

# RAPORT ȘTIINȚIFIC

## ETAPA 1

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

**Obiectiv principal:** Dezvoltarea unui câmp de forțe atomistic (CHARMM) pentru polietilenimină (PEI) protonată și simularea prin dinamică moleculară (MD) a structurării dinamice a lanțurilor PEI solvate.

### Obiective specifice:

- Dezvoltarea unui nou câmp de forțe CHARMM pentru PEI.
- Simulări MD atomistice privind dinamica structurală a lanțurilor PEI solvate.
- Creșterea numărului de personal tânăr implicat în proiect.
- Achiziții de tehnică de calcul de înaltă performanță.
- Diseminare: publicație în revistă de prestigiu, comunicări la conferințe internaționale, pagină web a proiectului, raport de etapă.

**Atât obiectivul principal cât și obiectivele specifice au fost realizate în totalitate.**

### Activități realizate:

**Activitatea 1.1** Dezvoltarea unui nou câmp de forțe CHARMM pentru lanțuri PEI protonate.

- Optimizarea ab initio la nivel MP2/6-31G(d) a unor tetrameri PEI de referință.
- Ajustarea parametrilor câmpului de forță pe baza calculelor ab initio utilizând pachetul ffTk.
- Construirea fișierelor CHARMM de topologie și parametri de forță pentru PEI în stări de protonare arbitrară.
- Achiziții de tehnică de calcul (3 stații de lucru de înaltă performanță).

**Activitatea 1.2** Investigarea prin simulări MD a structurării dinamice a lanțurilor PEI solvate.

- Simulări MD atomistice de polimeri PEI solvatați de diverse dimensiuni și stări de protonare.
- Colectarea datelor, medierea pe ansambluri de traiectorii și analiza statistică a rezultatelor.
- Elaborarea publicațiilor și participarea cu comunicări la conferințe internaționale.
- Elaborarea raportului științific de etapă.
- Achiziții de tehnică de calcul (laptop, tabletă, proiector, multifuncțională, consumabile).

## Motivațiile proiectului

Terapia genetică suscită un viu interes datorită potențialului său ridicat de tratare a multor afecțiuni transmise sau dobândite genetic. Pentru transportul materialului genetic în interiorul celulelor sunt utilizate pe scară largă vectori genetici virali și nevirali (sintetici). Aceștia au rolul primordial de a condensa lanțurile ADN/ARN sub formă de complecși și a proteja materialul genetic împotriva degradării enzimatică. Calități esențiale pe care trebuie să le poseze vectorii genetici sunt eficiență de transfecție ridicată, specificitate și biocompatibilitate.

Sistemele de transfer genetic nevirale sunt foarte populare, fiind bazate în mod tipic pe polimeri cationici, lipide cationice sau lipozomi. Permițând un bun control al toxicității, polimerii cationici reprezintă o clasă promițătoare, iar unul dintre cei mai utilizați este polietilenimina (PEI), care prezintă o eficiență de transfecție ridicată. Distribuția de sarcină particulară a PEI este considerată a fi responsabilă pentru: (a) condensarea lanțurilor ADN ca poliplecși și pătrunderea lor în celule prin endocitoză, (b) efectul "proton sponge" care declanșează eliberarea poliplecșilor din endozomi, și (c) eliberarea lanțurilor ADN din poliplecși, urmată de procesarea acestora în nucleu.

Proiectul urmărește investigarea detaliată a rolului PEI în condensarea ADN-ului prin simulări de dinamică moleculară atomistică și coarse-grained de înaltă calitate. Motivațiile majore ale primei etape derivă din inexistența în literatura de specialitate a unui câmp de forțe realist pentru PEI, precum și necesitatea cunoașterii precise a corelărilor dintre caracteristicile primare ale lanțurilor de PEI (dimensiune, grad de protonare etc.) și proprietățile lor dinamice (rază de rotație, coeficient de difuzie etc.).

## Aplicații de calcul utilizate

**NAMD** [1] – cod de dinamică moleculară de înaltă performanță pentru simulări de sisteme biomoleculare masive; prezintă o scalabilitate remarcabilă prin paralelizare.

**VMD** [2] – aplicație pentru vizualizarea și modelarea 3D a sistemelor biomoleculare.

**ffTK** (Force Field Tool Kit) [3] – aplicație de ultimă oră pentru ajustarea parametrilor câmpurilor de forțe de tip CHARMM [4] pornind de la rezultate ab initio de înaltă calitate.

## Modele, metode și rezultate

### Activitatea 1.1 Dezvoltarea unui nou câmp de forțe CHARMM pentru lanțuri PEI protonate.

Datorită actualității și utilizării sale pe scară largă, a fost adoptat câmpul de forțe atomistic **CHARMM** [4], având forma funcțională:

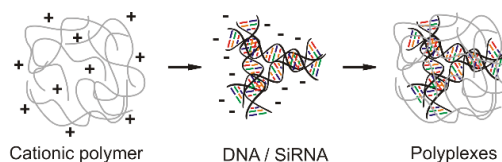


Fig. 1 Formarea poliplecșilor prin interacțiuni electrostatice.

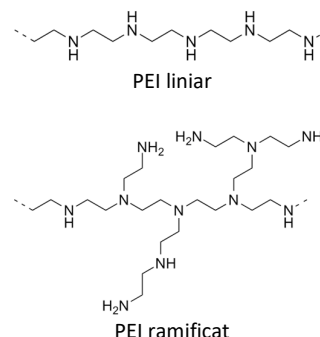


Fig. 2 Lanțuri de polietilenimină tipice.  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylenimine>

$$U = \sum_{\text{bonds}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} k_\psi [1 + \cos(n\psi - \delta)] + \sum_{\text{impropers}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2$$

$$+ \sum_{\text{atoms } i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \sum_{\text{atoms } i,j} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_{ub} (b^{1,3} - b_0^{1,3})^2$$

Metodologia de ajustare a parametrilor câmpului de forțe urmărește pas-cu-pas procedura standard a pachetului **ffTK v1.1** [4] și se bazează pe calcule ab initio la nivel MP2/6-31G(d), realizate cu ajutorul aplicației **Gaussian 09 Rev. E.01** [5] pentru doi tetrameri model, PEI4p0-neprotonat (Fig. 3) și PEI4p1-protonat central (Fig. 4).

Au fost definite 10 noi tipuri de atomi specifici pentru lanțurile de PEI: NH2 – atom N aferent grupării NH<sub>2</sub> terminale; HN2 – atom H legat la NH2; NH1 – atom N aferent grupării NH; HN1 – atom H legat de NH1; NH2P – atom N aferent grupării NH<sub>2</sub><sup>+</sup>; HN2P – atom H legat la NH2P; CH2 – atom C legat de NH1; CH2P – atom C legat de NH2P; CH2X – atom C interpus între NH1 și CH2P; HC2 – atom H legat de CH2, CH2P, sau CH2X.

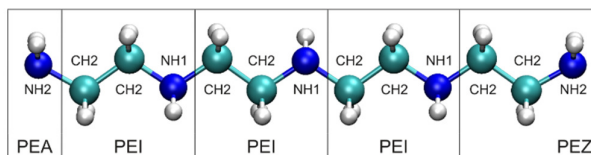


Fig. 3 PEI4p0 – tetramer de PEI neprotonat.

Au fost definite 5 noi tipuri de reziduu-uri: PEI – monomer CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH neprotonat; PEP – monomer CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> protonat; PEQ – monomer neprotonat care încheie o secvență protonată, însumând împreună cu PEP o sarcină unitară; PEA – NH<sub>2</sub> situat la începutul lanțului, PEZ – încheie un lanț înlocuind NH cu NH<sub>2</sub>.

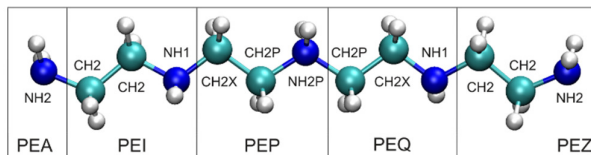


Fig. 4 PEI4p1 – tetramer de PEI protonat central.

Utilizând pachetul **ffTK** pentru a gestiona volumele mari de calcule ab initio implicate, au fost parcurse următoarele etape de calcul pentru fiecare din cei doi tetrameri de PEI utilizați ca model:

1. **Parametrii nelegați Lennard-Jones** au fost atribuiți prin analogie cu atomi similari din componenta standard, **CgenFF**, a celei mai recente versiuni a câmpului **CHARMM (CHARMM36)**.
2. **Optimizarea sarcinilor atomice parțiale din profilele de interacție cu apa** - pentru fiecare complex format dintr-un tetramer model PEI și o moleculă de apă cu rol de donator sau acceptor în raport cu câte unul dintre atomii polimerului au fost efectuate calcule de optimizare a geometriei. Energiile de interacție ab initio și momentele de dipol rezultate au reprezentat datele primare pentru optimizarea sarcinilor atomice.
3. **Optimizarea parametrilor de forță pentru legături și unghiuri din distorsiuni ale coordonatelor interne** – matricea hessiană ab initio (calculată cu **Gaussian 09** în reprezentarea coordonatelor interne) și matricea hessiană clasică (calculată cu **ffTK** din distorsiuni mici ale fiecărei coordonate interne) sunt utilizate pentru a calcula energii totale de deformare, care sunt apoi fitate iterativ, rezultând parametri de forță optimizați pentru legături și unghiuri.
4. **Optimizarea parametrilor de forță pentru unghiurile diedrale** – deoarece forma funcțională a energiei diedrale nu este armonică, abordarea hessiană nu poate fi folosită. În schimb, au fost generate suprafețe de energie potențială ab initio prin scanarea explicită a unghiurilor diedrale de interes. Optimizarea ulterioară a parametrilor diedrali s-a realizat printr-un protocol de “simulated annealing” minimizând diferența dintre suprafețele potențiale cuantice și clasice pentru toate unghiurile diedrale scanate.

Proprietăți topologice generale ale rezidurilor PEI protonate/neprotonate au fost sintetizate într-un fișier standard **CHARMM** de topologie, iar parametrii de forță corespunzători au fost incluși într-un fișier standard **CHARMM** care definește câmpul de forțe. Ambele fișiere au fost făcute publice odată cu publicarea rezultatelor.

## Activitatea 1.2 Investigarea prin simulări MD a structurării dinamice a lanțurilor PEI solvate

Câmpul de forțe dezvoltat în cadrul activității 1.1 a fost utilizat în studiul dinamicii structurale a lanțurilor PEI prin simulări de dinamică moleculară efectuate cu ajutorul codului NAMD. Am studiat lanțuri PEI compuse din 14, 26 și 50 monomeri, cu fracții de protonare de 0, 1/2 (alternativ protonat/neprotonat), 1/3 și 1/4. Sistemele alcătuite din PEI, apa de solvatare și ionii de neutralizare cuprind până la 23 000 atomi.

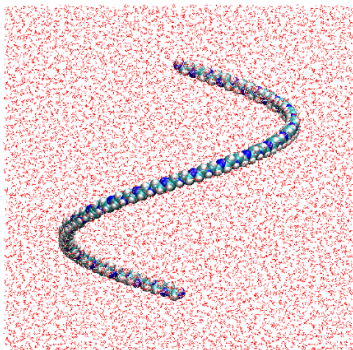


Fig. 5 PEI50-protonat (configurație elicoidală inițială).

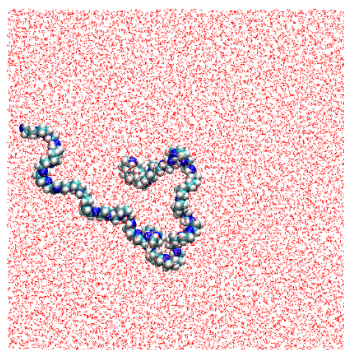


Fig. 6 PEI50-protonat (configurație la t=20 ns).

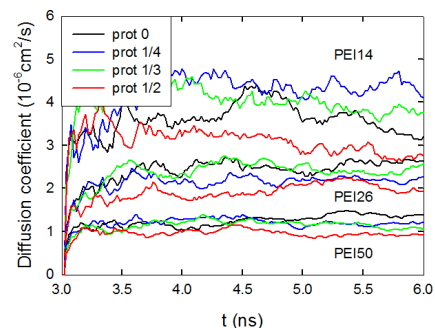


Fig. 7 Evoluția în timp a coeficientului de difuzie pentru un interval de eșantionare de 3 ns.

Pentru a reduce corelațiile temporale și a îmbunătăți statistica, mărimile de interes sunt mediate nu pe traiectorii individuale, ci pe ansamble de traiectorii pornite de la configurații inițiale aleatoare. Concret, pentru fiecare lungime/fracție de protonare a fost generat câte un ansamblu de 40 de traiectorii de câte 20 ns, corespunzând unui interval de timp de măsurare efectiv cumulat de 680 ns. Configurații inițiale și finale tipice sunt prezentate în figurile 5 și 6. Am analizat structurarea dinamică a diferitelor lanțuri PEI cu ajutorul următoarelor mărimi: rază de girație, lungime de persistență, funcții de distribuție radiale, numere de coordinare și coeficient de difuzie.

Pentru a caracteriza mobilitatea lanțurilor PEI în soluție, am studiat dependența coeficientului de difuzie al centrului de masă al lanțului de lungime și fracția de protonare a acestuia. Figura 7 prezintă evoluția coeficientului de difuzie pe parcursul unui interval de eșantionare tipic de 3 ns. Așa cum este de așteptat, valorile coeficientului de difuzie scad atât cu creșterea lungimii lanțului cât și a fracției de protonare. Valorile calculate ale coeficientului de difuzie sunt în excelentă concordanță cu valorile experimentale publicate [6].

## Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor oferă vizibilitate internațională grupului de cercetare, instituției și agenției de finanțare. Rezultatele etapei 1 a proiectului au fost publicate într-un articol în Journal of Computational Chemistry (factor de impact 3.229), într-un articol în volumul unei conferințe, ambele menționând sursa de finanțare a proiectului, și au fost comunicate la două conferințe internaționale.

Fișierele de topologie și parametri de forță au fost oferite în regim "open source" prin intermediul site-ului web al jurnalului Journal of Computational Chemistry. Accesul comunității științifice la noul câmp de forțe publicat permite realizarea unor simulări realiste a polimerilor, nanogelurilor cu aplicabilitate în terapia genică.

## Articole publicate în reviste indexate ISI

1. T.A. Beu, A. Farcaș, "CHARMM force field and molecular dynamics simulations of protonated polyethylenimine", J. Comput. Chem. 38(27), 2335 (2017).

Factor de impact: 3.229

Conține referirea explicită la finanțarea de către UEFISCDI a proiectului.

2. T.A. Beu, A. Farcaș, "Structure and Dynamics of Solvated Polyethylenimine Chains", AIP Conference Proceedings (2017).

(în curs de apariție)

Conține referirea explicită la finanțarea de către UEFISCDI a proiectului.

### Conferințe internaționale

1. T.A. Beu, A. Farcaș, "CHARMM force field and molecular dynamics simulations of polyethylenimine chains", 4th International Conference on Physical and Theoretical Chemistry, (18-19 September 2017, Dublin, Ireland).

(prezentare orală).

2. A. Farcaș, T.A. Beu, "Molecular Dynamics Simulations of Cationic Polymers", 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress, (16-20 July 2017, Edinburgh, UK).


(prezentare poster).

Journal of  
**COMPUTATIONAL  
CHEMISTRY**

WWW.C-CHEM.ORG

FULL PAPER

## CHARMM Force Field and Molecular Dynamics Simulations of Protonated Polyethylenimine

Titus Adrian Beu \* and Alexandra Farcaș

As a gene delivery vector, polyethylenimine (PEI) shows one of the highest transfection efficiencies, while effectively protecting (2) molecular dynamics investigations of solvated PEI, providing a detailed picture of the dynamic structuring thereof in depen-

icant progress in engineering non-viral gene vectors has been achieved, clinical results are far from being substantial. The difficulties include among others instability of the complexes in extracellular space, insufficient cellular uptake, and low endosomal escape.<sup>[1,6]</sup>

Non-viral gene delivery systems are currently based on polyplexes—DNA complexes with cationic polymers,<sup>[7,8]</sup> lipoplexes—cationic lipids, polymeric vesicles,<sup>[9]</sup> or liposomes. Owing to their accessible chemistry, cost effectiveness, and controllable

T. A. Beu, A. Farcaș  
Faculty of Physics, Department of Biomolecular Physics, University Babeș-Bolyai, Mihail Kogălniceanu Street 1, Cluj-Napoca 400084, Romania  
E-mail: titus.beu@phys.ubbcluj.ro  
Contract grant sponsor: Executive Unit for Financing Higher Education, Research, Development and Innovation (UEFISCDI), project PN-III-P4-ID-PCE-2016-0474  
© 2017 Wiley Periodicals, Inc.

Wiley Online Library

Journal of Computational Chemistry 2017, DOI: 10.1002/jcc.24890 1

### Pagina WEB a proiectului

Vizibilitatea proiectului este asigurată prin intermediul paginii web a proiectului:

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

## PolyGeneVec

Project financed by UEFISCDI: Call PN-III-2016 P4-IDPCE

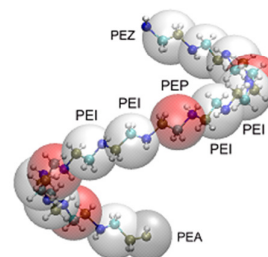
Project Type: Exploratory Research

Project Code: PN-III-P4-ID-PCE-2016-0474

Contract No.: 36 / 2017

Project Duration: 12.07.2017 – 31.12.2019

Principal Investigator: Prof. Dr. Titus Adrian Beu  
 e-mail: titus.beu@phys.ubbcluj.ro  
 phone: +40 264 405300, ext. 5183  
 Babes-Bolyai University  
 Str. Mihail Kogalniceanu nr. 1  
 RO-400084 Cluj-Napoca, Romania



## Project abstract:

Polyethylenimine (PEI) shows one of the highest transfection efficiencies as a gene delivery vector, effectively protecting DNA from enzyme degradation. Its particular charge distribution is considered responsible for: (a) DNA condensation as PEI/DNA polyplexes (entering cells via endocytosis), (b) proton sponge effect of PEI (triggers release of polyplexes from endosome), and (c) DNA release from polyplexes (further processed inside the nucleus).

The major incentives of our interdisciplinary project, matching a H2020 high-priority research area, are the absence of a realistic force field (FF) for PEI and the high topicality of investigations regarding the role of PEI in DNA condensation.

## Infrastructura de calcul achiziționată

Studiul condensării complexelor ADN-PEI în etapele 2 și 3 ale proiectului va implica sisteme solvate de până la 100 000 atomi, pentru care vor trebui simulați timpi de evoluție de ordinul 600 ns. Efortul imens de calcul necesită utilizarea unor sisteme de calcul cu număr mare de core-uri și, la modul ideal, existența plăcilor de procesare grafică (GPU), pe care codul NAMD scalează în mod extrem de favorabil. În această idee, în această etapă au fost achiziționate și deja folosite trei stații de calcul de ultimă generație Fujitsu Celsius R940 Power cu 28 core-uri și placă grafică (2 x Intel® Xeon® E5-2690v4, 28 cores, 2.6 - 3.5 GHz, GPU NVIDIA Tesla K40). Din teste preliminare, accelerarea asigurată de placa grafică NVIDIA Tesla K40 rezultă a fi superioară celor 28 de core-uri.



## Completarea echipei proiectului cu tineri

Echipa proiectului nominalizată la contractare a implicat două persoane: directorul de proiect, Prof. Dr. Titus Beu, și, ca asistent de cercetare, pe doctoranda Alexandra Farcaș. Postul vacant de asistent de cercetare prevăzut inițial a fost scos la concurs în trei rânduri, fiind ocupat în primă instanță în cuantum de 25% de Asist. Dr. Roxana Pașca, cu doctorat în chimie și doctorandă în fizică a directorului de proiect, iar la ultima scoatere la concurs, în proporție de 25% de Andrada-Elena Ailenei, studentă masterandă a directorului de proiect.

## Concluzii științifice de etapă

1. A fost dezvoltat și publicat un **nou câmp de forțe CHARMM pentru polietilenimină** în stări de protonare arbitrară. Câmpul de forțe prezintă o mare acuratețe, datorată ajustării bazate pe calcule ab initio calitate înaltă și implicării consecvente a tuturor parametrilor câmpului de forțe.
2. Au fost realizate simulări de înaltă precizie a structurării dinamice a lanțurilor PEI solvate, rezultând că:
  - **Raza de girație** crește cu creșterea lungimii lanțului PEI și cu fracția de protonare; modelul lanțului polimerului ideal se poate aplica doar în cazul lanțurilor neprotonate.
  - **Funcțiile de distribuție radiale** descriu orientarea moleculelor de apă în jurul atomilor de C și N ai lanțurilor PEI. Moleculele de apă sunt orientate predominant cu momentul de dipol către atomul N neprotonat.
  - **Coeficientul de difuzie** al lanțurilor PEI descrește puternic cu creșterea lungimii lanțului și cu fracția de protonare. Efectul semnificativ al protonării asupra dinamicii lanțurilor PEI sugerează controlul protonării ca metodă efectivă de a controla mobilitatea polimerului în soluție. Rezultatele obținute din simulări pentru coeficientul de difuzie sunt în foarte bună concordanță cu datele experimentale.

## Referințe bibliografice

- [1] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J of Computational Chemistry* 26 (2005) 1781.
- [2] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, VMD – Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics* 14 (1996) 33.
- [3] C. G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid and J. C. Gumbart, Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit, *J. Comput. Chem.* 34 (2013) 2757.
- [4] 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 (2010) 671.
- [5] *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, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [6] J. P. Clamme, J. Azoulay, and Y. Mely, *Biophys. J.* 84, 1960 (2003).