



**POLITECHNIKA
RZESZOWSKA**
im. IGNACEGO ŁUKASIEWICZA



**WYDZIAŁ
CHEMICZNY**
POLITECHNIKI RZESZOWSKIEJ

Dokowanie molekularne przy użyciu AutoDock i AutoDockTools

Opracował: Marcin Jaromin mjaromin@prz.edu.pl

Potrzebne programy

Najlepiej pobrać z naszego kursu e-learningowego, ale poniżej odnośniki do stron twórców oprogramowania.

Program *AutoDock* należy pobrać ze strony: <http://autodock.scripps.edu/downloads> a następnie zainstalować go zgodnie z [instrukcją](#)

Program *ADT* należy pobrać ze strony: <http://autodock.scripps.edu/downloads/resources/adt/index.html> a następnie zainstalować go zgodnie z [instrukcją](#).

<https://www.youtube.com/watch?v=k6tqCeDlwEk>

Program *Open Babel* – konwersja plików chemicznych

<http://openbabel.org/wiki/Category:Installation>

Dokowanie molekularne jest najpopularniejszą metodą projektowania leków opartą na strukturze (SBDD, ang. *structure-based drug design*), czyli wtedy gdy znana jest dokładna struktura 3D celu molekularnego. Popularność przyniósł ogromny wzrost mocy obliczeniowej komputerów, który pozwolił na badanie powinowactwa (ang. *affinity*) wielu ligandów w krótkim czasie.

Dokowanie typu mała cząsteczka – makrocząsteczka

Mała cząsteczka nazywana jest ligandem i najczęściej jest nią substancja endogenna lub egzogenna (np. lek) o małej masie molekularnej.

Natomiast makrocząsteczką może być białko (enzym, receptor), peptyd, kwas nukleinowy (DNA, RNA) lub inny biopolimer.

Przykład: Dokowanie tamoksyfenu do białka 2FSZ (receptor estrogenu)

Oryginalna praca naukowa

Wang, Y., Chirgadze, N.Y., Briggs, S.L., Khan, S., Jensen, E.V., Burris, T.P.

„A second binding site for hydroxytamoxifen within the coactivator-binding groove of estrogen receptor β ”, (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103: 9908-9911

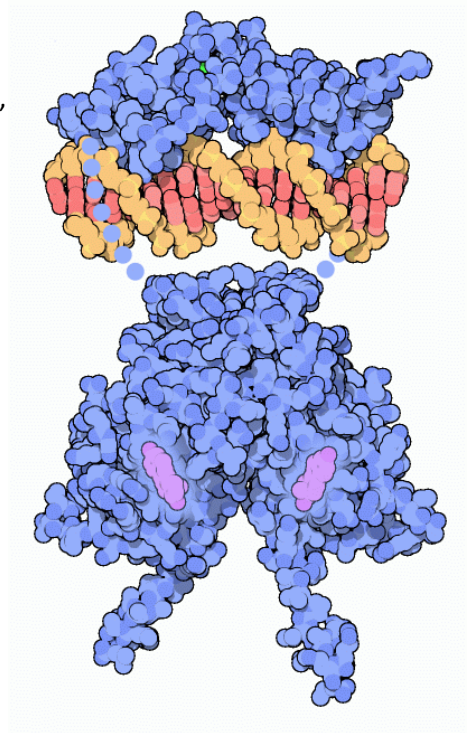
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0510596103>

Krótki opis wykonany przez studentów specjalności Biotechnologia w farmacji w ramach projektu (inż. Anna Nieczaj , inż. Oliwia Myszk, inż. Alicja Niemczyk, inż. Wojciech Jasionek) i moją skromną osobę.

Receptor estrogenowy

Budowa

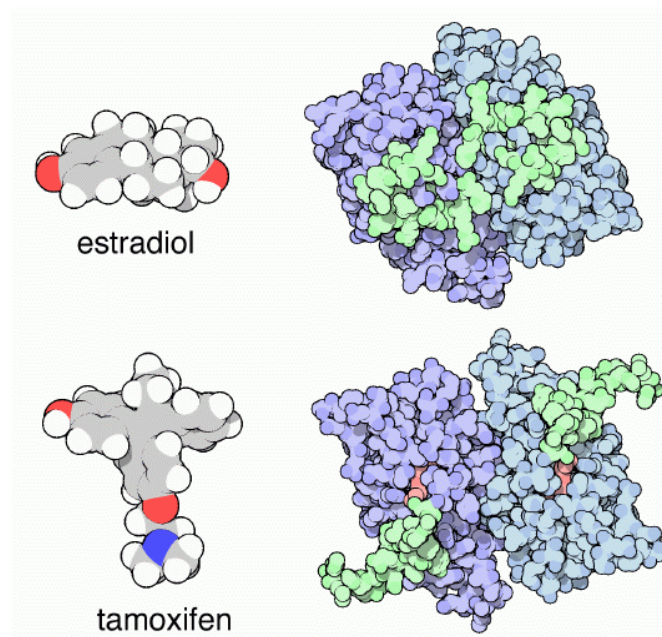
Receptor estrogenowy, podobnie jak inne receptory jądrowe, składa się z kilku części połączonych w jeden długi łańcuch. Na jednym końcu jest część, która wiąże się z hormonem. Ta struktura posiada związany estradiol, pokazany na fioletowo. Jest to połączenie z domeną wiążącą, która rozpoznaje specyficzne sekwencje DNA, pokazane tutaj na górze. Wreszcie, na końcu domeny wiążącej DNA znajduje się duża domena transaktywacyjna, która nie jest tu pokazana. Aktywuje ona polimerazę RNA, gdy receptor wiąże się z DNA.



Rys. 1 Receptor estrogenowy związany z krótkim fragmentem DNA.

Estrogen w walce z nowotworem

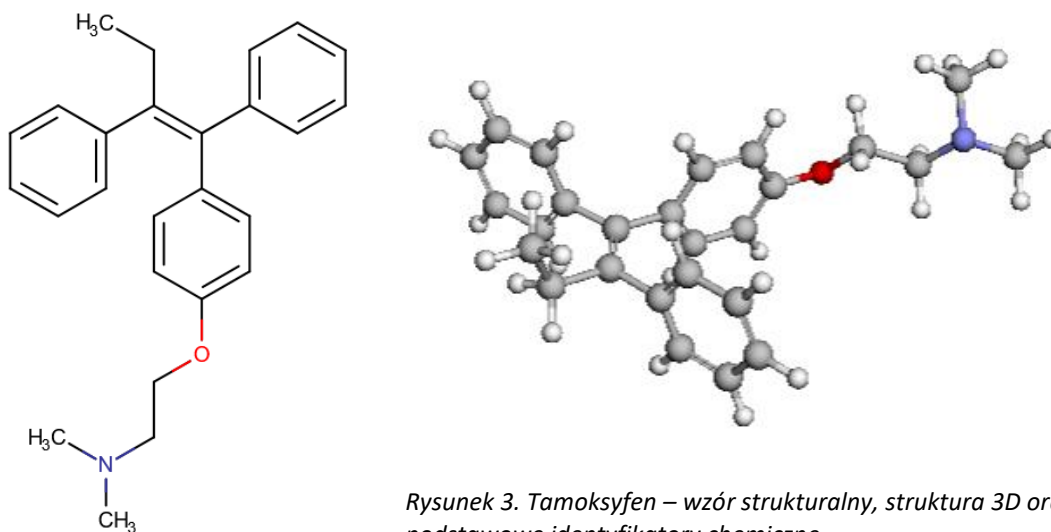
Estrogen stymuluje komórki do wzrostu. Jest to niezbędne w okresie dojrzewania, ale także konieczne w dorosłym życiu. Na przykład, estrogen jest ważny w rozwoju kości, a niski poziom estrogenów może prowadzić do osteoporozy. Natomiast w przypadku raka, estrogen może wzmocnić nienaturalny wzrost i pogłębić chorobę.



Lek tamoksyfen jest stosowany w leczeniu raka poprzez blokowanie działania estrogenów. Tamoksyfen jest małym lekiem, który naśladuje kształt estrogenów i wiąże się ściśle z receptorem estrogenowym. Kiedy się wiąże, zmienia kształt pętli sygnalizacyjnej na powierzchni receptora (pokolorowanej tutaj na zielono). Górna struktura pokazana tutaj, ma związany estradiol (estradiol nie jest widoczny na zdjęciu, ponieważ jest związany pod pętlą). Zwarta konformacja tej pętli stanowi część sygnału aktywacyjnego, który będzie stymulował prawidłowy wzrost. Niższa struktura, ma związany lek. Ponieważ lek jest większy od hormonu, zmusza pętlę aktywacyjną do wyjścia w nieaktywną konformację, blokując

Rysunek 2. Domena wiążąca ligand receptora estrogenowego z estradiolem (górze) lub tamoksyfenem (dół).

Tamoksyfen (Tamoxifen) jest niesteroidowym antyestrogenem stosowanym w leczeniu raka piersi z obecnością receptorów estrogenowych, a także w zapobieganiu zachorowalności na raka piersi w populacjach wysokiego ryzyka. Tamoksyfen stosuje się samodzielnie lub jako środek wspomagający



Rysunek 3. Tamoksyfen – wzór strukturalny, struktura 3D oraz podstawowe identyfikatory chemiczne.

CAS number

10540-29-1

InChI Key

NKANXQFJJICGDU-QPLCGJKRSA-N

InChI

InChI=1S/C26H29NO/c1-4-25(21-11-7-5-8-12-21)26(22-13-9-6-10-14-22)23-15-17-24(18-16-23)28-20-19-27(2)3/h5-18H,4,19-20H2,1-3H3/b26-25-

IUPAC Name

(2-{4-[(1Z)-1,2-diphenylbut-1-en-1-yl]phenoxy}ethyl)dimethylamine

SMILES

CC\C(=C/C1=CC=CC=C1)C1=CC=C(OCCN(C)C)C=C1)C1=CC=CC=C1

Krok 1 – Przygotowanie środowiska pracy

1.1 Przygotować folder na dysku (ścieżka nie powinna zawierać spacji i dziwnych znaków)

1.2 Do przygotowanego folderu skopiować pliki:

a) *autodock4.exe* oraz *autogrid4.exe* – domyślnie zainstalowane w C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Autodock\4.2.6 – folder utworzony przy instalacji programu AutoDock.

b) *AD4.1_bound.dat* i *AD4_parameters.dat* – domyślnie zainstalowane w C:\Program Files (x86)\MGLTools-1.5.7\Lib\site-packages\AutoDockTools – folder utworzony podczas instalacji AutoDockTools ADT.

c) Plik receptora (cel molekularny) w formacie PDB (w moim przypadku 2fzs.pdb)

- 1.3 Uruchomić program AutoDockTools
- 1.4 Ustawić domyślny folder na utworzony w punkcie 1.1

File → Preferences → Set:

StartupDirectory – wklejamy ścieżkę do folderu utworzonego w 1.1 naciskamy Set, Make Default i Dismiss.

Krok 2. Przygotowanie pliku koordynacyjnego PDBQT

Rozszerzony typ formatu PDB jest wykorzystywany do przechowywania informacji o atomowych ładunkach cząstkowych i typach atomów.

RECEPTOR

- 2.1 Wczytanie receptora
File → Read molecule
- 2.2 Usunąć niepotrzebny element – zaznaczamy niepotrzebny fragment i Edit → Delete selected
- 2.3 Usunąć wodę (jeśli występuje)
Edit → Delete water
- 2.4 Dodać polarne wodory
Edit → Hydrogens → Add (Polar only) albo w Dashboard – prawy przycisk Add Polar hydrogens
- 2.5 Sprawdzić czy nie brakuje atomów w cząsteczce Edit → Misc → Check for Missing Atoms
- 2.6 Naprawić braki atomów
Odznaczyć wszystko.
Edit → Misc → Repair for Missing Atoms
- 2.7 Usunąć heteroatomy (atomy obce) – kilka sposobów, ale najłatwiejszy to:
Select → Select From String, naciskamy przyciskiem na pole Atom Sets (prawa strona, 4 od góry) i wybieramy *hetatm* następnie Add i Dismiss.
I usuwamy zaznaczone elementy jeżeli istnieją Edit → Delete selected
- 2.8 Dodać ładunki cząstkowe
Edit → Charges → Add Kollman charges
- 2.9 Sprawdzić ładunek na atomach
Edit → Charges → Check Totals on Residues

Jeżeli pojawia się jakiś element w oknie naciskamy Spread Charge Deficit over all atoms in residue (rozdziel brakujący ładunek na wszystkie atomy w aminokwasie).
- 2.10 Zapisać cząsteczkę jako PDBQT
Grid → Macromolecule → Choose I wybieramy naszą cząsteczkę następnie program będzie chciał ją zapisać w formacie pdbqt (np.receptor.pdbqt – potrzebne w 2.1).
I zamykamy program AutoDockTools.

Krok 3. Konwersja liganda do format PDBQT oraz ustalenie wiązań skrętnych

LIGAND

3.1 Pobrać (przygotować) strukturę w formacie MOL lub SDF

3.2 Przekonwertować do formatu „pdbqt” przy użyciu programu OpenBabel (nie przez stronę internetową tylko poprzez program).

Uruchomić program AutoDockTools

3.3 Wczytanie
liganda

Ligand → Input

3.4 Dodać polarne wodory

Edit → Hydrogens → Add (Polar only) albo w Dashboard – prawy przycisk Add Polar hydrogens

3.5 Określamy wiązania ruchome liganda

Ligand – Torsion tree → Detect
Root

3.6 Ustawiamy liczbę wiązań

Ligand – Torsion tree → Set Number of Torsions

Krok 4. Obliczanie AutoGrid (siatki potencjałów)

4.1 Wczytaj strukturę receptora i liganda w formacie

PDBQT: Grid → Macromolecule → Open →

receptor.pdbqt

Grid → Set Map Types → Choose Ligand → I wybieramy ligand (modyfikowany w punkcie 3.6)

4.2 Określ dla jakich typów atomów będą liczone siatki: Grid → Set Map Types → Directly

Accept

4.3 Zdefiniuj położenie i rozmiar siatki.

(Miejsce wiązania ligandów w receptorach GPCR znajduje się we wnęce między helisami. Należy tak dobrać parametry siatki aby pokrywała ona całe miejsce wiążące receptora. Nie zapomnij zachować parametrów siatki w oknie Grid Options File → Close saving current)
Grid → Grid Box

4.4 Zachowaj plik GPF.gpf:

Grid → Output → Save GPF → 1.gpf (dodać ręcznie rozszerzenie pliku)

4.5 Uruchom program AutoGrid:

Run → Run AutoGrid → (określ katalog w którym znajdują się wszystkie pliki oraz katalog w którym został zainstalowany program AutoGrid4.exe)

Krok 5. Symulacja dokowania przy użyciu AutoDock

Docking is carried out using one of several search methods.

The most efficient method is a Lamarckian genetic algorithm (LGA), but traditional genetic algorithms and simulated annealing are also available. For typical systems, AutoDock is run several times to give several docked conformations, and analysis of the predicted energy and the consistency of results is combined to identify the best solution.

Najefektywniejsze aktualnie modele dokowania oparte są o algorytmy genetyczne i w tym programie taki właśnie wykorzystamy - Lamarckian genetic algorithm
więcej informacji:

Fuhrmann J, Rurainski A, Lenhof HP, Neumann D. A new Lamarckian genetic algorithm for flexible ligand-receptor docking. J Comput Chem. 2010 Jul 15;31(9):1911-8. doi: 10.1002/jcc.21478. PMID: 20082382.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20082382/>

Ustawianie parametrów algorytmu, między innymi ile konformacji ma być sprawdzane, odbywa się poprzez menu AutoDockTools Docking → Search Parameters → Genetic Algorithm

5.1 Określ strukturę receptora:

Docking → Macromolecule → Set Rigid Filename → receptor.pdbqt

5.2 Określ strukturę

liganda: Docking →

Choose → ligand

5.3 Zapisz plik DPF.dpf:

Docking → Output → Lamarckian GA → 1.dpf (dodać ręcznie rozszerzenie pliku)

5.4 Zadokuj ligand korzystając z procedury AutoDock:

Run → Run AutoDock → (określ katalog w którym znajdują się wszystkie pliki oraz katalog w którym został zainstalowany program AutoDock4.exe)

Krok 6. Analiza wyników

AutoDockTools zawiera wiele metod analizy wyników symulacji dokowania. Poniżej przedstawiona jeden z elementów analizy.

6.1 Porównanie energii poszczególnych konformacji.

Otworzyć utworzony przez program plik 1.dlg (nazwa pliku jest taka pod warunkiem, że w punkcie 5 jako nazwa pliku podano 1.dpf) w notatniku i odszukać fragment RMSD TABLE.

RMSD TABLE

| Rank | Sub-Rank | Run | Binding Energy | Cluster RMSD | Reference RMSD | Grep Pattern |
|------|----------|-----|----------------|--------------|----------------|--------------|
| 1 | 1 | 5 | -6.33 | 0.00 | 87.79 | RANKING |
| 1 | 2 | 1 | -4.17 | 1.99 | 88.56 | RANKING |
| 2 | 1 | 6 | -6.10 | 0.00 | 89.39 | RANKING |
| 2 | 2 | 10 | -5.93 | 0.55 | 89.12 | RANKING |
| 2 | 3 | 12 | -5.68 | 0.48 | 89.15 | RANKING |
| 2 | 4 | 3 | -5.52 | 1.33 | 89.47 | RANKING |
| 3 | 1 | 4 | -5.90 | 0.00 | 89.71 | RANKING |
| 4 | 1 | 2 | -5.30 | 0.00 | 87.90 | RANKING |
| 4 | 2 | 9 | -5.05 | 0.97 | 88.32 | RANKING |
| 4 | 3 | 11 | -4.96 | 0.85 | 88.08 | RANKING |
| 4 | 4 | 7 | -4.69 | 1.42 | 89.35 | RANKING |
| 4 | 5 | 8 | -4.63 | 1.37 | 88.98 | RANKING |

Jednym ze sposobów oceny, która konformacja jest najlepsza polega na porównaniu Energii (im mniejsza tym lepiej, w kolumnie Run mamy numer konformacji).

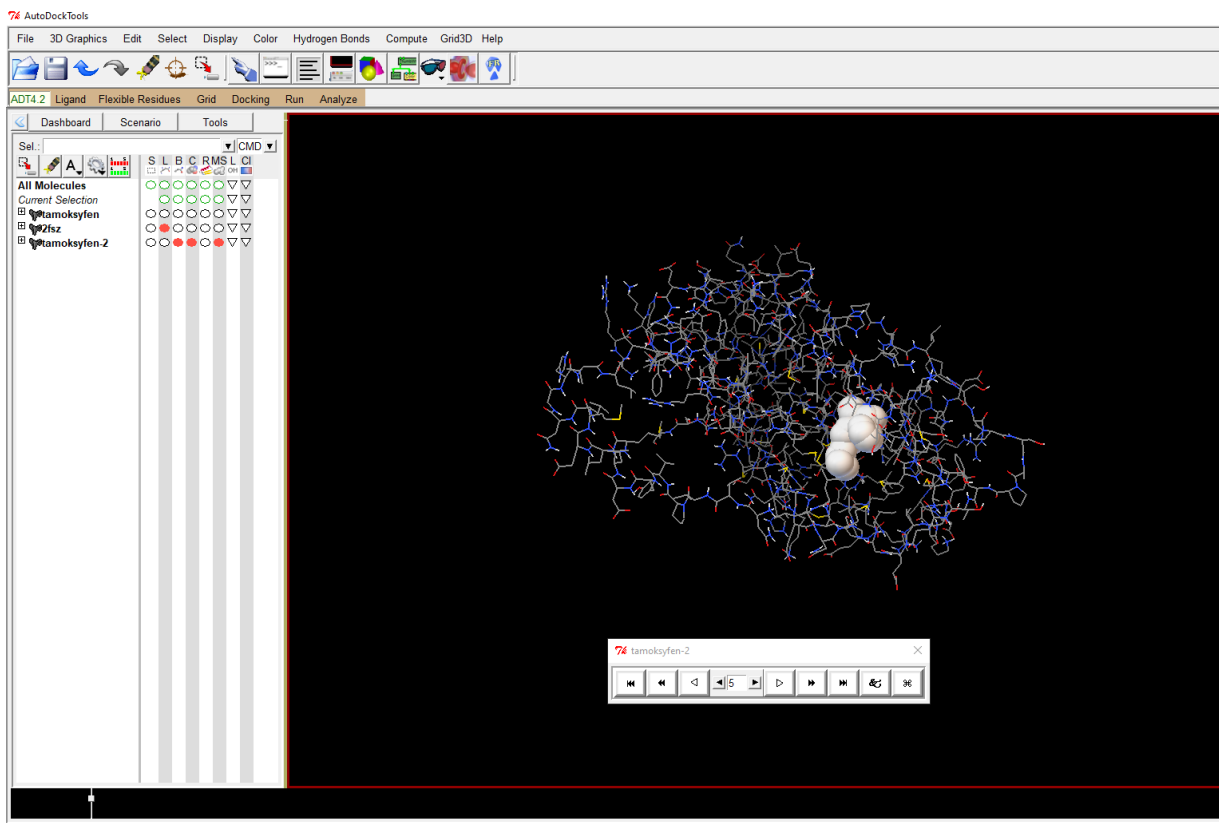
6.2 Wizualizacja wyników w programie AutoDockTools.

ADT Analyze → Dockings → Open → 1.dlg

ADT Analyze → Conformations → Play

(aby było to lepiej widoczne to podczas wykonywania 6.1 program automatycznie otwiera kopię naszego ligandu i w programie Python Molecule Viwer na wysokości tego ligandu wybrać trzecią kolumnę B lub czwartą a C aby był on wyświetlany jako sfery lub kulki rysunek poniżej czerwone kółka z lewej strony na wysokości tamoksyfen-2))

W moim przypadku z 12 konformacji najlepsza, według tabeli z energią okazała się konformacja piąta (kolumna Run). Do wyświetlenia wybranej konformacji używa się panelu pokazanego na rysunku poniżej cząsteczki).



Zadanie dla studentów

Wykonać dokowania ligandu do białka (fragmentu białka) jak w powyższym przykładzie. Jako wynik pokazać tabele z energią poszczególnych konformacji (ilość konformacji domyślnie ustawiona w programie 10, nie trzeba nic ustawiać) oraz wizualizacje najlepszej konformacji ligandu w otoczeniu białka (pkt 6.1 i 6.2 w przykładzie).

Jako sprawozdanie wysyłają Państwo plik w którym są podstawowe informacje (kto i kiedy wykonał, ligand i receptor (białko), tabele z energią poszczególnych konformacji, wizualizacje najlepszej konformacji ligandu w otoczeniu białka (patrz zdanie powyżej) oraz plik z wynikami .dlg.

| Numer indeksu | Ligand | Białko / Fragment cząsteczki |
|---------------|---|------------------------------|
| 173711 | Afimoxifene https://go.drugbank.com/drugs/DB04468 | 4J24 / A |
| 173776 | Droloxifene https://go.drugbank.com/drugs/DB15641 | 4J24 / A |
| 173777 | Toremifene https://go.drugbank.com/drugs/DB00539 | 4J24 / A |
| 173781 | Ospemifene https://go.drugbank.com/drugs/DB04938 | 4J24 / A |

| | | |
|--------|--|----------|
| 173782 | Fispemifene https://go.drugbank.com/drugs/DB06640 | 5TOA / B |
| 173783 | Clomifene https://go.drugbank.com/drugs/DB00882 | 5TOA / B |
| 173788 | Afimoxifene https://go.drugbank.com/drugs/DB04468 | 5TOA / F |
| 173789 | Droloxifene https://go.drugbank.com/drugs/DB15641 | 5TOA / B |
| 173794 | Toremifene https://go.drugbank.com/drugs/DB00539 | 5TOA / B |
| 173795 | Ospemifene https://go.drugbank.com/drugs/DB04938 | 5TOA / B |
| 173809 | Fispemifene https://go.drugbank.com/drugs/DB06640 | 3OLS / B |
| 167185 | Enclomiphene https://go.drugbank.com/drugs/DB06735 | 3OLS / B |
| 173825 | Clomifene https://go.drugbank.com/drugs/DB00882 | 3OLS / B |
| 173832 | Droloxifene https://go.drugbank.com/drugs/DB15641 | 3OLS / B |
| 173842 | Chlorotrianisene https://go.drugbank.com/drugs/DB06735 | 3OLS / B |