



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

ANÁLISIS DE DINÁMICA MOLECULAR
Y ENERGÍA LIBRE DE INTERACCIÓN
DE LA VARIANTE GAMMA EN
COMPLEJO CON HACE-2

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA

MAURIZIO MARTIN CAVANI BRAIN

LIMA - PERÚ

2023

ASESOR

PhD. Walter Arnaldo Riofrío Ríos

JURADO DE TESIS

Mg. Marco Antonio Cabello Napurí
PRESIDENTE

Dr. Jorge Rodríguez Bailon
VOCAL

Dr. Willy Cerón Tello
SECRETARIO

DEDICATORIA

A mis padres, Hugo y Roxanna, y a Renzo y Gabriella, por su constante e invaluable apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al “doc” Marcelino Arciniega por asesorarme, enseñarme e incorporarme a su equipo de investigación, y por haberme permitido trabajar a su laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, sin lo cual el proyecto sobre el cual versa el siguiente informe no habría sido posible.

Al doctor Walter Riofrío, por su asesoría y dedicación para que el proyecto se lleve a cabo.

Al doctor Diego Leonardo, con quien concebimos la idea inicial y por motivos de trabajo y estudio tuvo que abandonar el proyecto en etapas tempranas.

A mi carnal Leonardo Tafolla, por las constantes charlas en las cuales compartimos conocimientos que fueron de gran utilidad para ultimar detalles en los cálculos de afinidad (screening de momento dipolar) y la interpretación de las distancias interatómicas.

A Renzo Cavani, por su apoyo incondicional en la edición del informe final para la obtención del grado.

A mi querido amigo y colega Nicolás Delgado, por su apoyo constante e incondicional y la revisión exhaustiva del informe final.

ANÁLISIS DE DINÁMICA MOLECULAR Y ENERGÍA LIBRE DE INTERACCIÓN DE LA VARIANTE GAMMA EN COMPLEJO CON HACE-2

INFORME DE ORIGINALIDAD

20% <small>EN</small>	19%	19%	18%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	opendocs.ids.ac.uk Fuente de Internet	1%
2	profiles.wustl.edu Fuente de Internet	1%
3	scholars.cityu.edu.hk Fuente de Internet	1%
4	researchportal.ukhsa.gov.uk Fuente de Internet	1%
5	researchexperts.utmb.edu Fuente de Internet	1%
6	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	1%
7	pea.lib.pte.hu Fuente de Internet	1%
8	Submitted to Zhejiang University Center of Modern Educational Technology Trabajo del estudiante	1%



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN
ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
2.1	Metodología	6
2.2	Análisis estructural de las mutaciones	9
2.3	Análisis termodinámico	17
III.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	21
IV.	COMENTARIOS FINALES	22
V.	APÉNDICES	23
VI.	DATA DISPONIBLE	24
VII.	FUENTES DE FINANCIAMIENTO	25
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMEN

A tres años del inicio de la pandemia el virus continúa evolucionando, ahora dentro del clado de la variante omicrón. A lo largo de este periodo, gracias a los esfuerzos en investigación básica y clínica, la pandemia está cediendo hacia una posible endemia. El presente artículo se realizó dentro de este marco de aprendizaje con el objetivo de generar nuevas metodologías para abordar el estudio de la estructura-función del virus SARS-CoV-2. Entre diciembre del 2020 y junio del 2021, la variante gamma trajo consigo una oleada de infecciones y decesos que azotaron a la población mundial, afectando principalmente a Sudamérica. Las mutaciones K417T, E484K y N501Y fueron previamente descritas de manera experimental dejando vacíos en cuanto al efecto que tuvieron sobre la transmisibilidad. A fin de complementar los estudios previos, con el artículo publicado objeto de este informe se abordó el efecto de las mutaciones mediante simulaciones de dinámica molecular y el análisis termodinámico de la energía libre de interacción a partir de la obtención de la energía de afinidad mediante dos métodos: (1) uno modificado para el cálculo de la contribución electrostática de MM-PBSA (*“Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area”*) y (2) uno propuesto por los autores para obtener la contribución por residuo de la entropía de interacción. Los resultados indican una compensación energética entre las mutaciones K417T y E484K, y la mutación N501Y comprende un efecto inesperado sobre la configuración estereoquímica del residuo Y495. Con ello, el artículo no sólo correlaciona los resultados previamente publicados, sino que expone nuevas características asociadas a la contribución particular de las mutaciones. Sumado a ello, una metodología que puede ser empleada para futuras investigaciones en el campo de la inmunobioinformática.

PALABRAS-CLAVE: SARS-COV-2; variante gamma; mutaciones; dinámica molecular; MM-PBSA; entropía de interacción.

ABSTRACT

Three years after the start of the pandemic, the virus continues to evolve, now within the clade of the omicron variant. Throughout this period, thanks to efforts in basic and clinical research, the pandemic is giving way to a possible endemic. This article was carried out within this learning framework with the aim of generating new methodologies to address the study of the structure-function of the SARS-CoV-2 virus. Between December 2020 and June 2021, the gamma variant brought with it a wave of infections and deaths that hit the world population, mainly affecting South America. The K417T, E484K and N501Y mutations were previously described experimentally, leaving gaps regarding the effect they had on transmissibility. In order to complement previous studies, the article published as the subject of this report addressed the effect of mutations through molecular dynamics simulations and the thermodynamic analysis of the free energy of interaction from obtaining the affinity energy using two methods: (1) one modified for the calculation of the electrostatic contribution of MM-PBSA (“Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area”) and (2) one proposed by the authors to obtain the contribution per residual of the interaction entropy. The results indicate an energetic trade-off between the K417T and E484K mutations, and the N501Y mutation comprises an unexpected effect on the stereochemical configuration of the Y495 residue. With this, the article not only correlates previously published results, but also exposes new characteristics associated with the contribution of mutations. Added to this, a methodology that can be used for future research in the field of immunological bioinformatics.

KEY-WORDS: SARS-COV-2; gamma variant; mutations; molecular dynamics;
MM-PBSA; interaction entropy.

I. INTRODUCCIÓN

Desde finales de 2019, el mundo entero se encuentra sumido en la pandemia del COVID-19, la cual aún no es superada debido a la falta de tratamientos efectivos y vacunas completamente efectivas. A partir de ese año, el virus SARS-CoV-2 ha continuado su evolución y generado múltiples linajes estableciendo una suerte de prevalencia a pesar de los esfuerzos colectivos de los grupos de investigación y el personal de salud a nivel mundial (A & C, 2020; L, 2021).

La concepción del artículo que someto para la obtención del grado de magíster surgió en el mes de enero de 2021¹, cuando la variante gamma tomaba gran preponderancia en Sudamérica. Como es sabido, a finales del año 2020, en la región de Manaus en el Amazonas (Brasil), ocurrió un brote de crecimiento exponencial. En apenas dos meses, logró expandirse por todo el mundo y reemplazar a la variante predecesora (Faria et al., 2021; Sabino et al., 2021). Desde entonces, la variante gamma ha causado miles de infecciones y muertes de acuerdo con los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y GISAID (Elbe & Buckland-Merrett, 2017; Shu & McCauley, 2017), lo cual trajo consigo una severa crisis en los sistemas de salud de los países sudamericanos, que no se dieron abasto

¹ El título del artículo sobre el cual versa el presente informe es “Molecular Dynamics and MM-PBSA Analysis of the SARS-CoV-2 Gamma Variant in Complex with the hACE-2 Receptor”, y fue publicado en *Molecules* 2022, 27(7), 2370; <https://doi.org/10.3390/molecules27072370>. El autor principal es Maurizio Martin Cavani Brain; el asesor y autor secundario es PhD Walter Arnaldo Riofrío Ríos; en tanto que el colaborador y autor correspondiente es PhD Marcelino Arciniega Castro. Código SIDISI: 210607. El *paper* fue recibido el 4 de enero del 2022, revisado el 11 de marzo del 2022 y aceptado el 16 de marzo del 2022. Finalmente, fue publicado el 6 de abril del 2022.

para atender a la cantidad de pacientes que llegaban diariamente en busca de tratamiento y cuidados intensivos.

La variante gamma cuenta con 3 mutaciones en el dominio de reconocimiento del receptor (RBD por sus siglas en inglés) ubicado en la subunidad S1 de la proteína *spike*. Estas son K417T, E484K y T501Y. Cuando el proyecto se concibió, la variante gamma contaba con muy pocos estudios y la estructura tridimensional recién había sido resuelta. Por ello, lo que se sabía de su biología y de los parámetros epidemiológicos era poco a comparación de, por ejemplo, lo que se sabe hoy de la variante omicrón y sus subvariantes (*Tracking SARS-CoV-2 Variants*, n.d.).

Los antecedentes con los que se contaban en el momento respecto a las mutaciones de la variante gamma eran muy concisos. En efecto, la mutación K417T impedía que se forme un puente salino con el residuo D30 del receptor de la enzima convertidora de angiotensina-2 humano (hACE-2); la mutación E484K creaba una correspondencia electrostática con el receptor; y la mutación N501Y era descrita como una mutación que mejoraba el anclaje debido al apilamiento de anillos aromáticos con el residuo Y41 del receptor (Dejnirattisai, Zhou, Ren, et al., 2021; Wang et al., 2021). A partir de esa información quedaban vacíos para explicar por qué la variante gamma era ligeramente más transmisible y evadía mejor a la inmunidad humoral y a los anticuerpos monoclonales que la variante beta (la así llamada “variante sudafricana”, predecesora a gamma) (Rees-Spear et al., 2021; Zhou et al., 2021).

La mutación K417T, que en la variante beta era K417N, era ambigua debido a su carácter deletéreo. Normalmente, se trataría de una valla difícil de superar en un proceso de selección natural, debido a que disminuye la afinidad por el receptor. Por esa razón, la única forma de explicar el leve incremento en la afinidad (Kd) tenía que deberse a una correspondencia con cualquiera de las otras dos mutaciones o con ambas. Bajo esta premisa, se usaron técnicas computacionales para predecir la participación individual de los residuos sobre la afinidad por el receptor hACE-2.

En marzo de 2021, al inicio de la fase experimental de este proyecto, la variante delta estaba muy localizada (India) y era una variante de interés más que de preocupación (“Variant of Concern”, o VoC por sus siglas en inglés) (Choi & Smith, 2021). En cambio, la variante gamma era dominante y ya estaba azotando Sudamérica, sin perjuicio del hecho que las vacunas aún no llegaban a este lado del continente. Debido a ello, se desarrolló un estudio piloto basado en simulaciones, el cual obtuvo una posible restauración de la función de la proteína *spike* a partir de la correspondencia entre las mutaciones K417T y E484K.

Una vez culminado el piloto, a partir de una extenuante revisión bibliográfica, el misterio de cuál era la relación entre las mutaciones sobre la afinidad o la evasión inmunológica seguía sin respuesta. A simple vista, la posibilidad de que las mutaciones K417T y E484K se contrarresten era una opción, ya que la mutación deletérea quita una lisina cargada ampliando la distancia con el residuo D30 del receptor y la otra añade una lisina incrementando la complementariedad electrostática. Sobre la mutación N501Y sólo se observó un mejor anclaje. Sin

embargo, dada la persistencia de la mutación en las dos variantes predecesoras, era posible que escondiera alguna particularidad. Con base en estos resultados previos, se hipotetizó que el efecto de las mutaciones con los residuos circundantes y la correspondencia entre las mutaciones influyen sobre la afinidad con el receptor hACE-2.

A partir del estudio piloto se plantearon tres objetivos. El primer objetivo: medir la contribución energética individual de cada residuo a la afinidad de unión (entalpía) y la entropía de interacción con la finalidad de obtener la energía libre y comparar los resultados con las constantes de disociación (K_d) experimentales. El segundo objetivo fue dilucidar cuál era la participación de los residuos mutados en la interacción con el receptor hACE-2, debido a que había diferentes particularidades para cada uno. Finalmente, el tercer objetivo consistió en congregar los resultados para llegar a una conclusión con respecto a cómo afectan las mutaciones a los residuos circundantes y calcular el efecto que tienen sobre la transmisibilidad de la variante gamma.

Con estos objetivos, comenzó el estudio y, luego de mucho trabajo, culminó con su publicación en abril del 2022. A continuación, detallaré el desarrollo del artículo desde la metodología hasta fascinantes resultados obtenidos, así como el alcance y relevancia del artículo sobre el cual se basa el presente informe.

II. METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El artículo titulado “Molecular Dynamics and MM-PBSA Analysis of the SARS-CoV-2 Gamma Variant in Complex with the hACE-2 Receptor”, publicado en la revista *Molecules*, en abril de 2022, consistió en un estudio comparativo de dos simulaciones de dinámica molecular de la variante de Wuhan (“wild type” o WT) y de la variante gamma. La metodología del estudio se basó en un análisis estadístico de las simulaciones, el desarrollo de un método corregido para amortiguar el factor electrostático de la técnica de MM-PBSA para medir la entalpía global e individual por residuo y el cálculo de la entropía de interacción (IE) global e individual por residuo bajo un método desarrollado en el presente artículo (la derivación se encuentra en el apéndice A del artículo en mención).

Por motivos didácticos, los resultados con su respectiva discusión fueron separados en dos partes: (i) el análisis estructural de las simulaciones de dinámica molecular de ambas variantes y el análisis estadístico de las trayectorias con énfasis en las tres mutaciones; y (ii) el análisis termodinámico, que comprende el cálculo de la entalpía por MM-PBSA y la entropía de interacción para finalmente obtener la energía libre de interacción específica por residuo.

En las siguientes subsecciones detallaré la metodología y discutiré los resultados más importantes.

2.1 Metodología

Las simulaciones de dinámica molecular se hicieron con dos estructuras resueltas por difracción de rayos X publicadas en el “Protein Data Bank” (PDB) (Berman et al., 2014), el RBD de la proteína *spike* WT de SARS-CoV-2 en complejo con el receptor hACE-2 (PDB ID: 6M0J; Res=2.45 Å; R-free=0.227) (Lan et al., 2020) y el RBD de la variante gamma en complejo con los anticuerpos COVOX-222 y EY6A (PDB ID: 7NXB; Res=2.67 Å; R-free=0.246) (Dejnirattisai, Zhou, Supasa, et al., 2021). Para ambas estructuras se eliminaron las moléculas de agua, hidrógenos, anticuerpos y glicosilaciones; solo se mantuvieron los cofactores iónicos cloro y zinc en la estructura del receptor hACE-2. Los cofactores se mantuvieron debido a la relevancia en la estabilidad de la estructura terciaria y la influencia que tienen en el aspecto electrostático sobre la interfase de unión con el RBD de la proteína *spike*. El complejo de la variante gamma fue construido mediante un alineamiento estructural de C- α entre el complejo WT y el RBD de la proteína *spike* de la variante gamma (RMSD=0.44 Å) con el programa PyMOL (DeLano, 2002). Las simulaciones se hicieron con GROMACS v.2020 y la producción fue de 100ns (Lindorff-Larsen et al., 2010; van der Spoel et al., 2005). El análisis estadístico de las trayectorias consistió en evaluar el RMSD, RMSF, los puentes de hidrógeno y las características geométricas moleculares con la caja de herramientas de Gromacs.

El cálculo de la energía de afinidad (entalpía) y las contribuciones energéticas de los residuos interactuantes entre ambas proteínas (proteína *spike-receptor* hACE-2) se hizo mediante el análisis de MM-PBSA usando el programa g-mmpbsa (Baker

et al., 2001; Kumari et al., 2014; Sheng et al., 2021). El cálculo consistió en tres partes: el cálculo de la energía potencial en el vacío, el cálculo de la energía de solvatación polar y la energía de solvatación no polar ($\Delta G_{SA} = \gamma \cdot SASA + b$; $\gamma = 2.27 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ y $b = 3.85 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$$\begin{aligned}\Delta G_{bind} &= \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \\ \Delta E_{MM} &= \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw} \\ \Delta G_{sol} &= \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA}\end{aligned}$$

Para el cálculo de la energía electrostática se agregó a la ecuación un factor de amortiguación de acuerdo con la teoría de Debye-Hückel:

$$\begin{aligned}\Delta E_{ij}^{ele} &= \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{in}r_{ij}} \\ \Delta E_{ij}^{ele} &= \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{in}r_{ij}} e^{-r_{ij}/\lambda_D}; \lambda_D < 1.0M \\ \lambda_D &= \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_{out}k_B T}{\sum_i c_i e^2 z_i^2}}; T = 298 \text{ K}, \lambda_D = \frac{3.07}{\sqrt{c}}, \text{ donde: } c_{[NaCl]} = 0.15 \text{ M y } \lambda_D \\ &= 8.0 \text{ \AA}\end{aligned}$$

Para resolver la aproximación lineal de la ecuación de Poisson-Boltzmann se utilizó una constante dieléctrica de $\epsilon_{in} = 2.0$ para el soluto y $\epsilon_{out} = 80$ para el solvente (al respecto, setear los valores fue sumamente importante para aproximarse al valor entálpico cercano al experimental). Finalmente, para el cálculo se utilizaron 100 frames de la simulación de cada complejo.

La entropía de interacción se calculó mediante el método de Zhang et al. (Duan et al., 2016, 2017; Huang et al., 2020; Sun et al., 2017), con una modificación para identificar la contribución entrópica individual por residuo en la interacción

proteína-proteína para ambas simulaciones (la derivación se puede visualizar en el apéndice A del artículo):

$$-T\Delta S_{gas,k} = kT \ln \left(\sum_n \prod_{i \forall i \neq k}^S e^{\frac{R_{ni} - \frac{1}{N} \sum_n^N R_{ni}}{kT}} \right) - kT \ln(N)$$

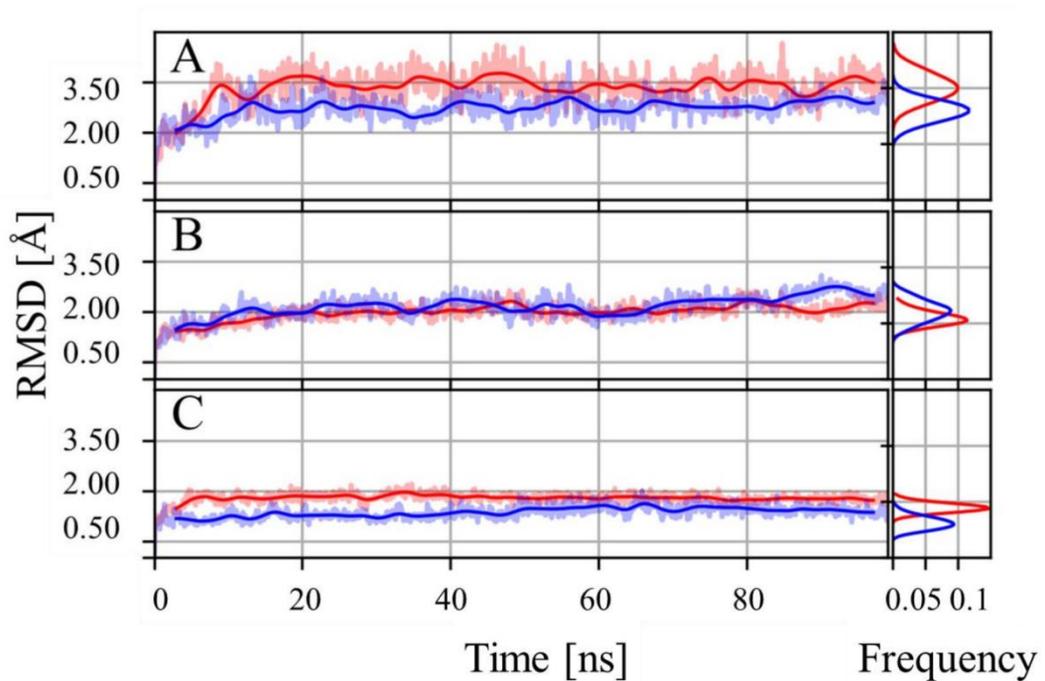
Ambos resultados fueron sumados para calcular la energía libre de Gibbs ($\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S_{gas,k}$) y compararla con la energía de afinidad experimental (Kd). A partir del cálculo de la energía libre se hicieron inferencias sobre el efecto de las tres mutaciones en la transmisibilidad y la evasión inmunológica.

2.2 Análisis estructural de las mutaciones

De los resultados generales obtenidos a partir de la dinámica, los gráficos de RMSD (Figura 1) muestran que el sistema se encuentra equilibrado sin considerar los primeros 20ns, lo cual indica la ausencia de artefactos y rearrreglos moleculares. Para visualizar los comportamientos de ambos complejos durante la simulación, se hicieron gráficos de RMSF para cada proteína por separado, siendo más pronunciadas las fluctuaciones del receptor hACE-2 para la mutante gamma.

Figura 1

Gráfico de RMSD a lo largo de los 100 ns de simulación de dinámica molecular. El RMSD de C- α se calculó sobre todo el complejo (A), el receptor hACE-2 (B) y el RBD de la proteína *spike* (C) de los complejos simulados WT (azul) y variante gamma (rojo). Las líneas continuas representan el promedio ponderado sobre los datos de RMSD originales (Kernel gaussiano estándar con ventana de 30 cuadros). Las sombras de colores asociadas corresponden a los datos originales de RMSD. Los histogramas de RMSD presentados en el extremo derecho de cada gráfico recopilan información a partir de 20 ns.

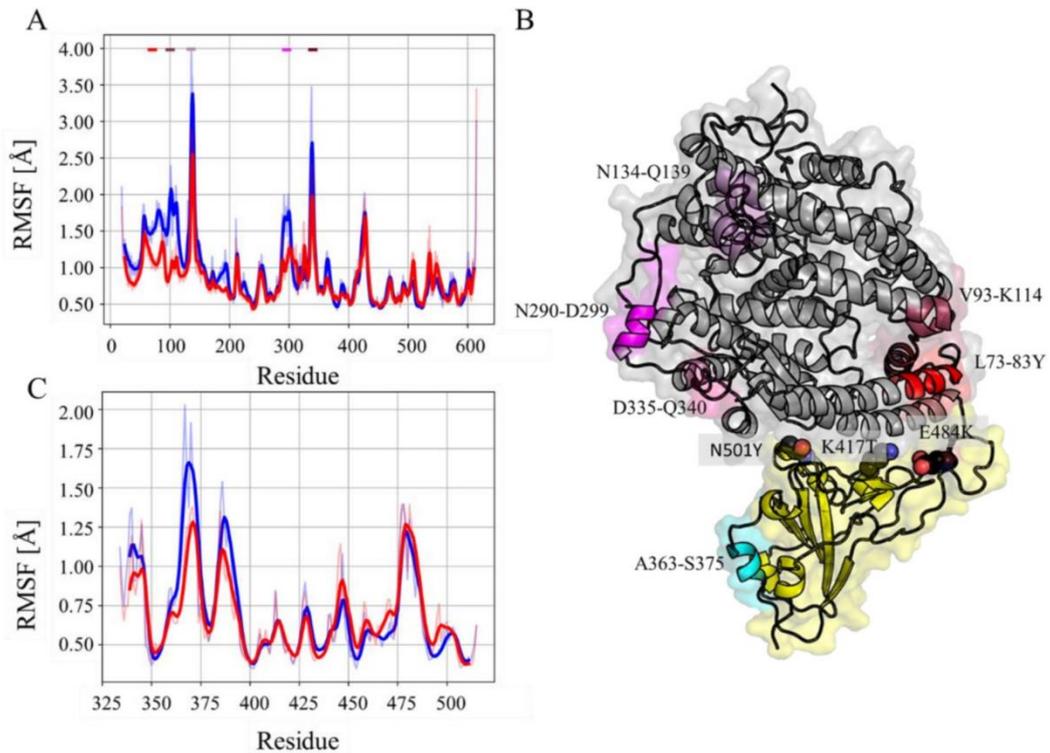


A partir de los gráficos de RMSF, es importante mencionar que las regiones con mayores fluctuaciones se encuentran ubicadas en la interfase de interacción (Figura 2); sin embargo, no se visualizaron grandes cambios estructurales entre ambas variantes. Ello sugiere que las diferencias experimentales observadas en publicaciones previas se deberían al efecto de las mutaciones sobre las interacciones intermoleculares específicas.

Figura 2

Gráfico de RMSF. RMSF de C- α calculado sobre todo el receptor hACE-2 (A) y el RBD de la proteína *spike* (C) de los complejos simulados de WT (azul) y variante gamma (rojo). Las líneas continuas representan el promedio ponderado sobre los datos de RMSF originales (Kernel gaussiano estándar con ventana de 5 residuos). Las sombras de colores asociadas corresponden a los datos de RMSF originales. Las barras de colores en la parte superior de cada panel resaltan las regiones con

comportamiento diferencial entre ambos complejos. Estos segmentos están mapeados en la estructura con el mismo código de color (B).

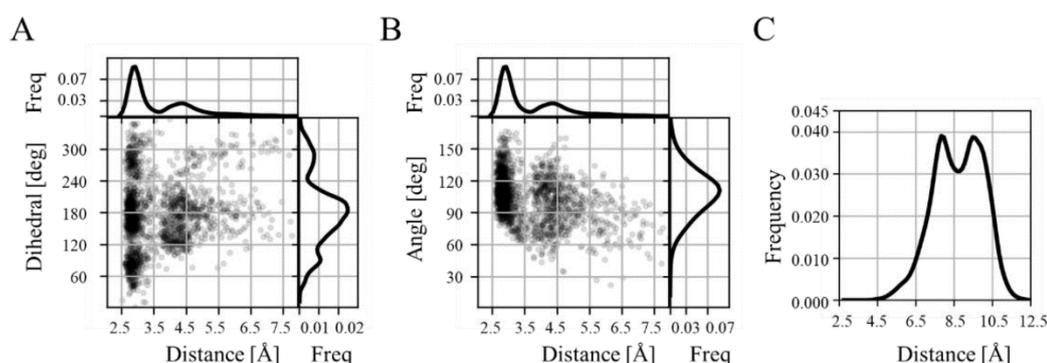


Para analizar el efecto de la mutación K417T, se midieron los ángulos diedros en ambas simulaciones basándonos en datos cristalográficos para la identificación del puente salino (Donald et al., 2011; Y. Han et al., 2021). En el complejo WT se observó el puente salino entre K417 N ζ y D30 O δ a una distancia de 2.5 a 3.5 Å durante el 82% de la simulación; la orientación del ángulo diedro entre K417 C δ -C ϵ -N ζ y D30 O δ y el ángulo entre K417 C ϵ -N ζ con D30 O δ , fueron reportadas (Figura 3). En la variante gamma la orientación del grupo hidroxilo de T417 se aleja del ácido carboxílico del residuo D30 en 8Å, lo cual refleja el efecto deletéreo de la mutación. Estos detalles estructurales fueron indicadores de que la pérdida de afinidad se iba a ver reflejada en gran medida con los cálculos posteriores. Así mismo, las interacciones con anticuerpos monoclonales y suero convaleciente se

ven afectadas debido a que se pierde el único residuo interactuante en ese flanco del RBM.

Figura 3

Aspectos estructurales destacados de la mutación K417T. (A) Gráfico de distancia del ángulo diedro de la interacción de K417 con D30. Cada punto en el gráfico representa la distancia entre K417 N ζ y D30 O δ y la forma diédrica entre C δ -C ϵ -N ζ de K417 y O δ de D30. (B) Gráfico de ángulo-distancia de la interacción de K417 con D30. Cada punto en el gráfico representa la distancia, como se describe para (A), y la forma del ángulo entre C ϵ -N ζ de K417 y O δ de D30. Los histogramas para cada variable individual se presentan en el borde del gráfico en (A) y (B). (C) Histograma que describe la distancia entre T417 O γ y D30 O δ .

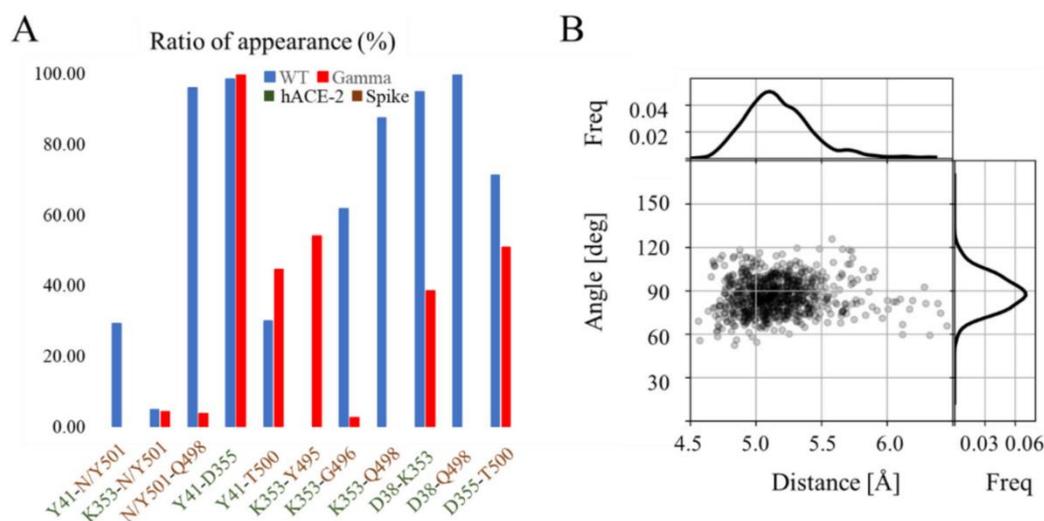


Con respecto a la mutación N501Y, el reordenamiento de las interacciones debido a la inclusión del anillo aromático se ve reflejado en el cálculo de los puentes de hidrógeno, en el cálculo del ángulo de los anillos aromáticos promediado en 90 deg y en la distancia entre los centros geométricos de los residuos Y501 y Y41 de 5Å (Figura 4). Esta mutación ya había sido previamente reportada tanto en la variante

alfa como en la variante beta, en las cuales resultó ser importante para la evasión del sistema inmune.

Figura 4

Aspectos estructurales destacados de la mutación N501Y. (A) Porcentaje de aparición de puentes de hidrógeno entre el residuo N(Y)501 y los residuos colindantes durante los últimos 80 ns de simulación para el complejo WT (azul) y el complejo de la variante gamma (rojo). (B) Gráfico de ángulo-distancia de la interacción π - π entre Y501 e Y41. Cada punto en el gráfico representa la distancia del centro geométrico y el ángulo de los vectores normales entre los grupos aromáticos correspondientes. Los histogramas para cada variable individual se presentan en el borde del gráfico.



Estructuralmente hablando, es importante describir que las interacciones polares presentes en casi la totalidad de la simulación del complejo WT entre los residuos K353 y Q498 desaparece completamente en la variante gamma, prevaleciendo la interacción polar con el residuo Y41. A razón de ello, se hizo un escaneo robusto

de las interacciones intramoleculares e intermoleculares y los cambios conformacionales que compensan la pérdida de esas interacciones polares, que son importantes para el complejo WT, sin perjuicio del apilamiento hidrofóbico de los anillos aromáticos. Además, se calculó el porcentaje de abundancia de los puentes de hidrógeno, tras lo cual encontramos que el residuo K353 estabiliza el anclaje mediante una interacción con el grupo carbonilo de Y495 con una prevalencia del 54% (Figura 4). Esta interacción es imposible sin una modificación estereoquímica del residuo Y495, la cual sorprendentemente ocurriría bajo la influencia de la mutación N501Y.

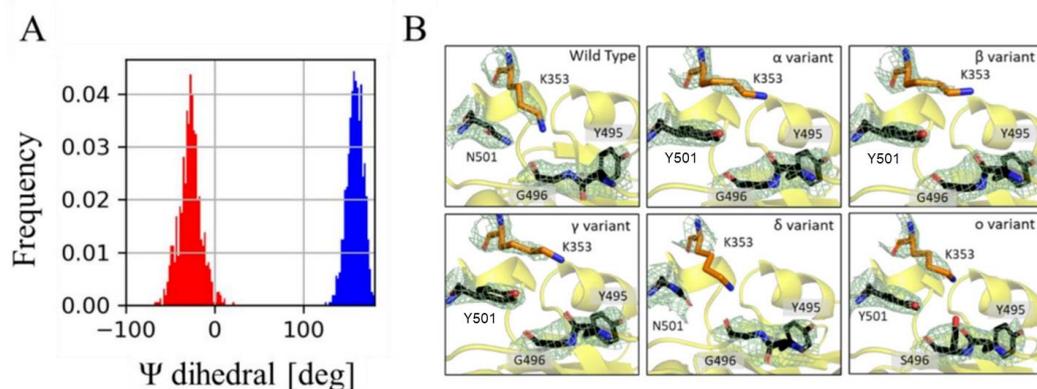
Para las otras variantes de preocupación ya se ha reportado la importancia del apilamiento hidrofóbico entre los anillos aromáticos de los residuos Y501 y Y41, y, también, cómo ello compensa la pérdida de la interacción polar entre K353 y N501. Sin embargo, no se había discutido hasta el momento la sustitución de la interacción entre K353 y G496 por el puente de hidrógeno formado entre K353 con Y495. Debido a esta nueva interacción polar, la cadena principal de Y495 se ve obligada a adoptar una configuración *cis*, un hallazgo reportado por primera vez en nuestro trabajo (Figura 5). Sumado a esto, es interesante el hecho de que la configuración *cis* de Y495 se encuentre interactuando con el *loop 2* (*loop* esencial para el reconocimiento y unión de la proteína *spike*) y, además, esta configuración solo esté presente en las variantes alfa, beta, gamma y omicrón, las cuales contienen la mutación N501Y (tabla suplementaria) (P. Han et al., 2021, 2022; Y. Han et al., 2021; Kim et al., 2021; Koehler et al., 2021; Lan et al., 2020; Socher et al., 2021; Tian et al., 2021). Con estos resultados en conjunto, en el artículo establecemos la

hipótesis de que la configuración cis de Y495 se debe a la presencia de Y501, lo cual mejora la habilidad de la proteína *spike* para anclarse al receptor hACE-2.

Figura 5

La mutación N501Y induce una configuración cis en la cadena principal de Y495.

(A) Histogramas del ángulo diedro ψ de Y495 en las simulaciones de la proteína *spike* WT (azul) y la variante gamma (roja). (B) Mapas de densidad de electrones 2Fo-Fc alrededor de Y495 para los complejos cristalográficos WT y de las cinco VoC's (códigos PDB: 6MOJ, 7EKF, 7EKG, 7EKC, 7WBQ y 7WBP). La densidad de electrones, contorneada en $1,5\sigma$ (malla verde pálido), se muestra alrededor de los residuos Y495, G(S)496 y N(Y)501 de la proteína *spike* (barras negras) y el residuo K353 del receptor hACE2 (barras naranjas).

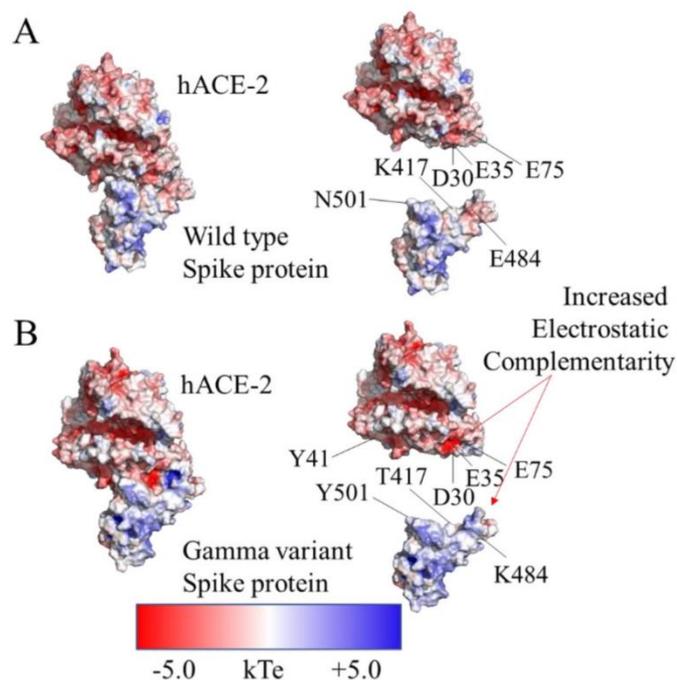


La mutación E484K en la variante gamma fue reportada “de preocupación” debido a ensayos experimentales que demostraron una fuerte capacidad para evadir al sistema inmune humoral, además de mejorar la transmisibilidad. A fin de estudiar el efecto de esta mutación, se utilizó la herramienta APBS para hacer un análisis electrostático. Mediante esta técnica, se observó que la región comprendida entre los residuos 470-490, cargada negativamente, se potenció por la mutación E484K

incrementando la afinidad por las cadenas laterales de los residuos E35 y E75 del receptor hACE-2 (Figura 6). Este resultado, sumado a la pérdida del puente salino con la mutación K417T, parece indicar que una compensación energética podría estar ocurriendo entre ambas mutaciones. Para confirmar las hipótesis que se generaron a partir del análisis de las simulaciones, se hizo un análisis termodinámico para confirmar el efecto de las mutaciones sobre la afinidad por el complejo con hACE-2.

Figura 6

Aspectos estructurales destacados de la mutación E484K. Análisis electrostático APBS para ambos complejos: (A) WT y (B) variante gamma. Se destaca la complementariedad electrostática debido a la mutación E484K con los residuos E35 y E75 del receptor hACE-2.



2.3 Análisis termodinámico

En estudios previos ya se habían reportado predicciones de afinidad de unión para la variante alfa (Forouzesh & Mishra, 2021; Y. Han et al., 2021; Shah et al., 2020). Para este trabajo, se utilizó el método de MM-PBSA modificado para amortiguar el factor electrostático, con la finalidad de medir el efecto de las mutaciones sobre la afinidad de unión. El resultado fue un valor entálpico global de $\Delta\Delta H = -7.49 \text{ kcal/mol}$. El cálculo de la diferencia de la entropía de interacción dio como resultado $-T\Delta\Delta S = -3.16 \text{ kcal/mol}$, siendo la entalpía el factor dominante en la formación del complejo. A partir de los cálculos de entalpía y entropía de interacción, se obtuvo el cambio en la energía libre de interacción $\Delta\Delta G = -10.67 \text{ kcal/mol}$, el cual va de acorde con los cambios de afinidad experimentales previamente reportados ($\Delta G = -RT\ln(K_D)$; $\Delta G_{exp,WT} = -10.40 \text{ kcal/mol}$ y $\Delta G_{exp,gamma} = -11.39 \text{ kcal/mol}$) y resulta en una leve ganancia a favor de la variante gamma ($\Delta G_{WT} = -26.43 \pm 24.68 \text{ kcal/mol}$ y $\Delta G_{gamma} = -37.10 \pm 23.50 \text{ kcal/mol}$) (Tabla 1). En un análisis detallado de las contribuciones entálpicas se observó que las principales diferencias energéticas entre ambas variantes se dan en los componentes electrostático y polar, favoreciendo en ambos casos a la variante gamma ($\Delta\Delta E_{elec} = 32.67 \text{ kcal/mol}$ y $\Delta\Delta G_{pol} = -45.34 \text{ kcal/mol}$).

Tabla 1. Resultados resumidos de MM-PBSA para el complejo WT y el complejo de la variante gamma de SARS-CoV-2. Los valores corresponden a la media y el error estándar.

	Wild Type [kcal/mol]	Gamma Variant [kcal/mol]
ΔE_{elec}	-102.84 ± 13.36	-70.17 ± 8.50
$\Delta G_{\text{non pol}}$	-11.92 ± 0.79	-10.99 ± 0.85
ΔG_{pol}	159.86 ± 19.70	114.52 ± 21.11
ΔE_{vdw}	-100.98 ± 6.16	-96.73 ± 5.59
ΔH	-55.88 ± 22.15	-63.37 ± 20.59
$-T\Delta S$	29.45 ± 0.56	26.27 ± 1.47
ΔG	-26.43 ± 24.68	-37.10 ± 23.50
ΔG_{exp}	-10.40	-11.39

A partir de los resultados globales, el efecto individual de las mutaciones se estudió desglosando la entalpía y la entropía de interacción ($T\Delta\Delta S_k = T\Delta S_{k,\text{gamma}} - T\Delta S_{k,\text{WT}}$) para calcular el $\Delta\Delta G$; con la finalidad de comparar los valores entre el complejo de la variante gamma y el complejo WT. Con ello se logró observar la compensación energética esperada entre las mutaciones K417T ($\Delta\Delta G = 2.32 \text{ kcal/mol}$) y E484K ($\Delta\Delta G = -3.32 \text{ kcal/mol}$). Con la mutación N501Y no se vieron grandes cambios en cuanto a la energía libre de interacción ($\Delta\Delta G = 0.52 \text{ kcal/mol}$); sin embargo, el rearrreglo que ocurre debido a la ganancia y pérdida de interacciones influye sobre las contribuciones polares y apolares de los residuos circundantes. El cambio de configuración estereoquímica sobre el residuo

Y495, publicado por primera vez en el presente trabajo, es de suma importancia debido a que ocurre bajo la influencia de la mutación N501Y y debido a que permite mantener el anclaje del RBD con el receptor. Todo ello visto desde el punto de vista inmunológico, afecta en gran medida al reconocimiento del sistema inmune humoral y celular, así como también, a la efectividad de drogas antivirales que inhiban la adhesión viral.

A partir de los resultados del análisis termodinámico, podemos afirmar que las mutaciones no tienen un gran efecto sobre la transmisibilidad. Empero, en la literatura sumado a los hallazgos previamente descritos, hay suficiente evidencia como para describir el efecto de las mutaciones en la pérdida de interacción con anticuerpos neutralizantes (Greaney et al., 2021; Wang et al., 2021). En la variante gamma, la mutación E484K no permite una interacción con los anticuerpos monoclonales Casirivimab (Regeneron) y Ly-CoV555 (Lilly) debido a la repulsión de cargas con la región hipervariable (Jones et al., 2021). Asimismo, la mutación K417T impide la formación de un puente salino con el residuo E99 del anticuerpo monoclonal LY-CoV16 (Lilly), el cual compite con D30 para bloquear la unión al receptor hACE-2 (Starr et al., 2021).

Con relación a las vacunas contra COVID, se ha vacunado por encima del 75% de la población mundial de acuerdo con los últimos reportes de la OMS (Ciotti et al., 2021; Fiolet et al., 2021; Luchsinger & Hillyer, 2021). Sin embargo, el virus sigue evolucionando en nuevas subvariantes de omicrón con diferentes mecanismos de evasión.

Desde el inicio de la pandemia de COVID-19, las variantes han coexistido por poco tiempo siendo en su mayoría predominantes sobre sus predecesoras. Teniendo en cuenta la precisión de las mutaciones sobre la evasión inmunológica y la transmisibilidad, es difícil inferir cuál va a ser el siguiente paso evolutivo. Sin embargo, con los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, es válido afirmar que el mecanismo compensatorio (también llamado epistasis intramolecular) le va a permitir al virus prevalecer por un largo tiempo.

III. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La variante gamma ya se encontraba fuera de circulación para el momento de la publicación; sin embargo, la metodología empleada en el artículo y los hallazgos son extrapolables a las variantes futuras. Así mismo, estos métodos pueden ser utilizados como estudios preliminares para predecir el efecto de una vacuna o de moléculas farmacológicas, no solo sobre la proteína *spike* de SARS-CoV-2, sino sobre cualquier otra proteína.

Con respecto a las mutaciones K417T y E484K, para las cuales se observó una compensación en la energía libre de interacción (se puede visualizar en el APÉNDICE A), estas aparentan estar bajo un fenómeno llamado “epistasia intramolecular” (Miton et al., 2021). Este fenómeno podría ser clave para entender el proceso de evolución del virus.

Sumado a ello, la importancia de la mutación N501Y (Tian et al., 2021) sobre la configuración estereoquímica del residuo Y495 nos lleva a pensar que, si bien los cambios en la transmisibilidad no son significativos al momento de comparar las variables, la evasión inmunológica es posible debido a la pérdida de interacciones y a los cambios en la configuración de los residuos circundantes. Bajo esta hipótesis también se encuentra el residuo V445 de la variante omicrón, el cual parece ser importante para explicar las reinfecciones que se vienen dando por las nuevas subvariantes del mismo clado.

IV. COMENTARIOS FINALES

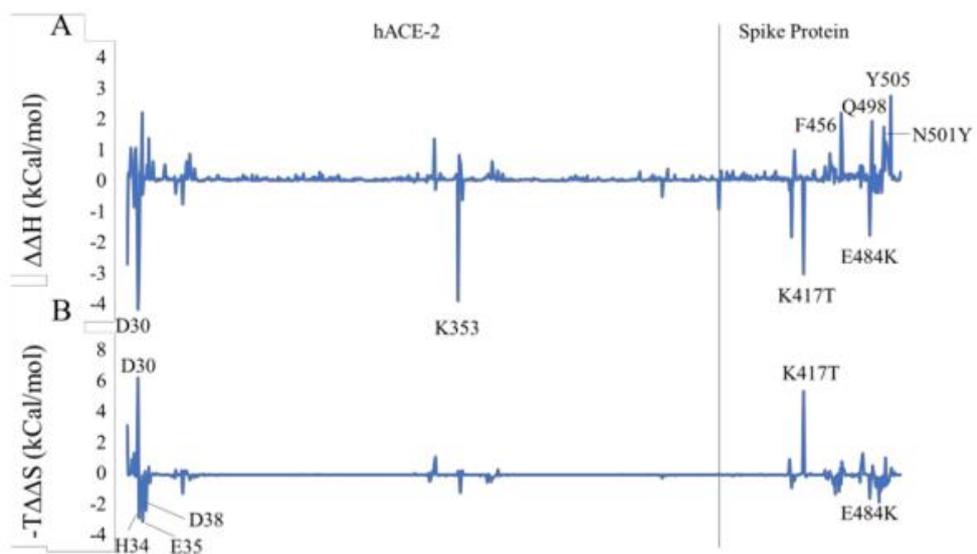
Dadas estas conclusiones, es válida la pregunta: ¿estamos ante un nuevo mecanismo de evolución? En respuesta a ello, hacen falta más estudios estructurales serios, sin dejar de lado el diagnóstico y la vigilancia genómica, con el objetivo de vislumbrar el efecto de las mutaciones sobre la función y los parámetros epidemiológicos.

Los hallazgos de este trabajo, para la investigación del proceso evolutivo de SARS-CoV-2, son de vital importancia. Además, es importante afirmar que el análisis estructural de la dinámica de las variantes de SARS-CoV-2 es tan o más importante que los ensayos en “*wet lab*” para mejorar el diseño de vacunas e inferir sobre el efecto de las variantes venideras, y con ello estar preparados para afrontar futuros coronavirus.

Con respecto al fenómeno de epistasis intramolecular, la interacción distante entre dos aminoácidos de una misma proteína en un proceso evolutivo sigue siendo un misterio sin resolver.

V. APÉNDICES

APÉNDICE A. Contribución específica por residuo de los resultados de MM-PBSA y entropía de interacción. A) $\Delta\Delta H$ (entalpía de interacción) para los complejos WT y Gamma. B) $-T\Delta\Delta S$ (entropía de interacción) para los complejos WT y Gamma.



VI. DATA DISPONIBLE

Las trayectorias de dinámica molecular pueden ser descargadas a través del link:

<https://drive.google.com/drive/folders/1qBof9FMPQwkm0cneBVIcywy2zKz>

[W3BR7?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1qBof9FMPQwkm0cneBVIcywy2zKz). El código para computar la contribución El código para

calcular la contribución de entropía de interacción relativa de residuos de un archivo

de energía de interacción descompuesta de residuos generado con g_mmpbsa se

puede encontrar en el siguiente link: <https://github.com/marciniega/rriec>.

VII. FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de los *grants* PAPIIT-DGAPA-IN213320 y LANCAD-UNAMDGTIC-320.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A, S., & C, N. (2020). Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sciences*, 257. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118056>
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10037–10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>
- Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2014). The Protein Data Bank archive as an open data resource. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 28(10), 1009–1014. <https://doi.org/10.1007/s10822-014-9770-y>
- Choi, J. Y., & Smith, D. M. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Medical Journal*, 62(11), 961. <https://doi.org/10.3349/YMJ.2021.62.11.961>
- Ciotti, M., Ciccozzi, M., Pieri, M., & Bernardini, S. (2021). The COVID-19 pandemic: viral variants and vaccine efficacy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. <https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1979462>
- Dejnirattisai, W., Zhou, D., Ren, J., Stuart, D. I., & Sreaton Correspondence, G. R. (2021). *Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.055>
- Dejnirattisai, W., Zhou, D., Supasa, P., Liu, C., Mentzer, A. J., Ginn, H. M., Zhao, Y., Duyvesteyn, H. M. E., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Wang, B., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Walter, T. S., Skelly, D., Clemens, S. A. C., Naveca, F. G., Nascimento, V., Nascimento, F., ... Sreaton, G. R. (2021).

- Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell*, 184(11), 2939-2954.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.03.055>
- DeLano, W. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 700.
- Donald, J. E., Kulp, D. W., & DeGrado, W. F. (2011). Salt bridges: Geometrically specific, designable interactions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(3), 898–915. <https://doi.org/10.1002/PROT.22927>
- Duan, L., Feng, G., Wang, X., Wang, L., & Zhang, Q. (2017). Effect of electrostatic polarization and bridging water on CDK2–ligand binding affinities calculated using a highly efficient interaction entropy method. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(15), 10140–10152. <https://doi.org/10.1039/C7CP00841D>
- Duan, L., Liu, X., & Zhang, J. Z. H. (2016). Interaction entropy: A new paradigm for highly efficient and reliable computation of protein-ligand binding free energy. *Journal of the American Chemical Society*, 138(17), 5722–5728. https://doi.org/10.1021/JACS.6B02682/SUPPL_FILE/JA6B02682_SI_001.PDF
- Elbe, S., & Buckland-Merrett, G. (2017). Data, disease and diplomacy: GISAID’s innovative contribution to global health. *Global Challenges*, 1(1), 33–46. <https://doi.org/10.1002/gch2.1018>
- Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., Claro, I. M., Candido, D. da S., Mishra, S., Crispim, M. A. E., Sales, F. C., Hawryluk, I., McCrone, J. T., Hulswit, R. J. G., Franco, L. A. M., Ramundo, M. S., de Jesus, J. G., Andrade, P. S., Coletti, T. M., Ferreira, G. M., Silva, C. A. M., Manuli, E. R., Sabino, E. C. (2021). Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil.

MedRxiv : The Preprint Server for Health Sciences.

<https://doi.org/10.1101/2021.02.26.21252554>

Fiolet, T., Kherabi, Y., MacDonald, C.-J., Ghosn, J., & Peiffer-Smadja, N. (2021).

Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: A narrative review.

Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

<https://doi.org/10.1016/J.CMI.2021.10.005>

Forouzesh, N., & Mishra, N. (2021). An effective MM/GBSA protocol for absolute

binding free energy calculations: A case study on SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor. *Molecules*, 26(8).

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26082383>

Greaney, A. J., Starr, T. N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Binshtein, E., Loes, A. N.,

Hilton, S. K., Huddleston, J., Eguia, R., Crawford, K. H. D., Dingens, A. S.,

Nargi, R. S., Sutton, R. E., Suryadevara, N., Rothlauf, P. W., Liu, Z., Whelan,

S. P. J., Carnahan, R. H., Crowe, J. E., & Bloom, J. D. (2021). Complete

Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition. *Cell Host & Microbe*, 29(1), 44.

<https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2020.11.007>

Han, P., Li, L., Liu, S., Wang, Q., Zhang, D., Xu, Z., Han, P., Li, X., Peng, Q., Su,

C., Huang, B., Li, D., Zhang, R., Tian, M., Fu, L., Gao, Y., Zhao, X., Liu, K.,

Qi, J., ... Wang, P. (2022). Receptor binding and complex structures of human

ACE2 to spike RBD from omicron and delta SARS-CoV-2. *Cell*, 185(4), 630-

640.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.01.001>

- Han, P., Su, C., Zhang, Y., Bai, C., Zheng, A., Qiao, C., Wang, Q., Niu, S., Chen, Q., Zhang, Y., Li, W., Liao, H., Li, J., Zhang, Z., Cho, H., Yang, M., Rong, X., Hu, Y., Huang, N., ... Qi, J. (2021). Molecular insights into receptor binding of recent emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-26401-W>
- Han, Y., Wang, Z., Wei, Z., Schapiro, I., & Li, J. (2021). Binding affinity and mechanisms of SARS-CoV-2 variants. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 4184. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2021.07.026>
- Huang, K., Luo, S., Cong, Y., Zhong, S., Zhang, J. Z. H., & Duan, L. (2020). An accurate free energy estimator: based on MM/PBSA combined with interaction entropy for protein–ligand binding affinity. *Nanoscale*, *12*(19), 10737–10750. <https://doi.org/10.1039/C9NR10638C>
- Jones, B. E., Brown-Augsburger, P. L., Corbett, K. S., Westendorf, K., Davies, J., Cujec, T. P., Wiethoff, C. M., Blackbourne, J. L., Heinz, B. A., Foster, D., Higgs, R. E., Balasubramaniam, D., Wang, L., Zhang, Y., Yang, E. S., Bidshahri, R., Kraft, L., Hwang, Y., Žentelis, S., ... Falconer, E. (2021). The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates. *Science Translational Medicine*, *13*(593), 1906. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABF1906>
- Kim, S., Liu, Y., Lei, Z., Dicker, J., Cao, Y., Zhang, X. F., & Im, W. (2021). Differential Interactions between Human ACE2 and Spike RBD of SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *17*(12), 7972–7979. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.1C00965/SUPPL_FILE/CT1C00965_SI_001.PDF

- Koehler, M., Ray, A., Moreira, R. A., Juniku, B., Poma, A. B., & Alsteens, D. (2021). Molecular insights into receptor binding energetics and neutralization of SARS-CoV-2 variants. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27325-1>
- Kumari, R., Kumar, R., & Lynn, A. (2014). G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>
- L, G. (2021). Human SARS CoV-2 spike protein mutations. *Proteins*, 89(5), 569–576. <https://doi.org/10.1002/PROT.26042>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2180-5>
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, 78(8), 1950–1958. <https://doi.org/10.1002/PROT.22711>
- Luchsinger, L. L., & Hillyer, C. D. (2021). Vaccine efficacy probable against COVID-19 variants. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6534), 1116. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABG9461>
- Miton, C. M., Buda, K., & Tokuriki, N. (2021). Epistasis and intramolecular networks in protein evolution. *Current Opinion in Structural Biology*, 69, 160–168. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2021.04.007>
- Rees-Spear, C., Muir, L., Griffith, S. A., Heaney, J., Aldon, Y., Snitselaar, J. L., Thomas, P., Graham, C., Seow, J., Lee, N., Rosa, A., Roustan, C., Houlihan, C.

- F., Sanders, R. W., Gupta, R. K., Cherepanov, P., Stauss, H. J., Nastouli, E., SAFER Investigators, ... McCoy, L. E. (2021). The effect of spike mutations on SARS-CoV-2 neutralization. *Cell Reports*, 108890. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108890>
- Sabino, E. C., Buss, L. F., Carvalho, M. P. S., Prete, C. A., Crispim, M. A. E., Fraiji, N. A., Pereira, R. H. M., Parag, K. v., da Silva Peixoto, P., Kraemer, M. U. G., Oikawa, M. K., Salomon, T., Cucunuba, Z. M., Castro, M. C., de Souza Santos, A. A., Nascimento, V. H., Pereira, H. S., Ferguson, N. M., Pybus, O. G., ... Faria, N. R. (2021). Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *The Lancet*, 397(10273), 452–455. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00183-5)
- Shah, M., Ahmad, B., Choi, S., & Woo, H. G. (2020). Mutations in the SARS-CoV-2 spike RBD are responsible for stronger ACE2 binding and poor anti-SARS-CoV mAbs cross-neutralization. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3402–3414. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.11.002>
- Sheng, Y. J., Yin, Y. W., Ma, Y. Q., & Ding, H. M. (2021). Improving the Performance of MM/PBSA in Protein-Protein Interactions via the Screening Electrostatic Energy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(5), 2454–2462. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.1C00410/SUPPL_FILE/CI1C00410_SI_002.ZIP
- Shu, Y., & McCauley, J. (2017). GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Eurosurveillance*, 22(13), 30494. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494>

- Socher, E., Conrad, M., Heger, L., Paulsen, F., Sticht, H., Zunke, F., & Arnold, P. (2021). Computational decomposition reveals reshaping of the SARS-CoV-2–ACE2 interface among viral variants expressing the N501Y mutation. *Journal of Cellular Biochemistry*, *122*(12), 1863–1872. <https://doi.org/10.1002/JCB.30142>
- Starr, T. N., Greaney, A. J., Dingens, A. S., & Bloom, J. D. (2021). Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *Cell Reports Medicine*, *2*(4). <https://doi.org/10.1016/J.XCRM.2021.100255>
- Sun, Z., Yan, Y. N., Yang, M., & Zhang, J. Z. H. (2017). Interaction entropy for protein-protein binding. *The Journal of Chemical Physics*, *146*(12). <https://doi.org/10.1063/1.4978893>
- Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., Dong, X., & Zheng, P. (2021). N501y mutation of spike protein in sars-cov-2 strengthens its binding to receptor ace2. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.69091>
- Tracking SARS-CoV-2 variants*. (n.d.). Retrieved August 14, 2021, from <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- Wang, P., Wang, M., Yu, J., Cerutti, G., Nair, M. S., Huang, Y., Kwong, P. D., Shapiro, L., & Ho, D. D. (2021). Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.01.433466>

Zhou, D., Dejnirattisai, W., Supasa, P., Liu, C., Mentzer, A. J., Ginn, H. M., Zhao, Y., Duyvesteyn, H. M. E., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Wang, B., Paesen, G. C., Lopez-Camacho, C., Slon-Campos, J., Hallis, B., Coombes, N., Bewley, K., Charlton, S., Walter, T. S., ... Sreaton, G. R. (2021). Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*, *184*(9), 2348. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.02.037>