

VIII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos

Laboratório Nacional de Computação Científica - LNCC/MCT

Petrópolis - Rio de Janeiro - Brasil

22 a 26 de agosto de 2016

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

CAMILA MAGALHÃES - camilasm@ufrj.br

ISABELLA ALVIM - isabella@lncc.br

LAURENT DARDENNE - dardenne@lncc.br

Informações:

Login: viiiemmsb

Senha: emmsb2016


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 – Docking com Portal DockThor – 1DB1

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.rcsb.org. No campo de busca em branco, digitar o código do complexo 1DB1 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 Format**) para sua pasta pessoal (/home/viiiemmsb/docking_turmaX/1db1)¹.
- 1.4 Clique no código do ligante **VDX** 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/viiiemmsb/docking_turmaX/1db1/. Analise a estrutura tridimensional do complexo no visualizador Pymol:

```
pymol 1DB1.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

¹ O arquivo já foi baixado (1db1_complex.pdb) no diretório /home/viiiemmsb/docking_turmaX/1db1/.

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 1DB1.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 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	LEU A 120	34.417	18.787	67.312	1.00 50.31	N
ATOM	2	CA	LEU A 120	34.298	17.304	67.212	1.00 49.96	C
ATOM	3	C	LEU A 120	33.672	16.891	65.886	1.00 49.44	C
ATOM	4	O	LEU A 120	32.815	17.592	65.344	1.00 49.49	O
ATOM	5	CB	LEU A 120	33.447	16.756	68.363	1.00 50.64	C
ATOM	6	CG	LEU A 120	34.003	16.880	69.783	1.00 51.38	C
ATOM	7	CD1	LEU A 120	32.969	16.374	70.777	1.00 51.56	C
ATOM	8	CD2	LEU A 120	35.297	16.085	69.906	1.00 51.43	C
ATOM	9	N	ARG A 121	34.106	15.745	65.375	1.00 48.14	N
ATOM	10	CA	ARG A 121	33.599	15.221	64.117	1.00 47.01	C
ATOM	11	C	ARG A 121	33.113	13.790	64.314	1.00 45.50	C
ATOM	12	O	ARG A 121	33.775	12.836	63.905	1.00 45.36	O
ATOM	13	CB	ARG A 121	34.700	15.264	63.052	1.00 48.45	C
ATOM	14	CG	ARG A 121	35.233	16.664	62.790	1.00 49.89	C
ATOM	15	CD	ARG A 121	36.430	16.655	61.852	1.00 52.32	C
ATOM	16	NE	ARG A 121	36.100	16.133	60.529	1.00 53.49	N
ATOM	17	CZ	ARG A 121	36.947	16.112	59.504	1.00 54.08	C
ATOM	18	NH1	ARG A 121	38.178	16.586	59.648	1.00 54.50	N
ATOM	19	NH2	ARG A 121	36.563	15.620	58.334	1.00 54.12	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 1DB1.pdb para outro arquivo 1db1_protein.pdb:

```
cat 1DB1.pdb > 1db1_protein.pdb
```

1.7.2 Faça o mesmo para o arquivo do ligante. Copie o arquivo 1DB1.pdb para outro arquivo 1db1_ligand.pdb:

```
cat 1DB1.pdb > 1db1_ligand.pdb
```

1.7.3 Abra o arquivo 1db1_ligand.pdb em um editor de texto:

```
gedit 1db1_ligand.pdb &
```

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

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 Carregue o arquivo do complexo 1DB1 (*Upload*).

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 Faça download dos arquivos preparados (*Download*).

2.5 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.

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

```
pymol ldbl_protein_prep.pdb &
```

2.7 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*).

3.10 Neste experimento não consideramos cofatores. Clique novamente em *Next* para prosseguir para a página de *Docking*.

4. Redocking

4.1 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.

4.2 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: 11.46 Y: 22.97 Z: 34.46**, 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.

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

4.4 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.

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

5. Análise dos Resultados

5.1 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.

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

http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_emmsb_1dbl_ligand_ngmnjp

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.

- 5.3 Selecione a opção para analisar os resultados pela energia total (energia de interação + energia interna do ligante).
- 5.4 Observe os parâmetros da análise dos resultados que podem ser modificados (expanda a caixa *Result Settings*). Mantenha os valores padrão.
- 5.5 Carregue o arquivo original do ligante (1db1_ligand.pdb) para comparar os modos de ligação encontrados pelo *docking* e a conformação observada experimentalmente.
- 5.6 Clique em *Analyse* para executar o programa **dtstatistic** e analisar automaticamente os resultados.
- 5.7 Analise interativamente os resultados de *docking* ainda na página clicando em *View results interactively*.
- 5.8 Observe o valor da afinidade proteína-ligante predito para cada modo de ligação encontrado pelo programa DockThor predito pela função de avaliação³ (*Score*).
- 5.9 Faça o *download* e descompacte o arquivo referente aos resultados. Entre no diretório e analise os arquivos gerados pelo programa **DockThor**.

³ Este valor é calculado por uma função de avaliação desenvolvida pelo grupo GMMSB especificamente para prever afinidade de ligação de complexos proteína-ligante. A função é um modelo linear parametrizado utilizando 2164 complexos proteína-ligante provenientes do banco de estruturas PDBbind como conjunto de treinamento. A capacidade preditiva desta função, avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson, no conjunto teste *core set* do PDBbind (N = 195) é R = 0.485.

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> .
*_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.
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 – Estados de Protonação e Docking com Metais - 1CAQ

Docking com Águas Estruturais – 1HPV

6. Preparação da proteína

6.1 No portal DockThor, prepare o arquivo da proteína **1caq_protein.pdb** (*Prepare*)⁵.

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).

6.1.1 Estados de protonação de resíduos de aminoácidos podem ser preditos utilizando diferentes métodos. Exemplos de servidores que são amplamente utilizados nesta etapa são Protoss (<http://proteinsplus.zbh.uni-hamburg.de/>) e PROPKA (<http://www.propka.org/>). O servidor PDB2PQR (http://nbcrc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/) considera a predição dos pKa's fornecida pelo PROPKA e adiciona automaticamente os átomos de hidrogênio no receptor.

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.

⁵ Os arquivos referentes a esta prática já estão salvos em /home/viiemmsb/docking_turmaX/1caq/

- 6.2 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.
- 6.3 Clique em *Reprepare* para recalcular as cargas parciais e os tipos de átomos de acordo com o novo estado de protonação dos resíduos.
- 6.4 Faça download dos arquivos preparados (*Download*).
- 6.5 Analise os arquivos gerados.
- 6.6 Abra o arquivo da proteína preparada no Pymol e analise as alterações que foram realizadas.

```
pymol 1caq_protein_prep.pdb &
```

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

7. Preparação do ligante

- 7.1 Carregue o arquivo do ligante **1caq_ligand.pdb** (*Upload*).
- 7.2 Prepare o arquivo adicionando átomos de hidrogênio.
- 7.3 Faça o *download* dos arquivos resultantes da preparação do ligante (*Download prepared files*).
- 7.4 Analise os arquivos gerados e abra o arquivo **new_ligand.pdb** no Pymol.
- 7.5 Prossiga para a etapa de preparação dos arquivos dos cofatores (*Next*).

8. Preparação do Cofator

- 8.1 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.
- 8.2 Faça o *download* dos arquivos e analise-os.
- 8.3 Clique em *Next* para prosseguir para a próxima etapa.

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.

9. Redocking

- 9.1 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.
- 9.2 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.
- 9.3 Visualize a grade de energia sobreposta com a proteína (*View Grid in 3D*).
- 9.4 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.
- 9.5 Clique em *Next* para submeter o experimento de *docking*.

10. Análise dos Resultados

- 10.1 Entre no *link* abaixo para analisar os resultados⁶:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_emmsb_1caq_ligand_mazmjz
```

- 10.2 Selecione a opção para analisar os resultados pela energia total (energia de interação + energia interna do ligante).
- 10.3 Observe os parâmetros da análise dos resultados que podem ser modificados (expanda a caixa *Result Settings*). Mantenha os valores padrão.
- 10.4 Carregue o arquivo original do ligante (1caq_ligand.pdb) para comparar os modos de ligação encontrados pelo *docking* e a conformação observada experimentalmente.
- 10.5 Clique em *Analyse* para executar o programa **dtstatistic** e analisar automaticamente os resultados.
- 10.6 Analise interativamente os resultados de *docking* ainda na página clicando em *View results interactively*.

⁶ **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.

10.7 Faça o *download* e analise os arquivos gerados pelo programa **DockThor**.

11. *Docking* com água estrutural

- 11.1 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)⁷.
- 11.2 Abra o arquivo do complexo 1HPV no Pymol e analise as interações proteína-ligante-água (1HPV.pdb).
- 11.3 Prepare o arquivo da proteína (1hvp_protein.pdb), neutralizando o resíduo de aminoácido Asp25:B no oxigênio ODN2 (ASPN2).
- 11.4 Prepare o arquivo do ligante adicionando átomos de hidrogênio (1hvp_ligand.pdb).
- 11.5 Na aba de cofatores, adicione a molécula de água estrutural (não adicionar hidrogênios -> 1hvp_water.pdb).
- 11.6 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.
- 11.7 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_emmsb_1hvp_cW_ligand_xcqfns
```

Sem água:

```
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_emmsb_1hvp_sW_ligand_xcqfns
```

Dia 3 – Alterando os parâmetros do *docking* – 1HXW

⁷ Os arquivos referentes a esta prática já estão salvos em /home/viiemmsb/docking_turmaX/1hvp/

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.

12. Ligações rotacionáveis do ligante

12.1 Abra os arquivos *1hwx_protein.pdb* e *1hxb_ligand.pdb* com o Pymol para visualizar o ligante e a proteína⁸.

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

12.3 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 às 19 torções do ligante.
- (ii) Docking flexível: Deixe todas as caixas marcadas.

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

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

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

12.6 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*).

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

12.8 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=docking_emmsb_1hwx_rig_ligand_zwslwl#  
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_emmsb_1hwx_flex_ligand_vbnojk#
```

⁸ Os arquivos referentes a esta prática já estão salvos em `/home/viiemmsb/docking_turmaX/1hwx/`

13. Parâmetros do algoritmo genético (AG)

- 13.1 Prepare os arquivos da proteína HIV-1 protease e do ligante ritonavir (*1hwx_protein.pdb* e *1hwx_ligand.pdb*). Não é necessário alterar nenhum estado de protonação da proteína. Adicione os hidrogênios. Considere o ligante totalmente flexível.
- 13.2 Não é necessário incluir nenhum cofator. Clique em *Next*.
- 13.3 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*).
- 13.4 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
- 13.5 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_emmsb_1hwx_p100_ligand_5dvtxz
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc
king_emmsb_1hwx_p250_ligand_5dvtxz
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc
king_emmsb_1hwx_p500_ligand_5dvtxz
```

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

- 13.6 Na aba *Docking*, expanda a caixa de opções avançadas para modificar os parâmetros relativos ao algoritmo genético (*Genetic Algorithm (GA) Parameters Settings*).
- 13.7 Mude o parâmetro *Population Size* e deixe-o fixo em 500 para todos os experimentos.

13.8 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

13.9 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_emmsb_1hwx_av100_ligand_5dvtxz  
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc  
king_emmsb_1hwx_av250_ligand_5dvtxz  
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=doc  
king_emmsb_1hwx_av500_ligand_5dvtxz
```

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

Docking cinase MAPK p38 – Complexo 1OUK

14. 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.

14.1 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.

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

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

14.4 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*.

14.5 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_au9n0d
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_PR_NEL_LIG_SAQ_ligand_j95mru
http://www.dockthor.lncc.br/index.php?pg=submission&pgs=results&id=docking_PR_SAQ_LIG_SAQ_ligand_cua7yr
```

15. Docking cinase MAPK p38 – Complexo 1OUK

15.1 Faça o download do complexo 1OUK no *Protein Data Bank* e realize um estudo de *redocking* com o inibidor originalmente complexado com a proteína.

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**.
- ∞ I. A. Guedes, C. S. de Magalhães, L. E. Dardenne. **Receptor-ligand Molecular Docking**. Biophysical Reviews, **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://nbc-222.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>
- ∞ *Ebook* gratuito: da Biologia à Flexibilidade Moleculares
Link: <http://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook>