

RAPORT ȘTIINȚIFIC

ETAPA 3

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 3 - Simulări MD atomistice și coarse-grained (CG) de condensare a polipeptidelor PEI-ADN.

- Simulări MD atomistice și CG privind condensarea polipeptidelor PEI-ADN.
- Sinteză a caracteristicilor optime ale lanțurilor PEI pentru procesul de condensare a polipeptidelor PEI-ADN.
- Elaborarea publicațiilor, participarea la conferințe internaționale.
- Achiziții de tehnică de calcul.
- Raport de etapă.

Activitatea 3.1 - Investigarea prin simulări MD AA și CG a condensării polipeptidelor PEI-ADN.

- Simulări MD atomistice și CG masive de condensare PEI-ADN pentru diverse configurații inițiale, fracții de protonare și temperaturi.
- Colectarea datelor, mediere pe ansambluri de traiectorii și analiza statistică a rezultatelor.
- Elaborarea publicațiilor, participarea cu comunicări la conferințe.
- Achiziții de tehnică de calcul (hardware și software), reparații și amenajări.
- Elaborarea raportului științific de etapă.

Obiectivele au fost realizate în totalitate.

Introducere

Tehnicile de terapie genică sunt în mod continuu dezvoltate și perfecționate pentru a trata eficient afecțiuni la nivel celular, având în același timp un grad scăzut de toxicitate. Metoda standard de livrare a materialului genetic (ADN) constă în formarea complexelor de tip ADN – vector genetic (Figura 1), condensarea și infiltrarea acestora în celule prin endocitoză. Polietilenimina (PEI), având formula chimică - $[CH_2-NH-CH_2]_n-$, este un polimer cu eficiență de transfecție ridicată. Această proprietate, împreună cu sarcina electrică pozitivă a grupărilor protonate ale PEI (care interacționează cu grupările fosfat din ADN prin intermediul forțelor electrostatice), fac din acesta un important vector genic care întrunește toate caracteristicile necesare pentru a fi utilizat pe scară largă în terapia genică.

În prezent există un interes deosebit în optimizarea formării și condensării poliplecșilor ADN-PEI. Studiile experimentale au demonstrat atât eficiența polietileniminei ca vector genic, cât și toxicitatea scăzută a complexelor ADN-PEI. De exemplu, condensarea ADN-ului prin intermediul lanțurilor de PEI ca parte a unui amestec de agenți cationici și ioni trivalenți a fost demonstrată de Jorge et al. [1], care a arătat eficiență crescută în prezența ionilor de Fe. În contextul imunoterapiei în cancer, Cai et al. [2] au construit nanocompuși formați din PEI și material inorganic și au demonstrat eficiența acestora prin microscopie de fluorescență.

Proiectul are ca scop principal modelarea polietileniminei și studiul amănunțit al dinamicii acesteia în prezența ADN-ului. Având la dispoziție câmpurile de forțe dezvoltate în primele două etape, în această fază a proiectului s-au efectuat simulări de dinamică moleculară de înaltă calitate ale complexelor ADN-PEI la nivel atomistic (AA) și coarse-grained (CG).

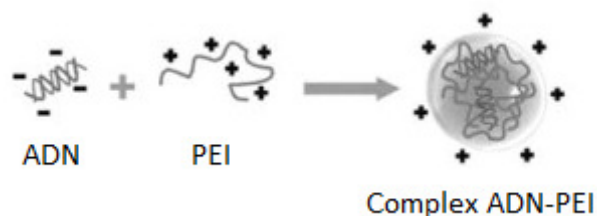


Fig. 1 Formarea complexelor ADN – PEI.

<https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/polyethyleneimine>

Rezumatul etapei

A treia etapă a avut ca obiectiv *realizarea simulărilor MD atomistice și coarse-graining de condensare a poliplecșilor ADN-PEI* și investigarea acestora în raport cu diferite fracții de protonare și configurații inițiale.

O parte din obiectivele ultimei etape, și anume *investigarea prin simulări MD atomistice a condensării poliplecșilor ADN-PEI*, au fost realizate, utilizând câmpul de forțe AA dezvoltat în prima etapă, și publicate în anul 2018 în revista **Studia UBB Chemia** (factor de impact 0.305).

A fost dezvoltat un câmp de tip coarse-grained pentru polietilenimină, prin maparea reziduurilor întregi atomistice în bead-uri. Acesta a fost folosit, împreună cu câmpul standard Martini pentru ADN [3], la efectuarea simulărilor CG masive ale polipeptidilor ADN-PEI, din care reiese clar rolul polietileniminei în procesul de condensare a materialului genetic. Rezultatele care privesc dezvoltarea câmpului CG și formarea complexelor ADN-PEI au fost acceptate spre publicare în **Journal of Computational Chemistry** (factor de impact 3.194), iar articolul menționează finanțarea prin proiectul de față.

Obiectivele etapei au fost realizate în totalitate. Rezultatele au fost comunicate la 4 conferințe internaționale prin prezentări orale și prezentări de poster, 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://phys.ubbcluj.ro/~titus.beu/PolyGeneVec/>

Accelerarea calculului intensiv necesare efectuării simulărilor de dinamică moleculară ale formării și condensării polipeptidilor ADN-PEI a fost realizată cu ajutorul achizițiilor de tehnică de calcul de înaltă performanță prezentate în secțiunile următoare.

Programe și modele utilizate

VMD [4] - program de vizualizare și modelare a sistemelor biomoleculare.

NAMD [5] - program de dinamică moleculară proiectat pentru realizarea simulărilor la scară largă a unor sisteme biomoleculare; prezintă o eficiență ridicată a paralelizării.

GROMACS [6] – program de dinamică moleculară utilizat pentru simularea eficientă a sistemelor biomoleculare la nivel atomistic și coarse-grained; are la dispoziție un pachet consistent de câmpuri de forțe (AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS).

CHARMM [7] - câmp de forțe atomistic. Calculul energiei potențiale (interacțiuni legate/nelegate) se realizează după descrierea de mai jos:

$$V = \sum_{bonds} k_b(b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} k_\phi[1 + \cos(n\Phi - \delta)] + \sum_{impropers} k_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum_{Urey-Bradley} k_u(u - u_0)^2 + \sum_{non-bonded} \epsilon \left[\left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

Martini [8] – câmp de forțe coarse-grained (CG) care modelează în medie 4 atomi grei (împreună cu atomii de hidrogen aferenți) ca o singură particulă (numită bead). Energia potențială are forma:

$$V = \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_b(r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} k_\phi[1 + \cos(\varphi - \varphi_{eq})] + \sum_{impropers} k_\phi(\Phi - \Phi_{id})^2 + \sum_{i,j} \left\{ \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r} + 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] \right\}$$

Infrastructura tehnică

Sistemele studiate în această etapă pot ajunge la sute de mii sau chiar milioane de atomi în cazul condensării ADN-ului. Pentru obținerea unor rezultate de înaltă calitate, afectate cât mai puțin de erori statistice, este nevoie de medierea mărimilor de interes pe ansambluri de traiectorii, ceea ce implică un efort imens de calcul și un interval mare de timp de achiziție al datelor.

Din acest motiv, se urmărește accelerarea simulărilor prin utilizarea unor stații de lucru de înaltă performanță pe care programele paralelizate de dinamică moleculară scalează eficient. Au fost achiziționate în cadrul proiectului în anul 2019 o stație de calcul Fujitsu CELSIUS M770 (Figura 2 a), având un procesor de ultimă generație (Intel i9) cu 28 de core-uri și un laptop DELL XPS 9570 (Figura 2 b) cu procesor Intel Core i9.



Fig. 2 a) Stație grafică Fujitsu CELSIUS M770 și b) Laptop DELL XPS 9570.

Detalii de modelare și implementare

Etapă 3 - Simulări MD atomistice și coarse-grained de condensare a polipeptidelor PEI-ADN.

Activitatea 3.1 - Investigarea prin simulări MD AA și CG a condensării polipeptidelor PEI-ADN.

S-au realizat simulări atomistice ale sistemelor formate din lanțuri de PEI și ADN utilizând câmpul AA dezvoltat în cadrul primei etape a acestui proiect. Rezultatele au fost publicate în anul 2018 în revista Studia UBB Chemia.

S-a dezvoltat un nou câmp coarse-grained pentru PEI prin metoda Boltzmann inversion [9]. Acesta a fost folosit împreună cu cel pentru ADN [3] și cel al apei polarizabile [10] pentru realizarea unor simulări masive CG ale complexelor ADN-PEI. Au fost considerate sistemele formate dintr-un dublu dodecamer Drew-Dickerson (având secvența CGCGAATTCGCG-CGCGAATTCGCG) și 2, 4, 6, respectiv 8 lanțuri de PEI având fracțiile de protonare 1/2 și 1/4. Configurațiile inițiale pentru simulările de acest fel sunt prezentate în Figura 3 a) – la nivel AA și b) – la nivel CG.

S-a observat formarea poliplecșilor ADN-PEI și a fost calculat potențialul de forță medie (Figura 4) dintre bead-urile protonate ale polimerului (PEP) și grupările fosfat ale ADN (BB1) care indică un minim absolut la o interdistanță de 0.46 nm. Se poate vedea că lanțurile alternativ protonate produc profile aproape indiscernabile, însă potențialul de forță medie al celor protonate cu fracția 1/4 este mai mare. Acest lucru este datorat faptului că, în cazul protonării 1/2, distanța dintre două bead-uri PEP consecutive este comparabilă cu distanța dintre două grupări fosfat consecutive ale ADN-ului, iar în cazul lanțurilor de protonare 1/4 distanța PEP-PEP este semnificativ mai mare decât distanța BB1-BB1.

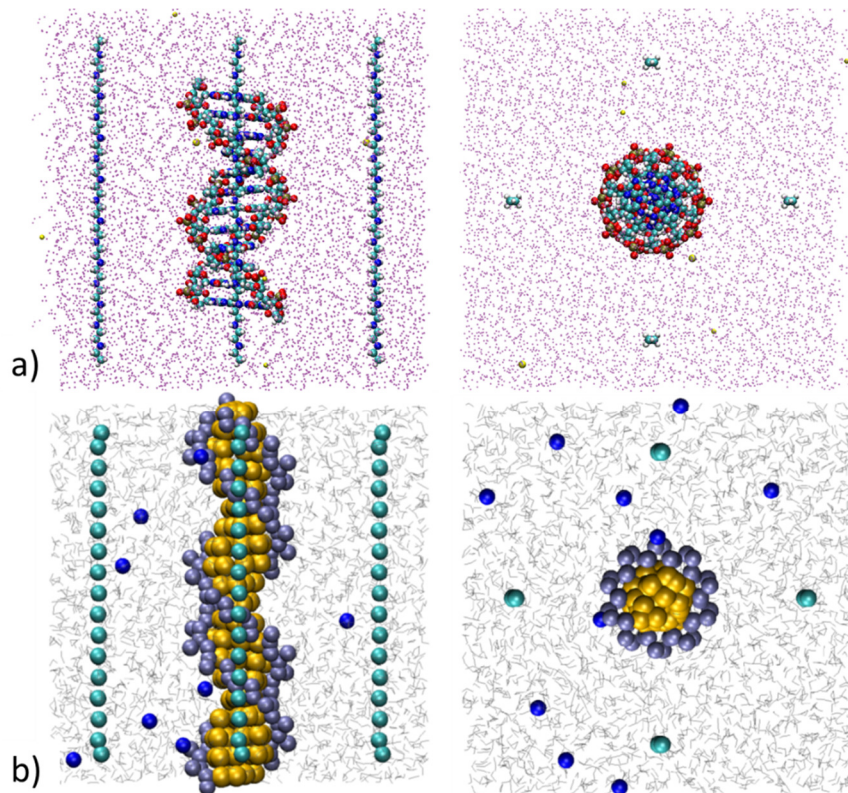


Fig. 3 Sistem format din ADN, 4 lanțuri PEI de câte 15 monomeri protonați uniform din 2 în 2, apă și ioni necesari neutralizării. a) – atomistic, b) – coarse-grained (vedere laterală și axială).

Concluzii științifice de etapă

S-au efectuat simulări AA și CG ale complecșilor ADN-PEI utilizând câmpurile de forțe dezvoltate în etapele anterioare. S-a constatat că cel mai eficient vector genetic este polietilenimina protonată alternativ (din 2 în 2 bead-uri protonate) datorită faptului că distanța dintre 2 bead-uri protonate PEI (încărcate pozitiv) este comparabilă cu distanța dintre 2 grupări fosfat consecutive ale ADN-ului (încărcate negativ).

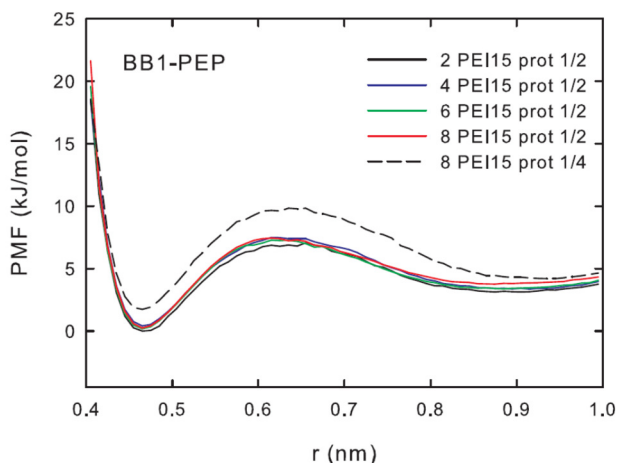


Fig. 4 Potențialul de forță medie între bead-urile protonate ale PEI și grupările fosfat ale ADN-ului.

Rezultate diseminate

Articole publicate în reviste indexate ISI

1. T. A. Beu, A. E. Ailenei, R. I. Costinaș, "Martini Force Field for Protonated Polyethyleneimine", J. Comput. Chem. (2019), DOI:10.1002/jcc.26110.

Factor de impact: 3.224

2. T. A. Beu, A. E. Ailenei, A. Farcaș, "Atomistic and Coarse-Grained Modeling of Polyethyleneimine", Chem. Phys. Lett., 714, 94 (2019), DOI: 10.1016/j.cplett.2018.10.071.

Factor de impact: 1.686

Conferințe internaționale

1. T. A. Beu, R. I. Costinaș, A. E. Ailenei, "Coarse-grained modeling of DNA-genetic-vector complexes", TIM19 Physics Conference, 29-31 May 2019, Timișoara, Romania, plenary lecture.
2. A. E. Ailenei, R. I. Costinaș, T. A. Beu, "Coarse-grained simulations of solvated polyethyleneimine", TIM19 Physics Conference, 29-31 May 2019, Timișoara, Romania, poster presentation.
3. T. A. Beu, "DNA-polycation complexes: coarse-grained modeling and simulations", 2nd Euro Chemistry Conference, 17-19 June 2019, Valencia, Spain, keynote speech.
4. T. A. Beu, "Coarse-grained simulations of DNA-polyethyleneimine complex formation", 12th European Conference on Computational and Theoretical Chemistry (EUCCO-CTC), 1-5 September 2019, Perugia, Italy, oral presentation.

5. T. A. Beu, "DNA-Polyethyleneimine complex formation: coarse-grain simulations", 12th International Conference on Processes In Isotopes And Molecules (PIM19), 25-27 September 2019, Cluj-Napoca, Romania, oral presentation.
6. A. E. Ailenei, R. I. Costinaş, T. A. Beu, "Polyethyleneimine: coarse-grain modeling and simulations", 12th International Conference on Processes In Isotopes And Molecules (PIM19), 25-27 September 2019, Cluj-Napoca, Romania, poster presentation.

Bibliografie

- [1]. A. F. Jorge, R. S. Dias, and A. A. C. C. Pais, *Biomacromolecules* 13, 3151 (2012).
- [2]. J. Cai, G. Chen, R. Jin, C. Deng, S. Huang, X. Yuan, G. Chen, J. Zhao, Z. Wang, and H. Ai, *J. Ind. Eng. Chem.* 76, 188 (2019).
- [3]. J. J. Uusitalo, H. I. Ingólfsson, P. Akhshi, D. P. Tieleman, and S. J. Marrink, *Journal of Chemical Theory and Computation* 11, 3932 (2015).
- [4]. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *Journal of Molecular Graphics* 14, 33 (1996).
- [5]. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten, *Journal of Computational Chemistry* 26, 1781 (2005).
- [6]. M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Pall, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, *SoftwareX* 1-2 19 (2015).
- [7]. 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., *Journal of Computational Chemistry* 31, 671 (2010).
- [8]. S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, and A. H. de Vries, *The Journal of Physical Chemistry B* 111, 7812 (2007).
- [9]. D. Reith, M. Pütz, and F. Müller-Plathe, *Journal of Computational Chemistry* 24, 1624 (2003).
- [10]. S. O. Yesylevskyy, L. V. Schafer, D. Sengupta, and S. J. Marrink, *PLOS Computational Biology* 6, 1 (2010).