

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.32

Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с виropорином коронавируса SARS-CoV-2

Е.П. Васюченко^{1, 2, *} , Е.Г. Холина¹ , В.А. Федоров¹ , М.Г. Страховская¹ ,
И.Б. Коваленко¹ , А.Б. Рубин¹

¹ Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Научно-образовательный математический центр «Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской», Псковский государственный университет, Россия, 180000, г. Псков, площадь Ленина, д. 2
*e-mail: vasyuchenko.katya@gmail.com

Виропорины являются небольшими мембранными белками оболочечных вирусов. Они играют важную роль как в жизненном цикле вируса, так и развитии патогенеза заболевания. В связи с этим, ингибирование виropоринов считается перспективной стратегией в лечении многих заболеваний, вызванных оболочечными вирусами, такими как коронавирус, вирус герпеса, вирус иммунодефицита человека, вирус Эбола и многие другие. Важным этапом поиска высокоэффективных ингибиторов таких каналов является изучение особенностей взаимодействия потенциальных противовирусных препаратов с аминокислотными остатками канала виropорина. В свою очередь, метиленовый синий является известным эффективным противовирусным агентом и широко применяется в медицинской практике. В данной работе мы провели расчеты молекулярной динамики взаимодействия метиленового синего с каналом виropорина коронавируса SARS-CoV-2 методом отбора зонтичных проб. Анализ образуемых контактов между молекулой метиленового синего и аминокислотными остатками виropорина показал, что ключевую роль в связывании играют нековалентные стэкинг-взаимодействия между системой ароматических колец метиленового синего и остатками фенилаланина, расположенными в центре канала виropорина. Полученные результаты приближают нас к пониманию механизмов противовирусного действия метиленового синего. Проведение подобных вычислительных экспериментов представляется эффективным подходом при поиске ингибиторов виropоринов.

Ключевые слова: виropорин, коронавирус, метиленовый синий, молекулярное моделирование, молекулярная динамика, броуновская динамика

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-4

Введение

Целый ряд вирусных заболеваний представляет значительный риск для общественного здравоохранения. Приоритетными для исследований и разработок считают вирусные инфекции, которые могут вызывать вспышки или пандемии [1]. Возбудителями таких инфекций являются вирус Конго-крымской геморрагической лихорадки, вирусы Эбола, Нипах, Зика, Ласса, коронавирусы. Все перечисленные вирусы объединяет наличие в их структуре дополнительной внешней липидной оболочки со встроенными гликопротеинами. К группе оболочечных относятся также вирусы гриппа и вирус иммунодефицита человека.

В XXI в. представители коронавирусов (CoV) оказались в центре внимания в связи со вспышками тяжелого острого респираторного синдрома

(SARS — Severe acute respiratory syndrome) в 2002–2003 гг. [2], ближневосточного респираторного синдрома (MERS — Middle East respiratory syndrome) в 2012 г. [3] и пандемией COVID-19 [4], которая побудила исследователей по всему миру к тщательному изучению строения и жизненного цикла ее возбудителя SARS-CoV-2. Сферические частицы коронавируса диаметром 80–120 нм окружены бислойной мембраной, липиды которой происходят из липидов клеток организма-хозяина. В мембрану оболочки коронавирусов встроены три основных структурных белка — спайковый, S; мембранный, М и оболочечный, Е [5]. Спайковые S-белки являются важнейшими функциональными структурами, обеспечивающими узнавание, связывание с рецепторами клеток хозяина, слияние мембран, вход вирусов в клетки [6, 7], в то

время как М- и Е-белки играют ключевую роль в сборке и почковании вируса [8, 9].

Эктодомены S-белков (шипы) выступают за липидный бислой на 10–20 нм, образуя характерную «корону», которой и обязана своим названием данная группа вирусов. Матрицу оболочки коронавируса образует гликозилированный структурный М-белок, который имеет три трансмембранных домена и обычно существует в форме функциональных димеров [10]. Этот белок представлен наибольшим числом копий и, взаимодействуя с другими белками оболочки и белком, формирующим нуклеокапсид (N белок), отвечает за сборку и поддержание формы и размера вирионов [11]. Когда новые вирионы собираются и отпочковываются в промежуточный компартмент эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (ERGIC – Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment), нуклеокапсид покрывается бислойной мембраной из липидов клетки-хозяина со встроенными трансмембранными вирусными белками.

Электростатическое поле оболочки SARS-CoV-2 крайне неоднородно и состоит из чередующихся областей положительного и отрицательного потенциала. Отрицательные участки электростатического потенциала генерируются в основном липидами мембраны фосфатидилинозитолом, фосфатидилсерином и кардиолипином, а также отрицательно заряженными аминокислотами спайкового белка S [12].

Небольшой (75 аминокислот) Е-белок с единственным гидрофобным доменом образует в мембранах гомопентамерные каналы, так называемые «виropорины» [13, 14]. В отличие от М-белков, виropорины в оболочке SARS-CoV-2 представлены всего несколькими копиями и преимущественно локализуются в мембранах эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и ERGIC инфицированной вирусом клетки. Липиды мембраны являются частью архитектуры каналов, образованных Е-белками, а их электрический заряд сильно влияет на ионную селективность каналов, при этом в отрицательно заряженных мембранах (например, мембраны ERGIC содержат 20% отрицательно заряженных липидов) возрастает проницаемость виropоринов для катионов [15]. Наличие ионов кальция модулирует транспортные свойства канала виropоринов через взаимодействие с заряженными липидами [16].

Ключевая роль виropоринов в процессе почкования вирионов показана в нескольких исследованиях *in vitro* [17–19]. Несмотря на то, что белок N значительно увеличивает продукцию новых вирусных частиц, для их сборки достаточно только белков Е и М [20]. Виropорины также вносят вклад в заключительный этап жизненного цикла коронавируса, на котором вновь образованные вирусные частицы включаются в секреторные пу-

зырьки и высвобождаются из инфицированной клетки. 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 [21]. Предполагают также, что виropорины SARS-CoV-2, участвуя в деацидификации лизосом, предотвращают деградацию вирусных частиц [22].

С учетом важной роли виropоринов в формировании и высвобождении вирусных частиц представляет интерес поиск и изучение потенциальных модуляторов их проводимости. С этой точки зрения, среди соединений с широким спектром антивирусной активности привлекает внимание метиленовый синий (МС). Как следует из результатов проведенного нами компьютерного моделирования взаимодействия МС с поверхностными структурами оболочки коронавируса [23], молекулы этого красителя связываются с отрицательно заряженными липидами мембраны, а также S- и Е-белками. При этом МС проявлял сродство к области с отрицательным электрическим потенциалом, которая формируется глутаматами Е-белков вокруг входа в канал виropорина SARS-CoV-2. В настоящей работе мы детально исследовали возможные локализации МС внутри канала виropорина SARS-CoV-2 методом полноатомной молекулярной динамики с использованием подхода зонтичной выборки.

Материалы и методы

Создание системы виropорина в мембране. В исследовании использовали модель виropорина, полученную ранее [24]. Молекулу МС (рис. 1) располагали над порой виropорина на расстоянии 4 нм от центра масс пяти остатков PHE26, составляющих центр поры этого пентамерного Е-белка. Белок помещали в мембрану, созданную с использованием веб-сервиса CHARMM-GUI *Membrane Builder* [25]. Мембрана имела следующий состав: 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин (POPC – 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine, 59%), 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилэтанолламин (POPE – 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine, 20%), 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилинозитол (POPI – 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylinositol, 10%), холестерин (CHOL, 4,5%), кардиолипин (CDL2, 4,5%), пальмитоилолеоилфосфатидилсерин (POPS – palmitoyl-oleoyl phosphatidylserine, 2%). В молекулярно-динамической системе использовали силовое поле CHARMM36m и модель воды TIP3P. Для нейтрализации системы добавляли ионы калия и хлора в концентрации 0,1 М для каждого иона. Топология молекулы МС была получена с помощью программы Antechamber [26], реализованной в веб-сервисе CHARMM-GUI, в силовом поле gaff2 методом AM1-BCC. Пространственная визуализация молекулы МС пред-

ставлена на рис. 1. После минимизации системы методом наискорейшего спуска проводили ее уравнивание с постепенным снятием позиционных ограничений в программе GROMACS-2022.5 [27]. На атомы молекулы МС накладывали добавочный потенциал 10000 кДж/моль, чтобы предотвратить перемещение молекулы в растворе. Состояние системы после уравнивания представлено на рис. 1.

Отбор зонтичных проб. Исследование взаимодействия МС с каналом виропорина проводили методом полноатомной молекулярной динамики с использованием подхода зонтичной выборки. Для отбора зонтичных проб использовали программный модуль PLUMED-2.9.0 [28] для программного пакета GROMACS-2022.5 [27]. 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/нм², наложенным на координату реакции. Потенциал средней силы (ПСС) рассчитывали с использованием метода анализа взвешенных гистограмм (WHAM — Weighted Histogram Analysis Method) [29], как это реализовано в программе WHAM версии 2.0.10 [30].

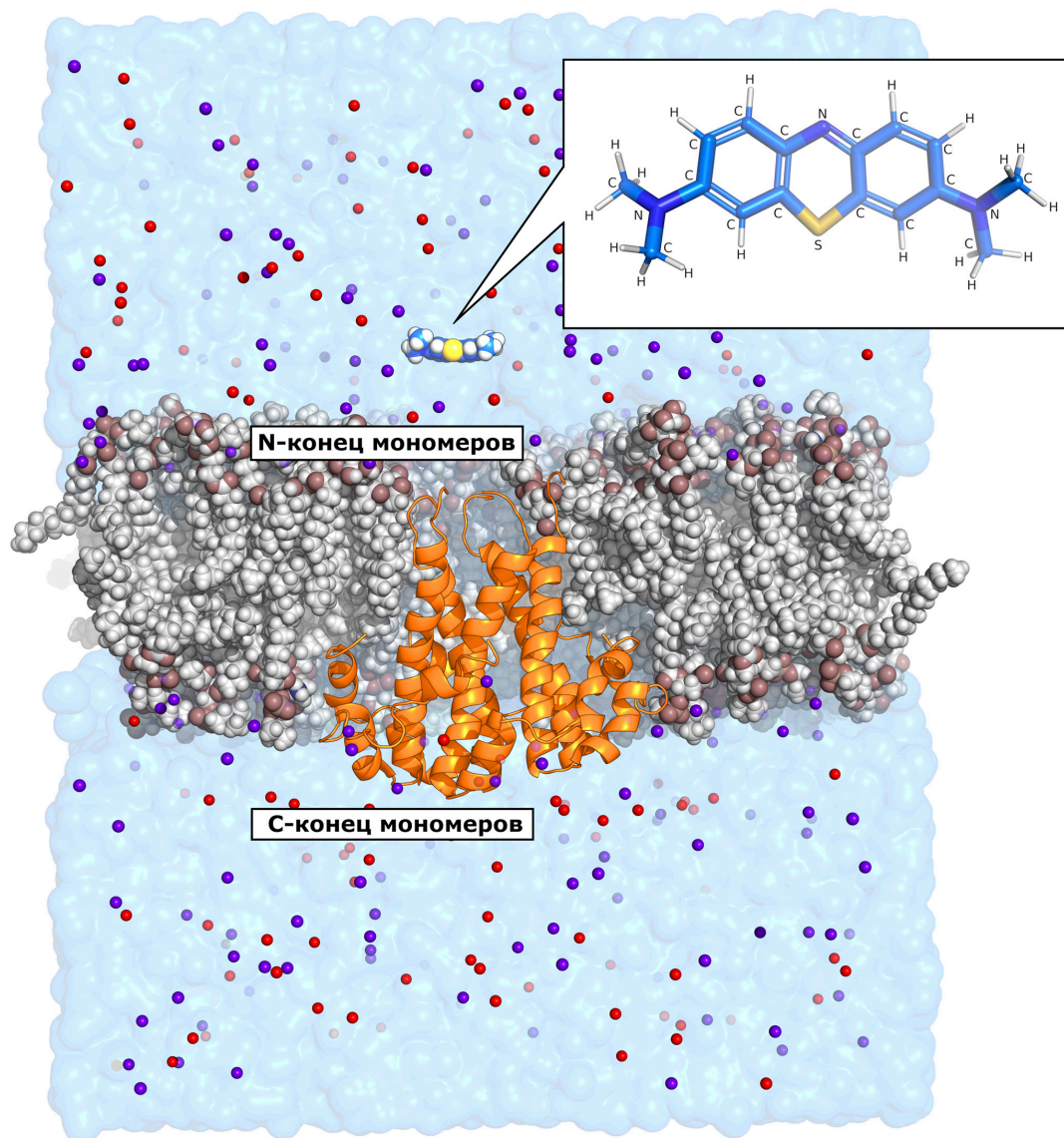


Рис. 1. Визуализация молекулярно-динамических моделей МС и виропорина в мембране. Е-белки представлены оранжевым цветом; атомы фосфатных групп липидов мембраны представлены светло-коричневыми сферами, остальные атомы — серыми сферами; ионы калия и хлора представлены фиолетовыми и красными маленькими сферами соответственно. Состояние системы показано после этапа уравнивания. Молекула МС расположена в центре первого окна зонтичной выборки.

Кластерный анализ. Для отбора структур с минимумами ПСС определяли диапазон значений координаты реакции, где значение ПСС превосходило таковое в локальном минимуме не более чем на 0,25 кДж/моль (0,1 кТ, где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура). Из траекторий зонтичной выборки выбирали пространственные положения, в которых координата реакции находится внутри выбранного диапазона. Таким образом был получен набор пространственных положений МС для каждого из пяти локальных минимумов. Количество структур, отобранных для кластерного анализа, в каждом из пяти минимумов составило 1068, 1057, 2946, 1493 и 1244 соответственно. Кластерный анализ был проведен с помощью утилиты *gmx_cluster* методом *gromos* ($\text{cutoff} = 0,6$). Центральную структуру наиболее заселенного кластера рассматривали как типичное положение молекулы МС. Структуры визуализировали с использованием программы PyMol-2.5.4 [31], диаграммы взаимодействия молекул метиленового синего с белком получены с помощью программы BIOVIA Discovery Studio 2024 [32].

Результаты и обсуждение

Структура молекулы МС включает в себя три конденсированных ароматических кольца, центральное из которых является гетероциклом с атомами серы и азота. К каждому из боковых бензольных колец присоединено по диметиламиновой группе (рис. 1). В растворе МС чаще всего существует в виде однозарядного катиона. Как мы показали ранее [23], дальнедействующие электростатические взаимодействия обуславливают сильное начальное притяжение положительно заряженных молекул МС к поре канала. Действительно, вокруг входа в канал виropорина существует заметная кольцевая область отрицательного потенциала, обусловленного наличием двух соседних (7 и 8 а.о.) остатков глутаминовой кислоты в петлях Е-белков, выходящих в раствор, и колокализованных с виropоринами отрицательно заряженных липидов. Эта область является весьма привлекательной для молекул МС.

В настоящей работе для описания взаимодействий МС с аминокислотными остатками виropорина в минимумах ПСС из траекторий молекулярной динамики были отобраны соответствующие положения МС (рис. 2). Для типичных конформа-

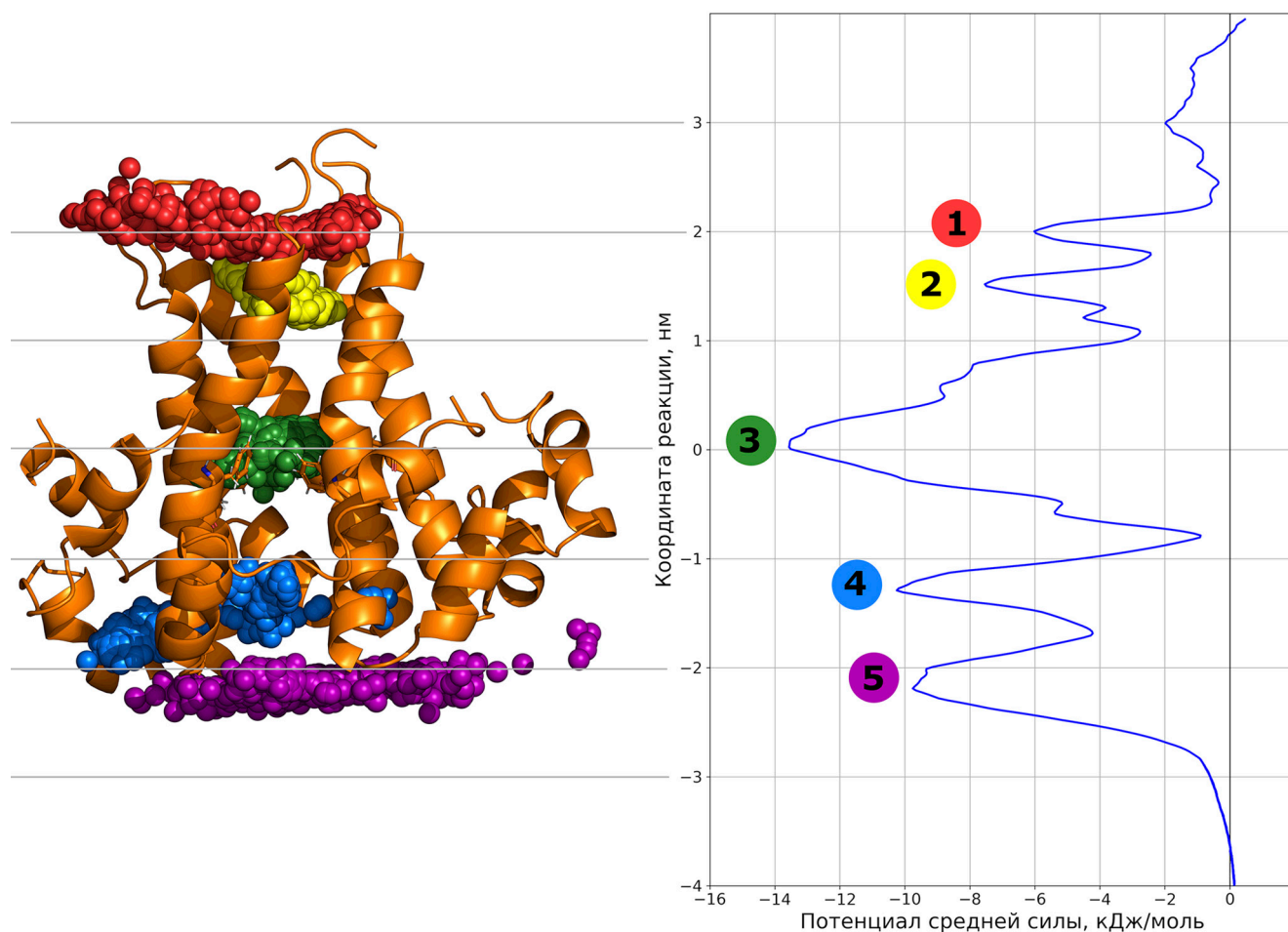


Рис. 2. Потенциал средней силы взаимодействия МС с аминокислотными остатками, формирующими канал виropорина SARS-CoV-2. Слева показан виropорин (оранжевый цвет) и центры масс молекул МС, положения которых соответствуют минимумам ПСС на правой панели.

ций МС с минимальными значениями ПСС были проанализированы взаимодействия молекул красителя с аминокислотными остатками канала виropорина. Всего было выявлено шесть типов нековалентных взаимодействий (рис. 3), в основном обусловленных наличием системы ароматических колец в структуре МС. Так, наблюдаемые π - π -стэкинг-взаимодействия обусловлены перекрыванием p -орбиталей в π -сопряженных системах МС и остатков ароматических аминокислот тирозина

и фенилаланина. При СН- π -взаимодействиях происходит взаимодействие π -электронного облака МС и электронного облака алкильных групп аланина, валина или лейцина. Другие типы π -взаимодействий включали S- π -, NH- π - и OH- π -взаимодействия. Кроме этого, существенную долю контактов между молекулами МС и аминокислотными остатками белка составляли неклассические водородные связи, образующиеся между водородами диметиламиновых групп и атомами

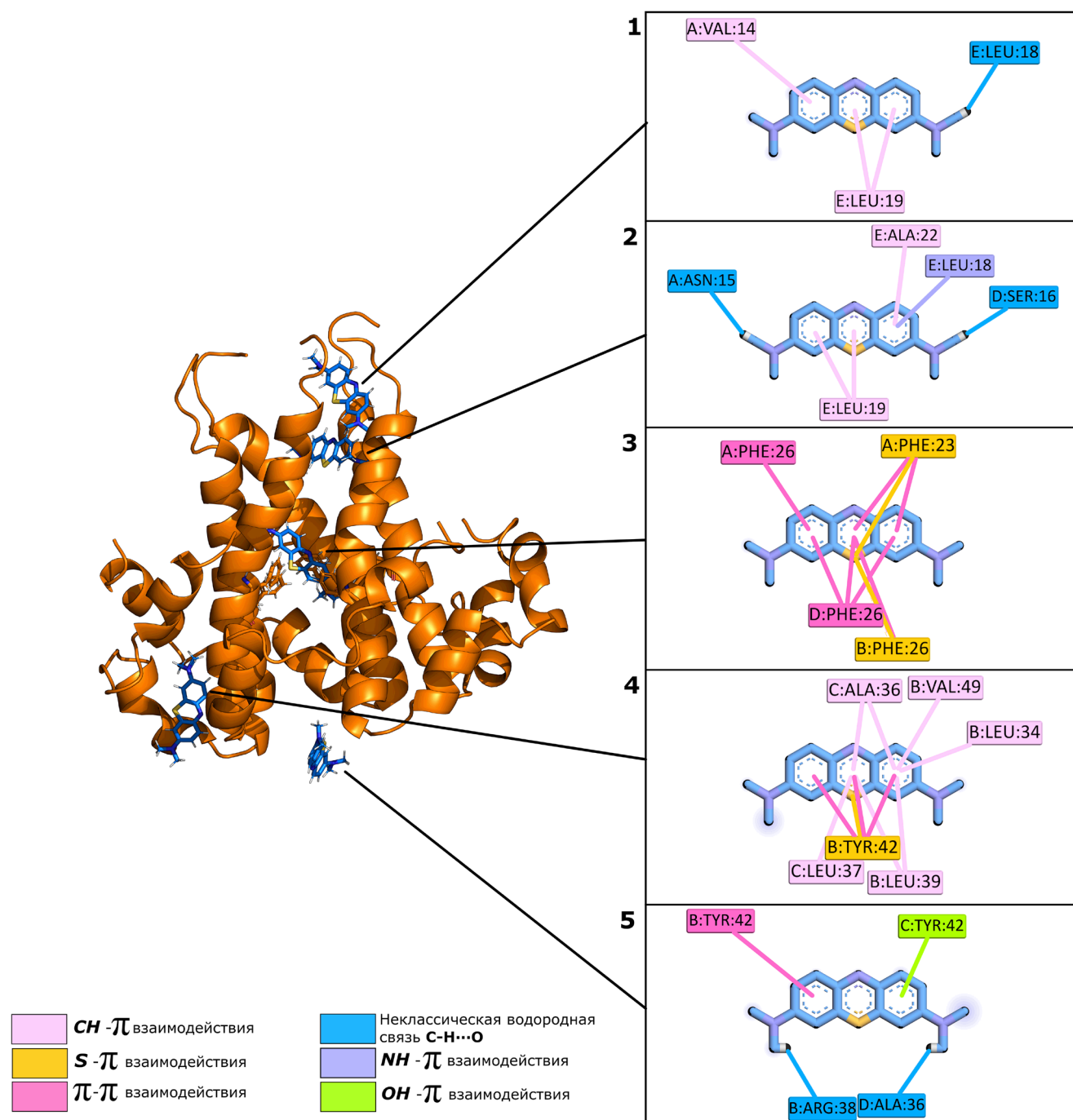


Рис. 3. Положения МС, соответствующие минимумам ПСС. МС представлен синим цветом, виropорин представлен оранжевым цветом, его конформация соответствует состоянию белка после уравнивания. Для положений в каждом минимуме представлены диаграммы взаимодействий молекулы МС с аминокислотными остатками Е-белков. В обозначении аминокислотного остатка используется цепь, которой он принадлежит, трехбуквенное обозначение типа аминокислоты и номер остатка. Положения МС в канале виropорина пронумерованы в соответствии с рис. 2.

кислорода белка. Такие связи гораздо слабее классических водородных связей, тем не менее их энергия находится в диапазоне 2–10 кДж/моль.

При анализе профиля ПСС на пути проникновения молекулы МС через пору виropорина критических энергетических барьеров не выявлено. Наблюдали пять локальных минимумов энергии, самый глубокий из которых соответствовал положению 3 МС в центре белкового канала и составлял –13,56 кДж/моль (–5,50 кТ) (рис. 2).

В области N-концов мономеров Е-белка взаимодействие МС с аминокислотными остатками выражается в наличии двух минимумов ПСС (минимумы 1 и 2 на рис. 2) с энергиями –6,01 и –7,54 кДж/моль соответственно. Энергетический барьер перехода из минимума 1 в минимум 2 и из второго в третий составляет ~4 кДж/моль (2 кТ). В первом локальном минимуме наблюдается взаимодействие молекулы МС с белком посредством СН-π-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.

Когда положение МС соответствует середине поры виropорина, на кривой ПСС наблюдается глобальный минимум со значением –13,56 кДж/моль (–5,5 кТ) (положение 3 на рис. 2). Эта область канала богата ароматическими аминокислотными остатками – фенилаланинами 20, 23 и 26 в каждом из пяти мономеров пентамера виropорина. Центр масс пяти остатков F26 был принят за центр поры виropорина. Эти остатки образуют самое узкое место в канале и ответственны за закрытое и открытое состояния канала. Именно нековалентные π-π-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 ингибированию его проводимости. Энергетические барьеры перехода из этого положения в соседние минимумы довольно высокие и составляют ~12,5 кДж/моль (4,5–5 кТ).

В области выхода из канала виropорина аминокислотные остатки Е-белков взаимодействуют с МС, что выражается в наличии еще двух локальных минимумов ПСС (положения 4 и 5 на рис. 2) с энергиями –10,25 и –9,75 кДж/моль соответственно. Между ними находится небольшой энергетический барьер ~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 минимуме 4 профиля ПСС характерны СН-π-взаимодействия с пятью алкильными группами остатков аланина, валина и лейцина. В минимуме 5, помимо π-π-взаимодействий, имеют место ОН-π-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 виropорина достаточно высокая и составляет ~10 кДж/моль (4 кТ). В петлях, соединяющих две альфа-спирали мономеров Е-белка и образующих выход из поры виropорина, присутствует пять остатков аргинина-38, экспонированных в раствор. Кольцо из пяти положительно заряженных аминокислот затрудняет выход положительно заряженной молекулы МС из канала виropорина, что выражается в довольно высоком энергетическом барьере выхода из минимума 5 на профиле ПСС.

Заключение

МС одобрен для лечения метгемоглобинемии, малярии, при отравлении цианидом. Он также проявляет вирулицидную активность, причем при достаточно низких концентрациях 1–5 мкмоль/л [33, 34] в качестве фотосенсибилизатора и эффективен против широкого спектра оболочечных вирусов при обеззараживании препаратов крови перед переливанием. В отсутствие активации светом МС также эффективен в отношении ряда вирусов, включая коронавирусы [35], однако о механизмах такого противовирусного действия красителя известно мало. В циклах репликации многих вирусов участвуют белки виropорины, которые образуют трансмембранные гидрофильные поры с определенной селективностью, модулируя таким образом проницаемость мембран [36]. В результате экспрессии виropоринов в инфицированных вирусом клетках происходят такие критические процессы, как нарушение гомеостаза важнейшего внутриклеточного мессенджера Ca^{2+} , деацидификация компартментов ERGIC и лизосом, а также повышение цитозольного pH, активация инфламмосомы, запуск апоптоза. Вирусные каналы являются признанными фармакологическими мишенями, а их потенциальные ингибиторы находятся в центре внимания исследователей. Хорошо известными соединениями, которые проявляют вирулицидную активность путем ингибирования виropорина, являются противогриппозные аминокислоты – амантадин и римантадин [37]. С помощью методов компьютерного моделирования мы показали, что следующим этапом после первоначального электростатического контакта МС с отрицательно заряженными остатками глу-

таминовой кислоты N-конца Е-белков SARS-CoV-2 при дальнейшем погружении в канал виropорина молекулы МС вступают в множественные π -взаимодействия. Рассчитанная нами энергия этих взаимодействий ($-13,56$ кДж/моль) немного превышает энергию связывания амантадина с виropорином SARS-CoV ($\sim -12,3$ кДж/моль или $-4,9$ кТ), рассчитанную на основе экспериментально определенной константы диссоциации [38]. Это указывает на перспективу дальнейших экспериментальных исследований потенциала МС в качестве ингибитора функционирования виropоринов — в частности, методом patch-

clamp — и возможность постановки тестов на ингибирование МС репликации коронавирусов в клеточных культурах.

Статья подготовлена в рамках реализации проекта «Научно-образовательный математический центр “Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской”» (соглашение № 075-02-2025-1607 от 27 февраля 2025 г). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts> (дата обращения: 19.03.2025).
2. Peiris J.S.M., Lai S.T., Poon L.L.M., et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory. *The Lancet*. 2003;361(9366):1319–1325.
3. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., et al. Commentary: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the coronavirus study group. *J. Virol.* 2013;87(14):7790–7792.
4. Zheng S., Fan J., Yu F., 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;369:m1443.
5. Satarker S., Nampoothiri M. Structural proteins in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Arch. Med. Res.* 2020;51(6):482–491.
6. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol.* 2016;3(1):237–261.
7. Ou X., Liu Y., Lei 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;11(1):1620.
8. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* 2019;16(1):69.
9. Ravi V., Saxena S., Panda P.S. Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian J. Med. Microbiol.* 2022;40(2):182–186.
10. Cao Y., Yang R., Wang W., Jiang S., Yang C., Liu N., Dai H., Lee I., Meng X., Yuan Z. Probing the formation, structure and free energy relationships of M protein dimers of SARS-CoV-2. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022;20:573–582.
11. Mahtarin R., Islam S., Islam M.dJ., Ullah M.O., Ali M.A., Halim M.A. Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2022;40(10):4725–4738.
12. Fedorov V., Kholina E., Khrushchev S., Kovalenko I., Rubin A., Strakhovskaya M. Electrostatic map of the SARS-CoV-2 virion specifies binding sites of the antiviral cationic photosensitizer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(13):7304.
13. Poggio E., Vallesse F., Hartel A.J.W., Morgenstern T.J., Kanner S.A., Rauh O., Giamogante F., Barazzuol L., Shepard K.L., Colecraft H.M., Clarke O.B., Brini M., Cali T. Perturbation of the host cell Ca^{2+} homeostasis and ER-mitochondria contact sites by the SARS-CoV-2 structural proteins E and M. *Cell Death Dis.* 2023;14(4):297.
14. Breiting U., Farag N.S., Sticht H., Breiting H.G. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2022;145:106185.
15. Surya W., Tavares-Neto E., Sanchis A., Queralt-Martín M., Alcaraz A., Torres J., Aguilera V. The complex proteolipidic behavior of the SARS-CoV-2 envelope protein channel: weak selectivity and heterogeneous oligomerization. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(15):12454.
16. Verdiá-Báguena C., Aguilera V.M., Queralt-Martín M., Alcaraz A. 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;1863(6):183590.
17. De Diego M.L., Álvarez E., Almazán F., Rejas M.T., Lamirande E., Roberts A., Shieh W.-J., Zaki S.R., Subbarao K., Enjuanes L. A Severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 2007;81(4):1701–1013.
18. Siu Y.L., Teoh K.T., Lo J., Chan C.M., Kien F., Escriou N., Tsao S.W., Nicholls J.M., Altmeyer R., Peiris J.S.M., Bruzzone R., Nal B. 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;82(22):11318–11330.
19. Fischer F., Stegen C.F., Masters P.S., Samsonoff W.A. Analysis of constructed E gene mutants of mouse Hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J. Virol.* 1998;72(10):7885–7894.
20. Ruch T.R., Machamer C.E. The coronavirus E protein: assembly and beyond. *Viruses*. 2012;4(3):363–382.
21. Wang W.A., Carreras-Sureda A., Demareux N. SARS-CoV-2 infection alkalizes the ERGIC and lysosomes through the viroporin activity of the viral envelope protein. *J. Cell Sci.* 2023;136(6):jcs260685.
22. Miura K., Suzuki Y., Ishida K., Arakawa M., Wu H., Fujioka Y., Emi A., Morita E. Distinct motifs in the E protein are required for SARS-CoV-2 virus particle formation and lysosomal deacidification in host cells. *J. Virol.* 2023;97(10):e00426–23.
23. Kovalenko I., Kholina E., Fedorov V., Khrushchev S., Vasyuchenko E., Meerovich G., Strakhovskaya M. Interaction of methylene blue with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 envelope revealed by molecular modeling. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(21):15909.
24. Srinivasan S., Cui H., Gao Z., Liu M., Lu S., Mkandawire W., Narykov O., Sun M., Korkin D. Structural

genomics of SARS-CoV-2 indicates evolutionary conserved functional regions of viral proteins. *Viruses*. 2020;12(4):360.

25. Feng S., Park S., Choi Y.K., Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder: past, current, and future developments and applications. *J. Chem. Theory Comput.* 2023;19(8):2161–2185.

26. Wang J., Wang W., Kollman P.A., Case D.A. Antechamber, an accessory software package for molecular mechanical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;222(1):2001.

27. Páll S., Zhmurov A., Bauer P., Abraham M., Lundborg M., Gray A., Hess B., Lindahl E. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. *J. Chem. Phys.* 2020;153(13):134110.

28. Tribello G.A., Bonomi M., Branduardi D., Camilloni C., Bussi G. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Comput. Phys. Commun.* 2014;185(2):604–613.

29. Kumar S., Rosenberg J.M., Bouzida D., Swendsen R.H., Kollman P.A. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* 1992;13(8):1011–1021.

30. Grossfield A. An implementation of WHAM: the Weighted Histogram Analysis Method Version 2.0.10. *Analysis*. 2004;1–13.

31. De Lano W. The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, L.L.C. [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://pymol.org/> (дата обращения: 19.03.2025).

32. BIOVIA Discovery Studio. Dassault Systèmes. [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> (дата обращения: 19.03.2025).

33. Eickmann M., Gravemann U., Handke W., Tolksdorf F., Reichenberg S., Müller T.H., Seltsam A. 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*. 2018;58(9):2202–2207.

34. Zhukhovitsky V., Shevlyagina N., Zubasheva M., Russu L., Gushchin V., Meerovich G., Strakhovskaya M. Infectivity and morphology of bovine coronavirus inactivated *in vitro* by cationic photosensitizers. *Viruses*. 2022;14(5):1053.

35. Cagno V., Medaglia C., Cerny A., Cerny T., Zwygart A.C.A., Cerny E., Tapparel C. 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;11(1):14295.

36. Breiting U., Farag N.S., Sticht H., Breiting H.G. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2022;145:106185.

37. Georgiou K., Kolokouris D., Kolokouris 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;11:100122.

38. Torres J., Maheswari U., Parthasarathy K., Ng L., Liu D.X., Gong X. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein Sci.* 2007;16(9):2065–2071.

Поступила в редакцию 19.03.2025

После доработки 10.06.2025

Принята в печать 16.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Molecular modeling of the methylene blue interaction with the SARS-CoV-2 coronavirus viroporin

E.P. Vasyuchenko^{1, 2, *} , E.G. Kholina¹ , V.A. Fedorov¹ , M.G. Strakhovskaya¹ ,
I.B. Kovalenko¹ , A.B. Rubin¹ 

¹ School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Scientific and Educational Mathematical Center “Sofia Kovalevskaya Northwestern Center for Mathematical Research,” Pskov State University, Lenin square 2, Pskov, 180000, Russia

*e-mail: vasyuchenko.katya@gmail.com

Viroporins are small membrane proteins of enveloped viruses. They play an important role both in the life cycle of the virus and in the development of disease pathogenesis. In this regard, inhibition of viroporins is considered a promising strategy in the treatment of many diseases caused by enveloped viruses, such as coronavirus, herpes virus, human immunodeficiency virus, Ebola virus and many others. An important step in the search for highly effective inhibitors of such channels is the study of the interaction of potential antiviral drugs with the amino acid residues of the viroporin channel. In turn, methylene blue is a well-known effective antiviral agent and is widely used in medical practice. In this work, we carried out molecular dynamic calculations of the interaction of methylene blue with the viroporin channel of the SARS-CoV-2 coronavirus using the umbrella sampling method. Analysis of the contacts formed between the methylene blue molecule and the amino acid residues of viroporin showed that the key role in binding is played by non-covalent stacking interactions between the system of aromatic rings of methylene blue and the phenylalanine residues located in the center of the viroporin channel. The results obtained bring us closer to understanding the mechanisms of the antiviral action of methylene blue. Conducting such computational experiments seems to be an effective approach in the search for viroporin inhibitors.

Keywords: *viroporin, coronavirus, methylene blue, molecular modeling, molecular dynamics, Brownian dynamics*

Funding: The article was prepared within the framework of the project Scientific and Educational Mathematical Center “Sofia Kovalevskaya Northwestern Center for Mathematical Research” (agreement No. 075-02-2025-1607, February 27, 2025).

Сведения об авторах

Васюченко Екатерина Павловна — аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: vasyuchenko.katya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0972-9378>

Холина Екатерина Георгиевна — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: tenarra@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5918-5084>

Федоров Владимир Андреевич — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: xbgth@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9397-1548>

Страховская Марина Глебовна — докт. биол. наук, доц. кафедры синтетической биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-06; e-mail: maristra@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4571-0431>

Коваленко Илья Борисович — докт. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: ikovalenko78@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4949-6591>

Рубин Андрей Борисович — академик РАН, докт. биол. наук, зав. кафедрой биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: rubin@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8354-7965>