

1. vaja - umestitev knjižnice spojin na opioidni receptor

Namen vaje je umestiti knjižnico spojin v ligand-vezavno mesto opioidnega receptorja (na izbiro so receptorji delta, mi in kapa) ter rezultate analizirati in interpretirati. Vsi računski koraki so bili opravljeni vnaprej, tako da je vaja demonstrativna v smislu, da zgolj sledite navodilom in si ogledate rezultate vsakega koraka. Natančnejša navodila za samostojno uporabo programa ter osnovne razlage posameznih metod najdete v tutorialu na spletu (http://dock.compbio.ucsf.edu/DOCK_6/tutorials/index.htm).

Umestitev je bila izvedena z računalniškim programom DOCK 6.6, ki je posebej prilagojen za umeščanje knjižnic spojin. Kot slednja je bila uporabljena knjižnica spojin "DrugBank Street-Drugs", ki je na voljo v podatkovni bazi komercialno dostopnih kemijskih spojin ZINC (zinc.docking.org). Na spletni strani poiščite knjižnico med razpoložljivimi katalogi proizvajalcev (zavihek Search → Catalogs) in si oglejte njeno sestavo, velikost in lastnosti spojin. V knjižnico je bilo naknadno ročno dodanih še nekaj dodatnih spojin, tako da celotna umeščena knjižnica vsebuje okoli 340 molekul. Baza ZINC in program DOCK sta bila razvita v istem laboratoriju, zato sta med seboj odlično kompatibilna. Banke spojin v formatu .mol2 lahko namreč direktno uporabimo za umestitev.

Rezultate umestitve (in vmesne stopnje v postopku) bomo analizirali v programu Chimera, ki je program za vizualizacijo molekul z obilico uporabnih dodatnih funkcij. Tudi Chimera je bila razvita na isti univerzi in je zato kompatibilna s programom DOCK. Uporabimo jo lahko za pripravo molekul na umestitev kot tudi za analizo rezultatov.

V Chimeri odprite molekulo opioidnega receptorja (PDB koda 4EJ4 za delta-opioidni receptor, 4DKL za mi-opioidni receptor oz. 4DJH za kapa-opioidni receptor) in si jo glejte. Poiščite vezavno mesto za ligand (namig: ligand je prisoten v strukturi). Izrišite tudi molekulsko površino receptorja z uporabo ukaza Actions → Surface → Show.

Za pripravo na umestitev so bile iz datoteke odstranjene vse neproteinske molekule in dobljen receptor shranjen v obliki *_noH.pdb. Od tega koraka dalje je smiselno, da uporabljate tole strukturo. Po potrebi je ligand shranjen v posebni datoteki formata .mol2. Kot ste spoznali na predavanju, program DOCK deluje tako, da površino receptorja opiše s krogli premera med 1.4 in 4.0 Å. Na ta način generira "negativ" površine, v katerega umesti vsak ligand. V začetni fazi program izračuna krogle po celotni površini receptorja. Oglejte si jih v datoteki all_spheres.pdb.

V naslednji fazi določimo položaj vezavnega mesta in krogle, ki mu ustrezajo. Izbrane krogle so v datoteki selected_spheres.pdb. Oglejte si jih.

V naslednji stopnji določimo dimenzije "škafle", ki obdaja vse krogle. Znotraj te škatle program vse atome receptorja pretvori v tridimenzionalno mrežo določenih dimenzij, ki jo uporabi pri računanju. Vsaka točka oz. kocka v mreži vsebuje povprečje lastnosti vseh atomov v kocki. Škatla je shranjena v datoteki box.pdb. Podlaga za generiranje mreže je funkcija za vrednotenje energije med receptorjem in ligandom.

Ko je mreža generirana, je receptor pripravljen za umestitev poljubnega števila spojin in knjižnic. Rezultati naše umestitve so bili dobljeni z metodo "anchor-and-grow", ki upošteva fleksibilno umeščanje liganda. Rigidnost receptorja se kompenzira z mehkim potencialom ki omogoča do 25 % prekrivanje radijev posameznih atomov liganda in receptorja.

Rezultati umestitve so shranjeni v datoteki "street_drugs.scored.mol2", ki jo v Chimeri odprete z ukazom Tools → Surface/Binding Analysis → View Dock. Na novo odprto okno omogoča ogled posameznih rezultatov umestitve ali večih hkrati ter njihovo sortiranje po različnih parametrih preko menija Column. Preko menija H-bonds lahko tudi za vsak ligand izračunate, koliko vodikovih vezi tvori z receptorjem.

Analizirajte rezultate umestitve in poskušajte preko uporabe baze ZINC in drugih spletnih virov identificirati vezane molekule.

2. vaja – umestitev s programom AutoDock

Namen vaje je spoznati delo s programom AutoDock. Program vsebuje grafični vmesnik, ki je priročen za pripravo receptorja in liganda ter definicijo vezavnega mesta. Molekule receptorjev in ligandov so že vnaprej pripravljene in shranjene v formatu .pdbqt.

Pri vaji boste izhajali iz struktur dveh homolognih receptorjev za serotonin, ki tako kot opioidni receptorji spadajo v družino receptorjev s 7 transmembranskimi vijačnicami (datoteki 4IAQ_receptor.pdbqt in 4IAR_receptor.pdbqt). Vsaka izmed njiju ima vezan antagonist (spravljena sta v datotekah 4IAQ-2GM.pdbqt in 4IAR-EGM.pdbqt), kar omogoča enostavno identifikacijo vezavnega mesta. Cilj vaje bo umestiti vsakega od obeh ligandov na oba receptorja. Poleg tega boste na receptor umestili tudi molekule serotonina (SR0.pdbqt), N-acetilserotonina (ASE.pdbqt) in melatonina (ML1.pdbqt).

1. Definiranje vezavnega mesta na ligandu:

Odprite molekulo receptorja z ukazom *Grid* → *Macromolecule* → *Open*

Za vizualizacijo vezavnega mesta odprite še odgovarjajoč ligand z ukazom *File* → *Read molecule*

Škatlo v katero bo program umeščal molekule, ustvarite z ukazom *Grid* → *Grid Box*. Z drsniki uravnavate velikost in položaj škatle. Izbrano škatlo v okencu potrdite z ukazom *File* → *Close saving current*.

Generirajte mrežo z ukazom *Run* → *Run AutoGrid*. Za vsako vezavno mesto je potrebno mrežo generirati le enkrat.

2. Določanje parametrov umestitve in zagon umestitve:

Najprej izberete molekulo receptorja z ukazom *Docking* → *Macromolecule* → *Set rigid filename*.

Molekulo liganda določite z ukazom *Docking* → *Ligand* → *Open*. Avtomatsko se vam odpre okence ligand parameters, kjer določate različne parametre začetnega stanja liganda. Nastavitve lahko pustite na prednastavljenih vrednostih.

V menijih *Search parameters* in *Docking parameters* so različne nastavitve posameznih algoritmov za iskanje. Za naše potrebe bo zadostovalo, če pustimo vse parametre na privzetih nastavitvah.

V meniju *Docking* → *Output* izberemo iskalni algoritem, ki ga želimo uporabiti. Na voljo je več različnih algoritmov za program **AutoDock** ter dodatno še poseben iskalni algoritem **AutoDock Vina**. Slednji uporablja lastne funkcije za definicijo receptorja in za vrednotenje rezultatov. Je bistveno hitrejši kot AutoDock in je bil razvit za uporabo z večjim številom spojin (knjižnicami). Predlagam, da za vsak ligand preizkusite vsaj Lamarckian genetic algorithm in Vina. V meniju torej izberite ustrezen algoritem in shranite konfiguracijske datoteke (za vsak par receptor/ligand pod svojim imenom). Pri tvorbi konfiguracijske datoteke za AutoDock Vina bodite pozorni še na vrednosti vseh parametrov v okencu, saj so se lahko ohranili še od prejšnje uporabe ali pa še niso vnešeni.

Umestitev zaženete z *Run* → *Run AutoDock* oz. *Run AutoDock Vina*. V vsakem primeru določite ustrezno ime konfiguracijske datoteke in po potrebi vpišite manjkajoče parametre (po potrebi prosite asistenta za pomoč).

3. Analiza rezultatov

Rezultati se shranjujejo v datoteke .dlg oz. *_out.pdbqt pri Vina. Vse datoteke so berljive kot tekstovni dokumenti. Oglejte si datoteke .dlg. Na koncu datoteke so rezultati zgrupirani v skupine (cluster) podobnih rešitev. Za vsako skupino rešitev je podana energetsko najbolj ugodna rešitev (št. Ponovitve) ter izračunana

vezavna energija (kcal/mol) in konstantna vezave. Podobno velja za datoteke ustvarjene z Vina, le da so tukaj podane samo energije v kcal/mol.

Vizualno se **rezultate dobljene z AutoDock** pregleduje preko menija *Analyze*.

Ustvarjene datoteke odprete z ukazom *Analyze* → *Dockings* → *Open*.

Ukaz *Analyze* → *Conformations* → *Play* vam omogoča pregledovanje posameznih umestitev.

Receptor odprete z ukazom *Analyze* → *Macromolecule* → *Open*.

Ukaz *Analyze* → *Dockings* → *Show Interactions* vam za vsako konformacijo liganda pokaže interakcije z receptorjem.

Rezultate dobljene z AutoDock Vina prav tako lahko pregledujete preko menija *Analyze*.

Datoteko odprete z *Analyze* → *Dockings* → *Open AutoDock Vina result*. V okencu, ki se odpre, izberete možnost *single molecule with multiple conformations*, nato se med rezultati pomikate s smernimi tipkami. Število zraven vsake konformacije pomeni energijo vezave (v kcal/mol).

3. vaja – makromolekulska umestitev

V tem delu boste spoznali delo v programu za makromolekulsko umestitev Hex. Program ima grafični vmesnik, ki je enostaven za uporabo.

V meniju *File* so ukazi za odpiranje in shranjevanje molekul.

V meniju *Controls* so povezave, ki odprejo različna ukazna okna za nadzor nad umestitvijo:

Molecule – ukazi za prilagoditev prikaza molekul (skeleton, stranske verige, vodikovi atomi)

Hetero – ukazi za prikaz in aktivacijo (upoštevanje pri umestitvi) heteroatomov (HETATM zapisi v PDB datoteki) in molekul vode

Docking – kontrola nad parametri umestitve, pri vaji bomo spreminjali:

Correlation type – upoštevanje/neupoštevanje prispevka elektrostatskih sil in algoritma DARS za ponovno vrednotenje energije

Post processing – različne funkcije za vrednotenje rešitev

Orientation – omogoča spreminjanje orientacij liganda glede na receptor

Graphics – različne opcije za spreminjanje prikaza molekul

Cilj vaje je zgraditi model liganda vezanega na njegov receptor. Eksperimentalni podatki so pokazali, da lahko ligand interagira z monomernim receptorjem (receptor_monomer.pdb) ali z dimernim receptorjem (receptor_dimer.pdb). V prvem primeru je stehiometrija ligand:receptor enaka 1:1, v drugem primeru pa je stehiometrija ligand:receptor enaka 1:2, ligand pa je istočasno v stiku z obema molekulama receptorja.

Pri uporabi programa Hex je zlasti pomembna začetna orientacija receptorja in liganda, zato priporočam, da preizkusite več različnih možnosti. Prav tako lahko preizkusite več različnih variant parametrov za umestitev. Po končani umestitvi program producira okoli 1000 različnih orientacij, jih združi v klastre po podobnosti rešitev in rangira po naraščajoči energiji interakcije. Med rešitvami se pomikate s tipkama *Pg Down* in *Pg Up*, na začetno stanje se premaknete s tipko *Home*. Vsak model kompleksa lahko po potrebi shranite v obliki .pdb datoteke v meniju *File* → *Save* → *Complex*.