



DOR [20.1001.1.17354226.1400.16.3.2.9](https://doi.org/10.17354/226.1400.16.3.2.9)

Original paper

Structural and Molecular Analysis of SARS-CoV-2 spike protein following S494P point mutation using Bioinformatics and Molecular Dynamics Methods

Mahmoud Janlou MA^{1,*}, Sahebamee H², Tazikeh-Lemeski E³

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological science, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
2. Department of Biophysics, Faculty of Biological science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
3. Department of Chemistry, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

*Corresponding author: e-mail: mehr.janlou@gmail.com

Received:2/19/2022

Accepted:4/18/2022

Abstract

The emergence of some mutations in the SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) can increase the spread and pathogenicity due to the conformational changes and increase the stability of Spike protein. Due to the formation of different strains of SARS-CoV-2 by mutations, and their catastrophic effect on public health, the study of the effect of mutations by scientists and researchers around the world is inevitable. Evidence of S494P has been observed in several strains of SARS-CoV-2 from Michigan, USA (15). To investigate how the natural mutation S494P alters receptor binding affinity in RBD, structural analysis of wild-type and mutant spike proteins using bioinformatics and computational tools such as FoldX, PoPMuSiCv3.1, molecule dynamics simulation, PCA, and HADDOCK, were performed. The results show that the S494P mutation increases the stability of spike protein. Also, applying docking by HADDOCK displayed higher binding affinity to hACE2 for mutant spike than wild type possibly due to the increased β -strand and Turn secondary structures which increases surface accessibly surface area (SASA) and chance of interaction. The analysis of S494P as a critical RBD mutation may provide the continuing surveillance of spike mutations to aid in the development of COVID-19 drugs and vaccines.

Keywords: SARS-CoV-2, Spike protein, RBD, S494P, MD simulation, Docking

مقاله تحقیقی

تجزیه و تحلیل ساختاری و مولکولی پروتئین سنبله SARS-CoV-2 بر اثر جهش نقطه‌ای S494P با استفاده از روش -
های بیوانفورماتیکی و دینامیک مولکولی

مهرعلی محمود جانلو^{۱*}، حسن صاحب جمعی^۲، الهام تازیکه لمسکی^۲

۱. گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۲. گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۳. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: mehr.janlou@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد گرگان و ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان و ورامین، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

چکیده

ظهور برخی جهش‌ها در دامنه^۱ اتصال گیرنده ویروس کووید ۱۹ (SARS-CoV-2 (RBD)) می‌تواند به دلیل تغییرات ساختاری و افزایش پایداری پروتئین سنبله^۲ باعث گسترش و افزایش بیماری‌زایی در انسان شود. با توجه به شکل‌گیری سویه‌های مختلف SARS-CoV-2 توسط جهش‌ها و تأثیر فاجعه‌بار آنها بر سلامت عمومی، مطالعه تأثیر جهش توسط دانشمندان و محققان در سراسر جهان اجتناب‌ناپذیر است. طبق شواهد موجود، نوع S494P در چندین سویه SARS-CoV-2 از میشیگان، ایالات متحده مشاهده شده است. برای بررسی اینکه چگونه جهش طبیعی S494P میل اتصال گیرنده را در RBD تغییر می‌دهد، تجزیه و تحلیل ساختاری پروتئین‌های سنبله نوع وحشی و جهش یافته با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و ابزارهای محاسباتی نظیر FoldX، PoPMuSiCv3.1، شبیه‌سازی دینامیک مولکول، PCA، و HADDOCK، انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که جهش S494P باعث افزایش پایداری پروتئین سنبله می‌شود. همچنین، بررسی داکینگ مولکولی با استفاده از HADDOCK تمایل اتصال بالاتری به hACE2 برای سنبله جهش یافته نسبت به نوع وحشی را نشان می‌دهد که احتمالاً به دلیل افزایش ساختارهای ثانویه رشته بتا و Turn است که باعث افزایش سطح قابل دسترسی سطح (SASA) و احتمال برهمکنش می‌شود. تجزیه و تحلیل S494P به عنوان یک جهش مهم RBD ممکن است نظارت مستمر جهش‌های سنبله را برای کمک به توسعه داروها و واکسن‌های COVID-19 فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: کووید ۱۹، پروتئین سنبله، S494P، داکینگ، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

¹ - domain

² - spike protein

مقدمه

ویروس بسیار مسری SARS-CoV-2 یکی از شایع ترین ویروس ها در جهان است که باعث بیماری و مرگ و میر می شود. این ویروس، به دلیل شباهت ساختاری آن به کرونا ویروس های مرتبط با سندرم حاد تنفسی، در تعدادی از گونه های حیوانی و انسان به SARS-CoV-2 نامگذاری شد (۱،۲). SARS-CoV-2 متعلق به زیرخانواده Coronavirinae، عضوی از خانواده Coronaviridae است. این ویروس ها دارای RNA بوده و می توانند هم حیوانات و هم انسان را آلوده کنند (۳). این ویروس ها بر اساس ویژگی های ژنوتیپی و سرولوژیکی به چهار جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا کرونا ویروس تقسیم می شوند (۴،۵). تاکنون، تمام کوویدهای شناسایی شده که می توانند انسان ها را آلوده کنند، متعلق به آلفا کروناویروس ها (alphaCoVs)، بتاکروناویروس ها (betaCoVs) و MERS-CoV هستند (۶). در انسان، SARS-CoV-2 مانند SARS و MERS باعث بیماری تنفسی به نام بیماری کرونا ویروس ۲۰۱۹ (COVID-19) می شود (۷). اولین جنس شناخته شده در وهان چین در دسامبر ۲۰۱۹ شناسایی شد (۸). از آن زمان، انواع مختلفی شکل گرفته و در سراسر جهان گسترش یافته است، که منجر به بیماری همه گیری جهانی منتسب به COVID-19 شده است که به عنوان یکی از همه گیری های فهرست کشنده در تاریخ شناخته می شود. علاوه بر این، یکی دیگر از پیامدهای COVID-19، رکود شدید در اقتصاد جهانی است که منجر به از دست دادن چشمگیر معیشت و درآمد در مقیاس جهانی می شود. در این شرایط، مطالعه و تحقیقات دانشمندان و محققان در سراسر جهان منجر به کسب اطلاعات زیادی در مورد SARS-CoV-2 شده است. در میان چندین پروتئین ویروسی، یکی از آنتی بادی اصلی حاصل از واکنش ها، گلیکوپروتئین سنبله (پروتئین S) ویروس کرونا است که نقش اساسی در ورود ویروس به سلول میزبان و پاتوژنز SARS-CoV-2 دارد (۹،۱۰). طول پروتئین سنبله حدود ۲۰ نانومتر است و یک پروتئین هوموترایمر با دو زیر واحد عملکردی S1 و S2 در هر مونومر است. زیر واحد S1 سر سنبله را تشکیل می دهد و آنزیم تبدیل کننده آنزیماتاسین انسانی ۲ (hACE2) را تشخیص

می دهد (۱۱). دامنه اتصال گیرنده RBD^۳ که گیرنده سطح سلول میزبان (hACE2) را شناسایی می کند و مسئول اتصال ویروس در سطح سلول است، در S1 قرار دارد (۱۲،۱۳). زیر واحد S2 ساقه ای را تشکیل می دهد که سنبله را در پوشش ویروسی قرار می دهد و ذرات ویروسی را به غشای سلولی ادغام می کند.

RBD دارای ناحیه ای به نام موتیف اتصال گیرنده (RBM^۴) است. RBM مستقیماً به موتیف اتصال ویروسی (VBM) در hACE2 متصل می شود (۱۴). ویژگی های ساختاری مهم سنبله در شکل ۱ نشان داده شده است. ویروس هایی که برهم کنش قویتری با گیرنده ویروس در سطح سلول های تنفسی انسان دارند به راحتی پخش می شوند و تبدیل به عفونت می شوند (۱۳). با توجه به آنچه که ممکن است افزایش تصاعدی در عفونت ها باشد، انتظار می رود نرخ بالاتری از عوارض یا مرگ و میر وجود داشته باشد. طبق شواهد موجود، نوع S494P در چندین سویه SARS-CoV-2 از میشیگان، ایالات متحده آمریکا مشاهده شده است (۱۵). با این حال، مطالعه دقیقی بر روی تغییرات ساختاری پروتئین اسپایک به دلیل جهش S494P و تمایل اتصال به hACE2 انجام نشده است. در این پژوهش، برای درک بهتر، خواص ساختاری و مولکولی جهش S494P با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک و شبیه سازی دینامیک مولکولی بررسی شده است.

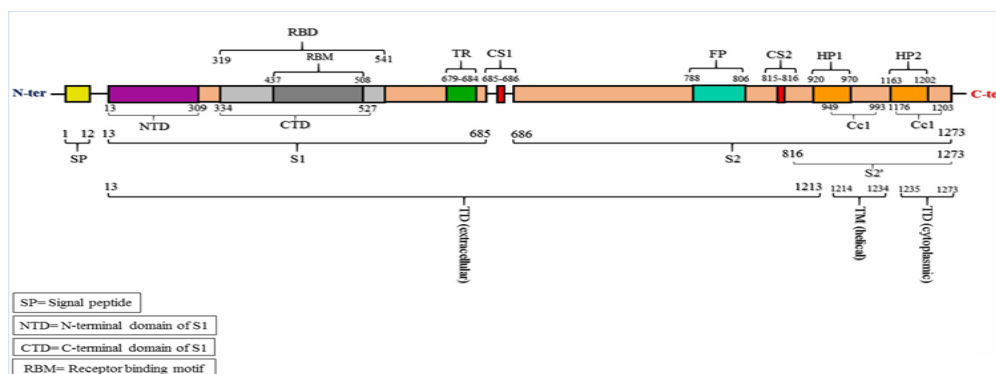
مواد و روش ها

بررسی پایداری

بین پایداری و انرژی ساختاری پروتئین ها رابطه نزدیکی وجود دارد. همچنین تغییرات پایداری ناشی از جایگزینی اسید آمینه پروتئین ها را می توان تعیین نمود (۱۶). از این رو، یکی از رایج ترین رویکردها برای بررسی اثر جهش بر پایداری پروتئین، محاسبه انرژی ساختاری است. تا به امروز، ابزارهای محاسباتی متعددی برای پیش بینی تأثیر جهش ها بر پایداری ایجاد شده اند.

³ - Receptor binding domain

⁴ -Receptor binding motif



شکل ۱ - نواحی مختلف RBD از سنبله ۱ SARS-CoV-2 که به hACE2 اتصال می یابد.

نانومتر تعیین شد. به منظور خنثی کردن بار خالص سیستم‌ها، یون های ۲ یون کلر اضافه شد. شرایط مرزی دوره ای PBC^۶ در هر سه جهت فضایی سیستم اعمال شد. سپس، کل سیستم با استفاده از steep descent^۷ ۱۰۰۰ مرحله و conjugate gradients^۸ ۱۰۰۰۰ مرحله بهینه شد (۲۶). در مرحله تعادل، یک مجموعه NVT^۹ با دمای ثابت ۳۰۰ کلوین برای ۲۰۰ پیکو ثانیه، و گروه NPT^{۱۰} با فشار ثابت ۱ بار برای ۵۰۰ پیکوثانیه اعمال شد. برای کولپینگ دما و فشار الگوریتم های Berendsen (۲۷) و Parrinello-Rahman (۲۸) اعمال شد و فرایند محدودیت مکانی در هنگردهای NVT و NPT بکار برده شد. ما دو اجرای MD مستقل را از ساختارهای وحشی و جهش یافته انجام دادیم تا اطمینان حاصل کنیم که نتایج برای جهش مربوطه قابل توجه است. سپس تحلیل مقایسه ای انحرافات ساختاری در ساختارهای وحشی و جهش یافته را محاسبه کردیم. ریشه میانگین مربع انحراف (RMSD)^۹، ریشه میانگین مربع نوسانات (RMSF)^{۱۰}، و سطح قابل دسترسی سطح (SASA)^{۱۱} برای ساختارهای هدف اندازه گیری شد.

با این حال، تنها تعداد کمی از این ابزارها برای بهبود پایداری پروتئین به صورت تجربی از طریق استفاده از جهش نقطه ای استفاده شده اند (۱۷). بنابراین، در این پژوهش، دو ابزار رایج و مرسوم یعنی FoldX (۱۸) و PoPMuSiCv3.1 (۱۹) برای محاسبه و مقایسه انرژی ساختار در سنبله وحشی و جهش یافته استفاده شد. FoldX انرژی سازه را با استفاده از ترکیب خطی فیزیک و الگوریتم‌های انرژی مبتنی بر آمار محاسبه می‌کند (۲۰). با محاسبه شرایط مختلف انرژی، اطلاعات مفیدی در مورد ویژگی های ترکیبات پروتئینی ارائه می دهد.

ارزیابی با استفاده از روش دینامیک مولکولی

شبیه سازی دینامیک مولکولی یک رویکرد با سرعت بالا و انعطاف پذیری است که برای کشف رفتار و حرکت اتم‌ها و مولکول‌ها در یک دوره زمانی معین انجام می‌شود (۲۱). ساختار سه بعدی سنبله از پایگاه PDB با کد 6M0J (۲۲) برای این تحقیق شد. شبیه سازی‌ها برای پروتئین‌های سنبله نوع وحشی^۵ WT و جهش یافته با استفاده از نرم نسخه 5.4.1 تحت سیستم عامل لینوکس اوبنتو با میدان نیروی Amber03 و برای ۱۰۰ نانومتر با گام زمانی ۲ پیکوثانیه اجرا شد (۲۳-۲۵). شبیه سازی ها با در نظر گرفتن مولکول های حلال در یک جعبه مکعبی شکل با مدل SPC و ۲۱۶ مولکول آب انجام شد. فاصله از لبه های جعبه مکعبی ۱

⁶ Periodic boundary condition

⁷ constant number (N), volume (V), and temperature (T)

⁸ constant number (N), pressure (P), and temperature (T)

⁹ Root mean square deviation

¹⁰ Root mean square fluctuation

¹¹ Solvent accessible surface area

⁵ Wild Type

تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA)^{۱۲}

در طول اتصال، حالت اتصال حل شده فعال شد و رزیدوهای فعال به عنوان بخش کاملاً انعطاف پذیر در نظر گرفته شدند. رزیدوهای غیرفعال که نزدیک به رزیدوهای فعال بودند به طور خودکار انتخاب شدند. خوشه با بهترین امتیاز در حین اتصال برای تجزیه و تحلیل استفاده شد. در نهایت از نرم افزار LigPlot v.2.2 برای تعیین نمودارهای شماتیک برهمکنش پروتئین-پروتئین استفاده شد (۳۳).

نتایج

بررسی میزان پایداری

مهمترین نیروها برای پایداری پروتئین برهمکنش های درون مولکولی مانند پل های دی سولفیدی، برهمکنش های یونی، پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش های آبگریز و برهمکنش های واندروالسی هستند (۳۴). تابع اصلی FoldX و PoPMuSiC، الگوریتم میدان نیروی تجربی، میزان تغییر انرژی آزاد (ΔG) را بر حسب kcalmol^{-1} محاسبه می کند (معادله ۱).

در این مطالعه، خروجی هر دو نرم افزار PoPMuSiC و FoldX نشان دادند که P494 ثبات ترکیب پروتئین اسپایک را افزایش می دهد. $\Delta\Delta G$ محاسبه شده توسط PoPMuSiC برای جهش S494P $0.02 \text{ kcalmol}^{-1}$ است ($\Delta\Delta G < 0$) به معنای جهش تثبیت کننده است. انرژی کل محاسبه شده توسط FoldX به ترتیب $60.62 \text{ kcalmol}^{-1}$ و 56.41 برای نوع وحشی و پروتئین اسپایک S494P بود. طبق جدول ۲، جایگزینی S494 با P باعث کاهش SideHbond از 41.40 - به 50.56 - می شود. میزان انرژی کمتر جهش S494P نشان می دهد که جهش P494 پایداری پروتئین اسپایک را افزایش می دهد. بنابراین، می تواند بر عملکرد SARS-CoV-2 تأثیر بگذارد.

تجزیه و تحلیل شبیه سازی دینامیک مولکولی

در مرحله بعد شبیه سازی MD به مدت 100ns برای تجزیه و تحلیل دقیق ساختاری تحت اثر جهش S494P به طور طبیعی در پروتئین سنبله رخ می دهد، انجام شد. پایداری ساختار و کانفورماسیون پروتئین را می توان با انحرافات تولید شده در طول مسیر شبیه سازی تعیین کرد.

آنالیز مؤلفه های اصلی PCA به عنوان یک ابزار استاندارد در مکانیک آماری برای تعیین حرکات همبسته رزیدوهای آمینواسیدی به مجموعه ای از متغیرهای خطی ناهمبسته به نام مؤلفه اصلی استفاده می شود. این روش برای ساختن تبدیل خطی ویژگی های ماتریس کوواریانس و کاهش همبستگی های خطی آنی بین مختصات پروتئین های شبیه سازی شده انجام شد. در این مطالعه، اتم های کربن آلفای پروتئین های هدف برای تخمین نوسانات انتخاب شدند که ویژگی های قابل توجهی را برای حرکات داخلی اصلی فراهم می کند. نتایج به دست آمده از PCA تحت ارزیابی انرژی آزاد (FEL)^{۱۳}، برای توصیف توزیع انرژی احتمالی یک یا چند متغیر جمعی از سیستم پروتئین قرار گرفتند که به تجسم پایداری ترکیب های مختلف برای یک پروتئین کمک می کند (۲۹). استخراج نمایش های دوبعدی FEL در طول مسیر با استفاده از g_sham در GROMACS انجام شد (۳۰).

انجام داکینگ پروتئین ها با استفاده از سرور HADDOCK

برای بررسی اثر جهش S494P بر توانایی سنبله برای اتصال به گیرنده hACE2، از فرآیند داکینگ استفاده شد. HADDOCK یک برنامه اتصال انعطاف پذیر است که در آن اطلاعات تجربی یا بیوانفورماتیکی به طور مستقیم برای پیش بینی میل پیوندی برهمکنش های پروتئین-پروتئین استفاده می شود (۳۱). این نرم افزار کاربرپسند که از اطلاعات بیوشیمیایی یا بیوفیزیکی برای بهبود نمونه برداری و امتیازدهی استفاده می کند. برای اجرای این نرم افزار محدودیت هایی اعمال شد که شامل رزیدوهای فعال و غیرفعال بود. با توجه به Gomari MM و همکاران (۳۲)، و تجزیه و تحلیل برخی از ساختارهای کریستالی موجود با PDB ID 6VW1، 6LZG و 6M17 رزیدوهای فعال آمینواسیدی شناسایی شدند (جدول ۱).

¹² - Principle component analysis

¹³ - Free energy landscape

انحراف قابل توجهی از نوع وحشی نشان می دهد. مقدار متوسط نوسانات در RMSD ستون فقرات در طول ۶۰ ns آخر در جدول ۳ نشان داده شده است. مقادیر پایین تر RMSD برای ساختار جهش یافته نشان می دهد که توپولوژی کلی تغییر کرده است به طوری که S494P ساختاری پایدار نسبت به سیستم نوع وحشی نشان می دهد.

مقدار RMSD برای اندازه گیری تفاوت بین ستون فقرات یک پروتئین از ساختار اولیه تا موقعیت نهایی آن استفاده می شود. هر چه انحرافات کوچکتر باشد، ساختار پروتئین پایدارتر است. با استفاده از شبیه سازی RMSD نشان داده شده در شکل 2A، می توان مشاهده کرد که سیستم ها پس از ۴۰ ns به تعادل رسیدند. همچنین ساختار جهش یافته

جدول ۱ - رزیدوهای اتصالی بین دو پیپتئین hACE2 و SARC-CoV-2

SARS-CoV-2	K417, G446, Y449, Y453, L455, F456, A475, F486, N487, Y489, Q493, G496, Q498, T500, N501, G502, Y505
hACE2	Ser19, Q24, F28, D30, K31, H34, E35, E37, D38, Y41, Q42, L79, M82, Y83, N330, K353, G354, D355, R357, R393

معادله ۱

$$\Delta G = a \Delta G_{vdw} + b \Delta G_{solvH} + c \Delta G_{solvP} + d \Delta G_{wb} + e \Delta G_{bond} + f \Delta G_{el} + g \Delta G_{kon} + h T \Delta S_{mc} + k T \Delta S_{mc} + I \Delta G_{clash}$$

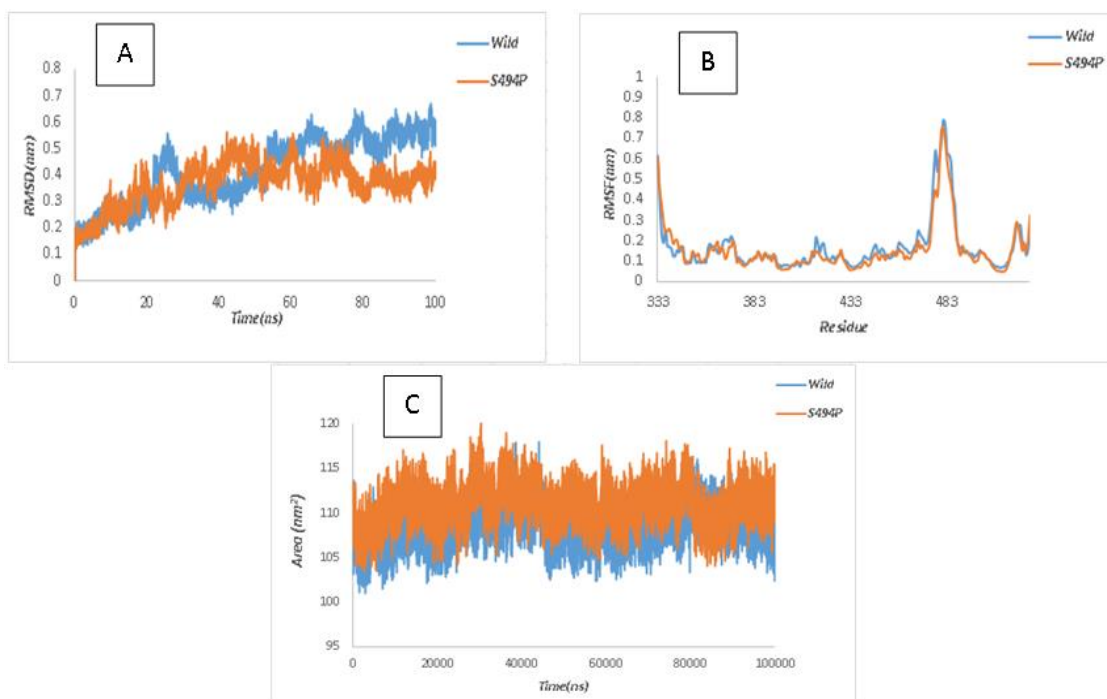
جدول ۲ - پارامترهای انرژی اندازه گیری شده توسط FoldX برای سنبله وحشی و جهش یافته (واحد تمام پارامترها برحسب انرژی kcalmol⁻¹ است).

FoldX	BackHbond	SideHbond	Energy_VdW	Electrostatic	Energy_SolvP	Energy_SolvH	Energy_vdwc	Energy-torsion	Entropy_sid	Entropy_mainc
S494	-101.05	-41.40	-220.30	-14.66	309.78	-278.13	16.16	6.42	112.23	301.00
P494	-101.04	-50.56	-220.55	-14.68	308.43	-279.61	16.08	6.45	112.16	300.72

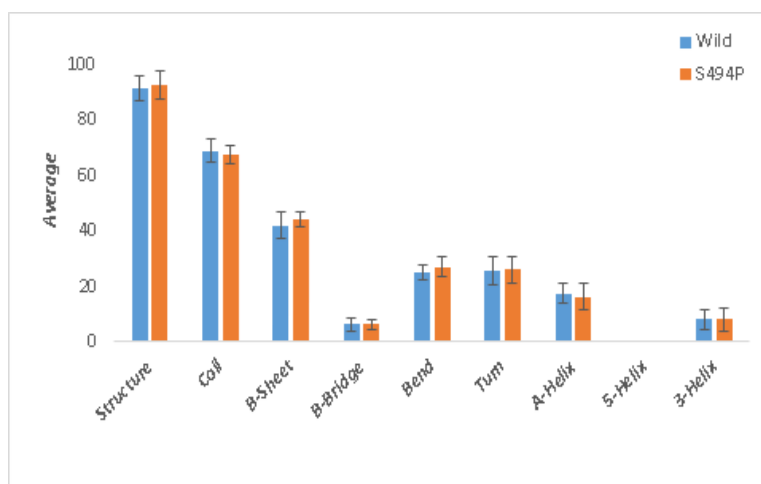
از DSSP عناصر ساختار ثانویه محاسبه می شود. تجزیه و تحلیل نتایج DSSP نشان می دهد که در ساختار جهش یافته تمایل به تشکیل ساختارهای ثانویه صفحه β ، ساختار از نوع Bend و Turn افزایش یافته اما Coil و مارپیچ α کاهش یافته است (شکل ۳). به طور کلی می توان گفت که جهش S494P باعث افزایش مجموع ساختارهای منظم می-شود. از آنجایی که دو ساختارهای ثانویه Bend و Turn در سطح پروتئین قرار دارند، می تواند سطح در دسترس سنبله جهش یافته و احتمال برهمکنش سنبله جهش یافته با پروتئین گیرنده نوع وحشی را افزایش دهد. تعیین میزان SASA نیز این ادعا را تایید می کند (شکل 2C).

نوسان میانگین مربعات ریشه مبتنی بر رزیدو (RMSF) ستون فقرات برای S494P با انعطاف کمتری در رزیدوهای شماره ۴۱۵-۴۸۵، که یک موتیف اتصال گیرنده (RBM) ناحیه پروتئین سنبله در مقایسه با نوع وحشی است، نشان می دهد. این نشان می دهد که ساختار ثانویه RBD بر اثر جهش پایدارتر شده است. بر این اساس، نتایج RMSF نیز تایید می کند که سیستم S494P پایدارتر از نوع وحشی است (شکل 2B).

یکی دیگر از پارامترهای ساختاری مهم، که اطلاعات مهمی در مورد پلاستیسیته ساختاری پروتئین ها ارائه می-دهد، ساختارهای ثانویه وابسته به زمان است که با استفاده



شکل ۲ - A, ریشه میانگین انحراف مربع (RMSD); B, نوسانات ریشه میانگین مربع (RMSF)؛ و C، سطح قابل دسترس حلال (SASA) در طول شبیه سازی MD ساختارهای وحشی و جهش یافته.



شکل ۳ - میانگین ساختارهای ثانویه در طول شبیه سازی MD پروتئین های سنبله نوع وحشی و جهش یافته.
 $Structure = A-Helix + B-Sheet + B-Bridge + Turn$.

شکل ۴). در FEL، حداقل انرژی بر اساس احتمال ترکیبی از نقاط داده MD برای ترسیم حداقل پیکربندی انرژی پروتئین ها به دست آمد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود، رنگ های قرمز و زرد نشان دهنده کمترین انرژی

چشم انداز انرژی آزاد (FEL)

برای نشان دادن ویژگی های ساختاری با استفاده از اطلاعات ترمودینامیکی، یک چشم انداز از انرژی آزاد برای نوع پروتئین سنبله نوع وحشی و جهش یافته ساخته شد

سنبله وحشی، دو Hbounds با Gln498 و Gly496 تشکیل می‌دهد. جدول ۴ مقایسه Hbounds بین اسیدهای آمینه کمپلکس های spike-hACE2 را نشان می‌دهد.

اثر جهش ها بر الگوی اتصال می تواند نتیجه تغییرات ساختاری در پروتئین های سنبله از طریق یک جایگزینی جدید باشد. شکل ۶ تغییرات ساختاری مربوط به نواحی مجاور رزیدوی جهش یافته در پروتئین های سنبله را نشان می‌دهد. مقایسه خواص فیزیکیوشیمیایی رزیدوی وحشی و جهش یافته نشان می‌دهد که در جهش S494P ، Ser ساده‌ترین اسید آمینه هیدروکسیل و دارای انعطاف پذیری زنجیره جانبی پایین است. از سوی دیگر، Pro آزاد یک آمین ثانویه است که زنجیره جانبی آن از کربن آلفا به عقب انحنا می‌یابد تا به نیتروژن آمینی اتصال یابد. هنگامی که پرولین در یک زنجیره پروتئینی قرار می‌گیرد زاویه چرخش ستون فقرات فی را تقریباً ۶۰- درجه توسط حلقه پیرولیدین تثبیت می‌کند. اما زوایای سای به دو گروه نزدیک به ۴۵- درجه و ۱۳۵+ درجه در ساختارهای مارپیچ و صفحه بتا قرار می‌گیرد. به همین دلیل، ستون فقرات نزدیک به پرولین، تقریباً غیرقابل انعطاف می‌گردد و ممکن است از تشکیل ساختارهای ثانویه خاصی جلوگیری کند.

بحث

اگرچه ویروس جدید SARS-Cov-2 (CovID-19) از سال ۲۰۱۹ ظهور کرده است، اما به دلیل همه‌گیری جهانی، مطالعات زیادی روی این ویروس توسط محققان در سطح مولکولی انجام می‌شود. در این تحقیق تمامی تحلیل‌ها مناسب و همگرا بودند. نتایج برخی از ابزارهای بیوانفورماتیک مانند شبیه‌سازی MD ، FoldX ، PoPMuSiC و آنالیز docking نشان‌دهنده افزایش پایداری و تعامل بهتر سنبله جهش‌یافته با گیرنده آن است. این بدان معنی است که جهش S494P منجر به تغییرات ساختاری در جهش یافته نسبت به ساختار نوع وحشی می‌شود که می‌تواند میل اتصال را افزایش دهد. با توجه به این واقعیت که جهش P494 در تماس نزدیک با ناحیه اتصال hACE2 است، میزان تمایل اتصال افزایش یافته P494 را می‌توان به عواملی مانند تغییرات ساختاری و سپس مکمل بین سطحی

بر اساس پایداری پروتئین سنبله است. می‌توان گفت که با توجه به توزیع حداقل انرژی احتمال، پایداری S494P بیشتر از نوع وحشی است.

تجزیه و تحلیل حاصل از داکینگ

پس از اجرای HADDOCK ، بهترین خوشه با توجه به اندازه خوشه و امتیاز Z آن انتخاب شد. برای پی بردن به میزان تمایل اتصال بین دو پروتئین، انرژی اتصال کل که مجموع انرژی واندروالس و انرژی الکترواستاتیکی است محاسبه می‌شود (۳۵). با توجه به نتایج حاصل از فرایند داکینگ، کل انرژی اتصال سنبله‌های نوع وحشی و P494 با گیرنده‌های آنها به ترتیب $1/339$ kcalmol⁻¹ و $1/348$ بوده است. همچنین، سطح مدفون (BSA) که میزان سطح مشترک را در کمپلکس پروتئین- پروتئین اندازه‌گیری می‌کند، برای سنبله جهش یافته با گیرنده آن بیشتر از مجموعه نوع وحشی است (جدول ۳). افزایش BSA به دلیل تغییر ساختاری سنبله جهش یافته نسبت به نوع وحشی است و می‌تواند شانس برهمکنش را افزایش دهد. در حقیقت، نتایج HADDOCK اتصال بهتر سنبله جهش یافته به گیرنده آن را نسبت به کمپلکس نوع وحشی نشان می‌دهد. برای بررسی جزئیات بیشتر، تغییر در الگوهای اتصال رزیدوهای بین کمپلکس های نوع وحشی و جهش یافته توسط LigPlot بررسی شد (شکل ۵). اطلاعات ارزشمندی در مورد برهمکنش های مولکولی spike-hACE2 به دست آمده است. نوع و تعداد برخی از برهمکنش آمینو اسیدها متفاوت است. تعداد Hbound در کمپلکس های نوع وحشی و جهش یافته به ترتیب ۱۵ و ۱۶ عدد می‌باشد. همچنین در نوع وحشی، به عنوان مثال، Ala475 یک Hbound با Ser19 از hACE2 تشکیل می‌دهد، اما هیچ نقشی در برهمکنش جهش یافته با hACE2 ندارد. علاوه بر این، Thr500 و Tyr41 با Hbound در سنبله وحشی تشکیل می‌دهد. با این حال، در سنبله جهش یافته Thr500 یک Hbound با Tyr41 و دیگری با Arg357 تشکیل می‌دهد. علاوه بر این، Lys353 از hACE2 در کمپلکس با سنبله جهش یافته سه Hbounds با رزیدوهای Gln498 ، Gly496 و Asp501 تشکیل می‌دهد. در حالی که در برهمکنش بین

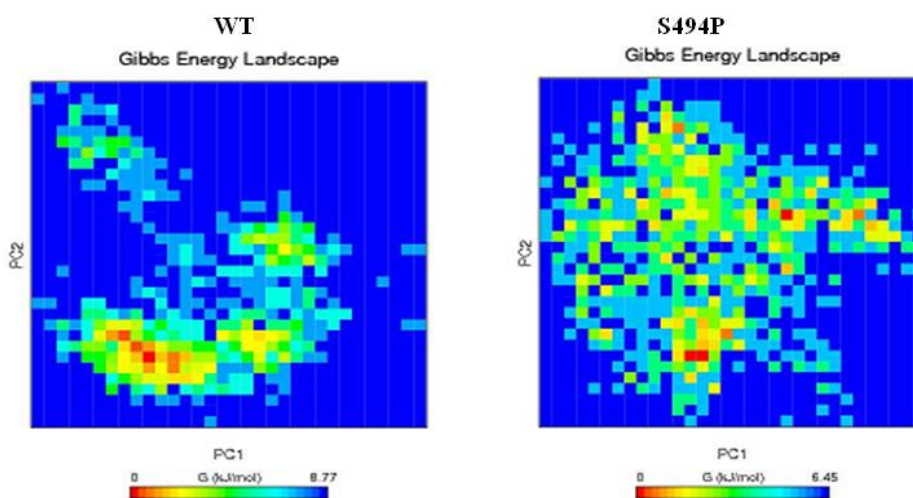
عملکرد، ویژگی‌ها و سایر جنبه‌های این جهش SARS-CoV-2 برای یافتن درمان ویژه در آینده مهم است.

تقدیر و تشکر

از تمام کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نموده اند سپاسگزاریم.

در طی اتصال hACE2 و همچنین جهت گیری مجدد برخی از رزیدوها در ناحیه اتصال که باعث می شود تعداد پیوندهای هیدروژنی بیشتر و قوی تری تشکیل شود، نسبت داد. در مجموع، بیماری زایی بیشتر S494P ممکن است به این تغییرات و ویژگی‌های ساختاری جدید مرتبط باشد.

بنابراین، استفاده از روش‌های دیگر مانند آنالیز پایداری تجربی و مطالعات ایمونواسی S494P برای نظارت دقیق بر



شکل ۴ - پیش بینی چشم انداز انرژی آزاد (FEL) فضای ساختاری پروتئین سنبله نوع وحشی و جهش یافته بر روی PC1 و PC2 تولید شده از مسیرهای PCA. چشم انداز انرژی آزاد در امتداد دو جزء اصلی PC1 و PC2 برای نوع وحشی (WT) و S494P که در آن قرمز و زرد نشان دهنده پیکربندی حداقل انرژی و آبی بالاترین پیکربندی انرژی را نشان می دهد.

جدول ۳ - اطلاعات آماری اتصال بهترین خوشه از سنبله وحشی و جهش یافته با hACE2

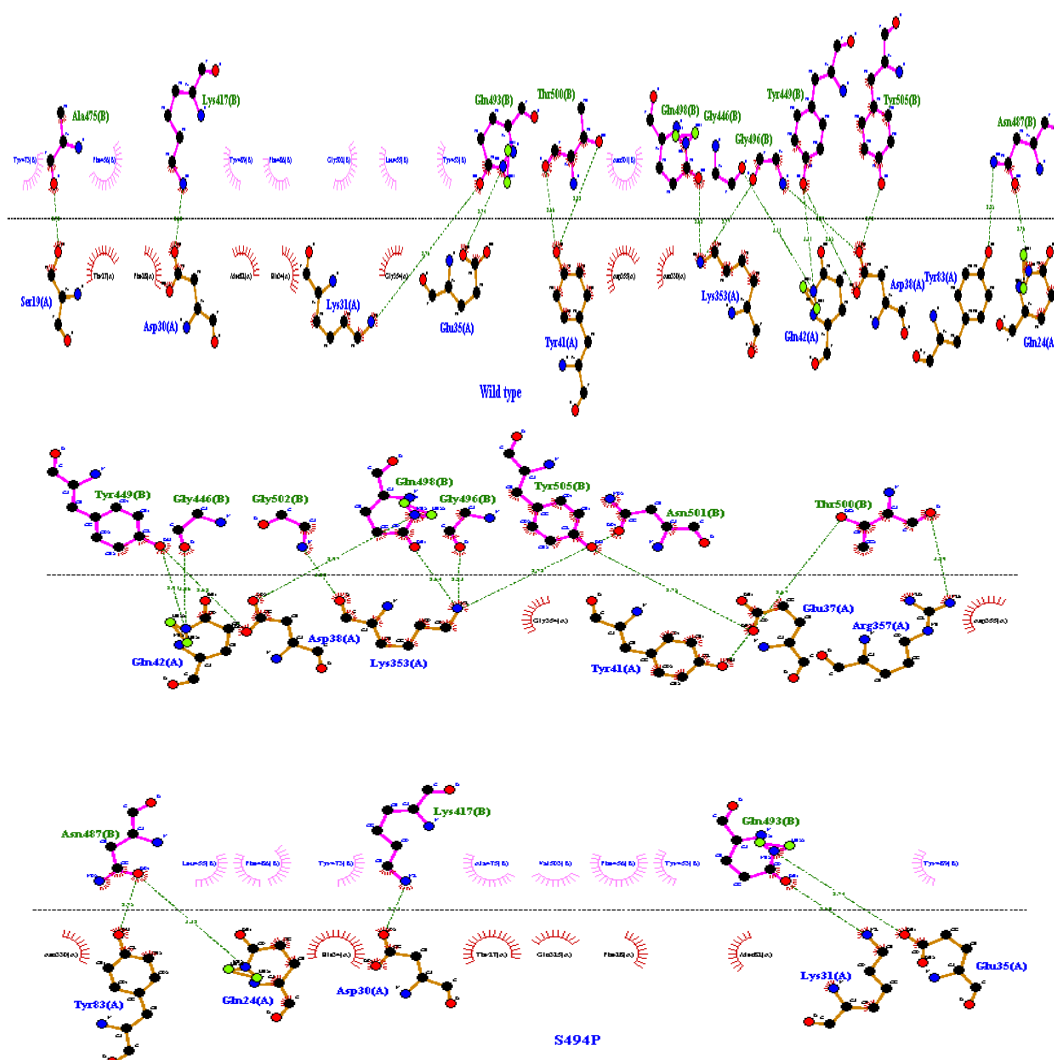
Haddock criteria	Wild type	S494P
HADDOCK score	-154.3 +/- 3.9	-157.7 +/- 1.1
Cluster size	199	198
RMSD from the overall lowest-energy structure	0.7 +/- 0.5	0.7 +/- 0.4
Van der Waals energy	-68.8 +/- 4.0	-68.3 +/- 3.4
Electrostatic energy	-261.1 +/- 15.8	-272.2 +/- 11.8
Desolvation energy	-36.3 +/- 2.8	-32.0 +/- 2.7
Restrains violation energy	0.0 +/- 0.03	0.1 +/- 0.11
Buried Surface Area (\AA^2)	1950.4 +/- 93.3	1976.0 +/- 68.9
Z-Score	0.0	0.0
Total Interaction energy	-339.8	-348.1

جدول ۴ - مقایسه پیوند هیدروژنی بین آمینواسیدهای کمپلکس های spike-hACE2 برای گونه های وحشی و جهش یافته.

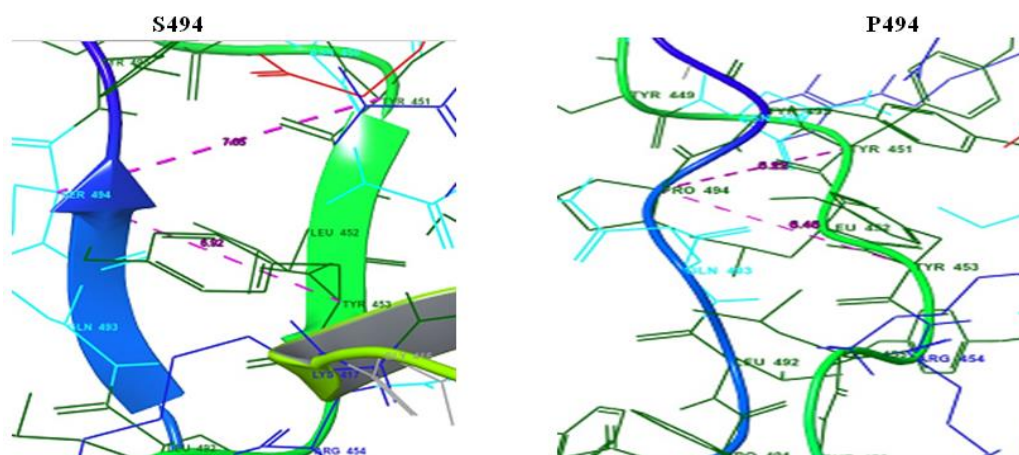
S ₁	hACE2	S ₁	hACE2	S ₁	hACE2
Ala475 (WT)	Ser19	Tyr449 (WT)	Asp38	Gly446 (WT)	Gln42
Ala475 (S494P)	-	Tyr449 (S494P)	Asp38	Gly446 (S494P)	Gln42

Lys417 (WT)	Asp30	Tyr505 (WT)	Asp38	Gly496 (WT)	Lys353
Lys417 (S494P)	Asp30	Tyr505 (S494P)	-	Gly496 (S494P)	Lys353
Gln493 (WT)	Lys31	Gly496 (WT)	Asp38	Gly496 (WT)	Asp38
Gln493 (S494P)	Lys31	Gly496 (S494P)	-	Gly496 (S494P)	-
Gln493 (WT)	Glu35	Asn487 (WT)	Tyr83	Tyr449 (WT)	Gln42
Gln493 (S494P)	Glu35	Asn487 (S494P)	Tyr83	Tyr449 (S494P)	Gln42
Thr500 ^a (WT)	Tyr41	Asn487 (WT)	Gln24	Lys353 (WT)	-
Thr500 ^b (S494P)	Tyr41	Asn487 (S494P)	Gln24	Lys353 (S494P)	Gly502
Gln498 (WT)	Lys353	Tyr505 (WT)	-	Asp501 (WT)	-
Gln498 (S494P)	Lys353	Tyr505 (S494P)	Glu37	Asp501 (S494P)	Lys353
Arg357 (WT)	-				
Arg357 (S494P)	Thr500				

^a two hydrogen bound, ^b one hydrogen bound.



شکل ۵: نمایش گرافیکی نتایج داکینگ بین سنبله های وحشی و جهش یافته با گیرنده hACE2 حاصل از نرم افزار LigPlot.



شکل ۶ - نمایش تغییر فاصله دو رزیدوی S494 و P494 نسبت به سایر رزیدوهای مجاور در دو سویه وحشی و جهش یافته. همچنین، تبدیل ساختار β به حلقه در جهش P494 دیده می شود.

منابع مورد استفاده

1. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, YM., Wang, W., Song, ZG., et al. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798):265–9.
2. Zhou, P., Yang, X Lou., Wang, XG., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798):270–3.
3. Gorbalenya, AE., Baker, SC., Baric, RS., de Groot, RJ., Drosten, C., Gulyaeva, AA., et al. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*, 5(4):536–44.
4. Lefkowitz, EJ., Dempsey, DM., Hendrickson, RC., Orton, RJ., Siddell, SG., Smith, DB. (2018). Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*, 46(D1):D708–17.
5. Adams, MJ., Lefkowitz, EJ., King, AMQ., Harrach, B., Harrison, RL., Knowles, NJ., et al. (2016). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, 161(10):2921–49.
6. Zaki, AM., van Boheemen, S., Bestebroer, TM., Osterhaus, ADME., Fouchier, RAM. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*, 367(19):1814–20.
7. Stawicki, S., Jeanmonod, R., Miller, A., Paladino, L., Gaieski, D., Yaffee, A., et al. (2020). The 2019-2020 novel coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) pandemic: A joint american college of academic international medicine-world academic council of emergency medicine multidisciplinary COVID-19 working group consensus paper. *J Glob Infect Dis*, 12(2):47–93.
8. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, TS., Imai, K., et al. (2021). SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nat Commun*, 12(1).
9. Chan, JFW., Kok, KH., Zhu, Z., Chu, H., To, KKW., Yuan, S., et al. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*, 9(1):221–36.
10. Astuti, I., Ysrafil. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*, 4(4):407–12.
11. Xing, Yu-Han., Ni, Wei., Wu, Qin., Li, Wen-Jie, Li, Guo-Ju., Wang, Wen-Di., Tong, Jian-Ning., Song, Xiu-Feng., Wong, Gary Wing-Kin., Xing, Q-S. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. *Ann Oncol*, 7(May):19–21.

12. Renhong, Y., Yuanyuan, Z., Yaning, L., Lu, X., Yingying, G., Qiang, Z. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485):1444–8.
13. Walls, AC., Park, YJ., Tortorici, MA., Wall, A., McGuire, AT., Veesler, D. (2020). Structure, function and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2):281-292.e6.
14. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., et al. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807):215–20.
15. Canrong, W., Yang, L., Yueying, Y., Peng, Zhang., et al. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5):766e788.
16. Funahashi, J., Takano, K., Yutani, K. (2001). Are the parameters of various stabilization factors estimated from mutant human lysozymes compatible with other proteins? *Protein Eng*, 14(2):127–34.
17. Broom, A., Jacobi, Z., Trainor, K., Meiering, EM. (2017). Computational tools help improve protein stability but with a solubility tradeoff. *J Biol Chem*, 292(35):14349–61.
18. Buß, O., Rudat, J., Ochsenreither, K. (2018). FoldX as Protein Engineering Tool: Better Than Random Based Approaches? *Comput Struct Biotechnol J*, 16:25–33.
19. Dehouck, Y., Grosfils, A., Folch, B., Gilis, D., Bogaerts, P., Rooman, M. (2009). Fast and accurate predictions of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: PoPMuSiC-2.0. *Bioinformatics*, 25(19):2537–43.
20. Gerasimavicius, L., Liu, X., Marsh, JA. (2020). Identification of pathogenic missense mutations using protein stability predictors. *Sci Rep*, 10(1):1–10.
21. Hildebrand, PW., Rose, AS., Tiemann, JKS. (2019). Bringing Molecular Dynamics Simulation Data into View. *Trends Biochem Sci*, 44(11):902–13.
22. Zardecki, C., Dutta, S., Goodsell, DS., Voigt, M., Burley, SK. (2016). RCSB Protein Data Bank: A Resource for Chemical, Biochemical, and Structural Explorations of Large and Small Biomolecules. *J Chem Educ*, 93(3):569–75.
23. Kutzner, C., Páll, S., Fechner, M., Esztermann, A., de Groot, BL., Grubmüller, H. (2019). More bang for your buck: Improved use of GPU nodes for GROMACS 2018. *J Comput Chem*, 40(27):2418–31.
24. Berendsen, HJC., van der Spoel, D., van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun*, 91(1–3):43–56.
25. Zhang, D., Lazim, R., Yip, YM. (2019). Incorporating Polarizability of Backbone Hydrogen Bonds Improved Folding of Short α -Helical Peptides. *Biophys J*, 117(11):2079–86.
26. Li, Z., Li, S., Wei, X., Zhao, Q. (2019). Scaled alternating steepest descent algorithm applied for protein structure determination from nuclear magnetic resonance data. *J Comput Biol*, 26(9):1020–9.
27. Margraf, JT., Hennemann, M., Clark, T. (2020). EMPIRE: a highly parallel semiempirical molecular orbital program: 3: Born-Oppenheimer molecular dynamics. *J Mol Model*, 26(3):22–5.
28. Miller, RE., Tadmor, EB., Gibson, JS., Bernstein, N., Pavia, F.(2016). Molecular dynamics at constant Cauchy stress. *J Chem Phys*, 144(18).
29. Aier, I., Varadwaj, PK., Raj, U. (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Sci Rep*, 6(May):1–10.
30. Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., Lindahl, E. (2008). GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput*, 4(3):435–47.
31. Kumar, D., Kumari, K., Jayaraj, A., Kumar, V., Kumar, RV., Dass, SK., et al. (2010). Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. *Photosynth Res*, 32(1):297–303.
32. Gomari, MM. Rostami, N., Hossein, OAH. & Arab, SS. (2021). Insight into molecular Characteristics of SARSCoV- 2 spike protein following D614G point mutation, a molecular dynamics stud. *Journal of Bimolecular Structure and Dynamics*, pp. 1-9.
33. Vieille, C., Zeikus, GJ. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(1):1–43.
34. Manning, MC., Chou, DK., Murphy, BM., Payne, RW., Katayama, DS. (2010). Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharm Res*, 27(4):544–75.
35. Kumar, A., Purohit, R. (2014). Use of Long Term Molecular Dynamics Simulation in Predicting Cancer Associated SNPs. *PLoS Comput Biol*, 10(4).