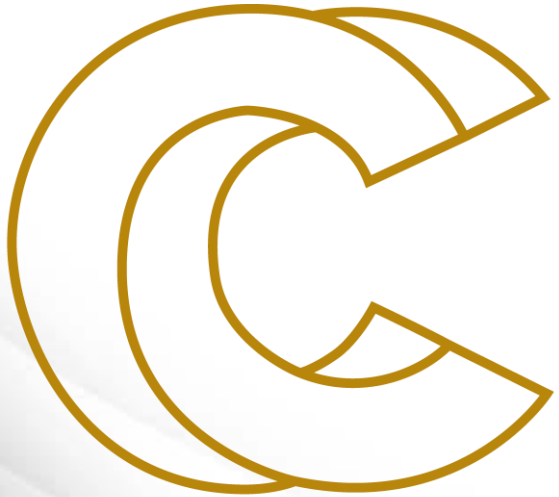


EURO

Moleküler Dinamik Simülasyonların ABC’si

30 Eylül 2022

F.A.Sungur, E. Çiçek İ.T.Ü

İçerik

EURO

01

Hazırlık

• PDB Hazırla
• pKa analizi PROPKA3.1
• Protonları ekle AMBER16

• Ligand geometri optimizasyonu PM3/GAUSSIAN

02

Minimizasyon

10000 adım minimizasyon

03

Docking

• Rigid docking for validation
• Flexible docking
• H41, C145, H163, E166, Q189
Autodock-Vina

04

Parametrization

• Seperate R and L from the docking pose
• Polar H addition to ligand
• Merge R and L, then fix complex pdb.
• Ligand parametrization
• AMBER16

05

MM/GBSA

• MMPBSA.py
• Sander modules of AMBER16,

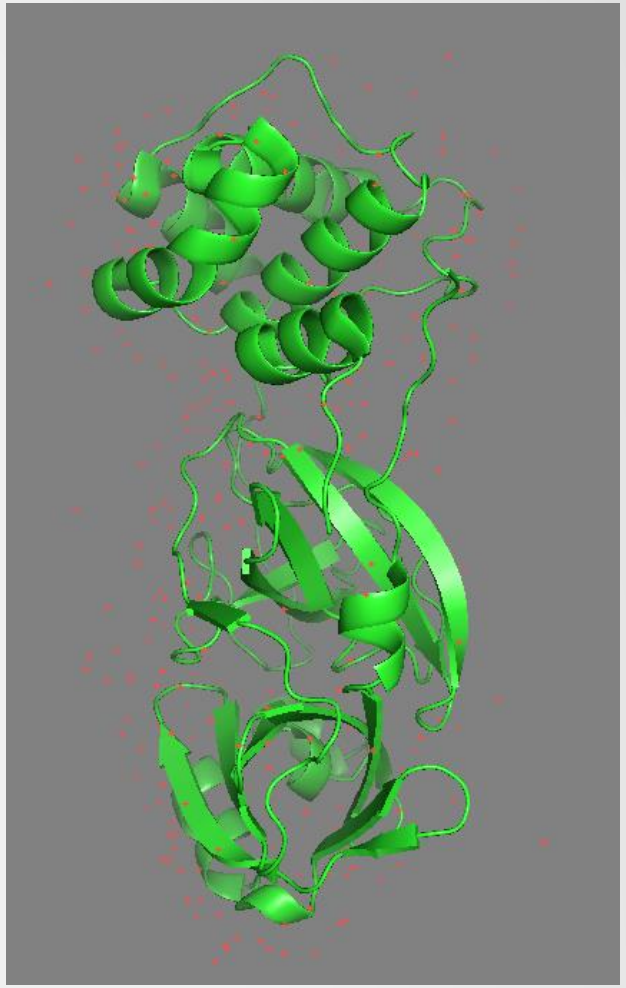
01

Sistem Hazırlama

EURO

-Enzim yapısı hakkında bilgi toplama

- Main protease (Mpro, 3CLpro)
- Katalitik aktivite için dimer zorunlu
- Başka türlü S1 cebi oluşmuyor ve bağlanma gerçekleşmiyor.
- His-41 ve Cys-145 aktif bölge rezidüleri
- Sekans uzunluğu : 306 a.a
- Pdb yapısı: 6lu7.pdb



01

Sistem Hazırlama

/okyanus/users/fsungur/EUROCC_WORKSHOP/HOLO-6LU7

EURO

-Pymol betiği (pdbholo-prep.pml dosyası)

1. X-ray yapısını yükle (.cif ya da pdb formatında-yapıyı saklayan pymol obje'ye aktar)
2. Suları kaldır
3. Monomerleri ayır
4. Bütünü saklayan objeyi sil
5. Zincirleri isimlendir
6. Yeniden yapılandır
7. Yapı oluşan dimer yapıyı kaydet

01

Sistem Hazırlama

/okyanus/users/fsungur/EUROCC_WORKSHOP/HOLO-6LU7

EURO

Bu aşamada ligand ve diğer hetero yapılar Pymol ile silinir. 6lu7-dimer.pdb hazır hale gelir.

- **pdb4amber -i 6lu7-dimer.pdb -o 6lu7-fixed.pdb**

01

Sistem Hazırlama

```
==================================================
Summary of pdb4amber for file 6lu7-dimer.pdb
==================================================

----------Chains
The following (original) chains have been found:
A
B

---------- Histidines (Renumbered Residues!)
It was not possible to determine the protonation state of the following HIS
residues based on presence of hydrogens. Amber will consider them as HIE
(epsilon-HIS) by default. If other protonation state desired change to HID
(delta-HIS) or HIP (protonated HIS) by hand.
HIS_64
HIS_386
HIS_163
HIS_164
HIS_470
HIS_552
HIS_41
HIS_172
HIS_80
HIS_370
HIS_469
HIS_246
HIS_347
HIS_478

---------- Cysteines in Disulfide Bonds (Renumbered Residues!)
No disulfide bonds have been detected.

---------- Missing Heavy Atoms (Renumbered Residues!)
None
```

- Pdb4amber ön kontrolü yaparak protein yapısındaki hataları temizler **ANCAK**
- Eksik rezidü var ise HOMOLOGY MODELLING yapılmalı.
- Protonasyon durumlarına bir sonraki adımda karar verilmeli

- https://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial9/index.php

01

Sistem Hazırlama–pKa Analizi

EURO

- Hesaplanan **pKa >>>>pH_{ortam}** yan zincir protonlanır. .pdb dosyası elde eidlen sonuçlar ve yapılan gözlemler sonucunda editlenir.

- pKa değerleri with PROPKA3 ve H++ web server (v3.2) ile deneyin belirttiği pH değerinde hesaplanır.

- Eğer kompleks (reseptör-ligant) yapınız var ise hesaplar için **MUTLAKA** Propka3.1 kullanmanız gerekir.

• **Histidine** **HID:** *Histidine with hydrogen on the delta nitrogen* **HIE:** *Histidine with hydrogen on the epsilon nitrogen* **HIP:** *Histidine with hydrogens on both nitrogens; this is positively charged.*	• **Cysteine** **CYM:** *deprotonated cysteine* **CYX:** *Disulfide bridge* **CYS:***protonated cysteine*
Lysine **LYS** *protonated lysine (+1 total charge)* **LYN** *deprotonated (neutral) lysine*	• **Aspartic acid** **ASP -** *deprotonated aspartate* ***ASH*** *- protonated aspartic acid (nl)*
	GLU - *deprotonated histidine* ***GLH -*** *protonated histidine (nl)*

Sistem Hazırlama–Protonasyon Durumları

	6lu7 (Complex)	
Residue@Chain	**H++**	**PROPKA3.1**
HIS-41@A, HIS-347@B	0.28	**4.29**
HIS-64@A, HIS-370@B	6.67	**6.22**
HIS-80@A, HIS-386@B	6.60	**5.77**
HIS-163@A, HIS-469@B	<0.0	**1.37** (1.05)
HIS-164@A, HIS-470@B	2.80	**1.86**
HIS-172@A, HIS-478@B	3.84	**6.47** (5.41)
HIS-246@A, HIS-552@B	6.03	**5.43**

Residue@Chain	Options	Proposed
HIS-41@A, HIS-347@B	HID	**HID**
HIS-64@A, HIS-370@B	HID/E/P	**HIP**
HIS-80@A, HIS-386@B	HIE/D/P	**HIP**
HIS-163@A, HIS-469@B	HIE	**HIE**
HIS-164@A, HIS-470@B	HID/E	**HID**
HIS-172@A, HIS-478@B	HIE/D	**HIE**
HIS-246@A, HIS-552@B	HIE/D/P	**HIP**

Asp, Glu,Cys ve Lys da kontrol edilir. Onlar için önerilenler uygun bulundu ve sadece HIS leri değiştirmek üzere devam ediyoruz.

01 Sistem Hazırlama

/okyanus/users/fsungur/EUROCC_WORKSHOP/HOLO-6LU7

Rezidüleri tekrar adlandırmak için (relabel-HISTIDINE)

cp 6lu7-fixed_renum.txt 6lu7-fixed_renum-modify.txt

cat 6lu7-fixed_renum-modify.txt | grep HI | \awk '{ printf "s/%3s A %3s /%3s A %3s /\n",$1 ,$4 ,$3 ,$4}' > sed.in

UNUTMA:

- sed.in dosyasında düzenlemeler sonrasında

sed -f sed.in 6lu7-fixed.pdb > 6lu7-in.pdb

6lu7-in.pdb dosyasında tüm histidinler uygun protonasyon durumlarıyla tanımlanmıştır.
Diğer polar rezidüler için önerilenlerden başka bir değişiklik yapılmayacak.

01

Sistem Hazırlama-Proton ekleme

EURO

tleap nasıl etkin kullanılır?

http://ambermd.org/tutorials/pengfei/

https://wikis.ch.cam.ac.uk/ro-walesdocs/wiki/index.php/Simple_scripts_for_LEaP_to_create_topology_and_coordinate_files

01

Sistem Hazırlama-Leap.in dosyası

/okyanus/users/fsungur/EUROCC_WORKSHOP/HOLO-6LU7

EURO

```
# load  the  force  field  libraries
source  leaprc.protein.ff14SB
source  leaprc.water.tip3p

# load  the PDB file , create a "mol" object
mol = loadpdb 6lu7-in.pdb

# neutralize  system
addions  mol Na+ 0
addions  mol Cl – 0

# save  topology  and  coordinate  files

saveamberparm  mol 6lu7-gas.top 6lu7-gas.incrd
quit
```

ÇALIŞTIR

tleap -f leap .in

ÇIKTI DOSYALAR

6lu7-gas.top

6lu7-gas.inrcrd

Oluşan yapının görseli

ambpdb -p 6lu7-gas.top < 6lu7-gas.incrd > 6lu7-gas.pdb

Sistem Hazırlama-Minimizasyon minH.in (sadece hidrojenler)

EURO

/okyanus/users/fsungur/EUROCC_WORKSHOP/HOLO-6LU7/Hminimization/short

minH.in

```
MD 10K NVT strong coupling, restraints on all protein heavy atoms
&cntrl
  imin = 1, !minimize initial structure
   ntx = 1, irest=0, ! read coordinate
   ntmin = 1, !both SD and CG is going to be used if =1 only SD no need for nyc
   ncyc=500,   !switch from steepest descent to CG after 1000 cycles
   maxcyc = 1000, !max cycle for minimization
   ntpr=10, !print to mdout every ntpr steps
   ntb=0, !non periodic simulation
   ntp=0, !no pressure scaling
   cut = 9999., !Nonbonded cutoff in Angstrom
   rgbmax=15., !controls the maximum distance between atom pairs
   ntr = 1, restraint_wt = 10.0, restraintmask = '!@H='
/
```

```
ambpdb -p 6lu7-gas.top -c 6lu7-gas-min0.rst > 6lu7-gas-min0.pdb
```

Sistem Hazırlama-Minimizasyon

amber.sh

EURO

```
#!/bin/bash

#SBATCH -J "Tutorial"                  # isin adi

#SBATCH -A cmpei1                      # account / proje adi
#SBATCH -p shortq                      # kuyruk (partition/queue) adi

#SBATCH -n 8
#SBATCH -N 1                           # cekirdek / islemci sayisi

module load cuda/cuda-8.0
module load intel/parallel_studio_xe_2017.0.035
module load intel/impi_2017.0.098
module load intel/mkl_2017.0.098

source /okyanus/progs/amber/amber16/intel/amber.sh

#calisacak is
$AMBERHOME/bin/sander -O -i minH.in -o 6lu7-gas-min0.out -p 6lu7-gas.top -c  6lu7-gas.incrd -ref 6lu7-gas.incrd
-r 6lu7-gas-min0.rst -e 6lu7-gas-min0.ene -v 6lu7-gas-min0.vel -x 6lu7-gas-min0.incrd  -inf 6lu7min.mdinfo
```

02

Moleküler Kenetleme

EURO

1. Minimize edilen protein yapısı, kenetleme için hazırlanır.

2. Esnek kenetleme çalışması için, proteinin sabit ve esnek kısımları ayrı PDB dosyalarına ayrılır. Bu aşamada hareket etmesine izin verilen yani esnek bırakılan aminoasitlerin hareket edebilmelerini sağlayan dönebilir bağlar belirlenir.

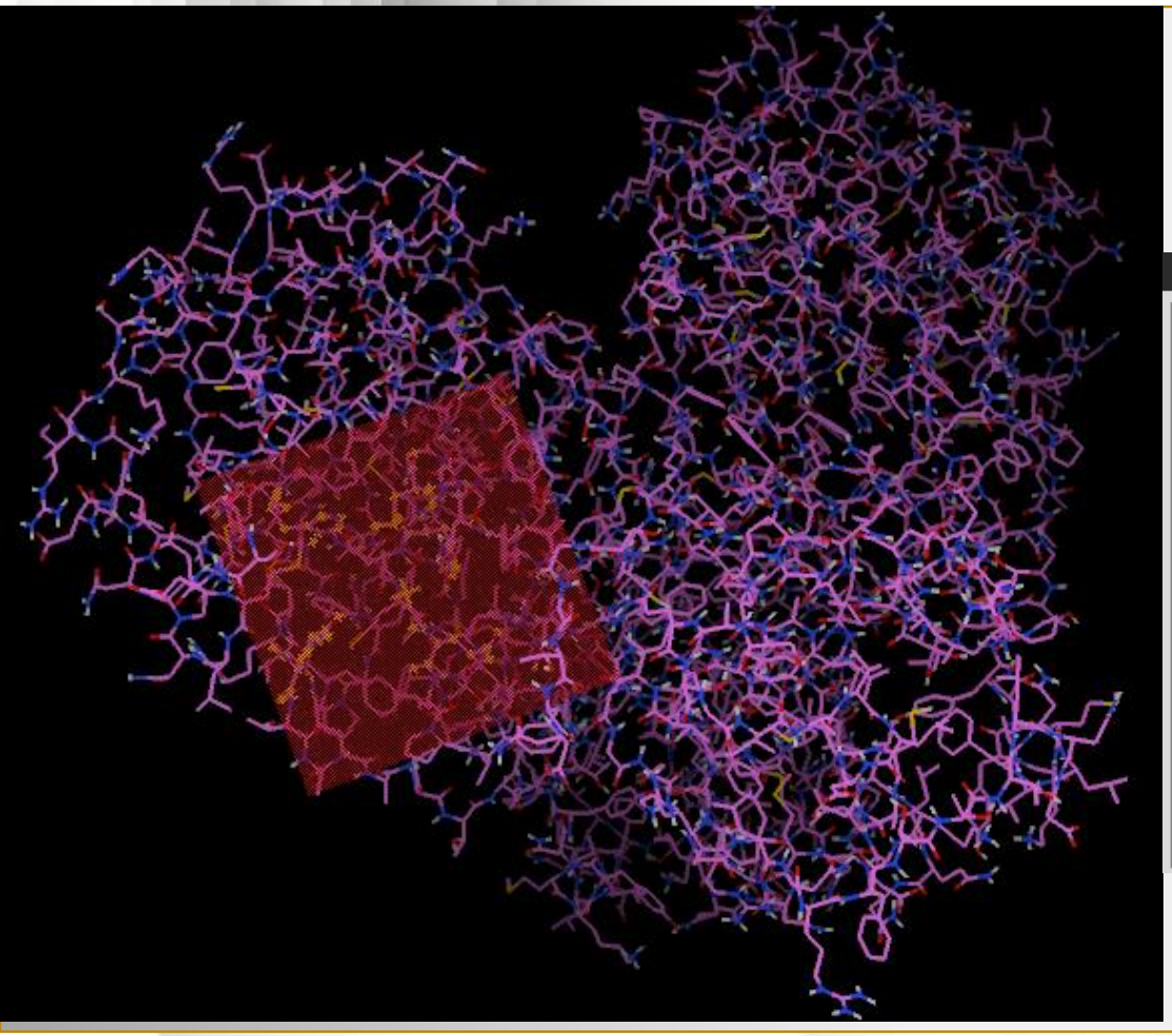
3. Kenetlenecek ligand hazırlanır. Ligandın aktif bölge içerisinde hareket ederek uygun lokasyonda konumlanması için esnek bırakılır ve dönebilir bağları belirlenir.

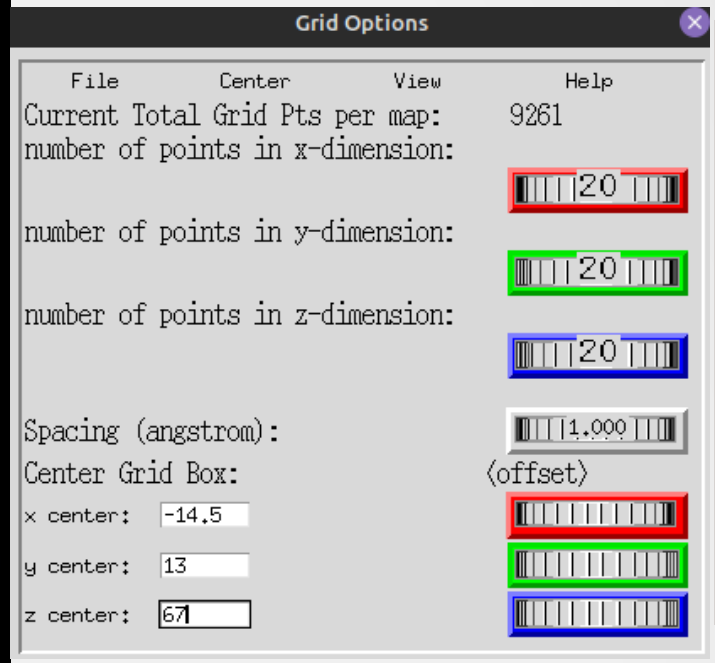
4. Kenetleme için gerekli parametrelerin yer aldığı konfigürasyon dosyası hazırlanır ve iş başlatılır.

02

Moleküler Kenetleme

EURO





Konfigürasyon dosyası (conf.txt)

```
receptor=6lu7-prep_rigid.pdbqt
flex=6lu7-prep_flex.pdbqt
ligand=ligand.pdbqt

center_x = -14.5
center_y = 13
center_z = 67

size_x = 20
size_y = 20
size_z = 20

exhaustiveness = 32

out=ligand_out.pdbqt
log=ligand_log.txt
```

Moleküler Kenetleme

EURO

```
#!/bin/bash

#SBATCH -J "Tutorial"                          # isin adi
#SBATCH -A cmpei1                             # account / proje adi
#SBATCH -p defq                              # kuyruk (partition/queue) adi
#SBATCH -n 28
#SBATCH -N 1                                  # cekirdek / islemci sayisi

mgltools_scripts_path=/okyanus/users/fsungur/mgltools_x86_64Linux2_1.5.7/MGLToolsPckgs/AutoDockTools/Utilities24
vina_path=/okyanus/users/fsungur/autodock_vina_1_1_2_linux_x86/bin
pythonsh=/okyanus/users/fsungur/mgltools_x86_64Linux2_1.5.7/bin/pythonsh

# 1. Reseptör hazırlanması
$pythonsh $mgltools_scripts_path/prepare_receptor4.py -r 6lu7-gas-min0.pdb -o 6lu7-prep.pdbqt

# 2. Reseptörün sabit ve esnek kısımlarının hazırlanması
$pythonsh $mgltools_scripts_path/prepare_flexreceptor4.py -r 6lu7-prep.pdbqt -s HID41_CYS145_HIE163_GLU166_GLN189

# 3. Ligandın hazırlanması
$pythonsh $mgltools_scripts_path/prepare_ligand4.py -l ligand.pdb

# 4. Kenetleme
$vina_path/vina --config conf.txt
```

01

Ligand Hazırlama

input files
– ligand.pdb
– receptor.pdb

Pymol kullanarak complex.pdb adıyla kayıt edebilirsiniz. 306 ve 307 arasına TER keyword eklemek gerekiyor.

Then use *pd4amber* to fix pdb file.
> pdb4amber -i ligand.pdb -o ligand-clean.pdb
> pdb4amber -i complex.pdb -o complex-clean.pdb

01 Ligand Parametrizasyon

Use antechamber program to parametrize ligand-clean.pdb

> antechamber -i ligand-clean.pdb -fi pdb -at gaff -o ligand.mol2 -fo mol2 -c bcc -s 2 -j 5

Use parmchk2 utility to test and generate paramater files

> parmchk2 -s 2 -i ligand.mol2 -f mol2 -o ligand.frcmod
> parmchk2 -s 2 -i ligand.mol2 -f mol2 -o ligand.frcmod.full -a Y

Check ligand.frcmod file: You should check these parameters carefully before running a simulation. If antechamber can’t empirically calculate a value or has no analogy it will either add a default value that it thinks is reasonable or alternatively insert a place holder (with zeros everywhere) and the comment ‘ATTN needs revision‘. In this case you will have to manually parameterise this yourself.

Antechamber

- This is the most important program in the package. It can perform many file conversions, and can also assign atomic charges and atom types.
  - -c : charge method
  - -j : atom type and bond type prediction index, default is 4
    - 0 : no assignment
    - 1 : atom type
    - 2 : full bond types
    - 3 : part bond types
    - 4 : atom and full bond type
    - 5 : atom and part bond type

List of the Charge Methods:

charge method	abbre.	index	charge method	abbre.	
RESP	resp	1	AM1-BCC	bcc	2
CM1	cm1	3	CM2	cm2	4
ESP (Kollman)	esp	5	Mulliken	mul	6
Gasteiger	gas	7	Read in charge	rc	8
Write out charge	wc	9	Delete Charge	dc	10

List of the File Formats:

file format type	abbre.	index	file format type	abbre.	index
Antechamber	ac	1	Sybyl Mol2	mol2	2
PDB	pdb	3	Modified PDB	mpdb	4
AMBER PREP (int)	prepi	5	AMBER PREP (car)	prepc	6
Gaussian Z-Matrix	gzmat	7	Gaussian Cartesian	gcrt	8
Mopac Internal	mopint	9	Mopac Cartesian	mopcrt	10
Gaussian Output	gout	11	Mopac Output	mopout	12
Alchemy	alc	13	CSD	csd	14
MDL	mdl	15	Hyper	hin	16
AMBER Restart	rst	17	Jaguar Cartesian	jcrt	18
Jaguar Z-Matrix	jzmat	19	Jaguar Output	jout	20
Divcon Input	divcrt	21	Divcon Output	divout	22
SQM Input	sqmcrt	23	SQM Output	sqmout	24
Charmm	charmm	25	Gaussian ESP	gesp	26

01 Prepare LIG Library File

Use tleap to generate parameter library file for ligand

input files
– ligand.mol2

> tleap -f leap-ligand .in

```
source leaprc.protein.ff14SB
source leaprc.gaff

LIG = loadmol2 ligand.mol2

check LIG

loadamberparams ligand.frcmod

check LIG

saveoff LIG ligand.lib

quit
```

01

Prepare Complex

EURO

Use tleap to generate topology and coordinate files for MD simulation

input files
– ligand.lib
– ligand.frcmod
– ligand.mol2
– receptor-clean.pdb
– complex-clean.pdb

> tleap -f leap-complex.in

Generate complex-solvated.pdb

```
source leaprc.protein.ff14SB
source leaprc.water.tip3p
source leaprc.gaff

loadamberparams ligand.frcmod
loadoff ligand.lib

COMPLEX = loadpdb complex-clean.pdb
LIGAND = loadmol2 ligand.mol2
RECEPTOR = loadpdb receptor-clean.pdb

set default PBRadii mbondi2

saveamberparm COMPLEX receptor-ligand.prmtop receptor-ligand.incrd

addions COMPLEX Na+ 0
addions COMPLEX Cl- 0

saveamberparm COMPLEX complex.prmtop complex.incrd
saveamberparm LIGAND ligand.prmtop ligand.incrd
saveamberparm RECEPTOR receptor.prmtop receptor.incrd

solvatebox COMPLEX TIP3PBOX 12.0 iso 1.00
set COMPLEX box 111.75708

saveamberparm COMPLEX complex-solvated.prmtop complex-solvated.incrd

quit
```

> ambpdb -p complex-solvated.prmtop -c complex-solvated.incrd > complex-solvated.pdb

EURO

Thanks!

EuroHPC
Joint Undertaking

This project has received funding from the European High-Performance Computing Joint Undertaking (JU) under grant agreement No 951732. The JU receives support from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme and Germany, Bulgaria, Austria, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Lithuania, Latvia, Poland, Portugal, Romania, Slovenia, Spain, Sweden, United Kingdom, France, Netherlands, Belgium, Luxembourg, Slovakia, Norway, Switzerland, Turkey, Republic of North Macedonia, Iceland, Montenegro