

Peptid in die Membran rein – eine zeitgemäße Alternative

Wir brauchen hier eine Struktur- und eine Topologiedatei für das Peptid K2. Diese haben Sie vorhin unter den Namen `k2.gro` und `topol.top` erzeugt.

1. Das Peptid und die Membran orientieren

Erst müssen wir das Peptid so ausrichten, dass die helikale Achse entlang der z -Richtung liegt. Vielleicht ist das schon der Fall, wie Sie im VMD prüfen können. Ist das doch nicht der Fall, erzielen Sie dies mit dem folgenden Befehl:

```
gmx editconf -f k2 -o k2_edit.gro -princ -rotate 0 90 0
```

und System auswählen. Prüfen Sie im VMD die Ausrichtung des Peptids erneut.

So haben Sie das Peptid vorbereitet. Nun müssen Sie sich dem Lipid widmen.

Zuerst brauchen Sie eine `.tpr` Datei, in der nur das Lipid berücksichtigt ist. Sie können eine beliebige `.mdp` Datei dafür benutzen, da Sie erstmal keine richtige Simulationen durchführen werden. Auch eine leere `.mdp` Datei, wie z.B. `dummy.mdp` funktioniert. Auch müssen Sie aus der Lipidstruktur `DOPC_303K.gro` das Wasser entfernen und die Anzahl der Atome anpassen – Vorsicht, die letzte Zeile mit der Boxgröße soll bleiben. Außerdem brauchen Sie eine Topologiedatei für ein reines Lipidsystem, die Sie unter dem Namen `topol_DOPC.top` erstellen können:

```
#include "forcefield.ff/forcefield.itp"
#include "DOPC.itp"
[ system ]
; Name
DOPC
[ molecules ]
; Compound      #mols
DOPC             128
```

Der Befehl lautet dann:

```
gmx grompp -f dummy -c DOPC_303K -p topol_DOPC -o dummy_DOPC
```

Falls Sie Warnungen bekommen, ignorieren Sie sie mit der option `-maxwarn [zahl]`. Beachten Sie: Dies ist der einzige Schritt, in dem Sie die leere `.mdp` Datei, und die Lipid-Topologiedatei benutzen.

Im zweiten Schritt entfernen Sie die Periodizität mittels `trjconv`:

```
gmx trjconv -s dummy_DOPC -f DOPC_303K -o DOPC_whole.gro -pbc mol -ur compact
```

und wählen Sie z.B. 0. Schauen Sie nun nochmal auf die letzte Zeile der neuen `.gro` Datei: dies sind die $x/y/z$ Längen der Simulationszelle. Wir sollen das K2 Peptid in der gleichen Zelle orientieren, und das Molekül mit seinem Schwerpunkt in die Mitte der Zelle platzieren:

```
gmx editconf -f k2_edit.gro -o k2_newbox.gro -c -box x-Lng y-Lng z-Lng
```

Das Peptid liegt nun genau in der Mitte der Box – dies ist eine Konvention von Gromacs.

2. Lipide um das Protein packen

Zuerst soll das Skript InflateGRO heruntergeladen und zu `inflategro.pl` umbenannt werden.

cbp.cfn.kit.edu/joomla/downloads/CB-praktikum-WS2016/materials/part3/inflategro.txt

Verbinden sie die Strukturdateien von Peptid und Lipid:

```
cat k2_newbox.gro DOPC_whole.gro > system.gro
```

Entfernen Sie unnötige Zeilen (Boxvektor aus der Peptidstruktur und den Kopf der Lipidstruktur) und aktualisieren Sie die Anzahl der Atome auf der Zweiten Zeile.

Von den Autoren des InflateGRO wird empfohlen, sehr starke Position Restraints auf die schweren (nicht-Wasserstoff) Atome des Peptids zu legen. Damit soll gewährleistet werden, dass das Peptid sich während einer Energieminimierung nicht bewegt. Fügen sie eine neue `#ifdef` Sektion in die Topologie hinzu, die auf einen besonderen Satz von Position Restraints verweist; fett gedruckt ist die neue Sektion:

```
; Include Position restraint file
#ifdef POSRES
#include "posre.itp"
#endif

; Strong position restraints for InflateGRO
#ifdef STRONG_POSRES
#include "strong_posre.itp"
#endif

; Include DOPC topology
#include "DOPC.itp"
; Include water and counterion topology
#include "amber99sb-ildn.ff/tip3p.itp"
#include "amber99sb-ildn.ff/ions.itp"
```

Außerdem soll die Topologie auch die Parametrisierung des Lipids und des Wassers enthalten, wie oben zu sehen ist. Dazu gehört auch zusätzlich das Kraftfeld für das Lipid, welches oben in der Datei kommen soll:

```
#include "amber99sb-ildn.ff/forcefield.itp" ; war vorhanden
#include "forcefield.ff/ffnonbonded.itp"    ; zusätzlich
#include "forcefield.ff/ffbonded.itp"       ; zusätzlich
```

Die neue Datei für Position Restraints erzeugen Sie wie folgt, wählen Sie dabei Protein-H aus:

```
gmx genrestr -f k2_newbox.gro -o strong_posre.itp -fc 100000 100000 100000
```

Dann nehmen Sie eine `.mdp` Datei, die Sie früher für eine Energieminimierung benutzt haben, etwa `em_steep.mdp`. In diese Datei ist eine Zeile `"define = -DSTRONG_POSRES"` hinzufügen, um die neuen Position Restraints einzuschalten.

Schließlich folgen Sie den Anweisungen von InflateGRO, die in dem Skript selbst aufgeführt sind. Dies lässt sich einfach skripten (`for`-Schleife). Skalieren Sie die Positionen der Lipidmoleküle mit einem Faktor 4:

```
perl inflategro.pl system.gro 4 DOPC 14 system_inflated.gro 5 area.dat
```

1. `system.gro` – Koordinaten zu skalieren
2. 4 – Skalierungsfaktor. Ein Wert > 1 heißt Aufblasen, < 1 entspricht Verkleinerung
3. DOPC – Residuenname der zu skalierenden Moleküle
4. 14 – Cutoff-Radius (in Å) zum Suchen der zu löschenden Lipidmoleküle
5. `system_inflated.gro` – Ausgabe von Koordinaten
6. 5 – Gitterparameter (in Å) für die Berechnung der Area per Lipid
7. `area.dat` – Ausgabedatei mit der Area per Lipid, nützlich zur Einschätzung der Struktur

Bemerken Sie, wieviele Lipidmoleküle gelöscht worden sind, und aktualisieren Sie entsprechend den Eintrag unter [`molecules`] in der Topologiedatei (letzte Zeile: DOPC 128 oder weniger).

Führen Sie eine Energieminimierung durch (`gmx grompp` und `gmx mdrun`).

Dann skalieren Sie die Lipide mit einem Faktor von 0.95 (passen Sie ggf. den Namen der `.gro` Datei an):

```
perl inflategro.pl em_steep.gro 0.95 DOPC 0 system_shrink_1.gro 5 area_shrink_1.dat
```

Danach führen Sie eine weitere Energieminimierung durch. Bei den Verkleinerungen ist es zwingend notwendig, den Cutoff-Wert auf 0 zu setzen, sonst würden Sie auch weiter Lipidmoleküle löschen! Nach ca. 26 Wiederholungen von Skalierung mit 0.95 erreichen Sie eine Area per Lipid, die vielleicht nur etwas höher als der experimenteller Wert liegt – prüfen Sie das! Da das Skript die Area per Lipid etwas überschätzen mag, ist dieser Wert gut genug, um zu einer Equilibrierung zu kommen.

3. Mit Wasser solvatisieren

Ein Proteinmolekül zu solvatisieren geht mit `gmx solvate` sehr einfach. Ein Membranprotein zu solvatisieren ist jedoch schwieriger, da das Programm dazu neigt, jegliche “Lücken” zwischen den Acylketten mit zufällig platzierten Wassermolekülen zu befüllen. Dies lässt sich mit einem kleinen Trick vermeiden:

Kopieren Sie die Gromacs-Datei `vdwradii.dat` (Sie kann mit dem Befehl `locate` gefunden werden) in das aktuelle Verzeichnis, und ändern Sie den Wert für Kohlenstoff von 0.17 auf 0.5. Damit überzeugen Sie das Programm `solvate` anhand der sehr großen van der Waals Radien, dass alle Kohlenstoffe sehr groß sind. Daher wird unwahrscheinlich, dass Wassermoleküle zwischen Fettsäureketten hineingepresst werden.

Nach der Solvatisierung prüfen Sie mit VMD, dass nicht viele Wassermoleküle sich in dem hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht befinden. Ist das doch der Fall, so löschen Sie diese von Hand, oder Sie können den van der Waals Radius noch etwas vergrößern und `gmx solvate` wiederholen, oder Sie können eins der Skripten von der Gromacs Website verwenden.

Beachten Sie, dass der Einsatz eines vergrößerten Radius für Kohlenstoff auch künstliche Leerstellen erzeugen kann, insbesondere wenn das Peptid aus der Membran hinausragt (weil das Peptid ja auch Kohlenstoff enthält), und auch in der Nähe der Lipidkopfgruppen (aus demselben Grund). In diesem Fall kann es vorkommen, dass die Equilibrierung sanft durchgeführt werden muss – damit hilft die Betreuung Ihnen weiter.

Auf jeden Fall ist die Datei `vdwradii.dat` vor dem Beginn der Equilibrierung zu löschen.

Vergessen Sie auch nicht, das System vor der Equilibrierung mit 5 Cl^- Gegenionen zu neutralisieren.

In der NPT Simulation kann es nötig sein, eine sehr schwache Druckkopplung mit einer Relaxationszeit bis zu 2 ps zu verwenden.