

# Simulaciones por Dinámica Molecular para el Estudio de Propiedades Biofísicas de Estafiloxantina en Membranas Modelo de *Staphylococcus aureus*.

John Erick Cabrera Ramirez

Código: 201823444

Director: Chad Leidy

24 de julio de 2019

## Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>2. Estado del Arte</b>	<b>3</b>
2.1. La membrana Bacteriana y sus compuestos presentes . . . . .	3
2.2. Resistencia a tratamientos antibióticos de <i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	5
2.3. Dinámica Molecular y Campos de Fuerza . . . . .	6
2.3.1. Campos de Fuerza . . . . .	7
2.3.2. Solución de las ecuaciones de Movimiento . . . . .	8
2.4. Trabajo Preliminar . . . . .	9
2.4.1. Studying the role of staphyloxanthin in modulating membrane structural parameters in DMPG and DPPG lipid bilayers [1] . . . . .	9
<b>3. Objetivo Principal</b>	<b>10</b>
<b>4. Objetivos Específicos</b>	<b>10</b>
<b>5. Metodología</b>	<b>11</b>
<b>6. Cronograma</b>	<b>14</b>
<b>7. Personas Conocedoras del Tema</b>	<b>14</b>

# 1. Introducción

*Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena Gram Positiva que causa enfermedades infecciosas. De acuerdo a Kobayashi et al. [2], la bacteria es un colonizador común de la piel y del aparato respiratorio y actúa como un patógeno oportunista que puede causar infecciones nicosomiales (intrahospitalarias) en el sistema respiratorio, en los tejidos blandos y en el torrente sanguíneo [3]; incluso puede causar infecciones en las juntas de las prótesis formando biopelículas [4].

Desde el descubrimiento de *Staphylococcus aureus* como causante de una infección a una herida en 1881 [5], se ha investigado su presencia en otras infecciones y se han utilizado antibióticos como la penicilina, la meticilina y la vancomicina para controlar estas infecciones [3]. Sin embargo, *Staphylococcus aureus* ha desarrollado resistencia a algunos de estos antibióticos, surgiendo la necesidad de buscar nuevos antibióticos o incluso moléculas con un mecanismo de acción diferente. Algunas de estas nuevas moléculas son los péptidos antimicrobianos, estas se describen en la sección 2.2.

De acuerdo a Perez-Lopez et al. [6] y a Nagendra et al. [7] se ha encontrado que la bacteria modula la composición de su membrana plasmática frente a cambios en el medio. Esta modulación afecta las propiedades biofísicas de su membrana; es decir propiedades fisicoquímicas como la permeabilidad, la estructura y las propiedades mecánicas. El cambio de estas propiedades es un factor que mejora la tolerancia de la bacteria a la acción de péptidos antimicrobiales. Debido a esto, las propiedades biofísicas de la membrana se convierten en objeto de estudio y además son determinantes en la búsqueda de nuevas moléculas dirigidas a la membrana (moléculas blanco) que combatan la bacteria.

Al ser *Staphylococcus aureus* una bacteria Gram positiva, consta de dos membranas plasmáticas, siendo la membrana interior la de interés en términos de la generación de nuevos antibióticos antimicrobiales debido a su rol como mediador del potencial electroquímico. Algunos estudios se han enfocado en como la composición de la bicapa lipídica interna afecta sus propiedades biofísicas de <sup>1</sup> cuando esta cambia la concentración de ciertos lípidos como la cardiolipina [8] y de carotenoides como la estafiloxantina [1], [6], [7]. Recientemente, en nuestro grupo, se han estudiado computacionalmente y/o experimentalmente propiedades mecánicas como la rigidez de la membrana, la orientación de la estafiloxantina, el área por lípido, la difusión y el parámetro de orden del deuterio.

En los experimentos por Perez-Lopez et al [6] y Nagendra et al. [7] se ha mostrado que cambios en el contenido de carotenoides en las membranas de distintas cepas de *Staphylococcus aureus*, y en membranas modelo compuestas por algunos lípidos mayoritarios de la bacteria, resultan en cambios en la rigidez. Se ha demostrado que este

---

<sup>1</sup>*Staphylococcus aureus* al ser una bacteria Gram positiva está envuelta por dos membranas, la externa llamada péptidoglicano y la interna llamada bicapa lipídica. Las membranas se explican en la subsección 2.1

cambio en rigidez afecta la resistencia de la membrana a diferentes péptidos antimicrobiales. Sin embargo, es necesario mirar en mas detalle molecular la influencia local que tienen los carotenoides en la membrana, en particular de la estafiloxantina, ya que la escala de los experimentos realizados no permiten vislumbrar diferentes propiedades moléculares. Entre las propiedades que se pueden estudiar en detalle a través de simulaciones están la ubicación relativa de los carotenoides con respecto a los otros lípidos, la orientación y las interacciones que presenta exclusivamente el carotenoide estafiloxantina con los lípidos vecinos. Estos detalles moleculares influyen en los cambios de la rigidez de la membrana de *Staphylococcus aureus*.

Para estudiar la ubicación, las interacciones con otros lípidos, el área por lípido, de la estafiloxantina, en nuestro grupo se ha realizado un estudio computacional preeliminar mediante las simulaciones por dinámica molecular implementadas en CHARMM [1] (ver sección 2.4). Estas simulaciones requieren introducir ciertos parámetros relacionados con los campos de fuerza y con la geometría de la estafiloxantina, los cuales deben ser cuidadosamente seleccionados para que las simulaciones por dinámica molecular reflejen el comportamiento físico de la molécula.

Debido a que solamente se ha utilizado el algoritmo implementado en CHARMM para estudiar la estafiloxantina y a que aún no se han optimizado completamente los parámetros de la estafiloxantina, el objetivo de la presente propuesta es proponer un plan de trabajo mediante el cual se puedan optimizar las simulaciones por dinámica molecular realizadas previamente por [1] en CHARMM, poniendo especial atención a la optimización de los parámetros de la estafiloxantina. Adicionalmente, proponemos modelar la estafiloxantina utilizando un segundo potencial (AMBER) para confirmar que las observaciones son independientes del potencial utilizado.

## 2. Estado del Arte

### 2.1. La membrana Bacteriana y sus compuestos presentes

Según el tipo de membrana que posean las bacterias, éstas pueden clasificarse en dos grandes clases: las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas. Las bacterias Gram positivas poseen una sola bicapa lipídica envuelta en una capa compuesta por unos polímeros de azúcares y aminoácidos llamados peptidoglicano (ver figura 1), mientras que las membranas de bacterias Gram negativa poseen dos bicapas lipídicas. Ya que *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva se discutirá principalmente la composición de la membrana de las bacterias Gram Positivas.

La bicapa lipídica es una membrana presente en todas las células la cual está compuesta mayoritariamente por lípidos. Los lípidos se acomodan de tal manera que el espesor de la membrana sea de dos lípidos de grosor. En su mayoría, con excepciones

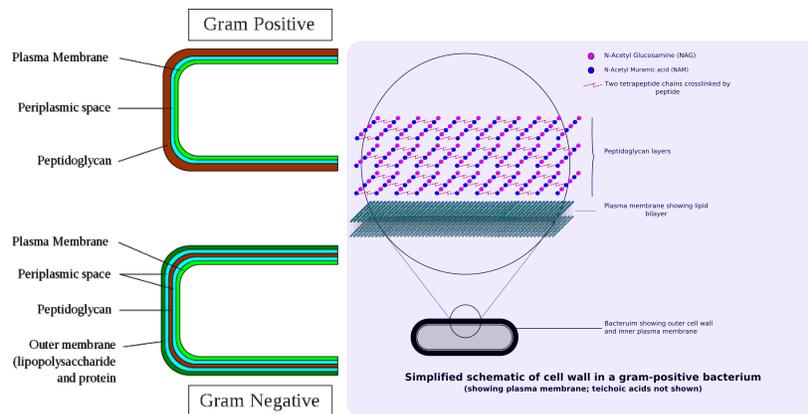


Figura 1: Imagen de la membrana de una bacteria Gram positiva. Tomado de [9].

como los esteroides, los lípidos están compuestos por una o varias cadenas de ácidos grasos no polares (cadenas hidrocarbonadas con carboxilo) unidas a diferentes sustituyentes polares los cuales pueden presentar carga o no a pH fisiológico. De acuerdo a los sustituyentes y al tipo de ácidos grasos cada lípido presenta propiedades fisicoquímicas específicas, como la carga total, la polaridad, y el largo que lo distinguen a nivel biofísico con los otros lípidos. Los lípidos forman bicapas debido a la presencia del agua ya que al ser moléculas anfipáticas (combinando motivos polares y apolares) se orientan con respecto a esta. La parte hidrofílica del lípido interactúa con el agua mientras que la parte hidrofóbica no interactúa con esta, lo que induce reorientación y agregación de los lípidos. Estas interacciones hacen que sea más estable encontrar los lípidos inmersos en el agua formando agregados sin mezclarse con el agua. La interacción lateral entre estas moléculas se da a través de fuerzas no covalentes lo que le confiere propiedades de cristal líquido caracterizado por la capacidad de presentar transiciones de fase sólido-líquido y difusión lateral.

La bicapa lipídica de *Staphylococcus aureus* esta compuesta principalmente por fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), lisofoglicandol (LPG) y glicopeptidolípidos (GPL) [10]. En la figura 2 se muestra la fórmula estructural del Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), el cual es un lípido con el fosfatidilglicerol unido a dos miristoil (provenientes del ácido mirístico). Se observa que este lípido forma un espaciado entre las cadenas hidrocarbonadas más grande que la cabeza del lípido, esto hace que la presencia de DMPG disminuya la rigidez de la membrana plasmática.

Las membranas lipídicas además de tener lípidos contienen otros tipos de biomoléculas como los carotenoides, las proteínas y los glicolípidos que tienen relevancia fisiológica en la célula. Los carotenoides en particular pigmentan las células. En el caso de *Staphylococcus aureus* se ha descubierto que los carotenoides juegan un papel importante en la integridad de la membrana celular y protegen a la bacteria frente a estrés oxidativo [7]. La protección de los carotenoides en la membrana se ve reflejada por un aumento de su

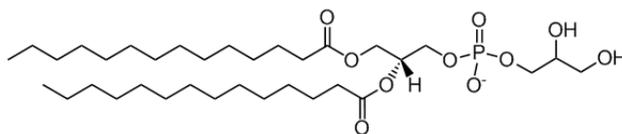


Figura 2: Fórmula estructural del Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). Tomada de [11].

rigidez, de forma similar al papel que juega el colesterol en la membrana eucariótica.

Uno de los carotenoides más relevantes en *Staphylococcus aureus* es la estafloxantina la cual le da el nombre a la bacteria ya que le da un color áureo. La estafloxantina es un triterpeno carotenoide que posee dos cadenas hidrocarbonadas. Una de ellas es un ácido graso parecido a otros ácidos grasos de la membrana, caracterizado por ser saturado y con presencia de ramificaciones metíles. El otro es un ácido graso diaponeurosporenoico, que presenta insaturaciones conjugadas tipo trans y ramificaciones. Las dos cadenas están unidas a un molécula de glucosa mediante enlaces tipo éster, ver figura 3. Debido a los enlaces dobles conjugados de la cadena diaponeurosporenoica, esta es rígida, ya que estos enlaces dificultan rotaciones intramoleculares. Esta rigidez se convierte en un factor que aumenta el empaquetado de la bicapa lipídica, ya que disminuye la distancia entre lípidos vecinos [12].

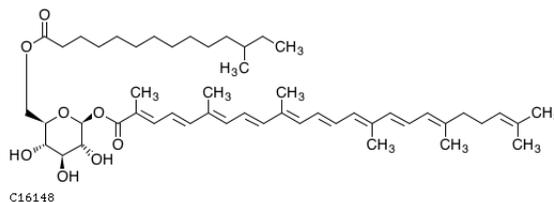


Figura 3: Fórmula estructural de la estafloxantina. Tomada de [13].

Además, estas insaturaciones conjugadas le da propiedades antioxidantes que protegen a la bacteria frente al estrés oxidativo del medio, al poder incorporar especies reactivas oxidativas [9].

## 2.2. Resistencia a tratamientos antibióticos de *Staphylococcus aureus*

Desde el descubrimiento de la penicilina, infecciones de *Staphylococcus aureus* han sido tratada con este antibiótico. Sin embargo, a mediados del siglo XX *Staphylococcus aureus* comenzó a presentar resistencia a esta familia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos,

incluida la meticilina. Posteriormente se han aplicado otros antibióticos como la vancomicina, pero también se ha ido generando resistencia a estos otros antibióticos. De ahí que surja la necesidad de buscar nuevos medicamentos que combatan *S. aureus*.

Un péptido antimicrobiano es un oligómero de aminoácidos, de alrededor de 20 aminoácidos de largo, que hace parte de la respuesta inmune de un amplio espectro de especies, y que son fáciles de sintetizar en el laboratorio. Los péptidos antimicrobianos se clasifican según la estructura secundaria que tienen:  $\alpha$  hélices,  $\beta$  plegados. Los péptidos antimicrobianos interactúan con la membrana de la bacteria produciendo orificios que causan pérdida de contenido, pérdida del potencial electroquímico y muerte celular.

Los péptidos antimicrobiales forman estructuras anfipáticas que inducen su adhesión a la membrana. Al aumentar su concentración superficial, se induce una inserción de estos péptidos, atravesando la membrana y generando poros. Son de interés los péptidos antimicrobiales catiónicos ya que la membrana de *Staphylococcus aureus* es aniónica y estos péptidos tienen una preferencia para adherirse a estas membranas. La formación de poros es un proceso mecánico que requiere la deformación de la membrana para suceder. Al incrementar la rigidez de la membrana, se dificulta la inserción del péptido generando resistencia [6], [7]. Por este motivo se vuelve relevante estudiar como la composición de la membrana, en particular la presencia de stafloxaquina, modulan la rigidez de la membrana.

### 2.3. Dinámica Molecular y Campos de Fuerza

Un paradigma central en la biología es la existencia de un vínculo entre la estructura, la dinámica y la función de una biomolécula, entendiéndose esta como cualquier molécula con un rol biológico. Se dice que tanto la estructura como la dinámica son determinantes en la función de cualquier biomolécula. En el caso de las membranas se sabe que además de su riqueza en la composición afectando procesos bioquímicos, esta riqueza también influye en la movilidad y propiedades físicas de la membrana. Al estar unidos por fuerzas débiles los lípidos son móviles y su movimiento afecta la función de la membrana para realizar sus funciones fisiológicas. Para estudiar las estructuras móviles de las moléculas se usa el método de la dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés).

En la dinámica molecular se resuelven numéricamente las ecuaciones de movimiento de Newton para cada una de las partículas que constituyen el sistema, por ejemplo a nivel de átomos (alta resolución espacial) o grupos de átomos (menor resolución espacial), obteniéndose la trayectoria como función del tiempo de cada partícula. Una vez obtenida la trayectoria se pueden analizar las propiedades del sistema en estudio, ya que se registran las velocidades, posiciones y energías de interacción de todo el sistema.

Las ecuaciones de movimiento de Newton para un conjunto de  $N$  partículas ( $3N$  coordenadas) están restringidas a una función de energía potencial, denominada  $V(\vec{r})$ , dependiente solo de la distancia entre partículas y afectando las fuerzas y torques de

interacción. Estas ecuaciones tienen la forma <sup>2</sup>

$$m_i \frac{d\vec{r}_i}{dt} = -\vec{\nabla}_i V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (1)$$

Donde  $m_i$  es la masa de la  $i$ -ésima partícula,  $\vec{r}_i$  es la posición de la partícula  $i$ -ésima y el gradiente  $\vec{\nabla}_i$  se calcula sobre las coordenadas de posición de la  $i$ -ésima partícula.

Para resolver las ecuaciones de movimiento es necesario conocer la fuerza aplicada al sistema en cada instante de tiempo, esta se halla a partir de la energía potencial sobre las partículas. En la sección de Campos de fuerza se detalla la naturaleza de estos potenciales.

### 2.3.1. Campos de Fuerza

Un campo de fuerza es la combinación de la energía potencial de interacción asociada a los parámetros de fuerza y sus respectivos parámetros [15]. Algunos de los campos de fuerza más utilizados son los de AMBER, CHARMM, GROMOS y OPLS-AA. Todos estos campos de fuerza tienen en común la separación de la energía total en dos términos: los enlazantes (o intermoleculares) y los no enlazantes (o entre pares). En forma de ecuación:

$$V = V_{\text{enlazante}} + V_{\text{no enlazante}} \quad (2)$$

Cada uno de estos tiene los términos:

- Interacciones intermoleculares: Son las producidas por los enlaces covalentes entre grupos de átomos, las interacciones de valencia y las torsiones.

$$V_{\text{cov}}(r) = \sum_{\text{enlaces}} k_r (r - r_0)^2 \quad (3)$$

$$V_{\text{val}}(r) = \sum_{\text{val}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (4)$$

$$V_{\text{tor}}(r) = \sum_{\text{dihedros}} \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (5)$$

- Interacciones entre pares: Lennard Jones y electrostático.

$$V_{\text{len}}(r) = \sum_{j=1}^{N+1} \sum_{i=j+1}^N f_{ij} \left\{ \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right\} \quad (6)$$

$$V_{\text{elec}}(r) = \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_R r_{ij}} \quad (7)$$

<sup>2</sup>Este sistema de ecuaciones puede obtenerse del lagrangiano  $L = T - V$  siendo  $T$  y  $V$  la energía cinética del sistema y la energía potencial del sistema respectivamente. Hay que tener en cuenta que la energía potencial tiene dos términos, el de un potencial externo si se aplica una fuerza externa y, el interno, el cual depende de la distancia entre las partículas, ver [14].

Las constantes  $k_r, k_\theta, f_{ij}, \epsilon_{ij}, r_{0ij}$ , son constantes empíricas definidas de manera diferente en cada uno de los programas que realizan dinámica molecular.

Una de las diferencias entre los programas está en el tratamiento de los ángulos dihedros impropios, es decir de los involucrados en la quiralidad de las moléculas. Por ejemplo, CHARMM Y GROMOS agregan a las interacciones enlazantes un potencial armónico entre los átomos terminales del dihedro (en A-B-C-D serían A y C) denominado de Urey-Bradley con la forma:

$$V_{\text{UB}} = \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{\text{UB}}(b^{A-C} - b^{A-C,0})^2 \quad (8)$$

En AMBER y OPLS-AA esta interacción es incluida en el término del potencial de torsiones.

En cuanto a los parámetros de los términos enlazantes tanto AMBER como CHARMM calculan las constantes de los términos no enlazantes/entre pares de átomos  $i, j$  como:

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (9)$$

$$r_{0ij} = \frac{1}{2}(r_i + r_j) \quad (10)$$

### 2.3.2. Solución de las ecuaciones de Movimiento

Debido al tamaño de los sistemas biológicos a considerar, en este caso del orden de 15000 átomos [1], las ecuaciones de movimiento (1) deben resolverse numéricamente. Para resolverlas se usan algoritmos como el de Verlet, el de la forma "leapfrog", el de velocidad de Verlet y el de Beeman [16].

En el algoritmo de Verlet se hace una aproximación en series de Taylor a segundo orden de las posiciones hacia adelante  $\vec{r}_i(t_{n+1})$  y hacia atrás  $\vec{r}_i(t_{n-1})$ , ver [1],[16]; que al restarlas da la siguiente solución iterada:

$$t_n = n\Delta t \quad (11)$$

$$\vec{r}_{(i,t_{n+1})} = 2\vec{r}_{(i,t_n)} - \vec{r}_{(i,t_{n-1})} + \vec{a}_{(i,t_n)}(\Delta t)^2 \quad (12)$$

$$\vec{v}_{(i,t_n)} = \frac{\vec{r}_{(i,t_{n+1})} - \vec{r}_{(i,t_{n-1})}}{2\Delta t} \quad (13)$$

Donde la ecuación (13) para la velocidad es una expresión de diferencias finitas y se obtuvo mediante el promedio entre  $v_{(i,t_n+\Delta t/2)}$  y  $v_{(i,t_n-\Delta t/2)}$ . Obsérvese que las ecuaciones (12) y (13) solo dependen de las coordenadas anteriores y no de las velocidades. Luego, solo es necesario usar la ecuación (12) para encontrar la trayectoria de la partícula.

En cuanto a las condiciones iniciales y a los parámetros necesarios para usar las soluciones numéricas, deben conocerse las posiciones iniciales, las cuales pueden ser obtenidas por métodos experimentales como la cristalografía de rayos-X (más común en proteínas) o computacionalmente realizando un autoensamblaje y minimizando la energía del ensamblaje. Las velocidades iniciales no se necesitan en el algoritmo de Verlet pero si se usan los otros algoritmos y los datos no se obtienen experimentalmente, en paquetes como GROMACS [17], se generan valores de velocidad aleatorios a partir de la distribución Maxwell-Boltzmann para la energía cinética a una temperatura  $T$ .

## 2.4. Trabajo Preliminar

### 2.4.1. Studying the role of staphyloxanthin in modulating membrane structural parameters in DMPG and DPPG lipid bilayers [1]

Para estudiar el rol de la estafloxantina en bicapas lipídicas compuestas por DMPG (dimiristoil fosfatidilglicerol) y DPPG (dipalmitoil fosfatidilglicerol) Melendez realiza simulaciones por dinámica molecular, esto es, resuelve numéricamente las ecuaciones de movimiento de Newton para 4 sistemas con las siguientes composiciones: DMPG, DMPG+estafloxantina, DPPG, DPPG+estafloxantina. De los resultados obtenidos de las dinámicas moleculares obtiene parámetros que dan cuenta del rol de la estafloxantina como son el parámetro de orden del Deuterio  $S_{CD}$  relacionado con el ángulo, el espesor de la membrana, el coeficiente lateral de difusión y el área por lípido.

El procedimiento utilizado para hacer la dinámica molecular es el siguiente. Primero prepara/ensambla cada uno de los 4 sistemas mediante la herramienta de ensamblaje de CHARMM-GUI. Sin embargo, los sistemas que tienen estafloxantina no pueden ensamblarse inmediatamente en CHARMM-GUI debido a que los parámetros de la estafloxantina no se encuentran reportados en la literatura, entonces los parámetros de la estafloxantina los encuentra previamente con CHARMM-GUI introduciendo el archivo SMILE de estafloxantina, generando los parámetros iniciales que no necesariamente son los correctos. Posteriormente, minimiza la energía en cada uno de los sistemas con el fin de obtener estructuras que sean lo suficientemente estables y que no presenten transiciones en la energía potencial cuando se realice la dinámica molecular, esto lo hace con el programa GROMACS. Una vez preparado cada sistema procede a realizar la dinámica molecular fijando condiciones NPT, una de estas condiciones es que la temperatura del sistema sea constante a  $T = 323\text{K}$ .

De el procedimiento seguido encuentra que los parámetros escogidos para la estafloxantina no son los más adecuados, debido a la inusual estructura del acid NEUROSPORI por lo cual explora otras opciones para generar los parámetros adecuados. Como estrategia, se utilizan los parámetros de torsión de grupos benzeno, que también presentan insaturaciones conjugadas, para corregir los parámetros del diaponeurosporenoica. Una vez cambiados los parámetros de la estafloxantina y corrido de nuevo la

dinámica molecular analiza la orientación de este compuesto en la bicapa fosfolipídica mediante el ángulo de inclinación respecto a la normal. Al analizar este parámetro encuentra que la estafloxantina está mayoritariamente alrededor de los  $100^\circ$  para el sistema DMPG+estafloxantina. Para el sistema DPPG+estafloxantina encuentra dos ángulos preferenciales, uno más probable alrededor de  $100^\circ$  y otro un poco menos probable, alrededor de  $135^\circ$ . Los ángulos menores a  $120^\circ$  representan una orientación horizontal de la estafloxantina y los mayores a  $120^\circ$  una orientación vertical respecto al plano normal de la membrana.

El uso de los parámetros de torsión de benzeno corrige la parte de la cadena NEUROSPENICA generando una estructura plana, esperada debido a la presencia de los enlaces dobles conjugados. Sin embargo, los parámetros relacionados a los carbonos próximos al grupo ester no quedan bien representados, debido a la presencia del grupo carboxilo que induciría una redistribución de la densidad electrónica. Es necesario corregir los parámetros tomando esto en cuenta.

### 3. Objetivo Principal

Optimizar los parámetros de los ángulos dihedro de la cadena diaponeurosporenoica de estafloxantina y estudiar las propiedades biofísicas de esta molécula por dinámica molecular en membranas modelo de *Staphylococcus aureus* compuestas por DMPG o DPPG utilizando los campos de fuerza CHARMM y AMBER.

### 4. Objetivos Específicos

1. Reproducir la simulaciones por dinámica molecular de estafloxantina en DMPG y DPPG realizadas por [1], con base en los parámetros no optimizados de la cadena diaponeurosporenoica.
2. Optimizar los parámetros relacionados con los ángulos dihedros de la cadena diaponeurosporenoica próximos al enlace ester y realizar simulaciones por dinámica molecular usando la herramienta CHARMM-GUI para estudiar los potenciales energéticos de los enlaces dihedros, su conformación y orientación de la molécula en membranas de DMPG y DPPG.
3. Optimizar los parámetros relacionados con los ángulos dihedros de la estafloxantina para la herramienta AMBER y realizar simulaciones por dinámica molecular con el fin de demostrar que el comportamiento de la molécula no depende del tipo de potencial utilizado.
4. De las simulaciones de stafloxantina en membranas DMPG y DPPG, obtener los parámetros biofísicos: área por lípido, ángulo de orientación de la estafloxantina, parámetro de orden del deuterio, coeficiente de difusión y espesor de la membrana.

5. Comparar los parámetros biofísicos obtenidos con las herramientas CHARMM-GUI y AMBER con el fin de demostrar que los resultados biofísicos son independientes del tipo de potencial usado y estudiar el papel biofísico que cumple la stafloxantina en la membrana.
6. Realizar simulaciones por dinámica molecular en CHARMM y AMBER para una concentración de stafloxantina del 15 % y visualizar el efecto global de la stafloxantina en las membranas modelo.

## 5. Metodología

Los pasos realizados se harán con el computador y el acceso al clúster proporcionados por el Departamento de Física de la Universidad de los Andes.

1. **Reproducir la simulaciones por dinámica molecular de stafloxantina en DMPG y DPPG realizadas por [1], con base en los parámetros no optimizados de la cadena diaponeurosporenoica.**

### Ensamblajes

Realizar los ensamblajes para las bicapas lipídicas DMPG y DPPG mediante la herramienta de ensamblaje de CHARMM-GUI insertando 64 lípidos por monocapa y sometidos a condiciones de frontera periódicas en una caja ortorrómbica y condiciones termodinámicas NPT. El barostato utilizado para las condiciones NPT es el de Parinello-Rahman y el termostato usado es el de Nose-Hoover a una temperatura de  $T = 323\text{K}$ <sup>3</sup>. Adicionalmente, a cada sistema se le agregan 45 H<sub>2</sub>O por lípido, un ion de Na por lípido y 0.15M de NaCl.

También se realiza un ensamblaje para las bicapas lipídicas DMPG y DPPG tal como el descrito anteriormente e insertando posteriormente una stafloxantina. Para insertar la stafloxantina debe introducirse un archivo con formato SMILES tomado de [18] en la herramienta de lector de ligando de CHARMM-GUI; este archivo se convierte a un Marvin sketch y se revisa la estereoquímica del archivo obtenido; luego se utiliza el algoritmo de CHARM-GUI para obtener los parámetros y la topología (estructura tridimensional) de la stafloxantina. Una vez obtenidos los archivos se cambian los parámetros por los parámetros de anillos aromáticos.

### Minimización de la Energía

Cada uno de los sistemas ensamblados se insertan en CHARMM-GUI usando  $n = 5000$  pasos hasta que alcance una fuerza de  $F = 1,000\text{N}$ . La idea de esta simulación es llevar el sistema al equilibrio usando el método del gradiente decreciente.

### Equilibración

---

<sup>3</sup>Esta es una temperatura mayor a la temperatura de transición de sólido ordenado a líquido desordenado

Se realizan varias equilibraciones con el fin de que el sistema no colapse durante la simulación principal y de que no hayan solapamientos de las nubes electrónicas de los átomos de cada sistema.

Las coordenadas utilizadas para equilibrar el sistema son las obtenidas al minimizar la energía. Con estas coordenadas se corren 6 simulaciones sucesivas de 25ps cada una con un paso de tiempo de 1fs, valor que es más de 10 veces menor a la frecuencia de vibración del agua. Durante cada una de las equilibraciones deben ponerse restricciones de posición y de los ángulos dihedros con el fin de que el sistema no presente movimientos alrededor del centro de masa ni rotaciones de cuerpo rígido.

### **Simulación**

Se da un tiempo total de  $t = 2000\text{ns}$  con un paso de tiempo  $\Delta t = 50\text{ns}$  el cual es más largo que el de la equilibración puesto que se quiere ver como evoluciona el sistema en un tiempo total más largo y si dejamos  $1\text{fs}$  la simulación duraría un tiempo mucho mayor; al dejar este tiempo se desprejará el movimiento de las vibraciones de las moléculas de agua. Se espera que en este caso la simulación dure 10 días.

- 2. Optimizar los parámetros relacionados con los ángulos dihedros de la cadena diaponeurosporenoica próximos al enlace éster y realizar simulaciones por dinámica molecular usando la herramienta CHARMM-GUI para estudiar los potenciales energéticos de los enlaces dihedros, su conformación y orientación de la molécula en membranas de DMPG y DPPG.**

Buscar y aplicar un método computacional mecánico cuántico que permita describir la forma del potencial junto con sus parámetros, del enlace éster situado antes de la cadena diaponeurosporenoica (la cual tiene electrones deslocalizados). Por ejemplo, usando la herramienta Gaussian-09 [19] se ha encontrado la energía potencial como función de los ángulos dihedros de la cadena poliénica de otro caroteno, aumentando el ángulo desde  $-180$  hasta  $180^\circ$  en pasos de  $18^\circ$  y usando el nivel B3LYP/6-31G(d). Igualmente se seguirá buscando en la bibliografía métodos aplicados a moléculas similares con enlaces tipo éster cuyos electrones estén deslocalizados. Luego, acoplar los parámetros encontrados de la energía potencial en la herramienta de dinámica molecular CHARMM para realizar simulaciones de los sistemas con estafloxantina.

- 3. Optimizar los parámetros relacionados con los ángulos dihedros de la estafloxantina para la herramienta AMBER y realizar simulaciones por dinámica molecular con el fin de demostrar que el comportamiento de la molécula no depende del tipo de potencial utilizado.**

Se realizan los cálculos mecánico cuánticos con el método computacional seleccionado en el paso 1 y posteriormente se realiza una simulación de dinámica molecular clásica usando el campo de fuerza de AMBER. Para esto se ensambla el sistema, se equilibra y se realiza la simulación. De la simulación se corta la equilibración

del sistema y mediante el software de GROMACS de la misma forma expuesta en el paso 4 para la simulación con CHARMM-GUI.

**4. De las simulaciones de estafloxantina en membranas DMPG y DPPG, obtener los parámetros biofísicos: área por lípido, ángulo de orientación de la estafloxantina, parámetro de orden del deuterio, coeficiente de difusión y espesor de la membrana.**

En cada una de las cuatro trayectorias obtenidas se corta el tiempo de equilibración del sistema con trajconv de la herramienta GROMACS y posteriormente se halla el área por lípido con el comando que permita hallar las dimensiones de la membrana, si queda una parte de la equilibración se recorta de nuevo. Una vez obtenidas las dimensiones como función del tiempo, se halla el área por lípido mediante la fórmula:

$$APL = \frac{xy}{N/2} \quad (14)$$

Finalmente se saca un promedio temporal del área por lípido.

También se halla el área local por lípido sin la estafloxantina usando un algoritmo de teselación de Vornoy. Este algoritmo hace una particiona la membrana en subareas de tal forma que en cada área aparezca un solo lípido y que si  $p_k$  y  $p_l$  son las posiciones de dos lípidos, un punto  $p$  está en la subarea de  $p_k$  si la distancia entre del punto a  $p_k$  es menor o igual a la distancia del punto a  $p_l$ .

El ángulo de orientación de la estafloxantina se halla con el producto interno entre un vector normal a la bicapa lipídica y otro vector que va desde el primer carbono de al cadena diaponeurosporenoica hasta el último doble enlace de dicha cadena.

El parámetro de orden del deuterio se halla mediante un comando en GROMACS, donde dentro de las opciones se colocan los grupos a los cuales se le quiere hallar el parámetro, en este caso la estafloxantina.

El coeficiente de difusión se halla mediante un comando de GROMACS que permite hallar el desplazamiento cuadrático medio sobre los átomos como función del tiempo, se hace una regresión lineal y se identifica el coeficiente de difusión  $D$  mediante la relación de Einstein:

$$\langle \Delta x^2 \rangle = 4Dt \quad (15)$$

El espesor de la membrana halla mediante un comando de GROMACS que permite hallar la densidad electrónica como función de la coordenada normal al plano de la membrana, para esto se le indica en las opciones del comando que calcule la densidad usando los lípidos. De la densidad electrónica se hallan los dos máximos relativos que correspondan a los grupos fosfato y se calcula su distancia, esta distancia es el espesor.

**5. Comparar los parámetros biofísicos obtenidos con las herramientas CHARMM-GUI y AMBER con el fin de demostrar que los resultados biofísicos son independientes del tipo de potencial usado y estudiar**

## el papel biofísico que cumple la stafloxacina en la membrana.

Se realizan los cálculos mecánico cuánticos con el método computacional seleccionado en el paso 1 y posteriormente se realiza una simulación híbrida por dinámica molecular usando el campo de fuerza de AMBER. Con los resultados de la dinámica molecular se hallan los parámetros biofísicos usando GROMACS, tal como se describe en el ítem 4. Posteriormente se analiza la diferencia entre los valores obtenidos en las dos simulaciones y se discute si estos valores coinciden o no dentro de sus márgenes de error. Se indaga en el procedimiento realizado en cada simulación para explicar las diferencias o similitudes encontradas.

### 6. Realizar simulaciones por dinámica molecular en CHARMM y AMBER para una concentración de stafloxacina del 15% y visualizar el efecto global de la stafloxacina en las membranas modelo.

En mediciones experimentales se ha observado que las propiedades biofísicas, como la constante de doblamiento de la membrana, son sensibles a concentraciones de stafloxacina en el orden de 15% molar. Por lo tanto queremos explorar que efecto tiene incluir un número de moléculas de stafloxacina que refleje esta concentración. Para realizar esto, se realiza el ensamblaje de cada una de membranas modelo con DPPG y DMPG con 64 lípidos por monocapa y se reemplaza el 15% molar de estos lípidos por stafloxacina, se solvata el sistema como se describe en el paso 1 teniendo en cuenta que la carga neta del sistema debe ser cero. Posteriormente se minimiza y se equilibra el sistema para encontrar el estado inicial del sistema bajo el cual se realizará la simulación. Con el sistema equilibrado se realiza una simulación la cual con un paso de tiempo de 50ns y un tiempo total de 2000ns, se espera que el sistema tenga una duración similar de 10 días.

## 6. Cronograma

Tareas \ Semanas	2	4	6	8	10	12	14	16
1	X	X	X	X				
2					X	X	X	
3								X
4								

## 7. Personas Conocedoras del Tema

- Gian Pietro Miscione (Universidad de los Andes)  
gp.miscione57@uniandes.edu.co  
<http://cobo.uniandes.edu.co/>

Tareas \ Semanas	18	20	22	24	26	28	30	32
1						X	X	X
2						X	X	X
3	X	X				X	X	X
4			X	X	X	X	X	X

- Gilles Paul Pieffet (Universidad Antonio Nariño)  
—
- Antonio Manu Forero Shelton (Universidad de los Andes)  
anforero@uniandes.edu.co

## Referencias

- [1] J. A. Meléndez Delgado, *Studying the role of staphyloxanthin in modulating membrane structural parameters in DMPG and DPPG lipid bilayers*. PhD thesis, Universidad de los Andes, 2018.
- [2] S. D. Kobayashi, N. Malachowa, and F. R. Deleo, *Pathogenesis of Staphylococcus aureus abscesses*, vol. 185. Elsevier Inc., 2015.
- [3] S. Harpavat and S. Nissim, *Lippincott’s Microcards: Microbiology Flash Cards*. Lippincott Williams & Wilkins, 3 ed., 2012.
- [4] S. Meylan, I. W. Andrews, and J. J. Collins, “Targeting Antibiotic Tolerance, Pathogen by Pathogen,” *Cell*, vol. 172, no. 6, pp. 1228–1238, 2018.
- [5] W. Orent, “A Brief History of Staph — Proto Magazine,” 2006.
- [6] M. I. Perez-Lopez, R. Mendez-Reina, S. Trier, C. Herrfurth, I. Feussner, A. Bernal, M. Forero-Shelton, and C. Leidy, “Variations in carotenoid content and acyl chain composition in exponential, stationary and biofilm states of *Staphylococcus aureus*, and their influence on membrane biophysical properties,”
- [7] N. N. Mishra, G. Y. Liu, M. R. Yeaman, C. C. Nast, R. A. Proctor, J. Mckinnell, and A. S. Bayer, “Carotenoid-Related Alteration of Cell Membrane Fluidity Impacts *Staphylococcus aureus* Susceptibility to Host Defense Peptides,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 2, pp. 526–531, 2011.
- [8] L. Hernández-Villa<sup>1</sup>, M. Manrique-Moreno<sup>1</sup>, C. Leidy, M. Jemioła-Rzemińska, C. Ortíz, and K. Strzałka, “Biophysical evaluation of cardiolipin content as a regulator of the membrane lytic effect of antimicrobial peptides,”
- [9] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. Freeman, W. H. & Company, 4 ed., 8 2011.

- [10] C. Sohlenkamp and O. Geiger, “Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways,” 9 2015.
- [11] CHEMDRUG, “DMPG ,Dimyristoylphosphatidylglycerol.”
- [12] T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*. Copenhagen: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 2007.
- [13] “KEGG COMPOUND: C16148.”
- [14] H. Goldstein, C. P. Poole, and J. Safko, *Classical Mechanics*, vol. 1. Adison Wesley, Pearson, 3 ed., 2001.
- [15] A. Kukol, *Molecular modeling of proteins: Second edition*, vol. 1215. 2014.
- [16] A. K. Mazur, “Common Molecular Dynamics Algorithms Revisited,” *J. Comput. Phys.*, vol. 2, no. physics/9707008, p. 136, 1997.
- [17] M. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, and B. Hess, “GROMACS User Manual version 2019.”
- [18] National Center for Biotechnology Information, “PubChem Database. CID 24892781, CID=24892781.”
- [19] J. Cerezo, J. Zúñiga, A. Bastida, A. Requena, J. P. Cerón-Carrasco, and L. A. Eriksson, “Antioxidant properties of  $\beta$ -carotene isomers and their role in photosystems: Insights from Ab initio simulations,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 116, no. 13, pp. 3498–3506, 2012.

**Firma del Director**