

## بررسی اثر دما بر وابستگی اتصال رمدسیویر به آنزیم RdRp ویروس سارس - کووید-۲ با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی هدایت شده

محدثه عبیدی<sup>۱</sup>، رضا سهیلی فرد<sup>۲</sup>، رضا حسن زاده قاسمی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری مهندسی مکانیک، گروه مکانیک، دانشگاه حکیم سبزواری، [m.90abidi@yahoo.com](mailto:m.90abidi@yahoo.com)

<sup>۲</sup> دانشیار، دانشکده مهندسی مکانیک، گروه مکانیک، دانشگاه حکیم سبزواری، [r.soheilifard@hsu.ac.ir](mailto:r.soheilifard@hsu.ac.ir)

<sup>۳</sup> دانشیار، دانشکده مهندسی مکانیک، گروه مکانیک، دانشگاه حکیم سبزواری، [r.hasanzadeh@hsu.ac.ir](mailto:r.hasanzadeh@hsu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله ۱۳۹۹/۱۰/۰۹، تاریخ پذیرش مقاله ۱۳۹۹/۱۱/۲۵

**چکیده:** ویروس مرگ بار سارس-کووید-۲ اولین بار اواخر سال ۲۰۱۹، در چین پدیدار شده است. این ویروس توالی مشابهی با ویروس سارس- کووید در سال ۲۰۰۲ داشته، با این تفاوت که سرعت انتقال آن بسیار زیاد می باشد. از طرفی سارس- کووید-۲، یک RNA ویروس بوده و برای رونویسی ژنوم ویروسی خود نیازمند آنزیم RdRp است. به سبب در دسترس بودن محل فعال این آنزیم، هدف قرار دادن آن برای مهار تکثیر سارس- کووید-۲ یک روش درمانی موثر محسوب می شود. رمدسیویر یک مهارکننده ویروس هپاتیت C و ابولا و مورد تایید سازمان غذا و دارو، نتایج مثبتی را در مهار پروتئاز اصلی و RdRp سارس- کووید-۲ نشان داده است. هدف از بررسی حاضر مشاهده عملکرد رمدسیویر برای مهار RdRp در دماهای متفاوت با روش شبیه سازی دینامیک مولکولی هدایت شده، می باشد. بدین منظور رمدسیویر و RdRp پس از اتصال با داکینگ مولکولی در چهار دمای متفاوت (از ۱۷ تا ۴۷ درجه سانتی گراد) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به نتایج بدست آمده، نیروی گسیختگی و کار کشیدگی برای جدا شدن رمدسیویر از RdRp، با افزایش دما، کاهش می یابند. همچنین در دماهای بالاتر، انرژی آزاد گیبس به سبب ارتباط با کار کشیدگی کاهش می یابد.

**کلمات کلیدی:** سارس- کووید-۲، آنزیم پلیمرز RNA وابسته به RNA، داکینگ مولکولی، شبیه سازی دینامیک مولکولی

هدایت شده، رمدسیویر

## The effect of temperature on the binding affinity of Remdesivir and RdRp enzyme of SARS-COV-2 virus using steered molecular dynamics simulation

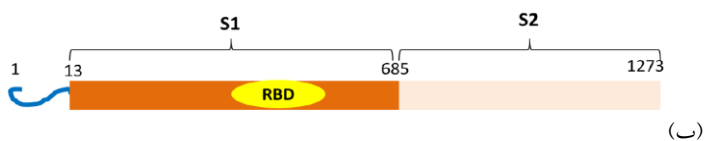
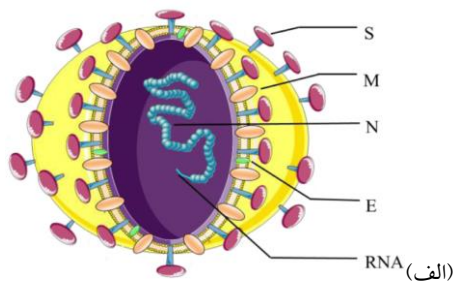
Mohadese Abidi, Reza Soheilifard, Reza Hasanzadeh Ghasemi

**Abstract:** The fatal SARS-COV-2 virus appeared in China at the end of 2019 for the first time. This virus has similar sequence with SARS-COV in 2002, but its infection is very high rate. On the other hand, SARS-COV-2 is a RNA virus and requires RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) to transcribe its viral genome. Due to the availability of the active site of this enzyme, an effective treatment is targeting it to inhibit SARS-COV-2 reproduction. Remdesivir is an inhibitor for Hepatitis C and Ebola that is approved by Food and Drug Administration. Also, it has shown good results in inhibition of main protease and RdRp enzyme of SARS-COV-2. In this paper, the inhibitory of Remdesivir in various temperatures has been observed using steered molecular dynamics simulation. For this reason, the binding affinity of Remdesivir and RdRp were evaluated

by molecular docking at four different temperatures (from 17 to 47 °C). According to the results, the rupture force and pulling work to separate the Remdesivir from RdRp decrease with increasing temperature. It is also shown that at higher temperatures, Gibbs free energy is reduced due to its relation with pulling work.

**Keywords:** SARS-COV-2, RNA-dependent RNA polymerase, Molecular Docking, Steered Molecular Dynamics Simulation, Remdesivir

ساختاری شامل گلیکوپروتئین سطح تاجی<sup>۱۴</sup> (S) پروتئین غشایی<sup>۱۵</sup> (M) پروتئین پوششی<sup>۱۶</sup> (E) و پروتئین نوکلئوکپسید<sup>۱۷</sup> (N) را که برای شکل گیری سارس-کووید-۲ و عفونت ضروری هستند تولید می‌کند (شکل ۱ الف). گلیکوپروتئین سطح تاجی نقش مهمی در اتصال آن به سلول‌های میزبان دارد و می‌تواند توسط پروتئازهای<sup>۱۸</sup> سلول میزبان به یک زیر واحد S1 در پایانه N و یک ناحیه S2 در پایانه C تقسیم شود. زیر واحد S1 خود در بردارنده قلمرو اتصال به گیرنده<sup>۱۹</sup> (RBD) است که می‌تواند از این طریق به آنزیم آنژیوتانسین ۲<sup>۲۰</sup> (ACE2) سلول اپیتلیال<sup>۲۱</sup> انسانی متصل شود (شکل ۱ ب).



شکل ۱: الف) پروتئین‌های تشکیل دهنده ویروس سارس-کووید-۲ (۱) و (ب) قلمروهای پروتئین تاجی (۶)

با توجه به ماهیت ویروس سارس-کووید-۲، برخی از قسمت‌های آن از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و همواره تحت عنوان اهداف دارویی مد نظر محققان قرار گرفته‌اند. از جمله ساختارهای مهم در فرآیند تکثیر و سرایت ویروس می‌توان به پروتئازهای ویروسی (Mpro و PLpro)، پروتئازهای سلول میزبان (مانند TRPM2 و...)، پروتئین تاجی (S

## ۱- مقدمه

کرونا ویروس‌ها<sup>۱</sup> متعلق به زیر مجموعه اورتوکروناویرینا<sup>۲</sup> در خانواده کروناویرینا<sup>۳</sup> هستند. به طور کلی مجموعه اورتوکروناویرینا شامل چهار گروه آلفاکرونا ویروس<sup>۴</sup> ( $\alpha$ -CoV)، بتاکرونا ویروس<sup>۵</sup> ( $\beta$ -CoV)، گاماکرونا ویروس<sup>۶</sup> ( $\gamma$ -CoV) و دلتاکرونا ویروس<sup>۷</sup> ( $\delta$ -CoV) است. در میان ویروس‌هایی که تاکنون شناسایی شده‌اند، کرونا ویروس-ها، دارای بزرگ‌ترین ژنوم در حدود ۲۶-۳۲kb هستند (۱). از میان گونه-های مختلف خانواده کروناویروس، تاکنون هفت گونه منتقل شده به انسان کشف شده است که موجب بروز بیماری‌هایی مشابه سرما خوردگی در انسان می‌گردند (۲). سندروم تنفسی حاد<sup>۸</sup> یا سارس-کووید (SARS-COV) و سندروم تنفسی خاورمیانه<sup>۹</sup> یا مرس-کووید (MERS-COV)، از حیوانات به انسان منتقل شده و مرگ و میر زیادی را در پی داشته‌اند. در سال ۲۰۰۲، سارس برای اولین بار در گوانگدونگ<sup>۱۰</sup> چین ثبت شد. همچنین در سال ۲۰۱۲، ۲۷ کشور در خاورمیانه، شرق آفریقا و جنوب آسیا، موارد ابتلا به مرس را گزارش کرده‌اند. در دسامبر سال ۲۰۱۹، یک کرونا ویروس جدید به نام سارس-کووید-۲ که از نظر آمینواسیدهای تشکیل دهنده دارای توالی مشابهی با سارس-کووید بود، در ووهان<sup>۱۱</sup> استان هوبئی<sup>۱۲</sup> چین پدیدار شد (۳-۵). ویروس نو ظهور سارس-کووید-۲، مشابه سارس-کووید و مرس-کووید متعلق به گروه  $\beta$ -CoV از خانواده‌ی کرونا ویروس‌ها است. ژنوم سارس-کووید-۲، با اندازه‌ی ۳۰kb، یک پلی پروتئین بزرگ و غیر ساختاری را رمز گذاری می‌کند. بعلاوه به صورت پروتئولیتیک<sup>۱۳</sup> تقسیم شده و چهار پروتئین

- |                      |                                    |
|----------------------|------------------------------------|
| 1 Coronavirus        | 8 Sever acute respiratory syndrome |
| 2 Orthocoronavirinae | 9 Middle East respiratory syndrome |
| 3 Coronaviridae      | 10 Guangdong                       |
| 4 Alphacoronavirus   | 11 Wuhan                           |
| 5 Betacoronavirus    | 12 Hubei                           |
| 6 Gammacoronavirus   | 13 Proteolytic                     |
| 7 Deltacoronavirus   |                                    |

<sup>14</sup> Spike surface glycoprotein

<sup>15</sup> Membrane (M) protein

<sup>16</sup> Envelope (E) protein

<sup>17</sup> Nucleocapsid (N) protein

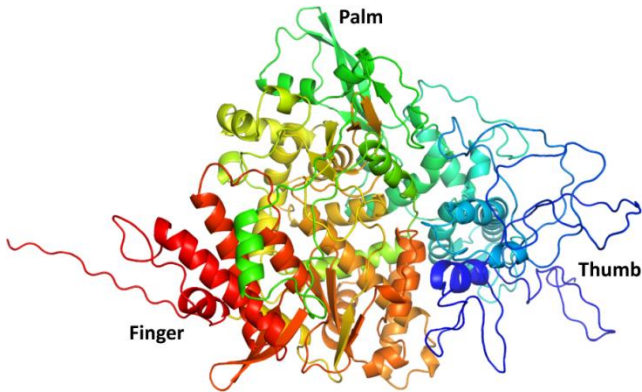
<sup>18</sup> Protease

<sup>19</sup> Receptor-binding domain

<sup>20</sup> Angiotensin-converting enzyme 2

<sup>21</sup> Epithelial

ویروس ممکن است یک روش درمانی موثر باشد (۱۳). شکل ۲، ساختار RdRp و قلمروهای مختلف آن را نشان می‌دهد.



شکل ۲: ساختار آنزیم RdRp ویروس سارس-کووید-۲ و قلمروهای مختلف آن (۱۳)

اندکی پس از شیوع بیماری کووید-۱۹، الفیکی<sup>۸</sup> ساختار RdRp ویروس سارس-کووید-۲ را با استفاده از ساختار RdRp سارس-کووید بدست آورده و با استفاده از مطالعات داکینگ مولکولی اثر بخشی داروهای ضد ویروس هپاتیت C را روی RdRp سارس-کووید-۲ مورد ارزیابی قرار داد. در نتیجه این پژوهش داروهای سوفسبوویر<sup>۹</sup>، IDX-184، ریباویرین<sup>۱۱</sup> و رمدسیویر به عنوان مهارکننده‌های RdRp سارس-کووید-۲ معرفی شدند (۲۰). به دنبال این پژوهش ژنگ<sup>۱۱</sup> و همکاران، مکانیزم اتصال رمدسیویر به RdRp را با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و انحرافات انرژی آزاد مورد بررسی قرار داده و در نتیجه آن نقش مهم رمدسیویر در مهار تکثیر RNA سارس-کووید-۲ و همچنین آمینو اسیدهای کلیدی (D618، R555 و S549) در اتصال RdRp با آن را شناسایی کردند (۲۱). با توجه به این امر که طراحی دارو در مدت زمان کوتاه چالش بزرگی برای داروسازان است، تجویز مجدد داروهای در دسترس می‌تواند گام موثری جهت کنترل بیماری باشد. پاترا<sup>۱۲</sup> و همکاران اثر اسید والپروئیک<sup>۱۳</sup> را روی RdRp با استفاده از داکینگ، محاسبات انرژی آزاد و شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی بررسی کردند. اسید والپروئیک، دارویی است که در مدیریت بیماری صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج بدست آمده از این شبیه‌سازی نشان‌گر تعامل مناسب و پایداری مجموعه مهارکننده و آنزیم است (۲۲). مدتی بعد الفیکی و همکاران با بررسی چندین داروی موثر در مهار RdRp و نیز اعمال تغییرات روی اجزای تشکیل دهنده یک مهارکننده به نتایج مطلوبی دست یافتند. با توجه به نتایج بدست آمده مهارکننده‌های سوفسبوویر، ریباویرین، گالیدسیویر<sup>۱۴</sup>، رمدسیویر، فاپیپراویر، سفوروکسیم<sup>۱۵</sup>

پروتئین) و آنزیم پلیمراز RNA<sup>۱</sup> وابسته به (RdRp) RNA<sup>۱</sup> اشاره کرد. محققان همواره در حال بررسی اثر داروهای مختلف بر غیر فعال کردن عملکرد این ساختارهای مهم، پایداری آن‌ها در دماهای متفاوت و شناسایی و بررسی اشکال جهش‌یافته ویروس سارس-کووید-۲ هستند. داروهای متفاوت برای مهار و کنترل ویروس سارس-کووید-۲ که اصطلاحاً مهارکننده نامیده می‌شوند نیز، خود در دو گروه طبیعی و شیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. بررسی‌های فوق به دو روش آزمایشگاهی و شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای (شامل مطالعات داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی) انجام گرفته و نتایج مفیدی را در پی داشته‌اند (۷-۱۳).

تاکنون راه‌های درمان متفاوتی برای مهار کووید-۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. داروهای ضد ویروس یکی از مواردی است که در مطالعات بالینی تاثیر بسزایی در کنترل کووید-۱۹ داشته‌اند. از جمله این داروها می‌توان به رمدسیویر<sup>۳</sup> و فاپیپراویر<sup>۴</sup> با تایید سازمان غذا و دارو آمریکا، اشاره کرد که نتایج مثبتی را در پی داشته‌اند. همچنین داروهای مقابله با ویروس ایدز نظیر لوپیناویر<sup>۵</sup>، ریتوناویر<sup>۶</sup> نیز برای درمان و جلوگیری از پیش‌روی کروناویروس مفید بوده و بسیاری از بیماران از طریق استفاده از این داروها نجات یافته‌اند. در حال حاضر یکی دیگر از روش‌های نجات افراد مبتلا به کووید-۱۹، استفاده از پلاسما خون افراد بهبود یافته از این بیماری برای افراد بیمار است. افرادی که از کووید-۱۹ بهبود یافته‌اند، سیستم‌های دفاعی طبیعی را در برابر این بیماری (آنتی‌بادی‌ها) در خون خود گسترش می‌دهند. تلاش برای کنترل و ریشه‌کن سازی کووید-۱۹ تنها در موارد فوق خلاصه نشده و استفاده از سلول‌های بنیادی و طراحی واکسن از جمله موارد دیگری است که نظر بسیاری از پژوهش‌گران و محققان را به خود جلب کرده است (۱۴-۱۹).

به طور کلی RNA ویروس‌ها نظیر سارس-کووید-۲ برای تکثیر و رونویسی ژنوم خود به آنزیم RdRp نیاز داشته و این امر برای بقای آن‌ها ضروری است. RdRp، از یک هسته کاتالیزوری شبیه به دست انسان با قلمروهای مختلف کف دست، انگشتان و انگشت شست تشکیل شده است. این آنزیم به عنوان یک پروتئین محافظت شده در ویروس‌های RNA در نظر گرفته می‌شود، بنابراین می‌تواند به عنوان یک کاندید جذاب برای درک زیست‌شناسی آن‌ها از نظر سنتز اسید نوکلئیک<sup>۷</sup> و تولید داروهای ضد ویروسی مورد استفاده قرار گیرد. RdRp، نقشی اساسی در چرخه زندگی ویروسی ایفا می‌کند و از آنجا که محل فعال آن منطقه‌ای در دسترس است، هدف قرار دادن این منطقه برای مهار تکثیر

<sup>8</sup> Elfiky

<sup>9</sup> Sofosbuvir

<sup>10</sup> Ribavirin

<sup>11</sup> Zhang

<sup>12</sup> Patra

<sup>13</sup> Valproic acid

<sup>14</sup> Galidesivir

<sup>15</sup> Cefuroxime

<sup>1</sup> Ribonucleic acid

<sup>2</sup> RNA-dependent RNA polymerase

<sup>3</sup> Remdesivir

<sup>4</sup> Favipiravir

<sup>5</sup> Lopinavir

<sup>6</sup> Ritonavir

<sup>7</sup> Nucleic acid

بیشینه نیروی مورد نیاز برای جدا شدن رمدسیور از RdRp در مقایسه با Mpro بیش‌تر است.  
رمدسیور یک ماده ضد ویروسی در برابر انواع مختلف ویروس ابولا<sup>۱۰</sup> و هپاتیت C است. پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان دادند که رمدسیور با تداخل در عملکرد پلیمراز RdRp ویروس‌های سارس-کووید و مرس-کووید را مهار می‌کند. اثر بخشی این دارو در بین بیماران کووید-۱۹ به اندازه‌ای است که در اروپا برای درمان افراد بالای ۱۲ سال تجویز شده‌است (۲۷). با توجه به نقش کلیدی مهارکننده رمدسیور در جلوگیری از فرآیند تکثیر و رونویسی ویروس سارس-کووید-۲ به وسیله‌ی مهار کردن RdRp و موفقیت‌های بدست آمده در بررسی‌های پیشین، این سوال مطرح می‌شود که آیا با تغییر پارامترهای محیطی می‌توان شاهد عملکرد بهتر این دارو بود یا خیر؟ با توجه به این امر که دمای داخل سلول تحت تاثیر فرآیندهایی که در سلول رخ می‌دهند می‌تواند مقادیر متفاوتی داشته باشد (۲۸، ۲۹)، درک تاثیر تغییرات دما در اتصالات مهارکننده به پروتئین از اهمیت بالایی برخوردار است. در پژوهش حاضر به منظور یافتن اثر دما بر نیروی بازشدگی اتصالات مجموعه رمدسیور و RdRp، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده در ۴ دمای متفاوت صورت گرفته است. به طور کلی هدف از انجام این تحقیق، بررسی تاثیر پذیری مهارکنندگی رمدسیور در دماهای متفاوت در مهار و محدود کردن فعالیت RdRp با استفاده از تغییرات مقدار نیروی مورد نیاز و کار کشیدگی<sup>۱۱</sup> برای جدا شدن مهارکننده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

ساختارهای سه بعدی رمدسیور و RdRp به ترتیب با استفاده از بانک داده PubChem با کد 121304016 و بانک داده پروتئین (PDB) با کد 7BTF به دست آمدند. شکل ۳ الف و ب، به ترتیب نمایش سه بعدی RdRp (chain A) و رمدسیور را با استفاده از نرم افزار Pymol نشان می‌دهد. شبیه‌سازی داکینگ مولکولی برای اتصال رمدسیور به محل فعال RdRp (chain A) با استفاده از نرم افزار AoutoDock Vina نسخه 1.1.2 صورت گرفت. در این شبیه‌سازی از روش داکینگ منعطف<sup>۱۲</sup> استفاده شد، بدین صورت که در طول غربال‌گری نرم افزار Vina، دو آمینو اسید اسپارتیک اسید<sup>۱۳</sup> و ۷۶۱ (D760 و D761) که در محل فعال RdRp واقع شده‌اند، در فرایند یافتن محتمل‌ترین اتصال پروتئین-لیگاند، به صورت انعطاف‌پذیر باقی ماندند. جعبه مشکبک<sup>۱۴</sup> برای انجام فرآیند داکینگ، مکعبی به طول ۳۰ آنگستروم بوده و مختصات مرکز آن به صورت ۱۲۶/۵، ۱۳۵/۴، ۱۲۴/۴ نانومتر با اندکی اختلاف با مرکز RdRp در نظر گرفته شد. شکل ۳ ج مجموعه RdRp(chain A) و

تنوفویر<sup>۱</sup> و هیدروکسی کلورکین<sup>۲</sup> در اتصال با RdRp سارس-کووید-۲ موثر واقع شده‌اند. همچنین ستروبویر<sup>۳</sup>، YAK و IDX-184 زمانی که اجزای آن با مولفه‌های دیگر جایگزین شده باشند نتایج بهتری را نشان دادند (۲۳). عباس‌خان<sup>۴</sup> و همکاران با استفاده از پایگاه داده ترکیبات دارویی شمال آفریقای جنوبی (NANPDB)، جهت شناسایی داروهای جدید در جلوگیری از فعالیت RdRp اقدام نمودند. از میان ترکیبات مورد بررسی با غربال‌گری داکینگ مولکولی، ۴۲ ترکیب اتصال بهتری را نسبت به رمدسیور از خود نشان دادند. پس از آن با انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و محاسبات انرژی آزاد، ۴ مهارکننده جدید دارای اتصالات قوی‌تر با RdRp در مقایسه با رمدسیور یافت شد (۲۴). پلی فنول‌های گیاهی به طور موثری RdRp ویروس‌های مختلف را مهار می‌کنند. علاوه بر این پلی فنول‌ها<sup>۵</sup> مدت زیادی به عنوان مکمل‌های غذایی استفاده شده‌اند و نقش مهمی در هموستاز<sup>۶</sup> داشته‌اند. از این رو سینگ<sup>۷</sup> و همکاران، اتصال پلی فنول‌ها با RdRp ویروس سارس-کووید-۲ را به منظور درمان بیماری کووید-۱۹ مورد مطالعه قرار دادند. طی این بررسی شمار زیادی از پلی فنول‌های مناسب برای درمان بیماری‌های مختلف با استفاده از داکینگ مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند که در این میان اتصال قوی مهارکننده‌هایی مانند EGCG، TF1، TF2a، TF2b، TF3، myricetin و quercetagenin، hesperidin به وضوح قابل مشاهده بود. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و انرژی آزاد اتصالات نشان دادند که EGCG، TF2a، TF2b و TF3 قادر به مهار RdRp بوده و می‌توانند به عنوان یک درمان موثر برای بیماری کووید-۱۹ مورد استفاده قرار گیرند (۲۵). در برخی از مطالعات پژوهش-گران اثر اتصال و پایداری مهارکننده‌های مختلف را روی RdRp و نیز 3CLpro بررسی کرده‌اند. اودیت<sup>۸</sup> و همکاران با استفاده از غربال‌گری مجازی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و نیز محاسبات انرژی آزاد، ترکیب شیمیایی را از نظر انرژی اتصال به RdRp و 3CLpro ۵۰۰۰۰ ارزیابی کرده و در نتیجه‌ی آن ۳ مشتق از مهارکننده 4-morpholin-2-amine-1,3,5-(yl) و دو ترکیب 2001083-5 و 2001083-6 در 69-6 مهار 3CLpro و یک ترکیب از 833463-19-7 برای مهار RdRp موثر واقع شده‌اند (۲۶). همچنین، نگوین<sup>۹</sup> و همکاران اثر مهارکننده رمدسیور را روی Mpro و RdRp به طور هم‌زمان و با استفاده از روش دینامیک مولکولی هدایت شده مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند

<sup>1</sup> Tenofovir  
<sup>2</sup> Hydroxychloroquine  
<sup>3</sup> Setrobovir  
<sup>4</sup> Abbas Khan  
<sup>5</sup> Polyphenol  
<sup>6</sup> Hemostasis  
<sup>7</sup> Singh

<sup>8</sup> Aouidate  
<sup>9</sup> Nguyen

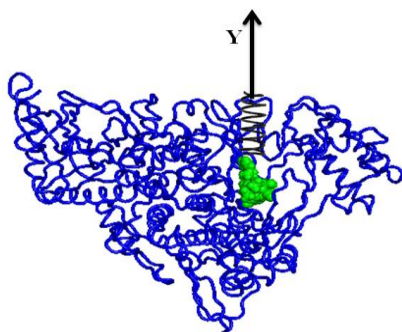
<sup>10</sup> Ebola  
<sup>11</sup> Pulling work  
<sup>12</sup> Flexible Docking  
<sup>13</sup> Aspartic acide  
<sup>14</sup> Grid box

ترموستات دما و فشار برنوسن و ثابت بودن تمام اتم‌های آلفا کربن<sup>۵</sup> به دو روش NVT و NPT برای مدت ۲۰۰ پیکوثانیه متعادل شد. از آنجایی که هدف از پژوهش انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده بود، گام سوم متعادل سازی به مدت ۵۰ پیکوثانیه و تنها با مقید کردن آلفا کربن‌های RdRp صورت گرفت.

جدول ۱: نتایج غربال‌گری داکینگ

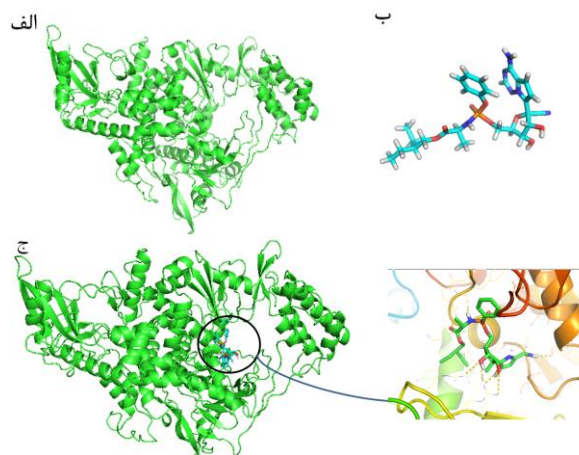
حالت	وابستگی (Kcal/mol)	RMSD فاصله از RMSD	بهترین حالت RMSD
1	-7.4	0.000	0.000
2	-7.4	2.699	6.790
3	-7.1	2.732	6.536
4	-7.1	2.085	5.924
5	-7.0	3.205	6.303
6	-7.0	1.268	2.127
7	-7.0	2.026	3.758
8	-7.0	4.366	8.559
9	-6.8	3.537	5.505

به منظور انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده به مدت ۱ نانوثانیه، رمدسیور تحت اثر نیروی حاصل از یک فنر هارمونیک با سختی  $600 \text{ kJ/mol/nm}^2$  متصل به مرکز جرم آن و در سرعت ثابت  $5 \text{ nm/ns}$  از RdRp (chain A) در جهت محور مختصات Y (منطبق با جهت Z در پژوهش نگوین و همکاران)<sup>(۲۷)</sup> جدا شد (شکل ۴). همچنین برای اطمینان از نتایج به دست آمده، سه شبیه‌سازی مستقل ایجاد و میانگین آن‌ها گزارش شده‌است.



شکل ۴: مجموعه رمدسیور و RdRp. پیکان مشکی جهت کشش رمدسیور را نشان می‌دهد.

رمدسیور را پس از فرآیند داکینگ با استفاده از نرم افزار PyMol نشان می‌دهد.



شکل ۳: ساختار سه بعدی (الف) RdRp(chain A) و (ب) رمدسیور. (ج) محل اتصال رمدسیور به RdRp(chain A)

پس از اطمینان یافتن از داکینگ مناسب و انتخاب بهترین پیکربندی برای مجموعه رمدسیور و RdRp (chain A) با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول ۱، اقدامات بعدی جهت انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده صورت گرفت. جدول ۱، مقدار وابستگی اتصال رمدسیور به RdRp را از بیش‌ترین مقدار به کم‌ترین مقدار نشان می‌دهد. با مراجعه به این جدول مشاهده می‌شود که حالت ۱ بیش‌ترین وابستگی اتصال بین رمدسیور و RdRp را داشته و بنابراین به عنوان ساختار اولیه برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفته است. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده با استفاده از نرم افزار GROMACS نسخه 2018.1، تحت میدان نیروی CHARMM 36 و با در نظر گرفتن مدل TIP3P برای آب آغاز شد. به منظور ایجاد توپولوژی برای رمدسیور با استفاده از سرور میدان نیروی کلی (CGenFF) (CHARMM)، پارامترهای مورد نیاز برای اتم‌های رمدسیور به دست آمدند. مجموعه رمدسیور به همراه RdRp در یک جعبه مستطیلی به ابعاد  $15/2 \times 13/4 \times 12/6$  نانومتر به صورت محلول درآمدند و محلول با افزودن یون‌های سدیم و کلر کاملاً خنثی شد. سپس انرژی سیستم به منظور حذف کرنش‌های اضافی با استفاده از الگوریتم تندترین آشوب کمینه شد. همچنین به منظور محاسبه تعاملات الکترواستاتیک<sup>۲</sup> با استفاده از روش PME و نیز نیروهای واندروالس<sup>۳</sup>، شعاع قطع  $1/4$  نانومتر به کار گرفته شد. گام زمانی برای این شبیه‌سازی ۲ فمتو ثانیه بوده و از الگوریتم leapfrog برای حل معادلات لانجورین<sup>۴</sup> استفاده شده است. در مرحله بعد سیستم در چهار دمای متفاوت ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد با

<sup>1</sup> Steepest decent

<sup>2</sup> Electrostatic intraction

<sup>3</sup> Van der waals

<sup>4</sup> Langevin

<sup>5</sup> Alpha carbon

### ۳- نتایج و بحث

داکینگ مناسب برای مجموعه RdRp و رمدسیور، با استفاده از روش کشیدگی سریع لیگاند (FPL)، نیروی گسیختگی و کار کشیدگی محاسبه هدف از این شبیه‌سازی بررسی تاثیر تغییرات دما بر عملکرد داروی رمدسیور و اتصالات ویروس-مهارکننده است. بدین منظور پس از انتخاب شدند. در صورتی که محل اتصال پروتئین برای خروج لیگاند بدون تغییر شکل ساختاری در دسترس باشد، FLP یک روش بسیار کارآمد برای کشف سریع میل اتصال یک لیگاند به یک پروتئین است. با وجود اینکه FLP به منبع محاسباتی کمی نیاز دارد، اما می‌تواند نتایج را با دقت و صحت بالایی ارائه دهد. بیشینه نیروی کشیدگی که همان نیروی گسیختگی نامیده می‌شود و کار کشیدگی، به عنوان ملاک‌هایی برای رتبه‌بندی وابستگی لیگاند استفاده شدند (جدول ۲). البته کار کشیدگی از نیروی گسیختگی مناسب‌تر است، زیرا مستقیماً از طریق معادله جازینسکی<sup>۲</sup>  $\langle e^{-\frac{W}{kBT}} \rangle = e^{-\frac{\Delta G}{kBT}}$  با انرژی آزاد لیگاند پیوند می‌یابد (۳۰،۳۱)

جدول ۲: خلاصه نتایج شبیه‌سازی مجموعه رمدسیور و RdRp در چهار

دمای متفاوت

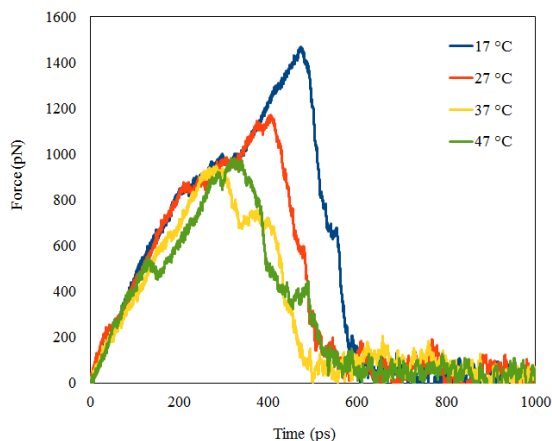
دما	نیروی گسیختگی*	کار کشیدگی**
17 °C	1468.42	280.54
27 °C	1171.72	212.34
37 °C	974.85	187.59
47 °C	981.87	178.88

\* pN

\*\*kcal/mol

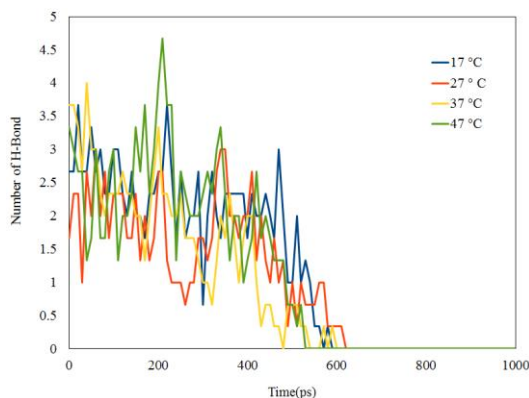
شکل ۵، نمودارهای نیرو بر حسب زمان در چهار دمای متفاوت (۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷) را نشان می‌دهد. همان‌طور که به وضوح قابل مشاهده است، نیروی گسیختگی رمدسیور از RdRp در دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد، بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده و دارای تفاوت چشم‌گیری با بیشینه نیروهای سایر دماها است. همچنین با افزایش دما، نیروی گسیختگی کاهش یافته و مقادیر کم‌تری را نشان می‌دهد. در دماهای ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد نیز بیشینه نیروها تقریباً یکسان بوده، لیکن زمان جداسازی کامل رمدسیور از RdRp متفاوت است. به طور کلی زمان جدایش در هر چهار دما یکسان نبوده و با توجه به نمودارهای گزارش شده در شکل ۵، با افزایش دما رمدسیور نیازمند زمان کوتاه‌تری برای جداسازی از RdRp است، به صورتی که دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای

کم‌ترین زمان برای جداسازی کامل است. این امر در حالی است که تعداد اتصالات پیوندهای هیدروژنی در دماهای متفاوت، اختلاف ناچیزی داشته‌اند. شکل ۶ نمودار تعداد اتصالات پیوندهای هیدروژنی را بر حسب زمان نشان می‌دهد.



شکل ۵: نمودارهای نیرو بر حسب زمان برای مجموعه رمدسیور و RdRp

پس از ۱ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده در چهار دمای متفاوت ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۶: نمودار تعداد اتصالات پیوندهای هیدروژنی بر حسب زمان پس از ۱

نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده و در چهار دمای ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد.

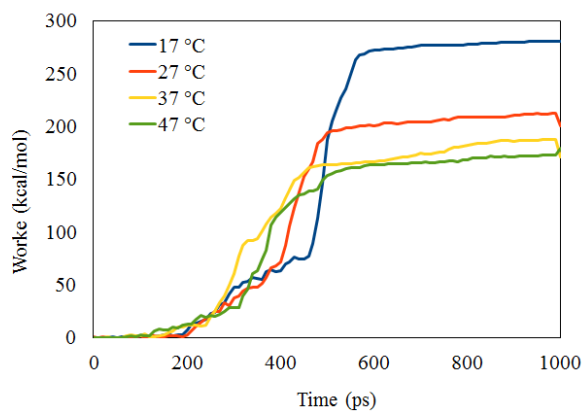
با توجه به شکل ۶، تعداد پیوندهای هیدروژنی در هر چهار دما، روند نزولی داشته و در فواصل زمانی ۴۸۰ تا ۶۴۰ پیکوثانیه به صفر میل پیدا کرده است. به منظور یافتن ارتباط فواصل میان مرکز جرم رمدسیور و RdRp در طول شبیه‌سازی در چهار دمای متفاوت، نمودارهای شکل ۷ پس از ۱ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده و با در نظر گرفتن فواصل مرکز جرم لیگاند از سه مکان متفاوت در RdRp، استخراج شدند. شکل‌های ۷ الف، ب و ج به ترتیب فواصل مرکز جرم رمدسیور و مرکز جرم RdRp، آسپارتیک اسید ۷۶۰ و آسپارتیک اسید ۷۶۱ واقع در جایگاه فعال RdRp را نشان می‌دهند. با مراجعه به شکل ۷، مشاهده می‌شود که فواصل مرکز جرم از هر سه نقطه در RdRp در چهار دمای

<sup>1</sup> Fast Pulling Ligand

<sup>2</sup> Jarzynski equality



با استفاده از نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده کار کشیدگی برای مجموعه رمدسیور و RdRp به دست آمد که می‌تواند معیار خوبی برای تحلیل انرژی اتصالات رمدسیور و RdRp باشد. شکل ۹، نمودار کار کشیدگی بر حسب زمان را برای مجموعه رمدسیور و RdRp در چهار دمای متفاوت نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار کار کشیدگی در هر چهار نمودار افزایش یافته و پس از مدتی به مقدار ثابتی رسیده است. همان‌طور که در شکل ۹ مشاهده می‌شود کار کشیدگی برای مجموعه در دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داده و اختلاف قابل‌ملاحظه‌ای با سایر دماها دارد. همچنین مشاهده می‌شود که با افزایش دما مقدار کار کشیدگی کاهش می‌یابد.

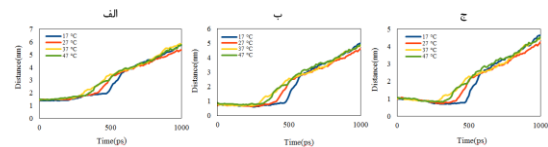


شکل ۹: نمودار کار کشیدگی بر حسب زمان برای مجموعه رمدسیور و RdRp پس از ۱ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده در چهار دمای متفاوت ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد.

#### ۴- نتیجه گیری

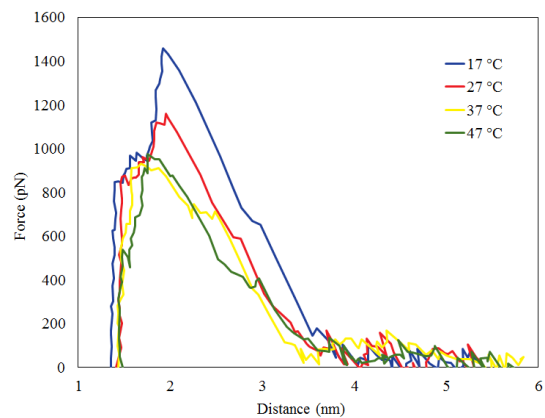
پژوهش حاضر با هدف یافتن تاثیر دما بر تمایل اتصال مجموعه رمدسیور و آنزیم RdRp ویروس سارس-کووید-۲، با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده صورت گرفته است. به سبب در دسترس بودن محل فعال این آنزیم، هدف قرار دادن آن برای مهار تکثیر سارس-کووید-۲ مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. همچنین رمدسیور به عنوان یک مهارکننده ضد ویروسی قوی، نقش مهمی را در مهار RdRp سارس-کووید-۲ ایفا می‌کند. از طرفی دمای داخل سلول می‌تواند به سبب فرآیندهای مختلفی که درون سلول رخ می‌دهد مقادیر متفاوتی را در بازه ۲۷ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد به خود اختصاص دهد. از این رو در این پژوهش به منظور اطمینان از صحت نتایج بازه دمایی بزرگ‌تری (۱۷-۴۷ درجه سانتی‌گراد) در نظر گرفته شده است. نتایج و نمودارهای بدست آمده، به وضوح تاثیر دما روی نیروی گسیختگی و کار کشیدگی مجموعه رمدسیور و RdRp را نشان دادند. با توجه به نتایج بدست آمده، افزایش دما سبب کاهش میزان

متفاوت نتایج یکسانی را نشان می‌دهد به صورتی که در هر سه نمودار دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد کم‌ترین فاصله بین نقاط مذکور را نشان داده و با افزایش دما فواصل نیز افزایش می‌یابند که این امر نشان‌دهنده کاهش ثبات مجموعه رمدسیور و RdRp با افزایش دما است.



شکل ۷: نمودارهای جابجایی بر حسب زمان برای مرکز جرم رمدسیور و (الف) مرکز جرم RdRp، (ب) آسپارتیک اسید ۷۶۰ و (ج) آسپارتیک اسید ۷۶۱ در جایگاه فعال RdRp، در چهار دمای متفاوت ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد پس از ۱ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده.

به منظور یافتن اثر دما بر سفتی جداشدن رمدسیور از RdRp، نمودار نیرو بر حسب جابجایی در چهار دمای متفاوت ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده در ۱ نانو ثانیه بدست آمد. با توجه به شکل ۸، نیروی گسیختگی رمدسیور از RdRp برای هر چهار دما در فاصله تقریباً یکسانی (حدود ۲ نانومتر) مشاهده می‌شود. بنابراین می‌توان گفت بیشینه نیرو در هر چهار دما در یک موقعیت واحد برای رمدسیور نسبت به RdRp رخ داده است. همچنین از آنجایی که شیب نمودار نیرو بر حسب جابجایی بیانگر سفتی کشیدگی است، با توجه به نمودارهای شکل ۸، مشاهده می‌شود که هر چهار نمودار تقریباً دارای شیب‌های یکسانی بوده و از این رو سفتی کشیدگی مستقل از دما بوده و برای هر چهار دما تقریباً یکسان می‌باشد.



شکل ۸: نمودار نیرو بر حسب جابجایی برای مجموعه رمدسیور و RdRp پس از ۱ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده در چهار دمای متفاوت ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد.

به طور کلی، انرژی آزاد اتصالات لیگاند-پروتئین با استفاده از تساوی جازینسکی به کار کشیدگی مرتبط است. نگو و همکاران (۳۰) در پژوهشی که روی مهارکننده‌های پروتئاز ویروس HIV انجام دادند، نشان دادند کار کشیدگی دارای همبستگی مناسبی با انرژی آزاد گیبس اتصالات پروتئاز ویروس HIV و مهارکننده‌های آن است. در این بررسی

Mutations in Spike Protein of SARS-CoV-2 Modulate Receptor Binding, Membrane Fusion and Immunogenicity: An Insight into Viral Tropism and Pathogenesis of COVID-19. 2020.

[9] Dayer MR. Old drugs for newly emerging viral disease, COVID-19: Bioinformatic prospective. arXiv. 2020;

[10] Abdelli I, Hassani F, Bekkel Brikci S, Ghalem S. In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by *Ammoides verticillata* components harvested from Western Algeria. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2020;0(0):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763199>

[11] Salim B, Noureddine M. Identification of Compounds from *Nigella Sativa* as New Potential Inhibitors of 2019 Novel Coronasvirus (Covid-19): Molecular Docking Study. *ChemRxiv*. 2020;19:1–12.

[12] Muralidharan N, Sakthivel R, Velmurugan D, Gromiha MM. Computational studies of drug repurposing and synergism of lopinavir, oseltamivir and ritonavir binding with SARS-CoV-2 protease against COVID-19. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2020;0(0):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1752802>

[13] Aftab SO, Ghouri MZ, Masood MU, Haider Z, Khan Z, Ahmad A, et al. Analysis of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a potential therapeutic drug target using a computational approach. *J Transl Med*. 2020;18(1).

[14] Choy KT, Wong AYL, Kaewpreedee P, Sia SF, Chen D, Hui KPY, et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Res*. 2020;178.

[15] Coomes EA, Haghbayan H. Favipiravir, an antiviral for COVID-19? Vol. 75, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020. p. 2013–4.

[16] Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;382(19):1787–99.

[17] Valk SJ, Piechotta V, Chai KL, Doree C, Monsef I, Wood EM, et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a rapid review. Vol. 2020, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020.

[18] Choudhery MS, Harris DT. Stem cell therapy for COVID-19: Possibilities and challenges. Vol. 44, *Cell Biology International*. 2020. p. 2182–91.

[19] Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific J Allergy Immunol*. 2020;38(1):1–9.

[20] Elfiky AA. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life Sci*. 2020;248.

نیروی گسیختگی و همچنین کار کشیدگی شده است. از طرفی به سبب همبستگی نتایج کار کشیدگی با انرژی آزاد گیبس توسط تساوی جارجینسکی می‌توان گفت با افزایش دما شاهد مقادیر کم‌تر انرژی آزاد گیبس برای اتصالات رمدسیور و RdRp خواهیم بود. بنابراین عملکرد داروی رمدسیور جهت مهار RdRp در دماهای پایین‌تر بهتر بوده و با افزایش دما از میزان آن کاسته خواهد شد. کومار<sup>۱</sup> و همکاران طی بررسی خود روی پروتئاز سارس-کووید-۲ نتایج مشابهی را نشان دادند که افزایش دما سبب کاهش پایداری مجموعه پروتئاز سارس-کووید-۲ و نوزکپاین<sup>۲</sup> می‌شود. به عبارت دیگر آن‌ها دریافتند عملکرد نوزکپاین در دماهای پایین‌تر بهتر از دماهای بالاتر است (۳۱). به عبارت دیگر می‌توان گفت داروی ضد ویروس رمدسیور برای مهار ویروس سارس-کووید-۲، با افزایش دمای بدن ضعیف‌تر عمل کرده و اثر مهارکنندگی آن ناپایدارتر خواهد بود.

## مراجع

- [1] Li H, Liu SM, Yu XH, Tang SL, Tang CK. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020;55(5):105951. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105951>
- [2] Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In: *Advances in Virus Research*. 2018. p. 163–88.
- [3] Ngo ST, Quynh Anh Pham N, Thi Le L, Pham D-H, Vu V V. Computational Determination of Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease. *J Chem Inf Model*. 2020;
- [4] Huynh T, Wang H, Cornell W, Luan B. In Silico Exploration of Repurposing and Optimizing Traditional Chinese Medicine Rutin for Possibly Inhibiting SARS-CoV-2's Main Protease. 2020;1–20.
- [5] Al-Dorzi HM, Van Kerkhove MD, Peiris JSM, Arabi YM. Middle east respiratory syndrome coronavirus. *ERS Monogr*. 2016;2016(9781849840705):21–34.
- [6] Banerjee AK, Ray U. Mutation hot spots in Spike protein of COVID-19 virus: Mutation in spike protein. *Proc Indian Natl Sci Acad*. 2020;86(April).
- [7] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* (80- ). 2020;367(6483):1260–3.
- [8] Saha D, Majumder R, chakraborty sourabrata, Kumar Srivastava A, Mandal M, Sarkar S.

<sup>1</sup> Kumar

<sup>2</sup> Noscapines



- [21] Zhang L, Zhou R. Binding mechanism of remdesivir to SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase. ResearchGate [Internet]. 2020;(March):2020030267. Available from: [www.preprints.org](http://www.preprints.org)
- [22] Patra A, Bhavesh NS. Virtual screening and molecular dynamics simulation suggest Valproic acid Co-A could bind to SARS-CoV2 RNA depended RNA polymerase. 2020;(March):1–10. Available from: <https://www.preprints.org/manuscript/202003.0393/v1>
- [23] Elfiky AA. SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) targeting: an in silico perspective. J Biomol Struct Dyn. 2020;
- [24] Khan A, Khan M, Saleem S, Babar Z, Ali A, Khan AA, et al. Phylogenetic Analysis and Structural Perspectives of RNA-Dependent RNA-Polymerase Inhibition from SARS-CoV-2 with Natural Products. Interdiscip Sci Comput Life Sci. 2020;12(3):335–48.
- [25] Singh S, Sk MF, Sonawane A, Kar P, Sadhukhan S. Plant-derived natural polyphenols as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA- dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: an in-silico analysis. J Biomol Struct Dyn. 2020;
- [26] Aouidate A, Ghaleb A, Chtita S, Aarjane M, Ousaa A, Maghat H, et al. Identification of a novel dual-target scaffold for 3CLpro and RdRp proteins of SARS-CoV-2 using 3D-similarity search, molecular docking, molecular dynamics and ADMET evaluation. J Biomol Struct Dyn. 2020;
- [27] Nguyen HL, Thai NQ, Truong DT, Li MS. Remdesivir Strongly Binds to Both RNA-Dependent RNA Polymerase and Main Protease of SARS-CoV-2: Evidence from Molecular Simulations. J Phys Chem B [Internet]. 2020; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33264025>
- [28] Lepock JR, Borrelli MJ. How do cells respond to their thermal environment? Int J Hyperth. 2005;21(8):681–7.
- [29] Gota C, Okabe K, Funatsu T, Harada Y, Uchiyama S. Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. J Am Chem Soc. 2009;131(8):2766–7.
- [30] Ngo ST, Hung HM, Nguyen MT. Fast and accurate determination of the relative binding affinities of small compounds to HIV-1 protease using non-equilibrium work. J Comput Chem. 2016;37(31):2734–42.
- [31] Kumar D, Kumari K, Jayaraj A, Kumar V, Kumar RV, Dass SK, et al. Understanding the binding affinity of nospapines with protease of SARS-CoV-2 for COVID-19 using MD simulations at different temperatures. J Biomol Struct Dyn. 2020;