

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific

Prof. dr. Titus Adrian Beu

Absolvent

Paul Trofin

2023

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

**STUDIUL DINAMIC MOLECULAR ASUPRA FORMĂRII POLIPECȘILOR
PEI (HIPER-RAMIFICAT)-PEG/ADN**

Coordonator științific

Prof. dr. Titus Adrian Beu

Absolvent

Paul Trofin

2023

Abstract

PEGylated PEIs are intensely studied non-viral vectors for gene delivery, having high transfection efficiencies. Using all-atom molecular dynamics simulations, the interaction of hyperbranched polyethylenimine polyethylene glycol (HPEI-PEG) with DNA was investigated for different number of PEG chains per HPEI core, and, to this end, a new CHARMM Force Field for PEG was developed. The obtained force field parameters are validated by the good agreement of structural measures, such as the radius of gyration, with experimental evidence.

The reported investigations reveal an upper bound for the PEG fraction in the modelled HPEI-PEG polymers. The addition of PEG reduces cytotoxicity, increases solubility, while still ensuring a high efficiency of forming polyplexes with DNA. Useful correlations between the copolymer structure and polyplex properties are observed, along with insights on the dynamics of the formation of hydrogen bonds between the HPEI core and DNA.

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
1. TRANSFERUL GENIC	6
1.1. Transferul genic cu vectori neviralii.....	6
1.2. PEI-PEG folosit ca vector genetic	8
1.3. Terapia genică	10
2. PARAMETRII CHARMM ȘI VALIDAREA LOR.....	12
2.1. Descrierea câmpului de forțe CHARMM.....	12
2.2. Parametrii optimizați pentru PEG și PEI-PEG adiacenți	13
2.3. Validarea parametrilor CHARMM	18
3. METODOLOGIA SIMULĂRILOR.....	22
3.1. Construcția policațiilor HPEI-PEG.....	22
3.2. Modelarea sistemelor biomoleculare.....	24
4. ANALIZA SIMULĂRILOR	26
4.1. Formarea poliplecșilor și limita PEGilării	26
4.2. Stabilitatea și solubilitatea poliplecșilor	28
4.3. Cinetica apei și legăturile de hidrogen.....	30
4.4. Complexarea completă a ADN-ului.....	31
CONCLUZII	34

INTRODUCERE

Policationii sunt importanți pentru transferul genic întrucât formează complecși stabili cu acizii nucleici și facilitează absorbția lor celulară, asigurând un transport sigur și eficient al genelor în celule. Un beneficiu major al polimerilor cationici folosiți ca și vectori genetici neviral este sintetizarea lor versatilă pentru protocoalele specifice livrării genetice. Structura și masa moleculară a acestora poate fi variată ușor pentru obținerea biocompatibilității, stabilității și eficienței de transfer dorite [1].

Polietilenimina (PEI) ramificată are o eficiență puțin crescută în formarea poliplecşilor cu ADN față de PEI liniară, acest fapt fiind confirmat recent și de simulările de dinamică moleculară a grupului nostru de cercetare [2]. Polietilenimina hiper-ramificată (HPEI), având multiple puncte de ramificație, are un impact semnificativ în încercările ulterioare de a forma mai stabil astfel de poliplecși [3]. Sarcina netă pozitivă, rezultată din excesul de protoni din HPEI, determină atracția electrostatică dintre monomerii protonați din PEI și grupările de fosfați din coloana vertebrală a ADN-ului, condensând informația genetică, și astfel permițând transportul sigur în nucleul celulelor. Acest proces este eficientizat folosind protonări diferite [4-6].

Citotoxicitatea indusă de sarcina lanțurilor de PEI poate fi contracarată prin copolimerizarea cu polietilenglicol (PEG), care ajută la reducerea interacțiunilor nespecifice cu alte biomolecule și componente celulare. Fiind un polimer neutru și hidrofilic, PEG-ul îmbunătățește timpul de circulație a poliplecşilor în sânge [7]. După cum se va arăta în continuare, proprietățile poliplecşilor sunt clar influențate de structura policationilor, și nu doar de masa lor moleculară. Întrucât în multe cazuri membrana celulelor este negativă, absorbția compușilor PEI-PEG/ADN pozitivi este mai favorabilă [11].

În proiectarea eficientă a protocoalelor pentru transferul genic, simulările atomistice de dinamică moleculară oferă o rezoluție temporală și structurală încă de neegalat, permițând o înțelegere mai profundă a dinamicii din spatele acestor procese biologice. Pentru a elucida aspecte de relevanță practică a complexării ADN-ului cu HPEI-PEG, precum structura copolimerilor și efectul PEGilării asupra eficienței de condensare, am dezvoltat un câmp de forțe atomistic

CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) pentru PEG, pe care l-am folosit în conjuncție cu câmpul de forțe pentru PEI, dezvoltat anterior de grupul nostru de cercetare, în simulări ample cu poliplecșii HPEI-PEG/ADN solvatați în apă. Parametrii CHARMM obținuți au fost validați de acordul foarte bun al razei de girație, calculată pentru lanțuri liniare de PEG în apă, cu experimentul. S-au observat corelări interesante între proprietățile poliplecșilor și geometria copolimerilor, dezvăluind o limită superioară pentru gradul de PEGilare.

Rezultatele acestei cercetări au fost date spre publicare la revista *Romanian Journal of Physics (ISSN 1221-146X)*, participând de asemenea și la conferința *3rd International Conference on Bioengineering and Polymer Science*, organizată de *The Advanced Polymer Materials Group* de la Universitatea Politehnica din București.

1. TRANSFERUL GENIC

1.1. Transferul genic cu vectori nevirali

Vectorii nevirali sunt compuși sintetici capabili să mimeze comportamentul vectorilor virali în procesul de transfecție. Nu sunt la fel de eficienți ca și omologii lor biologici întrucât solubilitatea, biodegradabilitatea și omogenitatea chimică a acestor polimeri nu este satisfăcătoare în prezent. Infecția virală are mari dezavantaje, fiind citotoxică și imunogenică, nepermițând selectarea exactă a celulelor țintă. Mai mult, sintetizarea polimerilor are un cost mai redus decât folosirea virușilor modificați. Câteva sute de compuși cationici (polimeri, lipide, peptide) au fost sintetizați în ultimii 15 ani, mulți dintre aceștia permițând transfecții eficiente [12].

Alte metode de transfer au fost concepute, precum injectarea directă prin seringă, electroporare (pulsuri de înaltă tensiune de ordinul milisecundelor aplicate asupra celulelor), sistem de particule biolistice, etc., însă aceste metode “fizice” de introducere a ADN-ului în celulă sunt foarte limitate din punct de vedere al eficienței și de multe ori rezultă în necroză.

Editarea genetică a fost extrem de costisitoare până recent când s-a dezvoltat tehnologia CRISPR (Clustered Regularly Interspread Short Palindromic Repeats) [13] care permite extragerea exactă a anumitor gene specifice folosite pentru transferul în alte celule. Ingineria genetică este într-un punct similar astăzi cu tehnologia electronică de acum câteva decenii care era rudimentară comparativ cu prezentul. Astfel, chiar dacă tehnologia genetică este la început, poate fi debutul unei noi revoluții.

Editarea genetică are numeroase beneficii, de la a trata bolile genetice și cancerul, la modificarea embrionului uman, astfel urmând a fi născuți primii oameni modificați genetic. Totuși, tehnologia de a transfera genele nu este infailibilă întrucât se confruntă cu dificultăți mari în prezent, vectorii genetici care trebuie sintetizați și optimizați fiind doar un exemplu.

Ingineria genetică cu vectori nevirali este o abordare în terapia genetică care implică utilizarea vectorilor care nu sunt derivați din virusuri. Acești vectori nevirali pot fi construiți în laborator și utilizați pentru a livra materiale genetice în celulele țintă.

Există mai multe tipuri de vectori neviral utilizați în ingineria genetică, iar două dintre cele mai comune sunt plasmidele și ARN-ul mesager (ARNm). Acești vectori sunt modificați pentru a transporta și exprima gene specifice în celule.

Plasmidele sunt mici molecule circulare de ADN care pot fi introduse în celule. Acestea pot fi manipulate genetic în laborator pentru a conține gene specifice și pentru a exprima proteinele dorite în celulele gazdă. Plasmidele pot fi livrate în celule prin diverse metode, cum ar fi transfecția cu ajutorul unor agenți de transfectare, electrotransfecția sau prin injecție directă în țesuturile țintă.

ARNm este o moleculă transcripțională a ADN-ului care servește ca șablon pentru sinteza proteinelor în celule. În terapia genetică, ARNm poate fi modificat și livrat în celule pentru a instrui celulele să producă proteine specifice. Tehnologia ARNm a avut un avans semnificativ în ultimii ani, fiind utilizată în dezvoltarea vaccinurilor ARNm împotriva COVID-19 și în alte aplicații terapeutice.

Utilizarea vectorilor neviral în terapia genetică prezintă anumite avantaje și dezavantaje. Avantajele includ siguranța sporită, absența potențialului de infectare virală și capacitatea de a transporta molecule de dimensiuni mari, cum ar fi genele mari sau multiple. De asemenea, vectorii neviral pot fi produși în cantități mari și pot fi adaptabili pentru a livra gene în diferite tipuri de celule și țesuturi.

Totuși, există și limitări în utilizarea vectorilor neviral. Eficiența de livrare poate fi mai mică în comparație cu vectorii virali, iar exprimarea genei poate fi mai slabă sau de scurtă durată. De asemenea, vectorii neviral pot declanșa un răspuns imun în organism, ceea ce poate limita eficacitatea tratamentului.

Cu toate acestea, cercetările continuă să dezvolte și să optimizeze vectorii neviral pentru a îmbunătăți eficiența și siguranța terapiei genetice. Utilizarea vectorilor neviral în terapia genetică prezintă un mare potențial în tratarea unor boli genetice și a cancerului și este un domeniu activ de cercetare în știința medicală.

1.2. PEI-PEG folosit ca vector genetic

Transferul genetic cu polietilenimină-polietylenglicol (PEI-PEG) ca vectori genetici este o tehnică utilizată în ingineria genetică pentru a livra materialul genetic în celule. PEI-PEG este o combinație de polimeri, care oferă o structură stabilă și funcționalități specifice necesare pentru a transporta și livra eficient materialul genetic în celule.

PEI, în forma sa cationică, posedă o sarcină electrică negativă datorită prezenței monomerilor C – N – C protonați. Acest fapt determină atracția electrostatică între polimeri și ADN-ul negativ, permițând astfel condensarea acestuia. Structura hiper-ramificată a PEI, fiind mai compactă și mai stabilă față de cea liniară, permite o densitate mai mare a sarcinilor pozitive, rezultând o creștere în încărcarea materialului genetic, o eficiență de transfecție îmbunătățită și o toxicitate redusă. PEG-ul este un polimer neutru din punct de electric, având unitatea de repetiție C – O – C. El se atașează la capetele monomerilor structurii de PEI prin procesul de copolimerizare.

Polimerii trebuie să înglobeze ADN-ul, să îl protejeze împotriva degradării biologice și să îl livreze în nucleul celulei. Utilizarea PEI-PEG ca vector genetic prezintă mai multe avantaje. Polietilenimina are capacitatea de a transporta eficient ADN-ul într-o gamă largă de celule, incluzând și celulele care sunt mai dificil de transfectat cu alte metode. De asemenea, PEI-PEG poate oferi o protecție suplimentară împotriva degradării ADN-ului și poate facilita trecerea barierelor biologice până la livrarea ADN-ului în nucleul celulelor țintă.

Coloana ADN-ului este încărcată negativ datorită prezenței grupurilor de fosfați în nucleotide, astfel purtătorii de ADN au o activitate de transfecție mai ridicată când posedă o sarcină electrică net pozitivă, deci vectorii nevirali trebuie protonați înaintea interacțiunii lor cu ADN-ul. Această necesitate de cationi introduce riscuri mari întrucât sarcina pozitivă interacționează cu plasma din sânge, rezultând reducerea fluxului circulației sângelui. O metodă pentru a remedia această problemă este mascarea sarcinii de suprafață folosind polimeri hidrofilici precum PEG-ul. Acest proces se numește “stealth tehnology” și este o modalitate de a crește viața medie a particulelor in vivo, rezultând o circulație mai bună a sângelui.

Procesul prin care complexul PEI-PEG/ADN pătrunde în celulă se numește endocitoză și presupune internalizarea biopolimerului de către celulă. Bineînțeles, în urma acestui proces complexul trebuie să treacă de membrana celulei unde efectul de PEGilare a PEI oferă, din nou, o eficiență crescută. Acest fapt se datorează corespondenței dintre raza hidrodinamică a PEG-ului și

raza porilor canalelor membranei, ceea ce înseamnă că polimerul difuzează cu axa lungă paralelă cu canalele membranei, trecând de membrana celulei fără să cauzeze daune mari atât celulei, cât și ADN-ului. În general, complexii PEI-PEG/ADN formați posedă o sarcină electrică net pozitivă. Datorită faptului că majoritatea celulelor au o membrană electronegativă, absorbția complexilor pozitivi este mai favorabilă [11].

După ce poliplecșii intră în celule, nanoparticulele sunt încapsulate într-un endozom, de unde materialul genetic trebuie să scape și să ajungă în nucleul celulei, unde procesul de transcripție al genelor are loc. Numeroase procese au loc pentru a realiza evadarea endozomală, care beneficiază din nou de la faptul că potențialul electrostatic al poliplecșilor este pozitiv, întrucât excesul protonilor ajută la creșterea volumului endozomului și presiunii interne, rezultând în rupțura endozomală. În final, după ce poliplecșii sunt despachetați, ADN-ul ajunge în nucleul celulei țintă. ADN-ul conține secvențe promotoare sau alte elemente reglementatoare care pot activa sau inhiba expresia anumitor gene din genomul gazdă. Astfel, ADN-ul transferat poate influența producția de proteine și funcțiile celulare.

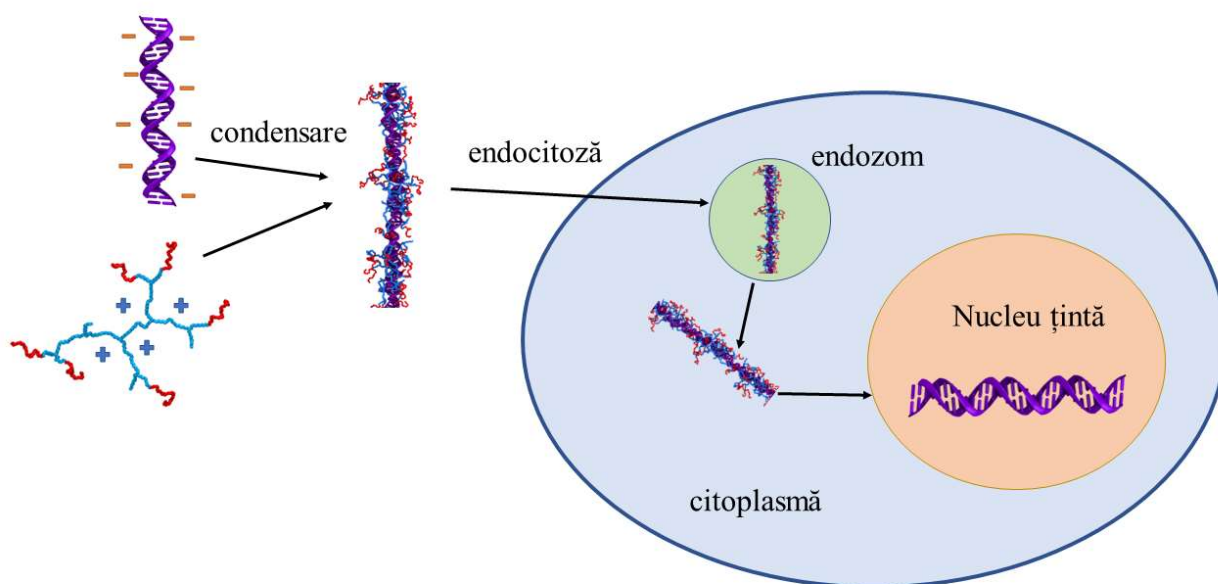


Figura 1.1. Mecanismul din spatele transferului genic cu vectori nevrali.

1.3. Terapia genică

Terapia genică este o ramură a medicinei care utilizează tehnici de inginerie genetică pentru a trata și vindeca boli genetice ereditare sau dobândite. Scopul terapiei genetice este de a corecta sau de a înlocui genele defecte sau absente, astfel încât să se obțină o funcție normală a celulelor și să se trateze sau să se prevină boala [14].

Vectorii genetici sunt vehicule utilizate în terapia genică pentru a livra materialul genetic (de obicei ADN sau ARN) în celulele pacientului. Vectorii genetici neviral, cum ar fi vectorii PEI-PEG, sunt alternativa sigură și eficientă la vectorii viral, având potențialul de a evita riscurile asociate cu utilizarea virusurilor.

Terapia genică a făcut progrese semnificative în ultimii ani și a fost utilizată cu succes în tratarea și chiar vindecarea unor boli ereditare sau dobândite. Câteva exemple notabile de boli care au fost tratate cu succes prin terapia genică se numără: atrofia musculară spinală (SMA), deficiența de adenosindeaminază (ADA-SCID), amauroza congenitală Leber (LCA) și beta-talasemia și anemia falciformă.

În lupta împotriva cancerului, terapia genică reprezintă o abordare promițătoare [15]. La momentul actual, există numeroase strategii pentru tratarea cancerului cu ajutorul transferului genetic. Unele cancere sunt rezultatul mutațiilor sau pierderii funcției genelor supresoare tumorale, care inhibă creșterea și diviziunea celulelor canceroase. Terapia genică poate implica livrarea genelor supresoare tumorale sănătoase în celulele canceroase, astfel încât să poată fi restabilită funcția normală a acestor gene și inhibată creșterea tumorală. Strategia cu genele suicidale presupune introducerea unor gene care induc moartea celulelor canceroase prin diverse mecanisme, cum ar fi apoptoza (moartea celulară programată). Genele suicidale pot fi activate în celulele canceroase, fie prin administrarea unor substanțe specifice, fie prin alte metode de activare specifică.

Este important de menționat că terapia genică pentru cancer se află încă în stadii incipiente de dezvoltare și este necesară mai multă cercetare pentru a optimiza eficacitatea și siguranța acesteia. Unele dintre provocările în terapia genică a cancerului includ obținerea unei distribuții eficiente a vectorilor genetici în tumoră și abordarea rezistenței la tratament. Rezultatele obținute variază în funcție de tipul și stadiul cancerului, iar terapia genică nu reprezintă încă o opțiune de tratament standardizată pentru toate tipurile de cancer. Printre cele mai notabile tipuri de terapii

genice împotriva cancerului se numără: terapia CAR-T, terapia cu virusuri oncolitice, terapia genică cu virusuri adenoasociate (AAV), terapia genică cu CRISPR-Cas9.

Cu toate acestea, rezultatele promițătoare obținute în aceste exemple demonstrează potențialul terapiei genetice în tratarea cancerului și stimulează continuarea cercetărilor în acest domeniu. Cercetările și studiile clinice în domeniu continuă, și există o perspectivă promițătoare că terapia genetică ar putea juca un rol crucial în înfrângerea cancerului.

2. PARAMETRII CHARMM ȘI VALIDAREA LOR

2.1. Descrierea câmpului de forțe CHARMM

Câmpul de forțe prevede un model matematic eficient pentru descrierea dinamicii unui sistem molecular, asignând o funcție a potențialului energetic pentru fiecare atom. Această funcție cuprinde termeni care modelează interacțiunile de legătură dintre atomi (legături, unghiuri, diedrale) și termeni care modelează interacțiunile de nelegătură, precum interacțiunile van der Waals (modelate prin potențialul Lennard-Jones) și interacțiunile electrostatice. În esență, fiecare atom se va mișca în conformitate cu această funcție a energiei potențiale:

$$\begin{aligned}
 V(b, \theta, \chi, q, r) = & \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} k_\chi [1 + \cos(n\chi + \delta)] \\
 & + \sum_{non-bonded} \left(V_{LJ} + \frac{qQ}{\epsilon_r r} \right)
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

În termeni simpli, unghiurile și diedralele sunt modelate de funcții de potențial armonice cu k_b și k_θ fiind constantele de forță și b_0 , respectiv θ_0 valorile de echilibru unde energia este minimizată. Pe de altă parte, energia potențială a diedralelor este descrisă de o sumă de funcții cosinus, în care k_χ este constanta de forță asociată diedralelor, n descrie complexitatea conformației suprafeței energiei potențiale, iar δ este faza (fixată prin convenția CHARMM la 0° sau 180°). V_{LJ} reprezintă potențialul Lennard-Jones, iar q și Q sunt sarcinile parțiale atomice care modelează densitatea electronică dintr-un atom, pentru fiecare pereche de atomi prezentă în simulare.

Am ales să folosesc câmpul de forțe CHARMM întrucât are o gamă largă de proteine, lipide și acizi nucleici parameterizați în baza sa de date. Câmpul de forțe CHARMM permite optimizarea parametrilor prezentați în *Ecuția 1* pentru fiecare sistem molecular specific, oferind astfel

versatilitate în studierea dinamicii din spatele proceselor biologice. Compatibilitatea câmpului de forțe CHARMM cu multe soft-uri de dinamică moleculară îi conferă flexibilitate în modificarea și extinderea parametrilor săi pentru a incorpora noi molecule sau pentru a investiga sisteme chimice și biologice specifice.

2.2. Parametrii optimizați pentru PEG și PEI-PEG adiacenți

Pentru a studia interacțiunea dintre ADN și policationi, într-un pas inițial am dezvoltat un câmp de forțe CHARMM pentru PEG și conectorul PEI-PEG pentru a modela copolimerizarea dintre cei doi polimeri. Astfel, am realizat calcule *ab initio* cuantice în programul Gaussian pentru lanțuri liniare de PEG (trimer, tetramer și pentamer) și pentru un monomer de PEG (cu unitatea monomerică C – O – C) și PEI (cu unitatea monomerică C – N – C) adiacenți, cu grupările terminale C – O – H și C – N – H₂ aferente.

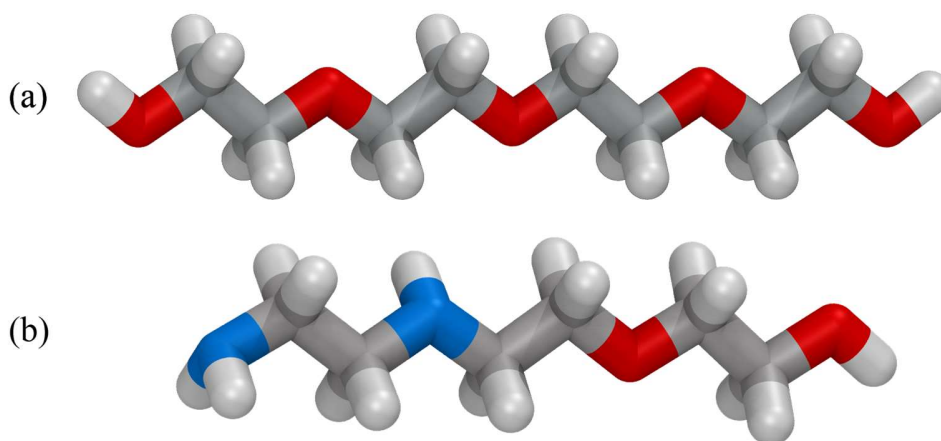


Figura 2.1. Structurile pentru (a) trimerul de PEG și (b) doi monomeri de PEI-PEG adiacenți

Cod culoare: hidrogen (alb), carbon (gri), azot (albastru), oxigen (roșu)

Înainte de a calcula parametrii CHARMM și a optimiza polimerii, trebuie construite moleculele de PEG și PEI. Pentru aceasta am folosit extensia *Molefactory* din programul VMD (Visual Molecular Dynamics). La finalul construcției moleculelor se scriu două fișiere inițiale cu extensiile “.pdb” (Protein Data Bank) care conține informații despre coordonatele atomilor și “.psf” (Protein Structure File) care conține toate informațiile specifice despre molecula studiată, necesare aplicării câmpului de forțe CHARMM unui sistem molecular.

În continuare pe baza acestor două fișiere se construiește fișierul inițial de parametrii (“.par”) în care se asignează parametrii lipsă ai potențialelor van der Waals și Lennard-Jones. Acești parametrii sunt atribuiți fiecărui tip de atom din monomerii de PEG, PEI și grupările terminale pe considerente de simetrie locală, comparând reziduurile ce trebuie optimizate cu cele din bazele de date CHARMM (“par_all36_cgenff.prm”).

Următoarele optimizări (geometrie, sarcini parțiale, legături, unghiuri și diedrale) ale moleculei se realizează folosind extensia fFtk (force field Toolkit) [16] din VMD 1.9.3. [17].

Optimizarea geometriei moleculei presupune calculul *ab initio* al coordonatelor atomilor la care energia este minimă. Se folosește nivelul de teorie MP2 (teoria perturbației Møller – Plesset de ordinul 2). Astfel, se generează un fișier de lucru pentru programul Gaussian [18] care va executa această optimizare și se obține fișierul “.pdb” final, cu coordonatele optimizate pentru polimerii studiați.

Sarcinile parțiale atomice se obțin din calcule cuantice și au ca scop reproducerea interacțiunilor cu moleculele de apă TIP3P. Se folosește un nivel de teorie modest: HF/6-31G*. HF este un acronim pentru Hartree-Fock, iar 6-31G* denotă faptul că se folosește o combinație liniară de 6 primitive gaussiene pentru fiecare orbital 1s (STO). Seturile cuantice formate din energiile de interacțiune și din momentele de dipol sunt folosite pe post de date țintă pentru procedurile iterative următoare.

Datele țintă de interacțiune a apei sunt obținute prin probarea pozițiilor optimizate a unei singure molecule de apă față de raza de interacțiune a ligandului. Raza de interacțiune presupune ca un atom să fie “accesibil” apei, adică apropierea unei molecule de apă de ligand să nu fie obstrucționată de legăturile de atomi adiacente.

Există două tipuri de interacțiuni între ligand și moleculele de apă: legătură de hidrogen donator, care interacționează mai favorabil cu atomul de oxigen din apă și legătură de hidrogen acceptor, care interacționează mai favorabil cu atomul de hidrogen din apă.

În continuare se optimizează iterativ sarcinile parțiale atomice la nivel de mecanică moleculară până când se obține convergența lor la datele țintă cuantice. Este de menționat faptul că atomii de hidrogen nepolari sunt excluși din optimizare întrucât sarcina lor parțială este menținută constant la valoarea de +0,09 u.a. prin convenția CHARMM. În final, se obține fișierul actualizat PSF, cu sarcinile parțiale optimizate (vezi *Tabelul 2.1.*).

Pentru monomerii PEI și PEG adiacenți s-a impus ca sarcinile parțiale atomice să rămână neschimbate de la monomerii deja optimizați ai polimerilor omogeni.

Tabel 2.1.

Sarcinile parțiale optimizate pentru atomii din coloana vertebrală a lanțurilor de PEG

Atom	q [u.a.]
O	- 0.316
C	- 0.022

Optimizarea legăturilor și unghiurilor se realizează prin potrivirea energiei de distorsiune cuantică (QM) și moleculară mecanică (MM), calculate din matricile hessiene în coordonatele interne. Matricea hessiană caracterizează curbura locală a suprafeței energiei potențiale folosind aproximația armonică.

Matricile hessiene cuantice se obțin din calcule vibraționale folosind programul Gaussian, iar matricile mecanice moleculare se obțin impunând mici distorsiuni în coordonatele interne și evaluând variația energiei de ordinul 2. Energia totală QM și MM de distorsiune se caracterizează prin următoarea ecuație:

$$\Delta E_i = \frac{1}{2} \sum_j \frac{\partial^2 E}{\partial q_i \partial q_j} \delta q_i \delta q_j \quad (2.2.)$$

unde, q_i este coordonata internă i . Aceste energii sunt potrivite printr-un proces iterativ, realizându-se mai multe şiruri de convergenţă, rezultând în final parametri optimizaţi ai legăturilor şi unghiurilor (vezi *Tabelul 2.2.*).

Datele cuantice ţintă se obţin prin calculul hessienei la nivelul de teorie MP2/6-31G*, urmărind convergenţa funcţiei de merit. În esenţă, se caută cea mai bună modelare a comportamentului cuantic al lanţurilor de polimeri prin datele molecular mecanice.

Tabel 2.2.

Parametrii optimizaţi pentru atomii din coloana vertebrală a PEG-ului şi PEI-PEG adiacenţi. Atomii adnotaţi cu steluţă aparţin monomerilor de PEI.

Legătura	k_b [$\frac{\text{kcal}}{\text{mol} \cdot \text{Å}^2}$]	b_0 [Å]	Unghiul	k_θ [$\frac{\text{kcal}}{\text{mol} \cdot \text{rad}^2}$]	θ_0 [grade]
O – C	351.47	1.41	O – C – C	65.89	107.17
C – C	312.22	1.51	C – O – C	58.66	109.94
C – C*	300.93	1.51	O – C – C*	70.78	107.64
			C – C* – N*	70.46	109.94

Optimizarea diedralelor sau a “unghiurilor de torsiune” se realizează prin potrivirea gropilor de potenţial periodice caracterizate de constanta de forţă k_χ , multiplicităţile n şi defazajul δ . Metoda matricilor hessiene nu este aplicabilă şi pentru diedrale întrucât ea modelează suprafeţele de energie a coordonatelor interne în punctele de minim, pe când la optimizarea diedralelor trebuie luate în calcul şi punctele în care energia este mare, iar aproximaţia armonică eşuează în a oferi rezultate precise.

Defazajul δ este fixat la valorile 0° şi 180° prin convenţia CHARMM, iar multiplicităţilor n le sunt atribuite valori întregi diferite de zero bazate pe considerente de simetrie locală.

Din nou, optimizarea diedralelor presupune minimizarea diferențelor dintre suprafețele energiei de torsiune QM (calculată la nivel de teorie MP2/6-31G*) și MM pentru toate diedralele scanate. Procesul iterativ de optimizare a diedralelor presupune alegerea convenabilă a multiplicățiilor, urmărindu-se convergența erorii pătratice medii a energiei de torsiune.

Energia potențială a diedralelor este o funcție periodică. Astfel, scanările în Gaussian sunt realizate modificând χ între -90° și $+90^\circ$ cu un pas de 15° .

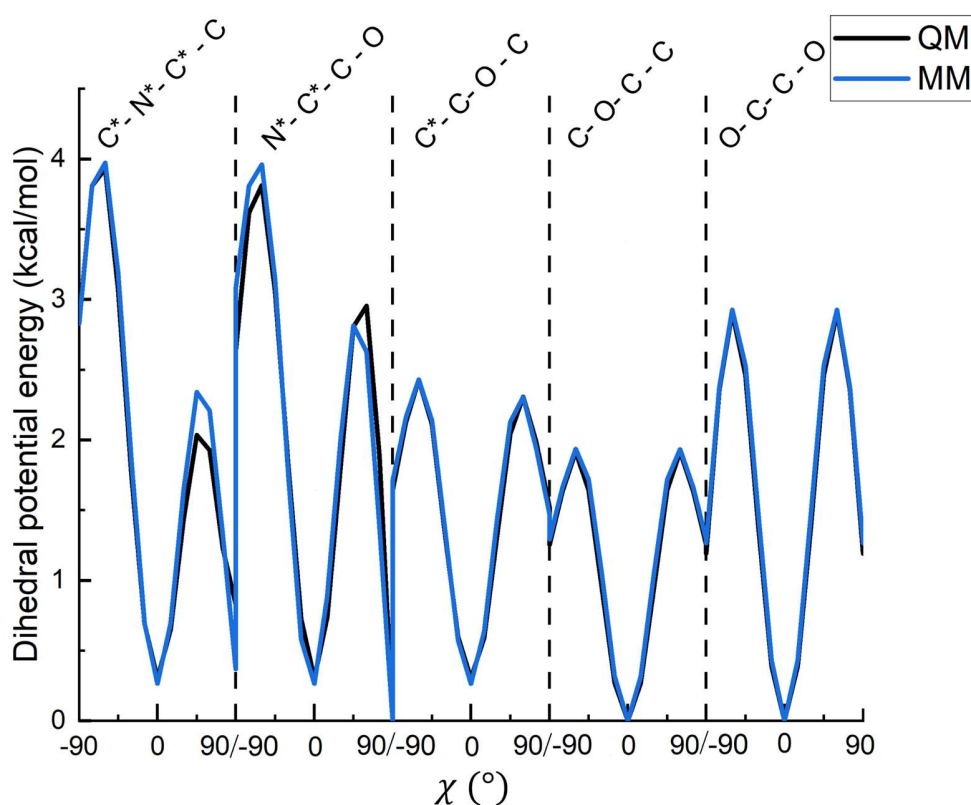


Figura 2.2. Conformația energetică pentru diedralele atomilor din coloanal vertebrală a PEG-ului și PEI-PEG adiacenți. Atomii adnotați cu steluță aparțin monomerilor de PEI.

Analog cu optimizările unghiurilor și legăturilor, se realizează mai multe șiruri de convergență, analizând pliarea datelor molecular mecanice la cele cuantice. După cum se observă în Figura 3, conformația MM urmează foarte bine conformația QM, având o eroare pătratică medie de aproximativ 0,5%. În *Tabelul 2.3.* sunt reprezentați parametri optimizați ai diedralelor.

Tabel 2.3.

Parameterii diedralelor optimizați pentru atomii din coloana vertebrală a PEG-ului și PEI-PEG adiacenți. Atomii adnotați cu stea aparțin monomerilor de PEI.

Diedral	k_{χ} [kcal/mol]	n [multiplicitate]	δ [grade]
O – C – C – O	2.899	1	180
C – O – C – C	0.880	3	0
N* – C* – C – O	1.305	2	0
C* – C – O – C	0.983	3	0
C* – N* – C* – C	0.252	3	0

Parameterii trimerului de PEG au reprodus cele mai bune minime energetice pentru tetramer și pentamer. Astfel, considerând aditivitatea câmpului de forțe CHARMM și folosind un raționament inductiv, parameterii trimerului de PEG se folosesc pentru lungimi arbitrare a lanțurilor de PEG.

2.3. Validarea parametrilor CHARMM

Pentru a testa validitatea parametrilor obținuți, am realizat relaxări de structură folosind NAMD [20], la o temperatură de 0 K, pentru un copolimer $H_2NC - PEI - PEG - COH$. După cele 100 ps ale relaxării, coordonatele atomice s-au schimbat doar 3,79% în medie față de structura optimizată cuantic.

Pentru parametrii obținuți pentru PEG, am calculat raza de girație pentru polimeri liniari solvatați în apă, la o temperatură de 300 K. Timpul total pentru aceste simulări este 10 ns, însă doar ultimele 8 ns au fost considerate pentru calculul razei de girație, asigurând astfel termalizarea lanțurilor de polimeri.

Raza de girație este o măsură a cât de întinse sunt conformațiile polimerilor relativ la centrul lor de masa:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n m_i (r_i - r_{CM})^2}{\sum_{i=1}^N m_i}} \quad (2.3.)$$

unde R_g – raza de girație, n – numărul total de atomi, m_i – masa atomului, r_i – distanța de la atom în origine, r_{CM} – distanța de la centrul de masă în origine.

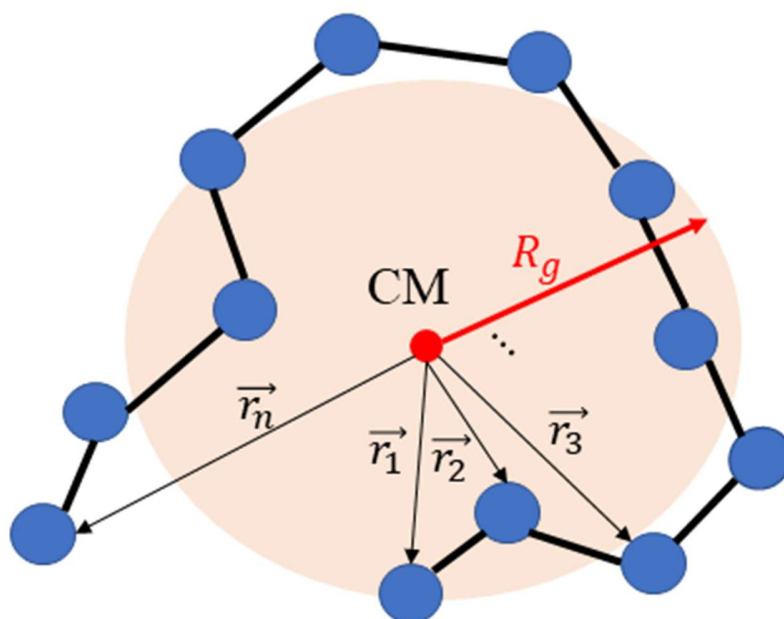


Figura 2.3. Ilustrație pentru calculul razei de girație. Atomii polimerului sunt reprezentați cu discuri albastre, n fiind numărul total de atomi.

Pentru a observa o dependență a razei de rotație cu masa moleculară a polimerilor, am reprezentat grafic logaritmul natural al razei de rotație în funcție de logaritmul natural al masei moleculare a lanțurilor liniare de PEG.

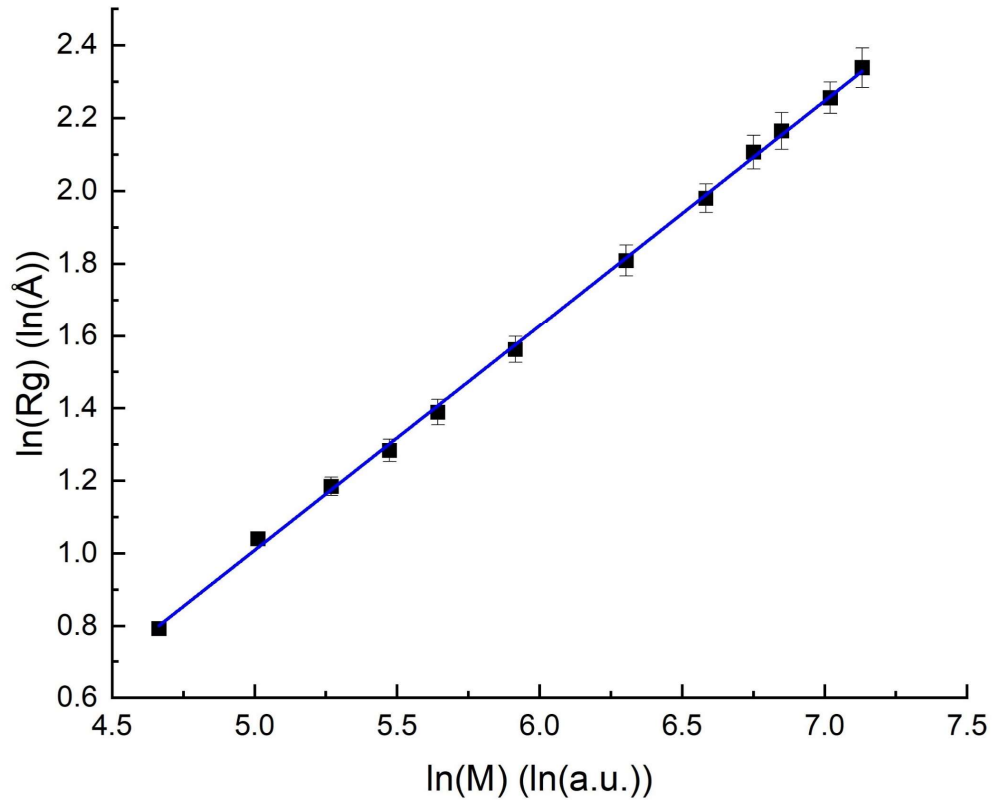


Figura 2.4. Graficul log-log al razei de rotație și masei moleculare a lanțurilor liniare de PEG.

Figura 5 arată că raza de rotație este proporțională cu masa moleculară ridicată la puterea egală cu panta funcției liniare de fitare:

$$R_g \propto M^{0,619 \pm 0,006} \quad (2.4.)$$

Exponentul obținut în *Ecuția 4* se numește *exponentul Flory* [21]. Pentru un model ideal de polimer, exponentul Flory are o valoare egală cu $1/2$. Faptul că exponentul Flory obținut pentru PEG are o valoare mai mare decât cea a unui model ideal de polimeri, indică faptul că PEG-ul are conformații mai extinse în apă la temperatura camerei.

Rezultatul obținut pentru exponentul Flory este într-un acord foarte bun cu experimentul. Folosind *small-angle neutron scattering*, Le Coeur et al. [22] a determinat un exponent pentru PEG egal cu 0,588. Devanand et al. [23] folosind măsurători de *elastic light scattering*, a determinat valoarea exponentului Flory pentru PEG egală cu $0,583 \pm 0,031$.

3. METODOLOGIA SIMULĂRILOR

3.1. Construcția policationilor HPEI-PEG

Parametrii optimizați pentru PEG și PEI-PEG adiacenți i-am folosit în conjuncție cu câmpul de forțe dezvoltat de Beu și Terteci-Popescu [2] pentru PEI ramificat cu trei brațe (*branched polyethyleneimine* – BPEI). Astfel, am construit un nucleu de PEI hiper-ramificat care conține 7 BPEI cu trei monomeri pe fiecare braț, unul fiind protonat.

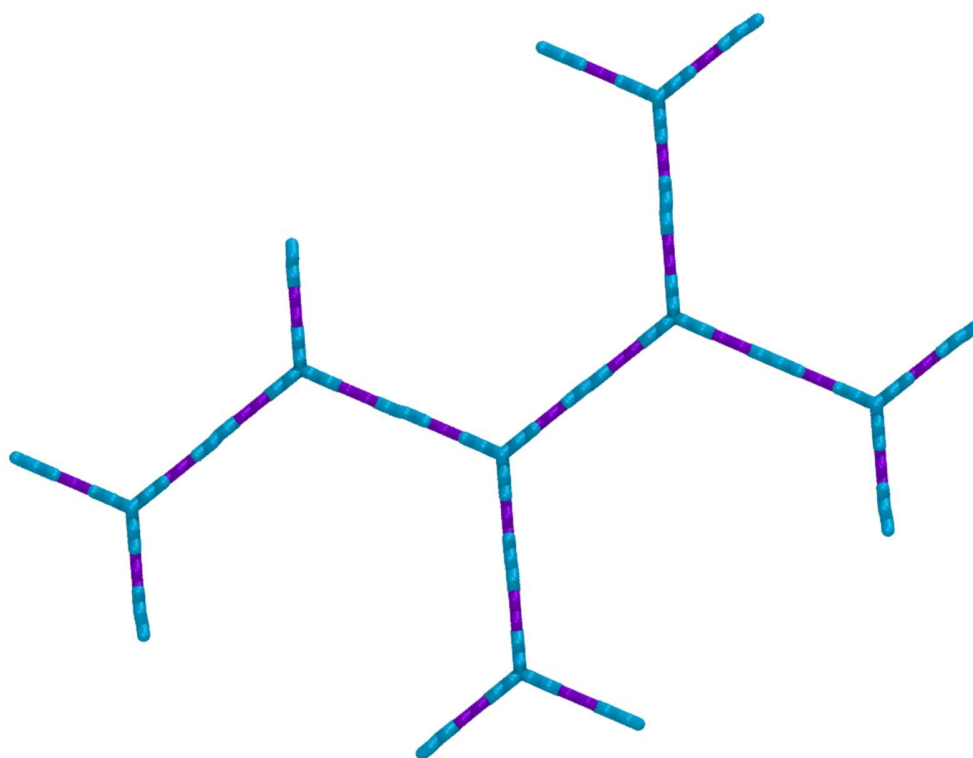


Figura 3.1. Nucleul de HPEI; monomerii neprotonați (albastru deschis) și monomerii protonați (violet)

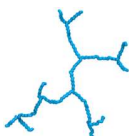
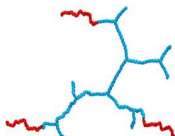
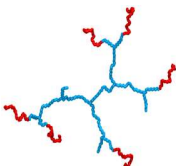
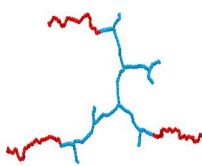
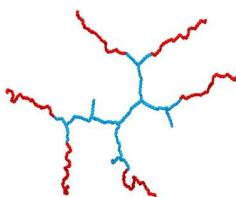
Nucleul de HPEI conține 7 puncte de ramificație cu un total de 70 de monomeri, dintre care 21 sunt protonați, conferindu-i o sarcină electrică de $+21e$. Acestui nucleu de HPEI i-am atașat multiple lanțuri de PEG de diferite lungimi, astfel modelând copolimerii HPEI-PEG folosiți ca vectori genetici nevirali.

Toți policationii au fost construiți folosind *Python*, definind clase de reziduuri care conțin un monomer sau grupările terminale ale polimerilor. Fiecare reziduu conține informații despre toate coordonatele atomilor și tipurile lor.

Pentru a studia efectul PEGilării, am menținut structura nucleului de HPEI constantă, modificând doar numărul de brațe de PEG și lungimea lor. Astfel, se obțin policationi cu geometrii și mase moleculare diferite.

Tabel 3.1.

Numele, compoziția masa moleculară și structura copolimerilor. HPEI este reprezentat cu albastru, iar PEG cu roșu.

Numele	HPEI	HPEI-PEG(10)3	HPEI-PEG(9)6	HPEI-PEG(20)3	HPEI-PEG(18)6
Conținut PEG	0%	31%	45%	47%	61%
Masa moleculară	3,4 kDa	4,5 kDa	5,7 kDa	5,9 kDa	8 kDa
Geometria copolimerilor					

HPEI-PEG(x)y se referă la o structură care conține y brațe de PEG cu lungimea de x monomeri. HPEI este policationul de control, eficiența celor 4 copolimeri fiind comparată atât între ei, cât și față de HPEI.

3.2. Modelarea sistemelor biomoleculare

ADN-ul a fost modelat concatenând trei dodecameri Drew-Dickerson, având catena A de forma [CGCGAATTCGCG]₃. Astfel, ADN-ul are o masă moleculară egală cu 19,6 kDa și o sarcină electrică de -62e provenind de la cele 62 grupări fosfat. Parametrii pentru câmpul de forte au fost preluați din bazele de date CHARMM (“par_all36_na.prm”).

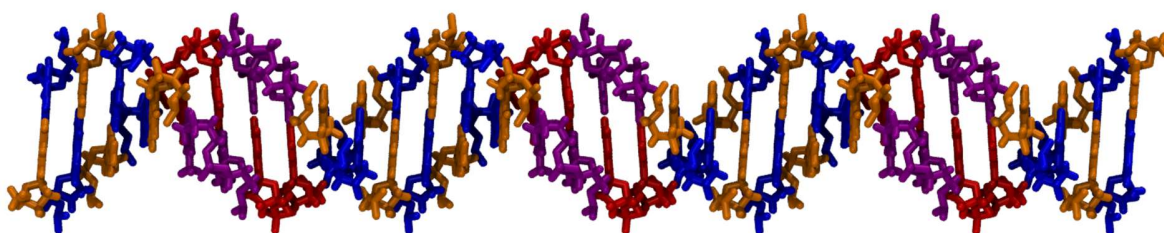


Figura 3.2. Modelul ADN folosit.

Cod culoare: guanină (albastru), adenină (roșu), citozină (oranj), timină (violet).

Simulările au fost rulate folosind GROMACS [25] pe o placă video NVIDIA Quadro RTX 4000, cu un processor Intel Core i9 11900K @ 3,50 GHz și 16 GB RAM.

Un total de 6 simulări au fost rulate, din care cinci simulări conțin 3 policationi și ADN, în timp ce ultima simulare este atribuită celui mai bun și eficient polication din cei 5 (vezi *Tabelul 3.1.*), acomodând 4 policationi.

Pentru a nu favora complexarea ADN-ului, policationii sunt plasați perpendicular pe ADN în configurația inițială. Sistemele solvate cu apă TIP3P sunt neutralizate adăugând un ion de clor.

Înainte de cele 20 ns ale fiecărei traiectorii, este realizată o relaxare de structură la 0 K, după care are loc procesul de termalizare a sistemelor, temperatura fiind încet ridicată la 300 K, menținând presiunea constantă la 1 atm și minimizând energia potențială la fiecare pas de 2 fs.

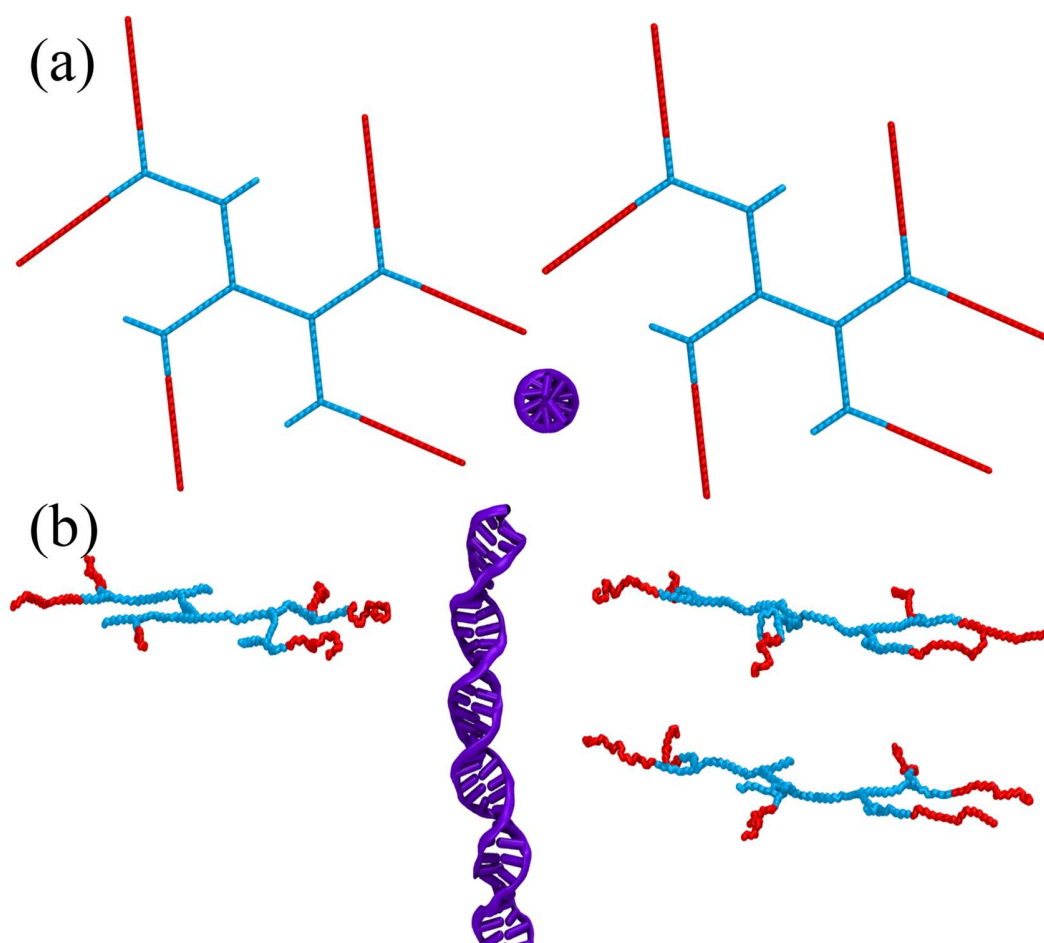


Figura 3.3. Un exemplu de configurație inițială pentru HPEI-PEG(9)6. (a) Structura “înghețată” la 0 K și la $t = 0$ ns (cadrul 0); (b) Structura la 300 K și $t = 10$ fs (cadrul 1).

Cel mai mare sistem molecular analizat, HPEI-PEG(18)6/ADN conține aproximativ un milion de atomi, având dimensiunile cutiei de apă $250 \times 380 \times 110$ Å. Timpul real pentru rularea acestei simulări a durat puțin peste o săptămână. Este important de menționat faptul că dimensiunea pe axa z este aleasă ca fiind 110 Å pentru a acomoda perfect ADN-ul, asigurând o interacțiune adecvată cu imaginile periodice, astfel simulând practic un lanț infinit de ADN.

4. ANALIZA SIMULĂRILOR

4.1. Formarea poliplecşilor și limita PEGilării

Datorită atracției electrostatice dintre monomerii protonați de PEI și radicalii fosfați din catenele ADN-ului, policationii difuzează către ADN. După câteva nanosecunde, majoritatea copolimerilor ajung la ADN, formează poliplexul și se stabilizează acolo până la sfârșitul simulărilor.

Analiza interacțiunii dintre ADN și policationi se face secvențial, adresând diferite aspecte legate de structura și masa moleculară, realizând o comparație detaliată între vectorii genetici utilizați (vezi *Tabelul 3.1.*). Se va evalua influența PEGilării asupra stabilității și solubilității complecșilor moleculari formați. Poliplecșii care nu respectă cerințele minime pentru protocoalele de livrare genetică, nu sunt consirați pentru analiza completă.

Figura 3 schematizează comportamentul ADN-ului care interacționează cu trei policationi în cele cinci simulări conduse. După cum se observă, în cazul particular cu HPEI-PEG(18)6 doar doi policationi au reușit să complexeze ADN-ul. În comparație cu ceilalți policationi, HPEI-PEG(18)6/ADN nu a reușit să dețină o sarcină net pozitivă, indicând o limită superioară pentru gradul de PEGilare. Acest comportament evidențiază importanța geometriei și conținutului de PEG asupra complexării ADN-ului, dat fiind faptul că supra-încărcarea ADN-ului (rezultarea unei sarcini pozitive din negative) este crucială pentru multe dintre aplicațiile transferului genic.

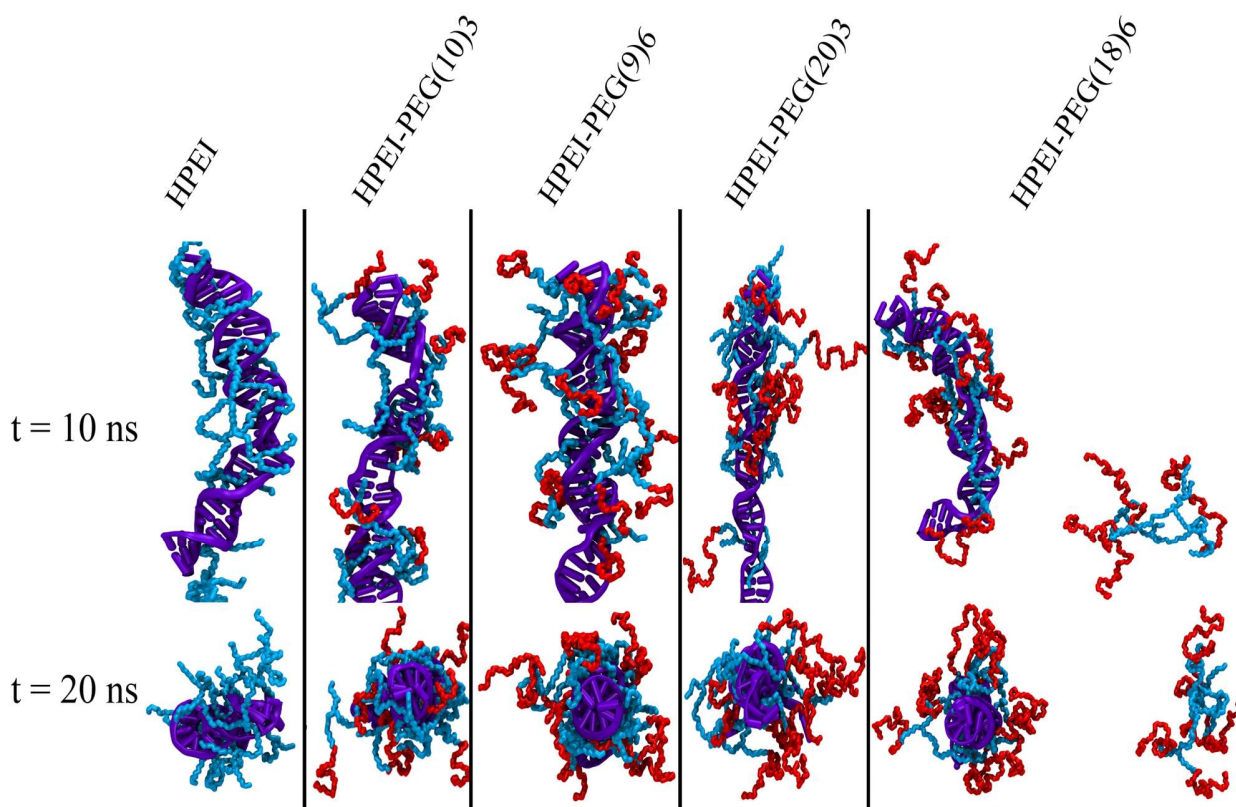


Figura 4.1. Capturi ale simulărilor la cadrul median și cel final (10 ns și respectiv 20 ns) pentru cele cinci sisteme studiate de ADN-copolimeri. ADN-ul este reprezentat cu violet, HPEI cu albastru și PEG cu roșu.

Din cauza faptului că policationii HPEI-PEG(18)₆ nu au reușit să supra-încarce ADN-ul, sunt prin urmare excluși din analiza următoare. Însă, este important de menționat faptul că există protocoale specifice de țintire a unor celule specifice pentru livrarea materialului genetic care necesită poliplecși negativi. Cu toate acestea, cazul simulării cu HPEI-PEG(18)₆ sugerează faptul că gradul de PEGilare influențează complexarea ADN-ului, și deci poate controla sarcina electrică netă a acestuia.

4.2. Stabilitatea și solubilitatea polipecșilor

Abilitatea copolimerilor de a condensa ADN-ul este caracterizată de densitatea de probabilitate de localizare $P_{N^+}(r)$ a azotului protonat relativ la atomii de fosfor. Aceasta este obținută normalizând distribuția radială definită astfel [26]:

$$g(r) = \frac{n(r)}{4\pi r^2 \Delta r \cdot \frac{N_1 N_2}{V}} \quad (4.1.)$$

În esență, $g(r)$ este raportul dintre numărul mediu de perechi de atomi găsite la r într-o coajă de grosime Δr (considerată 0.1 Å) și numărul mediu de perechi de atomi găsiți în același volum, presupunând o configurație omogenă și izotropă a atomilor. În acest caz particular, N_1 este numărul azoților protonați, N_2 numărul fosfaților și V volumul cubului de apă. Este foarte important de menționat faptul că diferența dintre $g(r)$ și $P(r)$ constă doar în factorul de normalizare. $P(r)$ este obținut impunând convergența la 1 a integralei de sub $g(r)$ pentru un r suficient de mare.

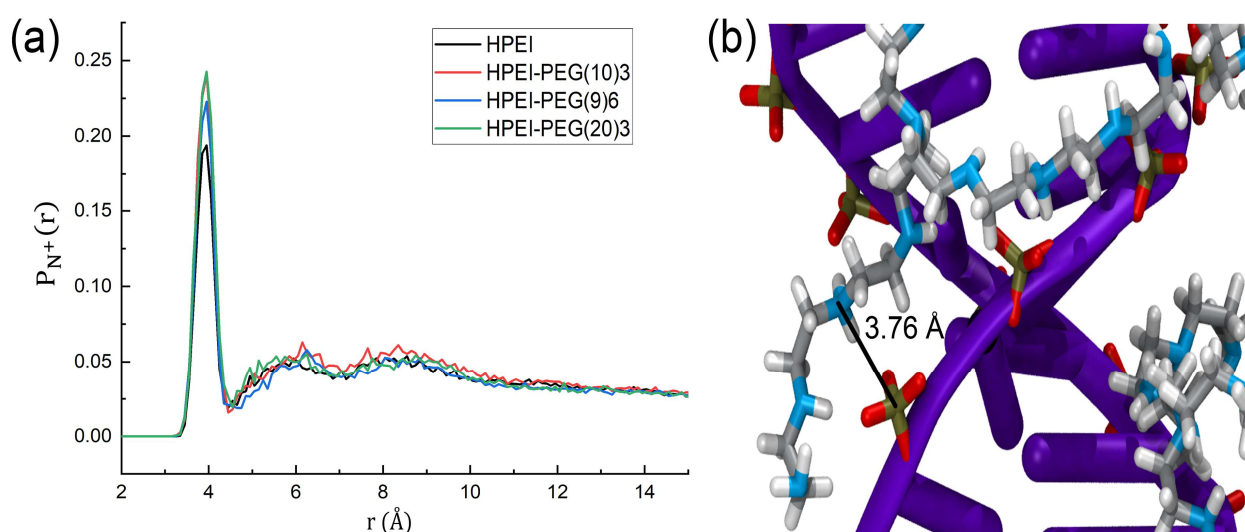


Figura 4.2. Interacțiunea dintre HPEI și ADN. (a) Densitatea de probabilitate de localizare $P_{N^+}(r)$ azoții protonați relativ la fosfați. (b) vedere în apropiere a HPEI în jurul ADN-ului.
Cod culoare: carbon (gri), azot (albastru), oxygen (roșu), fosfor (ocru), hydrogen (alb) și ADN (violet).

Toate cele patru sisteme cu ADN-policationi arată o bandă pronunțată în jurul a 4 Å, demonstrând abilitatea HPEI de a condensa ADN-ul. Lărgimea foarte mică a densității de probabilitate sugerează o mobilitate foarte redusă pentru HPEI în jurul ADN-ului și evidențiază formarea legăturilor de hidrogen. Interesant este faptul că toate sistemele PEGilate arată o interacțiune mai puternică cu radicalii fosfați. Specific vorbind, policationii cu trei brațe de PEG în structura lor par să formeze poliplecși mai favorabil decât HPEI sau HPEI-PEG(9)6.

Distribuția lanțurilor de PEG în jurul ADN-ului este caracterizată de densitatea de probabilitate locală a atomilor de oxigen relativ la atomii de fosfor, notată $P_O(r)$. Mai mult, pentru a investiga interacțiunea copolimerilor cu apa, funcția de distribuție radială $g_w(r)$, a moleculelor de solvent în jurul coloanelor vertebrale a HPEI și respectiv PEG este calculată.

Figura 5(a) arată o distribuție mult mai largă și mai puțin structurată a lanțurilor de PEG în jurul ADN-ului în comparație cu HPEI (vezi Figura 4.2.), sugerând un comportament “de scut” pentru PEG în jurul ADN-ului. În particular, HPEI-PEG(20)3 are cea mai largă și deplasată la dreapta distribuție. Acest fapt îi conferă ADN-ului o protecție crescută împotriva interacțiunii cu alte biomolecule, fiind probabil să rezulte într-un timp de circulație în sânge *in vivo* mai lung a poliplexului.

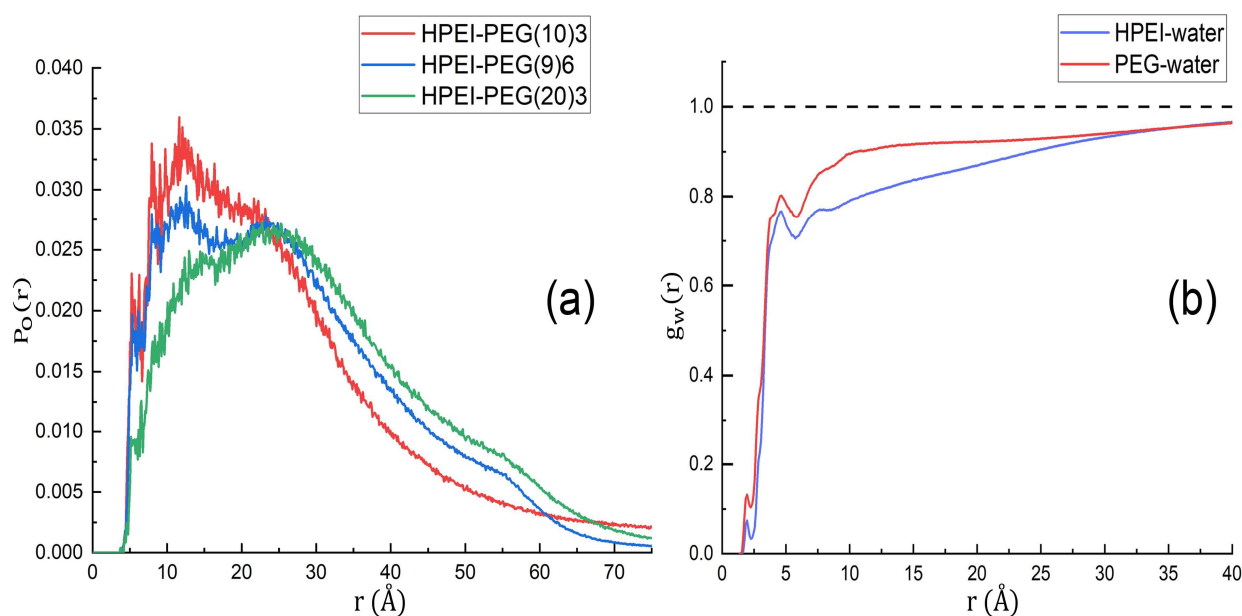


Figura 4.3. Distribuția PEG și interacțiunea cu apa. (a) Probabilitatea de densitate de localizare $P_O(r)$ a atomilor de oxigen relativ la fosfați. (b) Funcția de distribuție radială $g_w(r)$ a apei în jurul lanțurilor de HPEI și respectiv PEG.

Funcțiile de distribuție radială a moleculelor de apă (vezi Figura 4.3.b) revelează solubilitatea crescută a lanțurilor de PEG în comparație cu HPEI. Fiecare profil a funcțiilor prezintă două maxime locale, după care tind asimptotic la 1. Primul maxim, în jurul a 2 Å, corespunde legăturilor de hidrogen dintre moleculele de apă și polimeri. Al doilea maxim, în jurul a 3,5 Å, corespunde atât interacțiunilor mai slabe dintre polimeri și apă, cât și legăturilor de hidrogen dintre apă și apă.

La fiecare distanță particulară, în special în zona 5 – 30 Å, PEG-ul este mai hidrofilic decât HPEI, având mai multe molecule de apă în jurul său. Acest fapt corelează foarte puternic cu distribuția PEG în jurul ADN-ului, și demonstrează că solubilitatea crescută se datorează conformației mai extinse a PEG-ului în jurul ADN-ului.

4.3. Cinetica apei și legăturile de hidrogen

Pentru a analiza în continuare dinamica din spatele complexării ADN-ului cu policationi, dependența învelișului de hidratare a poliplecșilor (ADN și policationi) și numărul de legături de hidrogen formate între HPEI și ADN a fost măsurat. Moleculele de apă au fost considerate în proximitatea poliplecșilor pentru distanțe mai mici de 3 Å. Ca și valori limită pentru numărarea legăturilor de hidrogen, am considerat 4 Å pentru distanța donor-acceptor și 30° pentru unghiul donor-hidrogen-acceptor.

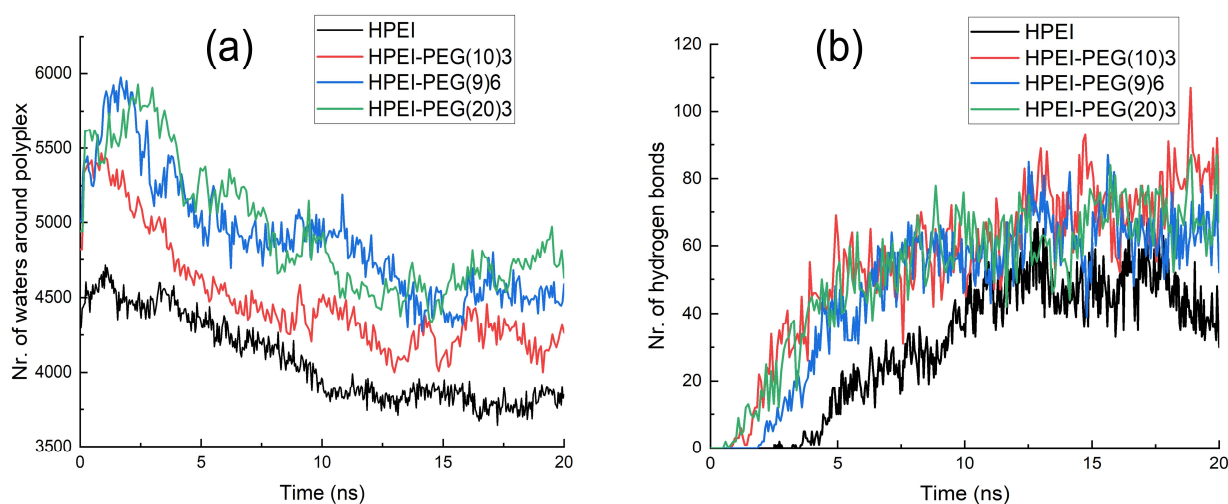


Figura 4.4. Cinetica apei și legăturile de hidrogen. (a) Numărul moleculelor de apă în jurul poliplecșilor. (b) Numărul legăturilor de hidrogen formate între HPEI și ADN.

Pe măsură ce se formează poliplexul, moleculele de apă sunt expulzate gradual din vecinătatea acestora, concomitent cu creşterea numărului legăturilor de hidrogen. Astfel, se explică cum legăturile de hidrogen asistă în stabilizarea compuşilor. Pentru sistemele biomoleculare analizate, cvasi-echilibrul este atins după aproximativ 10 ns.

Copolimerii HPEI-PEG prezintă o solubilitate mai bună comparativ cu HPEI, datorită abundenţei moleculelor de apă în jurul poliplecşilor. Este rezonabil să concludem că structurile copolimerice cu un conţinut crescut de PEG au o solubilitate crescută. În limita fluctuaţiilor statistice, comportamentul moleculelor de apă este similar pentru sistemele HPEI-PEG(20)3 şi HPEI-PEG(9)6, sugerând că solubilitatea are o dependenţă mai puternică în masa moleculară a PEG-ului, decât în geometria copolimerilor. Este interesant de notat faptul că învelișul de hidratare are fluctuații mai mari pentru HPEI-PEG decât HPEI, întrucât PEG are o mobilitate mai mare în jurul ADN-ului.

Din nou, nucleele de HPEI PEGilate prezintă o stabilitate crescută datorită legăturilor de hidrogen mai numeroase. Majoritatea acestor legături se formează între oxigenii polari din radicalii fosfați ca acceptori, și atomii din coloana vertebrală din HPEI ca donori. Este important de menționat faptul că atracția electrostatică este forța primară din spatele formării poliplecşilor, în timp ce legăturile de hidrogen ajută la stabilizarea acestora.

Până acum, abilitatea HPEI-PEG(20)3 de a condensa ADN-ului și de a forma cel mai mare înveliș de hidratare, îl face cel mai promițător vector neviral pentru transferul genic. Astfel, cea de-a șase simulare, în care este analizată interacțiunea ADN-ului cu patru policationi, îi revine lui HPEI-PEG(20)3. Această simulare este discutată în următorul subcapitol.

4.4. Complexarea completă a ADN-ului

Pentru a evalua saturația ADN-ului cu policationi, un sistem compus din patru copolimeri HPEI-PEG(20)3 și ADN este analizat. În esență, numărul maxim de policationi care interacționează cu ADN-ul este investigat.

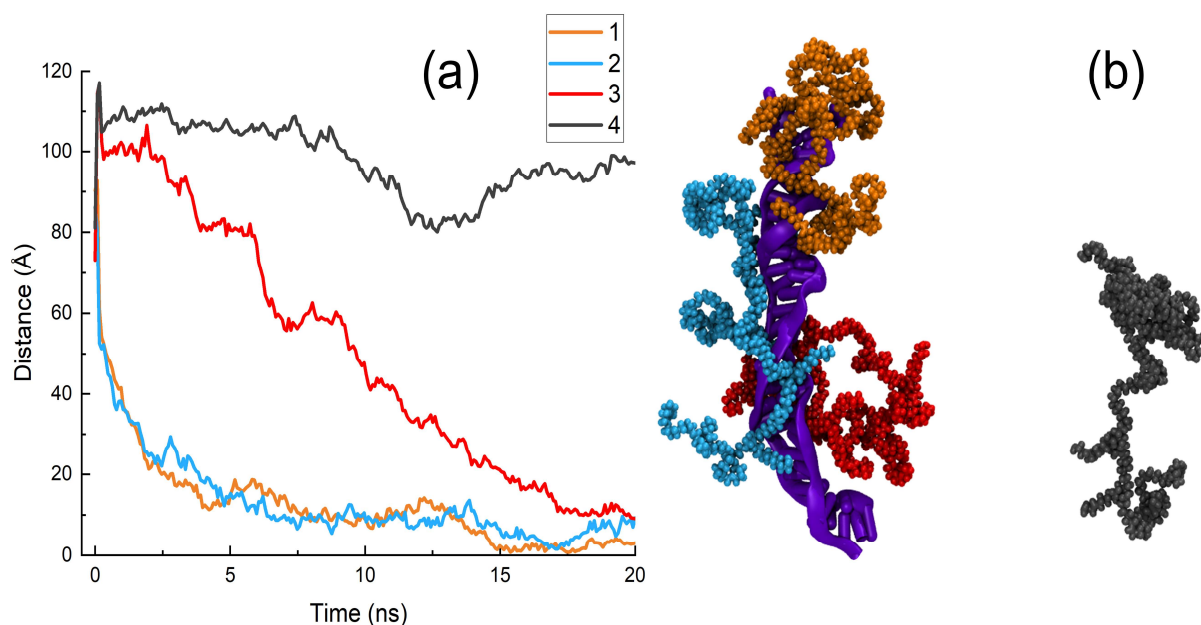


Figura 4.5. Patru HPEI-PEG(20)3 interacționând cu ADN-ul. (a) Dependența temporală a centrelor de masă a policationilor relativ la ADN. (b) Ultimul cadru al simulării. Cei trei policationi activi sunt 1 (oranj), 2 (albastru), 3 (roșu) și policationul inactiv este 4 (gri închis).

Pentru fiecare copolimer individual care interacționează cu ADN-ul, distanța a fost măsurată între centrul lor de masă și radicalul fosfat care prezintă cea mai apropiată interacțiune. În cazul copolimerului care nu interacționează cu ADN-ul, distanța a fost măsurată relativ la centrul de masă al ADN-ului.

După ce policationii 1 și 2 ajung la ADN, potențialul electrostatic din jurul ADN-ului devine considerabil mai puțin negativ. Ca și consecință, policationul 3 suferă o difuzie mai lentă, și, pe măsură ce se apropie de ADN, marchează momentul în care poliplexul trece pragul de la negativ la pozitiv, realizând supra-încărcarea ADN-ului.

Având în vedere că policationul 4 nu interacționează, complexarea completă a ADN-ului se atinge la $N/P = 3.39$, cu N fiind numărul de azoți protonați și P numărul de fosfori. Acest raport caracterizează saturația ADN-ului cu vectori nevrali.

Într-un sens mai general, în timp ce ADN-ul tinde să se neutralize, atrage numeroși copolimeri cationici. După ce ADN-ul este saturat, nu mai interacționează cu alți policationi din soluție.

Aceste rezultate sunt într-un acord foarte bun cu experimentele realizate de Mao et al. [27], care a măsurat un raport N/P egal cu 3 pentru structuri de PEI cu numeroase puncte de ramificație, având un conținut de PEG de 50%. De asemenea, au concluzionat că vectorii genetici cu grade de PEGilare ridicate și lanțuri scurte de PEG sunt incapabili să protejeze acizii nucleici împotriva degradării. Simulările de dinamică moleculară realizate de Ziebarth et al. [28], în care lanțuri lineare de PEI sunt adăugate secvențial lângă ADN, arată o valoare de 3,5 pentru raportul N/P .

CONCLUZII

Această cercetare are ca scop demonstrarea influenţei geometriei copolimerilor HPEI-PEG asupra comportamentului şi proprietăţilor poliplecşilor. Structurile cu un conţinut ridicat de PEG şi cu un grad de PEGilare mare sunt incapabile să realizeze supra-încărcarea ADN-ului, care este crucială pentru majoritatea protocoalelor pentru transferul genic. Totuşi, implicaţiile acestui fapt sunt că PEG-ul poate influenţa raportul N/P , care poate trebuie ajustat în acord cu numeroşi factori, incluzând tipul celului specifice care trebuie targetate.

Un rol fundamental al PEG-ului este de a îmbunătăţi solubilitatea, care se observă din funcţiile de distribuţie radială a PEG-ului în comparaţie cu HPEI şi de interacţiunile apropiate mai numeroase a moleculelor de apă în jurul poliplecşilor PEGilaţi. Formând un scut hidrofilic, după cum se vede din distribuţia de probabilitate de localizare a PEG-ului în jurul ADN-ului, poliplecşii dobândesc o protecţie îmbunătăţită împotriva degradării. Corelarea dintre distribuţia lanţurilor de PEG şi funcţiile de distribuţie radială a apei demonstrează că solubilitatea crescută se datorează, în principiu, conformaţiilor extinse pe care le adoptă PEG-ul în jurul ADN-ului.

Diferenţele dintre HPEI şi PEG sunt în mare datorate monomerilor protonaţi de PEI, întrucât prezintă o bandă îngustă şi foarte pronunţată relativ la atomii de fosfor, cauzând expulzarea moleculelor de apă din proximitatea ADN-ului. Astfel, se formează legături de hidrogen între policationi şi ADN, care ajută la stabilizarea complexului molecular.

Aspectele discutate aici confirmă că procesul de construcţie a vectorilor neviral care conţin HPEI-PEG este unul sensibil, întrucât trebuie aleasă lungimea şi densitatea potrivită a braţelor de PEG pentru a eficientiza transferul informaţiei genetice în celulele specifice. Este observat că structurile cu mai puţine braţe de PEG, dar mai lungi, sunt mai stabile şi oferă o protecţie îmbunătăţită pentru poliplecşi.

Bibliografie

1. R. Narain, Ed., *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*, Elsevier, Woodhead Publishing, Cambridge UK (2016).
2. A. E. Terteci-Popescu and T. A. Beu, *Branched polyethyleneimine: CHARMM force field and molecular dynamics simulations*, *Journal of Computational Chemistry*, 43(31), 2072-2083 (2022).
3. J. Wang, H. Wang, P. Zhao, Z. Chen, and Q. Lin, *Hyperbranched-star PEI-g-PEG as a nonviral vector with efficient uptake and hypotoxicity for retinoblastoma gene therapy application*, *Colloid and Interface Science Communications*, 50, 100647 (2022).
4. T. A. Beu, & A. Farçaş, *CHARMM force field and molecular dynamics simulations of protonated polyethyleneimine*, *Journal of Computational Chemistry*, 38(27), 2335-2348 (2017).
5. T. A. Beu, A. E. Ailenei, and A. Farçaş, *CHARMM force field for protonated polyethyleneimine*, *Journal of Computational Chemistry*, 39(31), 2564-2575 (2018).
6. T. A. Beu, A. E. Ailenei, and A. Farçaş, *Atomistic and coarse-grained modeling of polyethyleneimine*, *Chemical Physics Letters*, 714, 94-98 (2019).
7. A. Kichler, *Gene transfer with modified polyethylenimines*, *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 6(S1), S3-S10 (2004).
8. H. Petersen, P. M. Fechner, A. L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C. J. Roberts, ... and T. Kissel, *Polyethyleneimine-graft-poly (ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system*, *Bioconjugate chemistry*, 13(4), 845-854 (2002).
9. D. Appelhans, H. Komber, M. A. Qadir, S. Richter, S. Schwarz, J. van der Vlist, ... and B. Voit, *Hyperbranched PEI with various oligosaccharide architectures: synthesis, characterization, ATP complexation, and cellular uptake properties*, *Biomacromolecules*, 10(5), 1114-1124 (2009).
10. L. J. R. Foster, *PEGylation and bioPEGylation of polyhydroxyalkanoates: synthesis, characterisation and applications*, *Biopolymers*, 243-256 (2010).
11. U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, and A. Göpferich, *Polyethyleneimine-based non-viral gene delivery systems*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 247-266 (2005).
12. Yin, Hao, et al. "Non-viral vectors for gene-based therapy." *Nature Reviews Genetics* 15.8 (2014): 541-555.
13. Lander, Eric S. "The heroes of CRISPR." *Cell* 164.1-2 (2016): 18-28.
14. Dunbar, Cynthia E., et al. "Gene therapy comes of age." *Science* 359.6372 (2018): eaan4672.
15. Amer, M. H. (2014). Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Molecular and cellular therapies*, 2(1), 1-19.
16. C. G. Mayne, M. Muller, & E. Tajkhorshid, *Parameterizing small molecules using the force field toolkit (fftk)*, University of Illinois at Urbana-Champaign (2015).
17. W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, 'VMD – Visual Molecular Dynamics', *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38 (1996).
18. Gaussian 09, Revision E.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT (2009).
19. GaussView, Version 6.1, Roy Dennington, Todd A. Keith, and John M. Millam, Semicem Inc., Shawnee Mission, KS (2016).
20. J. C. Phillips, D. J. Hardy, ... and E. Tajkhorshid, *Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD*, *Journal of Chemical Physics*, 153:044130 (2020).
21. H. Orland, *Flory theory revisited*, *Journal de Physique I*, 4(1), 101-114 (1994).
22. C. Le Coeur, J. Teixeira, P. Busch, and S. Longeville, *Compression of random coils due to macromolecular crowding: scaling effects*, *Physical Review E*, 81(6), 061914 (2010).
23. K. Devanand, and J. C. Selsler, *Asymptotic behavior and long-range interactions in aqueous solutions of poly (ethylene oxide)*, *Macromolecules*, 24(22), 5943-5947 (1991).
24. K. Hart, N. Foloppe, C.M. Baker, E.J. Denning, L. Nilsson, and A.D. Jr. MacKerell, *Optimization of the CHARMM additive force field for DNA: Improved treatment of the BI/BII conformational equilibrium*, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8: 348-362 (2012).
25. H. Bekker, H. J. C. Berendsen, E. J. Dijkstra, S. Achterop, R. Vondrumen, D. Vanderspoel, ... and M. K. R. Renardus, *Gromacs-a parallel computer for molecular-dynamics simulations*, in 4th international conference on computational physics (PC 92) (pp. 252-256), World Scientific Publishing (1993).
26. B. G. Levine, J. E. Stone, and A. Kohlmeyer, *Fast analysis of molecular dynamics trajectories with graphics processing units—Radial distribution function histogramming*, *Journal of computational physics*, 230(9), 3556-3569 (2011).
27. S. Mao, M. Neu, O. Germershaus, O. Merkel, J. Sitterberg, U. Bakowsky and T. Kissel, *Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly (ethylene imine)-graft-poly (ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes*, *Bioconjugate chemistry*, 17(5), 1209-1218 (2006).
28. J. D. Ziebarth, D. R. Kennetz, N. J. Walker and Y. Wang, *Structural comparisons of PEI/DNA and PEI/siRNA complexes revealed with molecular dynamics simulations*, *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(8), 1941-1952 (2017).
29. C. E. Gallops, C. Yu, J. D. Ziebarth and Y. Wang, *Effect of the protonation level and ionic strength on the structure of linear polyethyleneimine*, *Acs Omega*, 4(4), 7255-7264 (2019).
30. Z. Wei and E. Luijten, *Systematic coarse-grained modeling of complexation between small interfering RNA and polycations*, *The Journal of Chemical Physics*, 143(24), 243146 (2015).

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Trofin Paul, declar că Lucrarea de licență pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea 2023 , sub îndrumarea Prof. dr. Titus Adrian Beu, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

21.06.2023

Paul Trofin,

