

INTERACCIÓN DE MOLÉCULAS FARMACOLÓGICAMENTE RELEVANTES CON MEMBRANAS LIPÍDICAS. ESTUDIOS DE DINÁMICA MOLECULAR

Dr. Ramón Garduño Juárez

Reporte de resultados

1.- Resumen

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar la acción de péptidos antimicrobianos sobre membranas modelo para que puedan ser empleados como futuros antibióticos, también estamos analizando el funcionamiento de canales iónicos y como esos se ven afectados por toxinas de origen animal. Para realizar estos estudios empleamos herramientas de simulación molecular como la dinámica molecular (DM). En lo que a los péptidos antimicrobianos (PAMs) concierne, estudiamos principalmente a dos candidatos: la Pandinina2 (Pin2) y Pandinina2GVG (Pin2GVG) y su interacción con membranas modelo. En la parte de los canales iónicos, estudiamos la interacción de la β -toxina CssIV con canal de sodio humano dependiente de voltaje ($hNa_v1.2$).

2.- Avances realizados

-Péptidos Antimicrobianos en Modelos de Bicapa Lipídica

En este estudio se emplearon las estructuras moleculares determinadas por resonancia magnética nuclear (RMN) de los PAMs Pin2 y Pin2GVG. El primero se encuentra presente en el veneno del escorpión africano *Pandinus imperator* y el segundo es un análogo donde se substituyó la P14 por el motivo GVG. Asimismo, se usaron dos modelos de membranas biológicas para los cuales ya existen parches equilibrados que reproducen los parámetros estructurales experimentales, tales como el área por lípido y el orden de las colas hidrofóbicas. Uno de los modelos está formado por una bicapa de POPC (1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) y el otro por una bicapa de POPG (1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol); con la primera se simuló una membrana eucariota y con la segunda a una membrana bacteriana.

Se realizaron doce simulaciones de DM con una duración de 1000 ns cada una, i.e. tres replicas para cada uno de los complejos moleculares Pin2:POPC, Pin2:POPG, Pin2GVG:POPC y Pin2GVG:POPG. Se determinaron los cambios conformacionales que ocurren en los PAMs Pin2 y Pin2GVG, y en las superficies de interface con las bicapas POPC y POPG. Para estos complejos se obtuvieron las trayectorias generadas por el programa de dinámica molecular conocido como GROMACS, y empleando las herramientas analíticas asociadas a éste se obtuvieron datos estructurales y energéticos involucrados en la formación de estos complejos. Estos datos permitieron hacer una hipótesis acerca de los mecanismos moleculares básicos previos a la lisis de membranas biológicas que realizan los péptidos Pin2 y Pin2GVG.

Las simulaciones de DM de 1000 ns indicaron la existencia de un mecanismo de interacción diferenciada de estos PAMs con los modelos de membrana. Se observó que cuando Pin2 y

Pin2GVG se encuentran sobre la superficie de una bicapa de POPC éstos adoptan una estructura seudo helicoidal, en tanto que cuando se encuentran sobre la superficie de una bicapa de POPG éstos adoptan una estructura desplegada que les permite interactuar más fuertemente con esta bicapa. Esta diferencia estructural permite la formación de diferentes contactos entre los aminoácidos aromáticos y polares de estos PAMs con la superficie de las bicapas.

Los resultados de esta parte del proyecto se presentaron en el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica en 2016 y han sido objeto de un artículo de investigación científica enviado recientemente a la revista *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* para su publicación; actualmente nos encontramos realizando más simulaciones para cumplir con las sugerencias de los revisores.

-Interacción entre canales iónicos y toxinas peptídicas

En esta parte del proyecto propusimos analizar mediante DM la interacción del canal hNa_v1.2 con la β toxina CssIV presente en el veneno del alacrán *C. suffussus suffussus*. El modelado de esta interacción realizado por acoplamiento molecular demostró que la toxina se acopla en los lazos extracelulares DIIS1-S2, DIIS3-S4 y DIISS2-S6 del canal hNa_v1.2. La principal región hidrofóbica de CssIV, que involucra hojas β , está orientada hacia el lazo DIIS1-S2 del canal, mientras que la región hidrofóbica secundaria interacciona con el lazo DIIS3-S4. Por otro lado, la región negativa de CssIV se encuentra cerca de los residuos positivos del sensor de voltaje DIIS4.

Las estructuras obtenidas del acoplamiento molecular fueron validadas mediante DM, manifestando una estabilidad de las interacciones toxina-canal a lo largo de 100 ns de simulación. Adicionalmente se crearon dos versiones mutantes del canal, P782N y G845N, las cuales fueron reportadas experimentalmente importantes para la unión de CssIV al Na_v1.2. Los resultados obtenidos mediante DM fueron consistentes con los datos experimentales, ambas mutantes presentaron diferencias importantes con respecto a la versión silvestre. La estructura CssIV-Nav1.2wt no presentó cambios notables durante la trayectoria, ésta se mantuvo con un RMDS máximo de 0.6 nm, a diferencia de las mutantes que presentaron fluctuaciones importantes durante la trayectoria. El análisis de las versiones mutantes demostró que la unión de la toxina con el canal es menos estable, la posición de CssIV respecto al canal cambia y se pierden interacciones importantes a lo largo del tiempo. El número de interacciones hidrofóbicas toxina-canal disminuye y esto genera un distanciamiento entre el receptor y el ligando. Se observó que la estructura silvestre conserva distancias menores a 0.8 nm, mientras que las estructuras mutantes presentan distancias mayores a 1 nm. Adicionalmente, el residuo Glu15 de CssIV (el cual es esencial para “atrappar” al sensor de voltaje) se localizó muy lejos de los residuos positivos del canal, lo que podría representar la pérdida de la actividad de CssIV. Hasta este momento podemos concluir que nuestros resultados son consistentes con los reportados experimentalmente, CssIV interacciona principalmente con los lazos extracelulares del DII del canal a través de sus regiones hidrofóbicas, además de un par de residuos positivos que interaccionan con el DIII.

Éstos resultados fueron presentados en el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica en 2016 y actualmente son material para la escritura de un artículo de investigación.

3.- Software utilizado

Para el desarrollo de nuestro proyecto empleamos el paquete GROMACS versiones 4.6.7 y 5.0.4 (en CPUs y en GPUs), adicionalmente hicimos uso de las librerías OpenMP y MPI.

4.- Lista de colaboradores

1.- José Luis Velasco Bolom, estudiante de doctorado del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

2.- Norberto Sánchez Cruz, estudiante de doctorado del Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.

3.- Dra. Ana Estela Pérez Mejía, posdoctorado asociado al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

5.- Alumnos graduados

- Dirección de la tesis de doctorado del M. en C. José Luis Velasco Bolóm, estudiante del Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y asociado al ICF.

- Formación y dirección de tesis del alumno de Maestría: Norberto Sánchez Cruz, estudiante de la Maestría en Ciencias Químicas de la UNAM y asociado al ICF.

- Supervisión de la investigadora posdoctoral Dra. Ana Estela Perez Mejia, con beca posdoctoral del CONACyT en Apoyo al Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

6.- Participación en congresos nacionales

Participación en el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica llevado a cabo en la Ciudad de Aguascalientes, Aguascalientes, México, del 6 al 11 de noviembre de 2016. En este congreso se presentaron los siguientes trabajos:

-Pore-forming mechanism of the antimicrobial peptide Pandinin-2. En versión Cartel y Oral

-Molecular dynamics studies of CssIV scorpion β-toxin binding to the voltage gated Nav 1.2. En versión Cartel



Dr. Ramón Garduño Juárez <ramon@icf.unam.mx>

Journal of Biomolecular Structure & Dynamics - Decision on Manuscript ID TBSD-2016-0572

Journal of Biomolecular Structure & Dynamics
<onbehalfof+rhs07+albany.edu@manuscriptcentral.com>
Responder a: rhs07@albany.edu
Para: ramon@icf.unam.mx

18 de octubre de
2016, 5:31

18-Oct-2016

Dear Professor Garduño-Juárez:

Your manuscript entitled "MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF ANTIMICROBIAL SCORPION-DERIVED PEPTIDES INTERACTING WITH BILAYER MEMBRANE SURFACES", which you submitted to Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, has been reviewed. The referee comments are included at the bottom of this letter.

The reviews are in general favourable and suggest that, subject to minor revisions, your paper could be suitable for publication. Please consider these suggestions, and I look forward to receiving your revision.

When you revise your manuscript please highlight the changes you make in the manuscript by using **yellow highlight**.

Please provide a reply to the referee comments; summarizing the changes you have made within the body of the manuscript in response to the referee comments, and any other response that you want the editor and the referees to note. You should submit it as a separate document along with manuscript files "Response to Decision Letter and Reviewer Comments". **Upload this as the first document.** You indicate in the space provided in the response box that a separate document has been uploaded.

The changes should be presented IN the revised paper, explaining the changes in the response document does not help the reader. The only manuscript that you upload should be the revised one with changes highlighted in yellow. Any other versions of the manuscript should not be uploaded.

To start the revision, please click on the link below:

https://mc.manuscriptcentral.com/jbsd?URL_MASK=3432fba229eb451cb135de6c64ac8601

This will direct you to the first page of your revised manuscript. Please enter your responses to the comments made by the referee(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you made to the original manuscript. Please be as specific as possible in your response to the referee(s).

This link will remain active until you have submitted your revised manuscript. If you begin a revision and intend to finish it at a later time, please note that your draft will appear in the "Revised Manuscripts in Draft" queue in your Author Center.

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, your revised manuscript should be uploaded by 17-Nov-2016. If it is not possible for you to submit your revision by this date, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to Journal of Biomolecular Structure & Dynamics and I look

forward to receiving your revision.

Sincerely,
Professor Sarma
Editor in Chief, Journal of Biomolecular Structure & Dynamics
rhs07@albany.edu

Referee(s)' Comments to Author:

Referee: 1

Comments to the Author

I think the time simulation may be longer.

I think the authors may have calculated the willingness of some atoms, such as, the carbon, nitrogen and phosphorus atoms of the POPC and POPG membranes, and the atoms of the peptides and the water molecules studing their density perpendicularly to the plane of the bilayers along the simulation box Z (Dz), expressing it in a 2-D graphic that best quantify the insertion of the peptides and water molecules in the membranes.

Referee: 2

Comments to the Author

This study by Garduno-Juarez et al. investigates the underlying molecular mechanism by which an antimicrobial scorpion peptide interacts with the membrane surface. This is based upon molecular dynamics and simulations of two peptides, pandinin1 and its analog pandinin 2, with model membranes. This study could be of interest to the comprehension of the mode of action of these peptides. However, there are issues that require modification to the manuscript.

General issues:

- .- Binding to membranes depends on various factors but ultimately a peptide's initial approach to the membrane may influence the bound structure. The authors base their analysis on three MD simulations, but it might be necessary to make other replicas but with different peptide orientations and distances to the membrane.
- .- The 150-ns simulations are rather short. PC lacks strong electrostatic driving force to promote binding of the peptide. It is possible that some more time might eventually results in stable insertion of the peptides in the membrane. This peptide has a patch of hydrophobic residues that will want to get into the membrane.
- .- The results and discussion section is too descriptive and should be shortened and made to the point.

Specific comments:

- .- Page 5, section 2, subsection 2.1. Do you think that the N- and C-terminus are really charged ?. Is there any experimental evidence for this ?. Please, show.
- .- Page 7, section 2, subsection 2.3. A distance of about 1.5 nm has been used to locate the peptide respect to the membrane. Would not it be better to increase it to about 2.5-3 to check a real binding ?.
- .- Figures 3 and 4 could be joined together.
- .- Figure 9. This figure could be deleted.
- .- Figures S1-S8. Please, be concise, reduce the text of the legends. The reader should refer to the Results and Discussion section.

- .- Figure S2. Would not it be better to show percentage of secondary structure over time ?. It is difficult to follow the data.
- .- Figures S3-S6. Images at t=0 and t=150 should be represented. It is observed that the starting peptide locations and dispositions are different for each of the systems (minimization should be done, at least partially, with the peptide structure fixed). How you can compare them ...
- . Figure S7 and S8. These figures could be deleted.

Referee: 3

Comments to the Author

1. The title of the work seems confusing..... rearrange and write in a better way.
2. Abstract "Multiple simulations were run from different initial random velocity distributions which lead to the same observations. The results provide detailed information of the relative positioning of the AMPs with respect of the membrane surface, of the early stages of AMPs binding and insertion, and perturbation of the bilayer surface".....write in better way.
3. pg-4,line:41-42 TFE.....???
4. pg-6,line:10-11 c.a.....???
5. pg-7,Table-1 " PLATINUM".....???
6. pg-7, line 43 "Similar approaches have been taken by other authors".....???
7. pg-8, line :12-20 "All simulations were performed using the GROMACS 4.5.3 package. The Pin2 and Pin2GVG peptides were represented using G96 53A6 force field. The POPC and POPG membrane patches were prepared for the G96 53A6 FF using the Berger force field parameters".....repetition from pg-4 in computational methodology part.....Avoid repetition and write properly.
8. pg-8,line:27 with a force constant of 1000 kJ mol-1nm-2.... justification is needed for this high value.
9. pg-8,line:39 "Parrinello-Rahman pressure coupling".....put reference
10. pg-8,line:53 " Particle Mesh-Ewald method".....reference

Results and discussion:

11. Few repetitions are there in result section.....Take care
12. This section can be presented in a better way through extensive editing of the results. The discussion on the results is not upto the mark so, it can be written in a better way.
13. Pg-11, line:13 "W2 F19"....???
14. pg-15,line:3 and 10-11 " (see Figure 4)" remove see. "As seen from Figure 4a".....write properly.
15. pg-29,line:6-15 put in the introduction and discuss it in the result section. line:29 "unordered".....replace by any other word. line:41-46....write properly
16. pg:29-30, "Moreover, the hydrophobic tails not undergo significant..... so that we can be able to see the whole insertion process.".....remove this part from conclusion. Some part of it may be included in the introduction. Conclusion part should be more compact so rewrite it.
As the structure was solved with water, so write at least one paragraph on the role of water molecules in the stabilization of PIN2 etc. in lipid bilayer.
pg-10,line:34-42 " In this conformation the non-polar residues L12, P14, L16, as well as the aromatic F20, are pointing to the lipid bilayer while the charged residues K7, K11 are exposed to the water and K22 and K23 are anchored to the bilayer surface by electrostatic interactions".....what are the interaction pattern of water molecules with K7 and K11.

The work is good and it can be recommended for acceptance after major revision specially the results and discussion and conclusion section.

Editor's Comments to Author:



Dr. Ramón Garduño Juárez <ramon@icf.unam.mx>

Journal of Biomolecular Structure & Dynamics - Decision on Manuscript ID TBSD-2016-0572.R1

Journal of Biomolecular Structure & Dynamics
<onbehalfof+rhs07+albany.edu@manuscriptcentral.com>
Responder a: rhs07@albany.edu
Para: ramon@icf.unam.mx

18 de noviembre de
2016, 13:07

18-Nov-2016

Dear Professor Garduño-Juárez:

Your manuscript entitled "MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF THE MEMBRANE BINDING AND DISRUPTION MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL SCORPION VENOM-DERIVED PEPTIDES" which you submitted to Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, has been reviewed. The referee comments are included at the bottom of this letter.

I know the referees of your paper, and they will insist that you complete the longer simulation required by two referees, reanalysis and resubmission. I will not be in a position to overrule them. In order to save some time, I am now executing "reject and resubmit" so that you get enough time to complete the longer simulation. If you need more time, just ask me for it. When you resubmit the revised version, please include all your response to the referee comments as you have done now.

Please note that resubmitting your manuscript does not guarantee eventual acceptance, and that your resubmission will be subject to re-review before a decision is rendered.

If you are resubmitting, Please provide a reply to the referee comments; summarizing the changes you have made within the body of the manuscript in response to the referee comments, and any other response that you want the editor and the referees to note. You should submit it as a separate document along with manuscript files "Response to Decision Letter and Reviewer Comments". **Upload this as the first document.** You indicate in the space provided in the response box that a separate document has been uploaded.

The changes should be presented IN the revised paper, explaining the changes in the response document does not help the reader. The only manuscript that you upload should be the revised one with changes highlighted in yellow. Any other versions of the manuscript should not be uploaded.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of your manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer.

To start your resubmission, please click on the link below:

https://mc.manuscriptcentral.com/jbsd?URL_MASK=d89774904b36433ea87c84aaf75177f8

This link will remain active until you have resubmitted your manuscript. If you begin a resubmission and intend to finish it at a later time, please note that your draft will appear in the "Resubmitted Manuscripts in Draft" queue in your Author Center.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, your revised manuscript should be uploaded by 17-May-2017. If it is not possible for you to resubmit your manuscript by this date, we will consider your paper as a new submission.

I look forward to a resubmission.

Sincerely,
Professor Sarma
Editor in Chief, Journal of Biomolecular Structure & Dynamics
rhs07@albany.edu

Referee(s)' Comments to Author:

Editor's Comments to Author:



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

AVE. CIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.
APARTADO POSTAL 70-606, CIUDAD UNIVERSITARIA
TEL. Y FAX. (55)5622-5742
<http://www.smb.org.mx>
Correo Electrónico: smbq@ifc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2015 - 2017

PRESIDENTE
DR. MIGUEL LARA FLORES

VICE-PRESIDENTE
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

SECRETARIA TESORERA
DRA. ELEDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

SUB-SECRETARIO TESORERO
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)
Dr. Joaquín Cravioto (†)
Dr. Carlos del Río Estrada (†)
Dr. Silvestre Frenk Freund
Dr. Mario García Hernández (†)
Dr. Jesús Guzmán García (†)
Dr. Jesús Kumate Rodríguez
Dr. José Laguna García (†)
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta
Dr. Efraín G. Pardo Codina
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Ana Estela Pérez Mejía

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Molecular dynamics studies of CssIV scorpion β -toxin
binding to the voltage gated Nav1.2.**

Por:

Ana Estela Pérez Mejía, José Luis Velasco Bolom,
Ramón Garduño Juárez

En la modalidad de cartel durante el XXXI Congreso Nacional de
Bioquímica del 6 al 11 de noviembre de 2016 en Aguascalientes, Ags.

Atentamente
Por el Comité Organizador

**Dr. Miguel Lara Flores
Presidente**



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

AVE. CIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.
APARTADO POSTAL 70-606, CIUDAD UNIVERSITARIA
TEL. Y FAX. (55)5622-5742
<http://www.smb.org.mx>
Correo Electrónico: smbq@ifc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2015 - 2017

PRESIDENTE
DR. MIGUEL LARA FLORES

VICE-PRESIDENTE
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

SECRETARIA TESORERA
DRA. ELEDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

SUB-SECRETARIO TESORERO
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)
Dr. Joaquín Cravioto (†)
Dr. Carlos del Río Estrada (†)
Dr. Silvestre Frenk Freund
Dr. Mario García Hernández (†)
Dr. Jesús Guzmán García (†)
Dr. Jesús Kumate Rodríguez
Dr. José Laguna García (†)
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta
Dr. Efraín G. Pardo Codina
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Ramón Garduño Juárez

Quien asistió y presentó el trabajo:

Pore-forming mechanism of the antimicrobial peptide Pandinin-2

Por:

Ramón Garduño Juárez, José Luis Velasco Bolom

En la modalidad de presentación oral durante el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica del 6 al 11 de noviembre de 2016 en Aguascalientes, Ags.

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. Miguel Lara Flores
Presidente



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

AVE. CIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.
APARTADO POSTAL 70-606, CIUDAD UNIVERSITARIA
TEL. Y FAX: (55)5622-5742
<http://www.smb.org.mx>
Correo Electrónico: smbq@ifc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2015 - 2017

PRESIDENTE
DR. MIGUEL LARA FLORES

VICE-PRESIDENTE
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

SECRETARIA TESORERA
DRA. ELEDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

SUB-SECRETARIO TESORERO
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)
Dr. Joaquín Cravioto (†)
Dr. Carlos del Río Estrada (†)
Dr. Silvestre Frenk Freund
Dr. Mario García Hernández (†)
Dr. Jesús Guzmán García (†)
Dr. Jesús Kumate Rodríguez
Dr. José Laguna García (†)
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta
Dr. Efraín G. Pardo Codina
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

José Luis Velasco Bolom

Quien asistió y presentó el trabajo:

Pore-forming mechanism of the antimicrobial peptide Pandinin-2

Por:

José Luis Velasco Bolom, Ramón Garduño Juárez

En la modalidad de cartel durante el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica del 6 al 11 de noviembre de 2016 en Aguascalientes, Ags.

Atentamente
Por el Comité Organizador

**Dr. Miguel Lara Flores
Presidente**