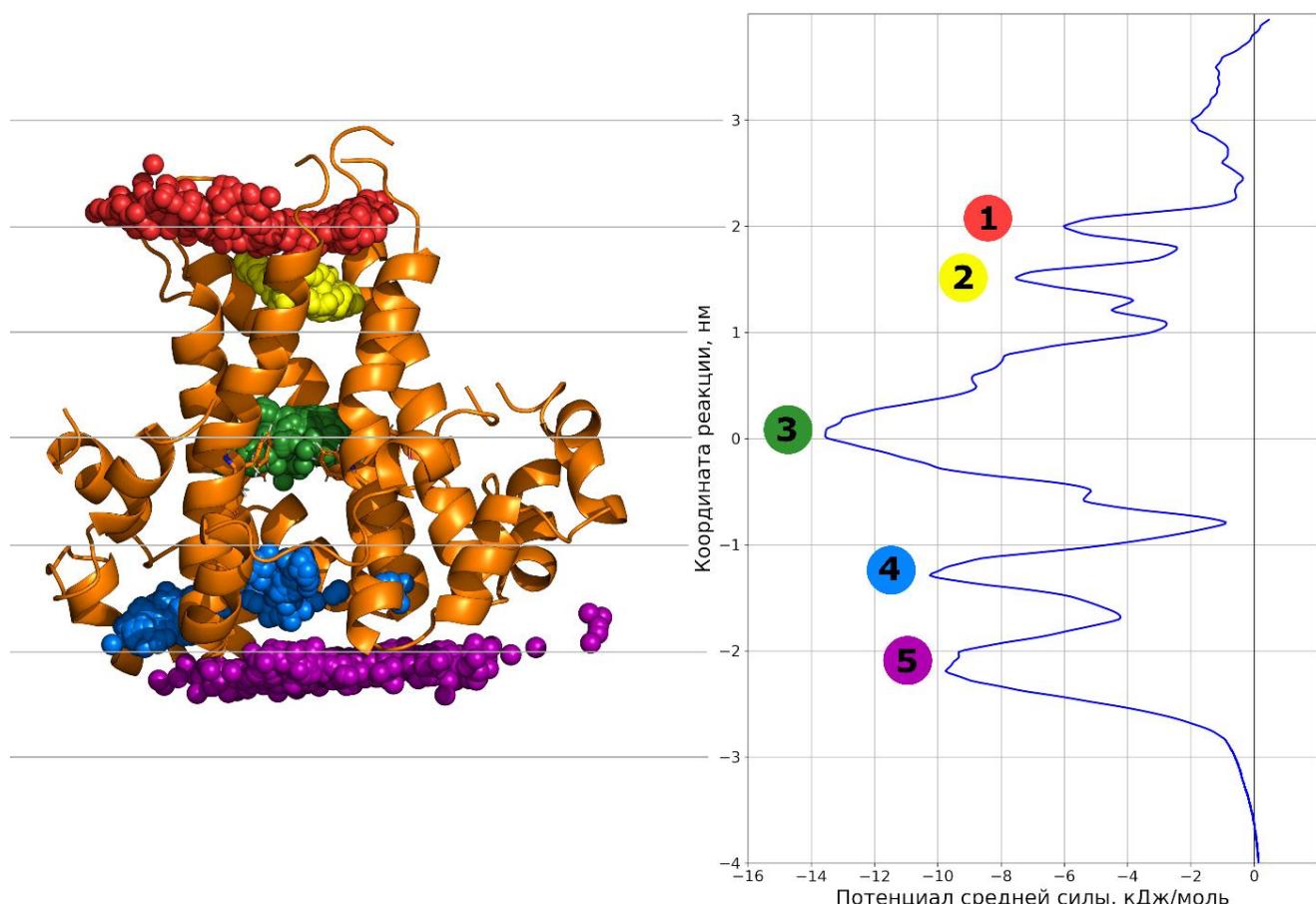


Рисунок 3.2.3. Потенциал средней силы взаимодействия МС с аминокислотными остатками, формирующими канал пентамера Е белка SARS-CoV-2. Слева показан Е белок (оранжевый цвет) и центры масс молекул МС, положения которых соответствуют минимумам потенциала средней силы на правой панели.

Когда положение МС соответствует середине поры виропорина, на кривой ПСС наблюдается глобальный минимум со значением  $-13,56$  кДж/моль ( $-5,5$  кТ) (положение 3 на Рисунке 3.2.3). Это область канала богата ароматическими

аминокислотными остатками – фенилаланинами 20, 23 и 26 в каждом из пяти мономеров пентамера виропорина. Центр масс пяти остатков F26 был принят за центр поры пентамера Е белка. Эти остатки образуют самое узкое место в канале и ответственны за закрытое и открытые состояния виропорина. Именно нековалентные  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия молекулы МС с остатками фенилаланина определяют наличие самого глубокого минимума на кривой ПСС. При этом фенилаланин 26 D-цепи образует стэкинг взаимодействия со всеми тремя кольцами молекулы МС, фенилаланин 23 A-цепи взаимодействует с двумя кольцами, тогда как фенилаланины 26 A- и В-цепи только с одним кольцом. Подобные сети стэкинг взаимодействий прочно связывают молекулу МС и осложняют ее движение внутри канала, что может приводить к ингибиции его проводимости. Энергетические барьеры перехода из этого положения в соседние минимумы довольно высокие и составляют  $\sim 12,5$  кДж/моль ( $4,5\text{--}5$  кТ).

В области выхода из канала виропорина аминокислотные остатки Е белков взаимодействуют с МС, что выражается в наличии еще двух локальных минимумов ПСС (положения 4 и 5 на Рисунке 3.2.3) с энергиями  $-10,25$  и  $-9,75$  кДж/моль, соответственно. Между ними находится небольшой энергетический барьер  $\sim 6$  кДж/моль (2 кТ). Важную роль в стэкинг взаимодействиях МС играет ароматический аминокислотный остаток тирозина 24 В-цепи белка. Помимо этого, для положения МС в 4 минимуме профиля ПСС характерны CH- $\pi$  взаимодействия с пятью алкильными группами остатков аланина, валина и лейцина. В 5 минимуме, помимо  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий, имеют место OH- $\pi$  взаимодействия и образование нетипичных водородных связей между кислородами остатков аланина 36 и аргинина 38, у которого боковая цепь, имеющая положительный заряд, экспонирована в раствор.

Энергия выхода МС из поры белка достаточно высокая и составляет  $\sim 10$  кДж/моль (4 кТ). В петлях, соединяющих две альфа-спирали мономеров Е белка и образующих выход из поры виропорина, присутствует пять остатков аргинина 38, экспонированных в раствор. Кольцо из пяти положительно заряженных

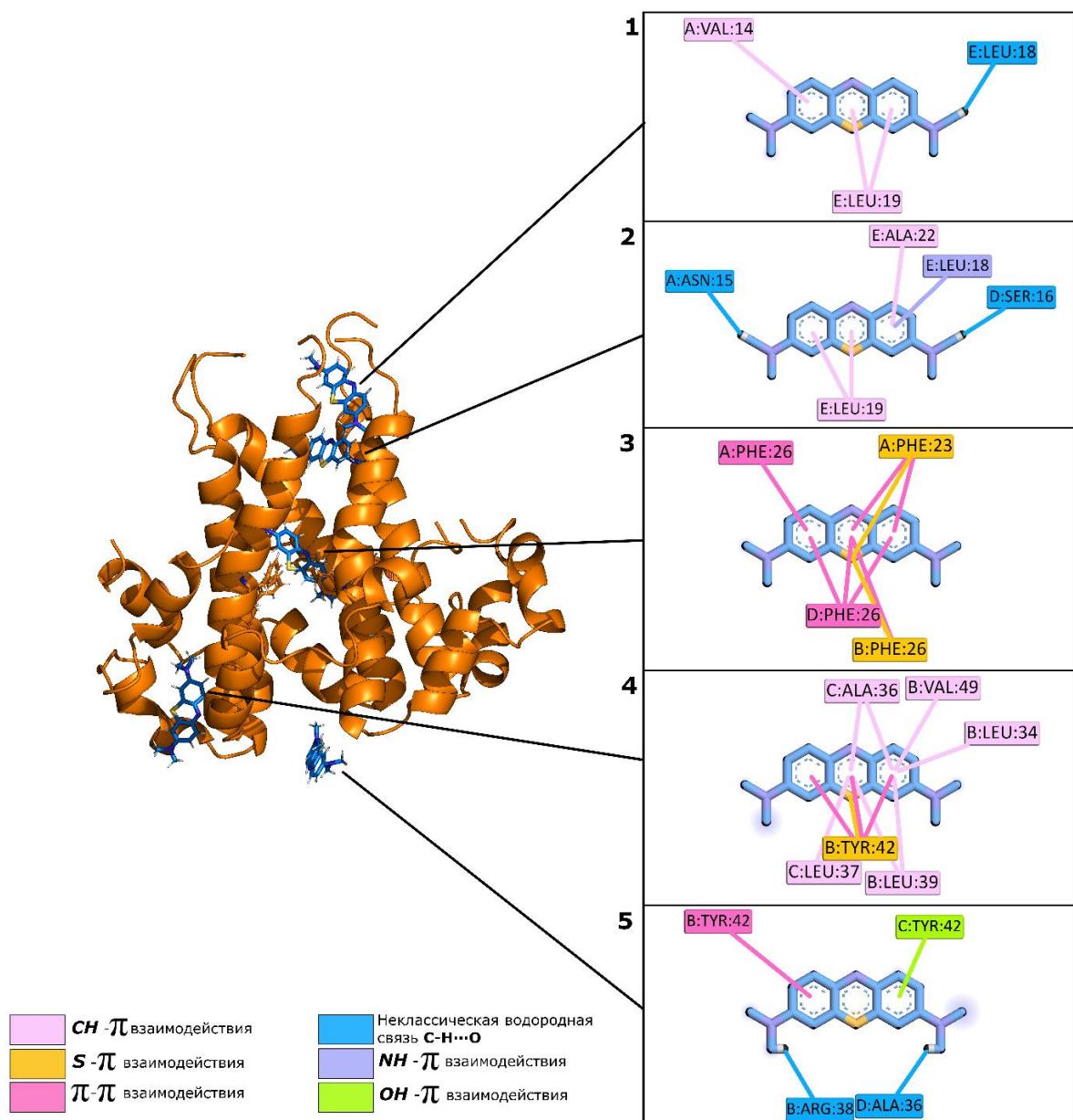


Рисунок 3.2.4. Положения метиленового синего (МС), соответствующие минимумам потенциала средней силы (ПСС). МС представлен синим цветом, пентамерный Е белок представлен оранжевым цветом, его конформация соответствует состоянию белка после уравновешивания. Для положений в каждом минимуме представлены диаграммы взаимодействий молекулы МС с аминокислотными остатками белка. Аминокислотный остаток имеет следующее обозначение: цепь, которой он принадлежит, трехбуквенное обозначение типа аминокислоты и номер остатка. Положения МС в канале виропорина пронумерованы в соответствии с рисунком 3.2.3.

аминокислот затрудняет выход положительно заряженной молекулы МС из канала виропорина, что выражается в довольно высоком энергетическом барьере выхода из 5 минимума на профиле ПСС.

С помощью методов компьютерного моделирования мы показали, что следующим этапом после первоначального электростатического контакта МС с отрицательно заряженными остатками глутаминовой кислоты N-конца Е белков SARS-CoV-2, при дальнейшем погружении в канал виропорина молекулы МС вступают в множественные  $\pi$ -взаимодействия. Хорошо известными соединениями, которые проявляют вирулицидную активность путем ингибиования виропорина, являются противогриппозные аминоадамантаны амантадин и римантадин [Georgiou, Kolokouris, Kolocouris, 2025]. Рассчитанная нами энергия этих взаимодействий ( $-13,56$  кДж/моль) немного превышает энергию связывания амантадина с виропорином SARS-CoV ( $\sim -12,3$  кДж/моль или  $-4,9$  кТ), рассчитанную на основе экспериментально определенной константы диссоциации [Torres et al., 2007]. Это указывает на перспективу дальнейших экспериментальных исследований МС в качестве ингибитора виропоринов».

Величина энергетического барьера прохождения МС через мембрану составляет  $37,8$  кДж/моль или  $15,2$  кТ, что практически в три раза выше по сравнению с барьером, который должна преодолеть молекула МС при прохождении через пору виропорина. Скорее всего, для молекулы МС путь проникновения внутрь вириона, или же внутрь компартмента ERGIC, лежит через виропорин, нежели через мембрану. Эти данные могут указывать на возможную роль виропоринов в фотодинамической инактивации вирусов, опосредованной МС, обусловленную облегчением проникновения МС внутрь вириона и последующее его связывание с РНК коронавируса.

## Глава 4. Взаимодействие метиленового синего с белковыми оболочками флавивирусов

### 4.1. Создание молекулярных моделей белковых оболочек вируса Зика и вируса денге

Модели белковых оболочек созданы на основе структур из базы данных PDB, идентификаторы 5IRE (ZIKV) и 3J6S (DENV) [Fibriantsah et. al., 2015; Sirohi et. al., 2016].

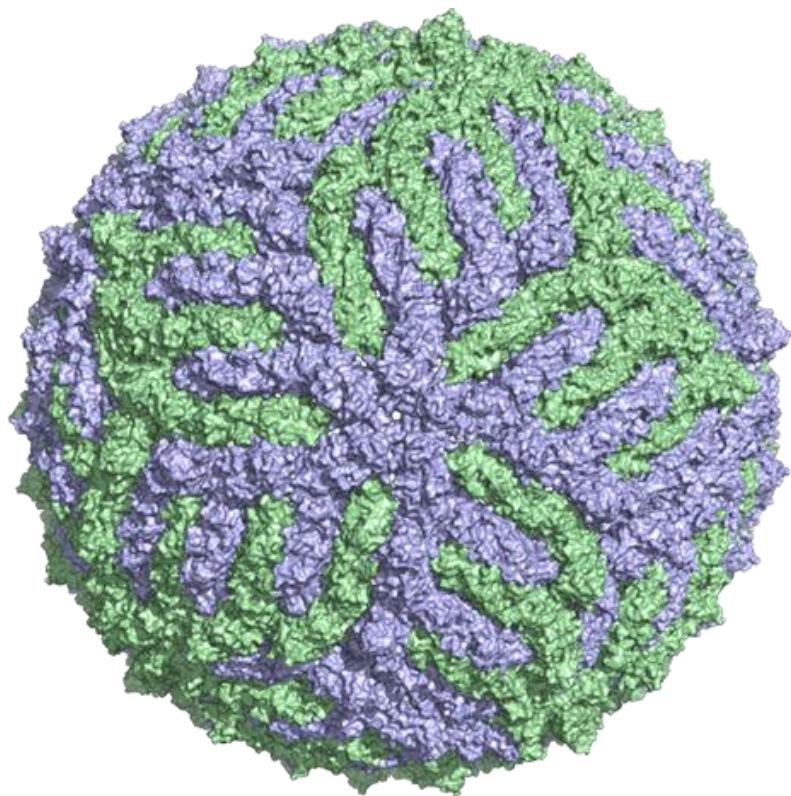


Рисунок 4.1.1. Структура внешней белковой оболочки флавивирусов, состоящая из 180 копий Е белков, организованных в 30 рафтов по три параллельных димера. Два Е белка в димере окрашены в сиреневый и светло-зеленый цвета.

Эти структуры содержат повторяющийся мотив белковой оболочки, состоящий из трех Е белков и трех М (мембранных) белков, а также информацию о положении и ориентации такого повторяющегося мотива в оболочке вириона. Недостающие

аминокислотные остатки и боковые цепи были добавлены в структуру повторяющегося мотива с помощью программы PDBFixer (<https://github.com/openmm/pdbfixer>). Парциальные заряды на атомах были рассчитаны в соответствии с силовым полем AMBER99SB [Hornak et. al., 2006]. Энергия системы была минимизирована методом наискорейшего спуска. На основе повторяющихся мотивов были собраны белковые оболочки вирионов ZIKV и DENV (Рисунок 4.1.1). Е белок вируса Зика несет общий заряд –4, вируса денге – заряд +1.

#### **4.2. Взаимодействие метиленового синего с белками оболочки flaviviruses**

Все патогенные flaviviruses используют гликозаминонгликаны (ГАГ), присутствующие на поверхности клетки-хозяина, в качестве факторов прикрепления [Kim et. al., 2017]. В Е белке оболочки flaviviruses обычно выделяют три домена (DI, DII, DIII). ГАГ-связывающая петля соответствует аминокислотным остаткам LYS290–LYS316 (ZIKV) и LYS282–LYS308 (DENV) и находится на границе доменов DI и DIII. Эта область богата положительно заряженными остатками лизинов, что, по всей видимости, способствует электростатическим взаимодействиям ГАГ-связывающей петли с отрицательно заряженными сульфатированными ГАГ. В домене DI находится участок полипептидной цепи, который называют «гликановая петля». Этот участок включает аминокислотные остатки HIS144–ASN163 у вируса Зика и HIS144–GLN156 у вируса денге. Остатки ASP154 и ASP153 представляют сайт гликозилирования у вирусов Зика и денге, соответственно [Cheng et. al., 2022; Goo et. al., 2018].

Нами были проведены расчеты броуновской динамики взаимодействия молекул МС с белковой оболочкой flaviviruses ZIKV и DENV и получены 38500 и 29000 электростатических комплексов с энергией электростатического притяжения 3 kT, соответственно. Места электростатических контактов молекул

МС на поверхности оболочки вирионов образуют обособленные области (Рисунок 4.2.1). Наиболее характерные области притяжения молекул МС располагаются у вируса Зика на границе доменов DI и DIII в местах контактов трех мономеров Е белка (на границе синих и оранжевых областей), а в случае вируса денге – места схождения трех мономеров Е белка (оранжевые области) и пяти мономеров Е белка (синие области). Также на поверхности обоих вирусов присутствуют области контактов с молекулами МС на домене DII.

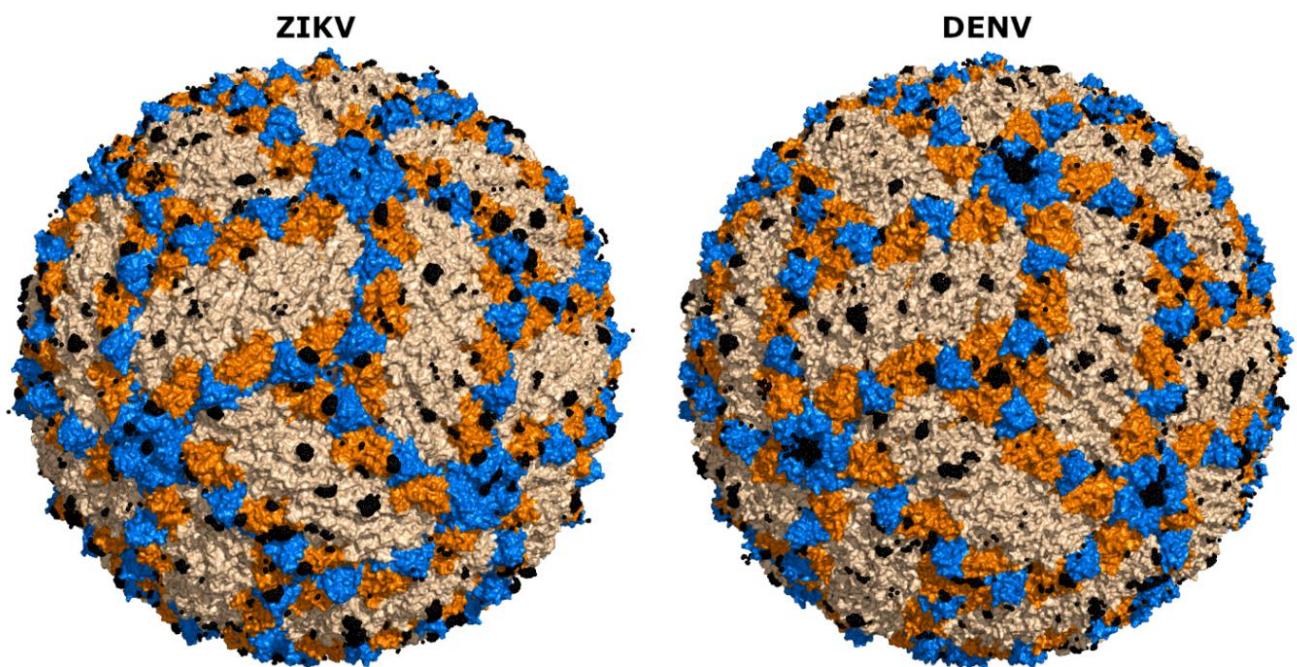


Рисунок 4.2.1. Электростатические комплексы молекул метиленового синего с белковой оболочкой вируса Зика (слева) и вируса денге (справа). Центры масс молекул метиленового синего (МС) представлены черными сферами.

Поверхность белковой оболочки вирусов окрашена в соответствии с доменной организацией Е белка (домен I – оранжевый, домен II – бежевый, домен III – синий).

Результаты анализа контактов молекул МС с аминокислотными остатками Е белков вирусов Зика и денге приведены на Рисунке 4.2.2. Видно, что в области

гликановой петли домена DI Е белка вируса Зика присутствуют многочисленные контакты МС с шестью аминокислотными остатками, а именно SER146, GLN147, HIS148, MET151, ASP161, GLU162. Также обращают на себя внимание многочисленные контакты МС с расположенными в домене DIII остатками THR366 и GLU367, и с участками GLU71–GLU87 и GLU230–THR233 в домене DII. Заметим, что на участке, содержащем ГАГ-петлю и ответственном за первичное узнавание клетки-хозяина (аминокислотные остатки LYS290–LYS316), контакты с МС малочисленны.

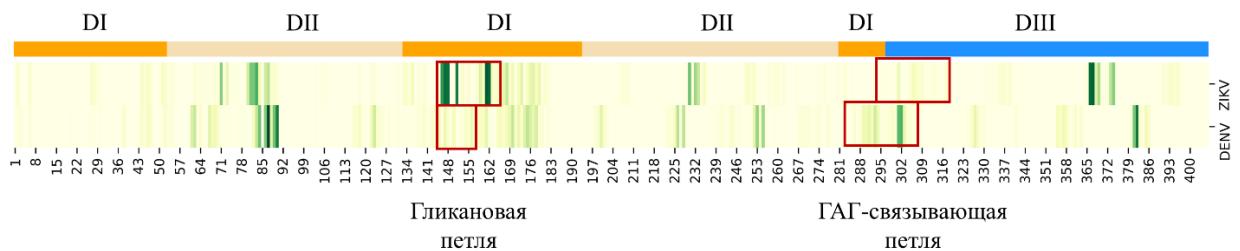


Рисунок 4.2.2. Аминокислотные остатки в первичных последовательностях вируса Зика (ZIKV) и вируса денге (DENV), окрашенные от светло-желтого до темно-зеленого в зависимости от относительного количества контактов с МС. Полоса сверху показывает доменную организацию Е белка (в соответствии с окраской на рис. 2). Красными рамками обозначены участки Е белка, соответствующие гликановой петле (остатки 144–163 для вируса Зика и 144–156 для вируса денге), и участки, соответствующие ГАГ-связывающей петле (остатки 290–316 для вируса Зика и 282–308 для вируса денге).

С областью гликановой петли домена DI Е белка вируса денге молекулы МС, напротив, контактируют слабо. Наибольшее число контактов наблюдается в домене DII на участке LEU82–TYR90, содержащем три отрицательно заряженных аминокислотных остатка GLU84, GLU85 и ASP87. В отличии от Е белка вируса Зика, в области ГАГ-связывающей петли Е белка вируса денге имеются многочисленные контакты МС с аминокислотными остатками THR301 и ASN302, а также с GLY381 и ASP382 в домене DIII.

Вторичная структура Е белка вируса Зика организована так, что гликановая

петля, содержащая отрицательно заряженные аминокислотными остатки ASP155, GLU159, ASP161 и GLU162, дополнительно окружена отрицательно заряженными остатками ASP42, GLU44, GLU329, ASP336, GLU367, GLU370, GLU377 (Рисунок 4.2.3.). Заметим, что остатки домена DIII THR366 и GLU367 имеют большое количество контактов с молекулами МС (Рисунок 4.2.2.). Таким образом, все перечисленные аминокислотные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот формируют обширную область отрицательного потенциала в области гликановой петли, электростатически притягивающую положительно заряженные молекулы МС.

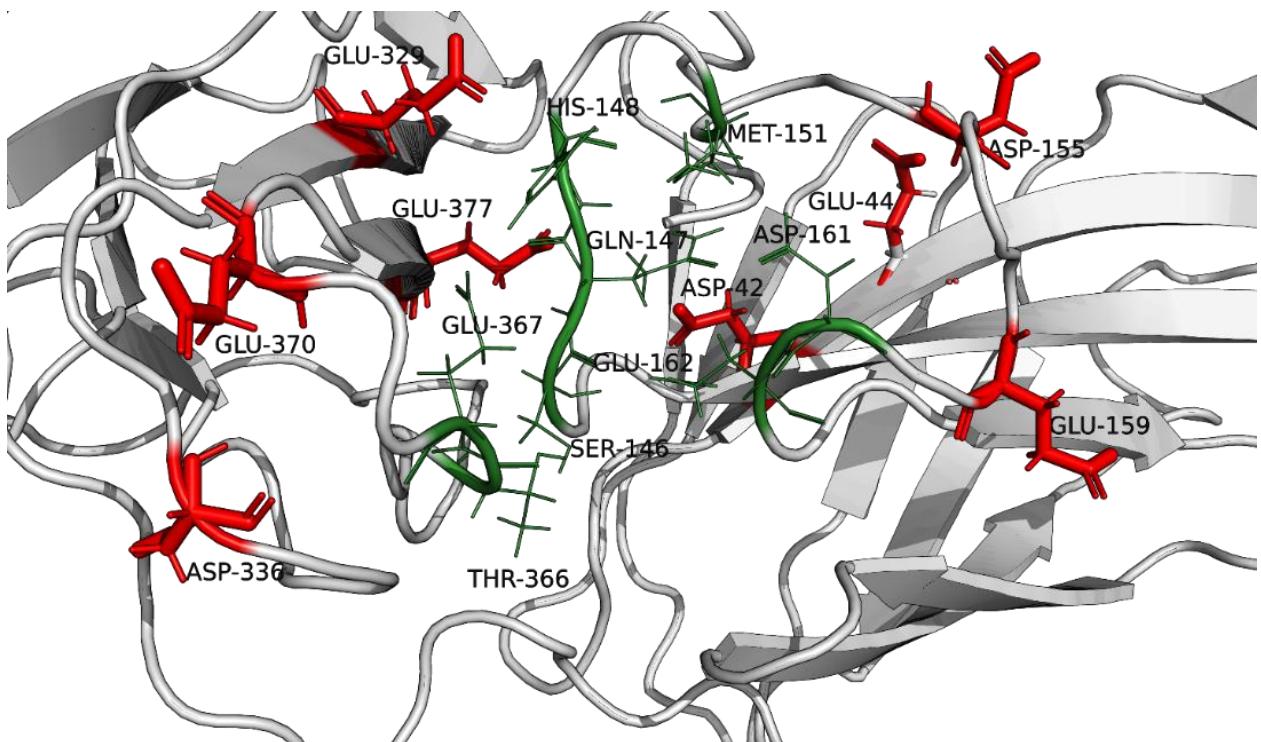


Рисунок 4.2.3. Участок Е белка вируса Зика, содержащий гликановую петлю. Аминокислотные остатки, имеющие наибольшее количество контактов с МС, показаны зеленым цветом (SER146, GLN147, HIS148, MET151, ASP161, GLU162, THR366, GLU367), окружающие их отрицательно заряженные аминокислотные остатки – красным цветом (ASP42, GLU44, ASP155, GLU159, GLU329, ASP336, GLU370, GLU377).

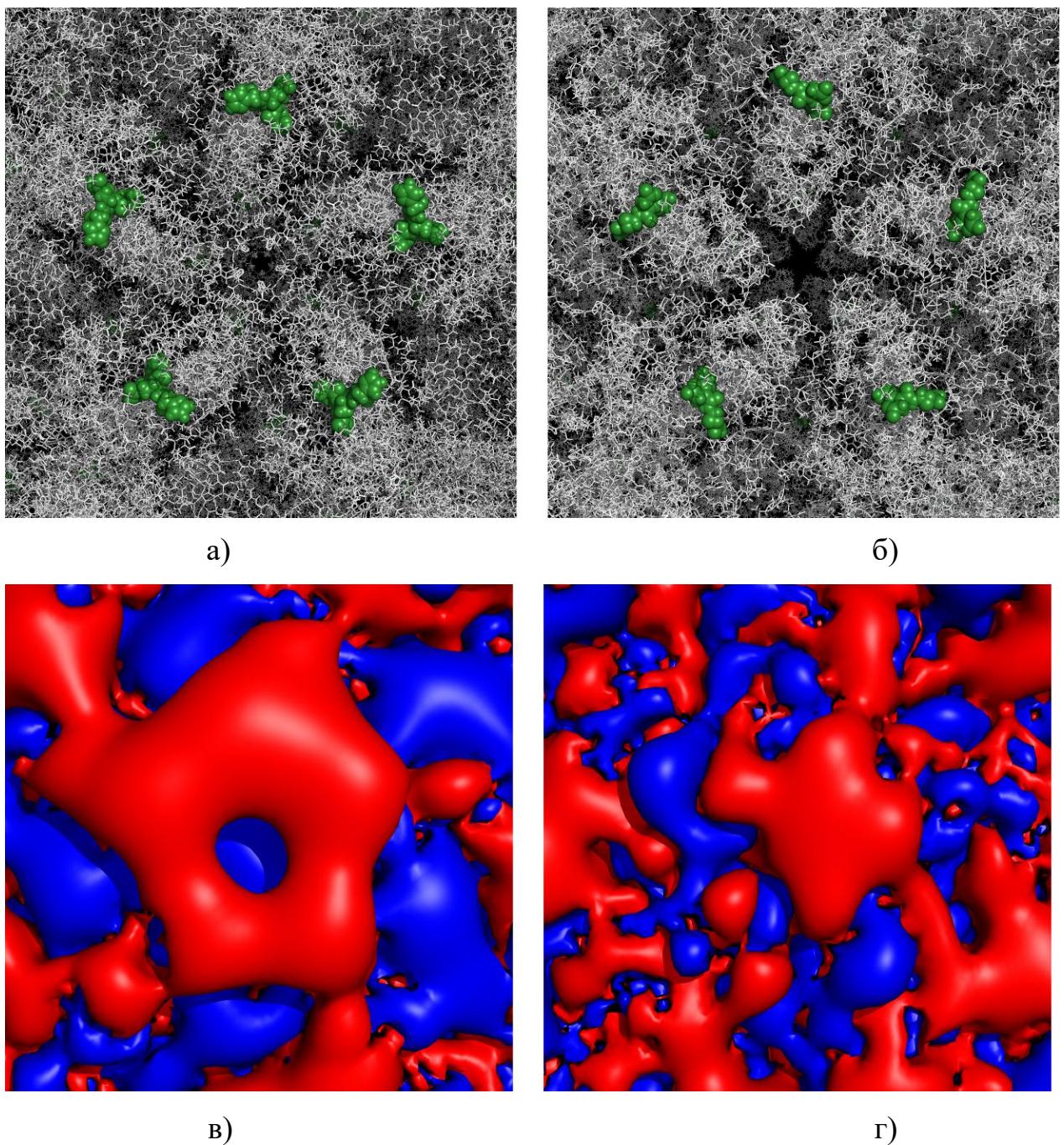


Рисунок 4.2.4. Области на поверхности белковых оболочек вируса Зика – а) и вируса денге – б), содержащие аминокислотные остатки гликановой петли.

Аминокислотные остатки Е белка вируса Зика, имеющие наибольшее количество контактов с МС, а также аналогичные остатки Е белка вируса денге окрашены в зеленый цвет. Эквипотенциальные электростатические поверхности, создаваемые электрическими зарядами оболочек вируса Зика – в) и вируса денге – г), в областях, соответствующих а) и б). Поверхность –10 мВ окрашена в красный цвет, а поверхность +10 мВ – в синий цвет.

Как видно из Рисунка 4.2.4., распределение электростатического потенциала в области гликановой петли у вируса Зика (а, в) и вируса денге (б, г) различается. Гликановая петля Е белка вируса Зика состоит из 15 аминокислотных остатков, в том числе четырех отрицательно заряженных остатков, в то время как гликановая петля вируса денге состоит из 13 остатков, лишь два из которых отрицательно заряжены (ASP147 и GLU154). Вместе с тем, отрицательно заряженный остаток GLU367 Е белка вируса Зика создает дополнительный отрицательный потенциал в области гликановой петли, тогда как у вируса денге в этой позиции находится положительно заряженный остаток лизина LYS358, следом за которым располагается одноименно заряженный остаток LYS359. Положительный потенциал, создаваемый этими остатками лизина, компенсирует отрицательный потенциал, создаваемый следующими за ними остатками GLU360 и GLU361. Таким образом, обширная область отрицательного потенциала, окружающая гликановую петлю Е белка вируса Зика эффективно притягивает молекулы МС (Рисунок 4.2.4. а, в), в то время как гликановая петля вируса денге закрыта от электростатических взаимодействий с молекулой МС областью положительного потенциала (Рисунок 4.2.4. б, г).

В отличии от Е белка вируса Зика, молекулы МС имеют значительное количество контактов с аминокислотными остатками, входящими в ГАГ-связывающую петлю Е белка вируса денге (см. Рисунок 4.2.2.). Аминокислотные остатки THR301 и ASN302, входящие в эту петлю, локализованы совместно с остатками GLY381 и ASP382. Большое количество контактов молекул МС в этой области обеспечивается отрицательно заряженными остатками GLU323, GLU327, ASP328, GLU360 и GLY381 (Рисунок 4.2.5.). В месте схождения пяти мономеров Е белка эти остатки создают кольцевую область отрицательного потенциала, обеспечивающую многочисленные контакты с МС (Рисунок 4.2.4. г).

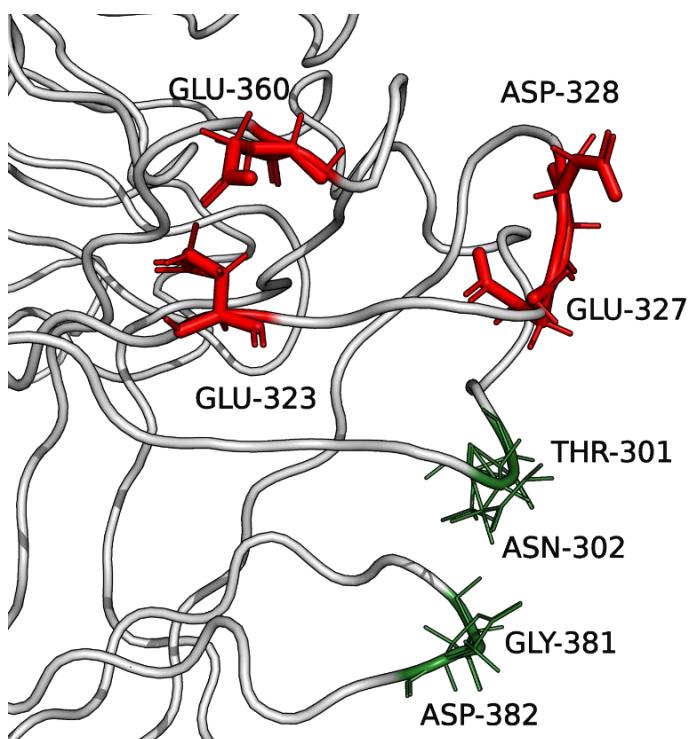


Рисунок 4.2.5. Участок домена DIII Е белка вируса денге, содержащий ГАГ-связывающую петлю. Аминокислотные остатки, имеющие наибольшее количество контактов с МС, показаны зеленым цветом (THR301, ASN302, GLY381, ASP382), окружающие их отрицательно заряженные аминокислотные остатки – красным цветом (GLU323, GLU327, ASP328, GLU360).

Первым этапом проникновения флавивирусов в клетку является связывание вириона с ее поверхностью за счет взаимодействия Е белка с факторами прикрепления. В качестве таких факторов выступают протеогликаны с сульфатированными боковыми цепями, ГАГ, которые создают отрицательный заряд гликокаликса. Гликозилированный Е белок может вступать в электростатические взаимодействия с ГАГ, способствуя прикреплению вирионов и последующему заражению клеток [Carbaugh, Lazear, 2020; Jolly C.L., Sattentau Q.J., 2013].

Методами мутационного анализа в белках оболочки флавивирусов ZIKV и DENV идентифицирована ГАГ-связывающая петля [Kim et. al., 2017], которая находится в переходной области между доменами DI и DIII (Рисунок 4.2.4.). Связывание малых молекул в областях Е белка, ответственных за первичное

узнавание клетки-хозяина, может создавать препятствия в процессах прикрепления вирусов к клетке, а, следовательно, приводить к снижению их инфекционности. Е белок флавивирусов также имеет консервативный сайт гликозилирования в области, называемой гликановой петлей [Cheng et. al., 2022]. Предполагается, что гликозилированный остаток аспарагина и окружающие его остатки петли могут напрямую влиять на доступность петли слияния в домене DII, способствуя слиянию мембран и проникновению вирусов в клетку [Goo et. al., 2018]. Ингибирование функций ГАГ-связывающей и гликановой петель Е белков флавивирусов является перспективной стратегией в противовирусной терапии.

## Заключение

В данной работе были идентифицированы вирусные структуры, которые могут выступать мишениями противовирусных препаратов, а также предложены антимикробные механизмы действия молекул метиленового синего на эти структуры, которые могут помочь в разработке новых малых молекул с противовирусными свойствами.

В результате проведения вычислительных экспериментов по броуновской динамике и расчета поля электростатического потенциала оболочек вирусов были выявлены основные молекулярные структуры на поверхности оболочки вириона SARS-CoV-2, которые способны связывать молекулы метиленового синего. К таким структурам относятся S белки, отрицательно заряженные липиды мембранны оболочки и виропорины. Благодаря использованию модели целого вириона нами был найден дополнительный сайт связывания молекул метиленового синего на HR2 домене S белка, расположенный возле трансмембранных домена около поверхности мембранны, который не был идентифицирован ранее.

Кроме того, было идентифицировано значительное связывание молекул метиленового синего с виропоринами. Виропорины являются ключевыми белками, высоко экспрессирующими внутри клетки и участвующими в сборке новых вирусных частиц на мембранах ERGIC. Благодаря важности их участия в этом процессе их рассматривают в качестве потенциальных мишеней для противовирусных препаратов. С применением метода зонтичного отбора проб был получен профиль потенциала средней силы прохождения молекулы метиленового синего через пору виропорина. Оценка минимальной энергии взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками внутри канала показала значение энергии равное  $-13,56$  кДж/моль. Было показано, что основной вклад в эту энергию вносят различного рода  $\pi$  взаимодействия с остатками фенилаланинов, наиболее значимые из которых  $\pi\text{-}\pi$  взаимодействия. Выявленные ключевые взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками E белка могут помочь в создании новых противовирусных препаратов, нацеленных на

виропорины.

На основании полученных результатов были выдвинуты возможные механизмы действия метиленового синего как при фотодинамической инактивации оболочечных вирусов, так и при его действии в темноте. Наличие сайта связывания метиленового синего на HR2 домене S белка может объяснить полную потерю шипов у вириона при фотодинамической инактивации коронавирусов. Опираясь на то, что молекулы метиленового синего могут проходить внутрь клетки, было выдвинуто предположение о его возможном ингибировании стадии формирования новых вирионов на мембранах ERGIC через блокирование каналов виропоринов. Благодаря рассчитанным профилям свободной энергии прохождения молекулы метиленового синего через мембрану и через канал виропорина можно предположить, что виропорины облегчают прохождение молекул метиленового синего внутрь вириона, где он опосредует фотодинамическое разрушение вирусной РНК.

Метод броуновской динамики позволяет проанализировать начальные стадии взаимодействия заряженных молекул антимикробных соединений со структурными компонентами целых вирусных оболочек и выявить области электростатических контактов с разрешением конкретных аминокислотных остатков, участвующих в таких взаимодействиях. Применение метода броуновской динамики к изучению взаимодействия молекул метиленового синего с белковыми оболочками flavивирусов позволило выявить особенности взаимодействия этих молекул с оболочками вируса Зика и вируса денге, и теоретически обосновать известное ингибирующее действие метиленового синего на первые стадии жизненного цикла оболочечных вирусов, включающие первичное узнавание поверхности клетки-хозяина и слияние мембран. Полученные результаты указывают на перспективу дальнейших экспериментальных исследований потенциала метиленового синего в качестве противовирусного препарата.

Проведение вычислительных экспериментов с использованием молекулярных пространственных моделей масштаба целого вириона представляется эффективным подходом при поиске молекул с противовирусными

свойствами, а также при поиске мишней, на которые могут быть нацелены эти молекулы.

## Выводы

На основании проведенных исследований и полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Электростатическое потенциальное поле оболочек коронавирусов и флавивирусов сильно неоднородно и состоит из чередующихся областей положительного и отрицательного заряда на белках и липидах мембранны оболочки вирионов.
2. Методом броуновской динамики найдены обособленные области электростатических контактов метиленового синего с S белками, E белками и отрицательно заряженными липидами коронавируса, а также E белками флавивирусов.
3. На S белки оболочки коронавируса, которые обеспечивают связывание вируса с клеточными рецепторами и слияние мембран, приходится более половины электростатических контактов с молекулами метиленового синего. Основные из них расположены между HR1 и HR2 доменами в месте сочленения «головы» и «ножки» шипа и на HR2 домене на границе с трансмембранным доменом.
4. В белке оболочки вируса Зика область отрицательного потенциала, окружающая гликановую петлю, которая участвует в процессе слияния мембран при заражении вирусом клеток, эффективно притягивает молекулы метиленового синего. Гликановая петля белка оболочки вируса денге закрыта от электростатических взаимодействий с молекулами метиленового синего областью положительного потенциала.
5. Метиленовый синий образует значительное количество контактов с петлей белка оболочки вируса денге, опосредующей первичное узнавание гликозамингликанов при связывании вирусов с клетками.

6. На пути проникновения положительно заряженных молекул метиленового синего через мембрану коронавируса наблюдается высокий энергетический барьер +37,8 кДж/моль в середине фосфолипидного бислоя.
7. При транслокации метиленового синего через канал виропорина коронавируса наблюдается пять локальных минимумов энергии, наименьший из которых находится в центре канала и составляет –13,6 кДж/моль. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки глутаминовой кислоты Е белка обеспечивают электростатическое притяжение молекул метиленового синего ко входу в пентамерный канал – виропорин. В канале виропорина глобальный минимум энергии достигается за счет многочисленных  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий метиленового синего с 15 остатками фенилаланина.

## Список сокращений

МС – метиленовый синий

МД – молекулярная динамика

ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент два

COVID-19 — коронавирусное заболевание 2019 года (от англ. coronavirus disease 2019)

CDL2 – кардиолипин

CHOL – холестерин

CTD – С-терминальный домен

FP – белок слияния

HR1 – гептадный повтор 1

HR2 – гептадный повтор 2

MERS-CoV – Middle East respiratory syndrome-related Coronavirus (пер. коронавирус ближневосточного респираторного синдрома)

NTD – N-терминальный домен

POPC – 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин

POPE – 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин

POPI – 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилинозитол

POPS – 1-пальмитоил-2-олеоил фосфатидилсерин

RBD – рецептор-связывающий домен (англ. receptor building domain)

RMSD – минимальное среднеквадратичное отклонение положений атомов в двух трехмерных структурах при их наилучшем выравнивании

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome-related Coronavirus 2 (пер. вирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 типа)

SARS-CoV – severe acute respiratory syndrome-related Coronavirus (пер. вирус тяжелого острого респираторного синдрома)

TMD – трансмембранный домен

ZnPcChol<sup>8+</sup> – октакис(холинил)фталоцианин цинка

Для обозначения аминокислотных остатков в работе используются трехбуквенные

и однобуквенные обозначения в соответствии с номенклатурой Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) [A one-letter notation for amino acid sequences (definitive rules), 1972]:

Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lis	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Tpr	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

## Список литературы

1. Tribello G. A. et al. PLUMED 2: New feathers for an old bird // Comput. Phys. Commun. 2014. Т. 185. № 2. С. 604–613.
2. DeLano W. The PyMOL Molecular Graphics System.
3. Васюченко Е. П. и др. Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с виропорином коронавируса SARS-CoV-2 // Вестник Московского Университета Серия 16 Биология. 2025. Т. 80. № 2.
4. Шайтан К. В. Молекулярная динамика биополимеров // Проблемы регуляции в биологических системах/Под общей ред. АБ Рубина. –М.-Ижевск: НИЦ Регулярная и хаотическая динамика. 2006.
5. Abramson J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // Nature. 2024. Т. 630. № 8016. С. 493–500.
6. Adelusi T. I. et al. Molecular modeling in drug discovery // Inform. Med. Unlocked. 2022a. Т. 29. С. 100880.
7. Adelusi T. I. et al. Molecular modeling in drug discovery // Inform. Med. Unlocked. 2022b. Т. 29. С. 100880.
8. Alharbi R. A. Structure insights of SARS-CoV-2 open state envelope protein and inhibiting through active phytochemical of ayurvedic medicinal plants from *Withania somnifera* // Saudi J. Biol. Sci. 2021. Т. 28. № 6. С. 3594–3601.
9. Almeida A., Faustino M. A. F., Neves M. G. P. M. S. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Control of COVID-19 // Antibiotics. 2020. Т. 9. № 6. С. 320.
10. Alsaadi E. A. J., Neuman B. W., Jones I. M. Identification of a Membrane Binding Peptide in the Envelope Protein of MHV Coronavirus // Viruses. 2020. Т. 12. № 9. С. 1054.
11. Artese A. et al. Current status of antivirals and druggable targets of SARS CoV-2 and other human pathogenic coronaviruses // Drug Resist. Updat. 2020. Т. 53. С. 100721.
12. Bachmann B. et al. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light // J. Med. Virol. 1995. Т. 47. № 2. С. 172–178.
13. Bai Z. et al. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure,

- Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation // Viruses. 2021. T. 13. № 6. C. 1115.
14. Barducci A., Bonomi M., Parrinello M. Metadynamics // WIREs Comput. Mol. Sci. 2011. T. 1. № 5. C. 826–843.
  15. Berendsen H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath // J. Chem. Phys. 1984. T. 81. № 8. C. 3684–3690.
  16. Bergmann C. C., Silverman R. H. COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies // Cleve. Clin. J. Med. 2020. T. 87. № 6. C. 321–327.
  17. Bhagat R., Kaur G., Seth P. Molecular mechanisms of zika virus pathogenesis: An update // Indian J. Med. Res. 2021. T. 154. № 3. C. 433–445.
  18. Bhowmik D. et al. Identification of potential inhibitors against SARS-CoV-2 by targeting proteins responsible for envelope formation and virion assembly using docking based virtual screening, and pharmacokinetics approaches // Infect. Genet. Evol. 2020. T. 84. C. 104451.
  19. Bojadzic D., Alcazar O., Buchwald P. Methylene Blue Inhibits the SARS-CoV-2 Spike–ACE2 Protein-Protein Interaction—a Mechanism that can Contribute to its Antiviral Activity Against COVID-19 // Front. Pharmacol. 2021. T. 11. C. 600372.
  20. Bonneau R. et al. pH DEPENDENCE OF SINGLET OXYGEN PRODUCTION IN AQUEOUS SOLUTIONS USING THIAZINE DYES AS PHOTOSENSITIZERS // Photochem. Photobiol. 1975. T. 21. № 3. C. 159–163.
  21. Borkotoky S., Banerjee M. A computational prediction of SARS-CoV-2 structural protein inhibitors from *Azadirachta indica* (Neem) // J. Biomol. Struct. Dyn. 2021. T. 39. № 11. C. 4111–4121.
  22. Bosoy D. et al. Utilization of methylene blue in the setting of hypotension associated with concurrent renal and hepatic failure: A concise review // Int. J. Acad. Med. 2017. T. 3. № 3. C. 101.
  23. Bowman G. R., Ensign D. L., Pande V. S. Enhanced Modeling via Network Theory: Adaptive Sampling of Markov State Models // J. Chem. Theory Comput. 2010. T. 6. № 3. C. 787–794.
  24. Breitinger U. et al. Inhibition of SARS CoV Envelope Protein by Flavonoids and

- Classical Viroporin Inhibitors // *Front. Microbiol.* 2021. T. 12. C. 692423.
- 25. Breitinger U. et al. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2 // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2022. T. 145. C. 106185.
  - 26. Bruchey A. K., Gonzalez-L F. Behavioral, Physiological and Biochemical Hormetic Responses to the Autoxidizable Dye Methylene Blue // *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 2008. T. 3. № 1. C. 72–79.
  - 27. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // *J. Chem. Phys.* 2007. T. 126. № 1. C. 014101.
  - 28. Cabrera-Garcia D. et al. The envelope protein of SARS-CoV-2 increases intra-Golgi pH and forms a cation channel that is regulated by pH // *J. Physiol.* 2021. T. 599. № 11. C. 2851–2868.
  - 29. Cagno V. et al. Methylene Blue has a potent antiviral activity against SARS-CoV-2 and H1N1 influenza virus in the absence of UV-activation in vitro // *Sci. Rep.* 2021. T. 11. № 1. C. 14295.
  - 30. Cao Y. et al. Computational Study of the Ion and Water Permeation and Transport Mechanisms of the SARS-CoV-2 Pentameric E Protein Channel // *Front. Mol. Biosci.* 2020. T. 7.
  - 31. Cao Y. et al. Characterization of the SARS-CoV -2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors // *Protein Sci.* 2021. T. 30. № 6. C. 1114–1130.
  - 32. Cao Y. et al. Probing the formation, structure and free energy relationships of M protein dimers of SARS-CoV-2 // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. T. 20. C. 573–582.
  - 33. Carbaugh D. L., Lazear H. M. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis // *J. Virol.* 2020. T. 94. № 11. C. e00104-20.
  - 34. Casares D., Escribá P. V., Rosselló C. A. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. T. 20. № 9. C. 2167.
  - 35. Chen Y.-M. et al. Repurposing dye ligands as antivirals via a docking approach on viral membrane and globular proteins – SARS-CoV-2 and HPV-16 // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2024. T. 1866. № 1. C. 184220.

36. Cheng M.-L. et al. Pathogenicity and Structural Basis of Zika Variants with Glycan Loop Deletions in the Envelope Protein // *J. Virol.* 2022. T. 96. № 23. C. e00879-22.
37. Collins L. T. et al. Elucidation of SARS-CoV-2 Budding Mechanisms through Molecular Dynamics Simulations of M and E Protein Complexes // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. T. 12. № 51. C. 12249–12255.
38. Cwalinski T. et al. Methylene Blue—Current Knowledge, Fluorescent Properties, and Its Future Use // *J. Clin. Med.* 2020. T. 9. № 11. C. 3538.
39. De Groot R. J. et al. Commentary: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group // *J. Virol.* 2013. T. 87. № 14. C. 7790–7792.
40. DeDiego M. L. et al. A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo // *J. Virol.* 2007. T. 81. № 4. C. 1701–1713.
41. Dey D., Borkotoky S., Banerjee M. In silico identification of Tretinoin as a SARS-CoV-2 envelope (E) protein ion channel inhibitor // *Comput. Biol. Med.* 2020. T. 127. C. 104063.
42. Dias L. D., Blanco K. C., Bagnato V. S. COVID-19: Beyond the virus. The use of photodynamic therapy for the treatment of infections in the respiratory tract // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2020. T. 31. C. 101804.
43. Diller D. J., Merz K. M. High throughput docking for library design and library prioritization // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2001. T. 43. № 2. C. 113–124.
44. Dudley N. E. Methylene Blue for Rapid Identification of the Parathyroids // *BMJ.* 1971. T. 3. № 5776. C. 680–681.
45. Eickmann M. et al. Inactivation of Ebola virus and Middle East respiratory syndrome coronavirus in platelet concentrates and plasma by ultraviolet C light and methylene blue plus visible light, respectively // *Transfusion (Paris).* 2018. T. 58. № 9. C. 2202–2207.
46. Eickmann M. et al. Inactivation of three emerging viruses – severe acute respiratory syndrome coronavirus, Crimean–Congo haemorrhagic fever virus and Nipah virus – in platelet concentrates by ultraviolet C light and in plasma by methylene blue plus

- visible light // Vox Sang. 2020. T. 115. № 3. C. 146–151.
47. El Omari K. et al. The structure of a prokaryotic viral envelope protein expands the landscape of membrane fusion proteins // Nat. Commun. 2019. T. 10. № 1. C. 846.
  48. Empereur-Mot C. et al. *Swarm-CG*: Automatic Parametrization of Bonded Terms in MARTINI-Based Coarse-Grained Models of Simple to Complex Molecules via Fuzzy Self-Tuning Particle Swarm Optimization // ACS Omega. 2020. T. 5. № 50. C. 32823–32843.
  49. Ermak D. L., McCammon J. A. Brownian dynamics with hydrodynamic interactions // J. Chem. Phys. 1978. T. 69. № 4. C. 1352–1360.
  50. Fatima S. W., Alam S., Khare S. K. Molecular and structural insights of  $\beta$ -boswellic acid and glycyrrhizic acid as potent SARS-CoV-2 Envelope protein inhibitors // Phytomedicine Plus. 2022. T. 2. № 2. C. 100241.
  51. Fedorov V. et al. What Binds Cationic Photosensitizers Better: Brownian Dynamics Reveals Key Interaction Sites on Spike Proteins of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 // Viruses. 2021. T. 13. № 8. C. 1615.
  52. Fedorov V. et al. Electrostatic Map of the SARS-CoV-2 Virion Specifies Binding Sites of the Antiviral Cationic Photosensitizer // Int. J. Mol. Sci. 2022. T. 23. № 13. C. 7304.
  53. Fedorov V. A. et al. Comparative analysis of plastocyanin–cytochrome *f* complex formation in higher plants, green algae and cyanobacteria // Physiol. Plant. 2019. T. 166. № 1. C. 320–335.
  54. Feng S. et al. CHARMM-GUI *Membrane Builder*: Past, Current, and Future Developments and Applications // J. Chem. Theory Comput. 2023. T. 19. № 8. C. 2161–2185.
  55. Fibriansah G. et al. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins // Nat. Commun. 2015. T. 6. № 1. C. 6341.
  56. Fischer F. et al. Analysis of Constructed E Gene Mutants of Mouse Hepatitis Virus Confirms a Pivotal Role for E Protein in Coronavirus Assembly // J. Virol. 1998. T. 72. № 10. C. 7885–7894.
  57. Floyd R. A., Schneider J. E., Dittmer D. P. Methylene blue photoinactivation of RNA

- viruses // Antiviral Res. 2004. T. 61. № 3. C. 141–151.
58. Fogolari F., Brigo A., Molinari H. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology // J. Mol. Recognit. 2002. T. 15. № 6. C. 377–392.
59. Gendrot M. et al. Methylene blue inhibits replication of SARS-CoV-2 in vitro // Int. J. Antimicrob. Agents. 2020. T. 56. № 6. C. 106202.
60. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities // Expert Opin. Drug Discov. 2015. T. 10. № 5. C. 449–461.
61. Georgiou K., Kolokouris D., Kolocouris A. Molecular biophysics and inhibition mechanism of influenza virus A M2 viroporin by adamantane-based drugs – Challenges in designing antiviral agents // J. Struct. Biol. X. 2025. T. 11. C. 100122.
62. Ghosh S. et al.  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway // Cell. 2020. T. 183. № 6. C. 1520–1535.e14.
63. Ginimuge P., Jyothi S. Methylene blue: Revisited // J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 2010. T. 26. № 4. C. 517.
64. Golla V. K., Prajapati J. D., Kleinekathöfer U. Millisecond-Long Simulations of Antibiotics Transport through Outer Membrane Channels // J. Chem. Theory Comput. 2021. T. 17. № 1. C. 549–559.
65. Gomes Da Silva P. и др. Serological Cross-Reactivity in Zoonotic Flaviviral Infections of Medical Importance // Antibodies. 2023. T. 12. № 1. C. 18.
66. Goo L. et al. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity // Virology. 2018. T. 515. C. 191–202.
67. Gowers R. et al. MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. Austin, Texas: 2016. C. 98–105.
68. Grossfield A. An implementation of WHAM: the Weighted Histogram Analysis Method Version 2.0.10 // 2014.
69. Gunsteren W. F. van. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide.: Biomos; Zürich, 1996.
70. Gupta S. et al. Identification of potential natural inhibitors of SARS-CoV2 main protease by molecular docking and simulation studies // J. Biomol. Struct. Dyn. 2021.

- T. 39. № 12. C. 4334–4345.
71. Gürsel S. A. et al. Radiation-Grafted Membranes Using a Trifluorostyrene Derivative // J. Electrochem. Soc. 2006. T. 153. № 10. C. A1964.
  72. Guy R. K. et al. Rapid repurposing of drugs for COVID-19 // Science. 2020. T. 368. № 6493. C. 829–830.
  73. Hasan S. S. et. al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses // Nat. Struct. Mol. Biol. 2018. T. 25. № 1. C. 13–20.
  74. Heinz F. X., Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure // J. Clin. Virol. 2012. T. 55. № 4. C. 289–295.
  75. Hemdan S. S. The Shift in the Behavior of Methylene Blue Toward the Sensitivity of Medium: Solvatochromism, Solvent Parameters, Regression Analysis and Investigation of Cosolvent on the Acidity Constants // J. Fluoresc. 2023. T. 33. № 6. C. 2489–2502.
  76. Heo L., Feig M. Modeling of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Proteins by Machine Learning and Physics-Based Refinement // 2020.
  77. Hockney R. W., Eastwood J. W. Computer Simulation Using Particles. New York: 1981. Вып. McGraw-Hill.
  78. Hoffmann M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor // Cell. 2020. T. 181. № 2. C. 271–280.e8.
  79. Hoover W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions // Phys. Rev. A. 1985. T. 31. № 3. C. 1695–1697.
  80. Hornak V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 2006. T. 65. № 3. C. 712–725.
  81. Hu X. et al. Discovery of TMPRSS2 Inhibitors from Virtual Screening as a Potential Treatment of COVID-19 // ACS Pharmacol. Transl. Sci. 2021. T. 4. № 3. C. 1124–1135.
  82. Ileri Ercan N. et al. Molecular Dynamics Modeling of Methylene Blue–DOPC Lipid

- Bilayer Interactions // Langmuir. 2018. T. 34. № 14. C. 4314–4323.
83. Irwin J. J., Shoichet B. K. ZINC- A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening // 2004.
  84. Jakalian A., Jack D. B., Bayly C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation // J. Comput. Chem. 2002. T. 23. № 16. C. 1623–1641.
  85. Jin Z. et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors // Nature. 2020. T. 582. № 7811. C. 289–293.
  86. Jo S., Kim T., Im W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations // PLoS ONE. 2007. T. 2. № 9. C. e880.
  87. Jones J. On the determination of molecular fields. —II. From the equation of state of a gas // Proc. R. Soc. Lond. Ser. Contain. Pap. Math. Phys. Character. 1924. T. 106. № 738. C. 463–477.
  88. Kaufmann B., Rossmann M. G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry // Microbes Infect. 2011. T. 13. № 1. C. 1–9.
  89. Kelly J. M., Van Der Putten W. J. M., Mcconnell D. J. LASER FLASH SPECTROSCOPY OF METHYLENE BLUE WITH NUCLEIC ACIDS // Photochem. Photobiol. 1987. T. 45. № 2. C. 167–175.
  90. Khan I. et al. Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation // Water. 2022. T. 14. № 2. C. 242.
  91. Kholina E. G., Kovalenko I. B., Strakhovskaya M. G. Investigation of Porin-Dependent Translocation of Methylene Blue and Gentamicin through the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria Using Molecular Dynamics Methods // Math. Biol. Bioinforma. 2025. T. 20. № 1. C. 71–82.
  92. Khruschev S. S. et al. Multi-particle Brownian Dynamics software ProKSim for protein-protein interactions modeling // Comput. Res. Model. 2013. T. 5. № 1. C. 47–64.
  93. Kim S. et al. PubChem 2023 update // Nucleic Acids Res. 2023. T. 51. № D1. C. D1373–D1380.

94. Kim S. Y. et al. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans // *Biochemistry*. 2017. T. 56. № 8. C. 1151–1162.
95. Kiriiri G. K., Njogu P. M., Mwangi A. N. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review // *Future J. Pharm. Sci.* 2020. T. 6. № 1.
96. Knox C. et al. DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024 // *Nucleic Acids Res.* 2024. T. 52. № D1. C. D1265–D1275.
97. Kovalenko I. et al. Interaction of Methylene Blue with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Envelope Revealed by Molecular Modeling // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. T. 24. № 21. C. 15909.
98. Kumar S. et al. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method // *J. Comput. Chem.* 1992. T. 13. № 8. C. 1011–1021.
99. Kuntz I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions // *J. Mol. Biol.* 1982. T. 161. № 2. C. 269–288.
100. Kuzmin A. et al. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2022. T. 90. № 5. C. 1102–1114.
101. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins // *Annu. Rev. Virol.* 2016. T. 3. № 1. C. 237–261.
102. Li Z. et al. Methylene blue is a potent and broad-spectrum inhibitor against Zika virus *in vitro* and *in vivo* // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. T. 9. № 1. C. 2404–2416.
103. Liao Y. et al. Expression of SARS-coronavirus envelope protein in Escherichia coli cells alters membrane permeability // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. T. 325. № 1. C. 374–380.
104. Liao Y. et al. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein // *Virology*. 2006. T. 349. № 2. C. 264–275.
105. Lindorff-Larsen K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2010. T. 78. № 8. C. 1950–1958.

106. Liu D. X. et al. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses // Antiviral Res. 2014. T. 109. C. 97–109.
107. Lu G. et al. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: a systematic review // BMC Med. 2018. T. 16. № 1. C. 59.
108. Lu W. et al. severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release // Proc. Natl. Acad. Sci. 2006. T. 103. № 33. C. 12540–12545.
109. Luger P. et al. Charge density studies on methylene blue – a potential anti-Alzheimer agent // Z. Für Naturforschung B. 2018. T. 73. № 2. C. 99–108.
110. Luty B. A., El Amrani S., McCammon J. A. Simulation of the bimolecular reaction between superoxide and superoxide dismutase: synthesis of the encounter and reaction steps // J. Am. Chem. Soc. 1993. T. 115. № 25. C. 11874–11877.
111. Mahtarin R. et al. Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2 // J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. T. 40. № 10. C. 4725–4738.
112. Malde A. K. et al. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0 // J. Chem. Theory Comput. 2011. T. 7. № 12. C. 4026–4037.
113. Mandala V. S. et al. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers // Nat. Struct. Mol. Biol. 2020. T. 27. № 12. C. 1202–1208.
114. Martines R. B. et al. Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States // Emerg. Infect. Dis. 2020. T. 26. № 9. C. 2005–2015.
115. Medeiros-Silva J. et al. atomic structure of the open SARS-CoV-2 E viroporin // Sci. Adv. 2023. T. 9. № 41. C. eadi9007.
116. Mehregan A. et al. Probing effects of the SARS-CoV-2 E protein on membrane curvature and intracellular calcium // Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2022. T. 1864. № 10. C. 183994.
117. Miura K. et al. Distinct motifs in the E protein are required for SARS-CoV-2 virus particle formation and lysosomal deacidification in host cells // J. Virol. 2023. T. 97. № 10. C. e00426-23.

118. Mondal S., De Anda Reyes Ma. E., Pal U. Plasmon induced enhanced photocatalytic activity of gold loaded hydroxyapatite nanoparticles for methylene blue degradation under visible light // RSC Adv. 2017. T. 7. № 14. C. 8633–8645.
119. Monje-Galvan V., Voth G. A. Molecular interactions of the M and E integral membrane proteins of SARS-CoV-2 // Faraday Discuss. 2021. T. 232. C. 49–67.
120. Motiejunas D. et al. Protein–protein docking by simulating the process of association subject to biochemical constraints // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 2008. T. 71. № 4. C. 1955–1969.
121. Mukherjee S., Harikishore A., Bhunia A. Targeting C-terminal Helical bundle of NCOVID19 Envelope (E) protein // Int. J. Biol. Macromol. 2021. T. 175. C. 131–139.
122. Muñiz-Chicharro A. et al. Brownian dynamics simulations of biomolecular diffusional association processes // WIREs Comput. Mol. Sci. 2023. T. 13. № 3. C. e1649.
123. Naqvi A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach // Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. 2020. T. 1866. № 10. C. 165878.
124. Neuman B. W. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology // J. Struct. Biol. 2011. T. 174. № 1. C. 11–22.
125. Nguyen J. Q. M. et al. Development of a modular fluorescence overlay tissue imaging system for wide-field intraoperative surgical guidance // J. Med. Imaging. 2018. T. 5. № 02. C. 1.
126. Nieto-Torres J. L. et al. severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome // Virology. 2015. T. 485. C. 330–339.
127. Nosé S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble // Mol. Phys. 2002. T. 100. № 1. C. 191–198.
128. Orekhov P. S. et al. Molecular Mechanism of Uptake of Cationic Photoantimicrobial Phthalocyanine across Bacterial Membranes Revealed by Molecular Dynamics Simulations // J. Phys. Chem. B. 2018. T. 122. № 14. C. 3711–3722.

129. Orfali R. et al. Sinapic Acid Suppresses SARS CoV-2 Replication by Targeting Its Envelope Protein // Antibiotics. 2021. T. 10. № 4. C. 420.
130. Ou X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV // Nat. Commun. 2020. T. 11. № 1. C. 1620.
131. Pál S. et al. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS // J. Chem. Phys. 2020. T. 153. № 13. C. 134110.
132. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method // J. Appl. Phys. 1981. T. 52. № 12. C. 7182–7190.
133. Peiris J. S. M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory // 2003.
134. Perrin F. Mouvement Brownien d'un ellipsoïde (II). Rotation libre et dépolarisation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoidales // J. Phys. Radium. 1936. T. 7. № 1. C. 1–11.
135. Pervushin K. et al. Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel // PLoS Pathog. 2009. T. 5. № 7. C. e1000511.
136. Pezeshkian W. et al. Molecular architecture and dynamics of SARS-CoV-2 envelope by integrative modeling // Structure. 2023. T. 31. № 4. C. 492–503.e7.
137. Pham V. L., Kim D.-G., Ko S.-O. Mechanisms of Methylene Blue Degradation by Nano-Sized  $\beta$ -MnO<sub>2</sub> Particles // KSCE J. Civ. Eng. 2020. T. 24. № 5. C. 1385–1394.
138. Poggio E. et al. Perturbation of the host cell Ca<sup>2+</sup> homeostasis and ER-mitochondria contact sites by the SARS-CoV-2 structural proteins E and M // Cell Death Dis. 2023. T. 14. № 4. C. 297.
139. Pöhlmann S. Viral Entry into Host Cells. New York, NY: Springer New York, 2013. Вып. 1st ed. 1 c.
140. Preiser J. et al. Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. // Crit. Care Med. 1995. T. 23. № 2. C. 259–264.
141. Ravi V., Saxena S., Panda P. S. Basic virology of SARS-CoV 2 // Indian J. Med. Microbiol. 2022. T. 40. № 2. C. 182–186.
142. Redmond R. W., Kochevar I. E. Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Invited Review

- // Photochem. Photobiol. 2006. T. 82. № 5. C. 1178–1186.
143. Rosado C., Rodrigues L. M. Solvent effects in permeation assessed in vivo by skin surface biopsy // BMC Dermatol. 2003. T. 3. № 1. C. 5.
144. Ruch T. R., Machamer C. E. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond // Viruses. 2012. T. 4. № 3. C. 363–382.
145. Sadiq S. K. et al. Multiscale Approach for Computing Gated Ligand Binding from Molecular Dynamics and Brownian Dynamics Simulations // J. Chem. Theory Comput. 2021. T. 17. № 12. C. 7912–7929.
146. Saha B. et al. Comparative Study of Toluidine Blue O and Methylene Blue Binding to Lysozyme and Their Inhibitory Effects on Protein Aggregation // ACS Omega. 2018. T. 3. № 3. C. 2588–2601.
147. Salimi A., Roosta A. Experimental solubility and thermodynamic aspects of methylene blue in different solvents // Thermochim. Acta. 2019. T. 675. C. 134–139.
148. Santos-Mendoza T. The Envelope (E) Protein of SARS-CoV-2 as a Pharmacological Target // Viruses. 2023. T. 15. № 4. C. 1000.
149. Sarkar M., Saha S. Structural insight into the role of novel SARS-CoV-2 E protein: A potential target for vaccine development and other therapeutic strategies // PLOS ONE. 2020. T. 15. № 8. C. e0237300.
150. Satarker S., Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 // Arch. Med. Res. 2020. T. 51. № 6. C. 482–491.
151. Saud Z. et al. The SARS-CoV2 envelope differs from host cells, exposes procoagulant lipids, and is disrupted in vivo by oral rinses // J. Lipid Res. 2022. T. 63. № 6. C. 100208.
152. Schenk P. et al. Methylene Blue Improves the Hepatopulmonary Syndrome.
153. Schirmer R. H. et al. Methylene blue as an antimalarial agent // Redox Rep. 2003. T. 8. № 5. C. 272–275.
154. Schoeman D., Fielding B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge // Virol. J. 2019. T. 16. № 1. C. 69.
155. Scott C., Griffin S. Viroporins: structure, function and potential as antiviral targets // J. Gen. Virol. 2015. T. 96. № 8. C. 2000–2027.

156. Seghatchian J., Struff W. G., Reichenberg S. Main Properties of the THERAFLEX MB-Plasma System for Pathogen Reduction // *Transfus. Med. Hemotherapy.* 2011. T. 38. № 1. C. 55–64.
157. Shepley-McTaggart A. et al. SARS-CoV-2 Envelope (E) protein interacts with PDZ-domain-2 of host tight junction protein ZO1 // *PLOS ONE.* 2021. T. 16. № 6. C. e0251955.
158. Simon M. et al. Surfactants – Compounds for inactivation of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2021. T. 55. C. 101479.
159. Sirohi D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus // *Science.* 2016. T. 352. № 6284. C. 467–470.
160. Siu Y. L. et al. The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles // *J. Virol.* 2008. T. 82. № 22. C. 11318–11330.
161. Smart O. S., Goodfellow J. M., Wallace B. A. The pore dimensions of gramicidin A // *Biophys. J.* 1993. T. 65. № 6. C. 2455–2460.
162. Snijder E. J. et al. Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex // *J. Virol.* 2006. T. 80. № 12. C. 5927–5940.
163. Souza P. C. T. et al. Martini 3: a general-purpose force field for coarse-grained molecular dynamics // *Nat. Methods.* 2021. T. 18. № 4. C. 382–388.
164. Srinivasan S. et al. Structural Genomics of SARS-CoV-2 Indicates Evolutionary Conserved Functional Regions of Viral Proteins // *Viruses.* 2020. T. 12. № 4. C. 360.
165. Steiner S. et al. SARS-CoV-2 biology and host interactions // *Nat. Rev. Microbiol.* 2024. T. 22. № 4. C. 206–225.
166. Strakhovskaya M. G. et al. Photoinactivation of coronaviruses: going along the optical spectrum // *Laser Phys. Lett.* 2020. T. 17. № 9. C. 093001.
167. Strecker C., Meyer B. Plasticity of the Binding Site of Renin: Optimized Selection of Protein Structures for Ensemble Docking // *J. Chem. Inf. Model.* 2018. T. 58. № 5. C. 1121–1131.
168. Surya W. et al. The Complex Proteolipidic Behavior of the SARS-CoV-2 Envelope

- Protein Channel: Weak Selectivity and Heterogeneous Oligomerization // Int. J. Mol. Sci. 2023. T. 24. № 15. C. 12454.
169. Surya W., Li Y., Torres J. Structural model of the SARS coronavirus E channel in LMPG micelles // Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2018. T. 1860. № 6. C. 1309–1317.
170. Svyatchenko V. A. et al. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2021. T. 33. C. 102112.
171. Takeoka S. et al. Reduction of Methemoglobin via Electron Transfer across the Bilayer Membrane of Hb Vesicles // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1997. T. 70. № 5. C. 1171–1178.
172. Tardivo J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2005. T. 2. № 3. C. 175–191.
173. Tomar P. P. S., Krugliak M., Arkin I. T. Blockers of the SARS-CoV-2 3a Channel Identified by Targeted Drug Repurposing // Viruses. 2021. T. 13. № 3. C. 532.
174. Torres J. et al. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein // Protein Sci. 2007. T. 16. № 9. C. 2065–2071.
175. Torrie G. M., Valleau J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling // J. Comput. Phys. 1977. T. 23. № 2. C. 187–199.
176. Tripathi P. K. et al. Screening and evaluation of approved drugs as inhibitors of main protease of SARS-CoV-2 // Int. J. Biol. Macromol. 2020. T. 164. C. 2622–2631.
177. Van Gunsteren W. F., Berendsen H. J. C. Algorithms for brownian dynamics // Mol. Phys. 1982. T. 45. № 3. C. 637–647.
178. Vanommeslaeghe K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields // J. Comput. Chem. 2010. T. 31. № 4. C. 671–690.
179. Vasyuchenko E. P. et al. Calculation of Electrostatic Potential Field of Coronavirus S

- Proteins for Brownian Dynamics Simulations // Supercomput. Front. Innov. 2022. T. 9. № 3.
180. Vasyuchenko E. P. et al. CPE-DB: An open database of chemical penetration enhancers // Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13. – №. 1. – С. 66.
  181. Venkatagopalan P. et al. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly // Virology. 2015. Т. 478. С. 75–85.
  182. Verdiá-Báguena C. et al. Analysis of SARS-CoV E protein ion channel activity by tuning the protein and lipid charge // Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2013. Т. 1828. № 9. С. 2026–2031.
  183. Verdiá-Báguena C. et al. Transport mechanisms of SARS-CoV-E viroporin in calcium solutions: Lipid-dependent Anomalous Mole Fraction Effect and regulation of pore conductance // Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2021. Т. 1863. № 6. С. 183590.
  184. Verlet L. Computer «Experiments» on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules // Phys. Rev. 1967. Т. 159. № 1. С. 98–103.
  185. Villalaín J. SARS-CoV-2 Protein S Fusion Peptide Is Capable of Wrapping Negatively Charged Phospholipids // Membranes. 2023. Т. 13. № 3. С. 344.
  186. V'kovski P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 // Nat. Rev. Microbiol. 2021a. Т. 19. № 3. С. 155–170.
  187. V'kovski P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 // Nat. Rev. Microbiol. 2021b. Т. 19. № 3. С. 155–170.
  188. Votapka L. W. et al. SEEKR: Simulation Enabled Estimation of Kinetic Rates, A Computational Tool to Estimate Molecular Kinetics and Its Application to Trypsin–Benzamidine Binding // J. Phys. Chem. B. 2017. Т. 121. № 15. С. 3597–3606.
  189. Wagner S. J. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes // Transfus. Med. Rev. 2002. Т. 16. № 1. С. 61–66.
  190. Wainwright M., Mohr H., Walker W. H. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products // J. Photochem. Photobiol. B. 2007. Т. 86. № 1. С. 45–58.
  191. Wang B. et al. Enrichment of Chemical Libraries Docked to Protein Conformational

- Ensembles and Application to Aldehyde Dehydrogenase 2 // J. Chem. Inf. Model. 2014. T. 54. № 7. C. 2105–2116.
192. Wang J. et al. Antechamber, An Accessory Software Package for Molecular Mechanical Calculations // 2001. T. 222. № 1. C. 2001.
193. Wang J. et al. Development and testing of a general amber force field // J. Comput. Chem. 2004. T. 25. № 9. C. 1157–1174.
194. Wang J. et al. Gaussian accelerated molecular dynamics: Principles and applications // WIREs Comput. Mol. Sci. 2021. T. 11. № 5. C. e1521.
195. Wang W.-A., Carreras-Sureda A., Demaurex N. SARS-CoV-2 infection alkalinizes the ERGIC and lysosomes through the viroporin activity of the viral envelope protein // J. Cell Sci. 2023. T. 136. № 6. C. jcs260685.
196. WHO. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts.
197. Wilson L. et al. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels // Virology. 2004. T. 330. № 1. C. 322–331.
198. Woo H. et al. Developing a Fully Glycosylated Full-Length SARS-CoV-2 Spike Protein Model in a Viral Membrane // J. Phys. Chem. B. 2020. T. 124. № 33. C. 7128–7137.
199. Xia B. et al. SARS-CoV-2 envelope protein causes acute respiratory distress syndrome (ARDS)-like pathological damages and constitutes an antiviral target // Cell Res. 2021. T. 31. № 8. C. 847–860.
200. Xie Y. et al. Spike Proteins of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Utilize Different Mechanisms to Bind with Human ACE2 // Front. Mol. Biosci. 2020. T. 7.
201. Yalcinkaya M. et al. Modulation of the NLRP3 inflammasome by Sars-CoV-2 Envelope protein // Sci. Rep. 2021. T. 11. № 1.
202. Yao H. et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus // Cell. 2020. T. 183. № 3. C. 730–738.e13.
203. Zeller F. et al. Multiscale Simulation of Receptor–Drug Association Kinetics: Application to Neuraminidase Inhibitors // J. Chem. Theory Comput. 2017. T. 13. № 10. C. 5097–5105.
204. Zheng S. et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with

- SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study // BMJ. 2020. C. m1443.
205. Zhou S. et al. SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development // Biomed. Pharmacother. 2023. T. 159. C. 114242.
206. Zhukhovitsky V. et al. Infectivity and Morphology of Bovine Coronavirus Inactivated In Vitro by Cationic Photosensitizers // Viruses. 2022a. T. 14. № 5. C. 1053.
207. Zhukhovitsky V. et al. Infectivity and Morphology of Bovine Coronavirus Inactivated In Vitro by Cationic Photosensitizers // Viruses. 2022b. T. 14. № 5. C. 1053.
208. Zuckerman D. M., Chong L. T. Weighted Ensemble Simulation: Review of Methodology, Applications, and Software // Annu. Rev. Biophys. 2017. T. 46. № 1. C. 43–57.
209. A one-letter notation for amino acid sequences (definitive rules) // Pure Appl. Chem. 1972. T. 31. № 4. C. 639–646.