

## Identifikasi Struktur Protein Spike Varian Baru SARS-CoV-2 secara Bioinformatika dalam Pengembangan Kandidat Terapi COVID-19

Taufik Muhammad Fakhri<sup>1\*</sup>, Dwi Syah Fitra Ramadhan<sup>2</sup>, Aulia Fikri Hidayat<sup>1</sup>, and Budi Prabowo Soewondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Farmasi, Poltekkes Kemenkes Makassar, Makassar, Indonesia

Corresponding Author:

Taufik Muhammad Fakhri  
taufikmuhammadf@gmail.com

Received: July 2023

Accepted: August 2023

Published: September 2023

©Taufik Muhammad Fakhri et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

Despite the relatively slow evolutionary rate of SARS-CoV-2 in comparison to other RNA viruses, the extensive and rapid transmission during the COVID-19 pandemic has led to the emergence of significant genetic diversity since the virus first infected the human population. This has resulted in various variants, such as Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), among others. Of particular concern are the Delta Variant and newly recognized Variants of Concern (VOCs), including lineages of B.1.617.2, as well as other VOCs discovered through local transmission, such as Epsilon (B.1.427/29-US) and B.1.1.7/E484K-UK. The interactions between these variants and the spike protein of SARS-CoV-2, as well as the Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), have become a primary focus in understanding the infection and spread of the SARS-CoV-2 virus. This research aims to comprehensively identify, evaluate, and explore the structural characteristics of the macromolecular spike protein of SARS-CoV-2 in the Beta, Gamma, and Delta variants using bioinformatics approaches. The methods employed in this study include homology modeling, molecular docking simulations, and molecular dynamics simulations. The research findings indicate that the spike protein of SARS-CoV-2 in the Gamma variant exhibits a strong affinity for ACE2. Therefore, this study is expected to serve as a reference for designing effective vaccine or antiviral candidates targeting various SARS-CoV-2 variants in the treatment of COVID-19 infections.

**Keywords:** *penyakit COVID-19; variants of concern (VOC); protein spike SARS-CoV-2; terapi COVID-19; bioinformatika.*

### Pendahuluan

Penyakit infeksi Coronavirus 2019 (COVID-19) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh sindrom pernapasan akut coronavirus 2 (SARS-CoV-2) dan telah mengakibatkan lebih dari 3,8 juta kematian di seluruh dunia. Setelah

kasus pertama dilaporkan di Wuhan, Provinsi Hubei, Cina, pada akhir Desember 2019, SARS-CoV-2 dengan cepat menyebar ke seluruh dunia dalam waktu singkat sehingga memaksa Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) untuk menyatakannya sebagai pandemi global pada 11 Maret 2020<sup>[1,2]</sup>. Meskipun kemajuan

substansial dalam penelitian klinis telah mengarah pada pemahaman yang lebih baik tentang SARS-CoV-2 dan pengelolaan COVID-19, namun penularan virus ini beserta varian barunya terus menjadi isu yang semakin meningkatkan kekhawatiran<sup>[3-5]</sup>.

Genom SARS-CoV-2 terdiri dari ssRNA dengan untai positif dan panjang kurang lebih 30.000 nukleotida. Genom yang tidak tersegmentasi ini meliputi 50 *untranslated region* (UTR), diikuti oleh daerah pengkode *Open Reading Frame* (ORF1a dan ORF1ab), serta gen-gen non structural seperti: spike (S), envelope (E), membrane (M), dan nukleokapsid (N)<sup>[6,7]</sup>. Protein spike merupakan glikoprotein transmembran yang terdiri dari 1273 asam amino dan berbentuk homotrimer. Pada protein spike terdapat *receptor binding domain* (RBD) yang berinteraksi dengan reseptor sel inang *ACE2*<sup>[8]</sup>. Protein spike SARS-CoV-2 memiliki kesamaan urutan asam amino 76,7–77% dengan SARS-CoV dari manusia dan musang, 75–98% dengan coronavirus kelelawar dari subgenus yang sama (*Sarbecovirus*), serta 90,7–92,6% dengan coronavirus yang menginfeksi trenggiling<sup>[9,10]</sup>.

Seperti virus RNA lainnya, SARS-CoV-2, saat beradaptasi dengan sel inang rentan terhadap evolusi genetik dengan perkembangan mutasi dari waktu ke waktu sehingga menghasilkan varian mutan yang mungkin memiliki karakteristik berbeda dari strain sebelumnya<sup>[11]</sup>. Berdasarkan pembaruan epidemiologi terbaru oleh WHO, pada 22 Juni 2021, terdapat tiga varian SARS-CoV-2 yang dianggap sebagai varian yang menjadi perhatian atau *Variants of Concern* (VOC) oleh WHO, diantaranya varian Alpha (B.1.1.7) dari Inggris Raya (UK), varian Beta (B.1.351) dari Afrika Selatan, dan varian Gamma (P.1) dari Brazil. Kemudian saat ini ditambah dengan dua varian baru yaitu varian Delta (B.1.617.2) dari India dan varian Epsilon (B.1.427/29-US dan B1.1.7/E484K-UK) dari Amerika Serikat<sup>[12-14]</sup>.

Studi awal sangat diperlukan untuk memahami karakteristik dari berbagai varian SARS-CoV-2. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pemodelan homologi protein spike SARS-CoV-

2 pada varian Alpha, Beta, Gamma, Delta, dan Epsilon. Kemudian dilakukan juga studi interaksi molekuler terhadap *ACE2* yang telah diketahui sebagai pintu masuk pada sel inang<sup>[15,16]</sup>. Metode bioinformatika dapat digunakan untuk identifikasi, evaluasi, dan eksplorasi bagian yang potensial dari protein spike SARS-CoV-2 pada masing-masing varian<sup>[17]</sup>. Secara khusus, protein spike SARS-CoV-2 dianggap sebagai target penting karena merupakan bagian terluar dari virus sehingga dari penelitian ini diharapkan diperoleh beberapa informasi dalam upaya pengembangan kandidat vaksin dan antivirus COVID-19.

Melalui penelitian ini akan diidentifikasi, dievaluasi, dan dieksplorasi secara menyeluruh mengenai karakteristik struktur makromolekul protein spike SARS-CoV-2 pada berbagai varian secara bioinformatika dengan memanfaatkan metode pemodelan homologi, simulasi penambatan molekuler, dan simulasi dinamika molekuler<sup>[18]</sup>. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat dijadikan salah satu acuan dalam mendesain kandidat vaksin atau antivirus yang memiliki efektivitas yang baik terhadap berbagai varian SARS-CoV-2 pada terapi infeksi COVID-19.

## Metodologi Penelitian

### Struktur kimia

Struktur tiga dimensi protein spike SARS-CoV-2 yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) melalui situs Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (<https://www.rcsb.org/pdb/>). Kode protein spike SARS-CoV-2 yang terkompleks dengan reseptor *ACE2* yang digunakan yaitu 6M0J, protein hasil kristalografi X-Ray dengan resolusi tinggi 2,96 Å<sup>[19]</sup>.

### Perangkat Keras

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan perangkat keras berupa fasilitas *High Performance Computing* (HPC) yang dilengkapi dengan sistem operasi Windows 10 dan Linux Ubuntu 18.10, dengan spesifikasi perangkat keras berupa Intel (R)

Core i5-8500 CPU @ 4.30GHz (6CPUs) processor, 4096 MB RAM, 2TB hard drive, 120GB solid state drive, and Intel HD Graphics NVIDIA GeForce GTX 1080 Ti.

### Perangkat Lunak

Fasilitas *High Performance Computing* (HPC) dilengkapi dengan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020, Gromacs 2016.3, VMD 1.9.2, MMPBSA.py, PyMOL, dan PatchDock.

### Prosedur penelitian

Studi bioinformatika yang dilakukan dalam penelitian ini bertujuan untuk mengamati interaksi molekular dari berbagai varian muatan protein spike SARS-CoV-2 (Beta, Gamma, dan Delta) dengan reseptor *ACE2*. Sebelum melakukan analisis interaksi molekular, tahap awal melibatkan identifikasi dan evaluasi struktur makromolekul serta bagian pengikatan pada protein spike SARS-CoV-2 menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020<sup>[20]</sup>. Langkah berikutnya adalah pemodelan struktur mutan protein spike SARS-CoV-2 varian Beta, Gamma, dan Delta menggunakan perangkat lunak PyMOL<sup>[21]</sup>. Interaksi antara reseptor *ACE2* dan protein spike yang dimutasi kemudian dikaji melalui perangkat lunak PatchDock<sup>[22]</sup>. Tahap terakhir melibatkan evaluasi stabilitas pengikatan protein spike SARS-CoV-2 pada reseptor *ACE2* melalui simulasi dinamika molekular (MD) menggunakan perangkat lunak Gromacs 2016.3<sup>[23,24]</sup>. Berbagai parameter analisis seperti *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), evaluasi struktur sekunder protein, dan perhitungan energi bebas ikatan ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) berdasarkan metode MM/PBSA<sup>[25-27]</sup> digunakan untuk menganalisis hasil simulasi ini.

### Hasil dan Diskusi

#### Pemodelan Mutan Protein Spike SARS-CoV-2

Struktur protein spike SARS-CoV-2 yang telah dipreparasi kemudian dilakukan mutasi pada beberapa titik melalui pemodelan homologi secara bioinformatika untuk mewakili varian protein spike SARS-CoV-2. Terdapat beberapa

mutan protein spike SARS-CoV-2 yang dimodelkan dalam penelitian ini diantaranya protein spike SARS-CoV-2 untuk varian Beta dengan mutasi E484K, K417N, dan N501Y yang kemudian masing-masing diberi nama Beta-A, Beta-B, dan Beta-C. Selanjutnya untuk varian Gamma hanya terdapat satu mutasi yaitu K417T dan diberi nama Gamma-A. Terakhir untuk varian Delta terdapat dua mutasi meliputi L452R dan T478K yang kemudian diberi nama Delta-A dan Delta-B.

Berdasarkan Tabel 1 dapat diamati bahwa beberapa titik mutasi yang telah dibuat terletak pada permukaan protein spike SARS-CoV-2 yang ditandai dengan huruf berwarna merah bercetak tebal. Lokasi tersebut berperan penting dalam pengikatan dengan *ACE2* yang merupakan reseptor pada sel inang tempat masuknya SARS-CoV-2. Namun demikian, untuk mengevaluasi, mengeksplorasi afinitas, dan stabilitas interaksi molekular masing-masing protein spike mutan SARS-CoV-2 terhadap *ACE2* perlu dikonfirmasi dengan menggunakan simulasi penambatan molekular dan simulasi dinamika molekular.

#### Validasi Metode Penambatan Molekular terhadap Protein Spike SARS-CoV-2 Template

Sebelum dilakukan simulasi penambatan molekular berbasis protein-protein antara beberapa protein spike mutan SARS-CoV-2 terhadap *ACE2*, maka terlebih dahulu harus dilakukan validasi metode untuk menentukan beberapa parameter yang akan digunakan pada simulasi penambatan molekular. Validasi metode terhadap parameter penambatan molekular dilakukan dengan menggunakan metode *re-docking*, yaitu proses pemisahan kompleks struktur kristal antara protein spike SARS-CoV-2 dengan *ACE2*, kemudian dilakukan simulasi penambatan molekular kembali.

Pada proses *re-docking* ini nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dibatasi dengan radius maksimum 2 Å dan tipe kompleks dipilih metode protein-protein.

**Tabel 1.** Urutan asam amino protein spike SARS-CoV-2 *template* dan beberapa varian baru

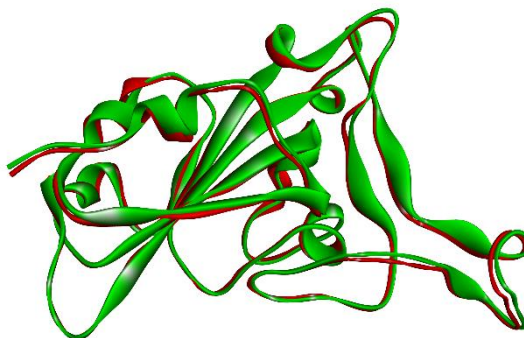
Nama Varian SARS-CoV-2	Urutan Sekuens
Protein Spike SARS-CoV-2 <i>Template</i> (6MOJ)	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN LDSKVGGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSY GFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG
Beta-A (E484K)	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN LDSKVGGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGV <b>K</b> GFNCYFPLQSY GFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG
Beta-B (K417N)	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTG <b>N</b> IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN LDSKVGGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSY GFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG
Beta-C (N501Y)	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN LDSKVGGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSY GFQPT <b>Y</b> GVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG
Gamma-A (K417T)	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTG <b>T</b> IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN LDSKVGGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSY GFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG
Delta-A (L452R)	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN LDSKVGGNYNY <b>R</b> YRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSY GFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG
Delta-B (T478K)	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN LDSKVGGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGS <b>K</b> PCNGVEGFNCYFPLQSY GFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG

Keterangan: Titik mutasi (huruf cetak tebal berwarna merah)

**Tabel 2.** Parameter hasil validasi metode penambatan molekular

Parameter	Hasil Validasi Metode
Tipe kompleks	Protein-protein
Clustering RMSD (Å)	0,60
Jumlah pencarian konformasi	100
Energi bebas ikatan (kJ/mol)	-345,14

Visualisasi hasil *re-docking*



Keterangan : Tumpang tindih antara pose protein spike SARS-CoV-2 *template* (merah) terhadap protein spike SARS-CoV-2 *template* hasil *re-docking* (hijau).

Nilai RMSD merupakan parameter yang menggambarkan seberapa besar perubahan interaksi protein-protein pada struktur kristal sebelum dan sesudah proses *re-docking*<sup>[29,30]</sup>. Parameter yang didapatkan dari proses *re-docking* meliputi jumlah pencarian konformasi dan nilai energi bebas ikatan dari protein spike SARS-CoV-2 *template* yang dapat dijadikan acuan untuk dibandingkan dengan protein spike mutan SARS-CoV-2 varian baru.

Berdasarkan visualisasi hasil validasi metode dapat diamati bahwa terdapat kemiripan konformasi antara pose sebelum dan sesudah dilakukan proses *re-docking*. Kemudian dari hasil *re-docking* juga dapat diamati bahwa nilai RMSD yang diperoleh adalah sebesar 0,60 Å. Nilai RMSD yang berada di bawah 2 Å menunjukkan bahwa parameter metode penambatan molekular yang digunakan memberikan hasil yang lebih mendekati hasil eksperimental<sup>[31]</sup>. Hal tersebut menunjukkan bahwa beberapa parameter tersebut dapat digunakan pada simulasi penambatan molekular antara protein spike mutan SARS-CoV-2 dan ACE2.

### Simulasi Penambatan Molekular terhadap Protein Spike Mutan SARS-CoV-2

Setelah diperoleh beberapa parameter yang telah memenuhi validitas, selanjutnya dilakukan simulasi penambatan molekular terhadap protein spike SARS-CoV-2 dari Beta-A, Beta-B, Beta-C, Gamma-A, Delta-A, dan Delta-B. Simulasi penambatan molekular dilakukan dengan tujuan untuk mengamati dan mengidentifikasi afinitas antara ACE2

dengan keenam protein spike mutan SARS-CoV-2. Jarak antara bagian permukaan ACE2 dan protein spike mutan SARS-CoV-2 dibatasi dengan batas radius maksimum 2 Å. Tipe kompleks pada simulasi penambatan molekular ini dipilih berdasarkan protein-protein. Keseluruhan simulasi dilakukan tanpa adanya ikatan yang rigid, kemudian digunakan jumlah pencarian sebanyak 100 konformasi.

Data energi bebas ikatan hasil simulasi penambatan molekular yang terdapat pada Tabel 3 menunjukkan bahwa protein spike SARS-CoV-2 varian Beta-A, Gamma-A, dan Delta-A memiliki afinitas yang lebih kuat dibandingkan dengan protein spike SARS-CoV-2 *template* terhadap bagian sisi aktif ACE2, yaitu dengan nilai energi bebas ikatan masing-masing sebesar -346,43 kJ/mol, -347,94 kJ/mol, dan -353,29 kJ/mol. Hal yang berbeda ditunjukkan oleh protein spike SARS-CoV-2 varian Beta-B, Beta-C, dan Delta-B yang memiliki afinitas yang lebih rendah dari protein spike SARS-CoV-2 *template*, yaitu dengan nilai energi bebas ikatan masing-masing sebesar -325,79 kJ/mol, -310,74, dan -328,85 kJ/mol. Berdasarkan fenomena tersebut dapat diprediksi bahwa protein spike SARS-CoV-2 varian Beta-A, Gamma-A, dan Delta-A memiliki afinitas yang baik terhadap ACE2.

### Analisis Interaksi Hasil Simulasi Penambatan Molekular

Identifikasi dan evaluasi lebih lanjut dilakukan terhadap interaksi molekular yang terbentuk dari kompleks protein spike SARS-CoV-2 terhadap ACE2.

**Tabel 3.** Energi bebas ikatan hasil simulasi penambatan molekular

Nama Varian SARS-CoV-2	Hasil Simulasi Penambatan Molekular (kJ/mol)
<i>Template</i> (6MOJ)	-345,14
Beta-A (E484K)	-346,43
Beta-B (K417N)	-325,79
Beta-C (N501Y)	-310,74
Gamma-A (K417T)	-347,94
Delta-A (L452R)	-353,29
Delta-B (T478K)	-328,85

**Tabel 4.** Interaksi yang terbentuk hasil simulasi penambatan molekular

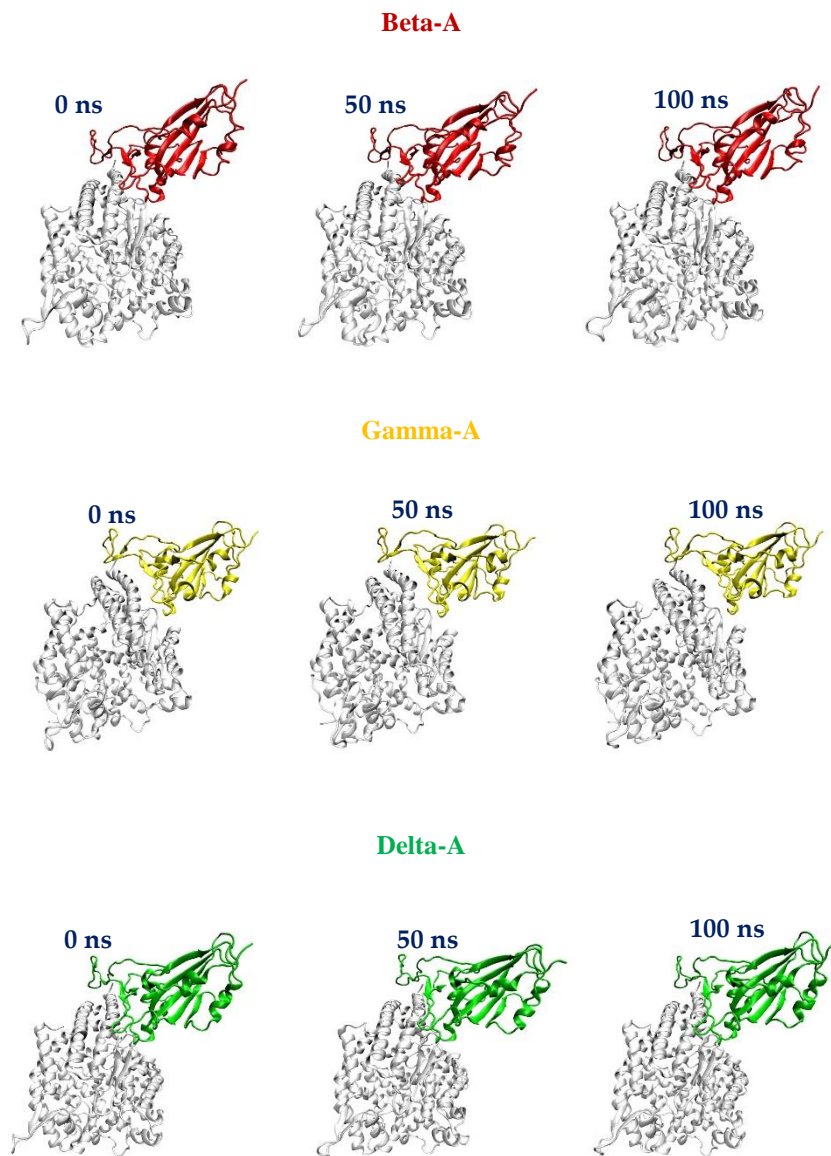
Nama Varian SARS-CoV-2	Jumlah Interaksi	Residu Asam Amino
Template (6MOJ)	21	Asp30, Lys31, Asp30, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, Tyr83, His34, Tyr83, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353
Beta-A (E484K)	20	Asp30, Asp30, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, Tyr83, His34, Tyr83, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353
Beta-B (K417N)	19	Lys31, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, Tyr83, His34, Tyr83, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353
Beta-C (N501Y)	24	Asp30, Lys31, Asp30, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, Tyr83, His34, Tyr83, Tyr41, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353, Lys353
Gamma-A (K417T)	19	Lys31, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, Tyr83, His34, Tyr83, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353
Delta-A (L452R)	21	Asp30, Lys31, Asp30, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, Tyr83, His34, Tyr83, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353
Delta-B (T478K)	21	Asp30, Lys31, Asp30, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, Tyr83, His34, Tyr83, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353

Keterangan : Ikatan hidrogen (hijau) dan interaksi hidrofobik (merah)

Secara umum, protein spike SARS-CoV-2 varian Beta-A, Beta-B, Beta-C, Gamma-A, Delta-A, dan Delta-B mampu menempati bagian sisi aktif dari ACE2, yaitu dengan residu asam amino Gln24, Asp30, Lys31, His34, Glu35, Asp38, Tyr41, Gln42, Met82, Tyr83, Lys353, dan Gly354 (Tabel 4). Menariknya, protein spike SARS-CoV-2 varian Beta-C memiliki interaksi molekular yang lebih banyak dibandingkan protein spike SARS-CoV-2 *template*, dengan 24 interaksi yang meliputi 2 interaksi elektrostatik (Asp30 dan Lys31), 13 ikatan hidrogen (Asp30, Tyr41, Gln42, Gln42, Tyr83, Lys353, Lys353, Asp38, Gln24, Glu35, Lys353, His34, dan Tyr83), dan 9 interaksi hidrofobik (His34, Tyr83, Tyr41, Lys353, Gly354, Met82, Lys31, Lys353, dan Lys353). Namun demikian, secara keseluruhan protein spike SARS-CoV-2 *template* dan protein spike mutan SARS-CoV-2 memiliki

jumlah interaksi molekular yang tidak jauh berbeda. Hal tersebut menunjukkan bahwa afinitas yang kuat dari protein spike SARS-CoV-2 disebabkan karena adanya kontribusi dari interaksi elektrostatik, ikatan hidrogen, dan interaksi hidrofobik<sup>[32]</sup>.

Studi interaksi dengan menggunakan simulasi penambatan molekular sejauh ini belum cukup mampu untuk menjelaskan sifat, karakteristik, dan fungsi dari protein spike SARS-CoV-2 *template* maupun protein spike mutan SARS-CoV-2 terhadap ACE2. Simulasi dinamika molekular (MD) diprediksi dapat menjelaskan lebih lanjut mengenai mekanisme aksi dari protein spike SARS-CoV-2 karena metode ini mempertimbangkan berbagai konformasi dan fleksibilitas dari protein-protein.



**Gambar 1.** Konformasi kompleks protein spike mutan SARS-CoV-2 terhadap *ACE2* selama simulasi dinamika molekular.

### Simulasi Dinamika Molekular

Simulasi dinamika molekular (MD) dilakukan terhadap ketiga sistem kompleks protein-protein untuk mengamati, mengidentifikasi, dan mengevaluasi lebih lanjut mengenai mekanisme aksi secara struktural, dinamika, dan stabilitas energi pada protein spike mutan SARS-CoV-2 dalam kantung pengikatan *ACE2*. Simulasi dinamika molekular juga diperlukan untuk mengkonfirmasi dan memprediksi interaksi antara dua makromolekul protein dengan lebih akurat. Simulasi penambatan

molekular yang telah dilakukan sebelumnya hanya mampu mengamati afinitas dari struktur protein spike mutan SARS-CoV-2 dan hanya dibatasi oleh rotasi pada beberapa titik, sedangkan struktur *ACE2* dibuat rigid. Pada simulasi dinamika molekular ditambahkan molekul air dan molekul ion, seperti natrium ( $\text{Na}^+$ ) dan klorida ( $\text{Cl}^-$ ). Struktur protein dibuat tidak rigid sehingga dapat bergerak sesuai dengan fleksibilitasnya dan struktur makromolekul dapat bergerak tidak terbatas hanya rotasi, namun juga dapat bertranslasi<sup>[33]</sup>.

### Analisis Visualisasi Trajektori

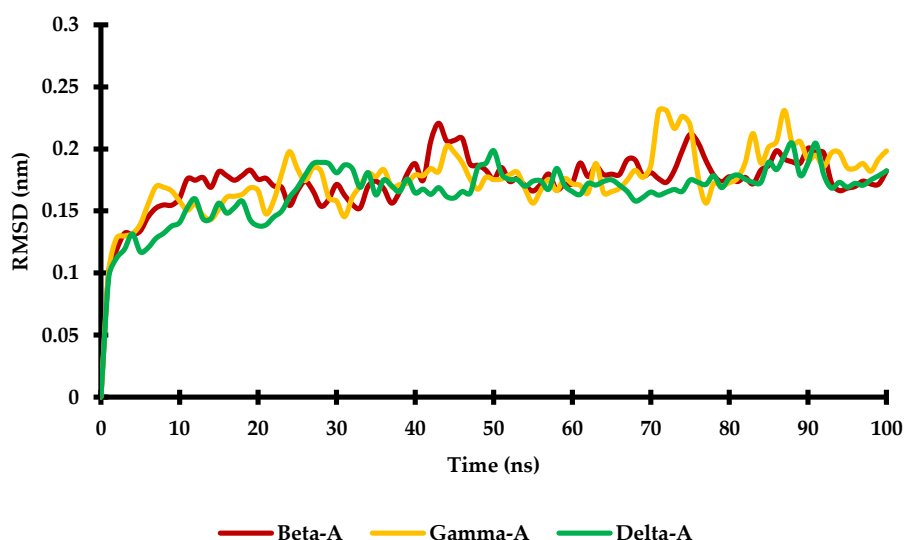
Berdasarkan *snapshot* yang diambil pada awal simulasi (pada posisi 0 ns), 50 ns, dan akhir simulasi (pada posisi 100 ns) dapat diamati bahwa perubahan konformasi masing-masing protein spike mutan SARS-CoV-2 umumnya terjadi pada saat simulasi telah mencapai 10 ns (Gambar 1). Konformasi protein spike mutan SARS-CoV-2 mengalami perubahan selama simulasi berlangsung, tetapi perubahan signifikan ditunjukkan oleh protein spike mutan SARS-CoV-2 varian Gamma-A. Terdapat beberapa perubahan yang terjadi pada bagian struktur makromolekul protein spike mutan SARS-CoV-2 tersebut terutama pada bagian alfa-heliks, beta-sheet, dan *loop*.

Fenomena berbeda terjadi pada protein spike mutan SARS-CoV-2 varian Beta-A dan Delta-A yang tidak mengalami perubahan bentuk signifikan selama simulasi dinamika molekular. Beberapa bagian pada kedua makromolekul protein spike mutan SARS-CoV-2 tersebut sebagian besar tidak mengalami perubahan apabila dibandingkan dengan keadaan awal pada saat simulasi dinamika molekular. Perubahan konformasi yang tidak signifikan

menunjukkan bahwa protein spike mutan SARS-CoV-2 varian Beta-A dan Delta-A mampu menjaga stabilitas interaksinya dengan bagian sisi aktif dari makromolekul *ACE2* sampai akhir simulasi.

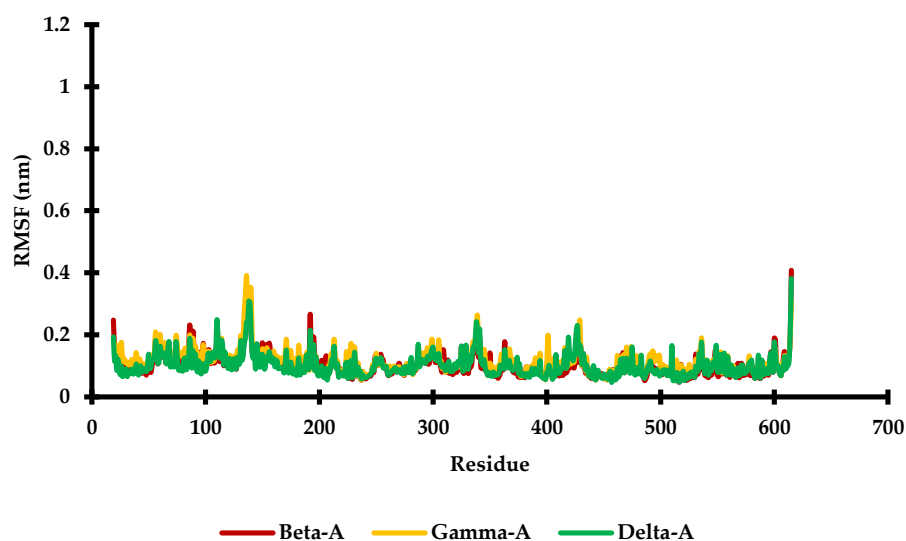
### Analisis Grafik Root Mean Square Deviation (RMSD)

Dalam mengidentifikasi interaksi dari ketiga protein spike mutan SARS-CoV-2 terhadap *ACE2* dapat diamati berdasarkan parameter RMSD. Nilai RMSD dari protein di sekitar situs aktif dihitung untuk memastikan stabilitas dan rasionalitas dari konformasi yang dipilih. Protein spike mutan SARS-CoV-2 yang telah membentuk kompleks dengan *ACE2* dilakukan simulasi dinamika molekular untuk mengamati mekanisme aksi ketiga protein spike mutan SARS-CoV-2 terhadap reseptor target. Grafik pada Gambar 2 menunjukkan bahwa terdapat korelasi dengan *snapshot* yang telah diamati pada tahap sebelumnya. Ketiga sistem kompleks protein spike SARS-CoV-2 mutan dan *ACE2* tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Akan tetapi, protein spike SARS-CoV-2 varian Gamma-A tidak dapat menstabilkan makromolekul *ACE2*.



**Gambar 2.** Perbandingan grafik *root mean square deviation* (RMSD) kompleks protein spike SARS-CoV-2 mutan terhadap *ACE2* selama simulasi dinamika molekular.





**Gambar 3.** Perbandingan grafik *root mean square fluctuation* (RMSF) kompleks protein spike SARS-CoV-2 mutan terhadap ACE2 selama simulasi dinamika molekular.

Berdasarkan grafik RMSD dapat diamati bahwa ketiga sistem stabil mulai dari 10 ns hingga 70 ns, namun fluktuasi terjadi terhadap kompleks protein spike varian Gamma-A yang dimulai ketika simulasi mencapai 70 ns sampai simulasi dinamika molekular berakhir (pada posisi 100 ns). Hal ini ditunjukkan dengan nilai RMSD rata-rata dari protein spike varian Beta-A dan Delta-A yang tidak memiliki rentang signifikan, yaitu dengan nilai RMSD masing-masing sebesar  $\pm 1,73 \text{ \AA}$  dan  $\pm 1,64 \text{ \AA}$ . Sementara protein spike Gamma-A memiliki nilai RMSD rata-rata sebesar  $\pm 1,75 \text{ \AA}$ . Se jauh ini perbedaan mekanisme aksi antara ketiga protein spike mutan dapat teramati ketika simulasi berlangsung. Dengan demikian, perilaku protein oleh rangsangan eksternal dari protein spike dapat mempengaruhi perubahan konformasi terhadap reseptor ACE2<sup>[34]</sup>.

#### Analisis Grafik Root Mean Square Fluctuation (RMSF)

Gambar 3 menunjukkan fleksibilitas dari residu asam amino ACE2 yang membentuk kompleks dengan mutan protein spike selama simulasi dinamika molekular. Dapat diamati bahwa sebagian besar residu asam amino tersebut memiliki fleksibilitas yang rendah. Namun, fleksibilitas tinggi terjadi pada residu asam amino Gln24, Asp30, Lys31, His34, Glu35,

Asp38, Tyr41, Gln42, Met82, Tyr83, Lys353, dan Gly354, karena residu tersebut berperan penting dalam pengikatan protein-protein.

Berdasarkan grafik RMSF ketiga protein spike mutan SARS-CoV-2 tidak memiliki rentang nilai RMSF yang tidak terlalu signifikan, yaitu dengan nilai RMSF rata-rata  $\pm 0,10 \text{ \AA}$  (Beta-A),  $\pm 0,11 \text{ \AA}$  (Gamma-A), dan  $\pm 0,10 \text{ \AA}$  (Delta-A). Hal tersebut membuktikan bahwa ketiga makromolekul protein spike mutan SARS-CoV-2 mampu menstabilkan ACE2 selama simulasi dinamika molekular. Situs pengikatan protein-protein merupakan bagian fungsional dari suatu protein dalam kemampuannya untuk melanjutkan proses persinyalan<sup>[35]</sup>. Perubahan yang terjadi pada area pengikatan protein spike mutan SARS-CoV-2 dapat mendeskripsikan sifat dan karakteristik yang dimiliki oleh suatu protein spike mutan SARS-CoV-2 sehingga dapat membantu dalam menentukan makromolekul protein yang memiliki afinitas paling kuat terhadap ACE2<sup>[36]</sup>.

#### Perhitungan Energi Bebas Ikatan menggunakan Metode MM/PBSA

Tabel 4 menunjukkan energi bebas ikatan hasil perhitungan MM/PBSA dari ketiga sistem kompleks.

**Tabel 4.** Energi bebas ikatan hasil perhitungan MM/PBSA

Sistem kompleks	$\Delta E_{vdw}$ (kJ/mol)	$\Delta E_{ele}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{PB}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{NP}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{Bind}$ (kJ/mol)
Beta-A + ACE2	-373,41	-2233,47	654,41	-43,00	-1995,47
Gamma-A + ACE2	-372,28	-780,96	620,38	-40,95	-573,82
Delta-A + ACE-2	-384,58	-1818,91	747,99	-43,06	-1498,56

Keterangan :  $\Delta E_{vdw}$  = kontribusi van der Waals,  $\Delta E_{ele}$  = kontribusi elektrostatik,  $\Delta G_{PB}$  = kontribusi desolvasi polar,  $\Delta G_{NP}$  = kontribusi desolvasi non-polar.

Perhitungan energi bebas ikatan ini dihitung berdasarkan trajektori dari awal simulasi (pada posisi 0 ns) hingga akhir simulasi dinamika molekular (posisi 100 ns). Berdasarkan hasil perhitungan MM/PBSA dapat diamati bahwa protein spike mutan SARS-CoV-2 varian Beta-A dan Delta-A memiliki energi bebas ikatan yang paling kuat dibandingkan dengan protein spike mutan SARS-CoV-2 varian Gamma-A terhadap ACE2.

Ketiga makromolekul protein spike mutan SARS-CoV-2 memiliki energi bebas ikatan masing-masing sebesar -1995,47 kJ/mol (Beta-A), -573,82 kJ/mol (Gamma-A), dan -1498,56 kJ/mol (Delta-A) selama simulasi dinamika molekular. Kemudian energi yang paling banyak berkontribusi selama simulasi adalah interaksi van der Waals dan interaksi elektrostatik. Hal tersebut karena pendekatan MM/PBSA memungkinkan pengamatan terhadap pengaruh kontribusi dari van der Waals dan elektrostatik serta perubahan afinitas protein-protein yang dipengaruhi proses solvasi terhadap sistem kompleks<sup>[37,38]</sup>.

### Kesimpulan

Hasil simulasi penambatan molekular menunjukkan bahwa protein spike SARS-CoV-2 varian Beta-A, Gamma-A, dan Delta-A memiliki afinitas yang lebih kuat terhadap bagian sisi aktif ACE2 dibandingkan dengan protein spike SARS-CoV-2 *template*, dengan energi bebas ikatan masing-masing sebesar -346,43 kJ/mol, -347,94 kJ/mol, dan -353,29 kJ/mol. Analisis grafik RMSD dan RMSF

selama simulasi dinamika molekular mengindikasikan ketiga sistem kompleks protein spike SARS-CoV-2 dan ACE2 memiliki perbedaan yang tidak signifikan, dengan nilai RMSD masing-masing sebesar  $\pm 1,73$  Å (Beta-A),  $\pm 1,64$  Å (Gamma-A), dan  $\pm 1,75$  Å (Delta-A), serta nilai RMSF berturut-turut sebesar  $\pm 0,10$  Å (Beta-A),  $\pm 0,11$  Å (Gamma-A), dan  $\pm 0,10$  Å (Delta-A). Lebih lanjut, perhitungan energi bebas ikatan menggunakan metode MM/PBSA menunjukkan bahwa protein spike SARS-CoV-2 varian Beta-A dan Delta-A menunjukkan afinitas yang kuat terhadap sisi aktif ACE2, dengan nilai energi bebas ikatan masing-masing sebesar -1995,47 kJ/mol dan -1498,56 kJ/mol. Namun, protein spike SARS-CoV-2 varian Gamma-A hanya memiliki energi bebas ikatan sebesar -573,82 kJ/mol.

### Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), Universitas Islam Bandung, atas dukungan finansial yang diberikan melalui skema hibah Penelitian Dosen Pemula tahun 2021, No.067/B.04/LPPM/XII/2021.

### Daftar Pustaka

- Heymann, D. L., Data sharing and outbreaks: best practice exemplified. *The Lancet*, (2020). doi:10.1016/S0140-6736(20)30184-7

2. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., *et al.*, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, (2020). doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
3. Mittal, A., Manjunath, K., Ranjan, R. K., Kaushik, S., Kumar, S. & Verma, V., COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS pathogens*, **16(8)**: (2020).
4. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T. & Velesler, D., Erratum: Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein (Cell (2020) 181(2) (281–292.e6), (S0092867420302622), (10.1016/j.cell.2020.02.058)). *Cell*, **183(6)**: (2020).
5. Lazarevic, I., Pravica, V., Miljanovic, D. & Cupic, M., Immune evasion of sars-cov-2 emerging variants: What have we learnt so far? *Viruses*, **13(7)**: (2021).
6. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., *et al.*, A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.*, **382(8)**: (2020).
7. Villoutreix, B. O., Calvez, V., Marcelin, A. G. & Khatib, A. M., In silico investigation of the new UK (B.1.1.7) and South African (501y.v2) SARS-CoV-2 variants with a focus at the ace2–spike rbd interface. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(4)**: (2021).
8. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. & Li, F., Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J. Virol.*, **94(7)**: (2020).
9. Lin, X. & Chen, S., Major Concerns on the Identification of Bat Coronavirus Strain RaTG13 and Quality of Related Nature Paper. *Preprints*, (2020).
10. Lam, T. T. Y., Jia, N., Zhang, Y. W., Shum, M. H. H., Jiang, J. F., Zhu, H. C., Tong, Y. G., *et al.*, Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, **583(7815)**: (2020).
11. Chen, J., Wang, R., Wang, M. & Wei, G. W., Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *J. Mol. Biol.*, **432(19)**: (2020).
12. Lou, F., Li, M., Pang, Z., Jiang, L., Guan, L., Tian, L., Hu, J., *et al.*, Understanding the Secret of SARS-CoV-2 Variants of Concern/Interest and Immune Escape. *Frontiers in Immunology*, **12**: (2021).
13. Sanyaolu, A., Okorie, C., Marinkovic, A., Haider, N., Abbasi, A. F., Jafari, U., Prakash, S., *et al.*, The emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, **8**: (2021).
14. Choi, J. Y. & Smith, D. M., SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Medical Journal*, **62(11)**: (2021).
15. Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J.-C., Turner, A. J., Raizada, M. K., *et al.*, Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System. *Circ. Res.*, **126(10)**: (2020).
16. Bian, J. & Li, Z., Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **11(1)**: (2021).
17. Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A. & Barvkar, V. T., SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, **61(3)**: (2021).
18. Rasheed, M. A., Raza, S., Zohaib, A., Riaz, M. I., Amin, A., Awais, M., Khan, S. U., *et al.*, Immunoinformatics based prediction of recombinant multi-epitope vaccine for the control and prevention of SARS-CoV-2. *Alexandria Eng. J.*, **60(3)**: (2021).
19. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., *et al.*, Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, **581(7807)**: (2020).
20. Kemmish, H., Fasnacht, M. & Yan, L., Fully automated antibody structure prediction

- using BIOVIA tools: Validation study. *PLoS One*, **12(5)**: (2017).
21. Makarewicz, T. & Kaźmierkiewicz, R., Molecular dynamics simulation by GROMACS using GUI plugin for PyMOL. *J. Chem. Inf. Model.*, (2013). doi:10.1021/ci400071x
  22. Aruleba, R. T., Adekiya, T. A., Oyinloye, B. E. & Kappo, A. P., Structural Studies of Predicted Ligand Binding Sites and Molecular Docking Analysis of Slc2a4 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, (2018). doi:10.3390/ijms19020386
  23. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. & Berendsen, H. J. C., GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, (2005). doi:10.1002/jcc.20291
  24. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B. & Lindahl, E., Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, (2015). doi:10.1016/j.softx.2015.06.001
  25. Aragonés, J. L., Noya, E. G., Valeriani, C. & Vega, C., Free energy calculations for molecular solids using GROMACS. *J. Chem. Phys.*, (2013). doi:10.1063/1.4812362
  26. Kumari, R., Kumar, R., Consortium, O. S. D. D. & Lynn, A., g\_mmpbsa - A GROMACS tool for MM-PBSA and its optimization for high-throughput binding energy calculations. *J. Chem. Inf. Model.*, (2014). doi:10.1021/ci500020m
  27. Ren, J., Yuan, X., Li, J., Lin, S., Yang, B., Chen, C., Zhao, J., *et al.*, Assessing the performance of the g\_mmpbsa tools to simulate the inhibition of oseltamivir to influenza virus neuraminidase by molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area methods. *J. Chinese Chem. Soc.*, (2020). doi:10.1002/jccs.201900148
  28. Ramadhan, D. S. F., Fakhri, T. M. & Arfan, A., Activity Prediction of Bioactive Compounds Contained in *Etlingera elatior* Against the SARS-CoV-2 Main Protease: An In Silico Approach. *Borneo J. Pharm.*, **3(4)**: (2020).
  29. Fitriyani F, F., Fakhri, T. M. & Tjahjono, D. H., In Silico Studies of Green Tea Catechins Against HER-2 Receptor in Breast Cancer. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, **14(5)**: (2020).
  30. Darusman, F. & Fakhri, T. M., Identification of the molecular mechanism of christinin compounds from Arabian bidara leaves (*Ziziphus spina-christi* L.) on microorganisms that cause female genital problems through computational approaches. *Pharmaciana*, **10(3)**: (2020).
  31. Bell, E. W. & Zhang, Y., DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J. Cheminform.*, **11(1)**: (2019).
  32. Liu, Z., Wickramasinghe, S. R. & Qian, X., Ion-specificity in protein binding and recovery for the responsive hydrophobic poly(vinylcaprolactam) ligand. *RSC Adv.*, (2017). doi:10.1039/c7ra06022j
  33. Pitaloka, D. A. E., Ramadhan, D. S. F., Arfan, Chaidir, L. & Fakhri, T. M., Docking-based virtual screening and molecular dynamics simulations of quercetin analogs as enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) inhibitors of mycobacterium tuberculosis. *Sci. Pharm.*, **89(2)**: (2021).
  34. Serafeim, A. P., Salamanos, G., Patapati, K. K. & Glykos, N. M., Sensitivity of Folding Molecular Dynamics Simulations to even Minor Force Field Changes. *J. Chem. Inf. Model.*, (2016). doi:10.1021/acs.jcim.6b00493
  35. Li, L., Spranger, L., Soll, D., Beer, F., Brachs, M., Spranger, J. & Mai, K., Metabolic impact of weight loss induced reduction of adipose ACE-2 – Potential implication in COVID-19 infections? *Metabolism.*, **113**: (2020).
  36. Rotondi, M., Coperchini, F., Ricci, G., Denegri, M., Croce, L., Ngnitejeu, S. T., Villani, L., *et al.*, Detection of SARS-COV-2 receptor ACE-2 mRNA in thyroid cells: a clue for COVID-19-related subacute thyroiditis. *J. Endocrinol. Invest.*, **44(5)**:

- (2021).
37. Kurniawan, F., Miura, Y., Kartasasmita, R. E., Mutalib, A., Yoshioka, N. & Tjahjono, D. H., In silico study, synthesis, and cytotoxic activities of porphyrin derivatives. *Pharmaceuticals*, **11(1)**: (2018).
38. Fakhri, T. M., Kurniawan, F., Yusuf, M., Mudasir, M. & Tjahjono, D. H., Molecular dynamics of cobalt protoporphyrin antagonism of the cancer suppressor REV-ERB $\beta$ . *Molecules*, **26(11)**: (2021).