

# RAPORT ȘTIINȚIFIC

## ETAPA 2

Proiect: Design computațional al unor polimeri cationici ca vectori genetici

Cod proiect: PN-III-P4-ID-PCE-2016-0474

Contract nr. 36 / 2017

Acronim: PolyGeneVec

**Etapă 2: Câmp de forțe coarse-graining (CG) și simulări de dinamică moleculară (MD) pentru lanțuri de polietilenimină (PEI) protonate.**

- Un nou câmp de forțe CG pentru PEI și o strategie de simulare adecvată.
- Simulări MD CG privind dinamica structurală a lanțurilor PEI solvate.
- Publicație în revistă de prestigiu și comunicări la conferințe internaționale.
- Achiziții de tehnică de calcul.
- Raport de etapă.

**Activitatea 2.1: Dezvoltarea unui câmp de forțe CG pentru lanțuri PEI protonate.**

- Analiza unor scheme de mapare CG a reziduurilor atomistice ale PEI.
- Dezvoltarea fișierelor CG de topologie și parametri de forță pentru PEI.
- Achiziții de tehnică de calcul (hardware și software), reparații și amenajări (se prelungește în anul 2019 corespunzător bugetului transferat).

**Activitatea 2.2: Investigarea prin simulări MD CG a structurării dinamice a lanțurilor PEI solvate. Se prelungește în anul 2019 corespunzător bugetului transferat.**

- Simulări MD CG de polimeri PEI solvatați de diverse dimensiuni și stări de protonare.
- Colectarea datelor, mediere pe ansambluri de traiectorii și analiza statistică a rezultatelor (se prelungește în anul 2019 corespunzător bugetului transferat).
- Elaborarea publicațiilor și participarea cu comunicări la conferințe (se prelungește în anul 2019 corespunzător bugetului transferat).
- Elaborarea raportului științific de etapă.

## Introducere

Poli(etilenimina) (PEI),  $-\text{[CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{]}_n-$ , este unul din cei mai utilizați vectori genetici non-virali și prezintă o eficiență de transfecție ridicată, protejând ADN-ul de degradarea enzimatică. Distribuția de sarcină particulară a PEI (configurații liniare/ramificate) este considerată responsabilă pentru: condensarea ADN ca poliplex ADN-PEI, efectul "proton sponge" al PEI și eliberarea ADN din poliplex. Condensarea ADN și formarea de poliplecși sunt condiționate de interacțiunile electrostatice dintre grupările amino încărcate pozitiv ale PEI și grupările fosfat încărcate negativ ale ADN-ului [1].

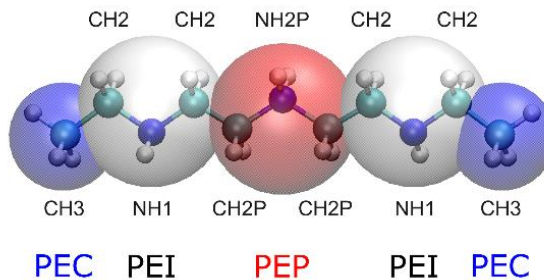


Fig. 1 Maparea reziduurilor atomice în bead-uri coarse-grained.

Datorită dificultăților asociate cu dezvoltarea unor câmpuri de forțe realiste (atomice/coarse-grained) pentru polimeri cationici, în literatură există puține studii computaționale care au ca subiect lanțurile PEI sau poliplecși ADN-PEI. Deși, câmpul de forțe CHARMM pentru acizi nucleici [2,3] permite realizarea unor simulări de dinamică moleculară realiste, pentru a investiga rolul lanțurilor PEI asupra condensării ADN-ului în poliplecși, dezvoltarea unui câmp de forțe de mare acuratețe pentru PEI este necesară.

În primul studiu computațional sistematic efectuat asupra formării poliplecșilor ADN-PEI, Ziebarth et al. [4] a folosit un câmp de forțe general, Amber GAFF [5] (neparametrizat specific pentru PEI), optimizând din calcule ab initio doar sarcinile parțiale prin metoda RESP [6]. Același câmp de forțe atomistic a fost folosit în investigații ulterioare asupra lanțurilor PEI protonate [7] și într-un studiu recent al complecșilor ADN-PEI și siARN-PEI [8]. Simulările de dinamică moleculară ale lui Choudhury et al. [9] asupra dinamicii structurale a lanțurilor PEI utilizează același câmp de forțe general Amber, care este ulterior folosit de Kondinskaia et al. [10] în conjuncție cu sarcinile parțiale ale PEI derivate din calcule ab initio pe 4 trimeri model prin metoda RESP.

În simulările de dinamică moleculară ale complecșilor ADN-PEI, Sun et al. [11] a considerat reziduuri prin analogie cu câmpul de forțe CHARMM27 [12] și parametrii torsionali au fost optimizați din calcule ab initio. Ca un prim pas în dezvoltarea unui câmp de forțe MARTINI pentru modelarea complexării ARN, Wei et al. [13] a dezvoltat un câmp de forțe atomistic pentru copolimeri PEI-PEG compatibili cu CHARMM General Force Field (CGenFF) [17]. Parametrizarea s-a bazat pe blocuri funcționale și pe parametri diedrali, care au fost optimizați utilizând plugin-ul Force Field Toolkit (ffTK) [14] al programului VMD [15].

## Rezumatul etapei

A doua etapă a acestui proiect are prevăzute 2 activități în vederea atingerii obiectivului principal O3. *Dezvoltarea unui nou câmp de forțe coarse-grained (MARTINI) pentru PEI.*

Pentru a dezvolta un câmp de forțe coarse-grained pentru PEI a fost necesară parametrizarea câmpului de forțe atomistic (CHARMM) dintr-o nouă perspectivă, bazată pe reziduuri simetrice (backbone -C-N-C-). Câmpul de forțe atomistic pentru PEI a fost publicat în 2018 în **Journal of Computational Chemistry** menționând finanțarea prin proiectul de față. Accesul comunității științifice la noul câmp de forțe publicat permite realizarea unor simulări realiste ale polimerilor PEI cu aplicabilitate în terapia genică.

Din traiectoriile atomice au fost obținute distribuțiile de probabilitate pentru legături, unghiuri și unghiuri diedrale între reziduuri, care au fost folosite în parametrizarea câmpului de forțe CG MARTINI. Modelul CG dezvoltat pentru PEI a fost publicat în 2018 în **Chemical Physics Letters**, articolul menționând proiectul de față.

Pentru pregătirea sistemelor necesare atingerii obiectivului principal O4. *Investigarea prin simulări MD atomistice și CG a condensării polipeptidelor PEI-ADN*, aferent anului 2019, au fost realizate simulări MD atomistice ale polipeptidelor ADN-PEI, rezultatele fiind publicate în **Studia UBB Chemia**, care menționează proiectul de față.

Rezultatele au fost comunicate la 4 conferințe internaționale prin prezentări orale, diseminarea rezultatelor oferind vizibilitate internațională atât grupului de cercetare, cât și instituției. Asigurarea transparenței activităților proiectului prin informarea publicului larg s-a realizat prin intermediul paginii web a proiectului, care a fost actualizată constant:

<http://www.phys.ubbcluj.ro/~tbeu/PolyGeneVec/>

Accelerarea calculelor intensive necesare efectuării simulărilor MD pe unitățile de procesare grafică a fost realizată cu ajutorul achizițiilor de tehnică de calcul de înaltă performanță prezentate în secțiunile următoare.

## Programe și modele utilizate

**VMD** [15] - program de vizualizare și modelare utilizat pentru sisteme biomoleculare.

**NAMD** [16] - program de dinamică moleculară proiectat pentru realizarea simulărilor la scară largă ale unor sisteme biomoleculare și prezintă o eficiență ridicată a paralelizării.

**CHARMM** [17] - câmp de forțe atomistic. Calculul energiei potențiale (interacțiuni legate/nelegate) se realizează după descrierea de mai jos:

$$U = \sum_{\text{bonds}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} k_\psi [1 + \cos(n\psi - \delta)] + \sum_{\text{impropers}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{atoms } i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \sum_{\text{atoms } i,j} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_{ub} (b^{1,3} - b_0^{1,3})^2$$

**MARTINI** [18] – câmp de forțe coarse-grained (CG) care modelează 4 sau 3 atomi grei cu atomii de hidrogen aferenți ca o singură particulă (bead).

## Infrastructura tehnică

Unitățile de procesare grafică (GPU-uri) conțin numeroase unități de procesare și sunt utilizate pentru accelerarea programelor științifice destinate calculelor moleculare masive.

Sistemele studiate în acest proiect ajung în această etapă până la 70000 atomi și pentru simularea unor timpi de evoluție necesari pentru atingerea unei statistici adecvate a rezultatelor (400 ns), este necesară utilizarea unor tehnici de simulare pentru accelerarea proceselor. Unul din cele mai costisitoare calcule în dinamica moleculară este calculul forțelor nelegate. Utilizarea GPU-urilor accelerează simulările, iar timpul necesar calculului forțelor nelegate scade, ajungând la valori similare celor necesare calculului forțelor legate și a interacțiunilor electrostatice.

Pentru efectuarea calculelor paralele intensive au fost folosite programele de modelare/vizualizare moleculară NAMD și VMD. Au fost achiziționate în cadrul proiectului pe anul 2017 3 stații de lucru Fujitsu Celsius R940 Power (2 x Intel® Xeon® E5-2690v4, 28 cores, 2.6 - 3.5 GHz, GPU NVIDIA Tesla K40) care au fost folosite pentru efectuarea simulărilor MD ale lanțurilor PEI solvate. În anul 2018, conform bugetului alocat, prin comasarea cu alte surse de finanțare s-a realizat achiziționarea unei plăci grafice profesionale suplimentare NVIDIA Tesla K40 (Fig. 2), pentru a crește performanța infrastructurii existente și a îndeplini obiectivele aferente proiectului.



Fig. 2 GPU NVIDIA Tesla K40

## Detalii de modelare și implementare

### Activitatea 2.1: Dezvoltarea unui câmp de forțe coarse-grained (MARTINI) pentru lanțuri PEI protonate.

Parametrizarea câmpului de forțe coarse-grained (MARTINI) a implicat dezvoltarea prealabilă a câmpului de forțe atomistic (CHARMM) recent publicat, bazat pe reziduuri simetrice care corespund cu bead-uri la nivel CG. Din traiectoriile atomistice aferente am extras distribuțiile de probabilitate pentru distanțe, unghiuri și unghiuri diedrale formate de reziduuri adiacente.

### Dezvoltarea unui câmp de forțe atomistic (CHARMM) utilizat pentru derivarea parametrilor coarse-grained.

Metodologia de ajustare a câmpului de forțe atomistic urmărește procedura de lucru a pachetului **ffTK** [14]. Câmpul de forțe atomistic dezvoltat se bazează pe calcule ab-initio (MP2/6-31G(d)), efectuate cu ajutorul programului **Gaussian 09 Rev. E.01** [20] pentru 3 pentameri model: PEI5p0-neprotonat, PEI5p1-protonat central și PEI5u2-dublu protonat (Fig. 3, 4, 5).

Fișierul de topologie definește noile tipuri de reziduuri, atomii constituenți și sarcinile parțiale ale acestora. Constantele de forță și lungimile de echilibru care descriu legăturile, unghiurile și unghiurile diedrale se regăsesc în fișierul de parametri.

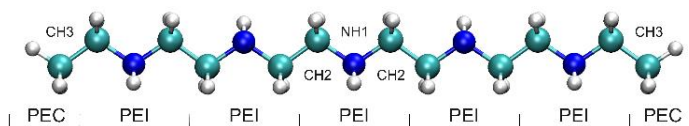


Fig. 3 PEI5p0-neprotonat.

Tipurile de reziduuri definite sunt: PEI – monomerul neprotonat  $-CH_2-NH-CH_2-$ ; PEP – monomerul protonat  $-CH_2-NH_2^+-CH_2-$ ; PEC – gruparea  $CH_3$  situată la fiecare din capetele lanțului PEI.

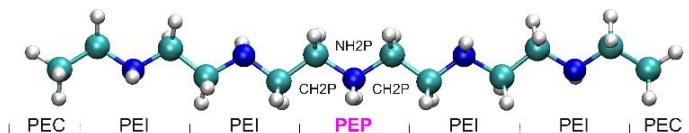


Fig. 4 PEI5p1-protonat central.

Urmărind procedura de lucru dezvoltată de Vanommeslaeghe et al. [17], și folosind pachetul **ffTK** pentru a gestiona calculele ab initio am urmărit pașii enumerați mai jos pentru fiecare dintre cei 3 pentameri model:

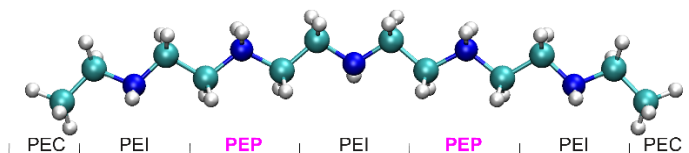


Fig. 5 PEI5u2-dublu protonat.

1. Atribuirea parametrilor Lennard-Jones (LJ) prin analogie cu atomi similari ai câmpului standard CGenFF (CHARMM36);
2. Optimizarea sarcinilor atomice parțiale din profilele de interacție cu apa;
3. Optimizarea parametrilor legăturilor și unghiurilor de valență;
4. Optimizarea parametrilor unghiurilor diedrale.

### Dezvoltarea unui câmp de forțe coarse-grained (MARTINI) pentru lanțuri PEI protonate.

Bead-urile coarse-grained coincid cu centrele de masă ale reziduurilor atomistice și păstrează aceeași denumire (Fig. 1): PEI - monomer neprotonat (alb), PEP - monomer protonat (roșu) și PEC - grup terminal CH<sub>3</sub> (albastru).

Am identificat parametrii nonbonded LJ cu cei ai unor tipuri standard de bead-uri MARTINI (SNO, SQO și SNO). Pentru a determina parametrii bonded, am aplicat tehnica de inversie Boltzmann [19] asupra distribuțiilor de probabilitate atomistice pentru legături, unghiuri (Fig. 8) și unghiuri diedrale formate între centrele de masă ale reziduurilor adiacente. Aceste distribuții au fost obținute prin medierea în timp peste întregul set de traiectorii atomistice.

### Investigarea prin simulări de dinamică moleculară a structurării dinamice a lanțurilor PEI solvate.

Am utilizat câmpurile de forțe dezvoltate (atomistic și coarse-grained) în studiul dinamicii structurale a lanțurilor PEI (Fig. 6, 7). Am studiat lanțuri PEI compuse din 27, 39 și 51 de monomeri cu fracții de protonare de 0, 1/2, 1/3 și 1/4.

Pentru fiecare combinație de lungime-fracție de protonare au fost generate ansambluri de 20 traiectorii atomistice, respectiv 50 de traiectorii coarse-grained. Am analizat structurarea dinamică cu ajutorul razei de girație (Fig. 9), lungimii de persistență, funcțiilor de distribuție radială și coeficientului de difuzie.

Suplimentar publicației deja realizate în 2018 în Chemical Physics Letters, prelucrarea finală a datelor și diseminarea rezultatelor privind *Dezvoltarea unui nou câmp de forțe coarse-grained pentru polietilenimină* se prelungește pentru anul 2019.

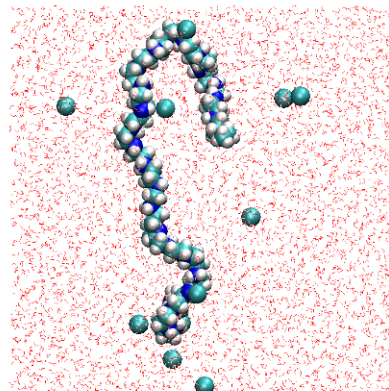


Fig. 6 PEI27-protonat (simulare atomistică).

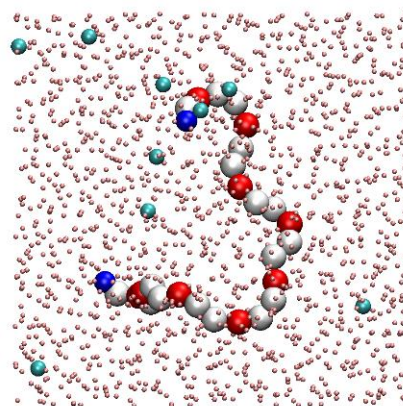


Fig. 7 PEI27-protonat (simulare coarse-grained).

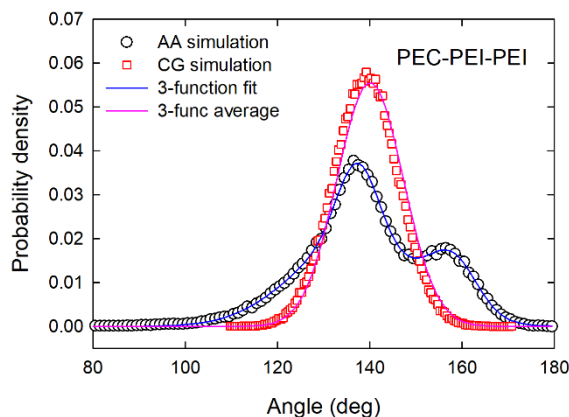


Fig. 8: Distribuțiile de probabilitate atomistice și coarse-grained pentru unghiul PEC-PEI-PEI.

## Concluzii științifice de etapă:

1. A fost dezvoltat un nou câmp **atomistic** (CHARMM) pentru polietilenimină (neprotonată/protonată) bazat pe reziduuri simetrice.
2. A fost dezvoltat un nou câmp **coarse-grained** (MARTINI) pentru polietilenimină (neprotonată/protonată).
3. Au fost realizate simulări de dinamică moleculară atomistică și coarse-grained pentru lanțuri PEI solvate.

- Calitatea câmpului de forțe coarse-grained asigură consistența structurării dinamice a lanțurilor PEI de diferite lungimi și fracții de protonare obținute din traiectorii atomistice, respectiv coarse-grained.
- Modelul coarse-grained dezvoltat permite realizarea realistă a simulărilor care urmăresc formarea de poliplecși ADN-PEI, fiind foarte util în dezvoltarea unor protocoale eficiente de livrare de gene.
- Utilizarea câmpului de forțe CG face posibilă extinderea timpului de simulare al complexelor ADN-PEI în mod semnificativ, permițând studiul unor sisteme cu un număr mult mai mare de particule decât în cazul atomistic.

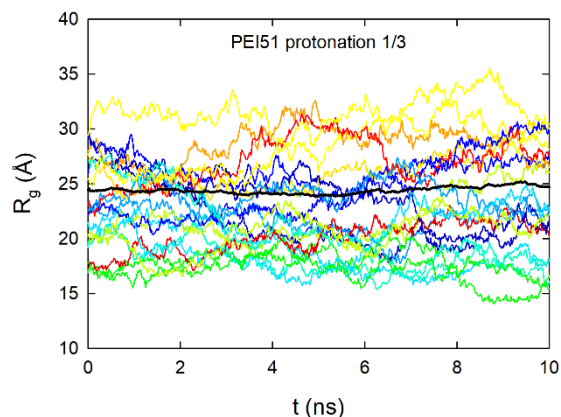


Fig. 9: Evoluția în timp a razei de girație pentru PEI51 protonare 1/3.

## Rezultate diseminate în etapa II (2018)

### Articole publicate în reviste indexate ISI

1. T. A. Beu, A. E. Ailenei, A. Farcaș, "CHARMM Force Field for Protonated Polyethyleneimine", **J. Comput. Chem.**, 9999, 1 (2018), DOI: 10.1002/jcc.25637.

**Factor de impact:** 3.221

2. T. A. Beu, A. E. Ailenei, A. Farcaș, "Atomistic and Coarse-Grained Modeling of Polyethyleneimine", **Chem. Phys. Lett.** (2018), DOI: 10.1016/j.cplett.2018.10.071.

**Factor de impact:** 1.686

3. A. Farcaș, T. A. Beu, "Complexation of DNA with Cationic Polymers", **Studia UBB Chemia**, LXIII, 2, 165 (2018).

**Factor de impact:** 0.305

## Conferințe internaționale

1. T. A. Beu, A. Farcaș, A. E. Ailenei, "*Atomistic and Coarse-Grained Modelling of Gene Delivery Polymers*", **12th Joint Conference on Mathematics and Computer Science** (12th MaCS), 14-17 June 2018, Săcuieu, Romania, prezentare orală.
2. T. A. Beu, A. Farcaș, A. E. Ailenei, "*Atomistic and Coarse-Grained Modelling of Polyethylenimine for Gene Delivery Applications*", **Polymer World Congress 2018** (PWC 2018), 3-6 September 2018, Stockholm, Sweden, prezentare orală.
3. T. A. Beu, A. E. Ailenei, A. Farcaș, "*Coarse-grained modeling of polyethyleneimine*", **Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry Conference** (MolMod), 28-30 October 2018, Cluj-Napoca, Romania, prezentare orală.
4. A. Farcaș, T. A. Beu, "*Cationic Polymers as Drug Delivery Systems*", **International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences** (IC-ANMBES), 23-25 May 2018, Brașov, Romania, prezentare orală.



## Bibliografie

- [1] *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*, editată de R. Narain, Elsevier, Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Cambridge, 2016.
- [2] E. J. Denning, U. D. Priyakumar, L. Nilsson, A. D. Mackerell, *Journal of Computational Chemistry* **32**, 1929 (2011).
- [3] K. Hart, N. Foloppe, C. M. Baker, E. J. Denning, L. Nilsson, A. D. MacKerell, *Journal of Chemical Theory and Computation* **8**, 348 (2011).
- [4] J. Ziebarth, Y. Wang, *Biophysical Journal* **97**, 1971 (2009).
- [5] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1157-1174 (2004).
- [6] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, P. A. Kollman, *J. Phys. Chem.* **97**, 10269 (1993).
- [7] J. D. Ziebarth, Y. Wang, *Biomacromolecules* **11**, 29 (2010).
- [8] J. D. Ziebarth, D. R. Kennetz, N. J. Walker, Y. Wang, *J. Phys. Chem. B* **121**, 1941 (2017).
- [9] C. K. Choudhury, S. Roy, *Soft Matter* **9**, 2269 (2013).
- [10] D. A. Kondinskaia, A. Y. Kostritskii, A. M. Nesterenko, A. Y. Antipina, A. A. Gurtovenko, *J. Phys. Chem. B* **120**, 6546 (2016).
- [11] C. Sun, T. Tang, H. Uludağ, J. E. Cuervo, *Biophysical J.* **100**, 2754 (2011).
- [12] A. D. MacKerell, N. Banavali, N. Foloppe, *Biopolymers* **56**, 257 (2001).
- [13] Z. Wei, E. Luijten, *J. Chem. Phys.* **143**, 243146 (2015).
- [14] C. G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, J. C. Gumbart, *J. Comput. Chem.* **34**, 2757 (2013).
- [15] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Molec. Graphics* **14**, 33 (1996).
- [16] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, K. Schulten, *J. Comput. Chem.* **26**, 1781 (2005).
- [17] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov and A. D. MacKerell Jr., *J. Comput. Chem.* **31** 671 (2010).
- [18] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, A. H. de Vries, The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations, *J. Phys. Chem. B* **111** 7812 (2007).
- [19] D. Reith, M. Pütz, F. Müller-Plathe, *J. Comput. Chem.* **24**, 1624 (2003).
- [20] Gaussian 09, Revision E.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.