

Montagem de uma Membrana POPC

Hubert Stassen

Instituto de Química - UFRGS, gullit@iq.ufrgs.br

10 de agosto de 2016

Resumo: Esse manuscrito apresenta os passos para a montagem de uma bicamada fosfolipídica hidratada utilizando as ferramentas do pacote de softwares Gromacs. Escolheu-se o fosfolípídeo palmitoil-oleil-fosfatidil-colina (POPC).

1 Ponto de Partida

Iniciamos a montagem da nossa bicamada hidratada através das coordenadas para os átomos unificados de uma molécula POPC. Além das coordenadas, precisa-se os parâmetros do campo de força. Escolheu-se aqui o campo de força de Berger para a descrição do fosfolípídeo [1]. Um dos motivos dessa escolha é o compartilhamento com o campo de força GROMOS53a6 [2].

Colocou-se os arquivos necessários para iniciar esse minicurso no diretório `mini_01/start`. Entramos no diretório de trabalho.

```
cd mini_01
```

Listamos o diretório contendo os arquivos de partida.

```
ls -l start
```

O conteúdo desse diretório aparece:

```

-rw----- 1 drg users      1274 Aug 9 14:42 ff_dum.itp
-rw----- 1 drg users     13376 Aug 9 14:42 ffG53a6bon.itp
-rw----- 1 drg users       176 Aug 9 14:42 ffG53a6.itp
-rw----- 1 drg users    188703 Aug 9 14:42 ffG53a6nb.itp
-rw----- 1 drg users      4527 Aug 9 14:42 md.mdp
-rw----- 1 drg users      5083 Aug 9 14:42 min.mdp
-rw----- 1 drg users      2382 Aug 9 14:42 popc.gro
-rw----- 1 drg users     13645 Aug 9 14:42 popc.itp
-rw----- 1 drg users       286 Aug 9 14:42 popc.top
-rw----- 1 drg users     29266 Aug 9 14:42 spc216.gro
-rw----- 1 drg users      1136 Aug 9 14:42 spc.itp

```

Os arquivos `ff*.itp` contêm os parâmetros intra- (`ffG53a6bon.itp`) e intermoleculares (`ffG53a6nb.itp`), `md.mdp` e `min.mdp` parâmetros da simulação e minimização, respectivamente. As coordenadas de uma molécula POPC encontram-se em `popc.gro`. Os arquivos `popc.itp` e `popc.top` representam a topologia da molécula. Finalmente, uma caixa pequena de água vindo junto com o pacote GROMACS está incluída no arquivo `spc216.gro`. Campos de força para a água são definidos em `spc.itp`. O campo de força definido nos arquivos é o GROMOS53a6 [3]. Sugere-se o uso dos arquivos listados e não daqueles padrão do GROMACS. Os arquivos incluídos aqui permitem o acoplamento do campo de força de Berger com o GROMOS53a6 [2]. Copiamos os arquivos na área de trabalho.

```
cp start/* .
```

Pode-se verificar o conteúdo de cada arquivo através de

```
more arquivo
```

Aqui, limita-se a visualização do POPC, cuja configuração foi extraída de uma bicamada pronta.

```
grompp -v -o popc.tpr -f min.mdp -p popc.top -c popc.gro
```

```
ngmx -s popc.tpr -f popc.gro
```

Girando **X-Rotate** por 90° fornece a vista frente ao plano xy que se tornará o plano da bicamada. Confina-se o POPC em uma caixa triclinica pequena com as dimensões da molécula.

```
editconf -f popc.gro -o 00.gro -bt triclinic -c -box 1 1 2.6
```

```
ngmx -s popc.tpr -f 00.gro
```

2 Construção da Bicamada

A estratégia na construção da bicamada consiste de vários passos. Inicialmente, cria-se uma monocamada no plano xy . Sugere-se aqui uma monocamada contendo 64 moléculas POPC. A ferramenta **genconf** permite copiar uma arquivo de coordenadas em três dimensões. Aqui, interessem apenas as direções x e y .

```
genconf -f 00.gro -o mono.gro -nbox 8 8 1
```

Com a finalidade de visualizar essa monocamada, precisa-se editar a topologia,

```
vi popc.top ou outroeditor popc.top
```

e substituir no fim do arquivo POPC 1 por POPC 64. Salvando e saindo do arquivo, compila-se para visualizar.

```
grompp -v -o mono.tpr -f min.mdp -p popc.top -c mono.gro
```

```
ngmx -s mono.tpr -f mono.gro
```

Não se esquecem de girar pelo eixo x (**X-Rotate**) por 90° . Em um segunda passo, cria-se uma segunda monocamada através de inverter a primeira pelo eixo z . A opção **scale** do **editconf** com valor -1 permite isso. Aqui, invertremos pelo eixo z , normal da futura bicamada.

```
editconf -f mono.gro -o inv.gro -scale 1 1 -1
```

Finalmente, costura-se as duas monocamdas produzindo a bicamada com 128 moléculas POPC. Para isso, criamos uma cópia da primeira monocamada,

```
cp mono.gro bi.gro
```

e editamos esse arquivo novo inserindo a monocamda invertida não esquecendo de arrumar número de átomos e comprimento em z . Abrimos o arquivo criado,

```
vi bi.gro ou outroedito bi.gro
```

e aplicamos as operações:

- Número de átomos: trocar 3328 por 6656 na segunda linha
- Excluir a última linha do arquivo
- Inserção da camada invertida no fim do arquivo `:r inv.gro`

- Excluir as duas linhas POPC e 3328
- Dobrar o tamanho z na última linha substituindo -2.60000 por 5.2

Salvando e saindo do arquivo, continua-se.

Tendo em vista que a monocamada invertida apresenta coordenadas z negativas, centramos o sistema na caixa nova.

editconf -f bi.gro -o bi.gro -c

Cabe mencionar que o comando **editconf** também arruma a numeração dos átomos.

Para visualizar a bicamada construída, editamos a topologia,

vi popc.top ou **outroeditor popc.top**

substituindo na última linha POPC 64 por POPC 128. Salvando e saindo do arquivo, visualizamos,

grompp -v -o bi.tpr -c bi.gro -f min.mdp -p popc.top

ngmx -s bi.tpr -f bi.gro

Tendo em vista que a bicamada consiste de configurações idênticas das moléculas POPC, sugere-se de movimentar essa bicamada antes de hidratar. Para isso, iniciamos a minimização (definiu-se no arquivo **min.mdp** 50 passos com o minimizador **steepest-decent steep**).

mdrun -nice 0 -v -s bi.tpr -c bimin.gro -o bimin.trr -g bimin.log -e bimin.edr

Prepara-se uma simulação curta (1 ps). No arquivo **md.mdp**, definiu-se 500 passos de integração com $dt = 0.002$ a 310 K. Observa-se o acoplamento semi-isotrópico da pressão.

grompp -v -o bi.tpr -c bimin.gro -f md.mdp -p popc.top

mdrun -nice 0 -v -s bi.tpr -c bi.gro -e bi.edr -g bi.log -o bi.trr &

Para fiscalizar essa simulação, monitora-se as entradas no arquivo **bi.log**.

tail -f bi.log

Esse comando pode ser abortado por **Ctrl-C**. Não extendemos essa simulação demais. Pode-se criar artifatos com condições de contorno antes de hidratar por simulações longas. Podemos visualizar a trajetória.

ngmx -s bi.tpr -f bi.trr

A animação mostra que conseguimos quebrar a organização de moléculas POPC igualmente configuradas.

3 Hidratar

Para hidratar essa bicamada, cria-se caixas de água com a mesma dimensão xy da bicamada. Verifica-se o tamanho da caixa contendo a bicamada (última linha do arquivo de coordenadas **bi.gro**),

```
tail bi.gro
```

e anota-se os três números da última linha (7.95861 7.95861 5.52105 ou semelhante). Criamos uma caixa de água (acredita-se que uma espessura de 2 nm seja suficiente). Utilizamos água SPC [4]. Recomenda-se de utilizar pelo menos 30 a 40 moléculas água por fosfolípídeo. Utiliza-se uma caixa de água equilibrada contendo 216 moléculas (faz parte da instalação do GROMACS) para criar a nossa caixa **agua.gro** com a ferramenta **genbox**.

```
genbox -cs spc216.gro -o agua.gro -box 7.96 7.96 2.0
```

Observa-se o output desse comando procurando o número de moléculas SOL inseridas na caixa (aqui 3957). Essa caixa será inserida em baixo da bicamada. Já podemos translacionar a bicamada por 2,1 nm em direção z . O valor de 2,1 nm consiste do comprimento z da caixa de água mais 0,1 nm de segurança minimizando o efeito eventual de sobrepor átomos do POPC com a água.

```
editconf -f bi.gro -o bi.gro -translate 0 0 2.1
```

A caixa de água para hidratar a parte superior da bicamada pode ser criada através de translacionar a caixa de água por 7,7 nm. Esse valor pode ser obtido somando o tamanho z da bicamada (aqui mais ou menos 5,5 nm), o tamanho z da caixa (aqui 2,0 nm), e duas faixas de segurança de 0,1 nm.

```
editconf -f agua.gro -o upper.gro -translate 0 0 7.7
```

A membrana hidratada terá aqui um comprimento z de 9,7 nm (7,7 nm mais o tamanho z da segunda caixa de água de 2,0). Anota-se esse valor.

Criamos uma cópia de segurança da bicamada.

```
cp bi.gro bi.gro.bak
```

Assim, podemos recuperar a nossa bicamada no caso de ter essa necessidade com o comando **cp bi.gro.bak bi.gro**.

A bicamda pode ser juntada com as caixas da água editando o arquivo de coordenadas da bicamada.

```
vi bi.gro ou outroeditor bi.gro
```

Aplicamos os procedimentos:

- Tendo em vista que cada caixa de água contem aqui 3957 moléculas, define-se o número de átomos do sistema novo como 6656 (bicamada) mais $3 \cdot 2 \cdot 3957$, ou seja, 30398. Esse número deve aparecer na segunda linha do arquivo (pode ser um número diferente).
- Excluir a última linha.
- Inserir o arquivo `agua.gro` através de `:r agua.gro`
- Excluir duas linhas `'generated by genbox'` e `'11871'` (esse pode ser um número diferente).
- Excluir a última linha
- Inserir o arquivo `upper.gro` através de `:r upper.gro`
- Excluir duas linhas `'generated by genbox'` e `'11871'` (esse pode ser um número diferente).
- Substituir o terceiro número da última linha (tamanho z) pelo valor anotado (aqui 9.70000)

A caixa contem agora 128 moléculas POPC e 7914 moléculas água (SOL). Salvando e saindo do arquivo, precisamos editar a topologia,

`vi popc.top` ou `outroeditor popc.top`

e adicionar como última linha `SOL 7914` (pode ser um número diferente). Salvando e saindo do arquivo, renumera-se os átomos,

`editconf -f bi.gro -o bi.gro`

visualizamos a bicamada hidratada.

`grompp -v -o min.tpr -f min.mdp -p popc.top -c bi.gro`

`ngmx -s min.tpr -f bi.gro`

Para obter a visão frente ao plano da bicamada, precisa-se girar `X-Rotate` por 90° .

4 Simulação da Bicamada Hidratada

Depois de uma minimização (50 passos com l-bfgs),

```
mdrun -nice 0 -v -s min.tpr -c min.gro -e min.edr -g min.log  
-o min.trr
```

prepara-se uma simulação de 50ps editando o arquivo dos parâmetros da simulação. Sugere-se uma temperatura de 310 K.

```
vi md.mdp ou outroeditor md.mdp
```

Modificamos esse arquivo:

- Com o passo de integração de 2 fs, define-se `nsteps = 25000`.
- Define-se `energygrps = POPC SOL` para poder fiscalizar interações específicas de fosfolípeos e água.
- Define-se `tc-grps = POPC SOL` para independentemente termostatizar fosfolípeos e água. Isso implica uma segundo termostato `tau-t = .45 .45` e `ref-t = 310. 310`.

Salvando e saindo do arquivo, desenvolvemos a simulação muito curta como um primeiro teste.

```
grompp -v -o 00.tpr -f md.mdp -p popc.top -c min.gro
```

```
mdrun -nice 0 -v -s 00.tpr -c 00.gro -g 00.log -o 00.trr -e 00.edr  
&
```

De novo, vamos fiscalizar as entradas no arquivo 00.log,

```
tail -f 00.log
```

(Ctrl-C para abortar) e visualizar a trajetória curta.

```
ngmx -s 00.tpr -f 00.trr
```

É importante de afirmar a ausência de água no centro da bicamada.

Como o objetivo de obter a evolução temporal de umas propriedades desse sistema, utilizamos a ferramenta `g_energy` aplicada ao arquivo `00.edr`. Escolhe-se as opções 1-7, 9-14, 16, 18-22, e 50-55. Colocando a opção 0, o cálculo inicia.

```
g_energy -s 00.tpr -f 00.edr -o 00.termo
```

O arquivo `00.termo.xvg` pode ser visualizado com o `gnuplot`.

gnuplot

```
p "00.termo.xvg" u 1:2 w l
```

Esse comando `p` do `gnuplot` plota a segunda coluna do arquivo `00.termo.xvg` contra a primeira (representando o tempo). Verificamos todas as colunas do arquivo,

```
p "00.termo.xvg" u 1:n w l
```

com `n` representando o número da coluna a ser plotado contra o tempo. O cabeçalho do arquivo `00.termo.xvg` indica que propriedade aparece em que coluna. Investigando as evoluções temporais, concluimos que muitas propriedades não convergiram. Precisa-se simular mais tempo (em membranas, é comum de simular 100 ns ou mais para chegar em um sistema equilibrado). Podemos sair do `gnuplot` com o comando `quit`.

Para continuar a simulação da membrana hidratada, editamos o arquivo com os parâmetros da simulação,

vi md.mdp ou `outroeditor md.mdp`

modificando

- `tinit = 50` (já simulamos 50 ps)
- `gen_vel = no`, pois temos velocidades para todos os átomos no arquivo `00.gro`

Salvando e saindo do arquivo, simulamos mais 50 ps,

```
grompp -v -o 01.tpr -f md.mdp -p popc.top -c 00.gro
```

```
mdrun -nice 0 -v -s 01.tpr -c 01.gro -g 01.log -o 01.trr -e 01.edr  
&
```

fiscalizando os logs (`tail -f 01.log`) e visualizando a trajetória (`ngmx -s 01.tpr -f 01.trr`). Aplica-se o `g_energy` com as mesmas opções de antes,

```
g_energy -s 01.tpr -f 01.edr -o 01.termo
```

e plotamos todas as colunas (mexendo com o `n`).

gnuplot

```
p "00.termo.xvg" u 1:n w l, "01.termo.xvg" u 1:n w l
```


A área por fosfolípídeo é uma grandeza importante para membranas. Pode-se obter o seu valor numérico através do produto `Box-X` com `Box-Y` (\Rightarrow área total da membrana) dividindo ainda por 64 (moléculas POPC por camada). Aplicando esse cálculo ao arquivo `01.termo.xvg`, obtemos algo em torno de $0,65 \text{ nm}^2$. Porém, o sistema precisa bem mais tempo de simulação.

O perfil de densidade representa outra propriedade importante para membranas. A ferramenta `g_density` permite a obtenção.

```
g_density -s 01.tpr -f 01.trr -o total (com opção System)
```

```
g_density -s 01.tpr -f 01.trr -o popc (com opção POPC)
```

```
g_density -s 01.tpr -f 01.trr -o agua (com opção SOL)
```

Chamamos o `gnuplot` para analisar esses perfis de densidade.

```
p "total.xvg" u 1:2 w l, "popc.xvg" u 1:2 w l, "agua.xvg" u  
1:2 w l
```

Nessa figura, enxergamos a decomposição do perfil de densidade (de massa) total da membrana nas suas contribuições originadas em POPC e água ao longo da normal da membrana (eixo z). Observa-se o mínimo no centro da bicamada e duas máximas separadas por $3,4 \text{ nm}$ (espessura da bicamada).

Precisa-se prolongar bastante essa simulação repetindo os procedimentos descritos. Outra ferramenta interessante de análise para membranas é o `g_order` permitindo a obtenção de parâmetros de ordem das cadeias alifáticas.

Bibliografia

- [1] O. Berger, O. Edholm, e F. Jähnig, *Biophys. J.* **72** (1997), 2002.
- [2] S.W. Siu, R. Vácha, P. Jungwirth, e R.A. Böckmann, *J. Chem. Phys.* **128** (2008), 125103.
- [3] C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, e W.F. van Gunsteren, *J. Comput. Chem.* **25** (2004), 1656.
- [4] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, e J. Hermans, em *Intermolecular Forces*, B. Pullman (ed.) (Reidel, Dordrecht, 1981), 331.