

# 11. GROMACS nello studio dell'interazione enzima-ligando

Esercitazione di dinamica molecolare tratta e riadattata da *GROMACS Tutorial for Drug – Enzyme Complex*, di John E. Kerrigan.

In questa esercitazione analizzeremo la stabilità di un ligando (bis-fenilamidina) nel sito attivo di un enzima (tripsina, codice PDB: 1AZ8) attraverso una simulazione di dinamica molecolare utilizzando il pacchetto **GROMACS**. A scopo puramente didattico simuleremo il sistema enzima-ligando in soluzione per 20 ps.

L'esercitazione è svolta sui sistemi operativi Linux/MAC OS X (il pre-processore **cpp**, se non presente, deve essere installato).

## Gli ingredienti per iniziare

**GROMACS** – Pacchetto gratuito di programmi utilizzati per effettuare simulazioni di dinamica molecolare. Nell'esercitazione sarà utilizzato GROMACS 3.3.3 (versione consigliata). Il software è disponibile gratuitamente sul sito [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org).

**VMD** (opzionale) – Acronimo di *Visual Molecular Dynamics*, è un programma di grafica molecolare gratuito, particolarmente adatto alla visualizzazione delle traiettorie ottenute da simulazioni di dinamica molecolare. In questa esercitazione verrà utilizzata la versione 1.8.6 del programma.

**PRODRG Server** – Servizio disponibile in rete e liberamente accessibile (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrgr/>) per il disegno di piccole molecole e la loro conversione in vari formati, tra i quali alcuni utilizzati da GROMACS.

**Grace** (opzionale) – Programma che consente di visualizzare i grafici con estensione .xvg generati da GROMACS.

## La procedura

I passaggi che compiremo sono i seguenti:

1. Definizione dei potenziali e della topologia del ligando attraverso l'utilizzo del server PRODRG.
2. Definizione dei potenziali e della topologia della macromolecola con GROMACS.
3. Formazione del complesso iniziale enzima-ligando.
4. Solvatazione del complesso.
5. Neutralizzazione delle cariche positive in eccesso del complesso attraverso l'introduzione di ioni cloro con il programma GENION.
6. Minimizzazione energetica del complesso.
7. Dinamica molecolare del complesso.
8. Analisi dei risultati.

## Passaggi preliminari e visualizzazione del complesso

Σ Collegatevi al sito della Protein Data Bank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) e scaricate le coordinate tridimensionali della tripsina bovina complessata con la bis-fenilamidina (codice PDB: 1AZ8). Potete utilizzare direttamente il seguente link:

[www.pdb.org/pdb/download/downloadFile.do?fileFormat=pdb&compression=NO&structureId=1AZ8](http://www.pdb.org/pdb/download/downloadFile.do?fileFormat=pdb&compression=NO&structureId=1AZ8)

Σ Aprite una shell.

Σ Create, a partire dal vostro *Home Folder* (si veda l'esercitazione su Linux), una directory che chiamerete "dinamica". Il comando UNIX è il seguente: *mkdir dinamica*. Copiate le coordinate scaricate (file 1AZ8.pdb) nella cartella appena creata.

Σ Cambiate directory digitando *cd dinamica* (e premete il tasto *Invio*).

Σ Aprite il file con un editor di testo, tagliate la sezione relativa alla molecola IN4 (in fondo al file) e incollatela in un nuovo file, che chiamerete *ligando.pdb*. Salvate il file modificato 1AZ8.pdb nominandolo *macromolecola.pdb*.

Σ Controllate il contenuto della directory digitando *ls* (+ *Invio*) appariranno i nomi dei file *macromolecola.pdb* e *ligando.pdb*.

Σ Controllate la posizione della macromolecola e del ligando aprendo il programma VMD: appariranno due finestre, *VMD main* e *VMD 1.8.3 OpenGL display*.

Σ Dalla finestra *VMD main* selezionate *File > New Molecule*. Apparirà una nuova finestra. Cliccate sul tasto *Browse*, selezionate *macromolecola.pdb* e premete *Ok*. Nella finestra precedente (*Molecule file browser*) premete *Load*. Nella finestra principale comparirà la macromolecola.

Σ Ripetete il passaggio precedente caricando questa volta *ligando.pdb*. Nella finestra principale comparirà il ligando. Chiudete la finestra "*Molecule file browser*" cliccando sulla crocetta in alto a destra.

Σ Dalla finestra *VMD main* selezionate *Graphics > Representations*. Dal menu a tendina *Drawing Method* della nuova finestra selezionate *Licorice*. Chiudete la finestra. Il ligando sarà evidenziato nella tasca dell'enzima. Ruotate il complesso tenendo premuto il tasto sinistro del mouse quando

il cursore si trova sulla finestra *VMD 1.8.3 OpenGL display*.

Σ Chiudete la finestra *VMD main*.

## Definizione dei potenziali e della topologia del ligando attraverso l'utilizzo del server PRODRG

Il passaggio iniziale di ogni simulazione di dinamica molecolare è l'assegnazione dei potenziali agli atomi del sistema. I potenziali definiscono la natura e il comportamento di ogni atomo in un campo di forza (*force field*). GROMACS è in grado di assegnare i potenziali alla macromolecola automaticamente, utilizzando una libreria di parametri standard implementata nel programma stesso, ma non è in grado di fare lo stesso per il ligando. Utilizzeremo quindi il server PRODRG, preposto a tale compito.

Σ Aprite una finestra del browser e collegatevi al sito del server PRODRG. Aprite poi con un editor di testo il file *ligando.pdb*. Vi apparirà il seguente testo:

```
HETATM 1700 C1 IN4 1 28.716 15.623 17.659 1.00 16.42 C
HETATM 1701 C2 IN4 1 28.506 14.923 18.841 1.00 18.48 C
HETATM 1702 C3 IN4 1 28.782 13.556 18.873 1.00 18.89 C
HETATM 1703 C4 IN4 1 29.267 12.908 17.721 1.00 21.94 C
HETATM 1704 C5 IN4 1 29.508 13.625 16.566 1.00 17.30 C
HETATM 1705 C6 IN4 1 29.241 14.976 16.536 1.00 17.20 C
HETATM 1706 C10 IN4 1 29.585 11.486 17.648 1.00 26.82 C
HETATM 1707 C9 IN4 1 31.069 11.356 17.931 1.00 28.60 C
HETATM 1708 C11 IN4 1 31.620 9.964 17.705 1.00 31.95 C
HETATM 1709 C12 IN4 1 33.126 10.033 17.815 1.00 34.09 C
HETATM 1710 C20 IN4 1 29.489 15.728 15.271 1.00 16.24 C
HETATM 1711 N3 IN4 1 30.011 15.183 14.197 1.00 16.67 N
HETATM 1712 N4 IN4 1 29.131 16.979 15.223 1.00 18.28 N
HETATM 1713 C7 IN4 1 33.852 10.479 16.716 1.00 34.64 C
HETATM 1714 C13 IN4 1 35.240 10.605 16.812 1.00 37.07 C
HETATM 1715 C15 IN4 1 35.933 10.228 17.980 1.00 37.86 C
HETATM 1716 C16 IN4 1 37.455 10.315 18.010 1.00 38.03 C
HETATM 1717 C17 IN4 1 35.194 9.749 19.075 1.00 35.11 C
HETATM 1718 C19 IN4 1 33.800 9.677 18.996 1.00 34.20 C
HETATM 1719 N2 IN4 1 38.121 9.896 19.069 1.00 38.28 N
HETATM 1720 N1 IN4 1 38.161 10.792 16.982 1.00 38.92 N
HETATM 1721 C14 IN4 1 28.702 10.577 18.537 1.00 32.09 C
HETATM 1722 C22 IN4 1 27.180 10.796 18.452 1.00 35.07 C
HETATM 1723 O3 IN4 1 26.635 10.960 17.360 1.00 37.55 O
HETATM 1724 O4 IN4 1 26.455 10.749 19.624 1.00 35.70 O
HETATM 1725 C8 IN4 1 25.040 10.869 19.726 1.00 33.88 C
END
```

Σ Selezionate l'intero testo e copiatelo. Chiudete la finestra dell'editor.

Σ Ritornate sulla finestra del sito PRODRG e incollate nell'apposito campo (*Paste your input here*) le coordinate tridimensionali del ligando. Selezionate le seguenti opzioni:

<i>Chirality</i>	<i>Yes</i>
<i>Full charges</i>	<i>Yes</i>
<i>Energy Minimization</i>	<i>No</i>

Σ Cliccate sul tasto *Run PRODRG*. Dopo un po' comparirà la molecola con i potenziali fissati e la topologia (la posizione reciproca degli atomi nello spazio e i loro legami). Di tutti i file generati dal server, a noi ne servono due: un file con le coordinate del ligando leggibili da GROMACS (*Coordinates > GROMOS87/GROMACS*) e un file con i potenziali e la topologia del ligando (*Docking/MD simulations > GROMACS*). Questi due tipi di file saranno richiesti spesso da GROMACS come input nei passaggi successivi. Scorrete il file e cliccate sui collegamenti suddetti. Osservate come sono organizzate le informazioni:

(file con le coordinate leggibili da GROMACS: IN4 è il ligando, 34 è il numero di atomi, ecc.)

#### PRODRG COORDS

```
34
1IN4 N3    1 3.001 1.518 1.420
....
....
```

(file di topologia: sono definite cariche e masse degli atomi, angoli di legame e così via.)

```
[ atoms ]
nr  type resnr resid atom cgnr charge  mass
1   NT   1 IN4   N3    1  0.144 14.0067
2   H    1 IN4   HAA    1  0.072  1.0080
....
...
```

Σ Per continuare la simulazione, questi due file vanno selezionati e salvati (*ligando.gro* e *ligando.itp* rispettivamente) nella directory *dinamica*. Verificate la presenza digitando il comando *ls* nella shell.

L'estensione *.gro* indica che il file è leggibile da GROMACS; *.itp* sta per **information topology**.

## Definizione dei potenziali e della topologia della macromolecola con GROMACS

Come accennato in precedenza, GROMACS è in grado di assegnare i potenziali automaticamente alla macromolecola utilizzando una libreria di parametri standard implementata nel programma stesso.

Σ Nella shell digitate:

```
pdb2gmx -f macromolecola.pdb -o macromolecola.gro -p macromolecola.top
e premete Invio.
```

(*pdb2gmx* genera, a partire da un file *.pdb*, un file *.gro* leggibile da GROMACS e un file di topologia *.top*).

Il programma richiederà il campo di forze da utilizzare nella simulazione: selezioniamo il campo di forze di GROMACS:

*Select the Force Field:*

0: *GROMOS96 43a1 force field*

1: *GROMOS96 43b1 vacuum force field*

2: *GROMOS96 43a2 force field (improved alkane dihedrals)*

3: *GROMOS96 45a3 force field (Schuler JCC 2001 22 1205)*

4: *GROMOS96 53a5 force field (JCC 2004 vol 25 pag 1656)*

- 5: GROMOS96 53a6 force field (JCC 2004 vol 25 pag 1656)
- 6: OPLS-AA/L all-atom force field (2001 aminoacid dihedrals)
- 7: **[DEPRECATED] GROMACS force field (see manual)**
- 8: **[DEPRECATED] GROMACS force field with hydrogens for NMR**
- 9: Encad all-atom force field, using scaled-down vacuum charges
- 10: Encad all-atom force field, using full solvent charges
- 11: AMBER94 Cornell et al. (1995), JACS 117, 5179-5197
- 12: AMBER96 Kollman (1996), Acc. Chem. Res. 29, 461-469
- 13: AMBER99GS Garcia & Sanbonmatsu (2002), PNAS 99, 2782-2787
- 14: AMBER99GSs Nymeyer & Garcia (2003) PNAS 100, 13934-13939
- 15: AMBER99 Wang et al. (2000), J. Comp. Chem. 21, 1049-1074
- 16: AMBER99p Sorin & Pande (2005). Biophys. J. 88(4), 2472-2493
- 17: AMBER99sb Hornak et. al (2006). Proteins 65, 712-725
- 18: AMBER03 Duan et al. (2003), J. Comp. Chem. 24, 1999-2012

## Formazione del complesso iniziale macromolecola-ligando

A questo punto dobbiamo «fondere» macromolecola e ligando in un unico file, che chiameremo *complesso.gro*. Per fare ciò aprite con un editor di testo i due file .gro (macromolecola.gro e ligando.gro) e fondeteli in un unico file (complesso.gro), riprendendo la numerazione del ligando a partire dall'ultimo residuo e dall'ultimo atomo della macromolecola ed eliminando le molecole di solvente (HOH):

```
...
223ASN  C 2097  0.933  2.308  3.868
223ASN  O1 2098  0.920  2.443  3.870
223ASN  O2 2099  1.030  2.236  3.930
224IN4  N3 2100  3.001  1.518  1.420
224IN4  HAA 2101  3.029  1.422  1.421
224IN4  HAB 2102  3.013  1.573  1.337
224IN4  C20 2103  2.949  1.573  1.527
...
```

Lasciate gli ultimi tre numeri del file macromolecola.gro alla fine del file e sostituite il numero nella seconda riga di complesso.gro con il numero di atomi totali che avete ottenuto. Salvate il file.

Σ Bisogna modificare di conseguenza il file macromolecola.top, in modo che si tenga conto del fatto che ora è presente anche il ligando. Nella *shell* digitate:

```
cp macromolecola.top complesso.top
e premete il tasto "Invio"
```

In questo modo il *file* "macromolecola.top" sarà copiato nel nuovo *file* "complesso.top".

Σ Il file complesso.top necessita ancora di qualche modifica. Cercate la linea:

```
; Include forcefield parameters
#include "ffgmx.itp"
```

ed aggiungete la stringa `#include "ligando.itp"`  
Ora il file dovrebbe apparire così:

```
; Include forcefield parameters
#include "ffgmx.itp"
```

```
#include "ligando.itp"
```

- Σ modificate poi la parte finale del file e aggiungete *IN4* sotto *Compound* e 1 (uno) sotto *#mols*  
Ora il file dovrebbe apparire così (eliminando le molecole di solvente):

```
; Compound      #mols  
Protein         1  
IN4           1
```

- Σ Salvate il file. A questo punto avete aggiunto informazione sulla topologia del ligando *IN4* (*#include "ligando.itp"*) e fatto notare a GROMACS che ci sono due molecole, *protein* e *IN4*.

## Solvatazione del complesso

Affinché una simulazione di dinamica molecolare sia attendibile, è necessario porre il complesso molecola-ligando nel suo ambiente: l'acqua (cioè bisogna «solvatare» il complesso). Costruiremo quindi una «scatola» che riempiamo d'acqua e al cui interno porremo il complesso.

- Σ Nella *shell* digitate:

```
editconf -bt cubic -f complesso.gro -o complesso.gro -d 0.5
```

e premete *Invio*; in questo modo definiremo una scatola cubica con il complesso al centro e una distanza di 0,5 nanometri dagli angoli della scatola.

- Σ Riempite la scatola d'acqua digitando:

```
cp complesso.top complesso_idratato.top (+ Invio);
```

```
genbox -cp complesso.gro -cs spc216.gro -o complesso_idratato.gro -p complesso_idratato.top  
(+ Invio);
```

Possiamo controllare che il nostro «nuovo» complesso *complesso\_idratato.gro* sia effettivamente idratato, visualizzandolo, come prima, con il programma *VMD*.

## Neutralizzazione delle cariche positive in eccesso del complesso attraverso l'introduzione di ioni cloruro con il programma GENION

È giunto il momento di minimizzare il nostro complesso. A tal fine, utilizzeremo il seguente protocollo, che salveremo in un file chiamato *em.mdp* nella directory *dinamica* (si vedano il Capitolo 12 e il manuale di GROMACS per maggiori dettagli):

```
title           = esercitazione_dinamica  
cpp            = /usr/bin/cpp ; path di cpp. Usare which cpp su shell  
constraints    = none          ; nessun constraint  
integrator     = steep         ; algoritmo, steepest descents  
dt            = 0.002         ; time-step in picosecondi  
nsteps        = 500           ; numero di iterazioni  
;  
; non modificare da qui in poi  
;  
nstlist        = 10  
ns_type        = grid  
rlist          = 0.9  
coulombtype    = PME  
rcoulomb       = 0.9  
rvdw           = 1.0
```

```

fourierspacing      = 0.12
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
pme_order           = 4
ewald_rtol          = 1e-5
emtol               = 1000.0
emstep              = 0.01

```

Prima di minimizzare energeticamente il complesso dobbiamo controllare che il nostro sistema non contenga artefatti. Qualsiasi macromolecola elettricamente carica in ambiente acquoso viene circondata dagli ioni di carica opposta presenti nell'ambiente affinché la carica sia neutralizzata. Attraverso GENION mimeremo questo effetto.

Σ Controllate la carica netta del complesso digitando:

```
grompp -f em.mdp -c complesso_idratato.gro -p complesso_idratato.top -o complesso_ioni.tpr
```

(+ Invio).

*grompp* è il programma che prepara i file alla minimizzazione energetica e alla dinamica molecolare: controlla che tutto sia a posto prima di iniziare. In questo caso tra i vari messaggi di output il programma ci avverte (con il seguente messaggio) che il sistema ha carica netta +9, cioè servono 9 atomi di Cl<sup>-</sup> per neutralizzare la carica:

**NOTE:**

*System has non-zero total charge: 9.000002e+00*

Σ Eseguite quindi il seguente comando:

```
genion -s complesso_ioni.tpr -o complesso_ioni.gro -nname Cl -nn 9 -g aggiunta_ioni.log
```

Il programma vi chiederà quali atomi volete sostituire con gli ioni cloruro.

Selezionate *Sol* (= solvente).

*-nname* indica che saranno aggiunti ioni cloruro, *-nn* indica che bisogna aggiungere 9 cariche. Il file con gli ioni Cloruro si chiamerà *complesso\_ioni.gro*.

```

Group 0 ( System) has 19656 elements
Group 1 ( Protein) has 2099 elements
Group 2 ( Protein-H) has 1629 elements
Group 3 ( C-alpha) has 223 elements
Group 4 ( Backbone) has 669 elements
Group 5 ( MainChain) has 893 elements
Group 6 (MainChain+Cb) has 1091 elements
Group 7 ( MainChain+H) has 1110 elements
Group 8 ( SideChain) has 989 elements
Group 9 ( SideChain-H) has 736 elements
Group 10 ( Prot-Masses) has 2099 elements
Group 11 ( Non-Protein) has 17557 elements
Group 12 ( IN4) has 34 elements
Group 13 ( SOL) has 17523 elements
Group 14 ( Other) has 17557 elements
Select a group: 13
Selected 13: 'SOL'
Number of (3-atomic) solvent molecules: 5841
Replacing solvent molecule 685 (atom 4188) with Cl
Replacing solvent molecule 4425 (atom 15408) with Cl
Replacing solvent molecule 2851 (atom 10686) with Cl
Replacing solvent molecule 4941 (atom 16956) with Cl

```

*Replacing solvent molecule 1945 (atom 7968) with Cl*  
*Replacing solvent molecule 935 (atom 4938) with Cl*  
*Replacing solvent molecule 2255 (atom 8898) with Cl*  
*Replacing solvent molecule 5175 (atom 17658) with Cl*  
*Replacing solvent molecule 2301 (atom 9036) with Cl*

- Σ Dobbiamo ancora una volta modificare il file `complesso_idratato.top` per considerare nel sistema anche i 9 ioni  $\text{Cl}^-$  aggiunti. Seguite molto attentamente le istruzioni seguenti:

Eseguite il comando:

```
cp complesso_idratato.top complesso_ioni.top
```

`complesso_ioni.top` sarà il nuovo file di topologia utilizzato in seguito all'aggiunta di ioni cloruro.

- Σ Aprite il file `complesso_ioni.top` e cercate la linea:

```
; Include forcefield parameters  
#include "ffgmx.itp"  
#include "ligando.itp"
```

Aggiungete la stringa `#include "ions.itp"`:

```
; Include forcefield parameters  
#include "ffgmx.itp"  
#include "ligando.itp"  
#include "ions.itp"
```

- Σ Modificate poi la parte finale del file: sottraete 9 dal numero delle molecole SOL e aggiungete la seguente linea:

```
Cl          9
```

esempio:

prima avevate:

```
Protein      1  
IN4          1  
SOL         4155
```

dopo avrete:

```
Protein      1  
IN4          1  
SOL         4146  
Cl           9
```

- Σ Salvate il file.

A questo punto avete aggiunto informazione sulla topologia degli ioni  $\text{Cl}^-$  (`#include "ions.itp"`) e fatto notare a GROMACS che ci sono altre nove molecole.

## Minimizzazione energetica del complesso

Siamo pronti per la minimizzazione energetica. Utilizziamo prima *grompp* per preparare i file al processo.

- Σ Eseguite il comando:

```
grompp -f em.mdp -c complesso_ioni.gro -p complesso_ioni.top -o complesso_ioni.tpr
```

Se tutto è andato bene non dovrebbero comparire *warning*.

Σ Il file *em.mdp* contiene il protocollo di minimizzazione energetica. Le seguenti righe in questo file:

```
dt = 0.002 ; ps !
```

```
Nsteps = 500
```

indicano che la minimizzazione andrà avanti per 500 iterazioni da 0,002 ps ognuna (*time step*).

Σ Digitate:

```
mdrun -s complesso_ioni.tpr -o minimization.trr -c complesso_minimizzato.gro -g  
minimization.log -e minimization.edr
```

Questo comando lancia la minimizzazione energetica. Attendiamo finché la minimizzazione non termina. Grazie alla minimizzazione abbiamo rilassato la posizione degli atomi del nostro sistema (le coordinate sono state salvate nel file *complesso\_minimizzato.gro*):

```
Steepest Descents converged to Fmax < 1000 in 335 steps
```

```
Potential Energy = -2.8778688e+05
```

```
Maximum force = 9.9375885e+02 on atom 2107
```

```
Norm of force = 9.6426504e+03
```

## Dinamica molecolare del complesso

Lanciamo a questo punto la dinamica molecolare in ensemble NPT. Utilizziamo prima *grompp* per preparare i file alla dinamica. A tal fine utilizzeremo il seguente protocollo, che salveremo in un file chiamato *md.mdp* nella directory *dinamica* (fate riferimento al Capitolo 12 e al manuale di GROMACS per maggiori dettagli):

```
title          = esercitazione_dinamica  
cpp            = /usr/bin/cpp ; path di cpp. Usare which cpp su shell  
constraints    = all-bonds  
integrator     = md  
dt             = 0.002 ; picosecondi  
nsteps         = 10000 ; totale 20 ps.  
nstcomm        = 1  
nstxout        = 50 ; output di coordinate ogni 0.1 ps  
nstvout        = 0  
nstfout        = 0  
nstlist        = 10  
ns_type        = grid  
rlist          = 0.9  
coulombtype    = PME  
rcoulomb       = 0.9  
rvdw           = 1.0  
fourierspacing = 0.12  
fourier_nx     = 0  
fourier_ny     = 0  
fourier_nz     = 0  
pme_order      = 6  
ewald_rtol     = 1e-5  
optimize_fft   = yes  
; temperature coupling  
Tcoupl         = berendsen  
tau_t          = 0.1 0.1 0.1 0.1  
tc-grps        = protein IN4 sol Cl
```

```

ref_t      = 300   300 300 300
; Pressure coupling
Pcoupl    = berendsen
pcoupltype = isotropic
tau_p     = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p     = 1.0
; generazione di velocità a 300 K.
gen_vel   = yes
gen_temp  = 300.0
gen_seed  = 173529

```

Il file `md.mdp` contiene il protocollo di dinamica molecolare. Le seguenti righe in questo file:

`dt = 0.002 ; ps !`

`Nsteps = 10000`

indicano che la dinamica molecolare durerà 10000 iterazioni da 0,002 ps ognuno.

Σ Eseguite il comando:

```
grompp -f md.mdp -c complesso_minimizzato.gro -p complesso_ioni.top -o complesso_ioni.tpr
```

Σ Infine eseguite:

```
mdrun -s complesso_ioni.tpr -o dinamica.trr -c complesso_dinamica.gro -g
dinamica.log -e dinamica.edr
```

Attendete finché il processo non termina (ci vorranno diversi minuti, a seconda del processore utilizzato). È possibile controllare l'avanzamento del processo attraverso il file `dinamica.log`.

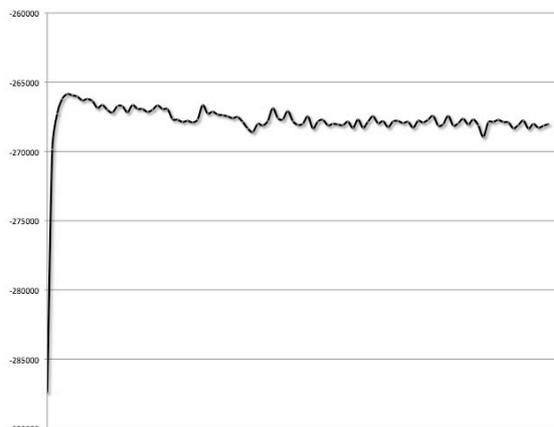
## Analisi dei risultati

Una volta che la simulazione è terminata, analizzeremo i valori di energia potenziale del complesso durante la dinamica molecolare.

Σ Nella shell digitate il comando:

```
g_energy -f dinamica.edr -o pe.xvg (+ Invio)
```

Vi sarà chiesto di indicare il termine energetico di interesse. Digitate il valore corrispondente all'energia potenziale, seguito da uno 0 per indicare che avete terminato la selezione. Se volete, provate ad analizzare altri tipi di energia (dando il comando precedente). Il file generato, `pe.xvg`, contiene il grafico dell'energia potenziale del sistema in funzione del tempo di simulazione ed è visualizzabile attraverso `gnome`.



- Σ Controllate il comportamento della macromolecola e del ligando durante la simulazione aprendo VMD; appariranno due finestre, *VMD main* e *VMD 1.8.3 OpenGL display*.
- Σ Dalla finestra *VMD main* selezionate *File > new molecule*. Comparirà una nuova finestra. Cliccate sul tasto *Browse*, selezionate *complesso\_dinamica.gro* e premete *Ok*. Nella finestra precedente (*Molecule file browser*) premete *Load*. Nella finestra principale apparirà il complesso macromolecola-ligando idratato da molecole dacqua.
- Σ Chiudete la finestra *Molecule file browser* cliccando sulla crocetta in alto a destra.
- Σ Dalla finestra *VMD main* selezionate *Graphics > Representations*. Apparirà una nuova finestra. All'interno del campo *selected atoms* cancellate *all* e digitate *protein*, dopodiché premete *Invio*.
- Σ Dal menu a tendina *Drawing method* selezionate *VDW*.
- Σ Dal menu a tendina *Coloring method* selezionate *Color ID*. La molecola sarà colorata di blu.
- Σ Al posto di 0, accanto a *Color ID*, selezionate 8 (*white*).
- Σ Cliccate ora su *Create Rep* (in alto a sinistra). Apparirà una nuova linea.
- Σ Cancellate *protein* da *selected atoms*.
- Σ Inserite *resname IN4* e premete *Invio*.
- Σ Dal menu a tendina *Drawing method* selezionate *Licorice*.
- Σ Selezionate *Type* come *Coloring method*.
- Σ Chiudete la finestra. Il ligando sarà evidenziato nella tasca dell'enzima. Ruotate il complesso muovendo lentamente il mouse (tenendo premuto il tasto sinistro) quando il cursore si trova sulla finestra *VMD 1.8.3 OpenGL display*.  
Tentate di evidenziare bene ligando ed enzima:
  - premete S e il tasto sinistro del mouse per ingrandire (zoom);
  - premete T e il tasto sinistro del mouse per traslare;
  - premete R e il tasto sinistro del mouse per ruotare.
- Σ Dalla finestra *VMD Main* cliccate su *complesso\_dinamica.gro* (che diventa giallo).
- Σ Dalla finestra *VMD main* selezionate *File > Load data into molecule*. Comparirà una nuova finestra. Cliccate sul tasto *Browse*, selezionate *dinamica.trr* e premete *Ok*. Premete *Load*.
- Σ Chiudete la finestra *Molecule file browser*.
- Σ Dalla finestra *VMD main* selezionate *Display > Ortographic*.
- Σ Dalla finestra *VMD Main* cliccate sull'ultima freccia a destra.
- Σ Ogni *frame* corrisponde a 0,1 ps. Il ligando si distacca dalla macromolecola? Quali possono essere i determinanti strutturali che consentono al ligando di interagire con la macromolecola?

Σ Chiudete la finestra *VMD main*.

