

*SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR
PARA DETERMINAR LAS INTERACCIONES DE
ANTIRRETROVIRALES CON LA
RETROTRANSCRIPTASA INVERSA DE SARS-
COV-2*

**MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS TO
DETERMINE THE INTERACTIONS OF
ANTIRETROVIRALS WITH SARS-COV-2 REVERSE**

Ruth Torres Perales

*Director: Pedro Merino Filella
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias*

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	4
1.1.	Dinámica molecular.....	6
2.	PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	8
2.1.	OBJETIVOS FORMATIVOS:	9
2.2.	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN:	9
3.	MÉTODOS COMPUTACIONALES.....	11
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1.	DOCKING	13
4.2.	DINÁMICA MOLECULAR	15
5.	CONCLUSIONES	21
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	22

RESUMEN

A finales de 2019 se identificaba un nuevo tipo de virus: el SARS-CoV-2 o como comúnmente se le conoce Covid-19. Este nuevo virus perteneciente a la familia de los coronavirus y se caracteriza por un RNA monocatenario y una serie de proteínas mediadoras. Dichas proteínas tienen diferentes funcionalidades como la proteína spike o “S”, que se encarga de la interacción con la célula huésped, o la RNA polimerasa dependiente de RNA, enzima responsable de la replicación del virus y la cual se estudia en este trabajo.

En particular, se realiza un análisis de las interacciones entre el complejo RdRp y diferentes ligandos . En una primera aproximación se realizan estudios de docking para ver la estabilidad de los ligandos frente a la proteína. A continuación, se realizan las simulaciones de dinámica molecular con los ligandos escogidos para poder estudiar en detalle las interacciones que tienen lugar con el fin de determinar qué factores son los responsables del reconocimiento de los sustratos por parte del enzima. Este tipo de estudios son fundamentales en el diseño de inhibidores de la enzima que bloqueen su actividad y por tanto, la replicación del virus.

ABSTRACT

At the end of 2019, a new type of virus was identified: SARS-CoV-2 or as it is commonly known Covid-19. This new virus belongs to the coronavirus family and is characterized by a single-stranded RNA and a amount of mediator proteins. These proteins have different functionalities such as the spike or "S" protein, which interacts with the host cell, or the RNA-dependent RNA polymerase, he enzyme responsible of the virus replication, which is studied in this work.

An analysis of the interactions between the RdRp complex and different ligands is carried out. In a first approach, docking studies give us information about the stability of the ligands and the protein. Then, molecular dynamics simulations are performed with the chosen ligands in order to study in detail the interactions that take place with the aim of determining the factors responsible of ligand recognition by the enzyme. This sort of studies is fundamental for the design of enzyme inhibitors capable of blocking the enzyme's activity and, consequently, the virus replication.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El COVID-19 es uno de los mayores desastres que ha sufrido la Humanidad en los últimos años y entra dentro de las pandemias con más actividad a lo largo de los siglos rozando los 1,4 millones de muertos. Este virus pertenece a la familia de los coronavirus que causan enfermedades tan dispares como el resfriado común o el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS). En 2019 se identificaba este nuevo coronavirus al que dieron el nombre de SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) o simplemente SARS-2, con el objetivo de diferenciarlo del brote de SARS-1 que tuvo lugar entre los años 2002 y 2003. En marzo de 2020 fue declarado por la OMS pandemia global.¹

El SARS-2 forma parte de la familia *Coronaviridae* y a nivel molecular esta caracterizado por un ARN monocatenario encapsulado. Hasta el momento han sido caracterizados siete coronavirus en humanos que pueden englobarse en las categorías Alpha y Beta, siendo los pertenecientes a la categoría Alpha los menos agresivos.

El SARS-2 mide entre 50 y 200 nm de diámetro y presenta en su membrana una proteína de superficie llamada glicoproteína Spike o “S”. Dicha proteína se une a la célula huésped por medio de los receptores de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA-II). Dichos receptores son mostrados por los neumocitos tipo II, abundantes en los pulmones, explicando así la gran afección de dicho órgano por esta enfermedad, aunque también se encuentran en menor número en órganos como riñón, cerebro, corazón... El virus es endocitado por la célula, la envoltura del virus se elimina por proteólisis y se libera su genoma viral en el citoplasma. El genoma actúa sobre sistema endoplasmático y aparato de Golgi y comienza a sintetizar nucleocápsides para formar los nuevos viriones, estos serán expulsados posteriormente de la célula por exocitosis. Finalmente, el ARN vírico llega al núcleo celular con ayuda de ciertas proteínas virales y la célula al ver alteradas sus funciones y estructura entra en fase de apoptosis.²

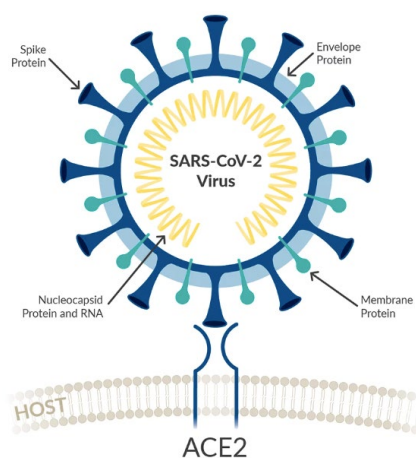


Figura 1. Estructura del SARS-2 y sitio de unión al receptor. (3)

Este sería el mecanismo general del virus que sigue el mismo esquema que otros virus similares, sin embargo este trabajo estudia en detalle la actividad de una proteína en concreto: la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Esta es una de las proteínas mencionadas anteriormente que participan en la replicación del genoma del virus. Como su propio nombre indica sus funciones están ligadas a la presencia del RNA, sin él su funcionalidad no será correcta. La RdRp está compuesta por un total de tres subunidades, la catalítica (nsp12) y dos accesorias (nsp7 y nsp8). Este complejo tiene un papel principal en la replicación del genoma viral y por tanto la subunidad catalítica va a ser la diana elegida por muchos de los antirretrovirales sometidos a estudio.⁴

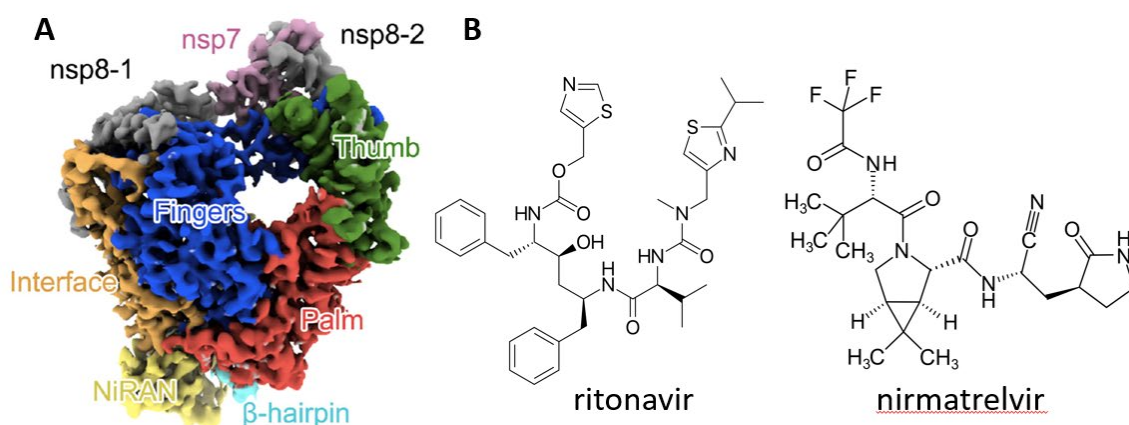


Figura 2. A: Estructura del 2019-nCoV, complejo nsp12-nsp7-nsp8. (⁵) B: Principios activos del primer tratamiento aprobado contra el SARS-2

Esta estructura está fuertemente correlacionada con la de otros virus que constan de polimerasas dependientes de RNA, como es el VIH. Por esta razón y frente a la urgencia de tratamiento que se dio en todo el mundo, numerosos estudios sobre el tratamiento del SARS-2 partieron de información ya preexistente sobre el tratamiento de VIH.

El 22 de diciembre de 2021 la FDA autorizaba el primer tratamiento antiviral oral contra el COVID-19, se trataba de Paxlovid de Pfizer. El tratamiento debía ser administrado lo antes posible tras una prueba positiva del virus y siempre en los primeros 5 días con síntomas. La composición del medicamento era nirmatrelvir y ritonavir suministrados conjuntamente; el primero es un peptidomimético que inhibe la síntesis de MPro, la principal proteasa de del SARS-2 mientras que el segundo, un conocido inhibidor de la proteasa del VIH, inhibe el citocromo P450 3A4, responsable del metabolismo del nirmatrelvir, ralentizando así su descomposición consiguiendo una mayor concentración en el organismo. En relación con otros virus, el uso de este medicamento en personas con una infección por VIH-1 no diagnosticada o descontrolada puede dar lugar a una resistencia al medicamento de este último.⁶

Por otro lado, el 25 de Julio de 2022 la administración Nacional de Productos Médicos (NMPA) autorizaba el uso de Azvudine, medicamento habitualmente usado en tratamientos contra el VIH, para

el tratamiento en adultos del coronavirus. Esta medida era aprobada en China, donde solo un año antes había sido aprobada para el tratamiento del VIH.⁷

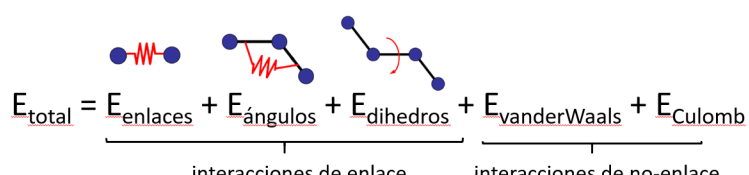
1.1. Dinámica molecular

Diversos análisis estructurales con el SARS-2 han proporcionado diversas estructuras de la enzima RdRp con RNA y una variedad de ligandos, principalmente antirretrovirales ya conocidos (PDB IDs: 6XQB, 7B3B, 7B3C, 7B3D, 7BV2, 7BW4 (*apo* form), 7D4F, 7D4G, 7DFH, 7DOI, 7DOK, 7L1F). Existen además diversas combinaciones de factores, cofactores y dímeros. Para elegir una de ellas seleccionamos la de mejor resolución dentro de las que tienen uno de los ligandos deseados, es decir 7L1F.

La técnica elegida para realizar el estudio de las interacciones entre proteína y ligandos a nivel molecular es la dinámica molecular (MD). La dinámica molecular se usa ampliamente en ciencia de materiales y Química Biológica. La dinámica molecular consiste en usar los principios de la mecánica clásica para modelar sistemas moleculares y sus interacciones.

Estos métodos también son conocidos como métodos de campos de fuerza empíricos, que no son sino modelos matemáticos que se usan para describir la energía potencial de los sistemas estudiados, ya que dicha energía está asociada a un grupo de fuerzas que actúan sobre un cuerpo dependiendo únicamente de la posición de este en el espacio.

Cada campo de fuerza se compone de un conjunto de ecuaciones de energía potencial; cada una de ellas describe las interacciones entre átomos, y tienen la forma de modelos simples extraídos de la mecánica clásica (Ecuación 1).



$$E_{\text{total}} = E_{\text{enlaces}} + E_{\text{ángulos}} + E_{\text{dihedros}} + E_{\text{vanderWaals}} + E_{\text{Culomb}}$$

interacciones de enlace interacciones de no-enlace

$$N^{\circ} \text{ interacciones} = \frac{N^{\circ} \text{ átomos} \cdot (N^{\circ} \text{ átomos} - 1)}{2} \quad \text{para 10.000 átomos: 12.497.500}$$

Ecuación 1. Cálculo del número total de interacciones

Dichos campos de fuerza contienen los siguientes términos de energía. Términos intramoleculares: Energía de estiramiento de enlace, energía de apertura/cierre angular, energía de torsión del ángulo diedro y energía de distorsiones por inversión. Términos intermoleculares: Interacciones de Van der Waals (dispersión y repulsión de intercambio) e interacciones electrostáticas.

Existen diferentes modelos y cada uno de ellos parametrizado usando datos empíricos, estos datos empíricos a su vez se toman de un conjunto de moléculas de referencia. El campo de fuerza se optimiza y debe reproducir los datos empíricos, utilizando un conjunto de parámetros. La molécula por estudiar será más fielmente descrita cuanto más similar sean sus elementos a los descritos en el conjunto de referencia. El fichero de salida resultante es una simulación que tiene en cuenta los movimientos y

equilibrios de energía necesarios e imita el movimiento e interacciones reales de los átomos en un espacio finito de tiempo.

Las simulaciones moleculares están limitadas mayormente por la capacidad de cálculo de los ordenadores, es necesario reducir los tiempos de cálculo para poder adquirir más información. Por ello desde el comienzo de las distintas técnicas computacionales gran parte de los esfuerzos se han dirigido a acelerar dichos cálculos, hasta su último gran avance: las tarjetas gráficas o GPUs. Estas GPUs suponen un gran incremento del rendimiento en multitud de aplicaciones y hoy en día ya son fáciles de encontrar en máquinas de altas prestaciones. En trabajos como el presente referentes a dinámica molecular se recurre incluso a sistemas multi GPU para acelerar en gran medida los cálculos. Es tanta la posible explotación de este modo de trabajo que se ha desarrollado un algoritmo empaquetado que permite la comunicación directa entre distintas GPU, este algoritmo se ejecuta directamente en GPU y evita así la necesidad de mover datos entre CPU y GPU.

2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Tras la aparición del COVID-19 y los miles y miles de muertos que dejó tras de sí los focos de investigación se dividieron en dos grandes grupos: prevención y tratamiento. En lo referente a la parte de tratamiento, el desarrollo de un fármaco nuevo desde el inicio conllevaría mínimo unos diez años de trabajo y dada la urgencia de la situación en la pandemia esto resultaba inviable. La opción más común que se lleva a cabo en muchos casos es comprobar el efecto de distintos antivirales ya descubiertos y que hayan tenido efecto sobre otros virus similares. Como se ha comprobado durante los últimos años de investigación, la mejor opción para combatir los RNA-virus son los análogos estructurales de los nucleósidos.

Para realizar pruebas de la eficacia de ciertos medicamentos y sobre todo si se trata de un cribado de un alto número de compuestos el método preferido es realizar las simulaciones por ordenador, así solo un bajo porcentaje de los fármacos han de someterse a ensayos en humanos. Los objetivos formativos de este trabajo consisten en aprender a manejar ciertos programas que nos permiten estudiar estas reacciones y efectos, ver como actuaría nuestro organismo ante numerosos agentes y todo a nivel teórico.

Con estos programas se lleva a cabo una inmersión en la investigación, al llevar a cabo ciertas pruebas que tienen un resultado desconocido. Se profundiza en programas que no han sido usados con anterioridad, añadiendo el hecho de trabajar sin un guion definido. Se parte de ciertos compuestos y ligandos propuestos con la intención de sacar conclusiones que sean pertinentes y útiles en la acción contra el virus.

En el terreno de objetivos de investigación se destaca el trabajo de documentación requerido acerca de la RNA-polimerasa dependiente de RNA del covid. Es necesario entender y manejar los conceptos a cerca de las bases moleculares de la RDRP para entender a su vez las interacciones posibles con los diferentes fármacos. Aunque el comportamiento de esta proteína pueda asemejarse al de otras de su familia, el tratamiento tan exhaustivo que se hace a nivel computacional de las moléculas requiere un conocimiento muy preciso de la RDRP del COVID.

A continuación, se detallan los objetivos del presente trabajo

2.1.OBJETIVOS FORMATIVOS:

- **Introducción al sistema Linux:** manejo del sistema operativo Linux y sus funciones básicas referentes a la química computacional
- **Docking:** realizar estudios de docking a diferentes ligandos
- **Dinámica molecular:** adquirir conocimientos acerca de los principios y fundamentos de una dinámica molecular
- **Pymol:** Este programa es el primer paso en el tratamiento de proteínas por ordenador, sin embargo, su uso final en este trabajo es poder ver en detalle las diferentes interacciones de nuestra proteína y como cambian a lo largo de la dinámica.
- **Introducción a AMBER:** comprender el funcionamiento del programa para poder realizar una dinámica molecular, supone el aprendizaje de una técnica computacional compleja.
- **Gestión de cálculo con GPUs:** Utilización de GPUs en lugar de procesadores. Introducción al lenguaje CUDA
- **Paquete de Software Schrodinger:** comprender el funcionamiento de los programas y ser capaz de ejecutar funciones principales como docking que incluye **Maestro**, **LigPrep** y **Glide** entre otros.

2.2.OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN:

- **Realización docking ligando RdRp:** obtener un primer resultado aproximado acerca de las interacciones proteína-ligando
- **Dinámica molecular RdRp (Apo-compuesto RNA):** analizar el comportamiento de la RNA polimerasa dependiente de RNA
- **Dinámica molecular, interacción con ligandos:** analizar las interacciones de la proteína RdRp con diversos ligandos
- **Monitorización de cambios durante la dinámica molecular:** analizar las fluctuaciones y cambios de los diferentes contactos entre proteína y ligando a lo largo de la dinámica
- **Análisis de interacciones:** Extraer las interacciones relevantes para la estabilidad del complejo ligando-proteína

(Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente)

3. MÉTODOS COMPUTACIONALES

Se tomó como estructura de referencia el registro 7L1F Protein Data Bank (PDB). Los ficheros de tipo PDB contienen datos estructurales de rayos X pero es necesario completar residuos que hayan podido quedar sin caracterizar por comparación con la información de la literatura. Además, es necesario completar una serie de parámetros que pueden no reflejar la realidad de la proteína, como son los puentes disulfuro, orientaciones de ciertos grupos laterales o estado de protonación de los residuos de histidina.

A continuación, se prepara el centro activo de la proteína se eliminan las aguas que no intervienen en la catálisis y a continuación se procesa la proteína completando átomos de hidrógeno, multiplicidades de enlace, etc. Tras esto es necesario optimizar la proteína y someterla a una primera minimización.

En el siguiente paso definimos la rejilla de cálculo (grid), es decir, fijamos la zona catalítica de la enzima seleccionando el ligando definido en nuestra estructura. El software reemplazará automáticamente el ligando de la estructura por nuestro ligando y llevará a cabo el cálculo de la rejilla dónde se optimizará el docking.

Es necesaria también una preparación de los ligandos, para tener en cuenta que partes se van a considerar flexibles así como las posibles conformaciones y, si se desea, las diferentes configuraciones. La preparación de los ligandos se realiza a partir del correspondiente fichero PDB y el software LigPrep integrado en el paquete Schrodinger.

La última etapa calcula cómo insertar los ligandos en el lugar del ligando inicial maximizando sus interacciones favorables y minimizando las desfavorables. Este proceso se denomina docking y se ejecuta con el software Glide integrado en el paquete Schrodinger. El resultado nos proporciona una serie de “poses” del ligando estudiado ordenadas según la energía de interacción calculada y asignando una puntuación de docking que cuanto más alta mejor ajusta al sitio activo indicado por la correspondiente. -

El procedimiento de docking se llevó a cabo con los siguientes ligandos:

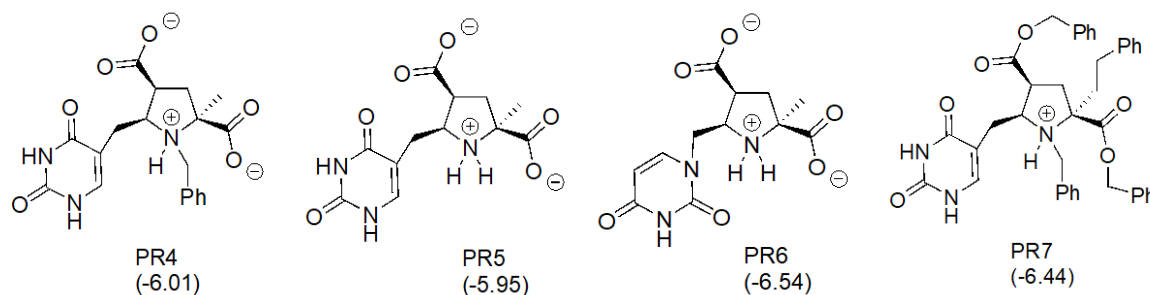


Figura 3. Estructuras de los ligandos usados en el proceso de docking.

Tras la realización del docking se lleva a cabo la dinámica molecular, ejecutada en este caso por el programa AMBER. Para poder comenzar hemos de generar los archivos de extensión adecuada, anteriormente se ha acondicionado la proteína y el ligando por lo que únicamente falta convertir las estructuras en un archivo de parámetros (.prmtop) y otro de coordenadas (.inpcrd), mediante el programa Xleap del paquete AMBER. Una vez en el punto de partida la proteína se introduce en una caja de aguas (10 Å), la caja de aguas es la versión computacional del medio al que está expuesto la proteína y que como se ha explicado con anterioridad simula todas las fuerzas a las que está expuesta la proteína. A continuación, el ordenador realiza una serie de pasos previos:

- 1) Se realiza una minimización de la caja de aguas.
- 2) Tiene lugar una segunda minimización esta vez engloba la proteína con la caja de aguas.
- 3) Una etapa de calentamiento, entre 0 y 300 K
- 4) Tras la etapa de temperatura es necesario un paso de equilibrio ya a 300 K

Después y finalmente tiene lugar la etapa de producción, que genera la simulación de la evolución del sistema a lo largo del tiempo. Se genera un fichero de salida con extensión .coord que puede transformarse a su vez en diferentes tipos, en nuestro caso volvemos a fichero PDB para analizar los resultados mediante el software Pymol. La dinámica molecular se llevo a cabo con los dos últimos ligandos con los que se realizó el docking.

En la fase de análisis de los resultados se analizan las dos dinámicas mediante las diferentes opciones y menús de Pymol. Pudiendo así evaluar las diferentes interacciones a lo largo de las dinámicas con se verá en el apartado posterior.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.DOCKING

Los resultados del docking generan un fichero de salida que indica la posición de ligando y producto y sus interacciones. Dicho fichero muestra una posición estática, es decir una sola posibilidad de interacción. Una vez generado el fichero de salida, podemos visualizar las interacciones en el propio programa Maestro. Se muestran las figuras para los cuatro ligandos a los que se aplicó el docking.

Es necesario puntualizar que los números de los residuos no coinciden en los ficheros de docking y dinámica molecular, esto es debido a un desfase de 4 unidades en el fichero de docking, que empieza su numeración en el número 5. Por este motivo pueden verse modificaciones entre los números de residuos que aparecen en las figuras. Nos referiremos, en general, a la numeración de la dinámica molecular (en rojo). Por comodidad, en el docking (numeración en negro y entre paréntesis) se indicarán las dos numeraciones.

Pr4

Lys 545, Thr 556, Arg624, Arg553

Lys541, Thr552, Arg620, Arg549

Para el ligando pr4 se encuentran 5 interacciones, dos con la lisina 541 (545 en la figura), otra con el residuo Thr552 (556) y además dos interacciones correspondientes a dos argininas: Arg620(624) y Arg549(553).

Pr5

Lys545, Cys622, Arg553, Thr680, Asp623

Lys541, Cys618, Arg549, Thr676, Asp619

El ligando pr5 muestra 6 interacciones, dos para Asp619 (623), y cuatro más correspondientes a los residuos Arg549 (553), Lis541 (545), Thr676 (680) y Cys618 (622).

Pr6

Arg553, Asp623, Cys622, Thr687, Thr680, Ser682, Lys545

Arg549, Asp619, Cys618, Thr683, Thr676, Ser678, Lys541

El ligando pr5 expone 9 interacciones, los aminoácidos Lys541 (545) y Asp619 (623) presentan 2 interacciones cada uno. Además, los residuos Arg549 (553), Cys618 (622), Thr683 (687), Thr678 (682) y Ser678 (682) muestran cada uno una interacción.

Pr7

Asp623, Thr556, Arg624, Arg553

Asp618, Thr552, Arg620, Arg 548

En el último caso para el ligando pr7 se presentan 4 interacciones para cuatro residuos diferentes que corresponden a Asp618 (623), Thr552 (556), Arg620 (624) y Arg548 (553).

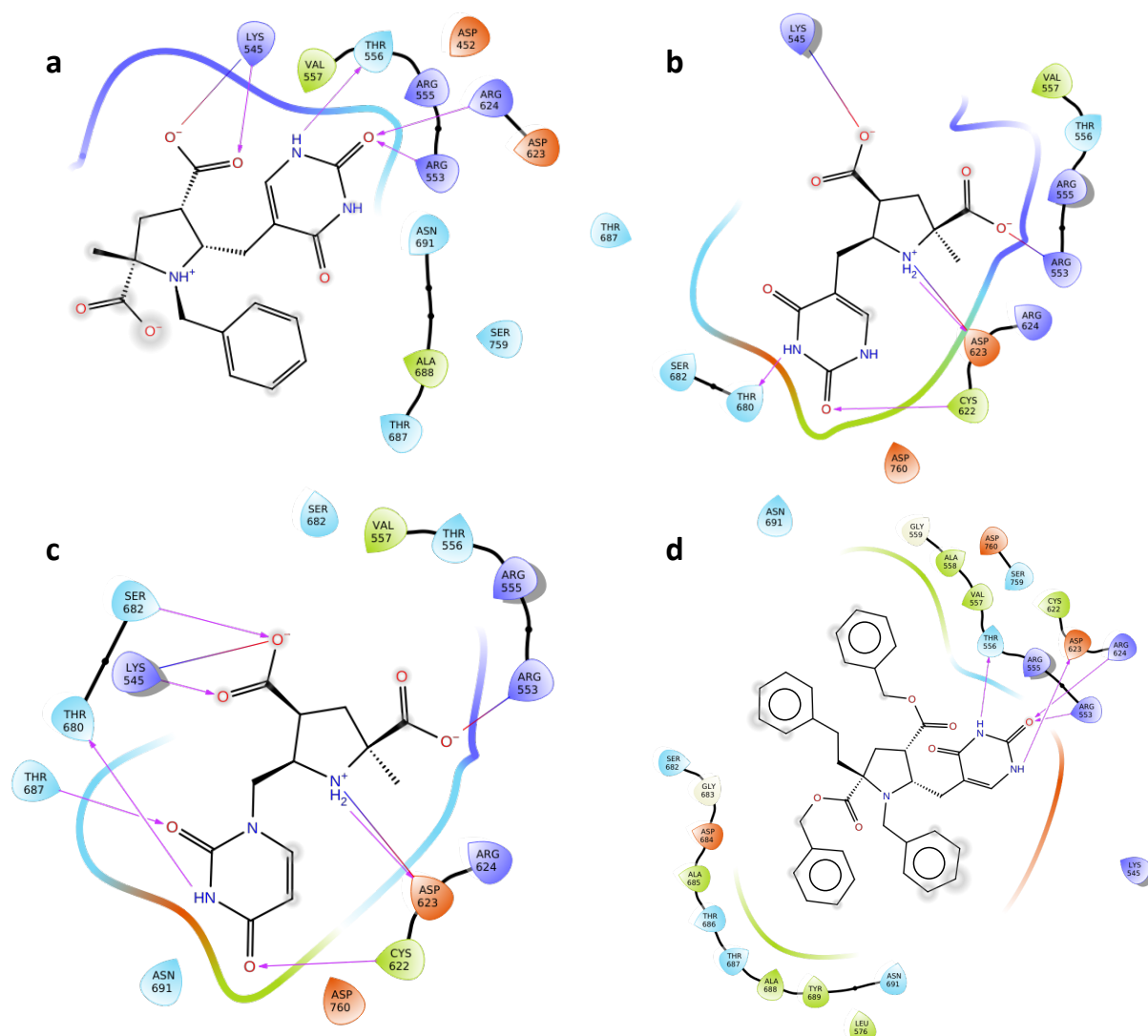


Figura 4. Interacciones resultantes del proceso de docking. A) Ligando pr4 B) Ligando pr5 C) Ligando pr6 D) Ligando pr7

4.2. DINÁMICA MOLECULAR

Como resultado de los cálculos de dinámica molecular se obtienen 2 conjuntos de archivos PDB, cada PDB representa un frame y cada frame corresponde a un nanosegundo. Así el conjunto de PDBs forma una secuencia, de unos cientos de nanosegundos, que representa la dinámica molecular. Con los resultados de dichas dinámicas moleculares se van a analizar en detalle las diferentes interacciones que presentan cada uno de los dos ligandos y su estabilidad. Cada dinámica se realiza con su ligando correspondiente y la proteína ha de incluir en todos los casos en fragmento de RNA, ya que es dicho fragmento el que le confiere la afinidad a la proteína. En presencia de RNA el complejo proteína-RNA es capaz de seleccionar ciertos sustratos/ligando para hacer crecer la cadena de ácido nucleico.

Ligando PR6

Se realizan dos réplicas de la dinámica correspondiente al ligando pr6, cuya estructura aparece descrita en la figura 3. La primera dinámica tiene una duración de 587 ns y a la vista de sus resultados la segunda fue ampliada hasta los 707 ns, sin embargo, esta expansión no generó nuevos resultados.

Las interacciones más relevantes y monitorizadas a lo largo de todo el proceso corresponden a tres argininas que ocupan los puestos 549, 551, 620 en la cadena de aminoácidos. En las figuras 5 y 6 se observan las distancias de estos tres aminoácidos respecto del ligando, puntualizándose en la segunda los átomos de enlace.

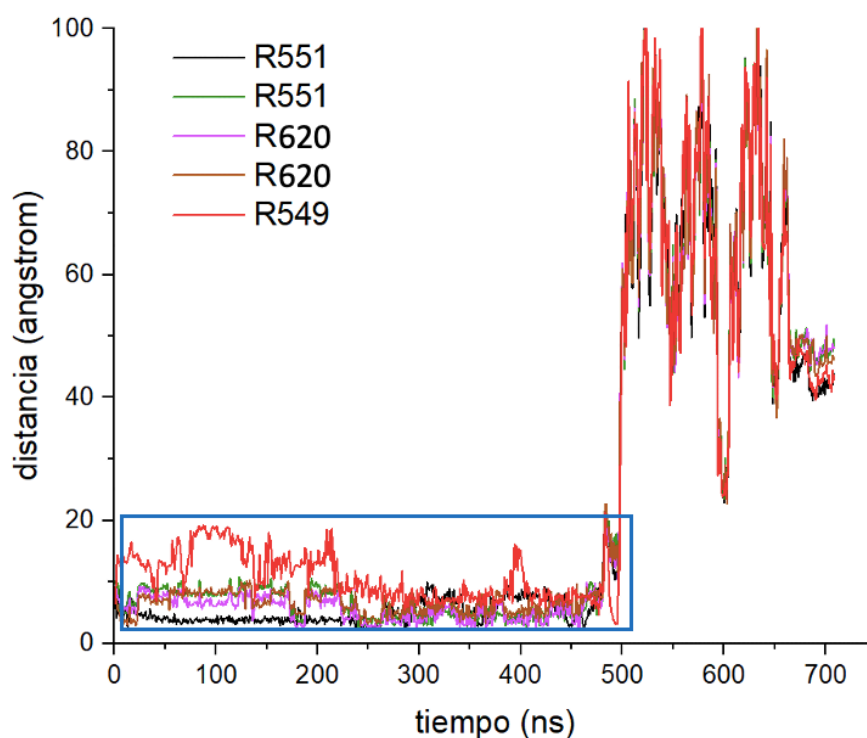


Figura 5. Distancias entre ligando pr6 y residuos 549, 551 y 620 a lo largo de la dinámica. (700ns)

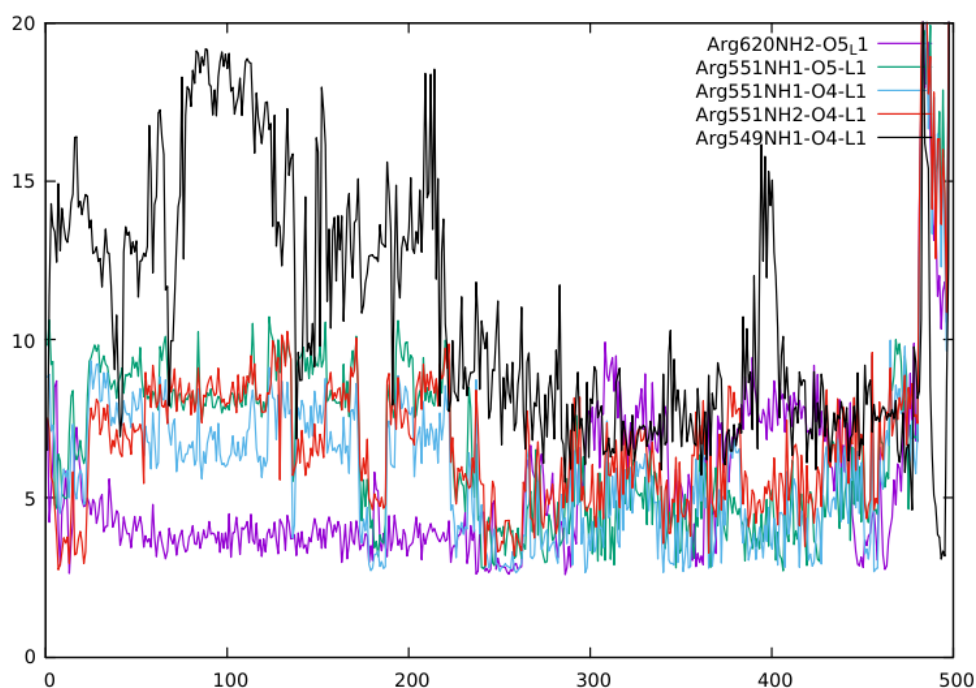


Figura 6. Ampliación de distancias entre ligando pr6 y residuos 549, 551 y 620 en los primeros 500ns, se especifica el átomo de interacción.

Al comienzo de la dinámica el ligando se sitúa en el centro activo de la proteína (Figura 7a). Durante los 200 primeros nanosegundos se observan puentes entre el ligando (representado en amarillo) y los residuos 551 y 620 (argininas representadas en cian).

En la figura 7a la arginina 620 presenta una interacción entre su grupo NH2 y el O5 del ligando, mientras la arginina 551 presenta dos interacciones NH1-O5 y NH2-O4.

Transcurridos más nanosegundos en la dinámica vemos como “aparece” una tercera arginina (arginina 549) que comienza a interactuar con el ligando (figura 7b). A medida que el ligando comienza a interactuar con R549 va aumentando su distancia a R620 y se debilitan sus interacciones con este. A su vez los puentes con R551 van fluctuando, pudiendo verse entre una y tres interacciones dependiendo del frame. En la figura 7b correspondiente al nanosegundo 300 vemos una sola interacción con la arginina 551 y dos con la 549, no se observan interacciones con R620.

Durante la dinámica observamos como el ligando va adoptando diferentes conformaciones lo que le permite unirse a varios residuos a la vez a través de un solo átomo, como se ve en la figura número 7c. La figura muestra un oxígeno perteneciente al ligando unido a las argininas 551 y 549 con unas distancias de 4,2 y 2,7 Å respectivamente.

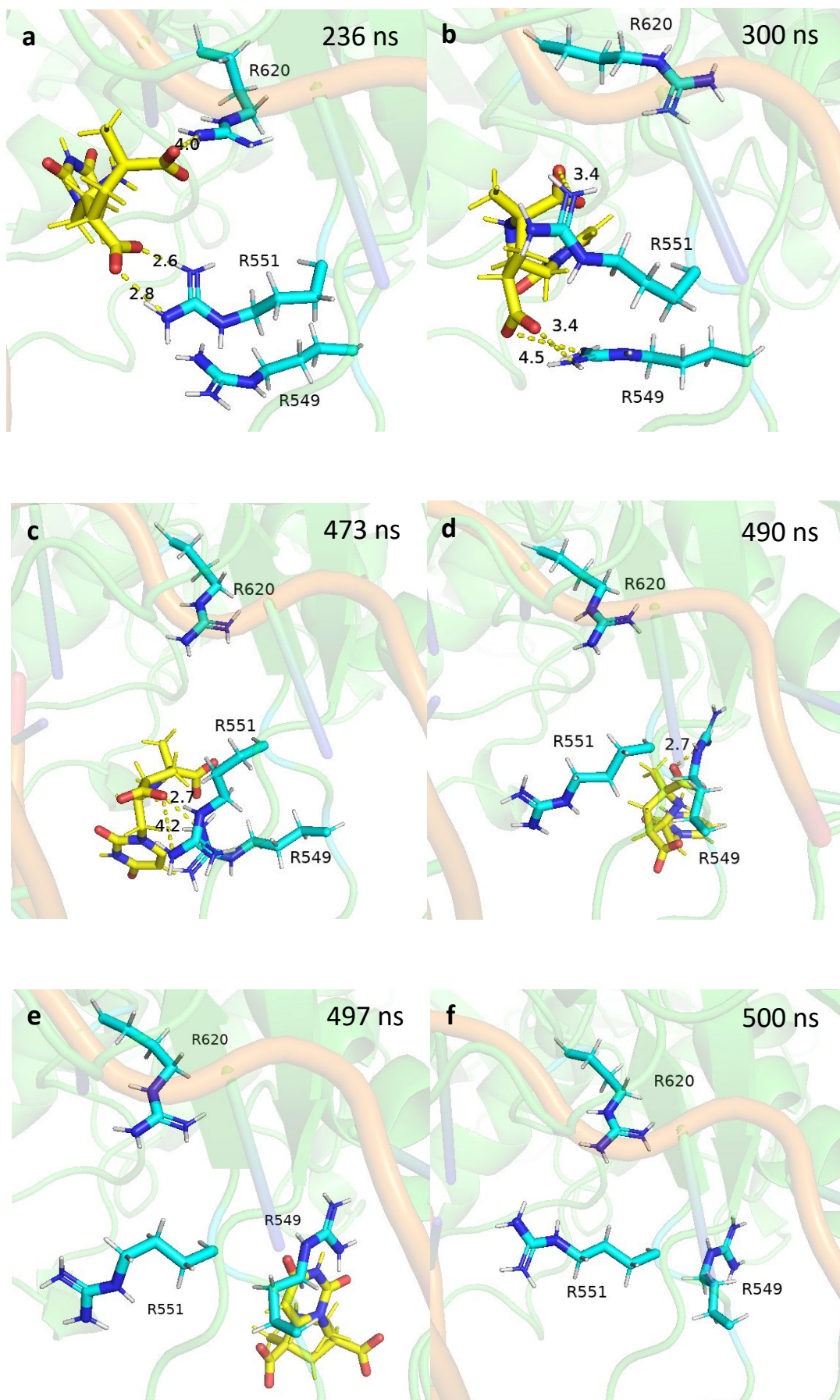


Figura 7. Secuencia de interacciones entre ligando (amarillo) y residuos 549, 551 y 620 (cian)

En torno al nanosegundo 490 (figura 7d) vemos como solo restan interacciones ligando-R549, la última arginina en unirse al ligando es la que captura a dicho ligando alejándolo de las demás argininas y expulsándolo del sitio activo (figura 7e). Esta secuencia tiene lugar en menos de 10 ns, visibles entre los frames 490 y 500 (figura 7de).

El ligando al alejarse del sitio activo no presenta más interacciones y se aleja del conjunto global de la proteína. El sitio activo queda vacío y las argininas no presentan más interacciones.

La segunda replica de la dinámica realizada con este ligando se extendió dejándola evolucionar hasta los 700 ns sin embargo como se puede ver en la figura 5, que refleja las distancias con los residuos relevantes, el ligando no vuelve al sitio activo. La proteína rechaza el ligando y lo expulsa del sitio activo ya que las interacciones entre ellos no resultan favorables.

Ligando PR7

En relación con el ligando pr 7 se realizan 2 dinámicas de 510 ns obteniendo resultados parejos para ambas.

La figura número 8 refleja las interacciones del ligando con Arg551, Ser 545 y Ile 544. En la primera parte de la gráfica se ve una fuerte fluctuación de las distancias, claramente más acusada para la arginina. Esta búsqueda del sitio activo para el ligando tiene su final al encontrar una posición de equilibrio que se ve reflejada en la parte posterior de la gráfica. Durante más de 100 ns se observan distancias constantes que derivan de interacciones estables, estas distancias durante un tiempo considerado nos indican un mínimo de energía y una situación estable para el complejo.

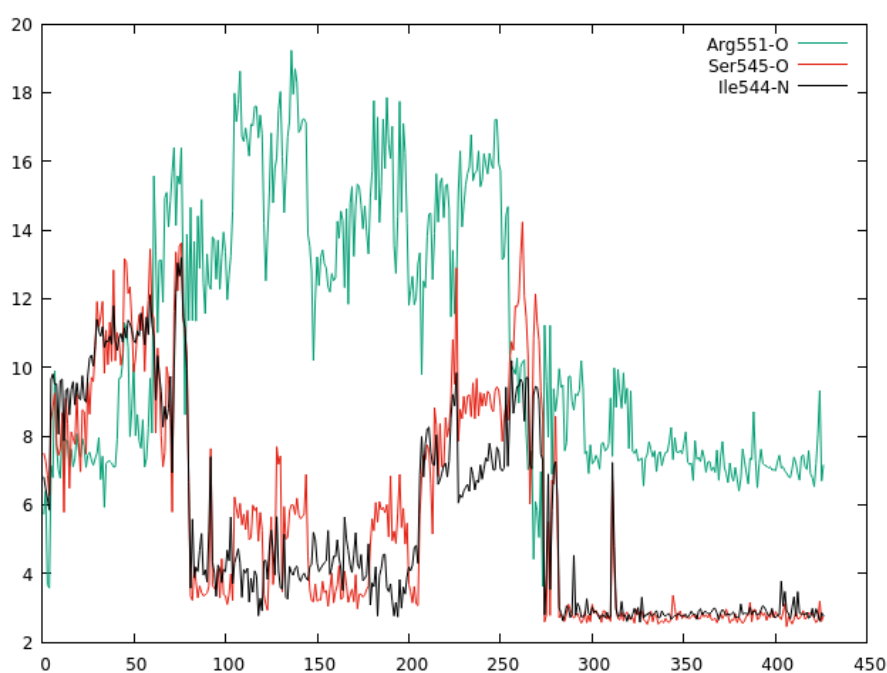


Figura 8. Distancias entre ligando pr7 y residuos 544, 545 y 551 a lo largo de la dinámica.

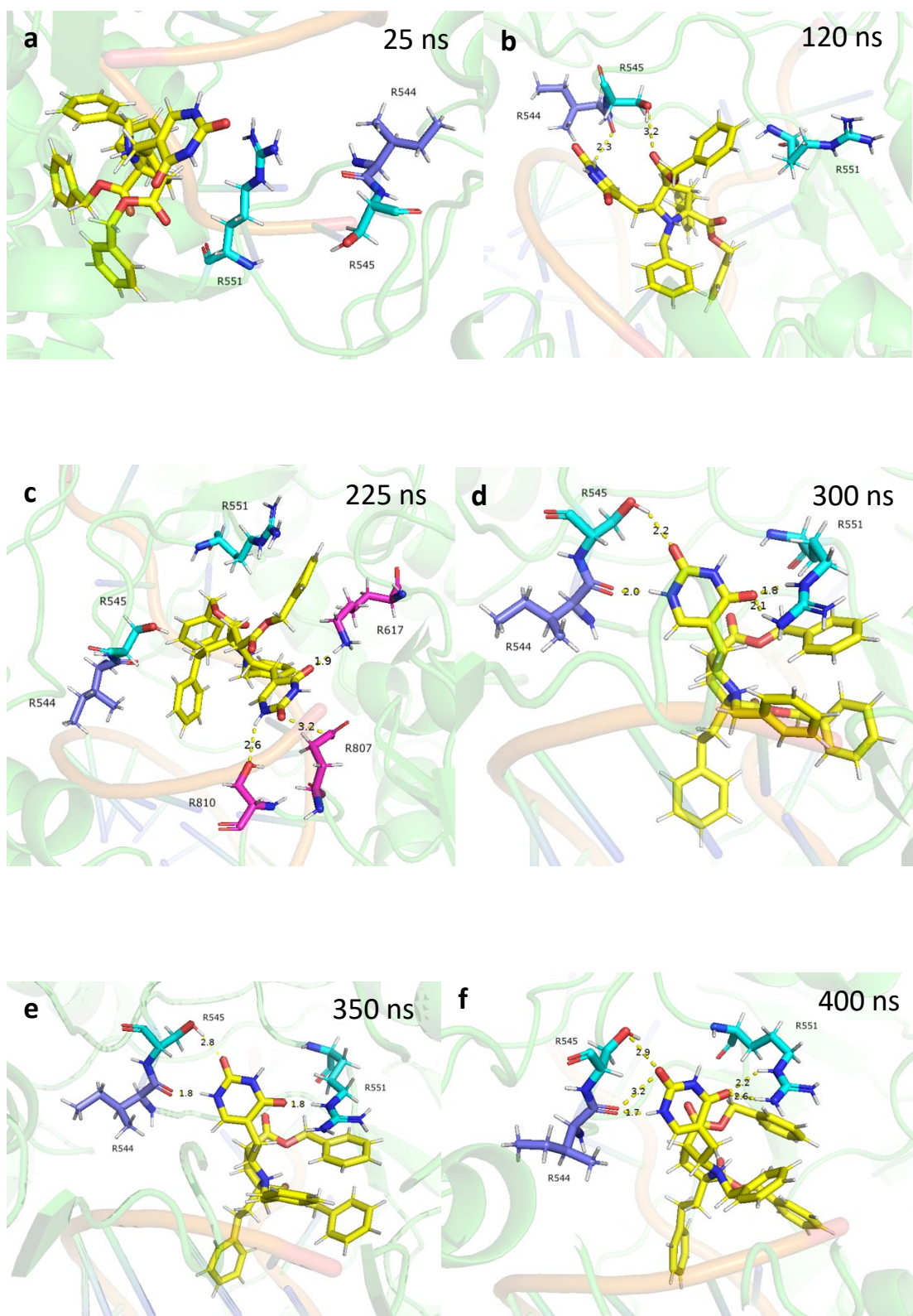


Figura 9. Secuencia de interacciones entre ligando (amarillo) y residuos 544, 545 y 551 (cian y azul)

En el punto de inicio de la dinámica y durante los primeros 50 ns el ligando busca el sitio activo de la proteína sin reflejar interacciones relevantes. En la figura 9a se observa el ligando (amarillo) y los residuos que tienen relevancia a lo largo del resto de la dinámica (azul y cian).

Sin embargo, tras localizarse en el sitio activo el ligando presenta dos interacciones estables que son monitorizadas durante toda la dinámica (figura 9b). El ligando forma puentes de hidrogeno con los residuos situados en las posiciones consecutivas 544 y 545, en este caso se trata de los aminoácidos isoleucina y serina respectivamente. Estas interacciones permanecen constantes unos 100 ns, aunque llegados al frame numero 200 dejan de estar presentes. Podemos ver sin embargo en la gráfica de distancias que no llegan a alejarse demasiado del ligando. Analizando dichos frames en detalle vemos que el ligando no llega a alejarse del sitio activo, ya que aparecen nuevas interacciones que estabilizan el ligando. Se reflejan interacciones con los residuos: serina 810, glutámico 807 y lisina 617 (presentado en magenta) (figura 9c).

Sin embargo, estas últimas interacciones no se alargan en el tiempo y desaparecen rápidamente, por lo que se puede deducir su poca estabilidad. Pocos nanosegundos más adelante se observa que los puentes que si resultan estables y mantienen el ligando en equilibrio en el sitio activo son R544 y R545 anteriormente mencionados (figura 9d). Observamos asimismo una nueva interacción que parece llegar al equilibrio entre el ligando y la arginina situada en la posición 551 como se puede ver en la figura 9d.

Esta configuración muestra una estabilidad a destacar, ya que estas interacciones se prologan en el tiempo hasta en final de la dinámica. Refleja una situación de equilibrio, aunque no estática como podemos ver en los pequeños cambios de conformación del ligando que se puede ver en la figura 9def.

Tras completar el análisis de los resultados de los dos procedimientos realizados, podemos realizar una comparativa entre ellos. El docking realizado en maestro nos muestra solo un conjunto de interacciones invariable, mientras la dinámica nos permite observar todas las interacciones posibles entre ligando y proteína y ver la diferencia de probabilidad de formación entre unas y otras. Fijándonos en los ligandos pr6 y pr7 vemos que los resultados difieren sustancialmente entre los dos métodos, solo se observa una interacción común en el ligando pr6 con la arginina 549, arginina que según la dinámica es la última responsable de la salida del ligando pr6 del sitio activo. Vemos, así como un resultado estático (resultado de docking) está lejos de reflejar la realidad en situaciones de múltiples posibilidades de interacción.

5. CONCLUSIONES

- Tras la realización de todos los estudios podemos concluir que:
- Para diseñar cualquier ligando o estudiar interacciones con ligandos preexistentes es necesario considerar la enzima junto con el RNA, si no ésta carece de selectividad.
- Los ligandos diseñados para ocupar el sitio activo deben competir con bases nucleotídicas de RNA.
- Existe la posibilidad de diseñar ligandos con cierta afinidad para la enzima RdRp del SARS-CoV-2.
- Dentro de la propia enzima los residuos pertinentes en el reconocimiento de ligandos son las argininas 549, 551 y 620, estos residuos muestran capacidad de rechazo ante ligandos no requeridos.
- Los residuos serina 545 e isoleucina 544 colaboran en la estabilidad de los ligandos aceptados por la enzima.
- Entre los ligandos estudiados resulta estable el ligando pr7 debido a sus interacciones estáticas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Speth, M. M.; Singer-Cornelius, T.; Oberle, M.; Gengler, I.; Brockmeier, S. J.; Sedaghat, A. R. Olfactory Dysfunction and Sinonasal Symptomatology in COVID-19: Prevalence, Severity, Timing, and Associated Characteristics. *Otolaryngol. Neck Surg.* **2020**, *163* (1), 114–120. <https://doi.org/10.1177/0194599820929185>.
- (2) Fernández-Pérez, G. C.; Oñate Miranda, M.; Fernández-Rodríguez, P.; Velasco Casares, M.; Corral de la Calle, M.; Franco López, Á.; Díez Blanco, M.; Cuchat, J. M. O. SARS-CoV-2: Cómo Es, Cómo Actúa y Cómo Se Expresa En La Imagen. *Radiologia* **2021**, *63* (2), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2020.10.006>.
- (3) *Tools to Study SARS CoV 2 Host Interactions*. <https://www.caymanchem.com/news/tools-to-study-sars-cov-2-host-interactions> (accessed 2023-07-02).
- (4) Byléhn, F.; Menéndez, C. A.; Perez-Lemus, G. R.; Alvarado, W.; De Pablo, J. J. Modeling the Binding Mechanism of Remdesivir, Favilavir, and Ribavirin to SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7* (1), 164–174. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01242>.
- (5) Gao, Y.; Yan, L.; Huang, Y.; Liu, F.; Zhao, Y.; Cao, L.; Wang, T.; Sun, Q.; Ming, Z.; Zhang, L.; Ge, J.; Zheng, L.; Zhang, Y.; Wang, H.; Zhu, Y.; Zhu, C.; Hu, T.; Hua, T.; Zhang, B.; Yang, X.; Li, J.; Yang, H.; Liu, Z.; Xu, W.; Guddat, L. W.; Wang, Q.; Lou, Z.; Rao, Z. Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase from COVID-19 Virus. *Science* **2020**, *368* (6492), 779–782. <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>.
- (6) Commissioner, O. of the. *Actualización sobre el coronavirus (COVID-19): La FDA autoriza el primer tratamiento antiviral oral contra el COVID-19*. FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/actualizacion-sobre-el-coronavirus-covid-19-la-fda-autoriza-el-primer-tratamiento-antiviral-oral> (accessed 2023-07-02).
- (7) *China aprueba uso de un medicamento contra el VIH para tratamientos anticovid*. SWI swissinfo.ch. https://www.swissinfo.ch/spa/coronavirus-china_china-aprueba-uso-de-un-medicamento-contra-el-vih-para-tratamientos-anticovid/47778598 (accessed 2023-07-02).