

TP3: Estudios de Dinámica Molecular

Docentes a cargo:

Dr. Juan Pablo Bustamante

Dra. María Cecilia Gómez

Diseño & Descubrimiento de Drogas

- FI-UNER 2022 -

1- Introducción

Como hemos visto a lo largo de los TPs realizados, la SIRT1 constituye un prometedor blanco terapéutico, motivo por el cual ha sido elegida como sistema a trabajar. También hemos visto que no es suficiente con estudiar, por separado, a la proteína y posibles compuestos que puedan interaccionar con ella, si no que es importante estudiar posibles maneras de interacción, evaluadas a través del docking molecular. Sin embargo, este enfoque puede (y debe) complementarse con un grado de realismo mayor, puesto que, como quedó explicitado al final del TP2, las proteínas se mueven constantemente y presentan regiones con distintos grados de flexibilidad, por lo que el resultado del docking puede verse alterado, ya sea con cambios menores o incluso muy significativos, dependiendo del caso. En este sentido, una vez en su sitio de unión, el ligando debe acomodarse, interaccionar con su receptor atravesando un proceso dinámico en el que, muchas veces, ambos se acomodan para maximizar interacciones. Este momento es en el que, como ya saben, las moléculas de agua pueden jugar un rol preponderante en muchos complejos receptor-ligandos.

En este TP realizarán simulaciones de dinámica molecular para analizar la dinámica del receptor y evaluar la permanencia en el tiempo de los modos de docking arribados en el TP anterior, lo que dará información más robusta sobre estos modos de unión y las interacciones que permitan a los ligandos mantenerse estabilizados. Harán diversos análisis que contribuirán de distinta manera al mismo objetivo.

2- Procedimiento

NOTA 1: Cree una carpeta para el trabajo actual y trabaje siempre desde allí.

2.A- Preparación de los sistemas

2.1- Llevaremos a cabo los estudios de dinámica molecular con **complejos propuesto por la cátedra para el TP2**.

Se debe emplear el módulo “Antechamber” para generar la información de entrada al paquete AMBER. Para ello se utiliza como punto de partida el archivo .log de Gaussian proveniente de los estudios de modelado molecular.

NOTA 2: Antes de seguir, es altamente recomendable que trabaje en una carpeta separada para cada sistema.

Para cada ligando, ejecute el siguiente comando:

```
antechamber -fi gesp -i compuestoN.gesp -fo prepi -o compuestoN.prepin -c resp
```

2.2- En una segunda instancia se requiere generar información complementaria requerida por el campo de fuerzas empleado para la simulación de dinámica molecular. A tal fin se emplea el módulo “parmchk”. Ejecutar:

```
parmchk -f prepri -i compuestoN.prepin -o compuestoN.frcmod
```

2.3 - Por medio del módulo tLeap generaremos los archivos propios necesarios para la dinámica, como vieron en la materia de “Modelado y Simulación de Macromoléculas” (M&SM). (archivos .prmtop y .rst7).

Empleando el módulo tLeap, ejecuta (realizar los cambios necesarios para que los comandos sean correctos en su pc):

```
source leaprc.gaff
loadamberprep compuestoN.prepin
loadamberparams compuestoN.frcmod
loadamberprep ../ZAFF/ZAFF.prep
loadamberparams ../ZAFF/ZAFF.frcmod
```

¿Recuerda para qué eran las últimas dos líneas de los comandos anteriores?

Tome las estructuras de los dockings generados en el TP2, es decir, un archivo pdb con el complejo SIRT1-compuestoN. Haga una copia y renómbrelo ahora, dentro de su carpeta del TP3, como SIRT_CompuestoN.pdb. Adecue el archivo, borrando la primera línea si la hay (cabecera) y agregando la palabra TER luego de cada molécula. Cargue la estructura en tLeap con la siguiente instrucción:

```
SIRT_CN=loadpdb RUTA_DONDE_ESTA_EL_ARCHIVO/SIRT_CompuestoN.pdb
```

Agregue contraiones y aguas de solvatación:

```
addions SIRT_CN Na+ 0
solvateoct SIRT_CN TIP3PBOX 9.0
```

Por último, guarde los archivos requeridos para correr la simulación y un pdb. Verifique la correcta creación de todos los archivos.

```
saveamberparm SIRT_CN SIRT_CN.prmtop SIRT_CN.rst7
savepdb SIRT_CN SIRT_CN.pdb
```

Informe en su TP que tipo de solvente se utilizará en la dinámica molecular.

A este punto, debe tener listos 3 sistemas en total:

1. proteína con ligando 1 en una pose dockeada.
2. proteína con ligando 2 en una pose dockeada.
3. proteína con ligando 3 en una pose dockeada.

Le brindaremos también un cuarto sistema que corresponde a la forma apo de la enzima

2.B- Protocolo de dinámica molecular

El protocolo a utilizar constará de las siguientes etapas:

1. Minimización
2. Termalización (1ns)
3. Equilibrado (2ns)
4. Dinámica de producción (50ns, de a 5ns por corrida)

Para cada etapa, dispone de un script generado por la cátedra.

NOTA 3: Los docentes le facilitaremos todas las salidas pre-calculadas de programas que utilice durante el desarrollo del mismo.

NOTA 4: Si no recuerda alguna etapa o algún parámetro de uso, repase los conceptos y usos del material brindado durante la materia “Modelado y Simulación de Macromoléculas”.

2.C- Control de las simulaciones y análisis generales

Centre las 4 trayectorias (recuerde que esto incluye -resetear la visualización- de la proteína y todas las moléculas de agua para que se visualicen todas dentro de la celda unidad). Calcule el RMSD y RMSF del receptor incluyendo el ligando, para cada caso. Solo para RMSD, además calcúlelo para:

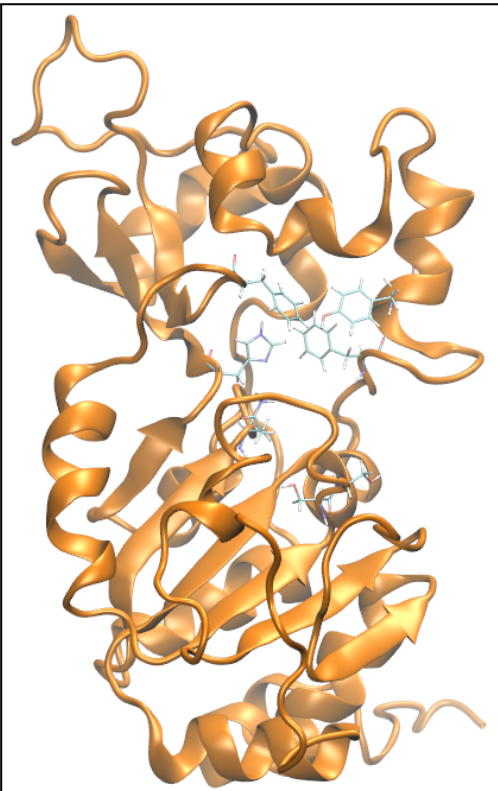
1. el receptor solo
2. el receptor sin considerar extremos móviles (si los hubiese). **¿Cómo lo verifica?**

Abra los archivos generados con el *xmgrace* (o *grace*, dependiendo de la versión instalada). Añada los ejes correspondientes y guarde las imágenes. Sugerencia: en algún caso puede que le convenga graficar más de un análisis a la vez, para poder compararlos mejor.

Interprete y deje por sentado su apreciación para cada caso. **¿Las MDs están convergidas?**
¿Qué puede decir de los comportamientos observados en los distintos RMSDs (intra e inter sistemas)? ¿Y en cuanto a los RMSFs?

2.D- Análisis de los modos de unión

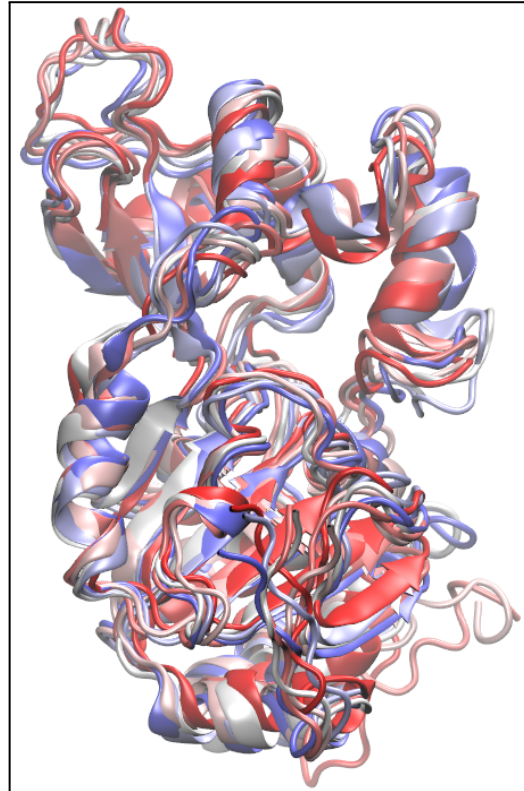
De los siguientes eventos para cada simulación de dinámica molecular, identifique cuál es el más representativo en cada caso, justificando su respuesta:



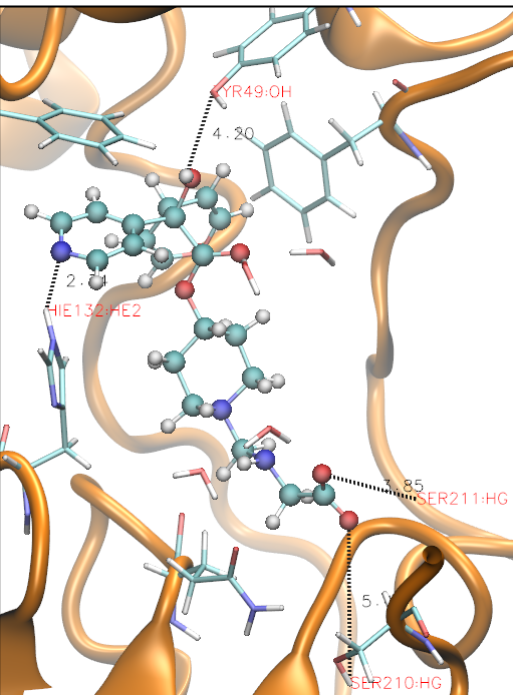
Sistema 1-A



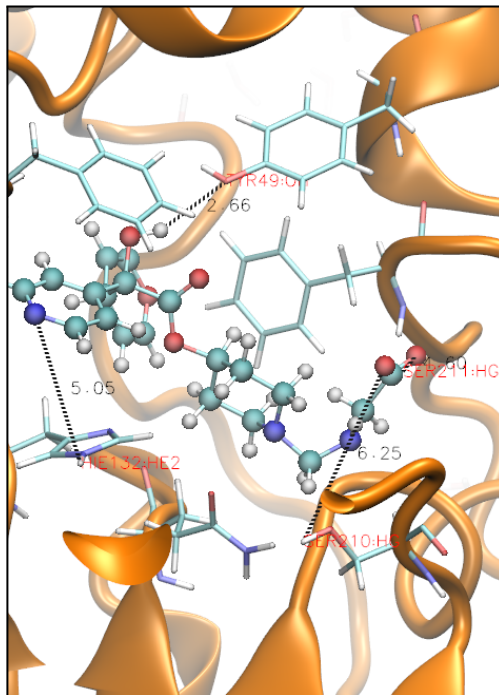
Sistema 1-B



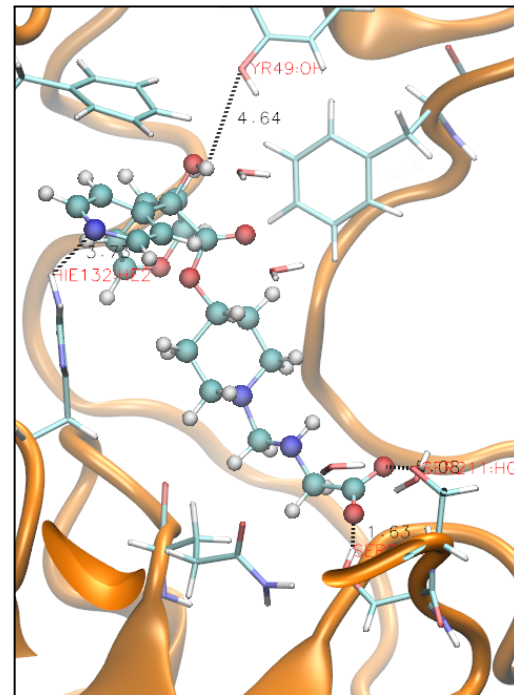
Sistema 1-C



Sistema 2-A



Sistema 2-B



Sistema 2-C

Ahora, para los sistemas 3 y 4, identifique cuál podría llegar a ser una figura representativa de la simulación, muéstrela, puede acompañarla de mediciones y/o de gráficos cuantitativos. Justifique su respuesta.

Discusión

1. En este TP se ha trabajado con la estructura del receptor SIRT1 apo obtenida del TP 1, partiendo de su forma cerrada con el cofactor APR.
 - a. ¿Cómo se obtuvo dicha estructura apo?
 - b. ¿La estructura global del receptor en este estado se mantuvo durante la simulación de dinámica molecular o hubo algún cambio que considere importante? ¿y hubo cambios menores en la estructura?
 - i. Mencione los análisis realizados que le permitieron arribar a una o más conclusiones al respecto.
 - ii. ¿Qué puede concluir sobre el estado apo y su evolución en función del tiempo si considera la información sobre los estados cerrado y abierto del receptor descritos en la publicación de Andrew M. Davenport *et. al.* 2014¹?
Sugerencia: básiese en la información brindada por la figura 5 y ayúdese con el resto.
2. Considerando los resultados del TP 2, es decir, el receptor con los 3 ligandos dockeados, ¿a qué conclusiones puede arribar comparando los resultados de las simulaciones de dinámica molecular para cada caso? Mencione sus conclusiones, para **cada caso de ligando**, respecto a:
 - a. ¿qué sucedió con las interacciones adquiridas durante los dockings? ¿se perdieron algunas y otras se ganaron? ¿cuáles? Muéstrelas en al menos una figura;
 - b. ¿se generaron interacciones mediadas por moléculas del solvente? ¿esporádicas o se mantienen en el tiempo? Muéstrelas en al menos una figura, puede ayudarse a justificar la segunda pregunta adjuntando un gráfico cuantitativo;
 - c. ¿qué cambios observó en el receptor, a nivel global o locales? muéstrelas con figuras y, en lo posible, también con gráficos cuantitativos.
3. Finalmente, de su conclusión sobre la relevancia de este tipo de estudios (TP 3), luego de un estudio de docking, para el sistema del receptor SIRT1 y los ligandos estudiados.

¹ Davenport AM, Huber FM, Hoelz A. *Structural and functional analysis of human SIRT1*. J Mol Biol. 2014 Feb 6;426(3):526-41. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.009.