

ciQUS

Centro Singular de Investigación
en Química Biológica e
Materiais Moleculares



Facultad de Química

Trabajo de Fin de
Grado

Infección y cáncer:
una aproximación a
través de la química
computacional

Alfonso Cabezón Vizoso

Junio 2020

Trabajo de Fin de Grado presentado en la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela para la obtención del Grado en Química

*Departamento de Química Orgánica y Centro Singular de Investigaciones en
Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS)*

Dña. REBECA GARCÍA FANDIÑO, INVESTIGADORA “RAMÓN Y CAJAL” DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y D. MARTÍN CALVELO SOUTO, INVESTIGADOR PREDOCTORAL DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INFORMAN: Que la memoria adjunta titulada “*Infección y cáncer: una aproximación a través de la química computacional*” que presenta Alfonso Cabezón Vizoso para su Trabajo de Fin de Grado (TFG) ha sido realizada bajo nuestra dirección en el CIQUS y autorizamos su presentación.

Y para que así conste, expedimos la presente autorización en Santiago de Compostela a 08 de Julio de 2020.



Fdo. Dra. Rebeca García Fandiño



Fdo: D. Martín Calvelo Souto

Índice

Índice.	3
Resumen.	4
Índice de abreviaturas.	6
1. Introducción.	7
1.1 Resistencia a antibióticos.	7
1.2 Ciclopéptidos y Nanotubos Peptídicos.	10
1.3 Dinámica Molecular.	13
2. Objetivos.	20
3. Materiales y Plan de Trabajo.	22
4. Resultados y discusión.	24
4.1 Interacción de los ciclopéptidos con la membrana modelo de DMPC.	24
4.2 Interacción de los ciclopéptidos con la membrana modelo de DMPC:DMPG (3:1).	30
4.3 Interacción de los ciclopéptidos con la membrana modelo de DMPE:DMPG (1:9).	36
5. Conclusiones.	42
Bibliografía.	48

Resumen

Con el objetivo de estudiar el proceso de autoensamblaje de un ciclopéptido anfipático con potencial actividad antimicrobiana en presencia de bicapas lipídicas de diferente composición, ha sido llevado a cabo un estudio utilizando cálculos de Dinámica Molecular. A diferencia de la mayoría de antibióticos existentes en la actualidad, los cuales suelen utilizar proteínas específicas como dianas, estos ciclopéptidos tienen como objetivo determinadas composiciones lipídicas, aprovechando la distinta naturaleza de membranas celulares sanas, bacterianas o cancerígenas. Debido a que la escala de tiempo a la que se espera que ocurra este proceso no es abordable para una simulación clásica de Dinámica Molecular, es necesaria la aplicación de diferentes aproximaciones. En este proyecto se han realizado simulaciones utilizando resolución *Coarse-Grain* (CG), la cual permite la reducción del número total de partículas utilizando grupos de átomos. Los resultados obtenidos indican que el péptido estudiado es capaz de autoensamblarse en membranas bacterianas y cancerígenas, pudiendo provocar la rotura de las mismas, mientras que en membranas celulares sanas el autoensamblaje se produce en el disolvente que rodea a la membrana, sugiriendo que el ciclopéptido no sería tóxico para una célula con esta composición lipídica.

In order to study the self-assembly process of an amphipathic cyclic peptide with potential antimicrobial activity in presence of lipid bilayers with different composition, a study using Molecular Dynamics calculation has been carried out. Unlike the majority current existing drugs, which usually target specific proteins, these cyclic peptides target certain lipidic compositions, taking advantage of the different nature of healthy membrane cells, bacterial membranes or cancer cells. Due to the fact that the time scale at which this process is expected to happen is not approachable for a classic Molecular Dynamic simulation, it is necessary to apply different approximations. In this project simulations using Coarse-Grain resolution, which allow the reduction of the total amount of particles using groups of atoms, have been carried out. The results obtained show that the studied cyclic peptide is able to

self-assemble in bacterial membranes and cancer cells, being able to disrupt them, whereas in healthy cell membranes the self-assembly takes place in the solvent surrounding the membrane, which suggests that the cyclic peptide would not be toxic for a cell with this lipidic composition.

Co obxectivo de estudar o proceso de autoensamblaxe dun ciclopéptido anfipático con potencial actividade antimicrobiana en bicapas lipídicas de diferente composición, levouse a cabo un estudo empregando cálculos de Dinámica Molecular. A diferenza da maioría dos antibióticos existentes na actualidade, os cales adoitan empregar proteínas específicas como diana, estes ciclopéptidos teñen como obxectivo determinadas composicións lipídicas, aproveitando a distinta natureza de membranas celulares sas, bacterianas ou canceríxenas. Debido a que a escala de tempo á que se espera que este proceso ocorra non é abordable para unha simulación clásica de Dinámica Molecular, é necesario a aplicación de diferentes aproximacións. Neste proxecto realizáronse simulacións empregando resolución *Coarse-Grain* (CG), a cal permite a redución do número total de partículas empregando grupos de átomos. Os resultados obtidos indican que o péptido estudado é capaz de autoensamblarse en membranas bacterianas e canceríxenas provocando a rotura das mesmas, mentres que en membranas celulares sas o autoensamblaxe prodúcese no disolvente que rodea a membrana, o que suxire que o ciclopéptido non sería tóxico para unha célula con esta composición lipídica.

Índice de abreviaturas

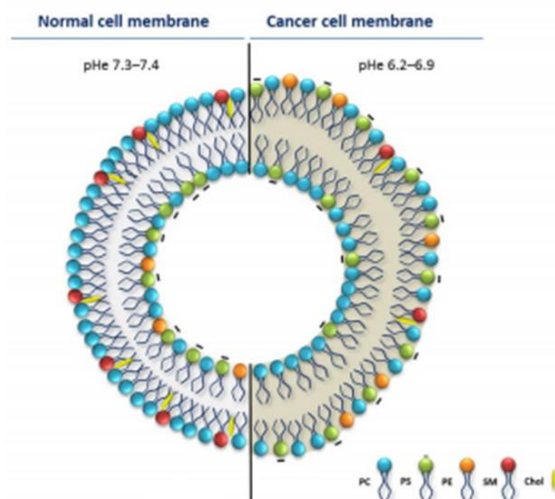
- **MD:** Dinámica molecular
- **CP:** Ciclopéptido
- **NT:** Nanotubo
- **AMP:** *Antimicrobial Peptide* (Péptido antimicrobiano)
- **ACP:** *Anticancer Peptide* (Péptido anticancerígeno)
- **SCP:** *Self-assembled cyclic peptide nanotube* (Nanotubo de ciclopéptidos autoensamblados)
- **PBC:** *Periodic Boundary Conditions* (Condiciones Periódicas de Contorno)
- **fs:** femtosegundo
- **μs:** microsegundo
- **AA:** *all-atoms*
- **DMPC:** 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
- **DMPG:** 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
- **DMPE:** 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
- **CG:** *Coarse-Grain*
- **CESGA:** Centro de Supercomputación de Galicia

1. Introducción

1.1 Resistencia a antibióticos.

La resistencia adquirida a antibióticos se ha convertido a día de hoy en una de las mayores amenazas para la salud mundial¹. Este fenómeno se debe a la mutación de bacterias como respuesta al uso de fármacos y, aunque este es un proceso natural, está acelerándose debido al mal uso de antibióticos en seres humanos y animales. Este hecho dificulta el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes, pudiendo llegar a convertirse en imposibles de tratar¹. La resistencia a tratamientos médicos actuales no es exclusiva de los enfocados a enfermedades infecciosas, sino que se extiende también a terapias destinadas a tratar el cáncer, siendo la principal la quimioterapia. Esta técnica está basada en el uso de agentes químicos que matan de forma masiva a las células cancerígenas, pero presenta una selectividad muy baja, provocando a menudo diferentes efectos secundarios. Además, está viendo limitada su eficacia por el desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales². Se ha propuesto que ambos tipos de enfermedades podrían estar relacionadas, ya que el desgaste que supone el tratamiento del cáncer hace más vulnerables a los pacientes frente a infecciones. Además, existen evidencias de que ciertas infecciones crónicas están asociadas con el desarrollo del cáncer, atribuyéndosele a estas el 20% de los nuevos casos a nivel mundial³.

Otra de las características comunes entre cáncer e infección es la composición lipídica de las membranas que componen las bacterias y las células tumorales. La membrana de una célula normal sana presenta asimetría en la distribución de cargas entre la superficie externa e interna de la membrana. La parte externa de la membrana es neutra y está formada principalmente por el fosfolípido fosfatidilcolina, mientras que la parte interna está cargada negativamente, siendo la fosfatidilserina el fosfolípido predominante. Sin embargo, esta asimetría se pierde en las células cancerígenas debido a la presencia de fosfatidilserina también en la parte externa de la membrana^{4,5,6} (Figura 1). Por su parte, las bacterias presentan una membrana cargada negativamente, siendo la fosfatidiletanolamina el lípido zwitteriónico más común en estas membranas. Además, en torno al 20%-25% de los lípidos constituyentes poseen carga negativa, como por ejemplo el fosfatidilglicerol⁷.



Alves, A. C., et al. *Biochem. Biophys Acta.*, 2016,1858, 2231-2244.

Figura 1. Representación esquemática de la composición lipídica de la membrana de una célula sana frente a una tumoral.

Los antibióticos convencionales, por lo general, se unen a receptores específicos, lo que desencadena diferentes procesos celulares que inhiben la proliferación del microorganismo⁸. Por tanto, aquellos nuevos medicamentos que tengan un mecanismo de acción similar también serán propensos a inducir resistencia en las bacterias, siendo necesario buscar agentes alternativos que presenten un mecanismo de acción diferente⁸. Como consecuencia, el estudio de agentes microbianos alternativos ha adquirido gran

importancia en los últimos años, siendo esta también una oportunidad extraordinaria para la prevención y el tratamiento del cáncer. En esta línea, ha emergido en los últimos tiempos una nueva clase de moléculas conocidas como péptidos terapéuticos, las cuales podrían tener como objetivo específico las membranas tanto de células cancerígenas como de bacterias, presentando además una toxicidad menor que algunos tratamientos actuales⁹. Entre los péptidos terapéuticos han sobresalido los péptidos antimicrobianos (AMPs) como una de las alternativas más atractivas. Los AMPs son, por lo general, moléculas de pequeño tamaño cargadas positivamente, los cuales se encuentran presentes en una gran variedad de organismos donde actúan como efectores esenciales del sistema inmune, siendo la defensa natural de estos contra las infecciones causadas por bacterias, virus y hongos¹⁰.

Además de ser una de las alternativas a los antibióticos convencionales, algunos AMPs han mostrado tener actividad anticancerígena, estos reciben el nombre de péptidos anticancerígenos (ACPs)¹¹. El hecho de que los péptidos terapéuticos tengan como objetivo principal las membranas lipídicas, así como su corto tiempo de interacción, hace que el desarrollo de resistencia por parte de bacterias y células tumorales sea menos probable^{12,13}. Esta ventaja ha impulsado su investigación en los últimos años, lo que ha dado lugar a la creación de bases de datos¹⁴ en las que se recogen miles de estas sustancias tanto de origen natural como sintético.

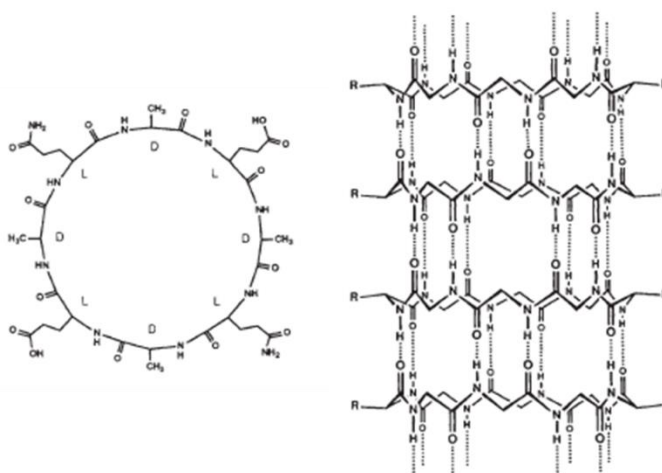
A pesar de que muchos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en los AMPs/ACPs, tan solo unos pocos han podido ser probados en ensayos clínicos¹⁵. Esto se debe a que su uso se ve limitado por su alto coste de síntesis, su despreciable actividad cuando son administrados oralmente ya que son poco resistentes a la digestión proteolítica, así como a su baja estabilidad *in vivo*^{16,17}.

Una alternativa a los péptidos terapéuticos viene dada por el uso de los biomateriales “inteligentes”. Estos sistemas podrían ser diseñados para adaptar sus propiedades químicas y mecánicas como respuesta a cambios en las condiciones fisiológicas o a estímulos externos, presentando actividad biológica tan solo en condiciones específicas¹⁸, como por ejemplo en presencia de una membrana bacteriana o cancerígena. Estos péptidos miméticos sintéticos pueden ser construidos a partir de unidades no tóxicas de pequeño tamaño, las cuales tras autoensamblarse en la membrana de la célula tumoral o bacteriana,

alterarían sus propiedades, provocando su muerte. Por tanto, alcanzar un mayor entendimiento de la relación existente entre la estructura de los péptidos terapéuticos y sus propiedades biológicas abriría la puerta a un diseño más racional de estos biomateriales “inteligentes”, los cuales pueden ser usados como fármacos antibacterianos y anticancerígenos¹⁹.

1.2 Ciclopéptidos y Nanotubos Peptídicos.

Entre los posibles materiales “inteligentes” que podrían utilizarse para mejorar los AMPs o ACPs naturales están los ciclopéptidos (CPs). Estos CPs serían inocuos en disolución, pero idealmente podrían adoptar la especie activa en presencia de membranas cancerígenas o bacterianas tras autoensamblarse formando nanotubos peptídicos (SCPNs). Estos fueron propuestos en el año 1974 por De Santis y colaboradores, basándose en la estructura helicoidal de la Gramicidina A²⁰, siendo sintetizados por primera vez por Ghadiri y colaboradores en 1993²¹. Estos SCPNs están formadas a partir del autoensamblaje de CPs que posean un número de residuos par de α -aminoácidos de estereoquímica D y L alternada. Este diseño deja los grupos amino y carbonilo de aminoácidos de distinta quiralidad orientados hacia caras opuestas del CP, permitiendo la formación de enlaces de hidrógeno entre CPs vecinos, dando lugar a la formación de láminas β (Figura 2). Los nanotubos obtenidos presentan un diámetro interno que se puede variar modificando el número de residuos de la secuencia, quedando las cadenas laterales hacia el exterior del NT, dando lugar a una superficie externa funcionalizable²².



Ghadiri, M. R. et al. *Nature*, **1993**, 369, 301-304

Figura 2. Representación esquemática de los D, L- α -CPs sintetizados por Ghadiri en 1993.

En trabajos posteriores Ghadiri y colaboradores sugirieron que sus nanotubos eran capaces de insertarse en las membranas lipídicas formando canales transmembrana, adoptando una disposición perpendicular a las mismas, cuando estaban formados por CPs con una secuencia hidrofóbica (Figura 3, izquierda). Los conductos transmembranosos formados eran capaces de transportar iones como Na^+ y K^+ ²³, y en el caso de nanotubos formados por CPs con un diámetro interno mayor ($>9\text{\AA}$) glucosa²⁴. Más adelante, otros estudios han demostrado que SCPNs formados por CPs con una secuencia con carácter anfipático se insertaban en bicapas lipídicas adoptando una disposición paralela, exhibiendo actividad antibacteriana a través de un mecanismo *carpet-like*²⁵ (Figura 3, derecha). De estos trabajos se deduce que el comportamiento del nanotubo depende de la disposición que adopte respecto a la membrana y que esto depende de la naturaleza de los aminoácidos que componen los CPs: aquellos que con una superficie externa hidrofóbica tienden a adoptar posiciones perpendiculares, dando lugar a canales transmembrana, mientras que los de naturaleza anfipática son más propensos a adoptar posiciones paralelas, exhibiendo propiedades antibacterianas (Figura 3).

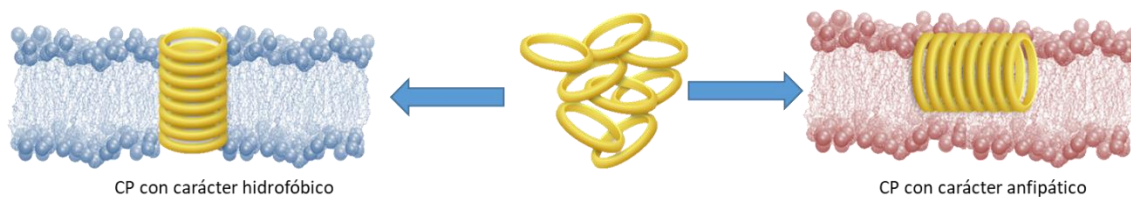


Figura 3. Representación de la disposición adoptada por los CPs en función de la naturaleza de los aminoácidos que lo componen.

Desde hace años el grupo del Prof. R. Granja viene trabajando en un nuevo tipo de CPs híbridos combinando unidades de ácido aminocicloalcanocarboxílico (con anillos de 5 o 6 unidades) con α -aminoácidos^{26,27,28}. Siguiendo esta estrategia, el grupo ha desarrollado dos nuevos tipos de SCPN, basados en los α , γ -CPs y en los α,δ -CPs²⁹. Lo que realmente diferencia a estos SCPNs de los anteriores es el carácter hidrofobo de la cavidad interior, siendo este inducido por la proyección de uno de los grupos metileno del cicloalcano hacia el interior del lumen. Además, este grupo metileno es funcionalizable, lo que permite modificar el comportamiento de la cavidad interna del SCPN³⁰.

A pesar del arduo trabajo realizado por el grupo en el estudio y diseño de estos materiales “inteligentes”, la mayoría de las técnicas experimentales actuales no permiten alcanzar el grado de resolución atómico requerido para el entendimiento de los mecanismos de acción de las moléculas antimicrobianas. Además, hay que tener en cuenta que la gran mayoría de los sistemas biológicos no son estáticos y, por tanto, para comprenderlos en su totalidad a nivel molecular es necesario observar cómo las moléculas reaccionan, interaccionan o se transforman en tiempo real a través de la caracterización estructural de los efímeros estados de transición e intermedios que tienen lugar. Sin embargo, obtener información de alta resolución espacial y temporal sobre procesos dinámicos supone todo un reto. En esta línea, las técnicas de modelización molecular y principalmente las simulaciones de Dinámica Molecular, pueden proporcionar las herramientas necesarias para alcanzar un entendimiento completo y de alta resolución sobre los procesos de interacción péptido-membrana. Los continuos avances en el desarrollo de la computación, como la utilización de unidades de procesamiento gráfico (GPUs), en paralelo a los avances de la MD, como la

utilización de la resolución *Coarse-Grain*, han permitido explorar de forma sistemática eventos biológicos en la escala de los microsegundos³¹.

1.3 Dinámica Molecular.

La evolución tecnológica ha provocado el desarrollo de la supercomputación, que aplicada a la química y a la biología está permitiendo un entendimiento más profundo de cómo funciona la naturaleza a nivel molecular. Tal desarrollo ha impulsado enormemente el campo de la Química Computacional y de metodologías dentro del mismo, como la utilizada en el presente trabajo, la MD. Las simulaciones de MD, haciendo uso de la capacidad de cálculo de los superordenadores, nos permiten ver cómo las biomoléculas interactúan entre sí, y cuál es su rol dentro de los sistemas biológicos con un grado de resolución que no se puede alcanzar con experimentos. Este hecho ha provocado que se haya llegado a comparar las simulaciones MD con un microscopio con elevada resolución espacial y temporal.

La MD consiste en la resolución numérica de las ecuaciones clásicas del movimiento³². Un átomo i , perteneciente a un sistema formado por N átomos, experimenta, según la segunda ley de Newton, una fuerza:

$$F_i = m_i \cdot a_i = m_i \cdot \frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} \quad \text{con } i = 1, \dots, N$$

En un sistema conservativo, en el cual la fuerza que actúa sobre los átomos depende solamente de la posición de los mismos, la fuerza está relacionada con la energía potencial del sistema:

$$F_i = - \frac{\partial V}{\partial x_i}$$

Para poder resolver la ecuación de movimiento se necesita una función que contenga un conjunto de expresiones y parámetros que describan las fuerzas e interacciones entre las partículas del sistema, lo que se conoce como campo de fuerzas.

La mayoría de campos de fuerzas utilizados en MD hacen uso de la aproximación de Born-Oppenheimer, la cual postula que, dado que los núcleos son mucho más pesados que los electrones, su movimiento será significativamente más lento. De este modo, dado que tras el desplazamiento de los núcleos los electrones se reorganizarán de forma instantánea, únicamente se consideran las coordenadas de los núcleos atómicos. Sin embargo, este hecho propicia que no se puedan calcular ni efectos cuánticos ni aquellos que dependan de forma directa de la representación de electrones, dado que estos no están explícitamente incluidos³³.

La mayoría de los campos de fuerzas que se utilizan para sistemas moleculares dividen la energía potencial del sistema en dos términos, los enlazantes y los no enlazantes:

$$V_{sist} = V_{enlazantes} + V_{no\ enlazantes}$$

La parte enlazante se atribuye a cambios que se producen en las coordenadas internas del sistema expresando las interacciones entre átomos que están separados por un máximo de 3 enlaces. Este término se divide en tres subtérminos, uno para la vibración de enlace entre dos átomos que están directamente unidos (*stretching*), otro para el ángulo formado entre tres átomos enlazados (*bending*), y otro para la torsión del ángulo diedro formado por cuatro átomos:

$$V_{enlazantes} = \sum_{i=1}^{N_{enlz}} V_{enlz} + \sum_{i=1}^{N_{ang}} V_{ang} + \sum_{i=1}^{N_{tor}} V_{tor}$$

La mayoría de campos de fuerza utilizan osciladores armónicos para describir los dos primeros términos (vibración y flexión angular).

$$V_{enlz} = \frac{1}{2} k_{enlz} (r - r_0)^2$$

$$V_{ang} = \frac{1}{2} k_{ang} (\theta - \theta_0)^2$$

Donde k_{enz} es una constante de fuerza que describe la fuerza del enlace, r es la distancia de enlace y r_0 es la distancia de enlace en el equilibrio. De forma análoga, para el término angular tenemos que k_{ang} es una constante de fuerza que determina la resistencia del enlace a la flexión y θ y θ_0 son el ángulo actual del enlace y el ángulo del enlace en la posición de equilibrio, respectivamente. Cabe destacar que la aproximación hacia un potencial armónico es válida para situaciones en las que la amplitud de la vibración del enlace es similar a la distancia de equilibrio.

En el término V_{tor} se incluyen dos tipos de torsiones: las torsiones propias, que vienen dadas por el ángulo diedro que se forma entre cuatro átomos; y las torsiones impropias, usadas para forzar a un átomo a mantenerse en el plano formado por otros tres. A diferencia de los anteriores, este término presenta periodicidad, por lo que para definirlo es necesario utilizar más términos. Cuanto más complicado sea el perfil energético de la torsión, más términos harán falta para definirla. Estas interacciones son descritas en la mayoría de los campos de fuerzas como potenciales de Fourier:

$$V_{tor} = k_{tor}(1 + \cos(n\omega + \gamma))$$

Donde k_{tor} es una constante que define la fuerza de la torsión, n es la periodicidad del término, ω es el ángulo diedro y γ es el ángulo de fase.

La parte no enlazante del potencial hace referencia a las interacciones que tienen lugar entre átomos que no se encuentran directamente enlazados y entre los que existe una separación de 4 enlaces o más. Este término se divide, a su vez, en dos subtérminos: uno para las interacciones electrostáticas (V_{ele}) y otro para las fuerzas de repulsión entre átomos cercanos y las fuerzas de atracción de van der Waals (V_{vdw}):

$$V_{no\ enlazante} = V_{ele} + V_{vdw}$$

El primer subtérmino, el que hace referencia a las interacciones electrostáticas entre parejas de átomos, se suele describir usando el potencial de Coulomb:

$$V_{ele} = \sum_{i>j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

Donde q_i y q_j son las cargas puntuales de los átomos, ϵ_0 es la constante dieléctrica del medio y r_{ij} es la distancia entre los átomos.

El segundo subtérmino engloba las repulsiones de Pauli que se producen entre dos átomos que se encuentran muy próximos, de manera que sus orbitales comienzan a solaparse, y las fuerzas de atracción a larga distancia de van der Waals. Ambas interacciones se suelen expresar a través del potencial de Lennard-Jones:

$$V_{LJ} = \sum_{i>j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

Donde el minuendo representa la repulsión y el sustraendo la atracción. Los términos ϵ_{ij} y σ_{ij} son parámetros de interacción que expresan, respectivamente, cómo de fuerte es esta y la distancia entre partículas que es necesaria para que se vuelva cero. Estos parámetros se calculan a partir de los propios de cada átomo³⁴:

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad \sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2}$$

A día de hoy, no es posible llevar a cabo simulaciones de MD incluyendo todos los átomos que participan en un sistema “real”, pues esto supondría una cantidad de partículas que la potencia de los ordenadores todavía no puede manejar. Para la realización de las simulaciones MD se define un espacio tridimensional, el cual se denomina “caja de simulación”. Una de las limitaciones que esto conlleva es que debido a que el tamaño típico de estas cajas está en la escala nanométrica, la proporción de partículas que se encuentran en la superficie de la caja de simulación interaccionando con el vacío es mucho más grande que en sistemas reales. Como alternativa, se introduce el concepto de condiciones periódicas de contorno (PBC), que consiste en replicar la caja de simulación infinitas veces

en todas las dimensiones del espacio, de tal forma que las ecuaciones de movimiento solo son resueltas para la caja original y el resto se limitan a replicar lo que ocurre en esta. Además, cuando el movimiento de las partículas implica que una de estas salga de su caja, una partícula idéntica entrará para ocupar su lugar por el borde contrario, puesto que el mismo movimiento está ocurriendo en todas las cajas de forma simultánea. De este modo, esta aproximación permite mantener constante el número de átomos en el recipiente en todo momento. Cabe destacar que, de considerar todas las posibles interacciones no enlazantes entre átomos al introducir las PBC, el coste computacional de los cálculos sería muy elevado. Por ello, para reducir el coste y asegurarse de que cada interacción se calcula una sola vez, se introduce una distancia de corte (*cut-off*). Por tanto, solo se calcularán las interacciones no enlazantes que se den entre átomos separados por una distancia menor que la de corte, siendo el resto de interacciones no calculadas de manera explícita.

Otra dificultad que puede surgir en las simulaciones de MD es el control de la temperatura y la presión. Con el fin de solucionar esto se han definido diferentes algoritmos que actúan como termostatos y barostatos. Para el control de la temperatura los termostatos más utilizados son *V-rescale*³⁵, Berendsen³⁶, Nose-Hoover³⁶ y Andersen³⁷, los cuales adaptan la energía cinética de los átomos por modificación de su velocidad para tal tarea. En cuanto al control de la presión, los barostatos más utilizados son el de Berendsen y el Parrinello-Rahman, los cuales la ajustan modificando el volumen de la caja de simulación³⁸.

Como ya se ha comentado anteriormente, la MD consiste en la integración de las ecuaciones del movimiento de Newton con el fin de determinar cómo varía la posición de las partículas del sistema con el tiempo. Para realizar la integración numérica de las ecuaciones existen diversos algoritmos como el *Verlet* o el *Leap-Frog*. Estos algoritmos se basan en el cálculo de las posiciones y velocidades de los átomos a un tiempo $t+dt$ a partir de las fuerzas que actúan sobre ellos en un tiempo anterior t , para el cual se conocen las posiciones y velocidades. Es por tanto necesario definir unas condiciones iniciales. En el caso de las velocidades, estas se suelen obtener a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann para la temperatura de simulación, recalculándose a cada paso utilizando el potencial obtenido con el campo de fuerzas. Las coordenadas iniciales se pueden obtener

de datos experimentales, de repositorios online como el *Protein Data Bank*³⁹, de otros modelos teóricos o incluso pueden ser dibujadas usando un software específico. Otro aspecto importante de cara a correr la simulación es la selección del tiempo de paso o *time step* (*dt*). En las simulaciones de MD, se suele utilizar un *time step* de 2 fs.

Muchos de los parámetros mostrados hasta el momento como las constantes de fuerza o las distancias y ángulos de equilibrio varían dependiendo del campo de fuerzas escogido. Por tanto, la elección de uno u otro es crucial, ya que puede llevar a cambios en los resultados. Normalmente, cada partícula de un campo de fuerzas coincide con un átomo, como por ejemplo en los campos de fuerzas de Amber⁴⁰ o CHARMM⁴¹. Sin embargo, esto no siempre es así, ya que hay campos de fuerzas en los que los átomos pesados se agrupan con sus hidrógenos no polares (típicamente son hidrógenos en estructuras como: CH₂, CH₃, NH₂...) para formar una única subunidad de interacción, como en el campo de fuerzas de GROMOS⁴². La aproximación utilizada es lo que determina la resolución de la simulación. Para aquellos casos en los que se representa cada átomo de forma explícita e individual, la resolución se denomina atomística o *all-atoms* (AA), mientras que cuando no todos los átomos están representados, sino que los hidrógenos no polares están descritos como parte de agrupaciones, recibe el nombre de *united-atoms* (UA)⁴³. Un paso más allá sería la resolución que se emplea en el presente trabajo y que recibe el nombre de resolución *Coarse-Grain* (CG), la cual permite reducir el número de partículas del sistema a estudiar agrupando átomos pesados en una única unidad de interacción, la cual recibe el nombre de "bead". El trabajo aquí presentado se ha realizado utilizando el campo de fuerzas *Martini*, uno de los más comunes para este tipo de resolución⁴⁴ (Figura 4).

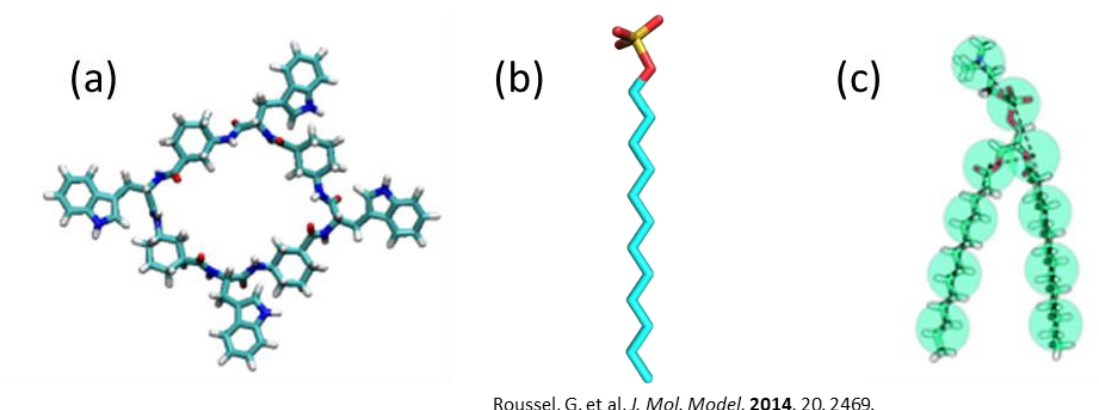


Figura 4. Comparación de los distintos tipos de resolución empleados en simulaciones de MD: (a) α,γ -CP en resolución AA; (b) SDS en resolución UA y (c) Lípido DMPC en resolución CG con el mapeado de Martini y su equivalencia en AA (imagen tomada de <http://cgmartini.nl/index.php/about>).

En este campo de fuerzas cada partícula está formada por cuatro átomos pesados y sus respectivos hidrógenos, estando las interacciones no enlazantes parametrizadas a partir de energías libres de partición experimentales entre fases polares y apolares y las enlazantes en simulaciones AA. Además, con el fin de simplificar el modelo, solo se contemplan cuatro tipos de interacciones entre partículas: polares, no polares, apolares y cargadas⁴⁴. Esto tiene ciertos inconvenientes, ya que algunas interacciones no están bien definidas, como el caso de los enlaces de hidrógeno, que son esenciales en la formación y conservación de las estructuras secundarias de las proteínas. Sin embargo, la cantidad de partículas que forman el sistema se ve reducida considerablemente permitiendo simular sistemas más grandes que las simulaciones AA. Algo similar ocurre con el *time step*, para las simulaciones AA se suele utilizar un *time step* de 2 fs pero, debido a la simplificación realizada, este se puede aumentar en las simulaciones CG casi en un orden de magnitud. Gracias a esto, una simulación CG-MD en el mismo número de pasos que una simulación AA-MD alcanzará un tiempo total de simulación mucho mayor.

2. Objetivos.

El objetivo de este proyecto es estudiar el proceso de autoensamblaje de CPs en nanotubos peptídicos en diferentes entornos lipídicos utilizando simulaciones de MD. La información obtenida podría ayudar en un futuro al diseño más inteligente de secuencias de CPs con mejores actividades. La formación espontánea de nanotubos a nivel atómico (AA) es un proceso muy costoso a nivel computacional. A día de hoy, este proceso solo puede ser abordado utilizando una resolución CG.

Mientras que en trabajos previos del grupo siempre se había partido de un nanotubo ya formado, en este trabajo se partirá de los CPs en disolución, analizándose su posible autoensamblaje. Se ha utilizado un CP anfipático con una secuencia cuya actividad antimicrobiana ha sido previamente demostrada²⁵ (Figura 5).

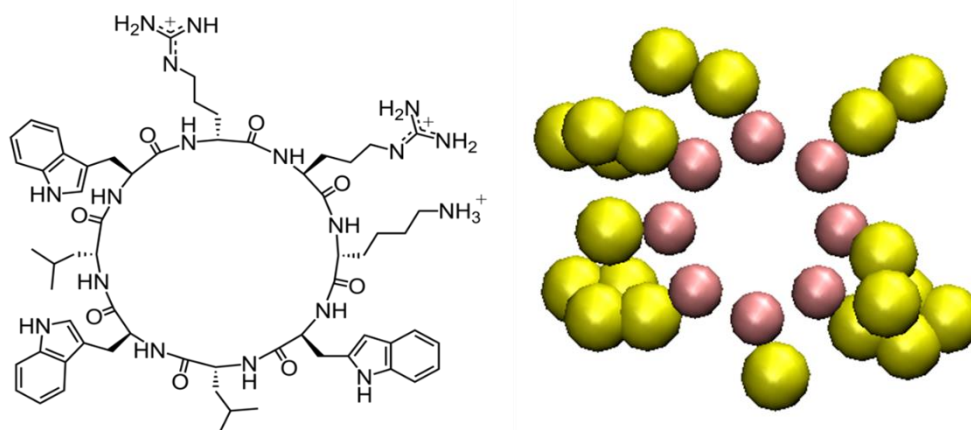


Figura 5. Se representa el *D,L*- α -CP utilizado en el plano (izquierda) y con resolución CG (derecha).

Tratando de imitar las composiciones más habituales de las membranas de células de mamíferos y de bacterias, se utilizarán tres bicapas lipídicas distintas. Una de ellas estará formada íntegramente por 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), un fosfolípido con carga neta 0 con la que se pretende representar las membranas de las células de los mamíferos, ya que este lípido representa alrededor de la mitad de los fosfolípidos en la mayoría de estas células. Las otras dos serán modelos de membranas bacterianas: para una de ellas se combina el fosfolípido DMPC anterior con 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DMPG) en proporción 3:1 y para la otra se utiliza 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DMPE) y DMPG en proporción 1:9. Variando el contenido de cargas negativas de la membrana, se pretende entender el rol que desempeña la carga de la bicapa lipídica en el proceso de autoensamblaje de los SCPNs.

3. Materiales y Plan de Trabajo

El ciclopéptido utilizado para llevar a cabo el trabajo es uno para el que ya se había demostrado con anterioridad su actividad antimicrobiana²⁵, y para el que ya se disponía de una geometría inicial, pues ha sido usado por otros investigadores con anterioridad⁴⁵ así como por miembros del grupo⁴⁶.

Las membranas utilizadas también fueron proporcionadas por el grupo de investigación, por lo que el primer paso fue añadir, con una distribución aleatoria, los ciclopéptidos a la caja de simulación en la que se encontraba la membrana solvatada con agua. Dado que el CP utilizado posee carga positiva (carga neta +3, se consideran los residuos de lisina y la arginina protonados), se añadieron iones hasta obtener un sistema neutro (Figura 6). Se han utilizado tres membranas diferentes y, para cada una, se han preparado un total de cuatro simulaciones variando la cantidad de CPs añadidos: 20, 40, 80 y 160. De este modo, el número total de sistemas simulados es doce.

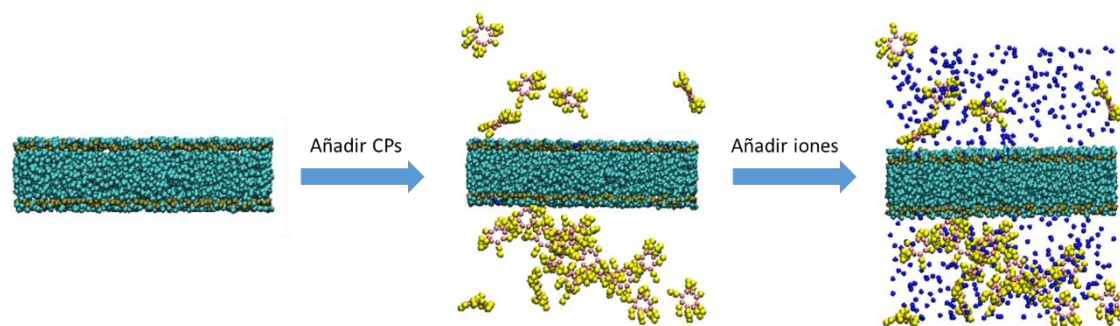


Figura 6. Esquema de la preparación del sistema con GROMACS (se omiten las aguas por claridad). La membrana lipídica se representa en azul claro, lo iones en azul y los CPs en amarillo.

Los sistemas fueron preparados con el programa GROMACS⁴⁷ en su versión 2018.3. Posteriormente, y también con el mismo programa, se optimizaron los sistemas, se ajustaron y equilibraron la presión y la temperatura y se simularon durante 20 μ s utilizando un *time step* de 25 fs. La presión utilizada durante la simulación fue de 1 bar, controlada mediante un sistema semi-isotrópico Parrinello-Rahman⁴⁸, mientras que la temperatura utilizada fue 303K controlada mediante un termostato V-rescale³⁵. La parte de preparación de los sistemas, optimización y equilibrado se realizó en un ordenador proporcionado por el grupo mientras que las producciones finales fueron realizadas en el CESGA.

Una vez terminadas las simulaciones, para la visualización e interpretación de los resultados obtenidos se utilizó el programa VMD⁴⁹. Posteriormente se utilizó un algoritmo desarrollado con Python por los miembros del grupo cuya validación se realizó previamente como trabajo en prácticas externas. Este algoritmo permite realizar un análisis rápido de la trayectoria de una simulación, obteniendo una serie de gráficas y archivos de texto que recogen importante información estructural como por ejemplo el número de CPs que se encuentran formando clústeres de diferentes tamaños en función del tiempo de simulación, la disposición paralela/antiparalela de CPs que forman parte de NTs o los ángulos de rotación entre CPs contiguos.

4. Resultados y discusión.

4.1 Interacción de los ciclopéptidos con la membrana modelo de DMPC.

Como ya se ha mencionado, con esta bicapa se pretende representar la composición de una membrana celular de un mamífero sano. Como se observa en los *snapshots* de la Figura 7 se aprecian dos tendencias en la formación NTs. Por una parte, en la simulación con 20 CPs, la de menor concentración, se aprecia como las unidades se ensamblan en la superficie de la membrana, mientras que al utilizar una cantidad de CPs superior se observa una clara tendencia al autoensamblaje en el medio acuoso, así como al agrupamiento de los SCPNs. Además, incluso a las concentraciones más elevadas de CPs no se observa una tendencia clara del péptido a unirse a la membrana. Este resultado indicaría que el CP no sería excesivamente activo para este tipo de células, sugiriendo una baja toxicidad.

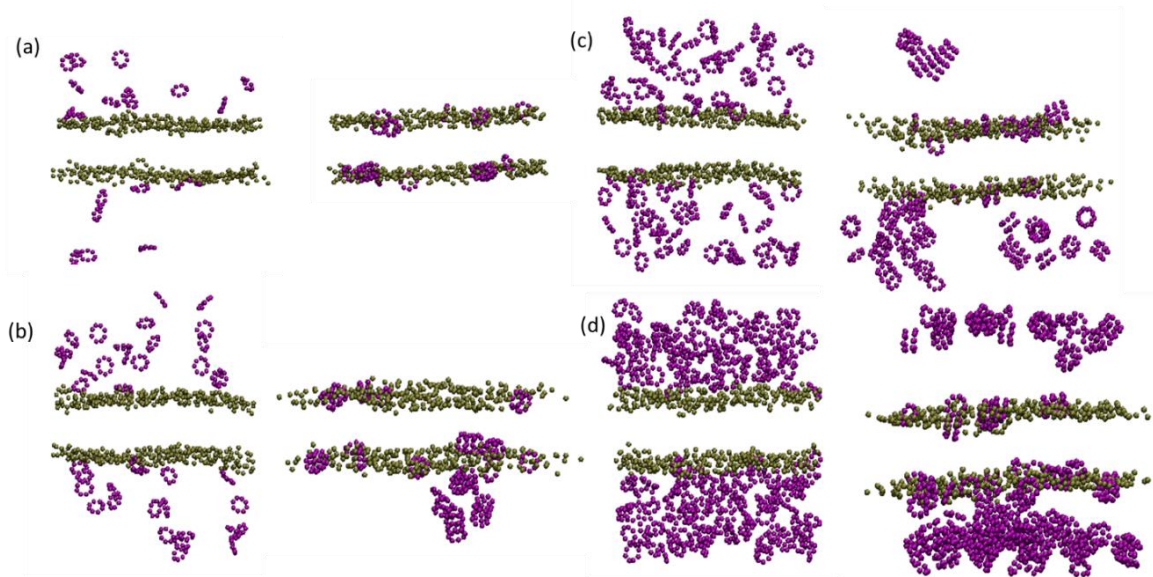


Figura 7. Comparación del estado inicial (izquierda) y final ($t=20\mu s$; derecha) de las simulaciones de MD realizadas para la membrana PC, (a) simulación con 20 CPs, (b) simulación con 40CPs, (c) simulación con 80CPs y (d) simulación con 160 CPs. Se muestran en color dorado los grupos fosfato de los lípidos y en morado el esqueleto peptídico de los CPs.

El análisis de la trayectoria completa con el algoritmo desarrollado por el grupo permite analizar de forma cuantitativa cuantos clústeres se han formado, así como el tamaño de los mismos en cada instante de la simulación (Figura 8).

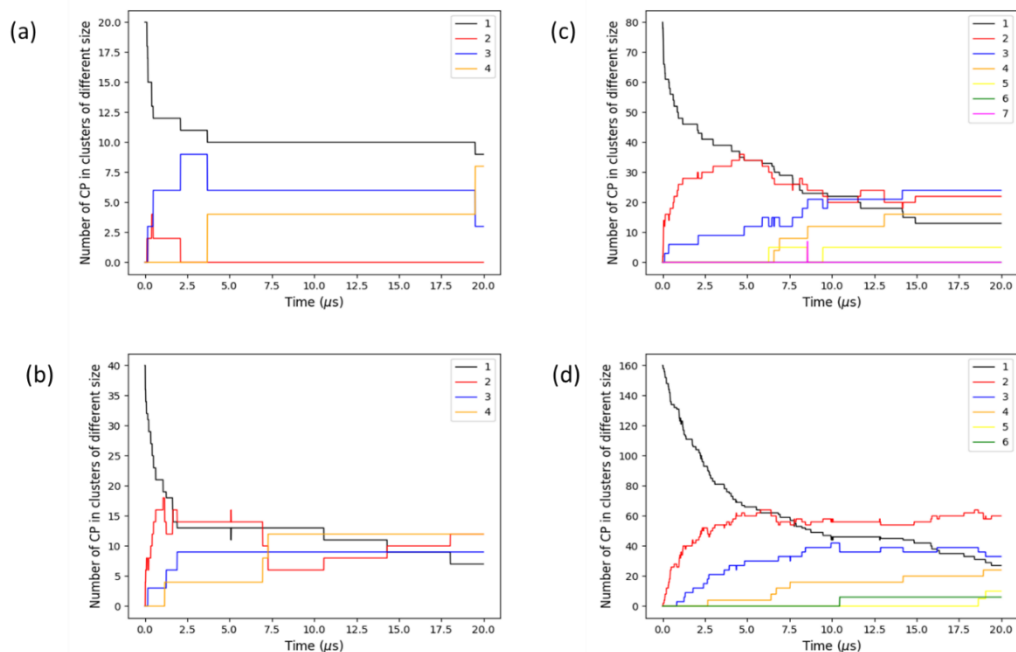


Figura 8. Gráficas obtenidas por el algoritmo de análisis en las que se representa el número de CPs que se ensamblan en los clústeres de distinto tamaño formados a lo largo de todo el tiempo de simulación donde (a) es la gráfica para la concentración de 20 CPs, (b) para 40 CPs, (c) para 80 CPs y (d) para 160 CPs.

De los sistemas estudiados, este es el que presenta probablemente un proceso de autoensamblaje más rápido, observándose que el número de CPs libres (línea negra) cae muy rápidamente. Además, en esta composición lipídica existe una mayor tendencia a la formación de SCPNs, ya que para los momentos finales de la simulación, de media el 76% de los CPs introducidos forman parte de clústeres. Sin embargo, los SCPNs que aparecen con más frecuencia no son demasiado grandes, ya que la mayoría están formados por entre 2 y 4 CPs. Estos resultados, al ser comparados con los obtenidos en las otras membranas, donde predomina el autoensamblaje en la membrana, sugieren que este proceso es más rápido en el medio acuoso que en el lipídico y que es más favorable la agrupación de clústeres pequeños que la formación de SCPNs de gran tamaño.

Además, el algoritmo fue aplicado para estudiar el tipo lámina β predominante: paralela o antiparalela (Figura 9). Debido a que este tipo de análisis sólo tiene sentido cuando los SCPNs están formados, únicamente se utilizaron los últimos 5 μ s de la trayectoria, asumiendo que tras 15 μ s de simulación el sistema se encuentra cercano al equilibrio, como se observa en la gráfica del número de SCPNs formados por distinto número de CPs a lo largo del tiempo (Figura 8).

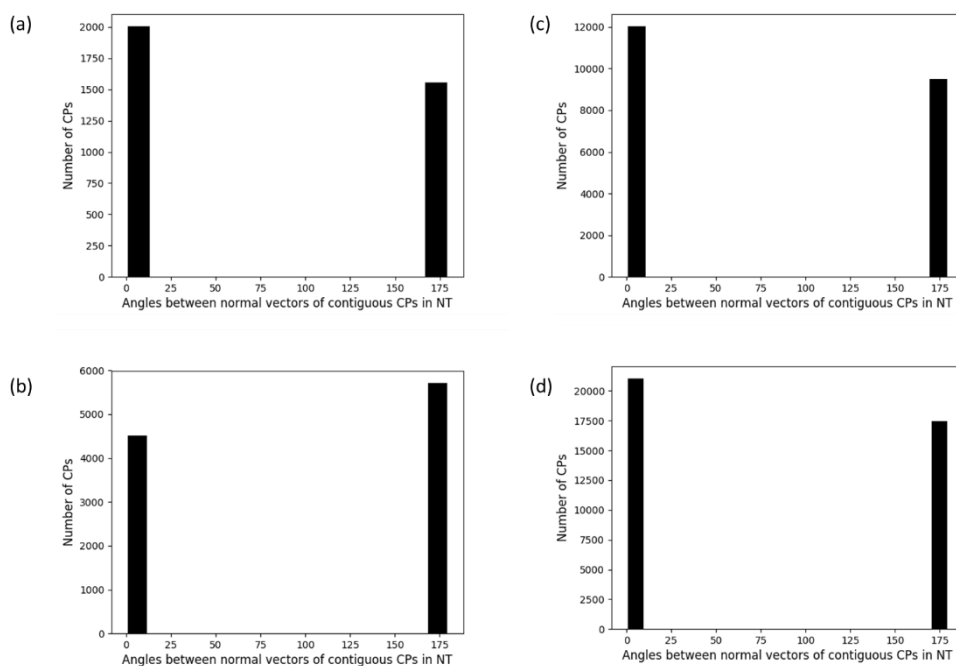


Figura 9. Histogramas paralelo/antiparalelo para las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs. El número de parejas paralelas es representado por la barra correspondiente al ángulo cercano a 0° mientras que la barra del ángulo cercano a 180° representa los antiparalelos.

En estos histogramas se recogen únicamente los CPs que forman parte de clústeres y tienen por tanto un CP contiguo con el que presentar una relación paralelo/antiparalelo (Figura 10).

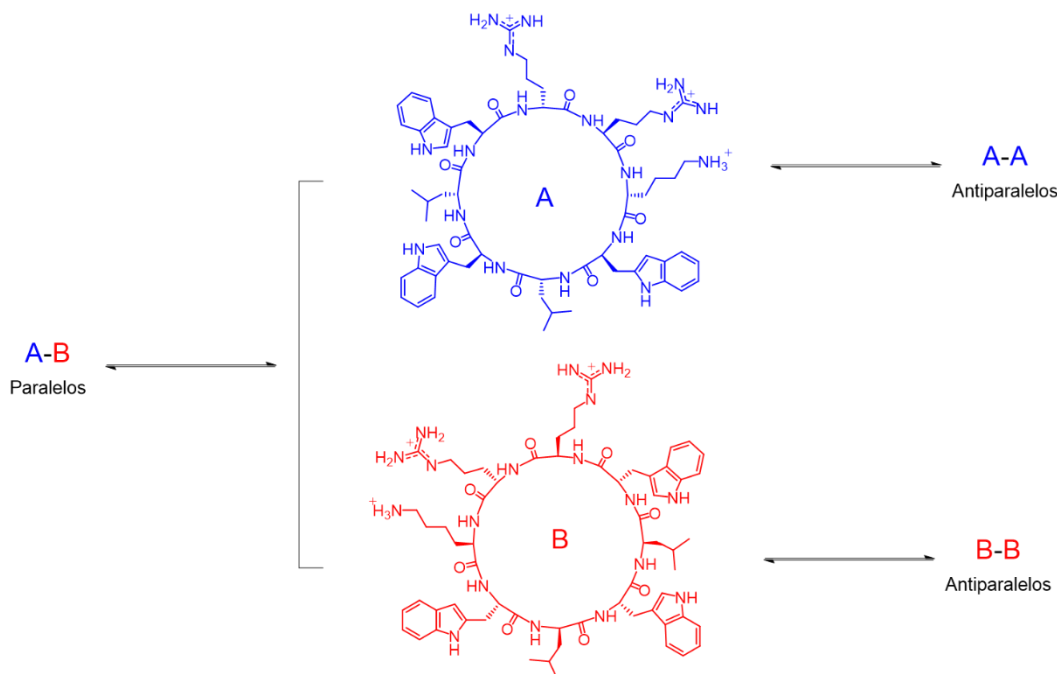


Figura 10. Se representan ambas caras (A y B) del CP utilizado y la relación que se establece en función de entre que caras se establezca la interacción.

Que las cantidades de péptidos añadidas no coincida con el eje vertical el cual da cuenta del número de CPs, se debe a que el algoritmo realizó el cálculo cada 10 nanosegundos de trayectoria. Aunque, en tres de los cuatro casos se observa un mayor número de parejas paralelas, la diferencia no parece demasiado grande, lo que sugiere que la relación paralelo/antiparalelo es próxima a 1:1, sin haber una clara preferencia por un tipo de lámina β sobre otra.

Para analizar los ángulos de rotación entre CPs contiguos también se aplica el algoritmo a los últimos 5 μ s de la trayectoria. Lo que se pretende en este análisis es saber cuantos grados está rotado uno de los CPs respecto al contiguo dentro del NT, para así conocer como se solapan las cadenas laterales. Para este análisis es importante distinguir entre CPs contiguos paralelos (Figura 12) y aquellos antiparalelos (Figura 14) ya que para un mismo valor del ángulo de rotación los residuos que se solapan son distintos (Figura 11).

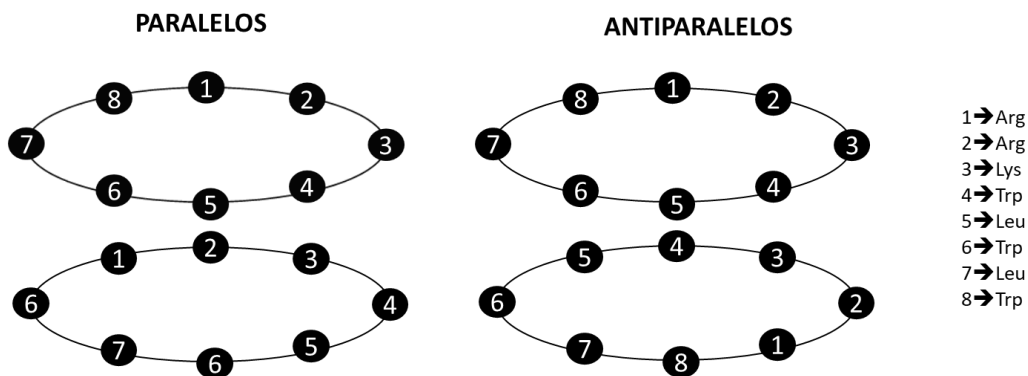


Figura 11. Se representan dos dímeros, uno en el que los CPs son paralelos y otro en el que son antiparalelos. En ambos el ángulo de rotación es 45°.

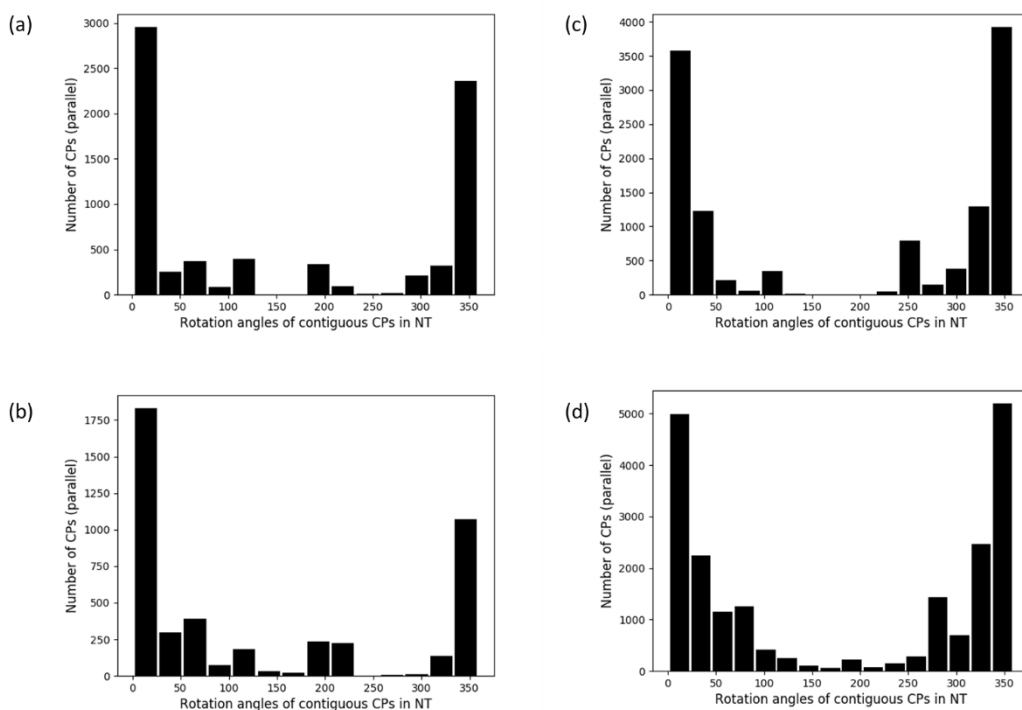


Figura 12. Distribución de los ángulos de rotación calculados por el algoritmo para los CPs paralelos a las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs.

Tal y como muestra la Figura 12, los CPs que son paralelos tienden a presentar ángulos de rotación que se encuentran principalmente entre 0-25° y 335-360°. En estos dos intervalos angulares las conformaciones presentan todos los residuos hidrofóbicos de un CP enfrentados a los del contiguo (Figura 13). Para los valores más cercanos a 0° y 360° las cadenas laterales de Triptófano se solapan entre ellas, ocurriendo lo mismo con las de Leucina. Mientras que en aquellas parejas en las que el ángulo está más cercano a 25° o 335°, las cadenas se encuentran alternadas.

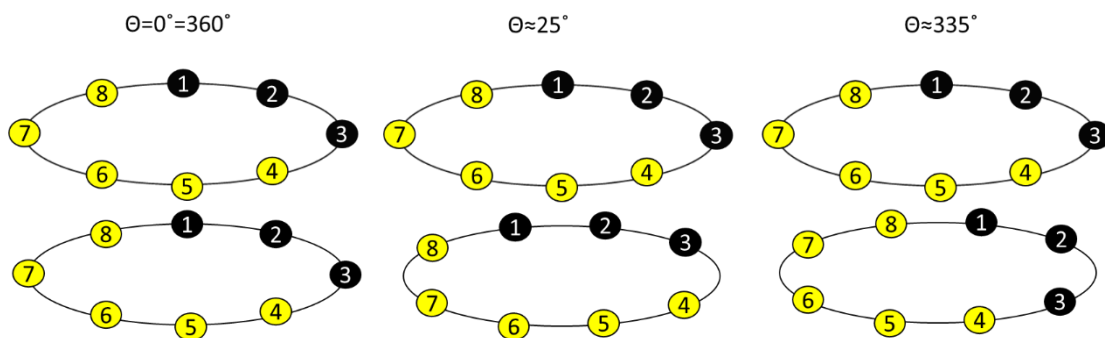


Figura 13. Representación de la disposición adoptada por dímeros paralelos con ángulos de rotación presentes en los rangos más frecuentes. Se destacan en amarillo los residuos hidrofóbicos.

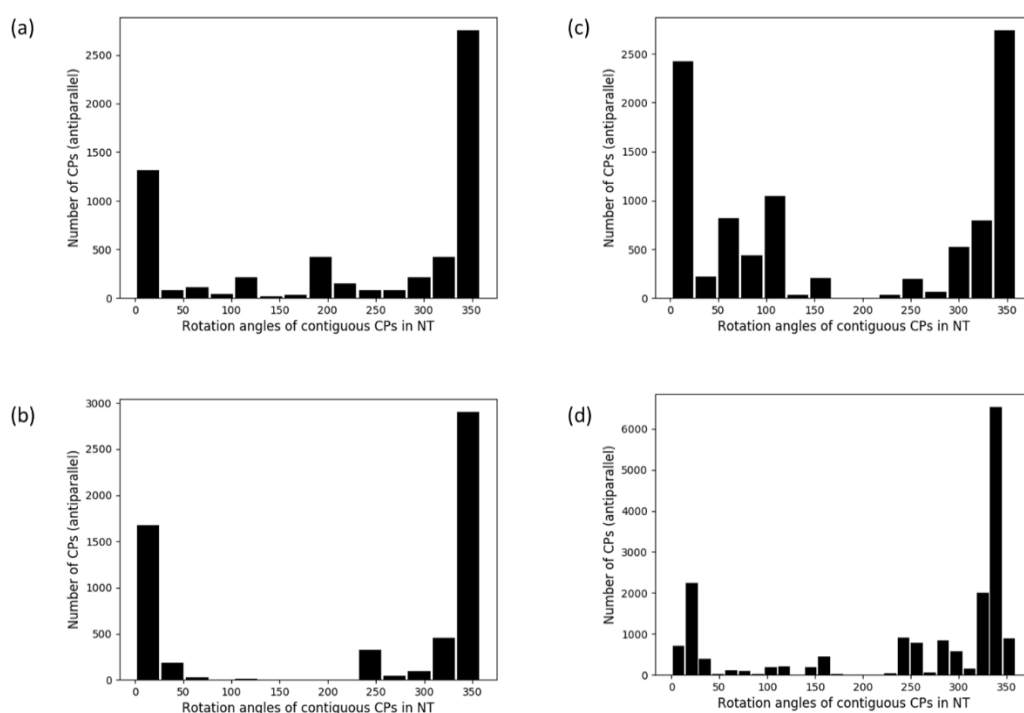


Figura 14. Distribución de los ángulos de rotación calculados por el algoritmo para los CPs antiparalelos a las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs.

En este caso, los valores predominantes para las simulaciones que contienen 20, 40 y 80 CPs se repiten. Cabe destacar, que para la simulación con 160 CPs los intervalos se reducen, estando la mayor parte de de los ángulos de rotación entre 335-350°, son frecuentes también los valores entre 15-30° y 320-335°.

4.2 Interacción de los ciclopéptidos con la membrana modelo de DMPC:DMPG (3:1)

Esta membrana está formada por una mezcla 3:1 de los lípidos DMPC y DMPG, confiriéndole la presencia de este último carga negativa, a diferencia de la anteriormente estudiada. Tal y como se muestra en la Figura 15, se observa para esta membrana que los CPs se agrupan en la superficie de los lípidos, donde forman NTs. Cabe destacar que para la simulación con el mayor número de CPs se observa también que un gran número de estos se agrupan en el medio acuoso. Este hecho sugiere que la concentración de CP utilizado es un factor importante relacionado con su actividad.

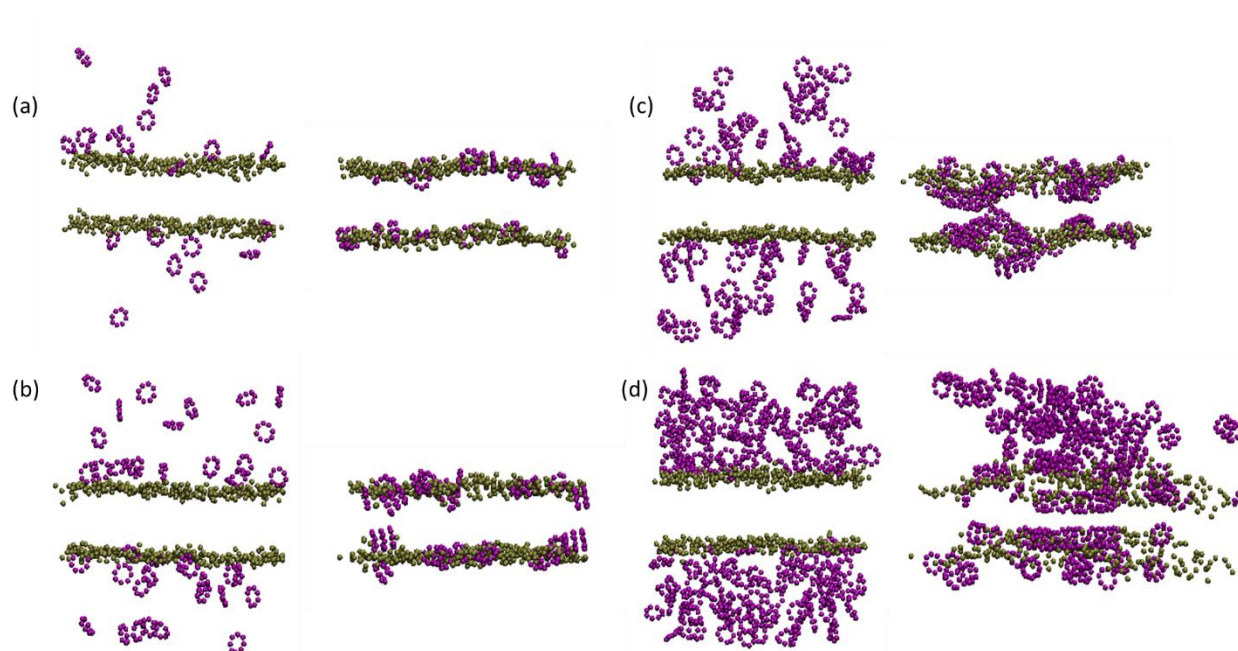


Figura 15. Comparación de los estados inicial (izquierda) y final ($t=20\mu s$; derecha) para las simulaciones de MD realizadas para la membrana DMPC:DMPG (3:1), (a) simulación con 20CPs, (b) simulación con 40CPs, (c) simulación con 80CPs y (d) simulación con 160CPs.

Además, tanto en la simulación con 80 CPs como en la de 160, se observa un fenómeno que no sucede en el resto de simulaciones y es que se forman SCPNs en ambos lados de la membrana, quedando los de una cara paralelos a los de la otra como se muestra en la Figura 16. Este fenómeno es posible debido a que en las simulaciones se ha partido de sistemas en los que había CPs presentes a ambos lados de la membrana .

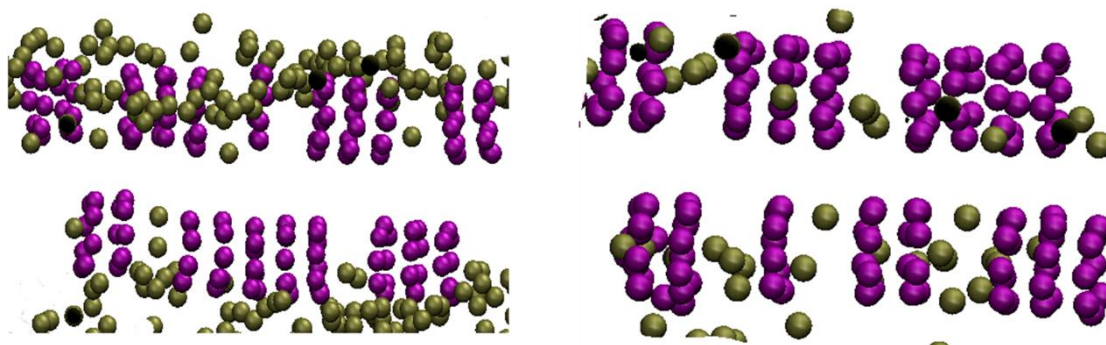


Figura 16. Se muestra a la izquierda uno de los casos para la simulación con 80 CPs y a la derecha el caso para la simulación con 160 CPs en la que se forman NTs paralelos.

Cabe destacar también que en estos casos se aprecia una mayor internalización de los CPs en la membrana llegando a interactuar las cadenas laterales hidrofóbicas de los que se encuentran en una cara con las de los CPs que se encuentran en la otra (Figura 17).

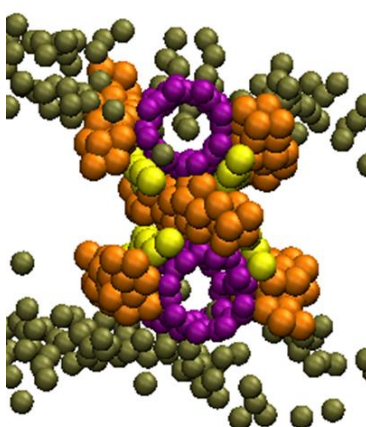


Figura 17. Representación de NTs paralelos dispuestos cada uno a un lado de la membrana. En amarillo se representan las cadenas laterales de Leucina mientras que en naranja están representadas las de Triptófano.

Del análisis de las trayectorias completas se obtienen las gráficas que representan el número de SCPNs formados por distinto número de CP a lo largo del tiempo (Figura 18).

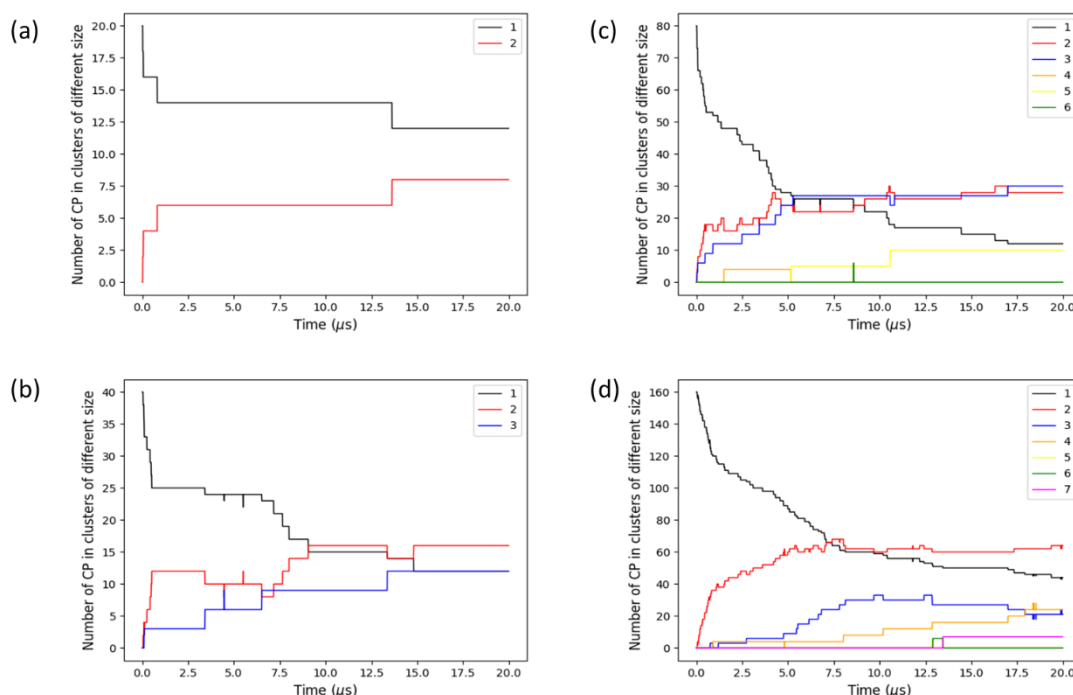


Figura 18. Número de CPs que se ensamblan en los clústeres de distinto tamaño formados a lo largo de todo el tiempo de simulación donde (a) es la gráfica para la simulación con 20 CPs, (b) para 40 CPs, (c) para 80 CPs y (d) para 160 CPs.

Este sistema presenta una tendencia menor a la formación de NTs que el anterior, pues en este caso , cerca del 67% de los CPs se encuentran formando clústeres. Aunque es en esta membrana en la que se registra el SCPN de mayor tamaño de forma estable (en la anterior el heptámero solo aparecía de manera puntual en un frame), se puede observar una disminución general del tamaño de los clústeres, predominando todavía más los dímeros y los trímeros. Además, cabe destacar que el heptámero se formó en el medio acuoso y no en la membrana.

Del análisis de los últimos 5 μs de la trayectoria se obtuvo la relación entre dímeros paralelos y antiparalelos, siendo presentada en la Figura 19.

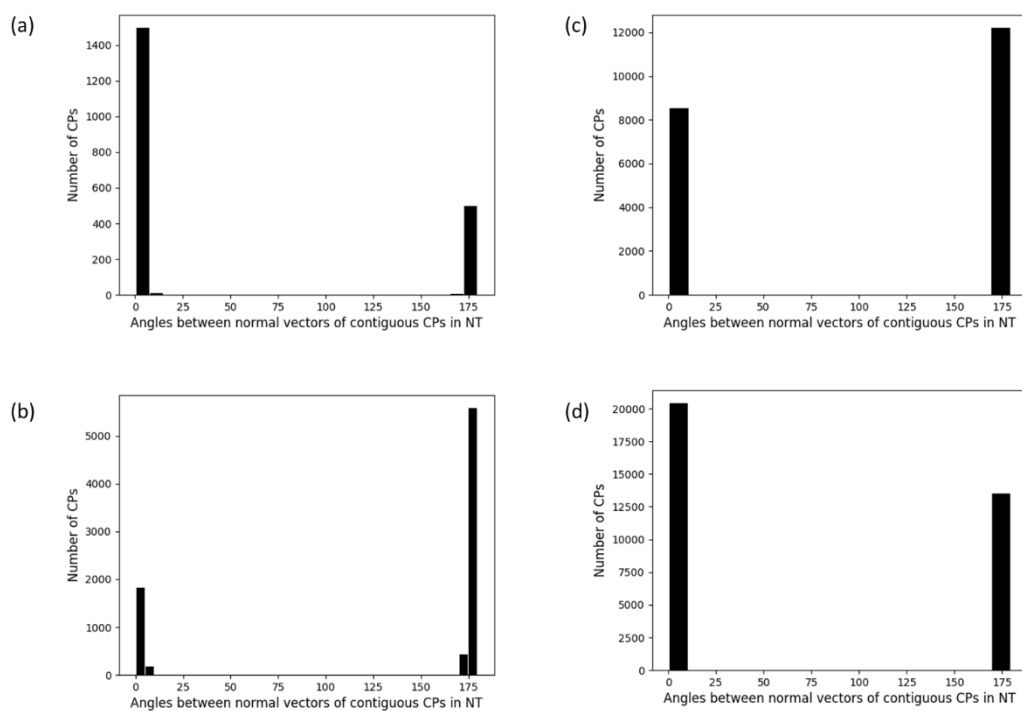


Figura 19. Histogramas d el número de CPs paralelos/antiparalelos para las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs.

En estos sistemas se observa una mayor disparidad en la proporción de parejas de CPs que guardan relación paralela o antiparalela. Cabe destacar, el cambio de tendencia que se observa de las simulaciones con una baja cantidad de CPs a la simulación con 160 CPs. Este hecho se observa en presencia de todas las distintas composiciones, siendo este el sistema con la mayor diferencia. Esto puede sugerir que la concentración de CPs puede afectar a la disposición que toman unos respecto de otros al ensamblarse.

El análisis de los ángulos de rotación de los dímeros paralelos se representa en la Figura 25.

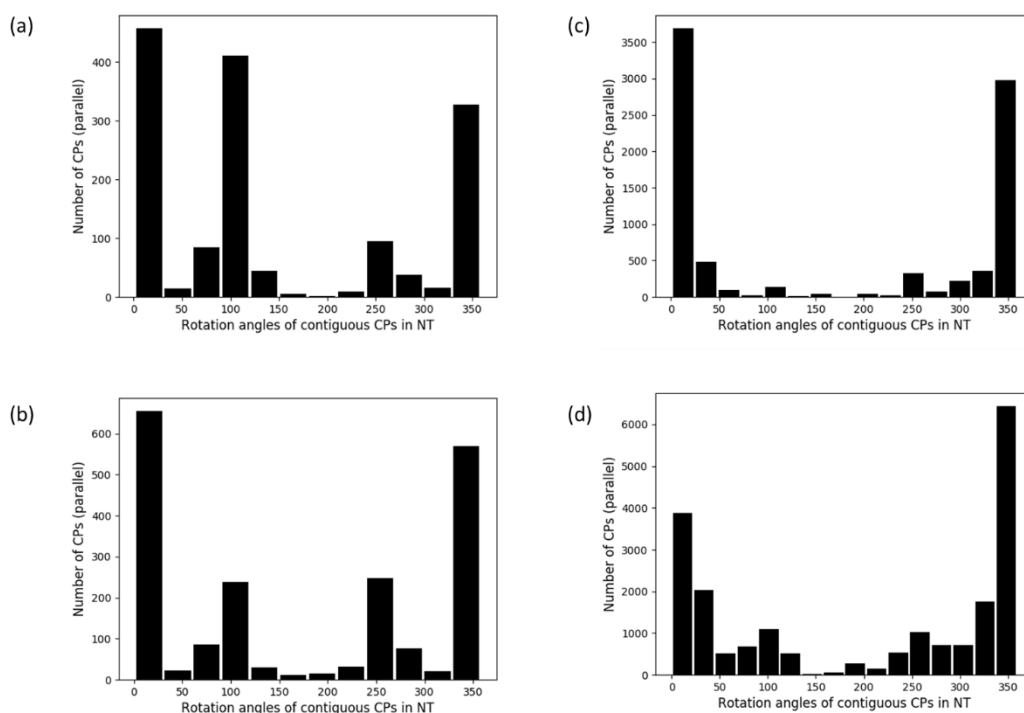


Figura 20. Distribución de los ángulos de rotación calculados por el algoritmo para los CPs paralelos a las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs.

Aunque entre las parejas de CPs paralelos los intervalos de rotación predominantes siguen siendo los mismos que en los sistemas anteriores, cabe destacar el aumento, al menos en las simulaciones con menor cantidad de CPs, de parejas en las que el ángulo de rotación está entre $90\text{-}120^\circ$ y $240\text{-}270^\circ$. En los valores angulares pertenecientes a estos rangos, las conformaciones posibles pueden presentar 6 residuos hidrofóbicos (2 Triptófanos y una Leucina de cada CP) alineados (90° y 270°) o enfrentados pero sin eclipsarse. Es decir, estando las cadenas laterales alternadas como se representa en la Figura 21 (Resto de valores de los rangos angulares).

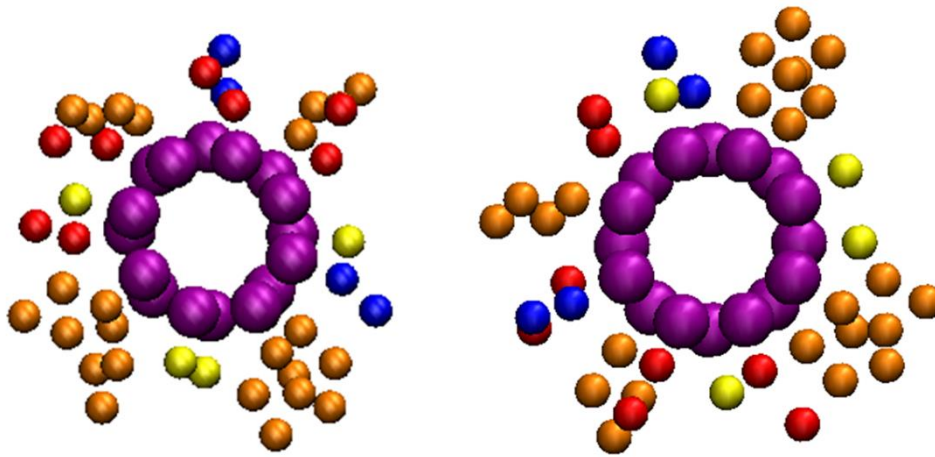


Figura 21. A la izquierda se muestra un dímero paralelo con ángulo de rotación de 114° y a la derecha uno con ángulo de rotación de 245° . Las esferas que representan las cadenas laterales se han reducido en tamaño para facilitar la visualización.

Que estas conformaciones no sean tan notorias en las simulaciones con mayor número de CPs puede deberse a que, como se vió anteriormente, en estas hay un mayor número de CPs ensamblados en el medio acuoso, y esta disposición de los CPs, según muestran las simulaciones, se da sobre todo en NTs que se han ensamblado en la membrana y que, además, no se han internalizado mucho, de forma que estos residuos hidrofóbicos se enfrentan unos a otros dentro de la membrana, quedando el resto expuestos al agua (Figura 22).

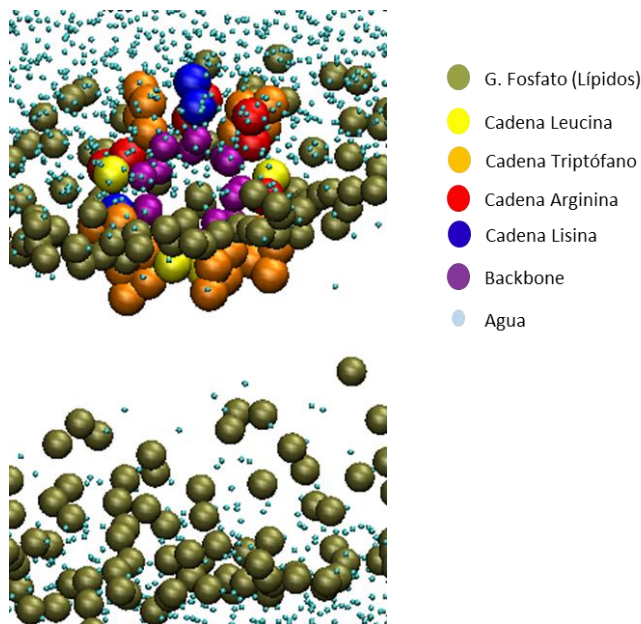


Figura 22. Dímero formado por CPs paralelos en el que el ángulo de rotación es de 114° . Las moléculas de agua se han puesto en un tamaño menor para permitir la visualización del dímero.

El análisis de los ángulos de rotación de los dímeros antiparalelos se representa en la Figura 23.

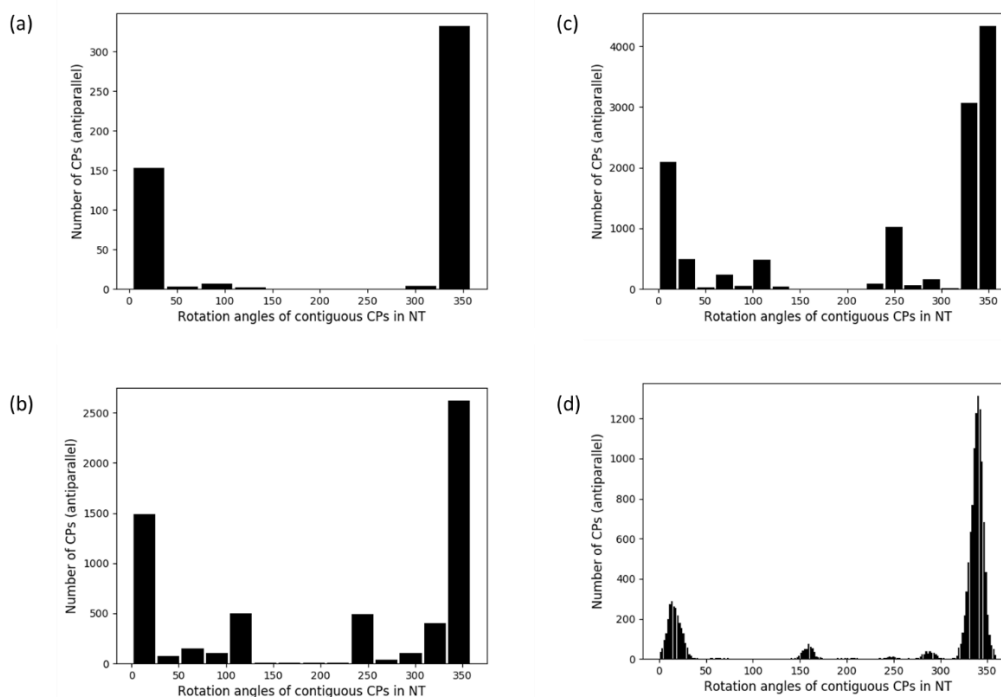


Figura 23. Distribución de los ángulos de rotación calculados por el algoritmo para los CPs antiparalelos a las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs.

La distribución de los ángulos de rotación obtenidos para los CPs antiparalelos no difiere mucho de los valores obtenidos para la membrana anterior, siguen siendo mayoritarios aquellos valores en los que se enfrentan un mayor número de residuos hidrofóbicos.

4.3 Interacción de los ciclopéptidos con la membrana modelo de DMPE:DMPG (1:9)

Esta membrana está formada por una mezcla 1:9 de los lípidos DMPE y DMPG respectivamente, y es la que posee mayor densidad de carga negativa. Como se observa en la Figura 21, en el momento inicial de la simulación los CPs ya se encuentran más próximos a la membrana, debido a que en el paso previo de equilibrado ya se ha producido un pequeño desplazamiento de los CPs hacia la membrana. Además, como se puede apreciar en dicha figura para las 4 concentraciones estudiadas, se observa la formación de NTs en la

membrana y en ningún caso, a diferencia de las otras membranas estudiadas, los CPs se agregan en el medio acuoso. Estos resultados sugieren que el CP sería tóxico para un organismo que posea en sus células una composición lipídica similar a la presentada, pudiendo llegar a romper la membrana celular. También cabe destacar la acusada curvatura que adquiere la membrana a la concentración más alta, lo que sugiere de nuevo que estos CPs la distorsionan de forma significativa. (Figura 24). Este fenómeno puede ser debido a la acumulación de NTs en la membrana, de forma que al aumentar la proporción de lípidos DMPG la interacción con la misma es mayor provocando así una deformación más severa.

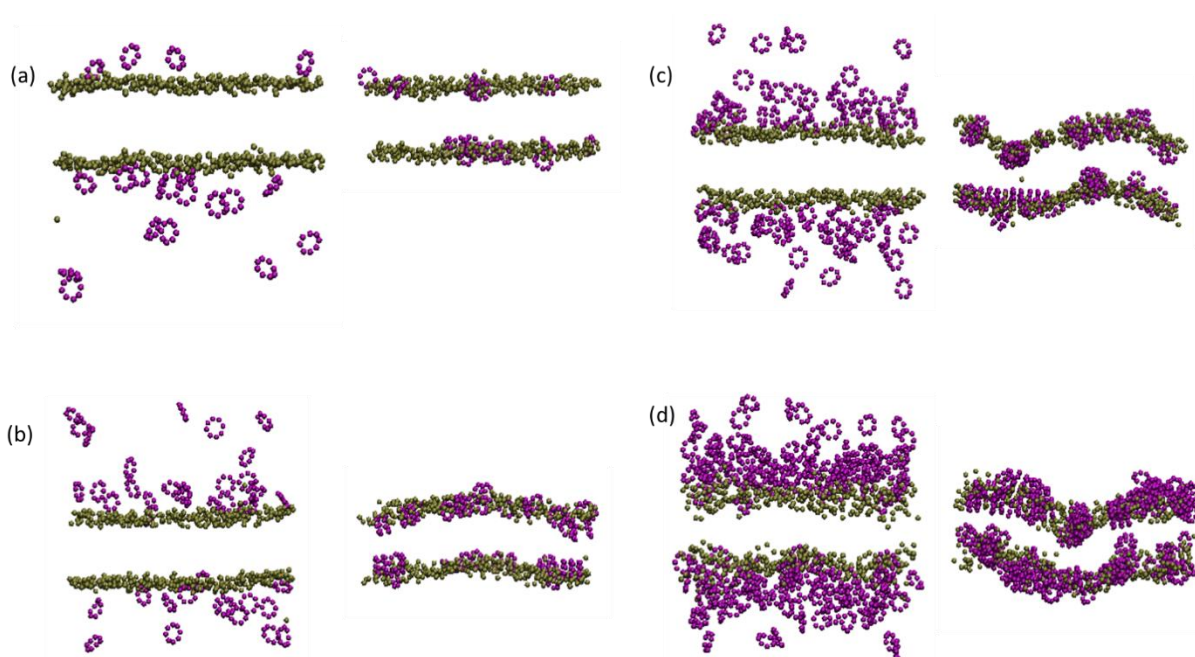


Figura 24. Comparación de los estados inicial (izquierda) y final ($t=20\mu\text{s}$; derecha) de las simulaciones de MD realizadas para la membrana DMPE:DMPG (1:9). (a) simulación con 20 CPs, (b) simulación con 40 CPs, (c) simulación con 80 CPs y (d) simulación con 160 CPs.

Del análisis completo de las trayectorias se obtiene el número de SCPNs formados por distinto número de CP a lo largo del tiempo (Figura 25).

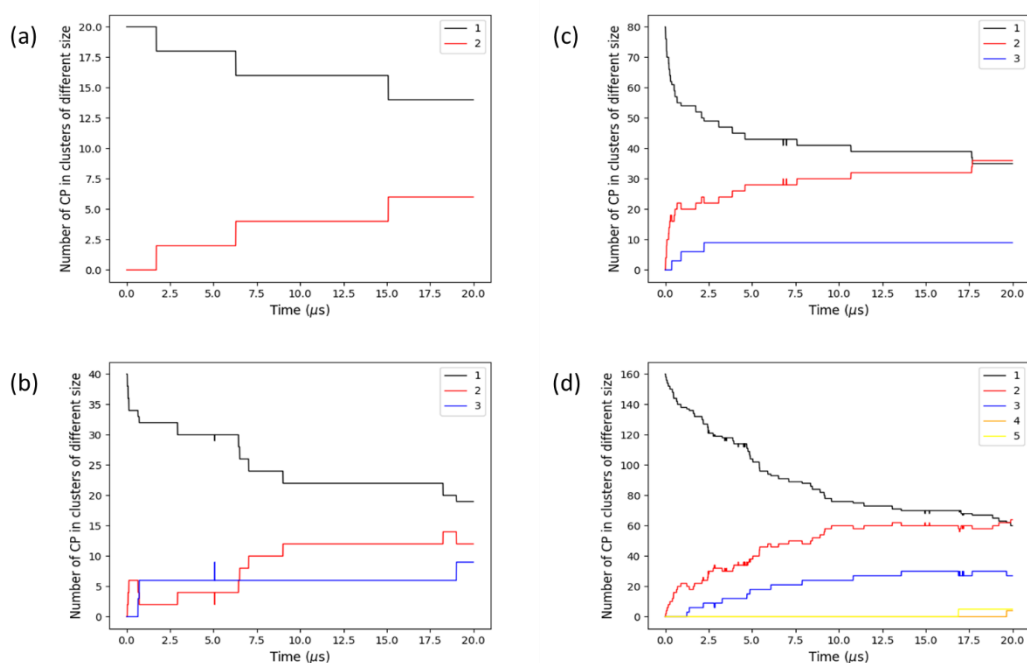


Figura 25. En las gráficas se representa el número de CPs que se ensamblan en los clústeres de distinto tamaño formados a lo largo de todo el tiempo de simulación donde (a) es la gráfica para la simulación con 20 CPs, (b) para 40 CPs, (c) para 80 CPs y (d) para 160 CPs.

Como se puede observar, este el sistema con una menor tendencia a la formación de NTs, encontrándose de media para el momento final de la simulación algo menos del 50% de los CPs en clústeres. Además, el tamaño de los SCPNs que se forman se limita prácticamente a dímeros y trímeros, encontrándose únicamente un tetrámero y un pentámero en la parte final de la simulación que cuenta con la mayor cantidad de CPs añadidos. Estos datos sugieren que, aunque el CP muestra una gran afinidad por la membrana, la formación de NTs no es tan favorable como en los casos anteriores.

Del análisis de los últimos 5 μs de las trayectorias se obtuvieron las gráficas que relacionan el número de dímeros paralelos y antiparalelos (Figura 26), las relativas al análisis de los ángulos de rotación en dímeros paralelos (Figura 27) y las que hacen referencia a los ángulos de rotación en los dímeros antiparalelos (Figura 28).

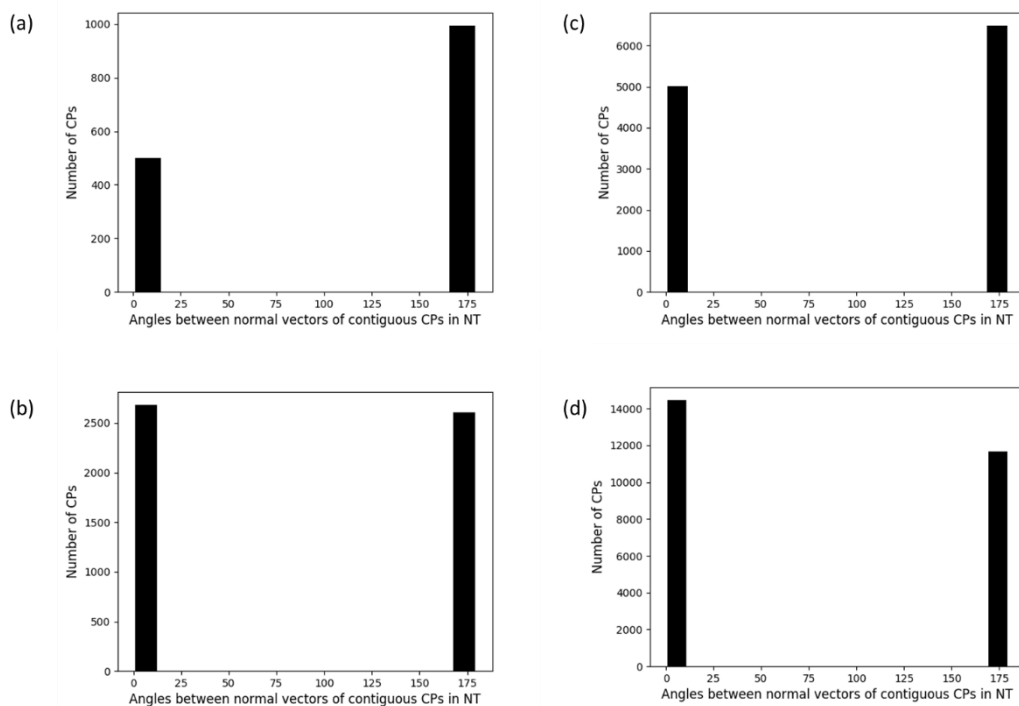


Figura 26. Histogramas obtenidos para las diferentes simulaciones: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs.

Igual que en los casos anteriores no se aprecia una gran diferencia entre el número de parejas que son paralelas y aquellas que son antiparalelas. También para este sistema se observa como cambia la proporción en función del número de CPs presentes en la simulación.

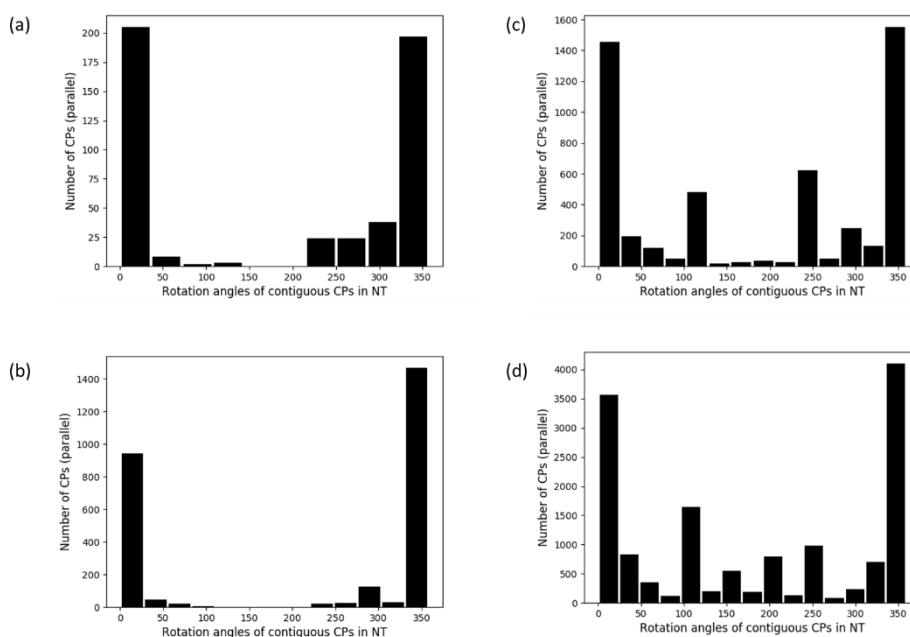


Figura 27. Se muestra la distribución de los ángulos de rotación calculados por el algoritmo para los CPs paralelos a las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs.

Los ángulos de rotación más habituales entre los CPs paralelos vuelven a estar entre 0-30° y 330-360°. Además, el predominio de estos valores en esta membrana es, aparentemente, mayor que en las anteriores. Esto puede deberse a que, al encontrarse los CPs más fuertemente atraídos hacia la membrana, debido al mayor carácter negativo de la misma, la internalización sea mayor y por tanto se vean más favorecidos los ángulos en los que hay un mayor número de residuos hidrofóbicos enfrentados dentro de la membrana. Cabe destacar, que en las simulaciones con 80 y 160 CPs vuelven a ser significativos los intervalos angulares comprendidos entre 100-120° y 240-270°, esto sugiere que en estas simulaciones en las que la membrana está más saturada de CPs, no todos son capaces de alcanzar la misma profundidad.

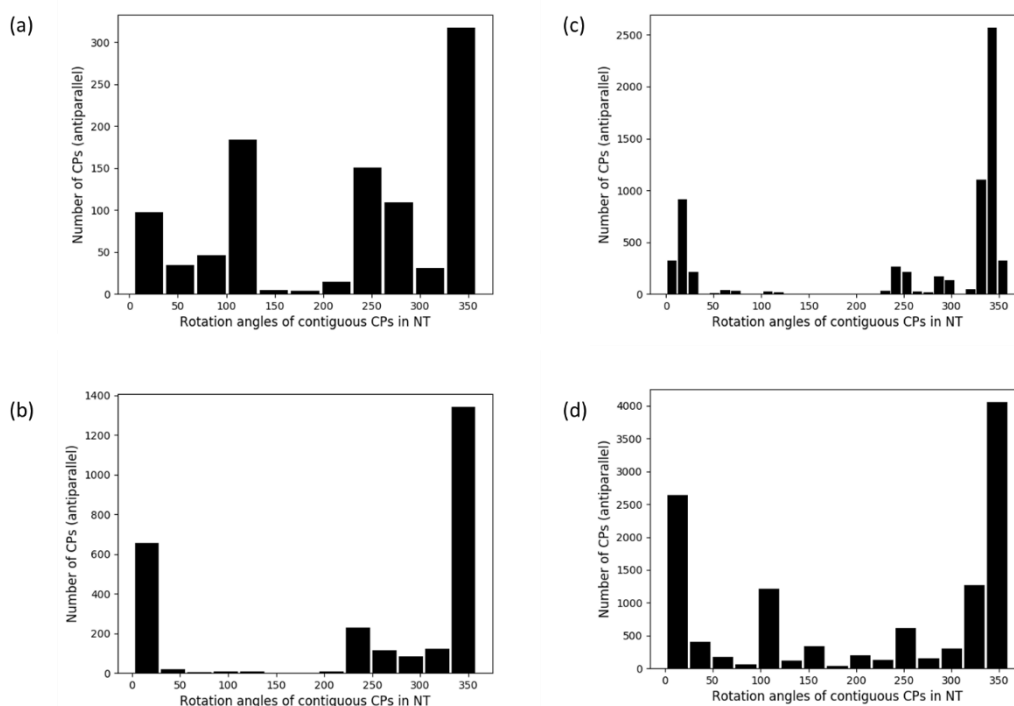


Figura 28. Se muestra la distribución de los ángulos de rotación calculados por el algoritmo para los CPs antiparalelos a las diferentes cantidades de CPs añadidos: (a) 20 CPs, (b) 40 CPs, (c) 80 CPs y (d) 160 CPs

En el caso de CPs antiparalelos la distribución de los ángulos de rotación no difiere excesivamente de los casos anteriores, la mayor diferencia se observa en la simulación con 20 CPs en la que aparecen una gran cantidad de parejas con ángulos de rotación entre 100-130° y 230-260°. Sin embargo, esto no se ajusta a lo esperado ya que son las configuraciones en las que menos residuos hidrofóbicos se enfrentan (Figura 29).

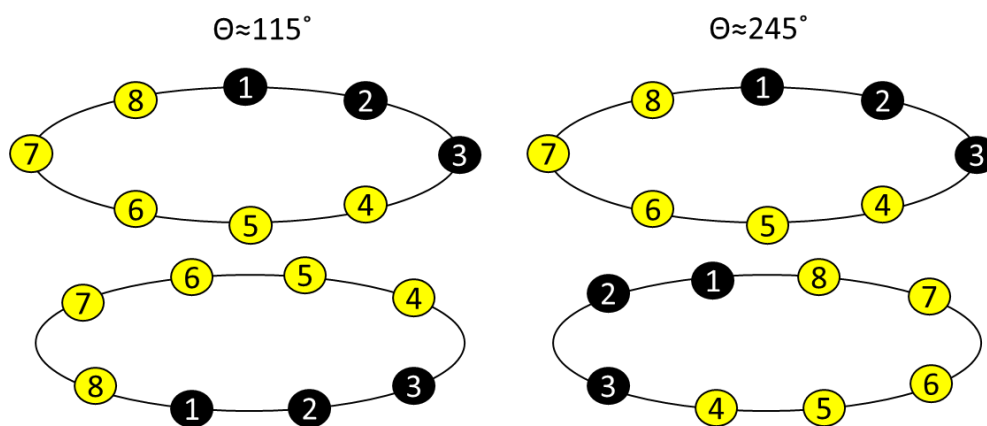


Figura 29. Representación de las conformaciones adoptadas por dímeros antiparalelos cuando el ángulo de rotación es 115° y 245° (Valores medios de los rangos).

5. Conclusiones

En este trabajo se ha utilizado el potencial de las simulaciones de Dinámica Molecular con resolución *Coarse-Grain* para estudiar un proceso biológico de escala nanométrica, como es el autoensamblaje de ciclopéptidos para formar nanotubos en membranas lipídicas. Con esta finalidad se seleccionó un D, L- α -ciclopéptido de naturaleza anfipática cuya actividad antimicrobiana ha sido previamente demostrada²⁵. Con el objetivo de estudiar el comportamiento de este ciclopéptido frente a membranas con diferente composición lipídica, fueron preparadas 3 bicapas con la finalidad de reflejar las composiciones más habituales de las membranas celulares y bacterianas. Además, para estudiar el efecto de la concentración de ciclopéptidos en el proceso de autoensamblaje, fueron preparados 4 sistemas con diferentes cantidades de ciclopéptidos, utilizando 20, 40, 80 y 160, para cada membrana, por lo que han sido llevadas a cabo un total de doce simulaciones de Dinámica Molecular. Los resultados obtenidos sugieren que la composición lipídica de la membrana juega un papel muy importante en el proceso de autoensamblaje. En presencia de una membrana neutra, los ciclopéptidos con naturaleza anfipática son más propensos a autoensamblarse en el medio acuoso, formando nanotubos que se agregan unos a otros en lugar de insertarse en la membrana. Este comportamiento indicaría una baja toxicidad de los ciclopéptidos en membranas con composiciones similares a la usada, lo que se extrapolaría a una baja toxicidad en células mamíferas. Sin embargo, en membranas con

cierta densidad de carga negativa, la afinidad del ciclopéptido por la membrana lo lleva a formar los nanotubos en la superficie lipídica, pudiendo llegar incluso a romperla. Este resultado sugiere que este ciclopéptido sería tóxico para un organismo cuyas células posean una composición lipídica similar a la usada, en este caso membranas bacterianas.

De manera similar, se ha demostrado como la concentración de ciclopéptidos utilizados afecta también a su actividad. Por una parte, una concentración demasiado baja favorece la inserción en la membrana incluso en aquellas para las que no se espera este comportamiento, mientras que, concentraciones demasiado altas provocan que parte de los ciclopéptidos se ensamblen en el medio acuoso. El número de ciclopéptidos que presenten este comportamiento dependerá, como se ha mostrado anteriormente, de la afinidad por la membrana ya que para la membrana DMPC:DMPG (3:1) una gran parte de los ciclopéptidos de la simulación con mayor concentración formaban nanotubos que se agregaban en el medio acuoso, mientras que para la membrana DMPE:DMPG (1:9) que tiene una mayor densidad de carga negativa, el número de nanotubos que se ensamblaban fuera de la membrana era mucho más pequeño y estos se situaban en posiciones muy cercanas a la superficie lipídica.

Los análisis de las trayectorias generadas en las simulaciones sugieren que tanto la composición de la membrana como la concentración de ciclopéptidos utilizada influye en el número y tamaño de los nanotubos formados, así como en la velocidad a la que tiene lugar el proceso de autoensamblaje. Los resultados obtenidos indicarían que en los sistemas en los que los ciclopéptidos se ensamblan en el medio acuoso se formarían un mayor número de nanotubos; y cuanto mayor sea la concentración, más grandes serán los clústeres obtenidos. De forma similar, en los sistemas en los que el autoensamblaje ocurre fuera de la membrana, se observó que el número de ciclopéptidos libres disminuye más rápidamente con el avance de la simulación, lo que sugiere que el proceso es más rápido en medio acuoso.

Sin embargo, no se encontró ninguna relación entre las condiciones en las que tiene lugar el proceso y el tipo de láminas β formadas entre los ciclopéptidos, ya que en las 3 membranas la relación paralelo:antiparalelo es cercana a 1:1.

Como conclusión, se puede afirmar que tanto la naturaleza de las cadenas laterales, la concentración de CP utilizada, como la composición de la membrana, determinan la actividad biológica del ciclo péptido. Además, conocer cómo se ensamblan y las características de las estructuras formadas permitirá un diseño más racional de estos sistemas.

In this work the potential of the Molecular Dynamics with Coarse-Grain resolution was used to study a biological process of nanometric dimensions, such as the self-assembly of cyclopeptides to form nanotubes in lipidic membranes. For this purpose an amphipathic D, L- α -cyclopeptide, which antimicrobial activity was demonstrated previously, was selected. Taking advantage of the behaviour of this cyclopeptide in the presence of membranes of different lipid composition, 3 membranes were prepared in order to reflect the most common composition of cell and bacterial membranes. With the aim of studying how the concentration of cyclopeptides affects the self-assembly process, 4 systems with 20, 40, 80 and 160 cyclopeptides respectively were prepared for each membrane, thus twelve Molecular Dynamics simulations have been carried out.

The results obtained suggest that the lipid composition of the membrane plays an important role in the self-assembly process. In the presence of a neutral membrane, the amphipathic cyclopeptide is more prone to self-assemble in the aqueous medium forming nanotubes which aggregate one with each other rather than inserting themselves into the membrane, this behaviour would indicate the low toxicity of the cyclopeptide in membranes with a composition similar to the one presented. However, in membranes with a certain negative charge density the affinity of the cyclopeptide for the membrane leads to the formation of nanotubes in the lipid surface being able to even disrupt it. This result suggests that this cyclopeptide would be toxic for an organism with a similar lipid composition in its cells.

In a similar way, it has been demonstrated that the concentration of cyclopeptide used affects its behaviour too. On the one hand, a very low concentration favours the insertion into the membrane even in those which were not expected to show that behaviour, whereas, high concentrations lead to the self-assembly of part of the cyclopeptides in the

aqueous medium. The number of cyclopeptides that are going to present this behaviour will depend, as shown above, on the affinity for the membrane since for the DMPC:DMPG (3:1) membrane in the simulation with the highest concentration a huge amount of cyclopeptide formed nanotubes which aggregate one to each other in the aqueous medium, while in the DMPE:DMPG (1:9) membrane which has more negative charge density, the number of cyclopeptides which self-assemble out of the membrane was way smaller and these ones were closer to the lipid surface.

The analysis of the trajectories generated on the simulations using the algorithm developed by the group, suggest that the composition of the membrane as well as the concentration of cyclopeptides used affects to the number and size of the nanotubes formed and to the velocity of the process as well. The results obtained would indicate that in the systems in which the cyclopeptides are assembled in the aqueous medium, a larger number of cyclopeptides would be formed and the higher the concentration the larger the cluster obtained. In a similar way, in the systems in which the self-assembly takes place out of the membrane it was observed that the number of free cyclopeptides decreases faster with the progress of the simulation, which suggest that the process is faster in de aqueous medium.

Nevertheless, no relationship was founded between at which the process takes place and the type of β -sheets formed between the cyclopeptides.

As conclusion, it could be claimed that the nature of the side chains, the concentration used as well as the membrane composition define the biological activity of the cyclopeptide. Furthermore, know how they are assembled and the traits of the structures formed will allow a more rational design of these systems.

Neste traballo empregouse o potencial das simulacións de Dinámica Molecular con resolución *Coarse-Grain* para estudar un proceso biolóxico de escala nanométrica, como é o autoensamblaxe de ciclopéptidos para formar nanotubos en membranas lipídicas. Con esta finalidade seleccionouse un D, L- α -ciclopéptido de natureza anfipática cuxa actividade antimicrobiana foi previamente demostrada. Aproveitando o comportamento deste

ciclopéptido fronte a membranas con diferente composición lipídica, foron preparadas 3 membranas coa finalidade de reflectir as composicións máis habituais das membranas celulares e bacterianas. Ademais, co obxectivo de estudar o efecto da concentración de ciclopéptidos no proceso de autoensamblaxe, foron preparados 4 sistemas con concentracións de 20, 40, 80 e 160 ciclopéptidos para cada membrana polo que foron levadas a cabo un total de doce simulacións de Dinámica Molecular.

Os resultados obtidos suxiren que a composición lipídica da membrana xoga un papel moi importante no proceso de autoensamblaxe. En presenza dunha membrana neutra, os ciclopéptidos con natureza anfipática son máis propensos a autoensamblarse no medio acuoso formando nanotubos que se agregan uns a outros en lugar de inserirse na membrana, este comportamento indicaría unha baixa toxicidade dos ciclopéptidos en membranas con composicións similares á utilizada. Con todo, en membranas con certa densidade de carga negativa a afinidade do ciclopéptido pola membrana conleva á formación dos nanotubos na superficie lipídica podendo chegar mesmo a rompela. Este resultado suxire que este ciclopéptido sería tóxico para un organismo cuxas células posúen unha composición lipídica similar á usada.

De maneira similar, demostrouse como a concentración de ciclopéptidos empregados afecta tamén á súa actividade. Por unha banda, unha concentración demasiado baixa favorece a inserción na membrana mesmo naquelas para as que non se espera este comportamento, mentres que, concentracións demasiado altas provocan que parte dos ciclopéptidos se ensamblen no medio acuoso. O número de ciclopéptidos que presenten este comportamento dependerá, como se mostrou anteriormente, da afinidade pola membrana xa que para a membrana DMPC:DMPG (3:1) unha gran parte dos ciclopéptidos da simulación con maior concentración formaban nanotubos que se agregaban no medio acuoso, mentres que para a membrana DMPE:DMPG (1:9) que ten unha maior densidade de carga negativa, o número de nanotubos que se ensamblaban fóra da membrana era moito máis pequeno e estes situábanse en posicións moi próximas á superficie lipídica.

As análises das traxectorias xeradas nas simulacións empregando o algoritmo desenvolto polo grupo suxiren que tanto a composición da membrana como a concentración de ciclopéptidos empregada inflúe no número e tamaño dos nanotubos formados, así como

na velocidade á que ten lugar o proceso de autoensamblaxe. Os resultados obtidos indicarían que nos sistemas nos que os ciclopéptidos se ensamblan no medio acuoso, formaríanse un maior número de nanotubos e canto maior sexa a concentración máis grandes serán os clústeres obtidos. De forma similar, nos sistemas nos que o autoensamblaxe ocorre fóra da membrana observouse que o número de ciclopéptidos libres diminúe máis rapidamente co avance da simulación, o que suxire que o proceso é máis rápido no medio acuoso.

Sen embargo, non se atopou ningunha relación entre as condicións nas que ten lugar o proceso e o tipo de láminas β formadas entre os ciclopéptidos.

Como conclusión, pódese afirmar que a natureza das cadeas laterais, a concentración empregada así como a composición da membrana determinan a actividade biolóxica do ciclopéptido. Ademais, coñecer como se ensamblan e as características das estruturas formadas permitirá un deseño máis racional destes sistemas.

Bibliografía

- ¹ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antibiotic Resistance. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> [Consultado el 11 de mayo de 2020]
- ² Holohan, C., Van Schaeybroeck, S. & Longley, D., et al. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer*, 13, 714-726.
- ³ Samaras, V., Rafailidis, P., Mourtzoukou, E., Peppas, G. & Falagas M. (2010). Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 4, 267-281.
- ⁴ Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D. & Fidler, I. J. (1991). Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.*, 51, 3062-3066.
- ⁵ Kenis, H. & Reutelingsperger, C. (2009). Targeting phosphatidylserine in anti-cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.*, 15, 2719-2723. doi: 10.2174/138161209788923903
- ⁶ Bevers, E. M. & Williamson, P. L. (2016). Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiol. Rev.*, 96, 605-645. doi: 10.1152/physrev.00020.2015

- ⁷ Glukhov, E., Stark, M. Burrows, L. L. & Deber C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 33960-33967. doi: 10.1074/jbc.M507042200
- ⁸ Lohner, K. (2009). New strategies of novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *General Physiology and Biophysics*, 28, 105-106.
- ⁹ Blanco-Míguez, A. et al. (2016). From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. *Protein Sci.*, 25, 1084–1095.
- ¹⁰ Hu, J., Chen, C., Zhang, S., Zhao, X., Xu, H., Zhao, X. & Lu, J. (2011). Designed Antimicrobial and Antitumor Peptides with High Selectivity. *Biomacromolecules*, 12, 3839-3843. doi: 10.1021/bm201098j.
- ¹¹ Dennison, S. R., Whittaker, M., Harris, F. & Phoenix, D. A. (2006). Anticancer alpha-helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 7, 487-499. doi:10.2174/138920306779025611
- ¹² Papo, N., & Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 784–790. doi:10.1007/s00018-005-4560-2
- ¹³ Meng, S., Xu, H. & Wang, F. (2010). Reserch Advances of Antimicrobial Peptides and Applications in Food Industry and Agriculture. *Current Protein and Peptide Science*, 10, 264-273.
- ¹⁴ THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATEBASE. Main. Disponible en: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> [Consultado el 2 de Julio de 2020].
- ¹⁵ Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C. & Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*, 5, 5. doi: 10.3389/fchem.2017.00005
- ¹⁶ Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S. & Price, D. (2013) The Future of Peptide-based Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.*, 81, 136-147.

- ¹⁷ Wu, D., Gao, Y., Qi, Y., Chen, L., Ma, Y. & Li, Y. (2014). Peptide-base cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*, 351, 13-22. doi: 10.1016/j.canlet.2014.05.002
- ¹⁸ Kowalski, P. S., Bhattacharya, C., Afewerki, S. & Langer, R. (2018). Smart Biomaterials: Recent Advances and Future Directions. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4, 3809-3817. doi: 10.1021/acsbomaterials.8b00889
- ¹⁹ Molchanova, N., Hansen, P. R. & Franzyk, H. (2017) Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs. *Molecules*, 22, 1430. doi:10.3390/molecules22091430
- ²⁰ De Santis, P., Morosetti, S. & Rizzo, R. (1974) Conformational Analysis of Regular Enantiomeric Sequences. *Macromolecules*, 7, 52-58.
- ²¹ Ghadiri, M. R., Granja, J. R., Milligan, R. A., McRee, D. E. & Khazanovich N. (1993) Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture. *Nature*, 366, 324-327.
- ²² Khazanovich, N., Granja, J. R., McRee, D. E., Milligan, R. E. & Ghadiri M. R. (1994) Nanoescale Tubular Ensembles with Specified Internal Diameters. Design of a Self-Assembled Nanotube with a 13-Å Pore. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 6011-6012.
- ²³ Ghadiri, M. R., Granja, J. R. & Buehler, L. K. (1994) Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes. *Nature*, 369, 301-304.
- ²⁴ Granja, J. R. & Ghadiri, M. R. (1994). Channel-Mediated Transport of Glucose across Lipid Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 10785-10786.
- ²⁵ Fernandez-Lopez, S., Kim, H., Choi, E. et al. (2001). Antibacterial agents based on the cyclic D,L- α -peptide architecture. *Nature*, 412, 452-455. doi: 10.1038/35086601.
- ²⁶ Amorín, M., Castedo, L. & Granja J. R. (2003) New Cyclic Peptide Assemblies with Hydrophobic Cavities: The Structural and Thermodynamic Basis of a New Class of Peptide Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2844-2845.
- ²⁷ Brea, R. J., Amorín, M., Castedo, L. & Granja J. R. (2005). Methyl-Blocked Dimeric α , γ -Peptide Nanotube Segments: Formation of a Peptide Heterodimer through Backbone-

- Backbone Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 5710-5713. doi: 10.1002/anie.200501555.
- ²⁸ Amorín, M., Villaverde, V., Castedo, L. & Granja J. R. (2005). New α,γ -peptide tubulets. *J. Drug del Sci. Tech.*, 15, 87-92.
- ²⁹ Lamas, A., Guerra, A., Amorín, M. & Granja J. R. (2018). New self-assembling peptide nanotubes of large diameter using δ -amino acids. *Chem. Sci.*, 9, 8228-8233. doi: 10.1039/C8SC02276C.
- ³⁰ Reiriz, C., Castedo, L. & Granja, J. R. (2008). New α,γ -cyclic peptides-nanotube molecular caps using α,α -dialkylated α -amino acids. *J. Pept. Sci.*, 14, 241-249. doi: 10.1002/psc.984.
- ³¹ Mukherjee S., Kar R.K., Bhunia A. (2020). Characterization of Antimicrobial Peptide–Membrane Interaction Using All-Atom Molecular Dynamic Simulation. In: Sandrelli F., Tettamanti G. Humana, New York, NY: (eds) Immunity in Insects. Springer Protocols Handbooks.
- ³² Hinchliffe, A. (2008). *Molecular Modelling for Beginners* (Segunda ed.). Chinchester: John Wiley & Sons Ltd.
- ³³ Leach, R. A. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications* (Segunda ed.). Essex: Prentice Hall (Pearson Education).
- ³⁴ Nogueira, J. J. [MoBioChem]. (2020, 22 de Abril). Molecular Dynamics – chapter 2: Force Fields [Archivo de video]. Recuperado de <https://youtu.be/vpqq0q3zvJU>.
- ³⁵ Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity-rescaling. *J. Chem. Phys.*, 126, 1. doi: 10.1063/1.2408420.
- ³⁶ Rühle, V. (2007). Berendsen and Nose-Hoover thermostats. *Am. J. Phys.*
- ³⁷ Andersen, H. C. (1980) Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.*, 72, 2384. doi: 10.1063/1.439486.

- ³⁸ Nogueira, J. J. [MoBioChem]. (2020, 6 de Mayo). Molecular Dynamics – chapter 3: Periodic Boundary Conditions, Temperature and Pressure [Archivo de video]. Recuperado de <https://youtu.be/lpdTtx98AWQ>.
- ³⁹ PROTEIN DATA BANK. Homepage. Disponible en: <https://www.rcsb.org/> [Consultado el 2 de Junio de 2020].
- ⁴⁰ THE AMBER MOLECULAR DYNAMICS PACKAGE. The Amber Home Page. Disponible en: <https://ambermd.org/> [Cosultado el 2 de Junio de 2020].
- ⁴¹ CHARMM. Home. Disponible en: <https://www.charmm.org/> [Consultado el 2 de Junio de 2020].
- ⁴² THE GROMOS SOFTWARE. About GROMOS. Disponible en: <http://www.gromos.net/> [Consultado el 2 de Junio de 2020]
- ⁴³ Yip, S., & Díaz de la Rubia, T. (2009). Scientific Modeling and Simulations. Berlín: Springer.
- ⁴⁴ MARTINI. About. Disponible en: <http://cgmartini.nl/index.php/about> [Consultado el 20 de Mayo de 2020].
- ⁴⁵ Khalifa, A. & Tarek, M. (2010). On the Antibacterial Action of Cyclic Peptides: Insights from Coarse-Grained MD Simulations. *J. Phys. Chem. B.*, 114, 2676-2684. doi: 10.1021/jp9064196.
- ⁴⁶ Claro, B., González-Freire, E., Bessa, L. C., Goormatight, E., Amorín, M., Granja, J. R., Garcia-Fandiño, R. & Bastos, M., manuscript in preparation.
- ⁴⁷ GROMACS. Gromacs. Disponible en: <http://www.gromacs.org/> [Consultado el 2 de Junio de 2020].
- ⁴⁸ Parrinello, M. & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.*, 52, 7182-7190.
- ⁴⁹ VMD. Visual Molecular Dynamics. Disponible en: <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> [Consultado el 20 de Junio de 2020].