

УДК 616.981.21/.958.7:578.53

<http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2025-17-4-44-53>

СЕЛЕКТИВНОЕ УСИЛЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКА PNOС С КОРЕЦЕПТОРАМИ ВИЧ-1 CCR5 И CXCR4 ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИССЕНС-МУТАЦИЙ: ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ И ПРОГНОЗ

V. S. Davydenko, A. N. Shchemelev*, Yu. V. Ostankova, A. A. Totolian

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Целью данного исследования стала систематическая *in silico* оценка влияния естественных миссенс-мутаций PNOС на стабильность и энергию связывания его комплексов с CCR5 и CXCR4 для идентификации вариантов с повышенной аффинностью, потенциально пригодных для ингибирования вирусного проникновения.

Материалы и методы. Методами молекулярного моделирования с использованием алгоритма AlphaFold были построены трехмерные структуры комплексов белка PNOС дикого типа с CCR5 и CXCR4. На их основе с помощью программы FoldX смоделированы мутантные варианты PNOС, локализованные в сайтах контакта с рецепторами. Для количественной оценки эффекта мутаций проводились расчет изменения свободной энергии стабильности комплекса (Δ Stability) и энергии взаимодействия между белками (Δ Connection), анализ изменения количества атомарных контактов (Δ Contacts) и прогноз функциональной значимости замен с помощью алгоритма PolyPhen-2.

Результаты и их обсуждение. Показано, что PNOС дикого типа обладает более высокой предсказанной аффинностью к CXCR4 по сравнению с CCR5. Для комплекса PNOС-CCR5 был идентифицирован один кандидат (E50K), полностью удовлетворяющий строгим критериям отбора (снижение Δ Stability и Δ Connection, сохранение количества контактов, статус «benign»). Для комплекса PNOС-CXCR4 выявлен более широкий спектр значимых мутаций, среди которых четыре (F14L, S20N, R23K, V43M) соответствовали всем критериям. Особый интерес представляют мутации с селективным действием: E50K (улучшает связывание с CCR5, но ухудшает с CXCR4) и F14L (единственная мутация, улучшающая параметры связывания с обоими рецепторами).

Закключение. Впервые проведен систематический вычислительный анализ влияния миссенс-мутаций PNOС на его взаимодействие с корецепторами ВИЧ-1. Идентифицированы конкретные аминокислотные замены (E50K для CCR5; F14L, Q22P и другие для CXCR4), которые статистически значимо улучшают энергию связывания и стабильность комплексов. Эти мутантные формы PNOС представляют собой перспективных кандидатов для дальнейшей экспериментальной проверки их способности ингибировать связывание вируса с клеткой-мишенью и могут рассматриваться в качестве основы для разработки новых стратегий противовирусной терапии.

Ключевые слова: ВИЧ-1, корецепторы CCR5 и CXCR4, белок PNOС, миссенс-мутации, молекулярное моделирование, энергия связывания, *in silico*

*Контакт: Шемелев Александр Николаевич, tvildorm@gmail.com

SELECTIVE ENHANCEMENT OF PNOС PROTEIN BINDING TO HIV-1 CO-RECEPTORS CCR5 AND CXCR4 BY MISSENSE MUTATIONS: A COMPUTATIONAL ANALYSIS AND PREDICTION

V. S. Davydenko, A. N. Shchemelev*, Yu. V. Ostankova, A. A. Totolian

St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

The aim of this study was a systematic *in silico* evaluation of the effect of natural missense mutations in PNOС on the stability and binding energy of its complexes with CCR5 and CXCR4 to identify variants with enhanced affinity, potentially suitable for inhibiting viral entry.

Materials and methods. Three-dimensional structures of wild-type PNOС protein complexes with CCR5 and CXCR4 were built using molecular modeling methods with the AlphaFold algorithm. Based on these, mutant PNOС variants localized at the

receptor contact sites were modeled using the FoldX program. To quantitatively assess the mutation effects, we calculated the change in the complex stability free energy (Δ Stability) and the protein-protein interaction energy (Δ Connection), analyzed the change in the number of atomic contacts (Δ Contacts), and predicted the functional impact of the substitutions using the PolyPhen-2 algorithm.

Results and discussion. The wild-type PNOС was shown to have a higher predicted affinity for CXCR4 compared to CCR5. For the PNOС-CCR5 complex, one candidate (E50K) was identified that fully met the strict selection criteria (decrease in both Δ Stability and Δ Connection, preserved number of contacts, «benign» status). For the PNOС-CXCR4 complex, a broader spectrum of significant mutations was revealed, among which four (F14L, S20N, R23K, V43M) met all the criteria. Mutations with selective action are of particular interest: E50K (improves binding to CCR5 but impairs it for CXCR4) and F14L (the only mutation that improves binding parameters for both receptors).

Conclusion. For the first time, a systematic computational analysis of the impact of PNOС missense mutations on its interaction with HIV-1 co-receptors has been conducted. Specific amino acid substitutions (E50K for CCR5; F14L, Q22P, and others for CXCR4) that statistically significantly improve the binding energy and complex stability have been identified. These mutant PNOС forms represent promising candidates for further experimental validation of their ability to inhibit viral binding to the target cell and can be considered as a basis for developing new strategies for antiviral therapy.

Keywords: HIV-1, CCR5 and CXCR4 co-receptors, PNOС protein, missense mutations, molecular modeling, binding energy, *in silico*

*Contact: *Shchemelev Aleksandr Nikolaevich, tvildorm@gmail.com*

© Давыденко В.С. и соавт., 2025 г.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Давыденко В.С., Шемелев А.Н., Останкова Ю.В., Тотолян А.А. Селективное усиление связывания белка PNOС с корецепторами ВИЧ-1 CCR5 и CXCR4 под действием миссенс-мутаций: вычислительный анализ и прогноз // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2025. Т. 17, № 4. С. 44–53, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2025-17-4-44-53>.

Conflict of interest: the authors stated that there is no potential of interest.

For citation: Davydenko V.S., Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Totolian A.A. Selective enhancement of PNOС protein binding to HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 by missense mutations: a computational analysis and prediction // *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2025. Vol. 17, No. 4. P. 44–53, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2025-17-4-44-53>.

Введение. ВИЧ-инфекция, вызываемая вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), остается одной из наиболее серьезных проблем глобального общественного здравоохранения. Несмотря на успехи антиретровирусной терапии (АРТ), широкое распространение резистентных штаммов вируса и наличие побочных эффектов от длительного приема препаратов диктуют необходимость поиска новых терапевтических мишеней и стратегий [1–3]. Одним из ключевых и наиболее уязвимых этапов жизненного цикла ВИЧ является проникновение вириона в клетку-мишень. Этот процесс инициируется связыванием вирусного белка оболочки gp120 с клеточным рецептором CD4, что индуцирует конформационные изменения и создает условия для взаимодействия gp120 с корецептором, в роли которых преимущественно функционируют хемокиновые рецепторы CCR5 или CXCR4

[4–6]. Блокада этих корецепторов, по аналогии с естественным механизмом устойчивости, обусловленным делецией CCR5- Δ 32, представляет собой перспективный подход к ингибированию вирусного прикрепления [7, 8].

В рамках поиска новых эндогенных регуляторов взаимодействия ВИЧ с клеткой-хозяином ранее был проведен многоэтапный биоинформатический скрининг. В его ходе белок PNOС (preproposicertin) идентифицирован в качестве одного из наиболее перспективных кандидатов, прошедших ранжирование на основе сетевого анализа, данных о тканевой коэкспрессии и сходства вовлеченных биологических путей с путями рецепторов CCR5, CXCR4, CCR2 и CD4 с последующей верификацией физического взаимодействия обнаруженных белков посредством моделирования в AlphaFold [9–11].

PНОС кодирует прекурсорный белок, который подвергается протеолитическому процессингу с образованием нескольких биологически активных пептидов, наиболее изученным из которых является ноцицептин (orphanin FQ) [12, 13].

Ноцицептин является эндогенным лигандом рецептора NOP (nociceptin opioid peptide receptor), принадлежащего к семейству опиоидных рецепторов. PНОС и его пептиды играют роль в регуляции широкого спектра физиологических процессов, включая модуляцию боли, стресс-ответ, тревожность, а также функции иммунной системы [14, 15]. Примечательно, что рецептор NOP, как и CCR5/CXCR4, принадлежит к надсемейству рецепторов, связанных с G-белками (GPCR), что указывает на потенциальную структурную и, возможно, функциональную пластичность относительно лигандов [16, 17].

В результате молекулярного моделирования с использованием алгоритма AlphaFold было предсказано взаимодействие белка PНОС с корецепторами CCR5 и CXCR4 [11, 18]. При анализе построенных моделей установлено, что относительно линейная структура PНОС способна формировать интерфейсы связывания с различными доменами рецепторов. Важно отметить, что в данных *in silico* условиях, без учета липидного бислоя, PНОС формировал контакты как с внеклеточными, так и с внутриклеточными участками CCR5 и CXCR4, что, вероятно, представляет собой артефакт моделирования изолированных белков и маловероятно в физиологическом контексте.

Несмотря на это ограничение, полученные модели представляют ценность для исследования. В-первых, они служат уникальным инструментом для изучения молекулярных основ взаимодействия PНОС с корецепторами и идентификации аминокислотных остатков, критически важных для связывания. Во-вторых, функционально активные варианты, по аналогии с полиморфизмом CCR5-Δ32, потенциально способны модулировать восприимчивость к ВИЧ-инфекции, открывая перспективы для выявления естественных механизмов устойчивости [19, 20].

Таким образом, основной целью данного исследования являлась оценка влияния естественных миссенс-мутаций белка PНОС на стабильность и энергию связывания его комплексов с корецепторами ВИЧ-1 CCR5 и CXCR4 для идентификации вариантов с потенциально повышенной аффинностью, которые могли бы рассматриваться

в качестве кандидатов для роли ингибиторов вирусного проникновения.

Цель. Провести систематический *in silico* анализ влияния естественных миссенс-мутаций белка PНОС на стабильность и энергию связывания его комплексов с корецепторами ВИЧ-1 CCR5 и CXCR4 для идентификации вариантов с потенциально повышенной аффинностью.

Материалы и методы. Построение и подготовка базовой модели комплекса. Трехмерные структуры комплексов белка PНОС дикого типа (AAV38141.1) с рецепторами CCR5 (NP_001381712.1) и CXCR4 (EAX11616.1) были построены с использованием алгоритма AlphaFold Server [18]. Полученную модель дикого типа подвергли оптимизации с помощью процедуры «Repair PDB» в программе FoldX [21], интегрированной в пакет молекулярного моделирования YASARA [22] с целью устранения стерических конфликтов и стабилизации структуры в условиях *in silico* среды.

Отбор миссенс-мутаций и моделирование мутантных вариантов. Из базы данных UniProt получены сведения о несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмах белка PНОС [23]. Для дальнейшего анализа были отобраны мутации, локализованные в предсказанных сайтах контакта с рецепторами CCR5 и CXCR4. Модели мутантных вариантов были получены из энергетически оптимизированной структуры дикого типа с помощью алгоритма встроенного мутагенеза в FoldX.

Расчет свободной энергии взаимодействия между белками в комплексе. Для количественной оценки эффекта мутаций проведен расчет свободной энергии для всех полученных моделей с использованием алгоритма FoldX. Для каждой модели рассчитывались энергия стабильности комплекса (Complex Stability) и энергия взаимодействия между партнерами в комплексе (Connection energy). На основе этих расчетов определялась разница энергий (Δ Stability, Δ Connection) между мутантным и диким типом для каждого параметра.

Анализ интерфейса взаимодействия. Для всех смоделированных комплексов в программе UCSF ChimeraX [24] провели анализ интерфейса взаимодействия с подсчетом общего количества атомарных контактов и водородных связей. Рассчитывали суммарное число контактов (Σ Contacts = Контакты — стерические столкновения + водородные связи). Полученные значения

сравнивали с таковыми для комплексов дикого типа (Δ Contacts).

Предсказание функциональной значимости мутаций. Для каждого полиморфного варианта с помощью алгоритма PolyPhen-2 выполнили прогноз функциональной значимости и потенциального нарушения функции белка [25]. Замены классифицировались как «probably damaging», «possibly damaging» и «benign».

Критерии оценки потенциально значимых мутаций. Для идентификации мутаций, представляющих наибольший интерес в контексте поиска естественных модуляторов взаимодействия ВИЧ с клеткой-хозяином, был применен комплексный критерий. Его целью являлось выявление вариантов, сочетающих повышенную стабильность комплекса и улучшенную энергию взаимодействия внутри комплекса с сохранением исходной функциональности белка и аналогичным или увеличенным количеством контактов. Соответственно, мутантный вариант PНОС классифицировали как потенциально значимый при одновременном выполнении следующих условий: снижение энергии стабильности комплекса (Δ Stability < 0) и энергии взаимодействия (Δ Connection < 0), сохранение или увеличение количества суммарных контактов (Δ Contacts \geq 0), а также прогноз функционального эффекта как «benign» согласно PolyPhen-2.

Результаты и их обсуждение. В процессе исследования построены и проанализированы *in silico* модели комплексов белка PНОС дикого типа с рецепторами CCR5 и CXCR4. В ходе моделирования показано, что PНОС формирует обширные интерфейсы взаимодействия с обоими корецепторами, однако энергетические профили этих комплексов существенно различались. Энергия стабильности комплекса PНОС-CCR5 дикого типа составляла 71,91 ккал/моль, а энергия взаимодействия между белками в комплексе (Connection energy) – 23,47 ккал/моль. В то же время для комплекса PНОС–CXCR4 дикого типа энергия стабильности комплекса была значительно ниже (37,63 ккал/моль), а энергия взаимодействия в комплексе существенно более отрицательной (–42,12 ккал/моль). Эти данные свидетельствуют о более высокой предсказанной аффинности PНОС к рецептору CXCR4 в условиях моделирования по сравнению с CCR5. При анализе интерфейсов взаимодействия обнаружено 200 суммарных контактов для комплекса с CCR5 и 231 кон-

такт для комплекса с CXCR4, что дополнительно подтверждает более обширное взаимодействие с последним.

Для комплекса PНОС-CCR5 обнаружен ограниченный набор мутаций, улучшающих связывание. Анализ 30 миссенс-мутаций PНОС в контексте комплекса с CCR5 показал, что большинство замен либо не оказывали значительного влияния на параметры связывания, либо приводили к их ухудшению. В результате отбора по комплексному критерию идентифицирован единственный кандидат — мутация E50K, для которой показано снижение энергии стабильности комплекса на 3,11 ккал/моль и улучшение энергии взаимодействия на 1,57 ккал/моль при сохранении количества контактов и статусе «benign». При анализе мутаций, соответствующих трем из четырех критериев, идентифицированы перспективные варианты с различными профилями. Для мутации T59I продемонстрировано значительное улучшение энергетических параметров (Δ Stability = –1,74, Δ Connection = –0,96) и увеличение количества контактов, однако данная мутация была предсказана как «possibly damaging». У мутации T59A зарегистрировано улучшение энергии взаимодействия между белками в комплексе при статусе «benign», но с выявленным снижением количества контактов. Для мутаций F14L и Q22P показан статус «benign» и продемонстрировано умеренное улучшение показателя энергии стабильности комплекса, однако первая мутация сопровождалась снижением количества контактов, а вторая — незначительным ухудшением энергии взаимодействия. У мутации M161T сохранились все параметры на уровне, близком к дикому типу, со статусом «benign». Особый интерес представляет мутация R148W, для которой зарегистрировано наибольшее улучшение энергии взаимодействия между белками (Δ Connection = –1,75) среди всех изученных вариантов, однако статус данной мутации «probably damaging». Данные по всем проанализированным мутациям PНОС для комплексов с CCR5 представлены в табл. 1.

Для комплекса PНОС-CXCR4 обнаружен широкий спектр стабилизирующих мутаций. Анализ 40 миссенс-мутаций PНОС в комплексе с CXCR4 позволил выявить значительно большее количество функционально значимых вариантов по сравнению с CCR5. Четыре мутации полностью удовлетворяли строгим критериям отбора: F14L, S20N, R23K и V43M, продемонстрировали улучшение энергии взаимодействия между белками при

сохранении или улучшении остальных параметров и статусе «benign». Среди них у F14L показано наибольшее снижение энергии стабильности комплекса ($-2,21$ ккал/моль).

действия между белками ($-4,54$ и $-1,99$ ккал/моль соответственно) при увеличении количества контактов, но данные мутации были определены алгоритмом как «probably damaging». Для мутаций

Таблица 1

Разница (Δ) энергии стабильности, энергии взаимодействия и контактов между белками комплексов мутантных форм PNOС и CCR5 относительно аналогичного комплекса белков дикого типа, а также функциональный эффект мутаций белка PNOС

Table 1

Difference (Δ) in stability energy, interaction energy, and contact numbers between proteins in complexes of PNOС mutant forms and CCR5 relative to the analogous wild-type protein complex, as well as the functional effect of PNOС protein mutations

Мутация	Δ Stability	Δ Connect	Δ Contacts	Функциональный эффект
F14L	-0,23	-0,09	-5	Нейтральный
F18Y	0,06	0	-2	Потенциально нарушающий
S20N	1,77	0,34	0	Нейтральный
Q22P	-0,53	0,27	1	Нейтральный
L26V	1,64	0,73	-7	Нейтральный
E49D	3,47	2,51	-9	Высоковероятно нарушающий
E50D	0,7	0,36	2	Нейтральный
E50K	-3,11	-1,57	0	Нейтральный
V52G	0,95	-0,29	-3	Потенциально нарушающий
P54L	7,43	6,17	12	Нейтральный
P54R	7,6	4,77	-10	Нейтральный
P54S	2,63	1,85	-10	Нейтральный
T59A	-1,09	-0,5	-9	Нейтральный
T59I	-1,74	-0,96	2	Потенциально нарушающий
T62S	0,21	0,27	-1	Нейтральный
R148G	1,16	0,03	-3	Высоковероятно нарушающий
R148Q	-0,05	0,3	-9	Высоковероятно нарушающий
R148W	-0,66	-1,75	6	Высоковероятно нарушающий
E151K	0,5	0,58	0	Высоковероятно нарушающий
F152L	-0,73	-0,82	-11	Высоковероятно нарушающий
M153K	2,55	1,54	0	Высоковероятно нарушающий
M153L	0,06	0,74	1	Потенциально нарушающий
M153V	1,48	1,4	-1	Нейтральный
R154K	-0,36	0,15	-7	Высоковероятно нарушающий
Q155E	1,21	0,58	3	Потенциально нарушающий
Q155R	1,57	1,85	-10	Потенциально нарушающий
Y156H	-1,16	-1,08	-7	Высоковероятно нарушающий
L157F	-0,78	-0,86	-1	Высоковероятно нарушающий
L159P	0,19	0,91	-4	Высоковероятно нарушающий
M161T	-0,02	0,09	0	Нейтральный

Среди вариантов, соответствующих трем из четырех критериев, мутация Q22P отмечена в связи со значительным улучшением энергетических параметров (Δ Stability = $-4,05$, Δ Connection = $-3,62$) при статусе «benign», несмотря на снижение количества контактов. У мутаций G135R и S139L обнаружили максимальное улучшение энергии взаимо-

V17A и Q155R констатировали умеренное улучшение энергии взаимодействия при статусе «benign», но для первой не обнаружено значимого изменения стабильности комплекса, а для второй наблюдали снижение количества контактов.

Для V43L, хоть и не соответствующей основным критериям, показано усиление взаимодействие в ком-

плексе и значительное увеличение количества контактов (+8) при статусе «benign». При этом F14L — единственный вариант с улучшающими параметрами связыва-

ния для обоих рецепторов одновременно. Данные по всем проанализированным мутациям PNOС для комплексов с CXCR4 представлены в табл. 2.

Таблица 2

Разница (Δ) энергии стабильности, энергии взаимодействия и контактов между белками комплексов мутантных форм PNOС и CXCR4 относительно аналогичного комплекса белков дикого типа, а также функциональный эффект мутаций белка PNOС

Table 2

Difference (Δ) in stability energy, interaction energy, and contact numbers between proteins in complexes of PNOС mutant forms and CXCR4 relative to the analogous wild-type protein complex, as well as the functional effect of PNOС protein mutations

Мутация	Δ Stability	Δ Connect	Δ Contacts	Функциональный эффект
S12N	0,57	-0,3	0	Потенциально нарушающий
F14L	-2,21	-0,56	0	Нейтральный
V17A	-0,5	-0,01	0	Потенциально нарушающий
F18Y	1,23	0,62	1	Потенциально нарушающий
S20N	-0,08	-0,25	2	Нейтральный
Q22P	-4,05	-3,62	-10	Нейтральный
R23K	-0,34	-0,08	0	Нейтральный
D40N	4,33	0,84	-1	Нейтральный
D40Y	4,81	-1,03	8	Потенциально нарушающий
E42Q	0,29	0,26	-3	Нейтральный
V43L	0,2	0,44	8	Нейтральный
V43M	-0,27	-1,19	1	Нейтральный
E49D	0,44	-0,09	-5	Высоковероятно нарушающий
E50D	-0,33	0,18	-9	Нейтральный
E50K	8,14	7,38	5	Нейтральный
P56L	0,38	0,14	0	Высоковероятно нарушающий
P56R	0,73	0,28	0	Высоковероятно нарушающий
R129K	0,16	0,07	-3	Высоковероятно нарушающий
G131V	1,58	-0,02	0	Высоковероятно нарушающий
G135R	-3,28	-4,54	9	Высоковероятно нарушающий
R137W	-1,43	-1,26	-8	Высоковероятно нарушающий
S139L	-3,04	-1,99	2	Высоковероятно нарушающий
R141K	0,92	1,11	-2	Высоковероятно нарушающий
L143S	0,94	3,18	0	Высоковероятно нарушающий
L143V	1,05	0,83	-3	Высоковероятно нарушающий
R148G	2,03	1,41	-9	Высоковероятно нарушающий
R148Q	0,49	1	-9	Высоковероятно нарушающий
R148W	0,12	0,58	-4	Высоковероятно нарушающий
F152L	0,08	-0,03	-4	Высоковероятно нарушающий
Q155E	0,01	0,05	-4	Потенциально нарушающий
Q155R	-0,45	-0,32	4	Потенциально нарушающий
Y156H	1,08	-0,17	3	Высоковероятно нарушающий
L159P	4,36	1,22	-5	Высоковероятно нарушающий
S163T	0,3	-0,36	0	Потенциально нарушающий
R167L	-0,01	0,11	0	Высоковероятно нарушающий
R167P	2,73	0,11	-3	Высоковероятно нарушающий
R167Q	0,43	0,11	0	Высоковероятно нарушающий
R167W	0,21	0,08	0	Высоковероятно нарушающий
L170P	1,81	0,01	-2	Высоковероятно нарушающий

Выявлены мутации с селективным и противоположным действием на связывание с разными корцепторами. Наиболее показательным примером служит мутация E50K. Как отмечено выше, для CCR5 она классифицирована как улучшающая. Однако в комплексе с CXCR4 эта же мутация проявляет резко негативный эффект, значительно повышая энергию взаимодействия ($\Delta\text{Connection} = +7,38$ ккал/моль) и дестабилизируя комплекс ($\Delta\text{Stability} = +8,14$ ккал/моль). Эти данные подчеркивают критическую роль остатка Glu50 для связывания с CXCR4 и его негативный вклад во взаимодействие с CCR5. Другой пример — мутация G135R, которая кардинально улучшает связывание с CXCR4, но практически не влияет на комплекс с CCR5. Таким образом, полученные результаты позволяют не только идентифицировать мутации, универсально усиливающие аффинность, но и выделить замены, которые могут избирательно блокировать один корцептор, не затрагивая другой.

Проведенное *in silico* исследование представляет собой систематический анализ влияния естественных миссенс-мутаций белка PНОС на его потенциальную способность к взаимодействию с корцепторами ВИЧ-1 CCR5 и CXCR4. Полученные результаты требуют интерпретации в контексте фундаментальных представлений о механизмах вирусного проникновения и пластичности белок-белковых взаимодействий.

Прежде всего, выявленные различия в энергетических профилях комплексов дикого типа согласуются с данными о высокой конформационной пластичности хемокиновых рецепторов и их способности взаимодействовать с широким спектром лигандов [19, 20]. Значительно более высокая предсказанная аффинность PНОС к CXCR4, по сравнению с CCR5, позволяет предположить потенциальную роль этого белка в качестве естественного модулятора, в первую очередь для Х4-тропных штаммов ВИЧ-1.

Основной результат работы заключается в демонстрации того, что отдельные аминокислотные замены способны существенно модифицировать энергетический ландшафт взаимодействия PНОС с корцепторами. Согласно устоявшимся представлениям, изменение свободной энергии связывания на величину ≈ 1 ккал/моль считается биологически значимым [26]. Однако интерпретация данного показателя должна проводиться с осторожностью, поскольку указанный критерий характерен для *in vivo* моделей, а не для смоделированных *in*

silico условиях, где точность и биологическая значимость изменений могут отличаться из-за ограничений моделей и условий эксперимента. В данном исследовании для множества мутаций получены значения $\Delta\text{Connection energy}$, превышающие этот порог (например, G135R: $-4,54$ ккал/моль для CXCR4; E50K: $-1,57$ ккал/моль для CCR5), что указывает на качественное изменение функционального потенциала белка.

Повышенная стабильность комплекса PНОС с корцептором, характеризуемая более отрицательными значениями $\Delta\text{Stability}$ и $\Delta\text{Connection}$, свидетельствует об увеличении времени жизни этого комплекса [27]. Для эффективного блокирования прикрепления ВИЧ это критически важно, так как вирусная частица, сталкиваясь с занятым рецептором, будет неспособна к связыванию [28]. Более медленная диссоциация лиганда, которая часто коррелирует со стабильностью комплекса [29, 30], может обуславливать продолжительное блокирование сайта связывания для вирусного белка gp120 даже в условиях флуктуирующих концентраций пептидов *in vivo*.

Особый интерес представляет выявление мутаций с селективным действием. Мутация E50K, улучшающая связывание с CCR5 и резко ухудшающая его с CXCR4, демонстрирует, как точечная замена может изменить рецепторную специфичность. Этот вывод указывает на потенциальную возможность конструирования селективных блокаторов и требует дальнейшего структурного анализа.

Следует, однако, отметить ограниченную предсказательную силу отдельных параметров. Ярким примером является мутация Q22P для комплекса с CXCR4, которая демонстрирует одно из наиболее значительных улучшений энергии взаимодействия между белками, несмотря на снижение общего количества контактов. Этот факт подчеркивает преобладание влияния качества взаимодействий над их количеством [31, 32] и свидетельствует о необходимости более детального анализа природы и геометрии контактов.

Важным аспектом интерпретации является функциональный прогноз PolyPhen-2. Мутации, предсказанные как «probably damaging» (например, G135R для CXCR4), могут сохранять или усиливать связывающую способность, при этом нарушая нативную сигнальную функцию PНОС. В контексте создания ингибитора вирусного проникновения это можно рассматривать как желательное свойство, позволяющее избежать нежелательной

активации сигнальных путей. В то же время «benign»-мутации (такие как E50K для CCR5 или F14L/V43M для CXCR4) представляют особый интерес для изучения естественных механизмов модуляции восприимчивости к ВИЧ.

Примечательно, что F14L оказалась единственной мутацией, улучшающей параметры связывания для обоих рецепторов одновременно. Более широкий спектр усиливающих аффинность замен, выявленный для CXCR4, вероятно, обусловлен как большим количеством анализированных мутаций в этом локусе, так и фундаментальными особенностями биологии этих систем. В частности, известно, что PНОС и CXCR4 демонстрируют совместную экспрессию в ряде тканей (например, в центральной нервной системе) в отсутствие CCR5 [10], что гипотетически могло создать предпосылки для формирования более варибельного и пластичного интерфейса взаимодействия между ними.

Таким образом, перспективным направлением дальнейших исследований представляется экспериментальная верификация влияния идентифицированных мутантных форм PНОС на функциональную активность рецепторов CCR5 и CXCR4, и, что наиболее важно, на их способность опосредовать прикрепление и проникновение ВИЧ-1 в клетки-мишени.

Заключение. В настоящем исследовании методом молекулярного моделирования впервые проведен систематический *in silico* анализ влияния естествен-

ных миссенс-мутаций белка PНОС на стабильность его комплексов с корецепторами ВИЧ-1 CCR5 и CXCR4. Было показано, что профиль взаимодействия PНОС дикого типа различается для двух рецепторов и характеризуется более высокой предсказанной аффинностью к CXCR4. Идентифицирован ряд мутаций, способных улучшать энергетические параметры связывания. Для CCR5 перспективным кандидатом выступает мутация E50K, тогда как для CXCR4 обнаружен более широкий спектр значимых замен, включая Q22P и F14L. Особый интерес представляют мутация F14L как единственный вариант, улучшающий связывание с обоими рецепторами, а также мутация E50K, демонстрирующая селективное действие. Выявленные мутантные формы, которые сочетают улучшенную аффинность с сохранением или улучшением структурного интерфейса, представляют интерес для дальнейшей экспериментальной проверки их способности влиять на процесс прикрепления ВИЧ-1 и дальнейшего изучения в контексте поиска новых механизмов регуляции вирусной инфекции.

* * *

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24–25–00479 от 29 декабря 2023 г. по теме «Оценка потенциальной значимости генетических факторов хозяина в инфицировании вирусом иммунодефицита человека и развитии заболевания». <https://rscf.ru/project/24-25-00479>.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019. Т. 11, № 4. С. 79–90. [Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. Molecular epidemiology and pharmaco-resistance of HIV in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2019, Vol. 11, No. 4, pp. 79–90 (In Russ.)]. doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90>.
2. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Семенова Д.А., Давыденко В.С., Тотолян А.А. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022. Т. 99, № 1. С. 28–37. [Schemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Semenova D.A., Davydenko V.S., Totolian A.A. Genetic diversity and drug resistance mutations of HIV-1 in Leningrad Region. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, Vol. 99, No. 1, pp. 28–37 (In Russ.)]. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-216>.
3. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Чурина М.А., Виrolайнен П.А., Тотолян А.А. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области // *Вопросы вирусологии*. 2022. Т. 67, № 4. С. 310–321. [Schemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Churina M.A., Virolainen P.A., Totolian A.A. Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region. *Problems of Virology*, 2022, Vol. 67, No. 4, pp. 310–321 (In Russ.)]. doi: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>.
4. Schemelev A.N., Davydenko V.S., Ostankova Yu.V., Reingardt D.E., Serikova E.N., Zueva E.B., Totolian A.A. Involvement of Human Cellular Proteins and Structures in Realization of the HIV Life Cycle: A Comprehensive Review // *Viruses*. 2024. Vol. 16, No. 11. P. 1682. doi: <https://doi.org/10.3390/v16111682>.

5. Moore J., Trkola A., Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry // *Current Opinion in Immunology*. 1997. Vol. 9. P. 551–562. doi: [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(97\)80110-0](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80110-0).
6. Yoon V., Fridkis-Hareli M., Munisamy S., Lee J., Anastasiades D., Stevceva L. The GP120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells // *Current Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 17, No. 8. P. 741–749. doi: [10.2174/092986710790514499](https://doi.org/10.2174/092986710790514499).
7. Ansari A.W., Heiken H., Moenkemeyer M., Schmidt R. E. Dichotomous effects of C-C chemokines in HIV-1 pathogenesis // *Immunology Letters*. 2007. Vol. 110. P. 1–5. doi: [10.1016/j.imlet.2007.02.012](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.02.012).
8. Garcia-Perez J., Rueda P., Staropoli I., Kellenberger E., Alcami J., Arenzana-Seisdedos F., Lagane B. New insights into the mechanisms whereby low molecular weight CCR5 ligands inhibit HIV-1 infection // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286. P. 4978–4990. doi: [10.1074/jbc.M110.168955](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168955).
9. Давыденко В.С., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Ануфриева Е.В., Кушнарева В.В., Тотолян А.А. Выявление генов человека, взаимодействующих с рецепторами прикрепления ВИЧ и потенциально участвующих в патогенезе заболевания, на основе мультисетового биоинформатического анализа // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2024. Т. 16, № 4. С. 28–44. [Davydenko V.S., Ostankova Yu.V., Schemelev A.N., Anufrieva E.V., Kushnareva V.V., Totolian A.A. Identification of human genes interacting with HIV attachment receptors and potentially involved in disease pathogenesis based on multi-network bioinformatics analysis. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2024, Vol. 16, No. 4, pp. 28–44 (In Russ.).] doi: [10.22328/2077-9828-2024-16-4-28-44](https://doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-4-28-44).
10. Davydenko V.S., Ostankova Yu.V., Schemelev A.N., Anufrieva E.V., Kushnareva V.V., Totolian A.A. Bioinformatically analyzed relationships between specific human genes associated with HIV attachment // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2024. Vol. 14, No. 6. P. 1153–1168. doi: [10.15789/2220-7619-BAR-17830](https://doi.org/10.15789/2220-7619-BAR-17830).
11. Davydenko V.S., Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Anufrieva E.V., Totolian A.A. Modeling Human Protein Physical Interactions Involved in HIV Attachment In Silico // *International Journal of Molecular Sciences*. 2025. Vol. 26, No. 22. P. 11209. doi: [10.3390/ijms262211209](https://doi.org/10.3390/ijms262211209).
12. Allen R., Peng B., Pellegrino M., Miller E., Grandy D., Lundblad J., Washburn C., Pintar J. Altered Processing of Pro-Orphanin FQ/Nociceptin and Pro-Opiomelanocortin-Derived Peptides in the Brains of Mice Expressing Defective Prohormone Convertase 2 // *The Journal of Neuroscience*. 2001. Vol. 21, No. 16. P. 5864–5870. doi: [10.1523/jneurosci.21-16-05864.2001](https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-05864.2001).
13. Arjomand J., Evans C. Differential splicing of transcripts encoding the orphanin FQ/nociceptin precursor // *Journal of Neurochemistry*. 2001. Vol. 77. P. 720–729. doi: [10.1046/j.1471-4159.2001.00219.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00219.x).
14. Ubaldi M., Cannella N., Borruto A., Petrella M., Di Bonaventura M., Soverchia L., Stopponi S., Weiss F., Cifani C., Ciccocioppo R. Role of Nociceptin/Orphanin FQ-NOP Receptor System in the Regulation of Stress-Related Disorders // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, No. 23. P. 12956. doi: [10.3390/ijms222312956](https://doi.org/10.3390/ijms222312956).
15. Palmer C., Meyrath M., Canals M., Kostenis E., Chevigné A., Szpakowska M. Atypical opioid receptors: unconventional biology and therapeutic opportunities // *Pharmacology & Therapeutics*. 2022. Vol. 232. P. 108014. doi: [10.1016/j.pharmthera.2021.108014](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108014).
16. Miller R., Thompson A., Trapella C., Guerrini R., Malfacini D., Patel N., Han G., Cherezov V., Calo G., Katritch V., Stevens R. The Importance of Ligand-Receptor Conformational Pairs in Stabilization: Spotlight on the N/OFQ G Protein-Coupled Receptor // *Structure*. 2015. Vol. 23, No. 12. P. 2291–2299. doi: [10.1016/j.str.2015.07.024](https://doi.org/10.1016/j.str.2015.07.024).
17. Preti D., Calo G., Guerrini R. NOP-Targeted Peptide Ligands // *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2019. Vol. 254. P. 237–270. doi: [10.1007/164_2018_198](https://doi.org/10.1007/164_2018_198).
18. Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., Willmore L., Ballard A.J., Bambrick J., Bodenstein S.W., Evans D.A., Hung C.C., O'Neill M., Reiman D., Tunyasuvunakool K., Wu Z., Žemgulytė A., Arvaniti E., Beattie C., Bertolli O., Bridgland A., Cherepanov A., Congreve M., Cowen-Rivers A.I., Cowie A., Figurnov M., Fuchs F. B., Gladman H., Jain R., Khan Y.A., Low C.M.R., Perlin K., Potapenko A., Savy P., Singh S., Stecula A., Thillaisundaram A., Tong C., Yakneen S., Zhong E.D., Zielinski M., Židek A., Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J.M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // *Nature*. 2024. Vol. 630, No. 8016. P. 493–500. doi: [10.1038/s41586-024-07487-w](https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w).
19. Macdonald-Obermann J., Pike L. Extracellular domain mutations of the EGF receptor differentially modulate high-affinity and low-affinity responses to EGF receptor ligands // *Journal of Biological Chemistry*. 2024. Vol. 300. P. 105763. doi: [10.1016/j.jbc.2024.105763](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105763).
20. Morningstar-Kywi N., Haworth I., Mosley S. Ligand-specific pharmacogenetic effects of nonsynonymous mutations // *Pharmacogenetics and Genomics*. 2020. Vol. 30, No. 8. P. 167–177. doi: [10.1097/FPC.0000000000000424](https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000424).
21. Schymkowitz J., Borg J., Stricher F., Nys R., Rousseau F., Serrano L. The FoldX web server: an online force field // *Nucleic Acids Research*. 2005. Vol. 33, Web Server issue. P. W382–W388. doi: [10.1093/nar/gki387](https://doi.org/10.1093/nar/gki387).
22. Krieger E., Vriend G. YASARA View — molecular graphics for all devices — from smartphones to workstations // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, No. 20. P. 2981–2982. doi: [10.1093/bioinformatics/btu426](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426).
23. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025 // *Nucleic Acids Research*. 2025. Vol. 53, Database issue. P. D609–D617. doi: [10.1093/nar/gkae1010](https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010).

24. Meng E.C., Goddard T.D., Pettersen E.F., Couch G.S., Pearson Z.J., Morris J.H., Ferrin T.E. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis // *Protein Science*. 2023. Vol. 32, No. 10. P. e4792. doi: 10.1002/pro.4792
25. Adzhubei I., Jordan D. M., Sunyaev S. R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2 // *Current Protocols in Human Genetics*. 2013. Vol. 76. P. 7.20.1–7.20.41. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76
26. Suruzhon M., Bodnarchuk M., Ciancetta A., Viner R., Wall I., Essex J. Sensitivity of binding free energy calculations to initial protein crystal structure // *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2021. Vol. 17, No. 3. P. 1806–1821. doi: 10.1021/acs.jctc.0c00972
27. Toyama B., Savas J., Park S., Harris M., Ingolia N., Yates J., Hetzer M. Identification of long-lived proteins reveals exceptional stability of essential cellular structures // *Cell*. 2013. Vol. 154, No. 5. P. 971–982. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.037.
28. Xiao T., Cai Y., Chen B. HIV-1 entry and membrane fusion inhibitors // *Viruses*. 2021. Vol. 13, No. 5. P. 735. doi: 10.3390/v13050735.
29. Garda Z., Nagy V., Rodríguez-Rodríguez A., Pujales-Paradela R., Patinec V., Angelovski G., Tóth É., Kálmán F., Esteban-Gómez D., Tripier R., Platas-Iglesias C., Tircsó G. Unexpected trends in the stability and dissociation kinetics of lanthanide(III) complexes with cyclen-based ligands across the lanthanide series // *Inorganic Chemistry*. 2020. Vol. 59, No. 9. P. 6242–6260. doi: 10.1021/acs.inorgchem.0c00520.
30. Gustavsson M., Dyer D., Zhao C., Handel T. Kinetics of CXCL12 binding to atypical chemokine receptor 3 reveal a role for the receptor N terminus in chemokine binding // *Science Signaling*. 2019. Vol. 12, No. 606. P. eaaw3657. doi: 10.1126/scisignal.aaw3657.
31. Ferenczy G., Kellermayer M. Contribution of hydrophobic interactions to protein mechanical stability // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022. Vol. 20. P. 1946–1956. doi: 10.1016/j.csbj.2022.04.025.
32. Koehl P., Delarue M. Polar and nonpolar atomic environments in the protein core: implications for folding and binding // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1994. Vol. 20, No. 3. P. 264–278. doi: 10.1002/prot.340200307.

Поступила в редакцию/Received by the Editor: 22.11.2025 г.

Авторство: вклад в концепцию и план исследования — Ю. В. Останкова, В. С. Давыденко, А. А. Толоян. Вклад в сбор данных — В. С. Давыденко, Ю. В. Останкова, А. Н. Щемелев. Вклад в анализ данных и выводы — В. С. Давыденко, Ю. В. Останкова, А. Н. Щемелев. Вклад в подготовку рукописи — В. С. Давыденко, Ю. В. Останкова, А. Н. Щемелев, А. А. Толоян.

Сведения об авторах:

Давыденко Владимир Сергеевич — младший научный сотрудник лаборатории вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции, аспирант федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: vladimir_david@mail.ru; ORCID 0000–0003–0078–9681;

Щемелев Александр Николаевич — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: tvildorm@gmail.com; ORCID 0000–0002–3139–3674;

Останкова Юлия Владимировна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: shenna1@yandex.ru; ORCID 0000–0003–2270–8897;

Толоян Арег А. — академик Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: totolian@pasteurorg.ru; ORCID 0000–0003–4571–8799.