



Máster en Biotecnología
BIOCATÁLISIS APLICADA Y
BIOTRANSFORMACIONES
Prácticas de DOCKING

Curso 2021-2022

Alumno:

Universidad Complutense de Madrid

MÁSTER EN BIOCATALISIS APLICADA Y BIOTRANSFORMACIONES: PRACTICAS DE DOCKING

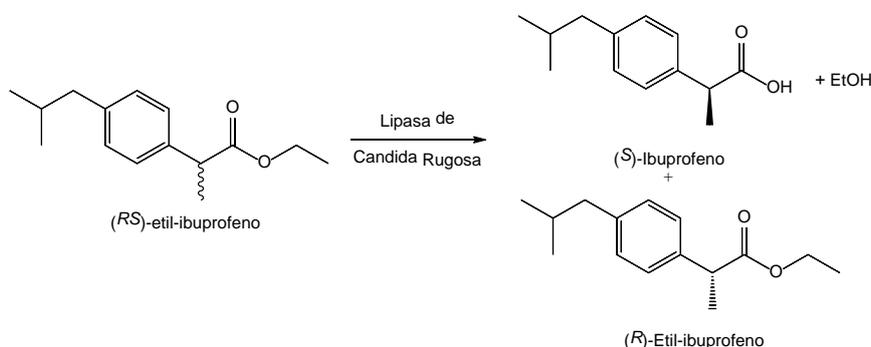
INTRODUCCION

Las enzimas se utilizan ampliamente en reacciones de síntesis orgánica como biocatalizadores sostenibles,^[1,2] siendo las enzimas hidrolíticas especialmente útiles, ya que pueden ser utilizadas frente una amplia gama de sustratos con alta especificidad, son estereoselectivas, están disponibles comercialmente y no requieren costosos sistemas de regeneración del cofactor. Estos biocatalizadores se han utilizado en un gran número de aplicaciones industriales, como son la industria farmacéutica, química, alimentaria etc.^[3,4]

Los métodos in silico han sido desarrollados para predecir afinidad, actividad y selectividad en las proteínas basadas en su información estructural.^[5] En el desarrollo de fármacos, el docking se utiliza habitualmente para identificar nuevos compuestos mediante la detección virtual de bibliotecas de pequeñas moléculas,^[6] además, los métodos de docking también se aplican con éxito para predecir los sustratos más probables de enzimas con estructura conocida^[7,8]

El ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (ibuprofeno) se usa como fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), como antipirético, analgésico y antiinflamatorio. Esta molécula posee un centro estereogénico en la posición alfa con respecto al ácido carboxílico, lo que hace que coexista en forma de dos enantiómeros. En el caso del ibuprofeno, el enantiómero (S) es 160 veces más activo que el enantiómero (R). Por lo tanto, es importante el uso de sólo el enantiómero activo, siendo un gran desafío separar estos enantiómeros para obtener una sustancia pura biológicamente activa. Los métodos clásicos para obtener enantiómeros puros vía la química tradicional son caros por lo que el uso de enzimas altamente enantioselectivas se muestra como una de las mejores alternativas para la síntesis de este tipo de compuestos.

En el caso de los ácidos 2-arilpropiónicos los mejores candidatos para una resolución de los racematos (RS) son las lipasas ya que hidrolizan o esterifican solo uno de los enantiómeros. Particularmente la Lipasa de *Candida Rugosa* es la enzima empleada para separar el racemato (RS) del ibuprofeno, ya que solamente hidroliza el enantiómero (S). En esta hidrólisis están implicados tres residuos del centro activos, llamados triada catalítica, (SER-209, GLU 341 y HIS-449).^[9]



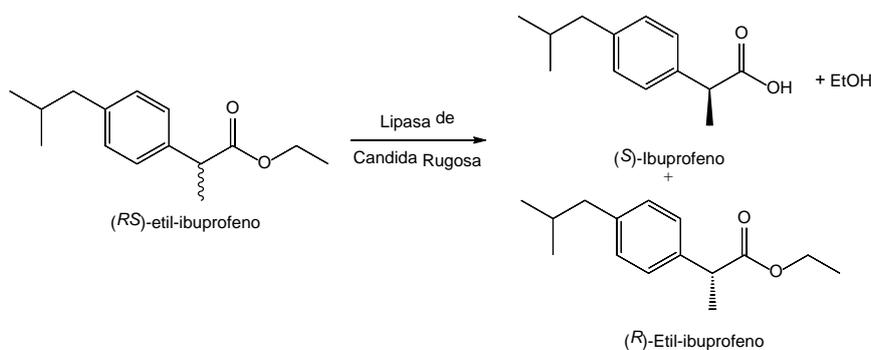
Referencias

- [1] Wong CH and Whitesides, G.M. 1994 *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Elsevier, Oxford.
- [2] Schneider MP 1986 *Enzymes as Catalysts in Organic Synthesis*, Reidel, Dordrecht, The Netherlands.
- [3] Faber K., "Biotransformations in Organic Chemistry. A textbook". 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2011.
- [4] Liese A., Seelbach K., Wandrey, C., "Industrial Biotransformations". 2nd ed.; John Wiley and sons, Inc. Verlag GmbH & Co, kGaA.: Weinheim, 2006.
- [5] Ortiz AR, Gomez-Puertas P, Leo-Macias A, Lopez-Romero P, Lopez-Viña E, Morreale A, Murcia M, & Wang K. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2006, 6: 41-55.

- [6] Cavasotto CN, Orry AJW: *Curr Top Med Chem* 2007, 7: 1006–1014.
 [7] Song L, Kalyanaraman C, Fedorov AA, Fedorov EV, Glasner ME, Brown S, Imker HJ, Babbitt PC, Almo SC, Jacobson MP, Gerlt JA. *Nat Chem Biol* 2007, 3: 486–491.
 [8] Hermann JC, Marti-Arbona R, Fedorov AA, Fedorov E, Almo SC, Shoichet BK, Raushel FM, *Nature* 2007, 448: 775–779.
 [9] Grochulski P, Li Y, Schrag JD and Cgler M, *Protein Sci* 1994, 3:82-91.

OBJETIVOS:

Entender mediante la técnica de Docking la estereoselectividad de la lipasa de *Candida Rugosa* en la reacción de hidrólisis de ésteres, teniendo en cuenta las interacciones entre el ligando (RS) ibuprofeno y la triada catalítica (SER-209, GLU 341 y HIS-449).



MATERIAL

- ZINC**: Base de datos de estructuras de pequeñas moléculas
- PDB**: Base de datos de estructuras de proteínas
- **AUTODOCKTOOLS**: Programa para preparar, realizar y visionar los ficheros de docking y sus resultados
- AUTODOCK**: Programa de docking
- PYMOL**: Programa para el visionado de estructuras moleculares tridimensionales.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.- CREACION DE UNA CARPETA DE TRABAJO:

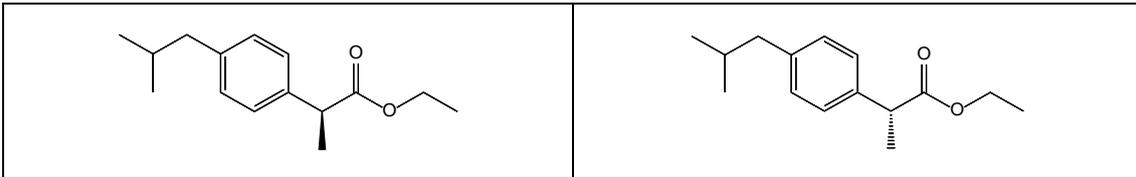
Generamos en el escritorio una carpeta de trabajo que nombraremos “Proyecto” en la que tenemos que incluir una copia de los programas de docking así como de los ficheros de parámetros (podemos encontrarlos en el campus virtual):

. - autodock.exe	. - AD4_parameters.dat
. - autogrid.exe	. - AD4.1_bound.dat

2.- OBTENCION DE LAS COORDENADAS DE LOS LIGANDOS Y LA PROTEINA MEDIANTE EL USO DE BASES DE DATOS

Vamos a trabajar con los dos enantiómeros del “etil-ibuprofeno”.

(S)-2-(4-isobutilfenil)propanoato de etilo	(R)-2-(4-isobutilfenil)propanoato de etilo
--	--



2.A) OBTENCION DE LAS COORDENADAS DE LOS LIGANDOS

Necesitamos los archivos de coordenadas de las estructuras del éster etílico de (R) y (S)-ibuprofeno, usamos base de datos de estructuras de ligandos ZINC para obtenerlos.

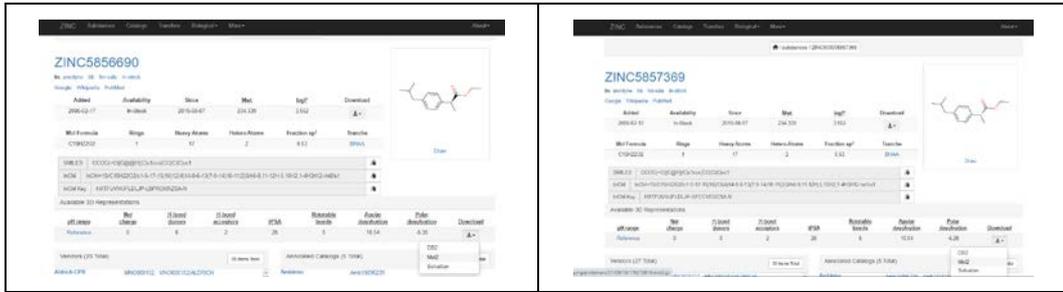
a) ENTRAMOS EN LA PAGINA DE ZINC: <https://zinc.docking.org/>

b) Dibujamos la molécula que queremos descargar en la sección de “substances”, y pinchamos en Default, para que nos busque la molécula que nos interesa

c) Descargamos los ficheros de los dos enantiómeros que nos interesa, para ello:
.- **Seleccionamos** cada uno de los ligandos que nos interesa:

.- **Descargamos** las coordenadas de cada uno de los ligandos en formato mol2:

(S)-Etil-ibuprofeno	(R)-Etil-ibuprofeno
---------------------	---------------------



2.B) OBTENCION DE LAS COORDENADAS DE LA PROTEINA

Descargamos la estructura de la proteína de la base de datos PDB, en formato .pdb

3. DOCKING CON AUTODOCK:

3.A) CONFIGURAR EL ENTORNO DE TRABAJO:

Definimos en el programa de AutodockTools, donde está la carpeta con la que vamos a trabajar. Es necesario que todos los ficheros de coordenadas tanto de la proteína como del ligando, así como los programas de cálculo de las grids de interacción (autogrid.exe), de docking (autodock.exe) y de parámetros (AD4_parameters.dat, AD4.1_bound.dat) se encuentren en la misma carpeta de trabajo.

“File” → “Preference” → “Set” → “Cambiamos el path en Startup Directory” → “Set”

3B) PASO 1. CREAMOS LOS FICHEROS PDBQT CON AUTODOCKTOOLS

Autodock solo tiene en cuenta los H polares, no tiene en cuenta los H unidos a los átomos de carbono. Usa como fichero de coordenadas un fichero PDB extendido, es un fichero PDBQT.

PDBQT incluye:

- 1) Átomos de hidrógeno polares
- 2) Cargos parciales
- 3) Tipos de átomos
- 4) Información sobre la articulación de moléculas flexibles.

Creamos dos archivos separados de **coordenadas *pdbqt uno para el receptor y uno para el ligando**.

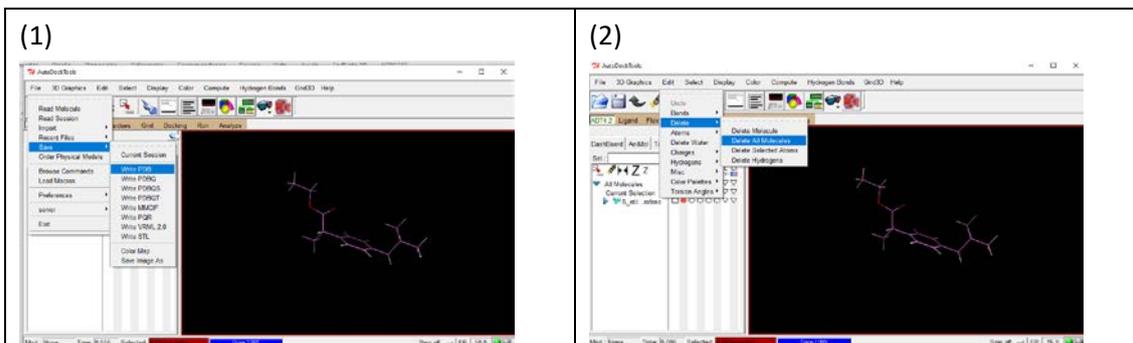
PREPARACIÓN DEL LIGANDO: Consta de dos etapas, preparación del fichero de coordenadas, creación del fichero pdbqt.

1.- Abrimos el fichero *.mol2 en AutodockTools y lo guardamos en formato *.pdb cambiando el nombre del fichero del ligando, es importante hacer este cambio de formato para poder continuar con la preparación del ligando. (El programa de docking esta creado de manera que la longitud de los nombres de los ficheros no sea demasiado largo, y no lleven caracteres distintos a las letras como guiones o asteriscos o puntos)

“File” → “Read Molecule” → “Save” → “Write PDB” → “**ligandoS.pdb**”

2.- Volvemos a AutodockTools y borramos todo lo que tenemos en la pantalla.

“Edit” → “Delete” → “Delete all molecules



3.- Abrimos ahora el fichero **ligandoS.pdb** en Autodock.

“File” → “Read Molecule” → “**ligandoS.pdb**”

4.- Comenzamos a preparar el ligando con el menú **EDIT** de AutodockTools:

4.1) Agregue átomos de hidrógeno a la molécula

“Edit” → “Hydrogens” → “Add” → “OK”

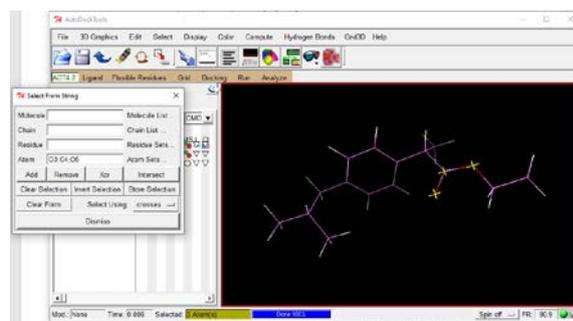
4.2) Agregue cargos parciales. Vamos a seleccionar las cargas de tipo GASTEIGER.

“Edit” → “Charges” → “Compute Gasteiger” → “Aceptar”

4.3) Fijamos el enlace éster como no rotable desde el menú Select.

“Select” → “Select from String” → “ATOM: O3,C4,O5” → “Add” → “Dismiss”

En La ventana emergente escribiremos el nombre de los átomos que están involucrados en los enlaces que queremos fijar, para ello escribimos en la ventana de "ATOM: O3,C4,O5" y seleccionamos la opción "Add".

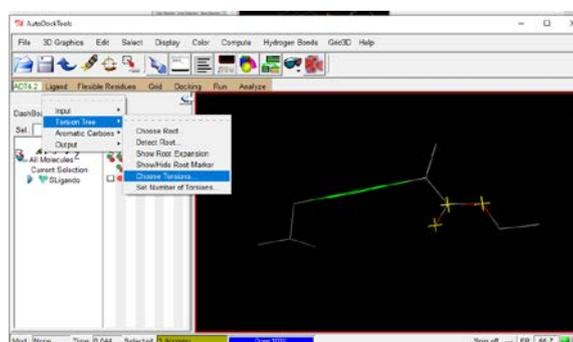


5) Salvamos el fichero "*.pdbqt" del ligando, para ello trabajamos con el **menú Ligand**. Empezamos seleccionando nuestro ligando como molécula para realizar el docking, en este momento el programa elimina los H no polares y comprueba que la molécula tenga las cargas parciales calculadas.

"Ligand" → "Input" → "Choose" → SLigando → "Select Molecule for Autodock4" → "Aceptar"

6) Definimos los enlaces rotables y construimos el árbol de torsión.

"Ligand" → "Torsion Tree" → "Choose Torsions" → "Make bonds between selected atoms non rotatable" → "Done"



6) Salvamos el ligando en formato "PDBQT"

"Ligand" → "Output" → "Save as PDBQT" → "SLigando.pdbqt" → "Guardar"

PREPARACIÓN DE LA PROTEINA: Consta de dos etapas, preparación del fichero de coordenadas, creación del fichero *.pdbqt.

1.- Abrimos el fichero 1crl.pdb en AutodockTools y comenzamos a prepararlo para el docking

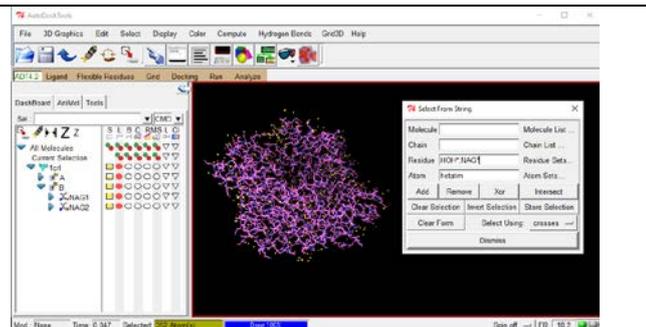
"File" → "Read Molecule" → "1crl.pdb" → "Abrir"

2.- Tenemos que eliminar de las coordenadas de la proteína todo aquello que el programa no vaya a utilizar para realizar el docking, como **moléculas de H₂O y heteroátomos**. Primero seleccionamos las moléculas que queremos eliminar y después las borramos.

Selección:

"Select" → "Select from String" → "rellenamos la ventana emergente" → "Add" → "Dismiss"

En la ventana emergente, rellenamos las secciones
Residue: HOH*, NAG*
Atom: hetatm



Eliminación:

“Edit” → “Delete” → “Delete Selected Atoms” → “CONTINUE”

3. Añadimos hidrógenos a la proteína.

“Edit” → “Hydrogens” → “Add”

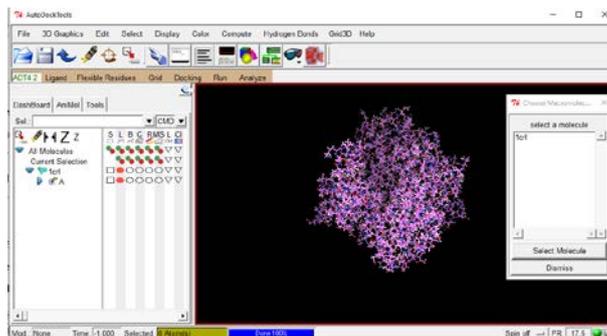
4.- Calculamos las cargas parciales de los distintos átomos de la proteína.

“Edit” → “Charges” → “Compute Gasteiger”

COMENZAMOS CON EL **MENU FLEXIBLE RESIDUE** que define los rotables de la proteína.

5.- Elegimos la proteína que queremos utilizar.

“Flexible Residue” → “Input” → “Choose Macromolecule” → “1cr1” → “Select Molecule” → “Yes” → “Aceptar”



6.- Calculamos los enlaces rotables de los residuos de la proteína que queremos que sea flexibles. Elegimos la Serina-209 que interacciona directamente con el ligando y que forma parte de la triada catalítica. Para su selección usamos el menú Select.

“Select” → “Select from String” → “Residue: SER209” → “Add” → “Dismiss”

Ahora calculamos los enlaces rotables del residuo elegido.

“Flexible Residue” → “Choose Torsion in Currently Selected Residues” → “Close”

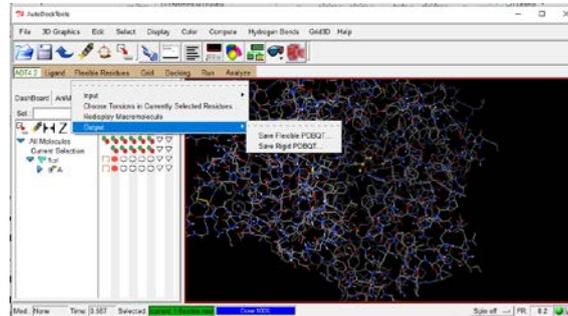
7.- Volvemos a cargar la macromolécula, es decir la proteína.

“Flexible residue” → “Redisplay Macromolecule”

8.- Salvamos los ficheros *.pdbqt de la proteína, la parte flexible que será el residuo SER209 y el resto de la proteína la salvaremos como proteína rígida.

“Flexible Residue” → “Output” → “Save Flexible PDBQT” → proteina-flexible.pdbqt → “Guardar”

“Flexible Residue” → “Output” → “Save Rigid PDBQT” → proteina-rigida.pdbqt → “Guardar”



4) PASO 2. PREPARAMOS LOS FICHEROS PARA CALCULAR LA GRID CON AUTODOCKTOOLS

Una vez que tenemos preparados los ficheros de la proteína y el ligando, el paso siguiente es calcular la grid de energía. Para agilizar el cálculo de energía de interacción entre la proteína y el ligando autogrid precálcula la energía de interacción de varios tipos de átomos (C alifático, C aromático, Oxígeno dador o aceptor de enlace de hidrogeno, etc) así como potenciales electrostáticos y de desolvatación. El programa calcula una malla de puntos de interacción que luego usara AutoDock para realizar los cálculos de energía de interacción de docking.

1.- Comenzamos a calcular la grid borrando todos los ficheros que hay cargados en AutodockTools hasta este momento.

“Edit” → “Delete” → “Delete All Molecules”

Vamos a usar el menú GRID para preparar el fichero **grid.gpf** que contiene las ordenes necesarias para calcular la grid de energía de interacción.

2.- Seleccionamos el fichero de proteína-rigida.pdbqt como macromolécula en la que calcular la grid de interacciones. Al final del proceso aparece una ventana preguntando si se desea mantener las cargas de la proteína, presionamos NO para volver a calcular las cargas gasteiger, así nos aseguramos de que son correctas.

“Grid” → “Macromolecule” → “Open” → “proteina-rigida.pdbqt” → “No”

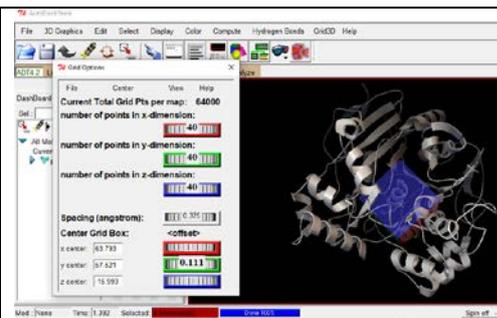
3.- Elegimos el tipo de átomos que vamos a usar para calcular la grid. Es importante que todos los átomos que forman la proteína estén representados, incluyendo los H polares.

“Grid” → “Set MapTypes” → “Directly” → “Accept”

4.- Elegimos el tamaño de la caja, el espacio entre los puntos de grid y el centro de la caja. Al realizar el docking el programa autodock procurará que el centro del ligando coincida con el centro de la caja.

“Grid” → “Grid Box”

- Tamaño de la caja: **40 x 40 x 40**
- Espacio entre los puntos de grid: **0,375 Å**
- Coordenadas (x,y,z) del centro de la caja de grid: **(63.793, 57.521, -15.993)**



5.- Salvamos las características de la caja en un fichero de texto y cerramos la ventana

“File” “Output grid dimensions file” → “grid.txt”

“File” → “Close Saving Currents”

6.- Salvamos el fichero con las órdenes para calcular la grid.

“Grid” → “Output Save GPF” → “grid.gpf”

5) PASO 3. PREPARAMOS LOS FICHEROS PARA CALCULAR EL DOCKING CON AUTODOCKTOOLS

Vamos a usar el menú **Docking** para preparar el fichero **dock.dpf** que contiene las ordenes necesarias para calcular el docking.

1.- Elegimos la proteína en la que vamos a realizar el docking. Le indicamos al programa que parte de la proteína es rígida y que parte de la proteína es flexible, seleccionando los ficheros *.pdbqt que creamos en el PASO 1.

“Docking → “Macromolecule” → “Set Rigid Filename” → “proteina-rigida.pdbqt”

“Docking” → “Macromolecule” → “Set Flexible Filename” → “proteina-flexible.pdbqt”

2.- Elegimos el Ligando que queremos hacer interaccionar con la proteína.

“Docking” → “Ligand” → “Open” → “Sligando.pdbqt” → “Accept”

3.- Elegimos el tipo de algoritmo de búsqueda que se va a utilizar para realizar el docking.

“Docking” → “Search Parameters” → “Genetic Algorithm Parameters” → “Accept”

4.- Elegimos los parámetros de docking

“Docking” → “Docking Parameters” → “Accept”

5.- Salvamos el fichero con las órdenes para realizar los cálculos de docking. El método más eficiente es un algoritmo genético lamarckiano (LGA), también se encuentran disponibles otros algoritmos.

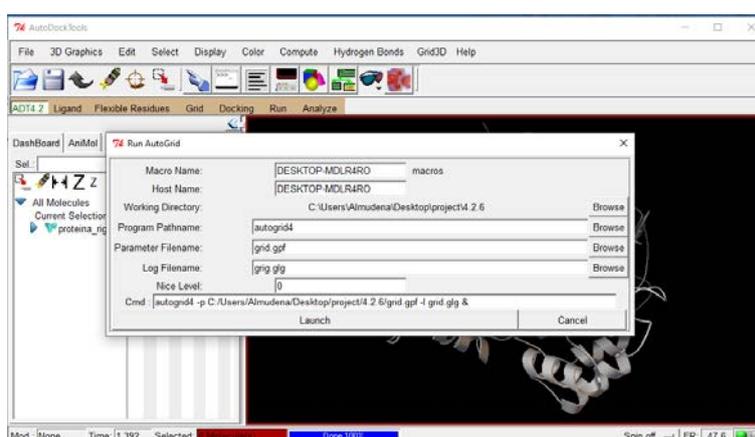
“Docking” → “Output” → “Lamarckina GA(4.2)” → “docking.dpf”

6) PASO 4. LANZAMOS AUTOGRID USANDO AUTODOCKTOOLS

Vamos a utilizar el menú **Run** para lanzar los distintos programas de cálculo, el primero que debemos lanzar es el autogrid, para tener los puntos de interacción precalculados que luego usará el algoritmo de autodock. Al final del cálculo se generan mapas de energía que se guardan en nuestra carpeta de cálculo con la extensión*.map. Tendremos un mapa de energía por cada tipo de átomo que hayamos elegido en el PASO 2.

1.- Abrimos el menú Run y seleccionamos Run Autogrid, en la ventana de dialogo lo único que debemos rellenar es el nombre con el que salvar el fichero de registro (log)

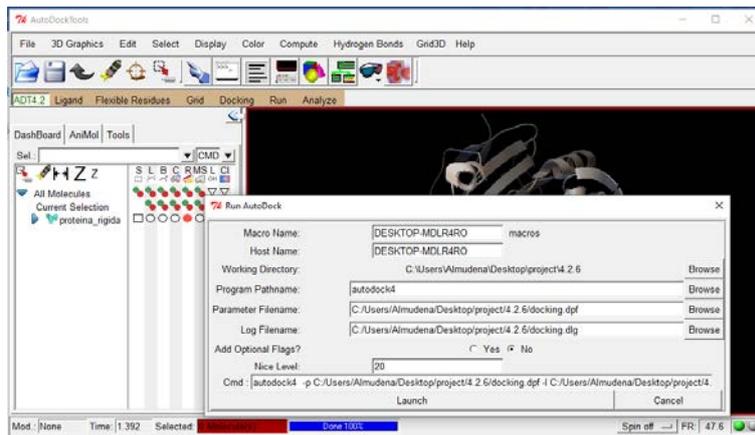
“Run” → “Run Autogrid”
“autogrid4 -p C:/Users/Almudena/Desktop/project/4.2.6/grid.gpf -l grid.glg &”
“Launch”



6) PASO 5. LANZAMOS AUTODOCK USANDO AUTODOCKTOOLS

1.- Una vez precalculada la grid lanzamos los cálculos de docking desde el menú Run. Para obtener 10 soluciones por ligando el programa tardará uso 10 minutos dependiendo de las capacidades del ordenador donde se realiza el cálculo. Lo único que debemos rellenar es el nombre con el que salvar el fichero de registro (log)

“Run” → “Run Autodock”
“autodock4 -p docking.dpf -l docking.dlg &”
“Launch”



7) PASO 6. ANALISIS DE RESULTADOS CON USANDO AUTODOCKTOOLS Y PYMOL

AutoDockTools incluye varios métodos para analizar los resultados de las simulaciones de docking, incluidas las herramientas para agrupar los resultados por similitud conformacional (cluster), visualización de conformaciones, visualización de interacciones entre ligandos y proteínas, y visualizar los potenciales de afinidad creados por AutoGrid. Usamos el menú **Analyze** para analizar los resultados de docking y salvarlos en formato pdb o pdbqt para poder visualizarlos en otros programas de visionado como pymol o chimera.

1. Cargamos los resultados de docking en AutodockTools, vamos a trabajar con el menú **Analyze**.

“Analyze” → “Dockings” → “Open” → “Docking.dlg” → “Aceptar”

2. Cargamos la estructura de la proteína para ver cómo interacciona con el ligando una vez hecho el docking.

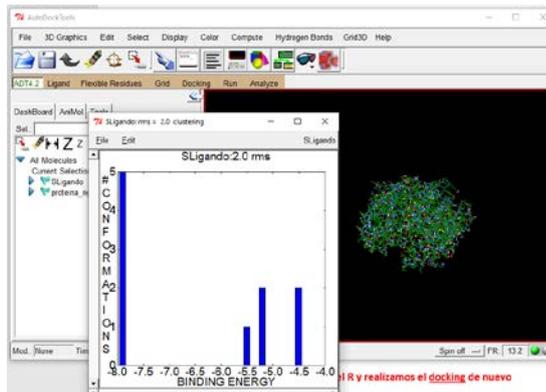
“Analyze” → “Macromolecule” → “Open” → “proteína-rígida.pdbqt”

3. Vemos las distintas conformaciones que adopta el ligando en el sitio activo de la proteína.

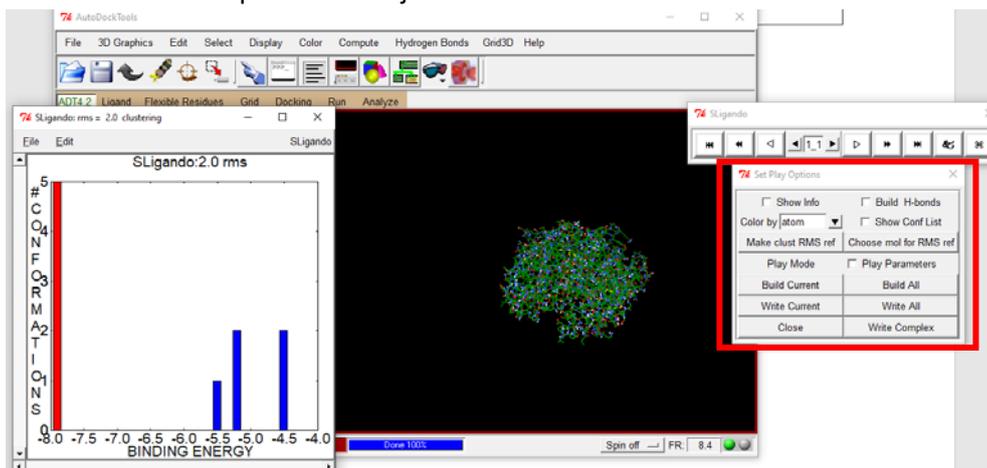
“Analyze” → “Conformations” → “Play, ranked by energy”

4. Para poder analizar la convergencia de los resultados de docking agrupamos las soluciones en función de su energía de interacción y de su conformación.

“Analyze” → “Clustering” → “Show”

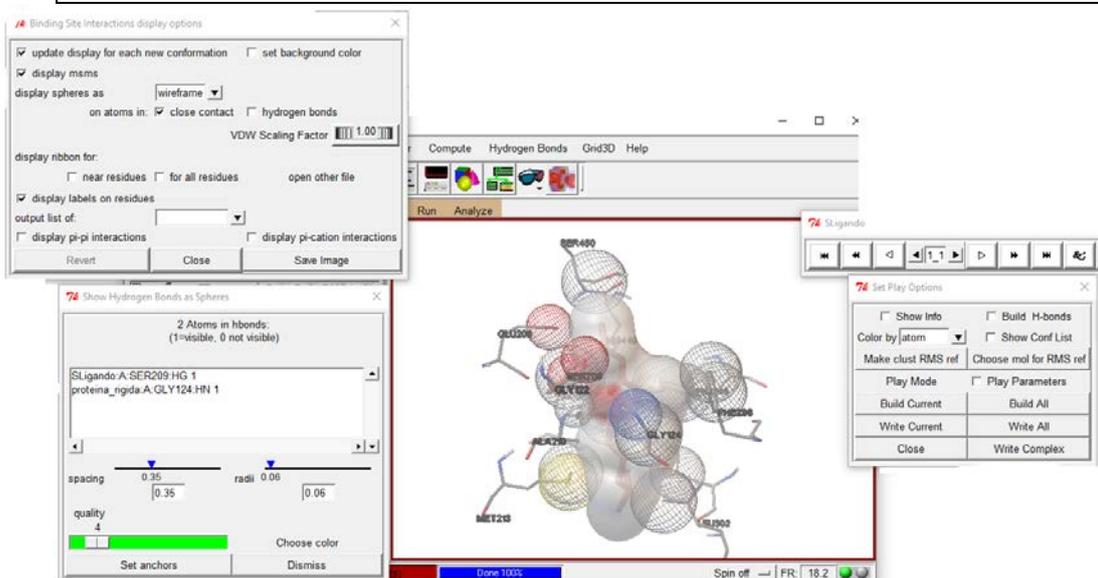


5. Pinchamos sobre el cluster más poblado que además es el de menor energía, y desplegamos las opciones de cada una de las soluciones. En el menú “Set Play Option” vamos a construir los puentes de Hidrógeno, Escribir las soluciones en la carpeta de trabajo.



6. El programa AutodockTools nos muestra también las interacciones de cada una de las soluciones con la proteína, usando en el menú “Analyze” la opción de “Show Interactions”.

“Analyze” → “Dockings” → “Show Interactions”



Una vez analizamos los resultados de docking del ligando (*S*) borramos todas las moléculas de la pantalla y comenzamos el docking con el ligando (*R*) para ellos seguimos todos los pasos descritos anteriormente.

8) COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE DOCKING CON EL PROGRAMA DE VISIONADO PYMOL.