**TUTORIAL 4 – steering molecular dynamics**

**Steered: imporre una forzante durante la simu lungo una specifica direzione, nel nostro caso è data dalla distanza degli estremi del peptide (\*prove di trazione)**

Partiamo dal mostrare la proteina su VMD, mostriamola con tube e mettiamo in evidenza i due estremi con VdW. Vogliamo che la forzante li allontani in modo controllato.

E’ come se tirassimo una linea sulla sup di energia libera, tagliandola e guardandola lungo una direzione che è una sua coordianta. Questa variabile è la distanza tra i due estremi e vediamo come varia durante la simulazione lungo questa specifica coordinata 🡪 **potential mean force** (vedi teoria)

Dal punto di vista tecnico dobbiamo capire come farlo in dinamica 🡪 possiamo mettere una molla, ad es un estremo incollato a terra (verde) e l’altro agganciato ad una molla che da una parte si muove a velocità costante mentre dall’altra è vincolata all’estremo della proteina. Se io imponessi direttamente sull’estremo blu uno spostamento non potrei vedere la reazione della proteina perché sto imponendo uno spostamento direttamente su di essa. Mi interessa studiare la reazione alla sollecitazione, impongo una variazione di potenziale dato dall’allungamento e acc della molla: la molla ha un estremo vincolato all’estremo blu e l’altro che si muove a velocità costante 🡪 due parametri da definire:

* la velocità del punto della molla che sposto
* la sua costante elastica

Conoscendo queste cose posso studiare gli spostamenti della proteina e quindi le caratteristiche meccaniche.

Nel tempo, la struttura si allungherà e si unfolderà fino ad, eventualmente, far crashare la simu (che non sa gestire la rottura dei legami) nel caso in cui abbia fatto una simu troppo lunga.

Abbiamo anche una forte dipendenza dalla velocità con cui avviene l’allungamento, non tanto per il comportamento viscoelastico, ma, piuttosto, per il fatto che la proteina non ha il tempo di esplorare gli stati e riarrangiarsi per ogni grado di deformazione e quindi manifesterà una caratteristica più rigida di quella reale. Man mano che abbasso la velocità tendo verso una deformazione quasi statica che mi piace molto, però: più bassa è la velocità 🡪 più bassa è la deformazione 🡪 mi servirà più tempo e più steps.

Normalmente, si fanno prove a diverse velocità per vedere se si raggiunge un plateau nelle curve sigma-eps o forza deformazione.

Apriamo una copia di pulling.mdp per modificare qualcosa:

* Integrator md
* Nsteps 50000
* Togliamo minimizzazione, perché dobbiamo arrivare qui già col gro minimizzato come ogni dinamica
* Output control lascia cosi
* V-rescale
* Alziamo la tau a 1
* Pull yes

Ci darà come output la posizione del gruppo di pulling rispetto a quella di riferimento

🡪**pull-nstxout** identifica in ogni istante di tempo la *distanza* tra i due punti di riferimento per calcolare l’allungamento della proteina,

🡪**pull-stfout** ci dice la *forza* sul gruppo di pull, cioè la forza nel tempo.

* Ncoords: coordinata di deviazione che definisce la distanza: 1
* Ngroups: 2
* Usiamo umbrella come tipo, ovvero il potenziale è armonico
* Distance
* Dimensioni: Y N N, sono le dimensioni sulla molla, ma siccome non stiamo facendo una position ma distance (coordinata di deviazione) non ha senso dire lungo che asse si sta muovendo
* Non cambio più nulla
* Dobbiamo cambiare gli ultimi due: i **pull coord rate** è la velocità con cui sposto l’estremo della molla 0.01 nm\*10 ps 🡪 influenza la capacità della proteina di riarrangiarsi ed esplorare bene gli stati, *la voglio sufficientemente bassa da considerare la prova quasi statica e trascurare i termini dissipativi, però non posso nemmeno rendere la simu troppo lunga*; l’altro parametro è la **costante elastica**, maggiore è il suo valore maggiore è la tendenza dell’estremità libera della proteina a seguire la deformazione della molla come fosse un vincolo rigido 🡪 forze molto grandi 🡪 instabilità

Nonostante la molla aggiunga un potenziale, si va ad aggiungere nella funzione del potenziale ma modifica l’Hamiltoniano. **Non è un restrains, sono equazione di costrains che si aggiungono al set di equazioni da risolvere per la dinamica. (chiarisci)**

Prendiamo la proteina con WSH, minimizziamo e iniziamo la simu di trazione. Il box deve essere sufficientemente grande perché una volta che lo stretchiamo non deve andare a interagire con se stessa, dando luogo a forze di compressione, per garantire la condizione di immagine minima.

A partire dal gro finale della minimizzazione dobbiamo creare un indice (make\_ndx) in cui inseriamo il gruppo iniziale e finale, basta listare gli amminoacidi con ‘’l’’ e prendere il primo e l’ultimo (si vede bene sul .gro chi sono, 43 e 58), li seleziono poi con r43 e r58 su make\_ndx.

Li rinomino come pull e ref: name 15 pull (sto rinominando il 15esimo gruppo) e name 16 ref 🡪 infine salvo con q (pulling.ndx)

Ora possiamo fare grompp per creare il trp che ci servirà per fare la simu di steering.

gmx grompp -f pulling.mdp -c 1em.gro -p topol.top -n pulling.ndx -o pull.tpr -maxwarn 2

In fondo mi dice che ha trovato due gruppi di pulling che hanno distanza iniziale pari a un tot; ora facciamo la dinamica per allungare la proteina 🡪 usiamo il tpr da dare a mdrun

Gmx mdrun -f pull.tpr -v -deffnm

Ci restituisce i soliti file con anche quello delle forze.

Innanzitutto, vediamo quello della traiettoria, da vmd sembra che l’abbia tirata poco, già dal rmsd si vede che la distanza è variata ma non evidentemente. La cosa più sensata sarebbe alzare il numero di steps, ma, invece, alziamo la velocità pull coord rate a 0.1 e il valore di rigidezza della molla a 10 000. Rilanciando la simu si vede che va in crash dicendoci che esce dal box, andando a vedere la traiettoria si vede più evidentemente la deformazione. Allarghiamo il box per risolvere il problema 🡪 si riesce a finire la simu. Il problema di uscire dal box è che va ad interagire con se stessa nei box adiacenti ed è come se anziché stirata fosse compressa.

Guardando il .trr su vmd si vede benissimo come si allunga diventando una stecca ed esplorando un sacco di stati.

Andiamo a calcolare la variazione di lunghezza direttamente su vmd, mostrando pull e ref e calcolando la distanza iniziale e quella finale direttamente selezionando i due punti.

**Vediamo i grafici tempo-deformazione e forza-deformazione**, guardando i grafici pull\_pullx.xvg è la lunghezza nel tempo dei due gruppi ovvero la distanza tra pull e ref nel tempo. Si indica come pull COM perché è la distanza tra i centri di massa dei due gruppi terminali. C’è una crescita ma non esplora più di tanto su e giu zoommando perché la molla è molto alta. Quando arriva a plateau, non si allunga più e mi aspetterò che la forza cresca molto in corrispondenza di tali valori, perché non riesce più a deformarsi e si allunga solo più la molla di prova. All’inizio invece la forza sarà molto bassa perché la proteina non si oppone alla deformazione.

Potrei essere interessato anche al grafico forza-deformazione 🡪 mi costruisco il file dalla bash, mi prendo il file della forza e della deformazione togliendoci il tempo e poi li unisco.

Cat pull\_pullf.xvg | grep -v [#,@] mi prende tutto tranne i commenti e le righe iniziali

Cat pull\_pullf.xvg | grep -v [#,@] | awk print ‘print $2’ > f.out salvandolo in un file della forza

Rifaccio lo stesso per il file delle deformazioni e creo un file che vada a unire le cose

Paste x.out f.out > xf.out

Posso graficare quindi forza-deformazione con xmgrace 🡪 al crescere della deformazione la forza cresce improvvisamente

Se rifacessi la simu a diverse velocità otterrei grafici diversi.

**LEGAMI IDROGENO (#hbond)**

Un altro modo per studiare la deformazione è studiare l’andamento dei legami idrogeno nel tempo

Gmx hbond -f pull.trr -s pull.tpr -num pull\_hbond.xvg

-num è il comando che mi restituisce l’andamento nel tempo dei legami, quanti se ne sono disfatti durante la simu.

Devo scegliere i due gruppi tra cui calcolare i legami idrogeno, facciamo la proteina con se stessa perché mi dice se si rompono i legami h bond ovvero se si rompono delle alpha eliche. Se diagrammiamo nel tempo con xmgrace, bisogna usare lo stesso campionamento per farmi restituire ogni 100 campioni. Si vede come il numero di hbond crolla nel tempo, fino ad essere nulli quando l’abbiamo totalmente stirata.

**Se vediamo invece come variano gli h bond tra proteina e acqua, si vede come aumentano nel tempo perché se rompo con la proteina cerco qualcun altro per farli e li faccio con l’acqua e poi si stabilizzano.**

**ENERGIA POTENZIALE**

Gmx energy -f pull.edr -o pot.xvg

Xmgrace pot.xvg

All’inizio cresce piano piano andando verso 0 perché la sto spostando ad un equilibrio, poi addirittura supera lo zero ed infatti ci manderà in crash il sistema. Chi è che ci sta facendo crescere questa sommatoria? Printo angoli, diedrali, LJ, forze di coulomb

L’energia di coulomb rimane sempre negativa circa costante. Il termine dominante è dato dal termine degli angoli, perché li ho distorti tutti rendendo la struttura dritta.

**STRUTTURA SECONDARIA**

Mi aspetto si perda totalmente e che passi da alpha elica a coil, la parte non strutturata sono i coil e i turn. Alla fine tutti e 16 i residui sono coil.