

Métodos de *Docking* Receptor-Ligante (Portal DockThor)

CAMILA MAGALHÃES - camilasm@ufrrj.br

ISABELLA ALVIM - isabella@lncc.br

LAURENT DARDENNE - dardenne@lncc.br

Informações:

Login: Evento EMMSB

Senha: emmsb

Comandos Básicos do Linux:

cd diretório/	Entra na pasta diretório/
ls diretório/	Lista as subpastas e arquivos existentes em diretório/
cd ..	Retorna para a pasta anterior
mkdir diretório/	Cria a pasta diretório/
rm arquivo.txt	Remove arquivo.txt (.txt ou outro formato de arquivo)
rmdir diretório/	Remove a pasta diretório/
cp diretório1/arquivo.txt diretório2/	Copia arquivo.txt no diretório1/ para diretório2/

* Neste curso os arquivos de entrada dos complexos já estão salvos nas respectivas pastas.

Dia 1 - Preparação dos Arquivos e *redocking* do Complexo 1CAQ

1. Download dos arquivos da proteína e do ligante

1.1 Buscar o arquivo com as coordenadas tridimensionais (.pdb) do complexo no *Protein DataBank*: www.pdb.org. No campo de busca em branco, digitar o código do complexo

1CAQ e clicar em .

1.2 As informações sobre o complexo serão carregadas na página. Analisar a presença de ligantes e cofatores, número de cadeias e outras informações relevantes (organismo de origem, resolução do cristal...).

1.3 Fazer o download do arquivo do complexo (**Download Files** → **PDB File (Text)**) para sua pasta pessoal¹.

1.4 Clique no código do ligante **DPS** para carregar a página contendo informações específicas sobre este composto. É possível fazer o download da estrutura 3D do ligante em sua conformação presente no cristal (de referência) ou a ideal, conformação mais estável do ligante no vácuo (**Download Files** → **Structure Data File**). A conformação ideal é calculada pelos programas Corina e OpenEye Omega. Neste tutorial será feito o *redocking*, então será usada a conformação do ligante presente no cristal.

1.5 Entre no diretório /home/viiemmsb_turmaX/1caq/. Analise a estrutura tridimensional do complexo no visualizador Pymol:

```
pymol 1caq_complex.pdb &
```

Inicialmente o complexo é carregado na visualização de linhas, e os átomos de oxigênio das moléculas de água são representados por **x**. Visualize as estruturas secundárias da proteína (**S** → **Cartoon**). No Pymol, é possível visualizar rapidamente as interações existentes entre ligantes e proteína. Carregue essa visualização e analise algumas interações (**A** → **Preset** → **Ligand Sites** → **Cartoon**). Com isso, apenas os resíduos da proteína que interagem com o ligante são representados como linhas. Todos os outros só são representados por *cartoon*. Automaticamente são calculadas as ligações de hidrogênio formadas entre a proteína, o ligante e moléculas de água no sítio ativo. Após analisar as interações, feche o programa.

1.6 Analisar o arquivo texto (.pdb) do complexo em um editor de texto. Digite no terminal:

```
gedit 1caq_complex.pdb &
```

Observe os comentários e as informações existentes no arquivo. As linhas do arquivo que iniciam com ATOM se referem a cada átomo da proteína. As linhas que

¹ O arquivo já foi baixado (1caq_complex.pdb) no diretório /home/viiemmsb_turmaX/1caq/.

iniciam com HETATM se referem aos átomos de ligantes (cofatores, inibidores, íons) e a moléculas de água (sempre nomeadas como HOH). A seguir a descrição de cada campo do arquivo PDB:

COLUMNS	DATA TYPE	CONTENTS
1 - 6	Record name	"ATOM "
7 - 11	Integer	Atom serial number.
13 - 16	Atom	Atom name.
17	Character	Alternate location indicator.
18 - 20	Residue name	Residue name.
22	Character	Chain identifier.
23 - 26	Integer	Residue sequence number.
27	AChar	Code for insertion of residues.
31 - 38	Real(8.3)	Orthogonal coordinates for X in Angstroms.
39 - 46	Real(8.3)	Orthogonal coordinates for Y in Angstroms.
47 - 54	Real(8.3)	Orthogonal coordinates for Z in Angstroms.
55 - 60	Real(6.2)	Occupancy.
61 - 66	Real(6.2)	Temperature factor (Default = 0.0).
73 - 76	LString(4)	Segment identifier, left-justified.
77 - 78	LString(2)	Element symbol, right-justified.
79 - 80	LString(2)	Charge on the atom.

Exemplo:

	1	2	3	4	5	6	7	8
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890								
ATOM	1	N	PHE A 83	7.420	9.645	6.321	1.00 24.99	N
ATOM	2	CA	PHE A 83	6.998	9.981	7.688	1.00 24.76	C
ATOM	3	C	PHE A 83	5.796	9.148	8.040	1.00 26.66	C
ATOM	4	O	PHE A 83	5.134	8.602	7.164	1.00 27.76	O
ATOM	5	CB	PHE A 83	6.764	11.500	7.894	1.00 22.63	C
ATOM	6	CG	PHE A 83	5.518	12.037	7.214	1.00 24.59	C
ATOM	7	CD1	PHE A 83	4.267	11.969	7.876	1.00 24.47	C
ATOM	8	CD2	PHE A 83	5.614	12.615	5.930	1.00 24.18	C
ATOM	9	CE1	PHE A 83	3.105	12.454	7.244	1.00 23.55	C
ATOM	10	CE2	PHE A 83	4.453	13.098	5.300	1.00 24.15	C
ATOM	11	CZ	PHE A 83	3.207	13.002	5.956	1.00 23.01	C
ATOM	12	N	ARG A 84	5.555	9.079	9.360	1.00 26.60	N
ATOM	13	CA	ARG A 84	4.435	8.331	9.889	1.00 25.51	C
ATOM	14	C	ARG A 84	3.869	9.093	11.064	1.00 23.64	C
ATOM	15	O	ARG A 84	4.587	9.706	11.834	1.00 22.62	O
ATOM	16	CB	ARG A 84	4.933	6.933	10.235	1.00 29.89	C
ATOM	17	CG	ARG A 84	3.837	5.975	10.651	1.00 40.15	C
ATOM	18	CD	ARG A 84	4.295	4.520	10.795	1.00 48.11	C
ATOM	19	NE	ARG A 84	3.180	3.669	11.252	1.00 53.85	N
ATOM	20	CZ	ARG A 84	3.346	2.344	11.546	1.00 56.00	C
ATOM	21	NH1	ARG A 84	4.544	1.756	11.468	1.00 56.44	N
ATOM	22	NH2	ARG A 84	2.292	1.614	11.927	1.00 56.02	N

1.7 Para calibrar os parâmetros para o *docking* devemos primeiro fazer um *redocking* com a estrutura do ligante na conformação que ele se encontra complexado com a proteína. Por isso, precisamos retirar o ligante diretamente do arquivo do complexo no formato PDB.

1.7.1 Copie o arquivo 1caq_complex.pdb para outro arquivo 1caq_ligand.pdb:

```
cat 1caq_complex.pdb > 1caq_ligand.pdb
```

1.7.2 Abra o arquivo 1caq_ligand.pdb num editor de texto:

```
gedit 1caq_ligand.pdb &
```

1.7.3 Remova todas as linhas, exceto as que iniciam com HETATM e que sejam referentes ao ligante DPS (apague também as linhas que se referem às moléculas de água). Salve o arquivo do ligante.

1.7.4 Faça o mesmo para gerar o arquivo dos cofatores separadamente:

```
cat 1caq_complex.pdb > 1caq_metal1.pdb  
cat 1caq_complex.pdb > 1caq_metal2.pdb
```

1.7.5 Remova todas as linhas, exceto as que iniciam com HETATM e que sejam referentes ao metal ZN (apague também as linhas que se referem às moléculas de água). Salve os arquivos dos cofatores.

2. Preparação da proteína

2.1 Os arquivos provenientes do PDB não são perfeitos. Além de não possuírem átomos de hidrogênio, podem ter átomos faltando. Nesta etapa, vamos preparar os arquivos da proteína usando o programa **pdbthorbox** (*Docking -> Protein*).

2.2 Submeta o arquivo do complexo 1CAQ.

2.3 Prepare o arquivo da proteína (*Prepare*). Nesta etapa os átomos de hidrogênio são adicionados de acordo com o estado de protonação padrão dos resíduos de aminoácidos

em pH neutro: Asp e Glu carregados negativamente, Lys e Arg carregadas positivamente e His neutra (NE2).

Atenção: o programa **pdbthorbox** remove automaticamente os ligantes, cofatores e água, além de completar as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos que possuem átomos faltando.

2.4 Altere a protonação das His-119, His-123 e His-129 para o tipo HISD (histidina neutra com hidrogênio em ND1). Expanda a caixa de opções *Residue Protonation Options* e altere os estados de protonação destes resíduos na cadeia A.

2.5 Clique em *Reprepare* para recalcular as cargas parciais e os tipos de átomos de acordo com o novo estado de protonação dos resíduos.

2.6 Faça download dos arquivos preparados (*Download*).

2.7 Analise os arquivos gerados.

Arquivos	Descrição
resumo.out	Contém informações sobre a preparação da proteína.
*.in	Coordenadas atômicas, cargas parciais e tipo dos átomos da proteína.
*_prep.pdb	Proteína preparada no formato PDB (sem HETATM).
*.A	Gerado por cadeia (identificada na extensão do arquivo), possui os tipos de resíduos de aminoácidos da proteína e é utilizado para alterar os estados de protonação.

2.8 Abra o arquivo da proteína preparada no Pymol e analise as alterações que foram realizadas.

```
pymol lcaq_complex_prep.pdb &
```

2.9 Clique em *Next* para armazenar a estrutura da proteína preparada e prosseguir para a etapa de preparação do ligante.

3. Preparação do ligante

3.1 Carregue o arquivo do ligante (*Upload*).

3.2 Visualize a estrutura antes de realizar a preparação (*View 3D*).

3.3 Habilite a opção de adicionar os átomos de hidrogênios e prepare a estrutura do ligante (marque a caixa *Add hydrogens* e clique em *Prepare*). A opção para adicionar automaticamente os átomos de hidrogênio mantém os já existentes e adiciona outros para completar as valências dos átomos. Esta opção deve ser usada com atenção caso a estrutura do ligante esteja com algum estado de protonação pré-definido.

3.4 Visualize a estrutura do ligante preparada (*View 3D*).

3.5 Expanda a opção *Rotatable bonds* para verificar todas as ligações rotacionáveis que serão consideradas como flexíveis durante o *docking*.

3.6 Visualize na estrutura tridimensional do ligante quais são essas ligações (*View 3D*). Altere as etiquetas no visualizador JSMol para mostrar o número dos átomos. Neste experimento todas as ligações rotacionáveis serão consideradas flexíveis.

3.7 Faça o *download* dos arquivos resultantes da preparação do ligante (*Download prepared files*).

3.8 Analise os arquivos gerados e abra o arquivo *new_ligand.pdb* no Pymol.

Arquivos	Descrição
*.pdb	Arquivo original do ligante.
*.pdb.top	Possui as coordenadas internas, cargas parciais, tipos de átomos e outras informações do ligante. Será usado para o <i>docking</i> .
new_*.pdb	Arquivo do mesmo formato do original contendo o ligante preparado. Este arquivo só é gerado quando se usa a opção para adicionar hidrogênios.

3.9 Prossiga para a etapa de preparação dos arquivos dos cofatores (*Next*).

4. Preparação do metal

4.1 Prepare os arquivos de cofatores 1caq_metal1.pdb e 1caq_metal2.pdb (*Docking->Cofactor*). Os arquivos de cofatores também são preparados com o programa **mmffligand**. Marque a opção para adicionar átomos de hidrogênio caso seja necessário.

4.2 Faça o *download* dos arquivos e analise-os.

Atenção: é importante clicar em *Next* mesmo que não haja arquivos de cofatores para serem preparados – é esta opção que envia para a página de *docking* os arquivos finais de cada etapa de preparação.

5. Redocking

5.1 Já com os arquivos da proteína e do ligante preparados, podemos executar o *redocking* usando o programa **DockThor**. Na aba *DockThor* todos os principais parâmetros necessários para o *docking* estão disponíveis para serem modificados pelo usuário.

5.2 O centro de coordenadas da grade para o *docking* deve ser pré-definido pelo usuário, assim como suas dimensões. Para este experimento utilizaremos o centro da grade **X: 16 Y: 6 Z: 20**, com 11Å em cada eixo e discretização de 0.25Å, totalizando uma grade de 22Å em cada dimensão (x, y, z) e 704.969 pontos.

5.3 Visualize a grade de energia sobreposta com a proteína (*View Grid in 3D*).

5.4 Expanda a caixa de opções avançadas para visualizar os parâmetros relativos ao algoritmo genético (*Genetic Algorithm (GA) Parameters Settings*). Utilizaremos os valores padrão do algoritmo genético.

5.5 Clique em *Next* para submeter o experimento de *docking*.

6. Análise dos Resultados

6.1 No momento em que terminar a execução do *docking* o usuário recebe um e-mail com o endereço *web* para analisar e fazer o download dos resultados.

6.2 Entre no *link* abaixo para analisar os resultados²:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1caq_ligand_q4ob77
```

6.3 Selecione a opção para analisar os resultados pela energia total (energia de interação + energia interna do ligante).

6.4 Observe os parâmetros da análise dos resultados que podem ser modificados (expanda a caixa *Result Settings*). Mantenha os valores padrão.

6.5 Carregue o arquivo original do ligante (1caq_ligand.pdb) para comparar os modos de ligação encontrados pelo *docking* e a conformação observada experimentalmente.

6.6 Clique em *Analyse* para executar o programa **dtstatistic** e analisar automaticamente os resultados.

6.7 Analise interativamente os resultados de *docking* ainda na página clicando em *View results interactively*.

6.8 Faça o *download* e analise os arquivos gerados pelo programa **dockthor**.

Arquivos	Descrição
dockthor.out	Armazena todo o log do programa, incluindo o tempo de execução.
parameters.txt	Arquivo dos parâmetros utilizados no <i>docking</i> .
*_diedral.inf	Possui as informações dos diedros do ligante de acordo com os parâmetros definidos no arquivo de topologia .top.
*_run_X.pdb	Soluções líderes de cada <i>cluster</i> obtido na execução X.
*_run_X.log	Resumo das energias dos líderes de cada <i>cluster</i> da execução X.
*.top	Arquivo de topologia do ligante preparado.
*.in	Arquivo da proteína preparada utilizada no <i>docking</i> .
reference_*.format	Arquivo do ligante de referência utilizado para o cálculo do RMSD (<i>format</i> corresponde ao formato do arquivo – <i>pdb</i> , <i>mol2</i> ...).
results.out	Arquivo de log do programa dtstatistic.
success_*.log	Taxas de sucesso com relação à energia e RMSD (arquivo gerado

² **Atenção:** os resultados de *docking* ficam disponíveis para acesso no portal e *download* por 20 dias a partir da data de submissão. Todos os arquivos são excluídos após este período.

	apenas se for utilizado um ligante de referência – <i>redocking</i>).
out.mol2	Soluções líderes de cada <i>cluster</i> dentre todas as execuções do AG.
out.log	Resumo das energias dos líderes de cada <i>cluster</i> .

Dia 2 – Alterando os parâmetros do *docking* – 1HXW

Nosso objetivo é realizar o *docking* do ligante ritonavir, um inibidor altamente flexível da proteína HIV-1 protease, testando diferentes protocolos, alterando principalmente: o número de ligações rotacionáveis do ligante e alguns parâmetros do algoritmo genético.

7. Ligações rotacionáveis do ligante

7.1 Abra os arquivos *1HXW_protein.pdb* e *1hxb_ligand.pdb* com o Pymol para visualizar o ligante e a proteína.

7.2 Prepare o arquivo da proteína (*1HXW_protein.pdb*). Não é necessário alterar nenhum estado de protonação da proteína.

7.3 Prepare o arquivo do ligante (*1hxb_ligand.pdb*), adicionando os hidrogênios. Na aba *Ligand*, expanda a caixa para visualizar os graus de liberdade torcionais do ligante (*Rotatable bonds to be flexible during docking*). Realizaremos experimentos com variação da flexibilidade do ligante, de acordo com os itens abaixo:

- (i) Docking Rígido: Desmarque todas as caixas referentes as 19 torções do ligante.
- (ii) Docking flexível: Deixe todas as caixas marcadas.

Após cada uma das três modificações acima, siga os passos abaixo:

7.4 Clique em *Save the rotatable bonds*. Clique em *Next*.

7.5 Não é necessário incluir nenhum cofator. Clique em *Next*.

7.6 Na aba *Docking*, digite seu e-mail, os valores para o centro da grade: **X: 2.194 Y: -2.947 Z: -7.733**, e um *label* para o *job* (use preferencialmente um *label* diferente para cada *job*).

7.7 Clique em *Dock* para submeter o experimento de *docking*.

7.8 Entre nos *links* abaixo para analisar os resultados de (i) e (ii), respectivamente:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc
king_PR_RIT_RIG_ligand_qjpjbr#
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc
king_PRRIT_RIT_ligand_xinugr#
```

8. Parâmetros do algoritmo genético (AG)

8.1 Prepare os arquivos da proteína HIV-1 protease e do ligante ritonavir (*1HXW_protein.pdb* e *1hwx_ligand.pdb*). Adicione os hidrogênios. Não é necessário alterar nenhum estado de protonação da proteína.

8.2 Não é necessário incluir nenhum cofator. Clique em *Next*.

8.3 Na aba *Docking*, digite seu e-mail, os valores para o centro da grade: **X: 2.194 Y: -2.947 Z: -7.733**, e um *label* para o *job* (use preferencialmente um *label* diferente para cada *job*).

8.4 Expanda a caixa de opções avançadas para modificar os parâmetros relativos ao algoritmo genético (*Genetic Algorithm (GA) Parameters Settings*). Utilizaremos valores distintos para o parâmetro *Population Size* do algoritmo genético. Mude o valor deste parâmetro para cada um dos itens abaixo. Após cada uma das alterações, clique em *Dock* para submeter o experimento de *docking*.

(i) 100

(ii) 250

(iii) 500

8.5 Entre nos *links* abaixo para analisar os resultados de (i), (ii) e (iii), respectivamente:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc
king_PR_RIT_POP100_ligand_tyogee
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc
king_PRRIT_POP250_ligand_j9kx0
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc
king_PRR_RIT_POP500_ligand_tddx4b
```

Agora, vamos alterar o parâmetro *Number of Evaluations*. Repita os passos em 7.1 e 7.2.

8.6 Na aba *Docking*, expanda a caixa de opções avançadas para modificar os parâmetros relativos ao algoritmo genético (*Genetic Algorithm (GA) Parameters Settings*).

8.7 Mude o parâmetro *Population Size* e deixe-o fixo em 500 para todos os experimentos.

8.8 Mude o valor do parâmetro *Number of Evaluations* de acordo com cada um dos itens abaixo. Após cada uma das alterações, clique em *Dock* para submeter o experimento de *docking*.

(i) 100000

(ii) 250000

(iii) 500000

8.9 Entre nos *links* abaixo para analisar os resultados de (i), (ii) e (iii), respectivamente:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc  
king_PR_RIT_P500_100M_ligand_bdj1wn
```

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc  
king_PR_RIT_P500_250M_ligand_mskeq3
```

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc  
king_PR_RIT_P500_500M_ligand_777gw1
```

Dia 3 – Erro de interpolação – 3HH4

Docking com Águas Estruturais – 1HPV

Influência da Conformação Inicial do Ligante - 1XOZ

9. Erro de interpolação da grade de energia

9.1 A grade de energia determina a região do receptor que será considerada como sítio de ligação e, conseqüentemente, limita o espaço de busca em que diversas conformações do ligante serão geradas. Os parâmetros da grade de energia possuem influência nos resultados do *docking*: quanto maior a aproximação utilizada, menos acurados serão os resultados. Neste experimento utilizaremos diversas configurações da grade de energia e iremos comparar os valores de energia obtidos pelo DockThor com a energia de interação calculada com o campo de força MMFF94 entre os pares de átomos. Utilizaremos uma proteína complexada com um ligante pequeno (benzeno) para avaliar melhor as diferentes configurações da grade de energia (código PDB: 3HH4).

9.2 Prepare os arquivos da proteína e do ligante (*3HH4_complexo.pdb* e *3hh4_ligand.pdb*). Não é necessário alterar nenhum estado de protonação da proteína.

9.3 Utilize uma grade de energia reduzida, com 7Å em cada eixo e os seguintes valores de discretização de energia:

- (i) 1.5 Å;
- (ii) 1.0 Å;
- (iii) 0.5 Å;
- (iv) 0.25 Å;
- (v) 0.14 Å.

Defina o centro da grade de energia como: X = 26.76; Y = 6.99; Z = 5.32.

9.4 Altere os parâmetros do algoritmo genético: 10.000 avaliações e 100 indivíduos na população inicial.

9.5 Compare os valores encontrados dos potenciais de Coulomb e van der Waals com os calculados pelo campo de força MMFF94 sem a aproximação por grade de energia.

1.5Å: http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_3hh4_i_ligand_1qfz0k

1.0Å: http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_3hh4_ii_ligand_kytamn

0.5Å: http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_3hh4_iii_ligand_nhbnzp

0.25Å: http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_3hh4_iv_ligand_fsrtx1

0.14Å: http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_3hh4_v_ligand_crcqjg

10. Docking com água estrutural

10.1 Diversos complexos possuem moléculas de água estruturais mediando interações receptor-ligante. Alguns exemplos são acetilcolinesterase e HIV-1 protease. Vamos utilizar o complexo da enzima HIV-1 protease com o inibidor VX-478 (código PDB: 1hvp).

10.2 Prepare o arquivo da proteína, neutralizando o resíduo de aminoácido Asp25:B no oxigênio ODN2 (ASP25:B).

- 10.3 Prepare o arquivo do ligante adicionando átomos de hidrogênio.
- 10.4 Na aba de cofatores, adicione a molécula de água estrutural (não adicionar hidrogênios).
- 10.5 Submeta o docking usando todos os parâmetros padrão e o seguinte centro da grade de energia: X = 9.667; Y = 16.49; Z = 8.71.
- 10.6 Analise os resultados e observe as interações do ligante com a proteína mediadas pela molécula de água. Compare com os resultados obtidos do *docking* sem a molécula de água.

Com água:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1hvp_cW_ligand_6n3i7y
```

Sem água:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1hvp_sW_ligand_apczlf
```

11. Influência da Conformação Inicial do Ligante

Diversos estudos têm demonstrado que o uso de diversas conformações iniciais do ligante tem impacto positivo na taxa de sucesso de estudos de *docking*. Isto ocorre principalmente no caso de ligantes que possuem diferentes conformações de anéis, isômeros etc.

Um exemplo é o complexo 1XOZ, em que dependendo da conformação minimizada no vácuo disponível no PDB (no formato *.sdf* – *structure data file*), o programa **dockthor** possui taxa de sucesso de 0%. Outros programas testados, *e.g.* Vina, Glide e GOLD (ChemPLP), também falham. Isto ocorre devido ao sistema de anéis presente neste ligante, que se encontra planar quando complexado, mas um pouco torcido quando minimizado no vácuo. Foram geradas quatro conformações de mínimo de energia para avaliar a influência da variação conformacional deste ligante nos experimentos de *docking*. Foi usado o campo de força OPLS2005, pelo programa LipPrep (versão 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011), da suíte de aplicativos Maestro.

- 11.1 Prepare o arquivo da proteína – não é necessário modificar nenhum estado de protonação da proteína.
- 11.2 Prepare o arquivo do ligante adicionando hidrogênios.
- 11.3 Não existem cofatores interagindo diretamente com o ligante. Clique em *Next* para prosseguir para a aba com os parâmetros do *docking*.
- 11.4 Submeta o *docking* utilizando a grade de energia centrada em: X = 46.964; Y = 33.834; Z = 11.772. Mantenha os outros parâmetros com os valores padrão.
- 11.5 Analise o resultado e compare com os modos de ligação preditos para as diferentes conformações iniciais do ligante.

Conformação original:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1xoz_ref_ligand_s06ydc
```

Conformação 1:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1xoz_cf1_ligand_nj2xyl
```

Conformação 2:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1xoz_cf2_ligand_tlp7cv
```

Conformação 3:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1xoz_cf3_ligand_233dzj
```

Conformação 4:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_gmmsb_1xoz_cf4_ligand_hmxj0q
```

Dia 4 - *Crossdocking* da HIV-1 protease - Saquinavir

12. Crossdocking

Neste protocolo serão realizados experimentos de *docking* do ligante saquinavir, inibidor da HIV-1 protease, usando diferentes conformações da proteína não originalmente complexadas com este ligante. O inibidor saquinavir complexado com a HIV-1 protease está armazenado no PDB sob o código 1HXB. No experimento de *crossdocking*, vamos utilizar como receptores as conformações da HIV-1 protease dos complexos 1HXW (ligante: **ritonavir**) e 1OHR (ligante: **nelfinavir**). Adicionalmente, faremos o estudo de *redocking* do saquinavir na conformação da HIV-1 protease (complexo 1HXB) para comparar os resultados dos dois experimentos.

12.1 Na pasta já criada *crossdocking/*, entre na pasta de cada complexo e prepare o arquivo da proteína (***_protein.pdb**) utilizando o **portal Dockthor**. Todos os complexos foram alinhados para ser utilizado o mesmo centro da grade nos cálculos de *docking*. Não é necessário alterar nenhum estado de protonação da enzima.

12.2 Prepare o arquivo do ligante saquinavir (1hxb_ligand_mod01.pdb), adicionando os hidrogênios. Deixe todas as torções flexíveis.

12.3 Não é necessário incluir nenhum cofator. Clique em *Next*.

12.4 Na aba *Docking*, digite seu e-mail, os valores para o centro da grade: **X: 0.872 Y: -2.341 Z: -4.771**, e um *label* para o *job* (use preferencialmente um *label* diferente para cada *job*). Clique em *Dock* para submeter o experimento de *docking*.

12.5 Entre nos *links* abaixo para analisar os resultados do ligante saquinavir utilizando as proteínas complexadas com os ligantes (i) ritonavir, (ii) nelfinavir e (iii) saquinavir, respectivamente:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_PR_RIT_LIG_SAQ_ligand_idfulb  
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_PR_NEL_LIG_SAQ_ligand_x4ngri  
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_PR_SAQ_LIG_SAQ_ligand_0ddbwa
```

Referências

- ∞ C. S. de Magalhães, D. M. Almeida, H. J. C. Barbosa, L. E. Dardenne. **A Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking of Highly Flexible Ligands**. Information Sciences, **2014**.
- ∞ PDB - H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. **The Protein Data Bank**. Nucleic Acids Research, 28: 235-242, **2000**.
- ∞ Almeida, D.M., **DockThor: Implementação, Aprimoramento e Validação de um Programa de Atracamento Molecular Receptor-Ligante**. Laboratório Nacional de Computação Científica – Petrópolis-RJ, **2011**.

Links Interessantes

- ∞ PropKa – cálculo de pKa de resíduos de aminoácidos de proteínas.
Link: <http://propka.ki.ku.dk/>
- ∞ PDB2PQR - preparação de proteína como adição de hidrogênios, cálculo de cargas parciais (vários campos de forças) e cálculo de pKa dos resíduos.
Link: http://nbc222.ucsd.edu/pdb2pqr_1.9.0/
- ∞ Corina - calcula a estrutura 3D de pequenas moléculas para download, a partir do SMILE ou do desenho da estrutura em 2D.
https://www.molecular-networks.com/online_demos/corina_demo_interactive
- ∞ Informações sobre o formato PDB:
Link: <http://www.wwpdb.org/documentation/format32/v3.2.html>