

TUTORIAIS PARA O CÁLCULO DE ENERGIA LIVRE POR MÉTODOS ALQUÍMICOS UTILIZANDO AMBER 24

Autor: Dr. Jorge E. Hernández

E-mail: jorge.hernandez@unesp.br

Introdução Geral

Os métodos alquímicos são abordagens computacionais que possibilitam o cálculo de energia livre em sistemas moleculares. Neste minicurso iremos apresentar três tutorias que permitirão rodar cálculos de energia livre alquímicos no pacote de programas Amber 24. As simulações de DM serão rodadas no programa pmemd.cuda, a versão que possibilita rodar em GPUs com um aumento expressivo da performance, e os cálculos de energia livre serão feitos pelo método de integração termodinâmica (IT) a partir dos resultados obtidos nas simulações de DM.

Abaixo, estaremos apresentando tutoriais para a execução de cálculos de energia livre em três cenários diferentes, utilizando como modelo o complexo da lisozima T4 (LYZ) e o benzeno (BNZ).

Os programas utilizados para os cálculos de energia livre e visualização das estruturas nos tutoriais apresentados abaixo são:

-Amber24 (<https://ambermd.org/GetAmber.php>)

-VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)

-Pymol (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)

-Alchemical_analysis (<https://github.com/MobleyLab/alchemical-analysis>)

Os apresentados aqui foram inspirados por outros tutoriais disponibilizados na internet e que usam os mesmos complexos para as análises. Modificações foram realizadas para adaptar todas as etapas descritas previamente aos programas de Amber24. Em caso de houver interesse, esses tutoriais podem ser acessados nos seguintes links:

http://www.alchemistry.org/wiki/Absolute_Binding_Free_Energy_-_Gromacs_2016

<https://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial9/index.html>

Tutorial 1. Cálculo da variação de energia livre de ligação associada a modificação química de um ligante

Introdução

Neste primeiro tutorial, iremos utilizar a estrutura da LYZ em complexo com BNZ (PDB: 181L, Figura 1) para prever como a modificação do BNZ para fenol (PHN) afeta a ligação à proteína. Ou seja, queremos saber se a introdução de um grupo hidroxila na estrutura do BNZ potencializa ou não a afinidade do ligante pelo alvo proteico. Para isto, iremos prever a energia livre de ligação relativa ($\Delta\Delta G$) dos dois ligantes com a LYZ.

Em geral, este é um problema muito comum na fase de otimização da estrutura de um composto líder, o qual queremos tornar mais potente contra o alvo de interesse. O presente tutorial mostrará como realizar as etapas básicas para o cálculo de $\Delta\Delta G$ no sistema anteriormente indicado.

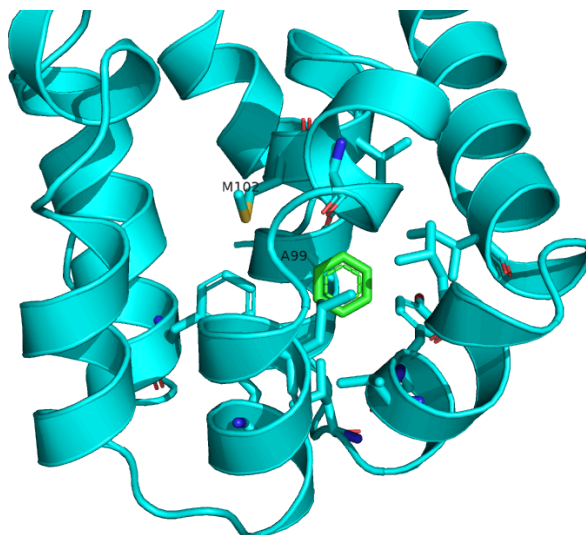


Figura 1. Representação da estrutura da LYZ (ciano) em complexo com o BNZ (verde) (PDB 181L). O resíduo A99, que será mutado por V, foi rotulado. Outros resíduos em contato com o BNZ aparecem representados em varetas.

As transformações alquímicas a serem realizadas para a predição do valor de $\Delta\Delta G$ dos ligantes BNZ e PHN estão representadas no esquema abaixo (Figura 2). O valor de $\Delta\Delta G$ é obtido a partir dos valores preditos para os processos alquímicos C e D segundo a equação a seguir:

$$\Delta\Delta G(\text{LYZ: BNZ} \rightarrow \text{PHN}) = \Delta G(\text{LYZ: PHN}) - \Delta G(\text{LYZ: BNZ}) = \Delta G(C) - \Delta G(D) \quad (\text{eq 1})$$

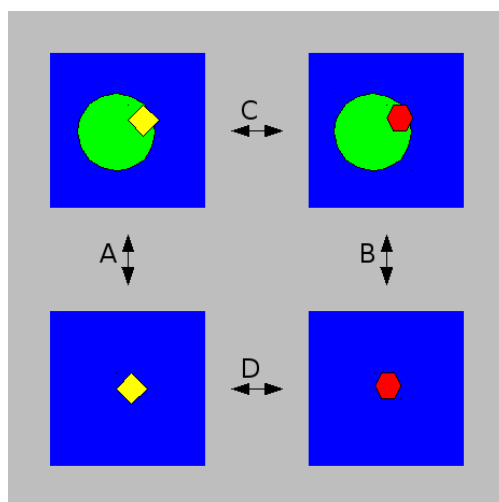


Figura 2. Esquema do ciclo termodinâmico utilizado para a predição de $\Delta\Delta G$ por métodos alquímicos. Os processos A e B correspondem a processos reais de ligação dos ligantes BNZ (diamante em amarelo) e PHN (hexágono vermelho) à LYZ. Os processos C e D são processos não físicos (alquímicos) que envolvem a transformação de um ligante em outro tanto no sítio de ligação da proteína e como em meio aquoso, respectivamente.

A equação 1 indica que a diferença entre as energias de ligação do PHN e do BNZ com a LYZ pode ser obtida subtraindo as energias alquímicas dos processos C e D da Fig. 2 na direção da transformação de BNZ para PHN.

As transformações alquímicas podem ser realizadas em uma etapa (one step), conforme mostrado na Fig. 3. Porém, esta abordagem de etapa única apresenta problemas de convergência e é comum, portanto, realizar as etapas associadas a modificações de carga (transformações eletrostáticas) e de van der Waals separadamente (abordagem chamada de duas etapas, embora para o presente objetivo de calcular energia livre relativa, realizaremos três etapas). A Figura 3, na parte inferior, mostra as três transformações alquímicas a serem realizadas na estrutura do BNZ a fim de converter esta molécula em PHN. As três etapas representadas correspondem à 1) descarga do átomo de hidrogênio do BNZ e que virará futuramente hidroxila no PHN, 2) transformação de van der Waals, onde o hidrogênio irá desaparecer e os átomos descarregados da hidroxila irão aparecer e 3) a recarga dos átomos de hidroxila recém criados. Cada uma das três etapas é realizada separadamente tanto para o ligante em solução quanto ligado à proteína, totalizando 6 transformações alquímicas. Por sua vez, cada transformação alquímica envolverá a execução de simulações de DM com 21 valores de lambda ($\lambda=0.00, 0.05...0.95, 1.00$).

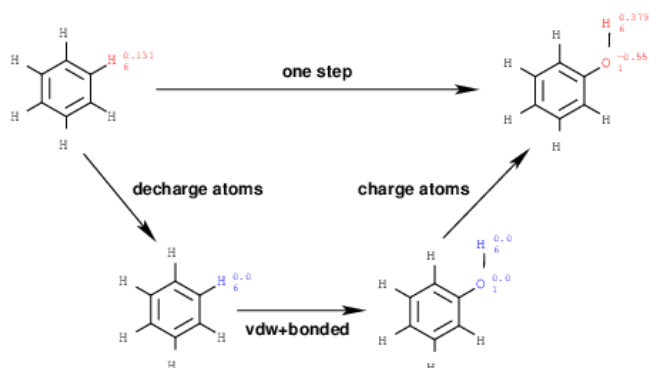


Figura 3. Estratégias de transformação alquímica em uma ou duas etapas. Na primeira abordagem, todos os parâmetros (cargas e parâmetros de van der Waals) são modificados progressivamente a fim de transformar o BNZ em PHN. Na estratégia em duas etapas, as transformações eletrostáticas e de van der Waals são separadas.

Passo a passo

Depois de termos explicado de forma teórica a realização do cálculo de $\Delta\Delta G$, vamos explicar na prática como executar as simulações e o processamento dos dados gerados nas simulações a fim de obter o valor de $\Delta\Delta G$ para a modificação proposta.

Antes de começarmos, é importante configurar o ambiente para rodar os programas de AmberTools23. Para isso, pode ser necessário realizar os seguintes passos no terminal:

conda deactivate #(se o ambiente *base* do conda estiver ativo)

conda activate AmberTools23

1) Acesse o diretório *Relative_free_energy_calculations_lysozyme*. Ele contém vários diretórios que vão ser utilizados ao longo deste tutorial.

2) Dentro de *setup* acesse o diretório *leap*.

Em *leap* irão aparecer vários arquivos pdb. O arquivo 181l.pdb contém as coordenadas do complexo LYZ:BNZ e foi descarregado do site do PDB (<https://www.rcsb.org/structure/181L>).

3) Para a execução das simulações de DM é necessário adicionar os átomos de H nas moléculas de LYZ e BNZ, ausentes na estrutura determinada por difração de raios X. Os átomos de H na proteína serão adicionados no site <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr> que utiliza o software propKa para prever os pKa's dos resíduos ionizáveis. No site indicado, selecione a estrutura a ser processada carregando-a desde seu computador ou digitando o código PDB. Selecione o campo de força e nomenclatura de Amber para a realização dos cálculos e clique em Start job. Após a finalização do cálculo, descarregue o arquivo .pqr que irá conter a estrutura da LYZ com os átomos de H adicionados. Carregue o arquivo .pqr no pymol e salve em formato pdb com o nome LYZ.pdb.

4) Para adicionar os átomos de H do BNZ, carregue o arquivo 181l.pdb no pymol e selecione a molécula do BNZ clicando acima dela na representação estrutural. Digite *extract bnz, sele* no Pymol command line para extrair os átomos do BNZ e criar um novo grupo chamado de bnz que irá aparecer no painel da direita do programa. Clique em A (actions) no novo grupo BNZ e selecione *hydrogens -> add*. Salve em formato de mol2 a molécula de BNZ hidrogenada sob o nome bnz.mol2.

5) Também precisaremos da estrutura do PHN, que pode ser gerada no Pymol utilizando a ferramenta Builder para adicionar o grupo hidroxila clicando no acima de um dos átomos de H do BNZ. Neste tutorial, iremos clicar no H01 do BNZ para transformá-lo em -OH. Da mesma forma que no passo anterior, iremos salvar a molécula de PHN em formato mol2 com o nome phn.mol2.

6) Seguidamente, vamos assinalar os tipos de átomo nas moléculas dos dois ligantes conforme o campo de força GAFF2 e atribuir as cargas parciais com o método AM1-BCC. Para isto utilizaremos o programa *antechamber* de Amber24, digitando os comandos abaixo no terminal:

```
antechamber -fi mol2 -fo mol2 -i bnz.mol2 -o bnz_bcc.mol2 -c bcc -nc 0 -at gaff2
```

```
antechamber -fi mol2 -fo mol2 -i phn.mol2 -o phn_bcc.mol2 -c bcc -nc 0 -at gaff2
```

Abra os arquivos gerados, bnz_bcc.mol2 e phn_bcc.mol2, e compare-os com os arquivos de entrada. Veja que a coluna das cargas contém agora cargas parciais diferentes de zero e que tipos de átomos foram atribuídos.

Adicionalmente, a parametrização completa das moléculas dos compostos envolve a determinação de parâmetros para as interações não ligadas e ligadas entre os átomos de cada molécula. Para obter estes parâmetros, vamos utilizar o programa parmchk2 do Amber24:

```
parmchk2 -f mol2 -a 'Y' -i bnz_bcc.mol2 -o bcc.frcmod
```

```
parmchk2 -f mol2 -a 'Y' -i phn_bcc.mol2 -o phn.frcmod
```

7) Além das estruturas dos ligantes e da proteína, iremos incluir nos nossos sistemas as moléculas de água cristalográficas, embora isto não seja essencial neste caso já que não se encontram no sítio ativo. Para criar um arquivo de pdb com as moléculas de água executamos o comando abaixo:

```
grep HOH 181l.pdb >water.pdb
```

8) Agora vamos gerar os arquivos restart e topologias dos sistemas a serem simulados. O arquivo leap.in contém as instruções para gerar todos os arquivos que necessitamos para rodar as simulações e será explicado em detalhe nas aulas práticas. A fim de gerar as topologias e arquivos restart, executamos no terminal:

```
tLeap -f leap.in
```

Confirme que não houve erros na execução do comando anterior. Visualize no pymol os pDBs dos sistemas gerados para confirmar que tudo esteja correto.

9) Copie os arquivos de topologia e arquivos restart para o diretório superior (setup).

```
cp *parm7 *rst7 ../
```

10) acesse dentro do diretório *Relative_free_energy_calculations_lysozyme* o sub-diretório *decharging*, onde se encontram templates dos inputs de pmemd.cuda para rodar todas as etapas das simulações (.tmpl) e que irão envolver a minimização, o aquecimento (heating), a equilibração da pressão (eqnpt) e a dinâmica produtiva (prod). A execução dos comandos abaixo vai gerar todos os arquivos necessários para rodar as simulações de DM para a transformação de descarga do complexo e do ligante livre:

```
./setup_complex.sh
```

```
./setup_ligand.sh
```

Mais detalhes sobre os inputs e sobre a geração dos scripts usados para rodar as simulações serão providenciados durante as aulas.

Dentro do diretório *decharging*, após a execução dos scripts anteriores, serão criados dois novos diretórios chamados *complex* e *ligand*. Dentro de cada um destes, haverá um diretório chamado *decharge*, dentro do qual iremos encontrar 21 diretórios cujos nomes correspondem aos valores de lambda a serem usados nas simulações. Dentro de cada um desses diretórios estão os arquivos necessários para rodar as simulações para cada valor de lambda do sistema correspondente (complexo ou ligante livre) e para a etapa de descarga.

11) No diretório *decharging*, tem um script chamado *prod.sh* que serve para rodar as simulações de DM para cada valor de lambda. Ele não será usado, pois não iremos rodar as simulações nas aulas. Elas já foram rodadas com antecedência e os arquivos encontram-se disponíveis para análise.

12) Antes de rodar as simulações, é necessário minimizar o sistema, mas isto não é necessário para cada valor de lambda, apenas uma minimização pode ser feita e o mesmo arquivo pode ser usado como input para o aquecimento em todos os valores de lambda.

Isto pode ser realizado (embora nós não vamos realizar a minimização durante a aula) acessando o diretório de um dos valores de lambda (por exemplo 0.50) e executando o comando abaixo:

```
pmemd.cuda -i min.in -p ti.parm7 -c ti.rst7 -ref ti.rst7 -o min.out -r min.rst7 -O
```

Às vezes, a minimização precisa ser realizada em CPU para garantir maior estabilidade das simulações subsequentes, o que pode ser realizado utilizando a versão pmemd.MPI em vez de pmemd.cuda.

O arquivo min.rst7 deverá substituir o arquivo rst7 do sistema que se encontra no diretório setup, de forma que o link simbólico para o arquivo ti.rst7 dentro de cada diretório dos diferentes valores de lambda aponte para o arquivo minimizado.

13) Uma vez realizadas as simulações, serão obtidos os valores de energia livre para cada transformação, executando o script *alchemical_analysis.sh* que está no diretório do tutorial. O script deve ser copiado para o diretório que contém os diretórios com os valores de lambda e executado ali.

Além disso, foi preparado o script *extract.py* para cálculo dos valores de energia por simples integração (sem análise de autocorrelação) e para plotar os valores de $dV/d\lambda$ vs λ , que pode ser executado de forma similar ao script anterior (no mesmo diretório).

14) As etapas de 10-13 devem ser realizadas também nos diretórios *vdw* e *recharging*, que contém os scripts para rodar essas outras transformações alquímicas.

15) Os diferentes valores de energia livre devem ser somados para obter o valor final de $\Delta\Delta G$.

O arquivo de excel no diretório *Relative_free_energy_calculations_lysozyme* (*free_energy.xlsx*) contém os valores de energia livre para cada processo e o valor final de $\Delta\Delta G$, além dos erros associados estimados por análise de autocorrelação.

Importante: O que indica o valor calculado de $\Delta\Delta G$, é a modificação de BNZ para PHN favorável para a ligação à proteína?

Tutorial 2. Cálculo da energia de ligação do benzeno à lisozima T4

Neste segundo tutorial, vamos aprender como realizar cálculos de energia livre de ligação para sistemas proteína-ligante, empregando novamente o complexo LYZ-BNZ como

modelo. A energia livre de ligação é frequentemente referida na literatura como energia livre absoluta, para diferenciá-la da energia livre relativa, a qual aprendemos a calcular no tutorial 1. Neste tutorial utilizaremos os dois termos indistintamente, e usaremos também a abreviação ΔG°_b .

O cálculo de ΔG°_b para sistemas proteína-ligante por métodos alquímicos pode ser realizado através do ciclo termodinâmico representado na Fig. 4. Este ciclo envolve o desaparecimento (*decoupling*) total do ligante em dois meios diferentes, complexado na proteína e no solvente, razão pela qual a abordagem se denomina em inglês *double decoupling method* (DDM). É importante ressaltar que o desaparecimento progressivo do ligante quando ligado à proteína provoca que ele se desligue do sítio de ligação e comece a se movimentar pela caixa de simulação. Isto acarreta problemas de convergência que atrapalham a acurácia dos cálculos de ΔG°_b . Para resolver esse problema, Boresch e colaboradores desenvolveram uma estratégia que consiste na aplicação de potenciais de restrição harmônicos envolvendo três átomos do ligante e três átomos da proteína a fim de manter o ligante confinado no sítio de ligação da proteína (1). Mais detalhes sobre esses potenciais harmônicos serão oferecidos durante as aulas. A contribuição desses potenciais harmônicos na energia livre quando o ligante se encontra totalmente desacoplado pode ser calculada de forma analítica (Figura 4C). Neste tutorial oferecemos um script *restraints.py* que vai calcular essa contribuição energética para o sistema simulado (mais detalhes serão providenciados mais abaixo). Finalmente, também será necessário remover os potenciais de restrição quando o ligante está acoplado (todas as interações com o sistema ativas) e ligado no sítio ativo da proteína (Figura 4E). Isto precisa ser realizado através de simulações que serão explicadas mais abaixo.

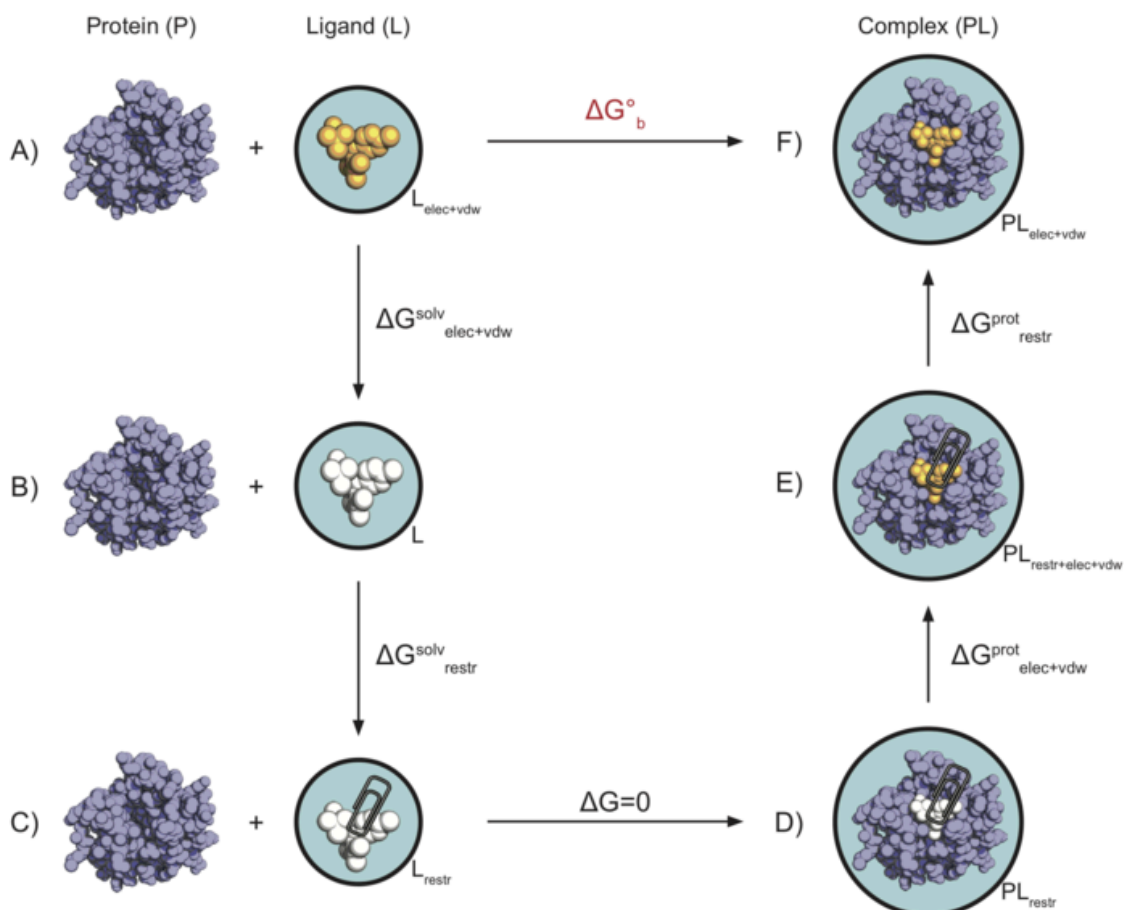


Figura 4. Ciclo termodinâmico para o cálculo da energia livre absoluta em um sistema proteína-ligante. A) e B) O ligante solvatado é desacoplado (transformado em dummy atoms). B), C) e D) Potenciais harmônicos são aplicados para confinar o ligante desacoplado no sítio de ligação da proteína. D) e E) Os átomos do ligante são ativados no sítio de ligação da proteína. E) e F) Os potenciais de restrição são eliminados do ligante ativo no sítio de ligação da proteína. A energia livre absoluta (ΔG°_b) é calculada através da soma dos valores da energia livre de cada um dos processos representados.

Passo a passo

Antes de começarmos este tutorial, é importante confirmar que o ambiente de AmberTools23 encontra-se ativo no nosso terminal, conforme explicado no tutorial 1.

1) No diretório *Free_energy_tutorials* acesse o diretório *Absolute_free_energy_calculations_lysozyme/setup/leap*. Ali, iremos encontrar os arquivos necessários para gerar as topologias e arquivos restart que usaremos para rodar as simulações de DM. Execute no terminal:

```
tLeap -f leap.in
```

2) Durante a aula será explicado o conteúdo do arquivo *leap.in*. Além dos arquivos de topologia e restart, iremos precisar de arquivos de extensão *.rest* que contêm informação sobre os potenciais de restrição que serão aplicados, conforme descrito anteriormente. O script de bash *add_restraints.sh* foi preparado para gerar esses arquivos (mais detalhes serão oferecidos na aula). Execute as seguintes linhas de comando no terminal:


```
./add_restraints.sh lyz_bnz_dech 163 C2 C4 C6 99 78 153
```

mude o nome do arquivo *.rest* gerado:

```
mv disang.rest disang1.rest
```

em seguida execute:

```
./add_restraints.sh lyz_bnz_dech 164 C2 C4 C6 99 78 153
```

e concatene os dois arquivos:

```
cat disang.rest disang1.rest > disang_dech.rest
```

apague os arquivos *disang.rest* e *disang1.rest* (*rm disang1.rest disang.rest*)

Após completar os passos anteriores o arquivo *disang_dech.rest*, que será utilizado nas simulações de descarga do complexo proteína-ligante estará pronto. Para gerar o arquivo análogo para a transformação de van der Waals, seguiremos os seguintes passos:

```
./add_restraints.sh lyz_bnz_pnh_vdw 163 C2 C4 C6 99 78 153
```

```
mv disang.rest disang_vdw.rest
```

3) Todos os arquivos **parm7* **rest* e **rst7* deverão ser movidos para o diretório *setup*.

4) Dentro do diretório *Absolute_free_energy_calculations_lysozyme/*, acesse o diretório *decharging* e execute os seguintes comandos:

```
./setup_ligand.sh
```

```
./setup_complex.sh
```

Como no caso do tutorial 1, estes scripts irão gerar todos os arquivos necessários para rodar as simulações de DM a diferentes valores de λ .

Essas etapas devem ser repetidas no diretório *vdw*. Além disso, os passos 10-14 do tutorial 1 têm informações relevantes sobre como proceder para rodar as simulações e processar os arquivos gerados a fim de obter os valores de energia livre.

5) A predição do valor de energia livre relativo ao processo E), F) da Fig. 4 envolve a realização de uma dinâmica convencional (sem potenciais de restrição aplicados nem transformação alquímica do ligante) e o cálculo para cada quadro da trajetória dos valores da distância, ângulos e diedros dos átomos aos quais foram aplicados os potenciais de restrição durante as simulações alquímicas.

O diretório *conventional_MD* contém todos os arquivos relacionados com a simulação convencional mencionada. A execução dos comandos abaixo permitirá obter as séries temporais dos valores de distância, ângulo e diedros envolvendo os átomos selecionados.

```
cpptraj -i distance.in
```

```
cpptraj -i angles.in
```

```
cpptraj -i dihedrals.in
```

Foi preparado também um script the python *calculate_total_restraints_coupled_ligand.py* no mesmo diretório que irá processar os arquivos gerados pelo *cpptraj* e vai calcular o valor de energia livre associado à remoção dos potenciais de restrição utilizando a fórmula de

perturbação termodinâmica em um único passo (ver equação 10 em ref. 2). Para rodar o script, digite:

```
python3 calculate_total_restraints_coupled_ligand.py
```

Para visualizar a simulação de DM convencional utilizaremos o vmd. Digite:

```
vmd *parm7 trajectory_fitted.nc
```

e siga as instruções que serão indicadas na aula.

6) Dentro do diretório *Absolute_free_energy_calculations_lysozyme* encontra-se o script *restraints.py* que vai calcular analiticamente o valor de energia livre associado aos potenciais de restrição quando aplicados ao ligante desacoplado. A equação para essa correção foi apresentada na ref. 1 e contém também correções de volume a fim de levar todas as moléculas ao estado padrão de concentração 1 mol/L. O script deve ser modificado manualmente com os valores correspondentes às restrições aplicadas no sistema simulado (já foi feito). Digite:

```
python3 restraints.py
```

7) O BNZ é uma molécula simétrica e o uso dos potenciais de restrição provocam que estados equivalentes em razão da simetria da molécula não serão amostrados (ver explicação mais em detalhe no site [http://www.alchemistry.org/wiki/Absolute Binding Free Energy - Gromacs 2016](http://www.alchemistry.org/wiki/Absolute_Binding_Free_Energy_-_Gromacs_2016)).

Por esse motivo, precisaremos introduzir mais uma correção analítica:

$$\Delta G_{sym} = -RT \ln(2) \quad (eq. 2)$$

8) Os valores de todas as contribuições energéticas e o resultado final da energia livre de ligação do BNZ à LYZ encontram-se no arquivo excel dentro do diretório *Absolute_free_energy_calculations_lysozyme*. Adicionalmente, está indicado o valor experimental correspondente.

A partir da análise dos resultados, pode se confirmar que o método empregado teve acurácia adequada na predição da energia livre de ligação?

Tutorial 3. Cálculo da variação da energia livre de ligação associada à mutação de um resíduo proteico na interface de um complexo proteína-ligante

Introdução

Neste terceiro tutorial, iremos prever o impacto de uma mutação de um resíduo da interface do complexo LYZ:BNZ (especificamente do resíduo A99 que será mutado por V) na afinidade pelo ligante. Este tipo de cálculo é importante para avaliar a importância de resíduos na interface em relação à estabilização do complexo proteína-ligante e permite também desenhar mutantes que apresentem propriedades diferentes à proteína nativa.

Desde o ponto de vista metodológico, a abordagem deste problema é bem semelhante àquela apresentada para o cálculo de $\Delta\Delta G$ associado à modificação do BNZ em PHN

(Tutorial 1). De fato, o ciclo termodinâmico empregado no presente estudo (Fig. 5) é totalmente análogo ao mostrado na Fig. 2. Neste caso, como no anterior, iremos calcular por meio de métodos alquímicos as energias dos processos C e D (Fig. 5), onde a diferença é que a mutação A99 para V99 é realizada em ausência (C) e em presença do ligante (D).

O valor de $\Delta\Delta G$ vai ser obtido pela equação a seguir:

$$\Delta\Delta G(LYZ - A99:BNZ \rightarrow LYZ - V99:BNZ) = \Delta G(LYZ - V99:BNZ) - \Delta G(LYZ - A99:BNZ) = \Delta G(B) - \Delta G(A) = \Delta G(D) - \Delta G(C) \quad (eq\ 3)$$

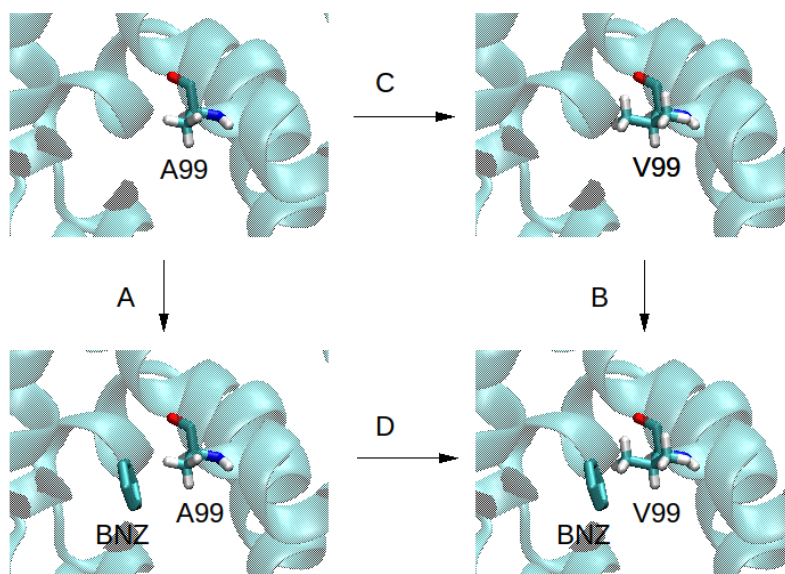


Figura 5. Ciclo termodinâmico para o cálculo da variação da energia de ligação ao BNZ associada à mutação A99V na LYZ. A e B representam processos reais de ligação do BNZ às proteínas nativa e mutante, respectivamente. C e D representam processos alquímicos, onde o resíduo A99 é transformado em V99 em ausência e presença do BNZ, respectivamente.

Passo a passo

Tendo já realizado os outros tutoriais e sabendo que o procedimento geral para realizar os presentes cálculos são similares àqueles expostos anteriormente, iremos fazer ênfase apenas em aqueles que divergem do que foi explicado antes.

1) Os arquivos do presente tutorial se encontram no diretório *Relative_free_energy_mutation_lysozyme*, o qual contém igual que nos casos anteriores o diretório *setup* e *leap*.

Dentro do diretório *leap*, execute o comando:

tleap -f leap.in

2) As topologias e arquivos restart gerados neste passo vão precisar de um processamento ulterior que consiste em combinar as duas cópias da proteína em uma só, exceto os resíduos que vão ser mutados. Este passo é essencial para eliminar termos de ligação redundantes, o que aumenta a eficiência do cálculo. Para esse fim, utilizamos o programa *parmed* e os arquivos com instruções que já foram previamente preparados, conforme os comandos abaixo:

```
parmed -p mlz_bnz_rech.rst7 -i merge_complex_rech.in
parmed -p mlz_rech.rst7 -i merge_free_rech.in
parmed -p lz_bnz_rech.rst7 -i merge_complex_dech.in
parmed -p lz_rech.rst7 -i merge_free_dech.in
parmed -p lyz_mlz_bnz_vdw.rst7 -i merge_complex_vdw.in
parmed -p lyz_mlz_vdw.rst7 -i merge_free_vdw.in
```

Após a execução destes comandos, os arquivos com extensão **parm7* e **rst7* e com nome inicial *merged_** deverão ser copiados para o diretório *setup* (cp merged*7 ../)

3) Os passos 10-14 do tutorial 1 deverão ser executados nos diretórios *decharging*, *recharging* e *vdw* do presente tutorial, notando que no presente caso, o nome *ligand* nos arquivos foi substituído por *free*, para ressaltar que agora estamos simulando a proteína livre e não o ligante.

4) No arquivo **xlsx* dentro do diretório deste tutorial, se encontram os resultados dos cálculos de energia livre realizados.

O valor final de $\Delta\Delta G$ indica que a mutação favoreceu ou não a ligação ao BNZ?

Conclusões

Ao longo destes três tutoriais aprendemos elementos básicos para a realização de cálculos de energia livre por IT utilizando o pacote de programas Amber 24 e o complexo modelo LYZ:BNZ. Os scripts e procedimentos aqui apresentados podem ser adaptados a outros sistemas e modificações referentes ao tempo de simulação, uso de métodos de amostragem melhorada, como replica exchange, podem vier a substituir os esquemas de simulação utilizados, a fim de melhorar a acurácia dos cálculos de energia livre nesses sistemas mais desafiadores. Amber também permite obter valores de energia para realização de cálculo de energia livre alquímico usando métodos alternativos ao de IT, como BAR e MBAR.

Amber apresenta algumas vantagens sobre outros pacotes de dinâmica molecular disponíveis. Por citar algumas, o programa *pmemd.cuda* apresenta uma performance excelente, permitindo encurtar os tempos para execução das simulações. Também é possível realizar de forma simples e eficiente a parametrização e montagem de complexos envolvendo ligantes químicos de natureza não peptídica. O fato da última versão de Amber ter sido liberada para uso gratuito com fins acadêmicos, torna esta ferramenta muito atraente para realizar cálculos alquímicos em sistemas proteína-ligante.

Referências

1. Boresch, S., Tettinger, F., Leitgeb, M., and Karplus, M. (2003) Absolute binding free energies: A quantitative approach for their calculation. *J. Phys. Chem. A* 107, 9535–9551
2. Doudou S, Burton NA, Henchman RH. Standard Free Energy of Binding from a One-Dimensional Potential of Mean Force. *J Chem Theory Comput.* 2009 Apr 14;5(4):909-18. doi: 10.1021/ct8002354. Epub 2009 Mar 10. PMID: 26609600.