

Melitina em Membrana DOPC

Hubert Stassen

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

11 de agosto de 2016

Resumo: Partindo de uma bicamada fosfolipídica hidratada e de uma estrutura proteica experimental, esse manuscrito apresenta os passos para iniciar uma simulação por dinâmica molecular de uma membrana contendo um polipeptídeo. Escolheu-se uma bicamada composta pelo fosfolípido dioleilfosfatidil-colina (DOPC) interagindo com a melitina.

1 Ponto de Partida

Nessa experiência, partimos de uma bicamada DOPC hidratada com água [1]. Esse sistema já foi simulado por 100 ns utilizando o campo de força de Berger [2] para as moléculas DOPC. Falta a estrutura do polipeptídeo melitina (em inglês: melittin). Uma varredura rápida na internet indica que a estrutura cristalina desse polipeptídeo foi depositado com o código 2MLT [3] no protein data bank (www.rcsb.org). Procurando com a palavra chave melittin nesse site, apresenta o link para a estrutura 2MLT contendo o arquivo 2MLT.pdb necessitado.

Colocou-se os arquivos necessários para iniciar esse minicurso no diretório `mini_02/start`. Entramos no diretório `mini_02`,

```
cd mini_02
```

e listamos os arquivos do diretório `start`.

```
ls -l start
```

O conteúdo aparece conforme:

```

-rw----- 1 drg users 66582 Aug 10 13:42 2MLT.pdb
-rw----- 1 drg users 957628 Aug 10 13:36 dopc.gro
-rw----- 1 drg users 14436 Aug 10 13:36 dopc.itp
-rw----- 1 drg users 298 Aug 10 13:36 dopc.top
-rw----- 1 drg users 1274 Aug 10 13:36 ff_dum.itp
-rw----- 1 drg users 13376 Aug 10 13:36 ffG53a6bon.itp
-rw----- 1 drg users 176 Aug 10 13:36 ffG53a6.itp
-rw----- 1 drg users 188703 Aug 10 13:36 ffG53a6nb.itp
-rw----- 1 drg users 4105 Aug 10 13:36 ions.itp
-rw----- 1 drg users 4532 Aug 10 13:36 md.mdp
-rw----- 1 drg users 4637 Aug 10 13:36 membed.mdp
-rw----- 1 drg users 5082 Aug 10 13:46 min.mdp
-rw----- 1 drg users 1136 Aug 10 13:36 spc.itp

```

Os arquivos `ff*.itp` contêm os parâmetros intra- (`ffG53a6bon.itp`) e intermoleculares (`ffG53a6nb.itp`) do campo de força GROMOS53a6 [4] adaptado ao campo de força de Berger para fosfolipídeos [1]. Os arquivos `md.mdp`, `membed.mdp` e `min.mdp` possuem parâmetros da simulação, do processo de inserção e da minimização, respectivamente. As coordenadas da bicamada DOPC hidratada encontram-se em `dopc.gro`. Os dois arquivos `dopc.itp` e `spc.itp` representam a topologia para DOPC e água. A composição da bicamada é definida no arquivo `dopc.top`. Copiamos esses arquivos para o nosso diretório de trabalho.

```
cp start/* .
```

Pode-se verificar o conteúdo de cada arquivo através de

```
more arquivo
```

Antes de inserir a melitina na bicamada, precisa-se analisar o conteúdo do arquivo `2MLT.pdb`.

```
vi 2MLT.pdb ou outroeditor 2MLT.pdb
```

A primeira parte desse arquivo apresenta referências, condições do experimento (raio-X), etc. Na linha 334 do arquivo, enxergamos que o arquivo contém duas melitinas (cadeia A e B), ambas com 26 aminoácidos. Em seguida aparece a estrutura primária e informações sobre a estrutura secundária (hélices envolvendo os resíduos 1-11 e 14-26). Seguem as coordenadas dos átomos da cadeia A nas linhas 370-569. Trabalhando com apenas uma das cadeias, delete-se todas as linhas a partir da linha 572 (linha que segue do indicador TER na esquerda). Apaga-se também a linha contendo HETATM 201. Salvando e saindo do arquivo, continuamos.

2 Definição de Topologia para a Melitina

Precisa-se definir topologia e campo de força para o polipeptídeo. O GRO-MACS possui a ferramenta `pdb2gmx` para essa tarefa. O comando

```
pdb2gmx -h
```

mostra as opções. Mantendo os estados de protonação de cada aminoácido em default, utiliza-se o `2MLT.pdb` como input criando a topologia `2MLT.top` e arquivo de coordenadas `2MLT.gro`.

```
pdb2gmx -f 2MLT.pdb -o 2MLT.gro -p 2MLT.top
```

Escolhe-se o campo de força GROMOS53a6 (na minha versão do `pdb2gmx`: opção 13; mas **olham bem**) e, em seguida, o modelo de água SPC [5]. O comando

```
ls -l
```

mostra que se obteve esses dois arquivos, bem como o arquivo `posre.itp` com os parâmetros de um position restraining da melitina.

Precisa-se ainda arrumar o arquivo de topologia da melitina. Edita-se o arquivo `2MLT.top`,

```
vi 2MLT.top ou outroeditor 2MLT.top
```

trocando a linha

```
#include "gromos53a6.ff/forcefield.itp"
```

por

```
#include "ffG53a6.itp"
```

Quase no fim do arquivo, insere-se em baixo da linha

```
; Include water topology
```

a linha.

```
#include "dopc.itp"
```

Agora, modifica-se a linha

```
#include "gromos53a6.ff/spc.itp"
```

para

```
#include "spc.itp"
```

Um pouco mais para baixo nesse arquivo, ainda se transforma a linha

```
#include "gromos53a6.ff/ions.itp"
```

em

```
#include "ions.itp"
```

Salvando e saindo do arquivo, arrumamos uma caixa de simulação com as dimensões da membrana definidas na última linha do arquivo de coordenadas da bicamada. O comando

```
tail dopc.gro
```

mostra o tamanho 6.58170 6.47570 7.41430 da membrana equilibrada. Criamos a caixa triclinica colocando o centro de massa da melitina no centro da caixa (opção `-c`).

```
editconf -f 2MLT.gro -o 2mlt.gro -bt triclinic -c -box 6.5817  
6.4757 7.4143
```

Visualizando,

```
grompp -v -o 2mlt.tpr -c 2mlt.gro -f min.mdp -p 2MLT.top
```

```
ngmx -s 2mlt.tpr -f 2mlt.gro
```

mostra que a melitina é rica em α -hélices. Porém, ela não fica orientada ao longo da direção z (normal da membrana). A vista default do **ngmx** é do eixo z para baixo. Assim, girando o eixo x por 90° com o **X-Rotate** do **ngmx** permite a visão de frente para o plano xy . Girando por 150° em direção x e 65° em y ,

```
editconf -f 2mlt.gro -o eioxz.gro -c -rotate 150 65 0
```

melhora a orientação do polipeptídeo dentro da caixa,

```
ngmx -s 2mlt.tpr -f eioxz.gro
```

Cabe mencionar que existem softwares facilitando melhor esse processo de arrumar a orientação de proteínas. Cita-se o Swiss-pdb Viewer (pdbev.vital-it.ch) como exemplo. Aqui, utiliza-se o arquivo gerado **eioxz.gro** para a inserção na membrana.

3 Inserção da Melitina na Bicamada DOPC

A estratégia na inserção da melitina na bicamada consiste da solvatação do polipeptídeo com a membrana. As dimensões das caixas `eioxz.gro` e `dopc.gro` são as mesmas. A melitina já foi centrada e orientada apropriadamente. Visualiza-se a caixa contendo a bicamada DOPC.

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

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

Verifica-se através de girar o eixo x por 90° (X-Rotate do `ngmx`) que a membrana fica dentro do plano xy . A membrana aparece também centrada na caixa.

A solvatação pode ser desenvolvida com a ferramenta `genbox`. Utilizando a melitina (em `eioxz.gro`) como soluto e a bicamada hidratada (em `dopc.gro`) como solvente, o comando seria `genbox -cp eioxz.gro -cs dopc.gro -o 00.gro` para obter a melitina inserida na bicamada (`00.gro`). Precisa-se observar quantas moléculas DOPC e água ficam perdidas nesse procedimento e corrigir a topologia (em `2MLT.top`).

Porém, o GROMACS possui uma ferramenta mais suave para esse processo, `g_membed` [6]. O comando

```
g_membed -h
```

mostra as opções. Precisamos juntar a melitina com a bicamada,

```
vi eioxz.gro ou outroeditor eioxz.gro
```

eliminando a última linha e inserir a bicamada com `:r dopc.gro`. Eliminamos a linha contendo `Berger lipid NPT,,` bem como a linha em seguida (21279). Na segunda linha do arquivo, trocamos o número 260 pelo número de átomos do sistema criado (21539). Salvando e saindo do arquivo, arrumamos a numeração dos átomos,

```
editconf -f eioxz.gro -o junto.gro
```

Adicionamos as moléculas DOPC e a água na topologia (`tail dopc.top` mostra o que precisamos adicionar),

```
vi 2MLT.top ou outroeditor 2MLT.top
```

incluindo no fim do arquivo as duas linhas,

- DOPC 128

- SOL 4789

Salvando e saindo do arquivo, visualiza-se o sistema.

```
grompp -v -o min.tpr -c junto.gro -f min.mdp -p 2MLT.top  
ngmx -s min.tpr -f junto.gro
```

Observa-se o output do comando **grompp**: O sistema possui uma carga total de +5 (resíduos da melitina protonados). Neutralizamos essa carga (sem considerar aqui condições fisiológicas). A ferramenta **genion** do Gromacs permite a troca de moléculas de água por íons (aqui: CL⁻).

```
genion -s min.tpr -o 000.gro -nname CL- -nn 5
```

Escolha-se a opção SOL. Editamos a topologia trocando 5 molécula SOL por CL⁻.

```
vi 2MLT.top ou outroeditor 2MLT.top
```

Subtraindo o número da última linha por 5 (\Rightarrow SOL 4784), adiciona-se uma nova linha CL⁻ 5 no fim do arquivo.

Agora, aplicamos a inserção diminuindo as dimensões x e y dos átomos da melitina mantendo z . Durante 1000 passos, crescemos as dimensões x e y para o valor correto. Compilamos com o arquivo de parâmetros **membed.mdp**,

```
grompp -v -o membed.tpr -c 000.gro -f membed.mdp -p 2MLT.top
```

e desenvolvemos a expansão suave,

```
g_membed -nice 0 -v -f membed.tpr -c membed.gro -e membed.edr -g membed.log -o membed.trr -xyinit 0.1 -xyend 1. -nxy 1000 -maxwarn 1
```

escolhendo **Protein** e em seguida **DOPC**. O output inicial desse comando diz que 6 moléculas **DOPC** e duas moléculas da água serão removidas. Tiramos essas moléculas da topologia,

```
vi 2MLT.top ou outoreditor 2MLT.top
```

substituindo no fim do arquivo 128 por 122 e 4784 por 4782. Salvando e saindo desse arquivo, visualizamos o crescimento da melitina,

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

escolhendo como filtro **Protein**.

4 Simulação do Sistema

Para simular esse sistema, sugere-se de desenvolver inicialmente uma simulação mantendo as coordenadas da melitina position restrained. Isso é comum em sistemas contendo proteínas. O objetivo desse position restraining é uma aproximação suave de moléculas do solvente ao polipeptídeo. Para isso, edita-se o arquivo de parâmetros `md.mdp`.

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

Colocamos `-DPOSRES` na opção `define` (\implies `define = -DPOSRES`). A simulação de position-restraining é relativamente curta (definiu-se 50 ps). Sugere-se utilizar tempos maiores para proteínas maiores (200 ps). Salvando e saindo desse arquivo, simulamos

```
grompp -v -o pos.tpr -c membed.gro -f md.mdp -p 2MLT.top  
mdrun -nice 0 -v -s pos.tpr -c pos.gro -e pos.edr -g pos.log -o  
pos.trr &
```

Fiscaliza-se as entradas no arquivo de logs.

```
tail -f pos.log
```

No final dessa simulação, (Ctrl-C aborta o comando `tail -f`) pode-se visualizar a trajetória desse position-restraining.

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

Antes de continuar a simulação, sugere-se um procedimento rápido de fiscalização da estrutura secundária da melitina. Calcula-se o plot de Ramachandran da estrutura original,

```
g_rama -s pos.tpr -f 2MLT.gro -o 2MLT.rama
```

da estrutura inserida na bicamada,

```
g_rama -s pos.tpr -f membed.gro -o membed.rama
```

e da estrutura obtida pelo position-restraining.

```
g_rama -s pos.tpr -f pos.gro -o pos.rama
```

Visualizamos esses plots,

```
gnuplot
```

```
p "2MLT.rama.svg" u 1:2, "membed.rama.svg" u 1:2, "pos.rama.svg"
u 1:2
```

Observa-se que os diedrais importantes aparecem em cada caso na região esperada para α -hélices. Fiscaliza-se ainda o RMSD da da melitina.

```
g_rms -s pos.tpr -f pos.trr -o pos.rmsd
```

Escolha-se a opção 3, C-alpha, duas vezes. Para visualizar o arquivo gerado (pos.rmsd.svg), utiliza o programa `gnuplot`.

```
gnuplot
```

```
p "pos.rmsd.svg" u 1:2 w l
```

indica que a melitina manteve essencialmente a sua configuração inicial (o RMSD indica apenas valores em torno de 0,025 nm). Com `quit` podemos sair do `gnuplot`.

Prepara-se a simulação editando o arquivo de parâmetros `md.mdp`.

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

Tira-se `-DPOSRES` na opção `define`. Não necessitando mais escalamento de coordenadas referenciais, colocamos `no` na opção `refcoord_scaling`. Salvando e saindo do arquivo, simulamos a partir das coordenadas obtidas no `position-restraining`,

```
grompp -v -o 001.tpr -c pos.gro -f md.mdp -p 2MLT.top
```

```
mdrun -nice 0 -v -s 001.tpr -c 001.gro -g 001.log -e 001.edr -o
001.trr &
```

fiscalizando as entradas no arquivo de logs.

```
tail -f 001.log
```

Visualizamos a trajetória.

```
ngmx -s 001.tpr -f 001.trr
```

A análise de propriedades termodinâmicas segue o protocolo explicado na primeira parte do minicurso verificando as opções do `g_energy`. Sugere-se aqui as opções 1-8, 10-15, 17, 19-23, 51-56, 59, e 60.

```
g_energy -s 001.tpr -f 001.edr -o 001.termo
```

O `gnuplot` permite a visualização dos dados,

gnuplot

```
p "001.termo.xvg" u 1:n w l
```

com `n` representando a coluna do arquivo `001.termo.xvg` a ser plotada. O cabeçalho do arquivo `001.termo.xvg` indica a propriedade física das colunas. Chama-se a atenção dos valores para `Box-X` e `Box-Y`. O produto desses valores, dividido pelo número de moléculas DOPC por camada, produz a área por fosfolípídeo. Esse dado experimentalmente acessível necessita muito tempo de CPU para convergir (mais que 60 ns).

O RMSD é importante.

```
g_rms -s 001.tpr -f 001.trr -o 001.rmsd
```

Sugere-se de novo a escolha de `C-alpha` duas vezes. Para visualizar, chama-se,

gnuplot

```
p "001.rmsd.xvg" u 1:2 w l
```

saindo com `quit`. Outras análises para proteínas como `g_rama`, `do_dssp`, `g_gyrate`, entre outros são importante. Fiscalizamos o plot de Ramachandran,

```
g_rama -s 001.tpr -f 001.gro -o 001.rama
```

gnuplot

```
p "2MLT.xvg" u 1:2, "membed.rama.xvg" u 1:2, "pos.rama.xvg" u 1:2, "001.rama.xvg" u 1:2
```

Em simulações por dinâmica molecular, condições de contorno periódico bem como a convenção da imagem mais próxima são utilizadas. Isso pode gerar problemas em casos a distância entre macromolécula e sua imagem mais próxima fica dentro da região do cutoff da simulação (aqui: 1,25 nm). Verificamos a distância mais curta entre proteína e sua imagem com a ferramenta `g_mindist`.

```
g_mindist -s 001.tpr -f 001.trr -pi -od 001.mindist
```

Escolhemos a opção `Protein`. O output desse comando já indica que a distância mínima fica maior que 3 nm, ou seja, bem maior do que o raio de cutoff. Pode-se visualizar a distância mínima com o `gnuplot`,

gnuplot

```
p "001.mindist.svg" u 1:2 w l
```

A aplicação do `g_mindist` é obrigatória em cada trajetória obtida.

Vamos simular um pouco mais. Editamos o arquivo de parâmetros,

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

colocando `tinit = 50` (já simulamos 50 ps). Simulamos,

```
grompp -v -o 002.tpr -c 001.gro -f md.mdp -p 2MLT.top
```

```
mdrun -nice 0 -v -s 002.tpr -c 002.gro -g 002.log -e 002.edr -o  
002.trr &
```

Repetimos as análises indicadas acima. Por exemplo (escolhendo as mesmas opções de antes),

```
g_energy -s 002.tpr -f 002.edr -o 002.termo
```

```
gnuplot
```

```
p "001.termo.svg" u 1:n w l, "002.termo.svg" u 1:n w l
```

Finalmente, sugere-se o cálculo do perfil de densidade do sistema.

```
g_density -s 002.tpr -f 002.trr -o total (opção System)
```

```
g_density -s 002.tpr -f 002.trr -o melit (opção Protein)
```

```
g_density -s 002.tpr -f 002.trr -o dopc (opção DOPC)
```

```
g_density -s 002.tpr -f 002.trr -o agua (opção SOL)
```

De novo, o `gnuplot` permite a visualização.

```
gnuplot
```

```
p "total.svg" u 1:2 w l, "melit.svg" u 1:2 w l, "dopc.svg" u  
1:2 w l, "agua.svg" u 1:2 w l
```

A separação entre posições de máxima indica a espessura da membrana (aqui em torno de 3 nm). Existem outras ferramentas de análise para membranas. Cita-se o `g_order` como exemplo.

Bibliografia

- [1] S.W. Siu, R. Vácha, P. Jungwirth, e R.A. Böckmann, *J. Chem. Phys.* **128** (2008), 125103.
- [2] O. Berger, O. Edholm, e F. Jähnig, *Biophys. J.* **72** (1997), 2002.
- [3] T.C. Terwilliger e D. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **257** (1982), 6010.
- [4] C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, e W.F. van Gunsteren, *J. Comput. Chem.* **25** (2004), 1656.
- [5] 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.
- [6] M.G. Wolf, M. Hoefling, C. Aponte-Santamaría, H. Grubmüller, e G. Groenhof, *J. Comput. Chem.* **31** (2010), 2169.