

ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DO RBD-SPIKE DA VARIANTE ÔMICRON DO SARS-COV-2 COM ACE2 POR DINÂMICA MOLECULAR

Raphaella Luisa Fernandes de Almeida, Heberth de Paula, Greiciane Gaburro Paneto.

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, s/nº - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, raphaella.almeida@edu.ufes.br, heberth.paula@ufes.br, greiciane.paneto@ufes.br

Resumo

A infecção pelo SARS-CoV-2 envolve a interação do domínio RBD da proteína *spike* com o receptor ACE2 das células humanas. Este estudo analisa as interações entre o RBD da variante Ômicron do SARS-CoV-2 e o receptor ACE2, utilizando simulações de dinâmica molecular. A estrutura inicial foi obtida do PDB (7KMB) e simulada por 50 ns utilizando o GROMACS 2024.2, a fim de avaliar a estabilidade estrutural e interações-chaves. Os resultados mostram que o complexo RBD manteve uma conformação estável, com flutuações dentro do esperado. A energia média total (\pm SEM) foi de $-32,44 \pm 0,67$ kcal/mol, destacando a importância das interações entre GLN493 e GLU35, além de LYS417 e ASP30 na estabilidade do complexo. Observou-se que, apesar das flutuações nas ligações de hidrogênio e pontes salinas, o complexo permanece funcional e estável, oferecendo *insights* valiosos sobre os mecanismos moleculares subjacentes à infecção pelo SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Bioinformática. Sars-CoV-2. Enzima Conversora de Angiotensina. Dinâmica Molecular.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde.

Introdução

O SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19, tem causado uma crise de saúde global desde o final de 2019 (KHALIL; DA SILVA, 2020). Este vírus pertence à família *Coronaviridae* (SOCIETIES et al., 2010), dentro do gênero *Betacoronavirus* (WOO et al., 2012), que inclui outros vírus como SARS-CoV-1 e MERS-CoV (FIUZA et al., 2020). O genoma do SARS-CoV-2 é composto por uma única fita de RNA de sentido positivo (PASTRIAN-SOTO, 2020), e o vírus codifica quatro proteínas principais: a proteína *spike* (S), a proteína do envelope (E), a glicoproteína da membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (KASMI et al., 2020).

A proteína S é composta por duas subunidades: S1, responsável pela ligação ao receptor celular, e S2, que facilita a fusão da membrana viral com a célula hospedeira (DA SILVA et al., 2023). A infecção celular acontece pela interação do domínio RBD (do inglês *receptor-binding domain*) da subunidade S1 do vírus com o receptor da enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2) da célula alvo (FREITAS; GIOVANETTI; ALCANTARA, 2021). Mutações na proteína S podem alterar a afinidade do vírus pelo receptor celular ou a carga viral eliminada durante o curso da infecção, capazes de implicarem no aumento da transmissão do vírus (TEGALLY et al., 2020).

A variante Ômicron, detectada pela primeira vez em novembro de 2021, se destacou rapidamente devido ao grande número de mutações na proteína S, particularmente no RBD (CALLAWAY, 2021). A compreensão das interações moleculares entre o RBD da variante Ômicron e o ACE2 é, portanto, essencial para avaliar o impacto dessas mutações na dinâmica da infecção e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Diante disso, as simulações de dinâmica molecular permitem uma análise detalhada das flutuações estruturais e das energias de interação ao longo do tempo, fornecendo *insights* sobre os mecanismos que governam a estabilidade e a funcionalidade do complexo. No entanto, apesar dos avanços, ainda há lacunas significativas na compreensão detalhada das interações específicas entre a variante Ômicron e o ACE2. Diante disso, o objetivo deste estudo é realizar uma análise detalhada das interações entre o RBD da variante Ômicron do SARS-CoV-2 e o receptor ACE2 utilizando simulações de dinâmica molecular. Através dessa abordagem, buscamos identificar as principais interações responsáveis pela estabilidade do complexo e como as mutações na variante Ômicron podem influenciar essas interações.

Metodologia

Para investigar a interface entre o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *spike* SARS-CoV-2 e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), a estrutura inicial da variante selvagem foi obtida do banco de dados de proteínas RCSB *Protein Data Bank* (PDB:7KMB).

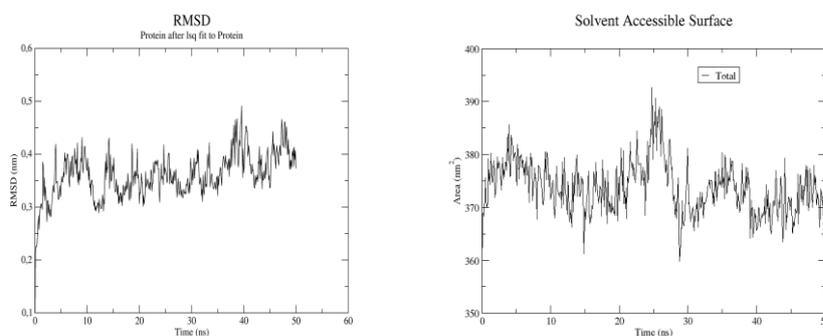
A simulação de dinâmica molecular do complexo RBD:ACE2 foi realizada utilizando o *software* GROMACS 2024.2 (ABRAHAM et al., 2024). O campo de força CHARMM36 (BEST, 2012) foi utilizado para descrever as energias de interação. O complexo foi solvatado em uma caixa dodecaédrica com água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) otimizado e modificado, com uma distância mínima de 3,0 nm entre qualquer átomo de proteína e a borda da caixa. O sistema solvatado foi neutralizado com 0,15 M de NaCl. A minimização da energia foi realizada utilizando o método do gradiente de descida mais íngreme até que a força máxima fosse inferior a 1000 kJ/(mol.nm). O sistema foi submetido a 100 ps de equilíbrio sob as condições de volume constante (NVT) e pressão constante (NPT), a fim de estabilizar a temperatura em 300 K e a pressão em 1,0 N/m².

Após essa etapa de preparação, a simulação de dinâmica molecular foi executada por 50 ns. Para analisar a evolução do sistema ao longo da simulação, a trajetória foi visualizada no *software* Pymol. Além disso, as ferramentas incluídas no GROMACS 2024.2 foram utilizadas nas análises. O desvio quadrático médio (RMSD), a flutuação da raiz quadrada média (RMSF) e a área de superfície acessível ao solvente (SASA) foram determinados. As ligações de hidrogênio e pontes salinas que foram previstas para ocorrer na interface do complexo foram calculadas usando o PLIP (SALENTIN et al., 2015). Em seguida, os dados foram organizados em um mapa de interações, gerado utilizando *in-house scripts* em python, no qual emprega as seguintes bibliotecas: pandas, matplotlib, seaborn e math. A energia média total do sistema (\pm SEM) entre o domínio RBD e a proteína ACE2 foi mensurado através da metodologia PBSA implementado pelo *software* gmx_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

Resultados

Para visualizar a simulação, a trajetória completa do complexo RBD:ACE2 (PDB: 7KMB) ao longo do tempo foi carregada no *software* Pymol. A variação do desvio quadrático médio (RMSD) (Figura 1A) entre 0,3 e 0,4 nm ao longo da simulação indica que o complexo RBD manteve uma conformação estável em relação à estrutura inicial. Durante a simulação de dinâmica molecular, o valor médio da área de superfície acessível ao solvente (SASA) (Figura 1B) do complexo RBD foi aproximadamente constante em torno de 375 nm², sugerindo que o complexo manteve uma conformação relativamente estável ao longo dos 50 ns simulados. Um pico notável no SASA foi observado entre 20 e 30 ns, alcançando o máximo por volta de 25 ns, seguido por uma diminuição em 30 ns. Este comportamento sugere um afastamento temporário das cadeias do complexo, aumentando a exposição ao solvente, seguido por uma reaproximação, o que reforça a ideia de que o complexo RBD experimenta ajustes estruturais, mas retorna a uma conformação estável.

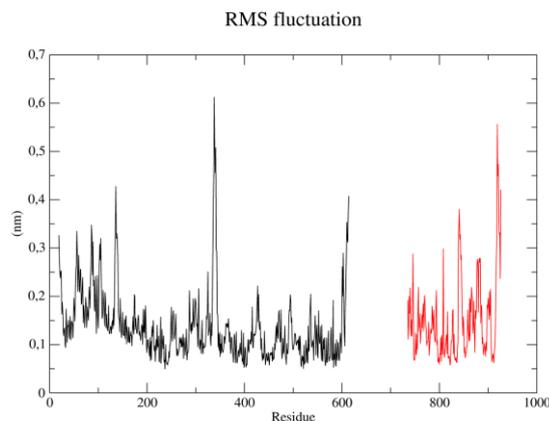
Figura 1 – Gráficos da variação do desvio quadrático médio (RMSD) e área de superfície acessível ao solvente (SASA) do domínio RBD do SARS-CoV-2 ligado à ACE2. (A) Variação (RMSD) do complexo. (B) Variação da área de superfície acessível ao solvente.



Fonte: A autora (2024).

A análise da flutuação quadrática média (RMSF) (Figura 2), revelou picos notáveis em regiões específicas da ACE2, particularmente entre os resíduos 130-140, 335-340 e 610-614. Paralelamente, há flutuações presentes na região do domínio RBD, destacando os resíduos 840-850 e 915-925. Essas regiões correspondem a alças, conhecidas por sua maior flexibilidade estrutural, indicando que as flutuações nessas áreas são esperadas.

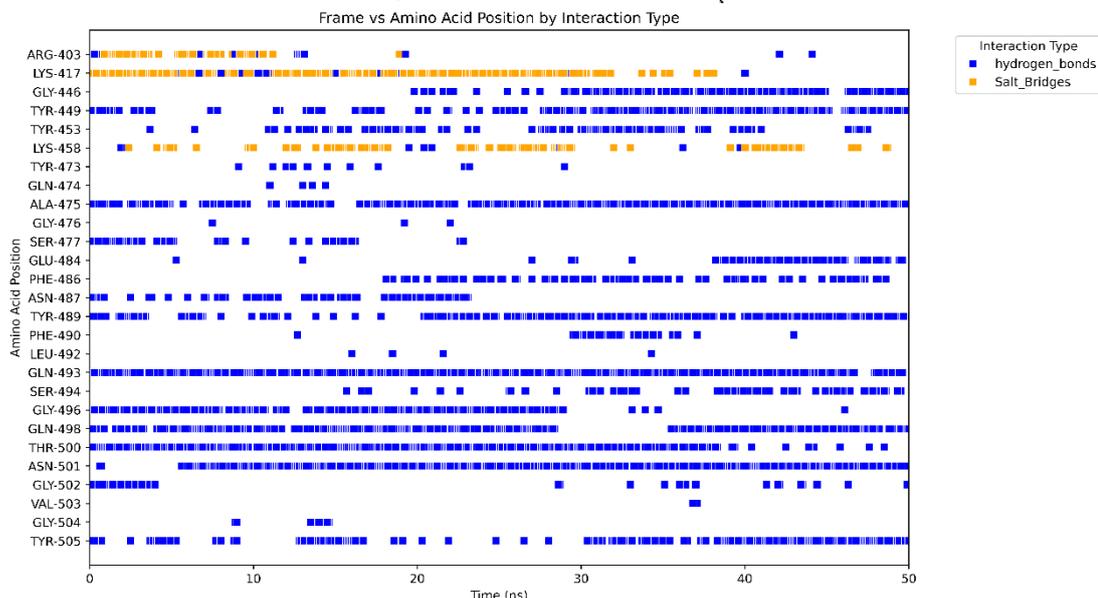
Figura 2 - Análise da flutuação quadrática média (RMSF) dos domínios de ligação ao receptor de pico da variante SARS-CoV-2 (RBD) e da angiotensina humana enzima-2 (ACE2) ao longo da simulação.



Fonte: A autora (2024).

Durante a simulação, o complexo RBD:ACE2 realizou em média 5 ligações de hidrogênio por *frame* decorrer da simulação, as quais mantiveram-se consistentes ao longo do tempo (Figura 3). Além disso, as interações iônicas desempenharam um papel significativo na estabilidade do complexo, com os aminoácidos ARG403, LYS417 e LYS458 do RBD estabelecendo interações com os resíduos correspondentes da ACE2 em 320 *frames* distintos. A análise dessas interações iônicas destacou a importância de LYS417, que formou ligações robustas com ASP30 da ACE2, contribuindo para a estabilidade da interface entre as proteínas.

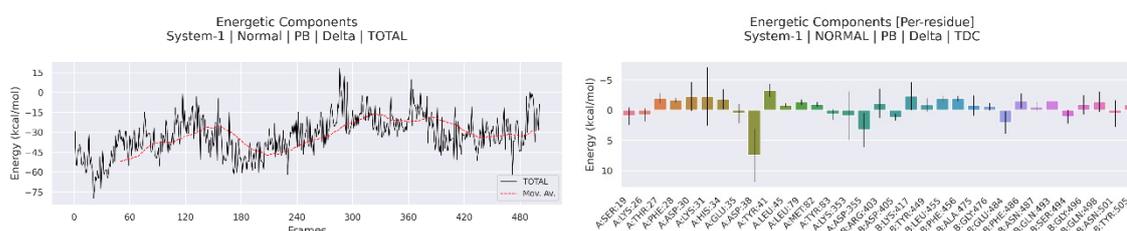
Figura 3 – Análise das ligações de hidrogênio e iônicas entre RBDs de pico variantes e ACE2 humano durante a simulação.



Fonte: A autora (2024).

A análise da energia por resíduo (Figura 4B), indicou que aminoácidos como TYR41, LYS417, ASP30 e LYS31 contribuíram significativamente para a estabilidade do sistema, apresentando valores de energia negativos, o que sugere uma contribuição favorável para a estabilidade do complexo. Por outro lado, resíduos como ASP38, ASP355 e GLU484 mostraram valores de energia positivos, indicando interações que podem desestabilizar o complexo devido à repulsão eletrostática ou outras interações desfavoráveis. A análise do gráfico de energia total do sistema (Figura 4A) ao longo da simulação indicou que o complexo RBD se manteve estável durante o período analisado. A média da energia total foi de $-32,44 \text{ kcal/mol} \pm 0,67 \text{ kcal/mol}$.

Figura 4 – Análise da energia total do sistema (\pm SEM) ao longo da simulação e distribuição da energia por resíduo da ACE2. (A) Energia total do sistema. (B) Energia por resíduo da ACE2.



Fonte: A autora (2024).

Discussão

A simulação de dinâmica molecular realizada para o complexo RBD da variante Ômicron do SARS-CoV-2 fornecem *insights* valiosos sobre a estabilidade estrutural e as interações críticas que sustentam a funcionalidade desse complexo. Os resultados deste estudo mostram que, apesar das flutuações observadas, o complexo manteve uma conformação global estável ao longo dos 50 ns de simulação, o que é consistente com a sua função biológica essencial na entrada viral nas células hospedeiras. As flutuações no desvio quadrático médio (RMSD), variando entre 0,3 e 0,4 nm, refletem ajustes conformacionais que são comuns em sistemas biológicos. Essas flutuações indicam uma flexibilidade adaptativa, permitindo que o complexo responda a pequenas perturbações sem comprometer sua estabilidade global. Esses movimentos locais não apenas reforçam a capacidade do complexo de se adaptar, mas também podem influenciar a eficiência de ligação ao ACE2, com possíveis implicações para a transmissibilidade do vírus.

Pontes salinas também foram relatadas em estudos anteriores entre o resíduo RBD LYS417 e o resíduo ACE2 ASP30 (LAN et al., 2020). A redução das ligações iônicas de LYS417 durante esse intervalo pode ter contribuído para a maior flexibilidade ou movimentação do complexo, resultando no aumento do RMSD. Este resíduo ganha destaque já que a presença das ligações de hidrogênio podem indicar uma reorganização local na estrutura do RBD, onde essas novas interações estabilizam diferentes regiões da proteína.

O resíduo GLY496 estava consistentemente presente no início da simulação, mas sua menor evidência neste intervalo pode sugerir uma redução em sua contribuição para a estabilidade do complexo. Isso pode ter permitido mais flexibilidade na região correspondente, contribuindo para o aumento do RMSD. A ligação de VAL503 com GLN325 da ACE2, que só aparece neste intervalo, pode indicar uma nova interação estabilizadora que se forma durante essa fase da simulação, podendo refletir uma tentativa de reequilibrar o complexo, levando a ajustes conformacionais que resultam na flutuação observada no RMSD.

Na flutuação em particular evidenciada na análise da área de superfície acessível ao solvente (SASA), a região que compreende o intervalo de 20 a 30 ns foi marcada por modificações na formação de interações entre aminoácidos do RBD e a ACE2, momento em que é evidenciado a ausência da ponte salina anteriormente mantida pela ARG403. Estudos anteriores evidenciam que o resíduo ARG403 é responsável pela maior contribuição de energia para a ligação de ACE2 no RBD (PITSILLOU et al., 2022). Paralelamente, observou-se que a LYS458 apresentou redução significativa na formação de pontes salinas, em comparação com intervalos anteriores. A presença deste aminoácido pode

interferir no potencial negativo em relação ao SARS-CoV, por exemplo (WANG; LIU; GAO, 2020). Além disso, a SER477 mostrou uma baixa frequência na formação de ligações de hidrogênio, enquanto a TYR505 também apresentou uma diminuição nas ligações de hidrogênio durante este período. Sabidamente, a TYR505 está envolvida em interações de hidrogênio com um grupo hidroxila polar, outra característica compartilhada com o SARS-CoV (LAN et al., 2020).

Esses dados podem, portanto, explicar a flutuação observada no gráfico de SASA, indicando uma possível correlação entre a diminuição dessas interações e a instabilidade estrutural nessa região do intervalo. Por outro lado, foi observado que a LYS417 presente no RBD estabeleceu uma ligação iônica com ASP30 da ACE2, e em um momento formou simultaneamente uma ligação iônica com ASP30 e uma ligação de hidrogênio com LYS26 da ACE2. Já a ALA475 frequentemente formou uma ligação iônica com GLN24 da ACE2, mas foi evidenciada a formação simultânea de ligações com SER19 e GLN24. Ainda, o THR500 geralmente formava uma ligação de hidrogênio com TYR141, porém foram observadas três interações: ligações de hidrogênio com TYR41 e com ARG357 da ACE2.

Outras interações importantes foram observadas como GLN493 (VIQUE-SÁNCHEZ, 2021), que estabeleceu interações iônicas regulares com LYS31 e GLU35 da ACE2 e ASN501 interagiu com TYR41 da ACE2, além de formar ligações em outros momentos com ASP355. Além dessas interações, foi observado o surgimento de novas ligações iônicas entre PHE486 do RBD e TYR83 da ACE2 durante essa fase, reforçando a ideia de que o pico observado no SASA reflete um período de reestruturação e reorganização das interações intermoleculares. Por outro lado, resíduos como ASP38 e GLU484, dos quais apresentaram valores energéticos positivos, podem contribuir para a instabilidade local devido a repulsões eletrostáticas.

Conclusão

A dinâmica das interações moleculares revelou que o resíduo GLN493 desempenha um papel central na estabilidade do complexo, formando interações de hidrogênio robustas ao longo da simulação, principalmente com GLU35 e LYS31 da ACE2. A identificação de novas interações, como a ligação de VAL503 com GLN325 e a interação entre PHE486 do RBD e TYR83 da ACE2, durante fases específicas da simulação, destaca a complexidade e dinâmica adaptativa do complexo. Essas novas interações podem indicar mecanismos de ajuste conformacional que contribuem para a estabilidade global do sistema, mesmo em face de flutuações estruturais.

Os resultados das simulações de dinâmica molecular realizadas com o complexo RBD da variante Ômicron do SARS-CoV-2 demonstram uma estabilidade estrutural significativa, apesar das flutuações conformacionais observadas. As análises de RMSD e SASA indicam que o complexo mantém uma conformação geral estável, com flutuações que refletem a flexibilidade adaptativa, característica importante para a funcionalidade do RBD na interação com o receptor ACE2. As análises energéticas destacaram aminoácidos críticos, como o resíduo LYS417, cujas interações robustas com ACE2 são fundamentais para a estabilidade da interface. Esses achados fornecem *insights* valiosos sobre as interações intermoleculares que governam a ligação do RBD com a ACE2, contribuindo para um entendimento mais profundo dos mecanismos moleculares subjacentes à infecção pelo SARS-CoV-2 e potencialmente auxiliando no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas.

Referências

- ABRAHAM, M. et al. (2024). GROMACS 2024.2 Manual (2024.2). **Zenodo**. <https://doi.org/10.5281/zenodo.11148638>.
- BEST, R.B. et al. "Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone phi, psi and side-chain chi1 and chi2 dihedral angles," **Journal of Chemical Theory and Computation**, 8: 3257-3273, 2012, PMC3549273.
- CALLAWAY, E. et al. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. **Nature**, v. 600, n. 7887, p. 21, 2021.
- DA SILVA, M. D. H. et al. Principais tipos de coronavírus em humanos, seu diagnóstico e a necessidade de manutenção da vigilância à Covid-19. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 5, p. e12678-e12678, 2023.

- FIUZA, Laís Valéria Rezende et al. Ciclo de replicação e diagnóstico da infecção pelo SARS-COV-2. **Revista Fontes Documentais**, 2020.
- FREITAS, A. R. R.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C. J. Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva. **InterAm J Med Health**, v. 4, p. 1-8, 2021.
- GUIMARÃES, F. G et al. **Integração de dados de expressão gênica e proteômica em redes de interação proteína-proteína de Trypanosoma cruzi**. 2017. Tese de Doutorado.
- JORGENSEN, W. L. et al. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, *79*(2), 926-935. doi:10.1063/1.445869
- KASMI, Y. et al. Coronaviridae: 100,000 years of emergence and reemergence. In: **Emerging and reemerging viral pathogens**. Academic Press, 2020. p. 127-149.
- KHALIL, O. A. K; DA SILVA KHALIL, S. SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 5, p. 473-479, 2020.
- LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **nature**, v. 581, n. 7807, p. 215-220, 2020.
- PASTRIAN-SOTO, G. Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune. **International journal of odontostomatology**, v. 14, n. 3, p. 331-337, 2020.
- PITSILLOU, E. et al. Molecular dynamics simulations highlight the altered binding landscape at the spike-ACE2 interface between the Delta and Omicron variants compared to the SARS-CoV-2 original strain. **Computers in Biology and Medicine**, v. 149, p. 106035, 2022.
- SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Res.** 2015 Jul 1;43(W1):W443-7. doi: 10.1093/nar/gkv315. Epub 2015 Apr 14. PMID: 25873628; PMCID: PMC4489249.
- SANTOS, C. R. et al. A iniciação científica na era da bioinformática: superando desafios em tempos de pandemia. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e7511325852-e7511325852, 2022.
- SOCIETIES, T. V. D. et al. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy. <http://www.ictvonline.org/>, 2010.
- TEGALLY, H. et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. **medrxiv**, p. 2020.12.21.20248640, 2020.
- VALDÉS-TRESANCO, M.S. et al. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2021 17 (10), 6281-6291. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jctc.1c00645>.
- VIQUE-SÁNCHEZ, J. L. Avoiding the Interaction between S-protein of SARS-CoV-2 and ACE2, to Develop an Adjuvant Antiviral by Molecular Docking. 2021.
- WANG, Y.; LIU, M.; GAO, J. Enhanced receptor binding of SARS-CoV-2 through networks of hydrogen-bonding and hydrophobic interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 25, p. 13967-13974, 2020.
- WOO, P. C. Y. et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **Journal of virology**, v. 86, n. 7, p. 3995-4008, 2012.