

## 12. Docking di un inibitore della proteasi del virus HIV

Lo scopo di questa esercitazione è prevedere l'interazione tra la proteasi di HIV e l'inibitore XK2 attraverso l'utilizzo di metodologie di docking molecolare. A tal fine, utilizzeremo il pacchetto **AutoDock**. La struttura tridimensionale del complesso è già stata risolta sperimentalmente (codice PDB: 1HVR). A partire da questa struttura, recettore e ligando si troveranno in due file distinti, che saranno poi utilizzati per la simulazione di docking.

L'esercitazione è svolta sui sistemi operativi Linux/MAC OS.

### Gli ingredienti per iniziare

1. **AutoDock** - Nell'esercitazione sarà utilizzata la versione 4.0. AutoDock è scaricabile gratuitamente dal sito <http://autodock.scripps.edu/downloads>.
2. **ADT** - *AutoDock Tools* è un'interfaccia grafica che consente una facile preparazione dei file di input per AutoDock. Nell'esercitazione sarà utilizzata la versione 1.5.4, disponibile su <http://mgltools.scripps.edu/downloads>.

### La procedura

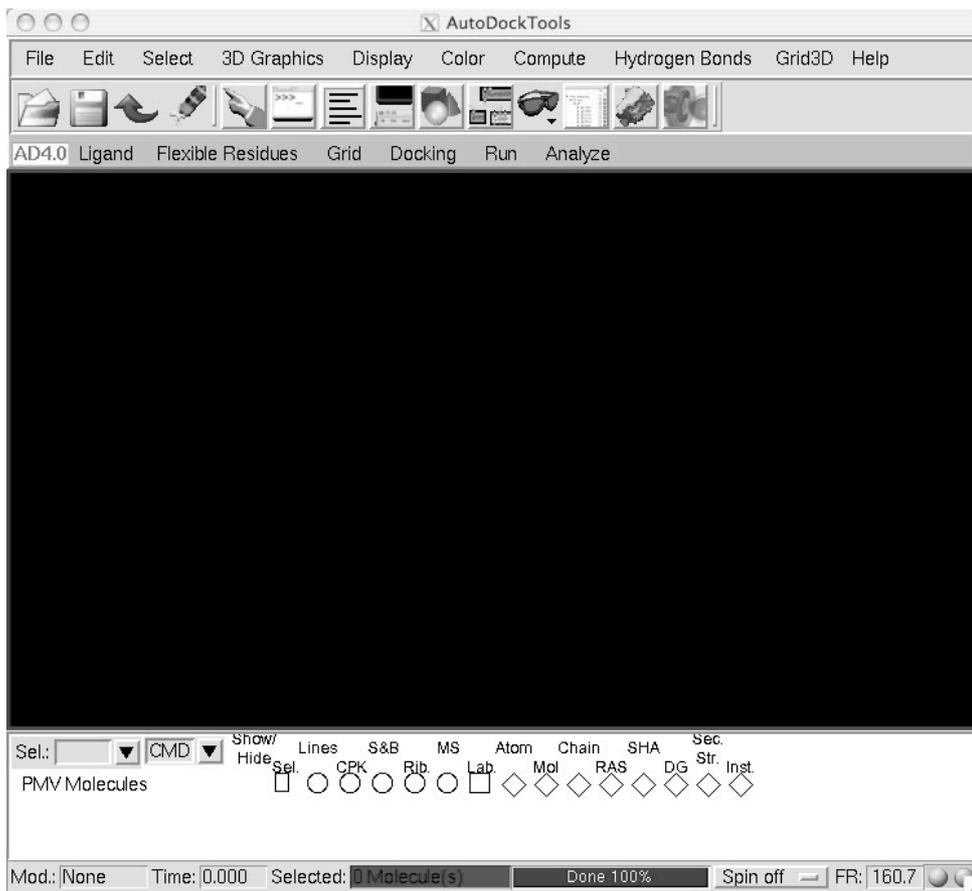
1. Collegatevi al sito della Protein Data Bank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) e scaricate le coordinate tridimensionali della proteasi di HIV in complesso con XK2 (codice PDB: 1HVR). Potete utilizzare direttamente il seguente link:  
<http://www.pdb.org/pdb/download/downloadFile.do?fileFormat=pdb&compression=NO&structureId=1HVR>  
Salvate le coordinate (file 1HVR.pdb) nel vostro *Home Folder* (si veda l'esercitazione su Linux).  
Apriete il file con un editor di testo, tagliate la sezione relativa alla molecola XK2 e incollatela in un file che nominerete *ligando.pdb*. Salvate il file modificato 1HVR.pdb come *1hvr.pdb*.

```

ATOM 1837 CB PHE B 99 -14.374 34.845 33.976 1.00 32.51 C
ATOM 1838 CG PHE B 99 -12.935 34.871 33.522 1.00 36.94 C
ATOM 1839 CD1 PHE B 99 -12.553 34.254 32.395 1.00 36.27 C
ATOM 1840 CD2 PHE B 99 -11.966 35.468 34.362 1.00 39.41 C
ATOM 1841 CE1 PHE B 99 -11.191 34.231 31.935 1.00 36.24 C
ATOM 1842 CE2 PHE B 99 -10.607 35.446 33.996 1.00 36.93 C
ATOM 1843 CZ PHE B 99 -10.227 34.827 32.787 1.00 35.39 C
ATOM 1844 OXT PHE B 99 -14.842 38.047 32.559 1.00 33.50 O
ATOM 1845 H PHE B 99 -14.970 36.317 31.250 0.00 15.00 H
TER
HETATH 1847 C1 XK2 A 263 -8.611 15.060 27.954 1.00 19.90 C
HETATH 1848 O1 XK2 A 263 -7.939 14.039 27.941 1.00 20.46 O
HETATH 1849 N2 XK2 A 263 -8.461 15.923 26.905 1.00 18.96 N
HETATH 1850 C2 XK2 A 263 -7.854 15.351 25.436 1.00 17.53 C
HETATH 1851 C3 XK2 A 263 -8.627 17.388 27.811 1.00 16.64 C
HETATH 1852 O4 XK2 A 263 -10.029 17.910 27.298 1.00 16.75 O
HETATH 1853 O4 XK2 A 263 -9.929 15.274 26.998 1.00 17.28 O
HETATH 1854 O5 XK2 A 263 -10.461 17.645 28.733 1.00 16.33 C
HETATH 1855 O5 XK2 A 263 -11.692 18.254 29.820 1.00 16.28 O
HETATH 1856 O6 XK2 A 263 -10.057 16.152 28.964 1.00 17.82 C
HETATH 1857 N7 XK2 A 263 -9.461 15.294 29.004 1.00 18.56 N
HETATH 1858 C7 XK2 A 263 -9.271 14.491 30.215 1.00 19.97 C
HETATH 1859 C8 XK2 A 263 -8.361 15.798 24.336 1.00 19.60 C
HETATH 1860 C21 XK2 A 263 -9.769 15.712 24.822 1.00 21.97 C
HETATH 1861 C22 XK2 A 263 -10.195 15.919 22.694 1.00 22.13 C
HETATH 1862 C23 XK2 A 263 -9.219 16.152 21.693 1.00 22.78 C
HETATH 1863 C24 XK2 A 263 -9.688 16.394 20.349 1.00 23.58 C
HETATH 1864 C25 XK2 A 263 -8.626 16.508 19.349 1.00 26.36 C
HETATH 1865 C26 XK2 A 263 -7.263 16.562 19.662 1.00 24.91 C
HETATH 1866 C27 XK2 A 263 -6.860 16.403 21.006 1.00 26.95 C
HETATH 1867 C28 XK2 A 263 -7.828 16.192 22.822 1.00 23.18 C
HETATH 1868 C29 XK2 A 263 -7.400 15.983 23.346 1.00 20.82 C
HETATH 1869 C31 XK2 A 263 -7.476 17.972 27.094 1.00 17.00 C
HETATH 1870 C32 XK2 A 263 -6.124 17.890 27.193 1.00 23.82 C
HETATH 1871 C33 XK2 A 263 -5.226 16.826 27.494 1.00 27.22 C
HETATH 1872 C34 XK2 A 263 -4.829 16.667 26.750 1.00 21.82 C
HETATH 1873 C35 XK2 A 263 -3.738 17.585 25.723 1.00 23.48 C
HETATH 1874 C36 XK2 A 263 -4.607 18.660 25.432 1.00 21.61 C
HETATH 1875 C37 XK2 A 263 -5.083 18.811 26.163 1.00 21.66 C
HETATH 1876 C51 XK2 A 263 -11.712 15.451 28.879 1.00 28.34 C
HETATH 1877 C52 XK2 A 263 -12.318 14.248 28.779 1.00 28.04 C
HETATH 1878 C53 XK2 A 263 -13.167 14.422 29.090 1.00 28.49 C
HETATH 1879 C54 XK2 A 263 -13.700 15.201 30.842 1.00 19.34 C
HETATH 1880 C55 XK2 A 263 -13.374 11.982 30.858 1.00 19.90 C
HETATH 1881 C56 XK2 A 263 -12.529 11.814 29.944 1.00 18.59 C
HETATH 1882 C57 XK2 A 263 -11.992 12.954 29.394 1.00 19.66 C
HETATH 1883 C70 XK2 A 263 -9.374 15.148 31.571 1.00 20.15 C
HETATH 1884 C71 XK2 A 263 -10.228 14.492 32.477 1.00 22.33 C
HETATH 1885 C72 XK2 A 263 -10.272 14.926 33.088 1.00 24.25 C
HETATH 1886 C73 XK2 A 263 -11.156 14.282 34.709 1.00 29.56 C
HETATH 1887 C74 XK2 A 263 -11.245 14.748 36.044 1.00 29.18 C
HETATH 1888 C75 XK2 A 263 -10.435 15.037 36.451 1.00 26.45 C
HETATH 1889 C76 XK2 A 263 -9.540 16.475 36.553 1.00 25.15 C
HETATH 1890 C77 XK2 A 263 -9.458 16.028 34.212 1.00 23.69 C
HETATH 1891 C78 XK2 A 263 -8.605 16.691 33.288 1.00 21.00 C
HETATH 1892 C79 XK2 A 263 -8.374 16.252 31.962 1.00 18.90 C
CONNECT 624 631
CONNECT 631 624 632 630
CONNECT 632 631 633 635
CONNECT 633 632 634
CONNECT 634 633 637
CONNECT 635 632 636 640
CONNECT 636 635

```

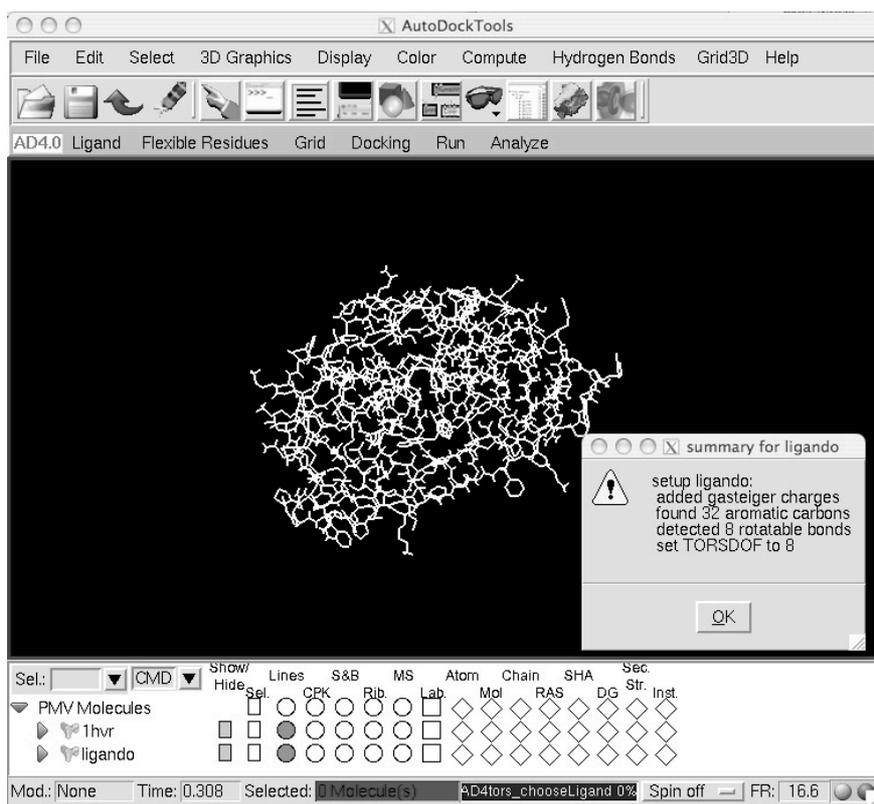
Apriete *AutoDock Tools* (per esempio: *Applications -> MGLTools -> AutodockTools*). Verrà caricato il programma ADT. Selezionate, quando richiesto, la versione **4.0** di AutoDock



## 2. Caricate la proteasi:

*File -> Read Molecule ->* (si apre una finestra di selezione, scegliete *1hvr.pdb*).

3. A questo punto dovrebbe apparire la proteasi sullo schermo. Familiarizzate con i movimenti della molecola:
  - muovendo la rotella centrale del mouse, la molecola ruota;
  - tasto destro: traslazione
  - rotellina del mouse: zoom
  - Shift + tasto centrale: zoom
  - premendo il tasto N sulla tastiera la molecola si posiziona al centro dello schermo.
4. Caricate l'inibitore:  
*File -> Read Molecule ->* (si apre una finestra di selezione, scegliete *ligando.pdb*).
5. Premete il tasto N sulla tastiera per normalizzare la visuale del ligando.
6. A questo punto inizia il docking vero e proprio. Prima di tutto bisogna preparare il ligando, definendo i suoi atomi, i suoi potenziali e i suoi gradi di libertà; cliccate su:  
*Ligand -> input -> choose -> ligando* e selezionate *Select molecule for Autodock4*.



7. A questo punto il programma automaticamente riconosce gli atomi e la loro «natura» (potenziali atomici) colorando il ligando (rosso = ossigeno; blu = azoto; celeste = idrogeno polare; grigio e verde = atomi di carbonio alifatici e aromatici, rispettivamente). Comparirà una finestra con un messaggio che descrive ciò che ha fatto il programma. Premete su *OK*.
8. Esaminiamo quali sono le torsioni possibili (legami flessibili, un grado di libertà in più per ognuno di essi):  
*Ligand -> Torsion Tree -> Set Number of Torsions*

A questo punto i legami flessibili diventano verdi, quelli fissi rossi. Tentate di centrare il ligando sullo schermo. È possibile variare il numero di torsioni (8 in questo caso) agendo sulle frecce della finestra apparsa. Lasciate 8 torsioni e premete su *Dismiss*.

9. Salvate il ligando con le cariche assegnate: *Ligand -> Output -> Save as PDBQT* (salvate il file con nome *ligando.out.pdbqt*).

10. Prepariamo ora la macromolecola (proteasi) per il docking. Per prima cosa occorre definire l'ambiente nel quale far evolvere le soluzioni candidate. Selezionate la molecola:

*Grid -> Macromolecole -> Choose -> 1hvr -> Select Molecule*

Comparirà una finestra che vi informerà che il programma ha riconosciuto gli atomi. Premete su *OK*. Salvate il file con nome *1hvr.pdbqt*.

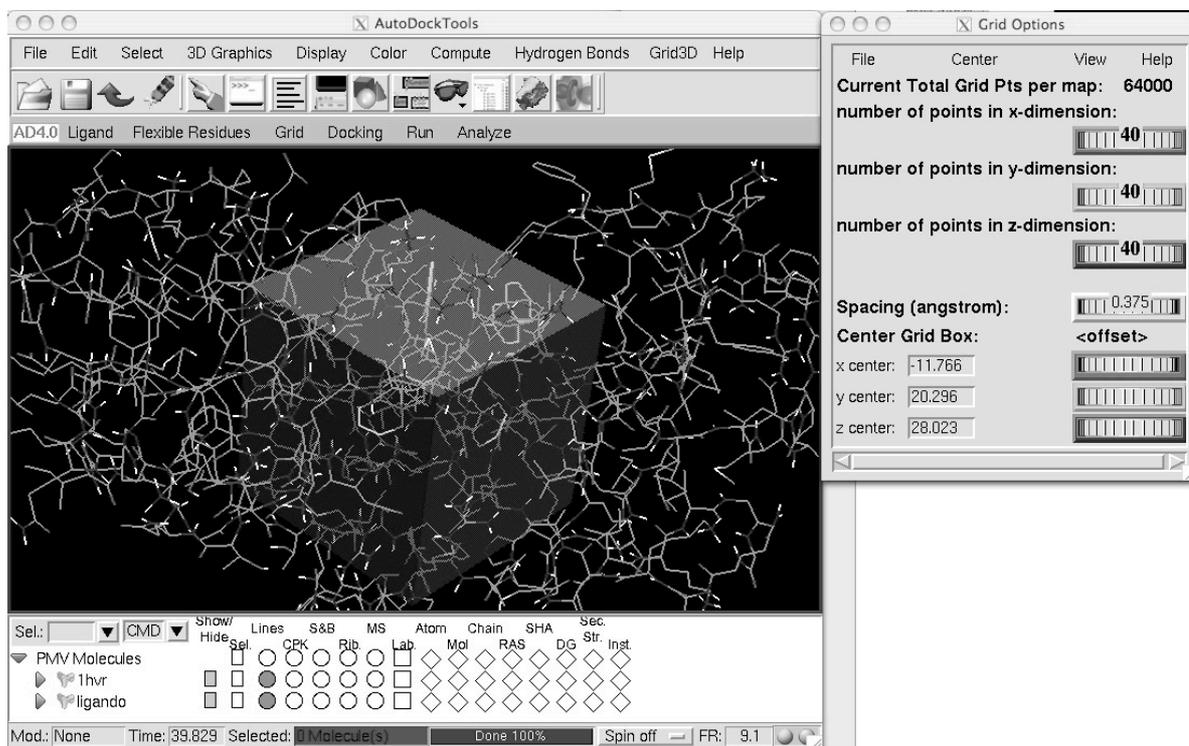
11. Costruiamo la griglia di docking:

Tentate di centrare la macromolecola sullo schermo. Poi selezionate:

*Grid -> Grid Box ->* (apparirà la griglia e la finestra per modificarla)

Aumentate un po' le dimensioni della griglia: ruotate le rotelline indicate dalla voce *number of points in x, y, z dimension* premendo con il tasto sinistro finché i nuovi valori non saranno 50 in tutte e tre le rotelle in alto. Tentate di porre la griglia in modo che comprenda la cavità centrale della molecola ruotando le rotelline di *offset* (vi potete aiutare con la visualizzazione selezionando nella finestra *Grid Options* la voce *View grid box as lines*). La stellina gialla dovrà trovarsi circa al centro della cavità. Quando pensate di aver trovato la posizione corretta, all'interno della stessa finestra (*Grid Options*) salvate la nuova griglia:

*File -> Close Saving Current*



12. Salviamo i parametri della griglia:

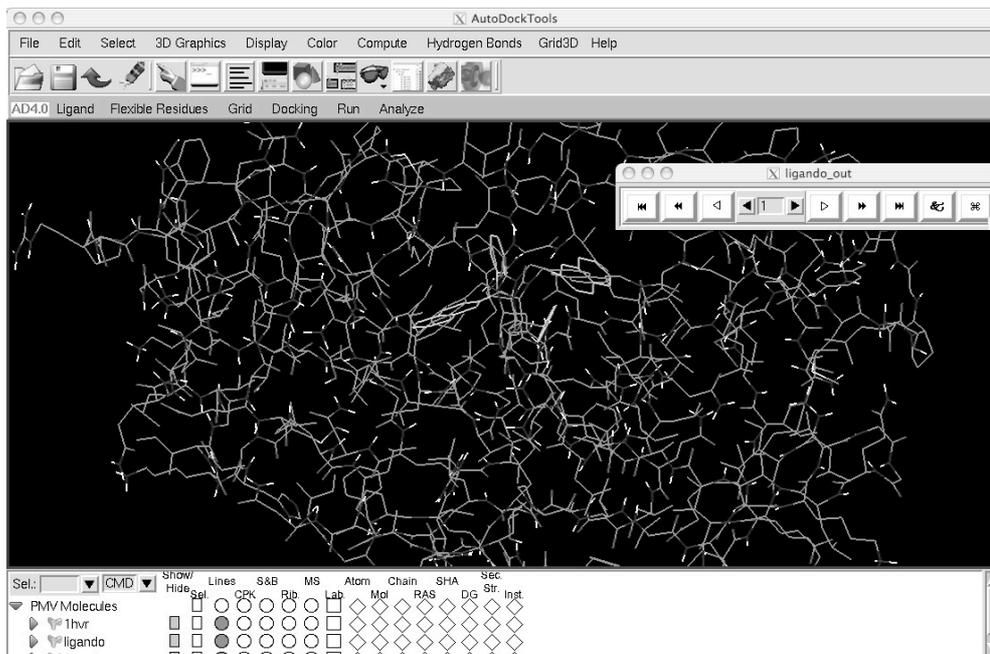
*Grid -> Output -> Save GPF ->* (chiamiamolo *1hvr.gpf* e salviamo).

13. Diamo uno sguardo a questo file:

*Grid -> Edit GPF*

Notate il numero di punti sulla griglia modificata (50, 50, 50). Premete su *OK*.

14. Ora è tutto pronto per il docking vero e proprio. Selezionate la macromolecola:  
*Docking -> Macromolecole -> Set Rigid Filename -> Ihvr.pdbqt.*
15. Selezionate il ligando:  
*Docking -> Ligand -> Choose Ligand -> ligando -> Select Molecule* (comparirà una finestra nella quale è possibile modificare alcuni parametri del ligando). Premete su *Accept*.
16. Osserviamo i parametri dell'algoritmo genetico:  
*Docking -> Set Search Parameters -> Genetic Algorithm Parameters*  
Notate le seguenti voci: *Initial population size, rate of gene mutation, rate of crossover*; da questa finestra è possibile modificare l'evoluzione delle soluzioni di docking. Modificate la voce *Maximum Number of evals* da *medium* a *short* e premete su *Accept*.
17. Salviamo i parametri del docking:  
*Docking -> Output -> Lamarckian GA ->*(chiamate il file *Ihvr.ligando.dpf*).
18. Controllate i parametri del file appena creato:  
*Docking -> edit DPF*  
Poi premete *OK*.
19. È il momento di lanciare il docking; prima di tutto il programma **AutoGrid** definirà le «caratteristiche» dell'ambiente nel quale evolverà la nostra popolazione:  
*Run -> Run Autogrid ->* (si apre una finestra con i comandi che saranno eseguiti) -> premete *Launch*.  
A questo punto il programma impiegherà qualche minuto, a seconda della potenza del processore. Attendete che la finestra del processo di *Autogrid* si chiuda automaticamente.
20. Ora lanciamo il docking:  
*Run -> Run Autodock ->* si apre una finestra con i comandi che saranno eseguiti -> premete *Launch*. Il programma impiegherà qualche minuto. Attendete che la finestra del processo di *AutoDock* si chiuda automaticamente. Potete controllare l'avanzamento di *Autodock4* digitando il comando *top* all'interno di una shell.
21. È arrivato il momento di analizzare i risultati: carichiamo il file di output di *AutoDock*:  
*Analyse -> Dockings -> Open ->* (selezionate *Ihvr.ligando.dlg*).
22. Analizziamo la «classifica» dei risultati migliori con le relative energie di interazione:  
*Analyse -> Conformations -> play, ranked by energy* (apparirà una finestra con i risultati ordinati in maniera decrescente; potete vedere i risultati delle migliori pose utilizzando le frecce). Selezionate il miglior risultato (1) e confrontatelo con la struttura sperimentalmente risolta. Cliccate sulla "&" della finestra e selezionate *Show\_info*. Annotate l'energia relativa di *binding* (per esempio, *binding energy*: -20.92).

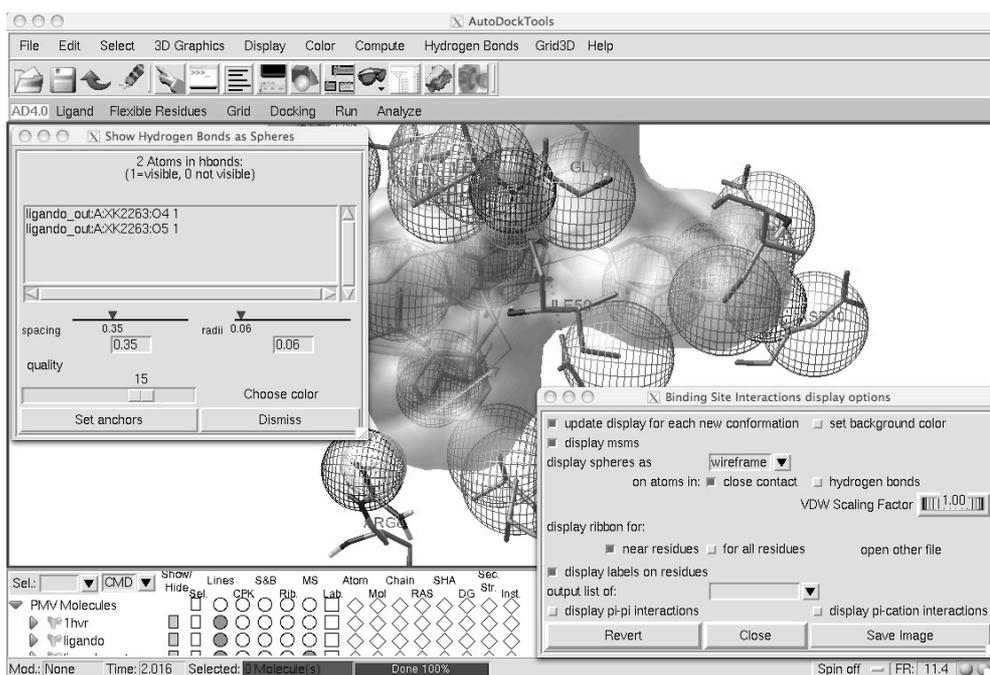


23. Tentate di capire che tipo di interazioni si formano tra molecola e ligando.

*Analyse ->Macromolecule -> Choose...-> 1hvr*

*Analyse ->Dockings -> Show Interactions*

Tentate di comprendere il significato delle finestre che appariranno. Alla fine cliccate sul tasto *REVERT*.



28. Al termine dell'esercitazione, ripulite il vostro *Home Folder*. Nella finestra che si apre digitate:  
rm 1hvr\* (+ *Invio*)  
rm ligando\* (+ *Invio*).