

## RAPORT STIINTIFIC DE ETAPA

### Denumirea proiectului:

Optimizarea in silico a designului nanovectorului CRISPR/Cas9-Gold

(Acronim: nanoCrAud)

### Etapa 1 - Optimizarea acoperirii cu oligonucleotide a GNP-urilor

- **Activitate 1.1** - Filtrarea Protein Data Bank pentru identificarea unui complex Cas9-sgRNA
- **Activitate 1.2** - Optimizarea acoperirii cu oligonucleotide a GNP-urilor

### Etapa 2 - Investigarea conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu lanturi ADN

- **Activitate 2.1** - Constructia GNP decorate cu lanturi ADN modificate tiolic
- **Activitate 2.2** - Simulari de dinamica moleculara si analiza GNP-urilor decorate cu oligonucleotide modificate tiolic
- **Activitate 2.3** - Extragerea unghiurilor de inclinare a lanturilor ADN modificate tiolic
- **Activitate 2.4** - Constructia ssADN-SH + donor ssADN pentru o anumita dimensiune a GNP
- **Activitate 2.5** - Simulari de dinamica moleculara ale conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu ADN
- **Activitate 2.6** - Caracterizarea structurala a nucleotidelor hibridizate

### Etapa 3 - Investigarea detaliata a conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9

- **Activitate 3.1** - Constructia sistemelor aferente conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9
- **Activitate 3.2** - Investigarea prin simulari de dinamica moleculara a conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9
- **Activitate 3.3** - Analiza comportamentului structural al complexului CRISPR/Cas9-GNP

## Obiectiv principal

- Investigarea conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu lanturi ADN

## Obiective specifice

- Constructia GNP decorate cu lanturi ADN modificate tiolic
- Simulari MD si analiza GNP-urilor decorate cu oligonucleotide modificate tiolic
- Extragerea unghiurilor de inclinare a lanturilor ADN modificate tiolic
- Constructia ssADN-SH + donor ssADN pentru o anumita dimensiune a GNP
- Simulari MD ale conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu ADN
- Caracterizarea structurala a nucleotidelor hibridizate
- Achizitii de tehnica de calcul de inalta performanta
- Diseminare realizata prin intermediul paginii web a proiectului si a raportului stiintific de etapa

## Cuprins

Rezumatul etapei

1. INTRODUCERE
2. PROGRAME SI MODELE UTILIZATE
3. INFRASTRUCTURA TEHNICA
4. DETALII DE MODELARE SI IMPLEMENTARE
5. CONCLUZII ETAPA
6. REZULTATE
7. REFERINTE

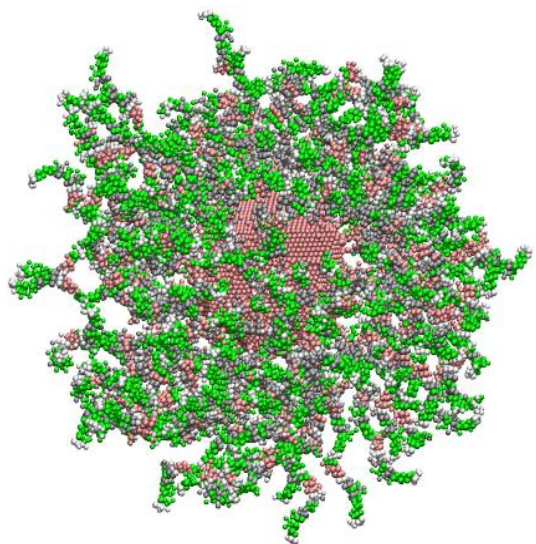


Fig. 1 Nanoparticula de aur functionalizata cu lanturi ADN

## Rezumatul etapei

A doua etapa a acestui proiect are prevazute 6 activitati in vederea atingerii obiectivului principal: Investigarea conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu lanturi ADN.

Studiul care prezinta mecanismele fizice de baza ale comportamentului nanoparticulelor de aur functionalizate in solutie a fost trimis spre publicare in revista Computational and Theoretical Chemistry. Moleculele de tiol pe suprafata nanoparticulelor de aur interactioneaza intr-o maniera dependenta de orientarea, curbura suprafatei si densitatea de molecule tiol, manipularea proprietatilor acestora fiind esentiala pentru proiectarea rationala a unor vehicule de livrare bazate pe nanoparticule functionalizate.

Rezultatele au fost comunicate la 2 conferinte internationale si 4 workshop-uri, diseminarea rezultatelor oferind vizibilitate internationala atat grupului de cercetare, cat si institutiei. Asigurarea transparentei activitatilor proiectului prin informarea publicului larg s-a realizat prin intermediul paginii web a proiectului, care a fost actualizata constant:

<https://www.itim-cj.ro/PNCIDI/nanocraud/>



Accelerarea calculelor intensive necesare efectuării simularilor de dinamica moleculara pe unitatile de procesare grafica a fost realizata cu ajutorul achizițiilor de tehnica de calcul de inalta performanta prezentate in sectiunile urmatoare.

Raportul stiintific de etapa se incheie cu cateva concluzii majore asupra rezultatelor obtinute, impreuna cu lista de referinte folosite.

## 1. INTRODUCERE

Dintre nanoparticulele pe baza de metale nobile, nanoparticulele de aur (GNPs) au atras o atentie considerabila in ultimii ani, datorita proprietatilor lor atractive, care decurg din dimensiunea, arhitectura și functionalizarea facila [1-5]. S-a demonstrat ca interactiunea lor cu celulele poate fi influentata prin modificarea dimensiunii, formei si functionalizarii suprafetei nanoparticulelor. [6]

Terapia genica utilizeaza material genetic pentru a trata sau a preveni bolile [7]. Vectorii virali sunt folosiți pe scara larga, dar au dezavantajul ca nu pot fi usor funcționalizati si activeaza sistemul imunitar al gazdei [8]. Prin urmare, in raport cu sistemele biologice, vectorii virali prezinta o citotoxicitate ridicata si se stie ca reduc eficacitatea terapiei genice [8]. Cu toate acestea, aceste neajunsuri pot fi eliminate de vectorii non-virali, cum ar fi nanoparticulele metalice [9, 10]. Unele cercetari recente au aratat ca GNP-urile sunt mai sigure, mai ușor de produs, la un pret accesibil, usor de functionalizat pentru a imbunatati transfectia si pot incapsula acizi nucleici de aproape orice dimensiune [11, 12].

Spre deosebire de alte forme, GNP-urile sferice au fost utilizate pe scara larga datorita sintezei usoare si capacitatii de a functionaliza usor suprafata lor cu diversi liganzi [13 - 18]. Utilizarea in sectorul medical a nanoparticulelor functionalizate ca agent terapeutic necesita un ligand și o strategie de atasare a acestuia pe suprafata nanoparticulelor [19].

Interactiunile chimice (de exemplu, datorate derivatilor tiol, linkeri bifunctionali) si/sau interactiuni fizice (atractie ionica, atractie hidrofoba) sunt folosite pentru a atasa diferite molecule la suprafetele nanoparticulelor [20 - 22].

Prin urmare, pentru conjugarea moleculelor la GNP-uri, in prezent sunt utilizate 2 moduri de interactiune (covalente/necovalente) [23]. Moleculele functionalizate sunt adsorbite nespecific pe nanoparticule pentru a oferi stabilitate

### Glosar de editare genetica

**ARN/ADN** – Acid ribonucleic / dezoxiribonucleic sunt substantele de baza ale aparatului genetic

**Gena** – secventa specifica de nucleotide in **ADN/ARN** care indeplineste o anumita functie

**Mutatie** – modificare in materialul genetic

Editare genetica – tehnica utilizata pentru a modifica cu precizie o secventa genetica

**CRISPR** – grupuri de repetari scurte palindromice in ordine intercalata (secvente genetice folosite de bacterii pentru a se proteja de virusi)

**Cas** – proteina asociata CRISPR

**Cas9** – proteina 9 asociata CRISPR (enzima care foloseste secventele CRISPR pentru a taia lanturi specifice de ADN complementare secventei CRISPR)

**HDR** – repararea directionata pe baza de omologie (mecanism utilizat pentru a repara defectele in lantul ADN)

**sgRNA** – ARN de ghidare monocatenar

in solutia coloidala [24,25]. Astfel, strategia de bioconjugare foloseste interactiunea non-covalenta (electrostatica si hidrofoba) pentru a ancora liganzii pe suprafata nanoparticulelor de aur [26]. Aceasta tehnica se caracterizeaza prin absorbtia spontana a ligandului pe suprafata GNP-urilor prin interactiuni hidrofobe sau ionice [27]. Modurile de interactiune non-covalente au totusi unele limitari: pentru a prepara conjugatele ligand – particule de aur este necesara o concentratie mare si o orientare aleatorie a liganzilor [27,28]. O alternativa la legarea grupurilor functionalizate de pe suprafata GNP este reprezentata de modurile de interactiune covalente [29]. Legarea covalenta a gruparii tiol de GNP este utilizata pentru anticorpi si diferite molecule [29,30]. Aceasta metoda utilizeaza moduri covalente pentru atasarea peptidelor, polimerilor, oligonucleotidelor pe suprafata GNP-urilor [29,31].

Metodele experimentale au cateva neajunsuri din cauza dimensiunii extraordinar de mici a nanoparticulelor [32]. Acest lucru limiteaza intelegerea aprofundata a vehiculelor de livrare bazate pe nanoparticule si a potentialului de a imbunatati design-ul GNP-urilor cu aplicabilitate in biomedicina. Pe de alta parte, simularile de dinamica moleculara explica mecanismele de baza ale sistemelor moleculare implicate la un nivel de precizie atomistic [33,34]. Prin simulari de dinamica moleculara se determina modul in care diferitele dimensiuni de GNP si densitatile de acoperire cu molecule tiol ale GNP-urilor afecteaza proprietatile nanoparticulelor (cum ar fi atractia de ioni), care sunt utilizate pentru a ghida proiectarea rationala a vehiculelor de livrare pe baza de nanoparticule. Astfel, se pot extinde potentialele lor aplicatii medicale, agricole si farmaceutice.

## 2. PROGRAME SI MODELE UTILIZATE

**VMD** [35] - program de vizualizare 3-D utilizat pentru sisteme biomoleculare de mari dimensiuni.

**NAMD** [36] - program de dinamica moleculara care prezinta o performanta, flexibilitate si acuratete ridicata si permite realizarea unor simulari la scara larga a unor sisteme biomoleculare complexe.

**GROMACS** [37] – program de dinamica moleculara utilizat pentru sisteme biomoleculare la nivel atomistic si coarse-grained, utilizand o multitudine de campuri de forte (CHARMM, GROMOS, AMBER, OPLS).

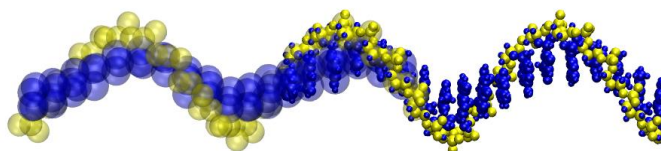


Fig 2.1 Maparea reziduurilor atomistice in bead-uri coarse-grained

**CHARMM** [38] - camp de forte atomistic care include parametri pentru proteine, acizi nucleici, lipide, carbohidrati. Energia potentiala ia in considerare atat interactiunile legate, cat si cele nelegate.

**Martini** [39] – camp de forte coarse-grained, unde interactiunile nelegate se bazeaza pe reproducerea profilelor experimentale de energie libera, iar interactiunile legate sunt derivate din simulari atomistice.

### 3. INFRASTRUCTURA TEHNICA

Sistemele moleculare studiate sunt de ordinul a sute de mii sau chiar milioane de atomi/particule si implica un efort imens de calcul și un interval mare de timp de achiziție al datelor. Pentru a realiza investigarea moleculara a complexului CRISPR/Cas9-Gold a fost necesara achizitionarea unor statii de calcul de inalta performanta. Programele de dinamica moleculara scaleaza excelent pe placile grafice, acestea fiind indispensabile in accelerarea calculelor aferente sistemelor de interes.

In acest context, au mai fost achizitionate in cadrul proiectului:

#### Anul 2021

##### ✓ 1 Statie de calcul

Processor 2 x Xeon Silver 4210 2P 10C/20T 2.2GHz, Cache 13.75M, 9.6GT 85W RAM 64GB DDR4, 2933 MHz, ECC Storage 1 x SSD 240GB SATA 6Gb/s, 1 x HDD 2TB SATA 6 Gb/s 4U Rackmountable / Tower

##### ✓ 2 GPU

GPU 1 x GeForce RTX 3070TI 8GB VRAM, DDR6

GPU 1 x GeForce RTX 3080TI 10GB VRAM, DDR6



Fig. 3.1 Statie de calcul

## 4. DETALII DE MODELARE SI IMPLEMENTARE

### Activitatea 2.1 - Constructia GNP decorate cu lanturi ADN modificate tiolic

Lantul ADN modificat cu tiol (ssADN-tiol) si secventa de ADN donor au fost determinate pe baza sgARN.

**Thiol-ssADN** Thiol-AAATTCTGACAGATATTTCTGGCATATTTTC

#### ssADN donor

TGATATGAATGAAACTCATCAAATATGCGTGTTAGTGTAATGAACTTCTATTTAATTTTGAGGCTCTGCAAA  
GTTCTTTAAAGGAGCAGCAGAATGGCTTCAACTATCTGAGTGACTGTGAAGGAGATGGCCAAGAAAGC  
ACCTCAGAAATATGCCAGAAATATCTGTCAGAATTT

**Constructia sistemului.** Pentru acoperirea nanoparticulelor au fost utilizate molecule tiol care au compozitia chimica  $S-[CH_2]_2-CH_3$ . Fiecare atom de sulf din moleculele de tiol este legat covalent de atomii de aur de suprafata ai nanoparticulei de aur. Atomii de sulf au fost distribuiți aleatoriu pe suprafata de nanoparticulei. Toate structurile initiale ale nanoparticulei conjugate cu molecule tiol pentru simularile de dinamica moleculara au fost generate utilizand CHARMM-GUI Nanomaterial Modeler [40, 41]. Campul de forte INTERFACE [41] a fost utilizat pentru atomii de aur pentru a obtine structura nanoparticulelor, topologia si fisierele de parametri. Toate imaginile au fost extrase folosind pachetul VMD [35].

Descrierea coarse-grained a nanoparticulelor este cea din modelul atomistic, cu exceptia sarcinilor. Toti atomii de Au si S sunt considerati neutri in modelul coarse-grained [42]. Moleculele tiol sunt construite din particule Martini interconectate de tip S, C1. Parametrii pentru legaturi si unghiuri liganzilor sunt cei aferenti pentru campul de forte Martini. Acesti liganzi sunt legati de atomii de aur de la suprafata nanoparticulelor prin legaturi Au-S. Lanturile de ADN monocatenar sunt legate prin intermediul moleculelor tiol de nanoparticula de aur.

Structura atomistica initiala a ADN-ului a fost construita folosind Nucleic Acids Flexibility prin serverul <http://mmb.irbbarcelona.org/NAFlex//index.php>. Specific, lanturile ADN au fost construite in forma canonica B.

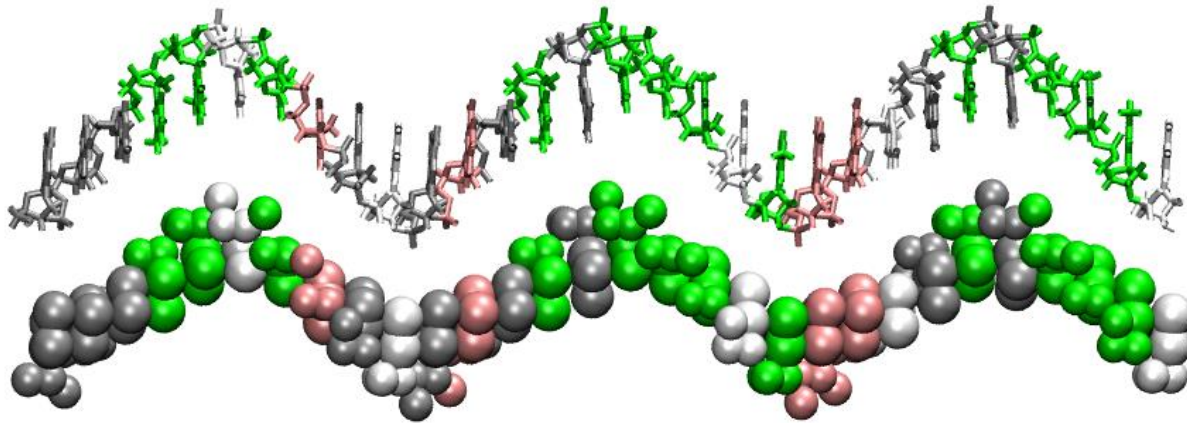


Fig. 4.1 Secventa ssADN reprezentare atomistica/coarse-grained AAATTCTGACAGATATTTCTGGCATATTC  
 Au fost construite nanoparticule functionalizate de diferite densitati de acoperire a suprafetei, considerand diametre diferite ale acestora. Acest lucru ne-a permis sa reducem numarul de nanoparticule functionalizate cu lanturi ssADN-SH necesare pentru a imbunatati eficienta generala de incarcare a lanturilor ADN.

#### **Activitatea 2.2 – Simulari MD si analiza GNP-urilor decorate cu oligonucleotide modificate tiolic**

Au fost studiate prin simulari atomistice nanoparticule de aur modificate cu tiol cu 4 densitati de acoperire cu molecule tiol diferite si 3 marimi diferite de nanoparticule. Pentru nanoparticula de aur am folosit un model icosaedric, care prezinta doar fatete (111) [43]. Am simulat GNP-uri de diferite dimensiuni cu diametre de 5, 10 și, respectiv, 15 nm. In simularile noastre, am folosit 4 densitati diferite de acoperire cu tiol 1%, 12%, 25% și, respectiv, 50%. Acoperirea completa corespunde cu cea mai mare impachetare posibila a moleculelor de tiol. Densitatile alese sunt in concordanta cu datele experimentale [43].

#### **Protocoale de simulare.**

Simularile atomistice ale nanoparticulelor de aur conjugate cu molecule tiol au fost realizate utilizand programul NAMD 2.13 [36]. Pentru toate simularile a fost folosit campul de forte CHARMM36 [38] si campul de forte INTERFACE [46]. Toate simularile MD au fost realizate in ansamblul NPT. Pentru particulele de apa a fost folosit modelul TIP3P [38] si au fost adaugati ionii de Cl<sup>-</sup> si Na<sup>+</sup> cu o concentratie de 150 mM. Controlul temperaturii a fost realizat termostatul Nose-Hoover [36], iar presiunea utilizeaza barostatul Parrinello-Rahman [36].

In toate simularile am utilizat pasul de integrare de 2 fs, distanta de taiere folosita a fost de 12 Å, iar functia de comutare a fost setata la 9 Å pentru toate interactiunile de scurta distanta. Cu



exceptia interactiunilor electrostatice, care au fost actualizate la fiecare al doilea pas, toate celelalte interactiuni au fost actualizate la fiecare pas. Pentru a minimiza efectele de margine au fost aplicate conditii de periodicitate, iar interactiunile electrostatice de lunga distanta au fost tratate folosind metoda Particle Mesh Ewald (PME) [36]. Fiecare simulare a fost echilibrata timp de 100 ns inainte de cel puțin 300 ns de rulare de productie. Conditii la limita periodice au fost folosite in toate sistemele.

Fisierele de structura (coordonate carteziane – ex. fișierul de structura PDB) a nanoparticulelor functionalizate cu molecule tiol obtinute in urma simularilor atomistice au fost utilizate in constructia fisierelor de structura a nanoparticulelor functionalizate cu oligonucleotide modificate tiolic. Martini DNA a fost utilizat pentru a modela atat ADN-ul monocatenar (AAATTCTGACAGATATTTCTGGCATATTTTC).

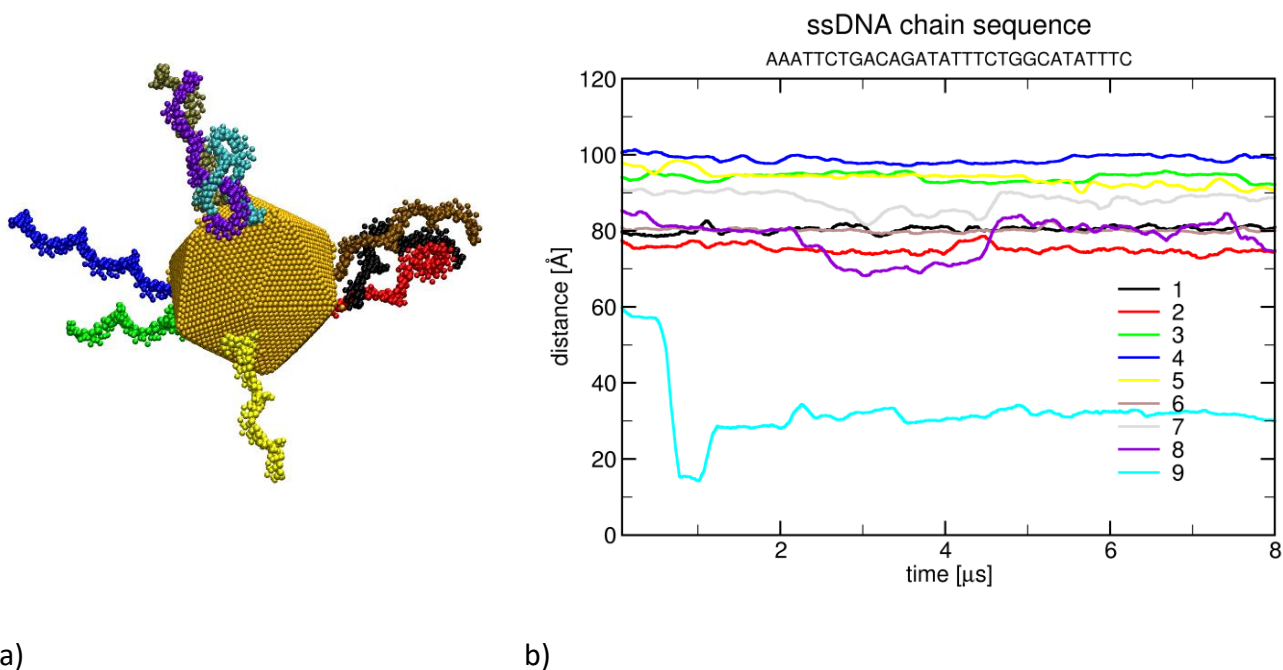


Fig. 4.2. a) Reprezentarea coarse-grained a unei nanoparticule conjugate cu nucleotide ssADN-SH (fiecare lant ADN este colorat diferit); b) Distanta dintre capete a lanturilor ADN.

Fisierele de topologie (care contin asocierea atomilor cu anumite tipuri de beaduri, lista de legaturi, unghiuri, unghiuri diedrale etc.) au fost generate cu ajutorul programului python martinize-dna.py. Pentru a obtine o perspectiva asupra dinamicii conformationale complexe a GNP-ului conjugat cu oligonucleotide modificate cu tiol, au fost efectuate simulari extinse ale sistemului. Fluctuațiile conformaționale ale complexului au monitorizate prin evaluarea atat a

rolului proprietăților fizico-chimice a GNP (vezi Fig. 4.2), cât și a interacțiunii dintre oligonucleotide.

### Activitate 2.3 - Extragerea unghiurilor de inclinare a lanțurilor ADN modificate tiolic

Sistemul complet solvat format din nanoparticule funcționalizate cu oligonucleotide poate atinge zeci/ sute de nanometri. Prin urmare, simularea a milioane de atomi devine nerealistă, iar utilizarea modelelor coarse-grained devine necesară pentru a reduce numărul de grade de libertate. Din simularile realizate în cadrul **Activității 2.3** am extras unghiurile medii de inclinare ale lanțului ssADN-SH cu suprafața nanoparticulei (vezi Fig.4.3).

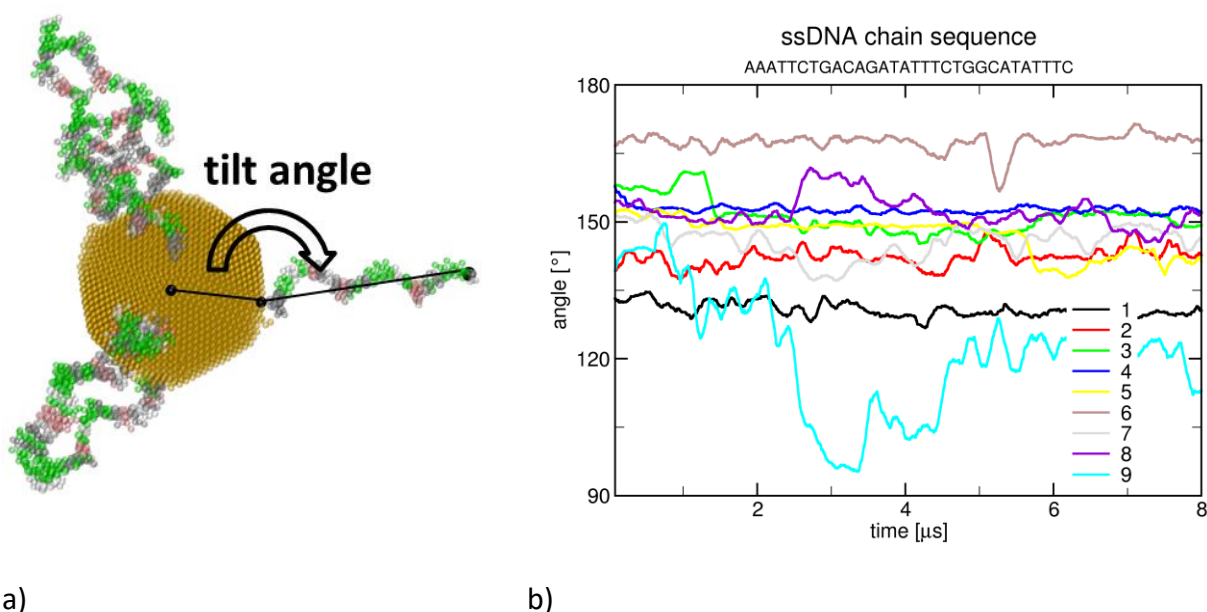


Fig. 4.3 a) Reprezentarea unghiului mediu de inclinare ale lanțului monocatenar ADN-SH; b) unghiurile medii de inclinare ale lanțului monocatenar ADN-SH cu tiol cu suprafața nanoparticulei. Pentru diferite densități de acoperire a suprafeței, numărul lanțurilor ADN care interacționează între ele se modifică, rezultând astfel o împachetare diferită a acestora pe suprafață.

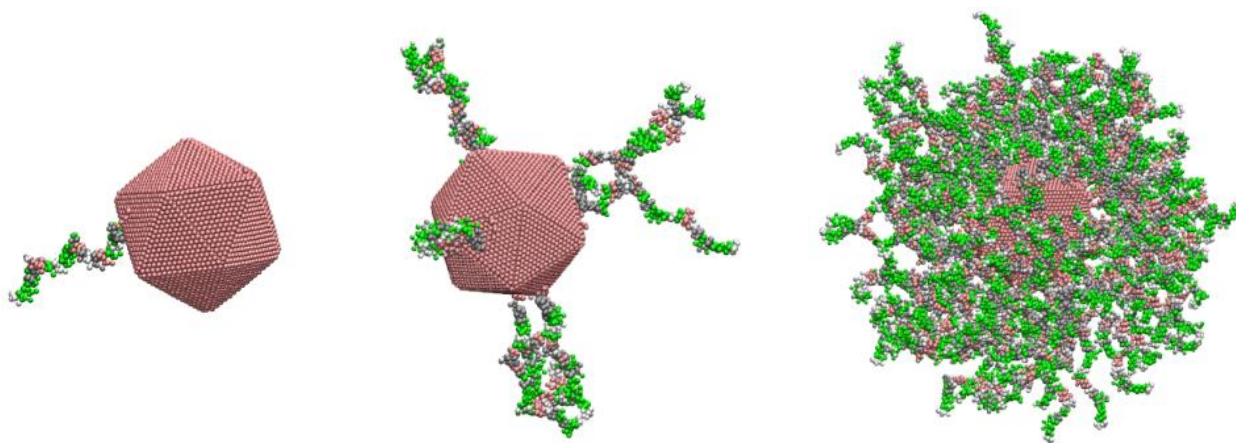


Fig. 4.4 Reprezentarea coarse-grained a unei nanoparticule functionalizate cu oligonucleotide cu densitati de acoperire a suprafetei diferite

#### Activitate 2.4 - Constructia ssADN-SH + ssADN donor

Pentru a construi complexul, este necesara hibridizarea secvențelor complementare ale catenelor ADN (ssADN-SH, ADN donor, vezi Fig. 5). Am implementat o abordare pe mai multe trepte prin utilizarea rezultatelor rezolutiei atomistice pentru a construi sistematic modelul CG al GNP conjugat cu ssADN-SH + ssADN donor pentru a efectua simulari MD pe scale mai mari de timp și lungime.

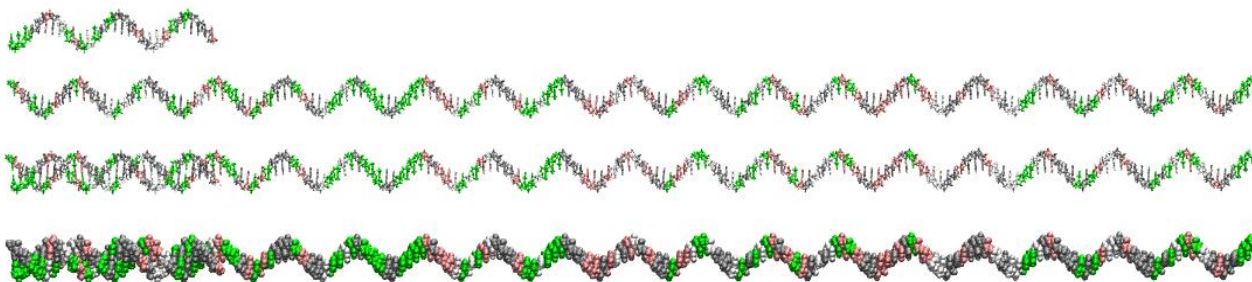


Fig. 4.5 Reprezentarea atomistica/coarse-grained a complexului ssADN-SH + donor ssADN

Initial au fost construite structure atomistice aferente secvențelor prezentate in cadrul **Activitatii 2.1**. Ulterior, secvențele oligonucleotidelor (ssADN-SH, ADN donor) determinate pe baza sgRNA au fost hibridizate cu ajutorul programului VMD [35]. Martini DNA a fost utilizat pentru a modela atat ADN-ul monocatenar, cat si cel dublu catenar.

## Activitate 2.5 - Simulari MD ale conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu ADN

Scopul simularilor semi-atomistice (coarse-grained) au fost sa extinda cele atomistice la o scara mai mare (microsecunde) pentru a realiza simularile nanoparticulelor de aur functionalizate cu lanturi ADN. Coordonatele initiale din fisierele de intrare au fost generate avand ca referinta structurile atomistice ale nanoparticulelor de aur modificate cu molecule tiol.

**Constructia sistemului.** Sistemele coarse grained au fost solvatate (apa MARTINI [39]) si neutralizate cu ajutorul ionilor de sodiu si clor pentru a avea concentratia molară de 0.15 mol/L.

**Campul de forte.** Campul de forte MARTINI [39] a fost folosit in toate simularile coarse-grained.

**Protocoale de simulare.** Programul Gromacs versiunea 2019 [37] a fost utilizat in toate simularile efectuate, folosind un pas de integrare de 20 de fs. Un ansamblu NPT a fost folosit la 1 bar si 301 K. Presiunea constanta a fost mentinuta de o cuplare izotropa, folosind un timp de relaxare de 12 ps. Temperatura constanta a fost mentinuta la o temperatura constanta de 301 K folosind un timp de relaxare de 1 ps. Toate rularile au fost efectuate dupa minimizarea si echilibrarea nanoparticulelor functionalizate.

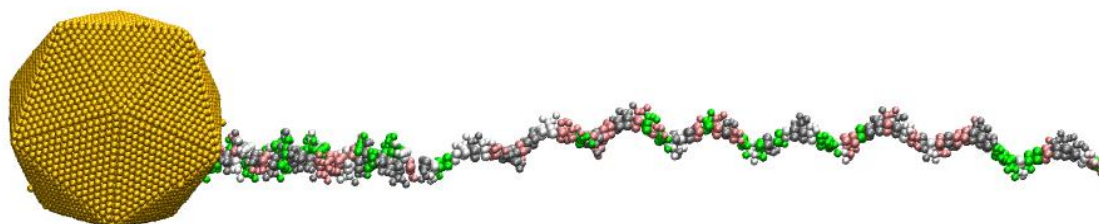
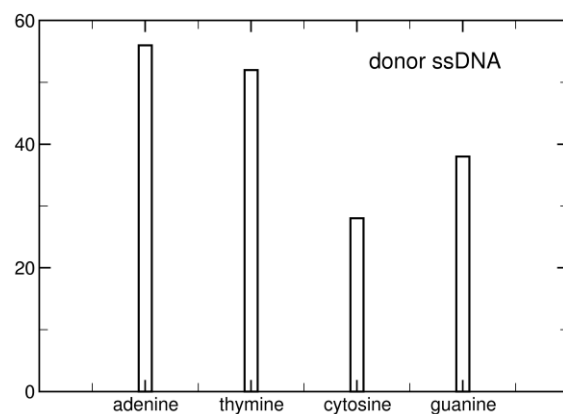
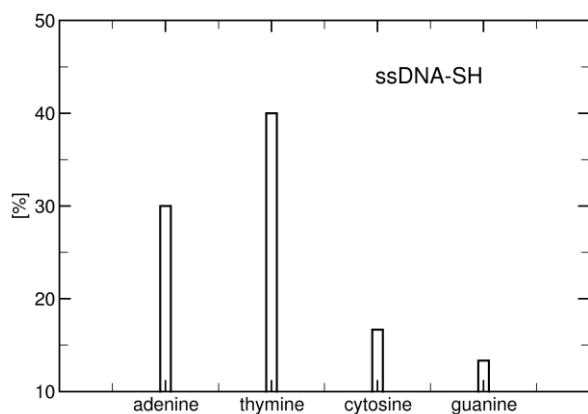


Fig. 4.6 Reprezentarea coarse-grained a complexului GNP-oligonucleotide hibridizate cu lanturi ADN monocatenar

## Activitate 2.6 - Caracterizarea structurala a nucleotidelor hibridizate

Pentru a investiga complexul GNP-oligonucleotide hibridizate cu lanturi ADN monocatenar, au fost efectuate simulari extinse ale sistemului (descrise in cadrul **Activitatii 2.5**). In Fig. 4.7 este reprezentata distributia de baze azotate din ssADN-SH si ssADN donor folosite in simularile de dinamica moleculara.



a)

b)

Fig. 4.7 Distributia de baze azotate in lanturile ADN: a) ssADN-SH; b) donor ssADN

Pentru complexul GNP-oligonucleotide hibridizate cu lanturi ADN monocatenar am realizat caracterizarea structurala calculand raza de giratie, distanta dintre capete a lanturilor ADN.

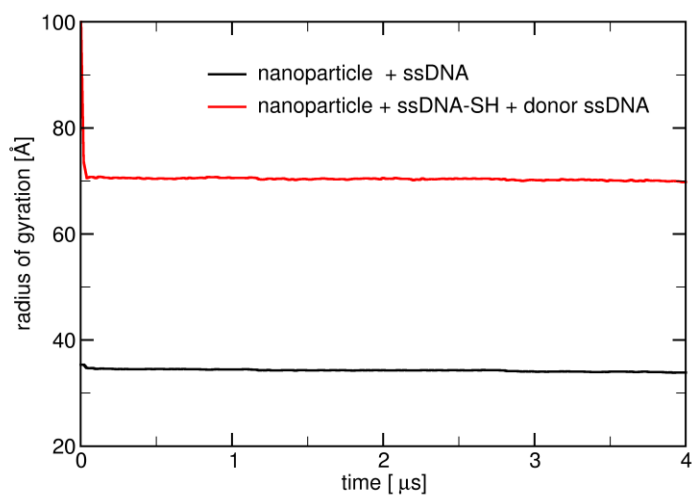


Fig. 4.8 Raza de giratie reprezentata cu linia neagra pentru GNP decorate cu oligonucleotide modificate tiolic si rosie pentru complexului GNP-oligonucleotide hibridizate cu lanturi ADN monocatenar

## 5. CONCLUZII ETAPA

1. **Modelele coarse-grained** folosite pentru constructia nanoparticulelor de aur decorate cu lanturi ADN modificate tiolic au fost derivate din modele atomistice, atat in cazul nanoparticulelor de aur, cat si a lanturilor ADN modificate tiolic.
2. Au fost realizate **simulari de dinamica moleculara** a GNP-urilor decorate cu oligonucleotide modificate tiolic. Dimensiunea nanoparticulelor de aur si densitatea de acoperire a suprafetei cu oligonucleotide reprezinta elemente cheie care ar trebui utilizate in manipularea proprietatilor nanoparticulelor functionalizate.
3. Din simularile de dinamica moleculara am extras **unghiurile medii de inclinare** ale lanturilor ADN modificate tiolic cu suprafata nanoparticulei de aur. Structura conformationala a lanturilor de ADN depinde puternic de densitatea de acoperire a suprafetei nanoparticulei cu oligonucleotide, fiind rezultatul interactiunii dintre lanturile de ADN monocatenar.
4. A fost realizata **hibridzarea secventelelor complementare** ale lanturilor ADN modificate tiolic cu lanturile ADN donor. Lantul ADN modificat cu tiol si secventa de ADN donor au fost determinate pe baza sgARN.
5. Simularile coarse-grained de dinamica moleculara ale conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu ADN au permis extinderea simularilor atomistice la o scara mai mare (microsecunde). Modelul coarse-grained permite realizarea realista a simularilor conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu **ribonucleoproteina Cas9**, fiind foarte util in imbunatatirea protoalelor utilizate pentru terapie genica.

## 6. REZULTATE

### Articole

1. Alexandra Farcas, Lorant Janosi and Simion Astilean, *Size and surface coverage density are major factors in determining thiol modified gold nanoparticles characteristics*, **Computational and Theoretical Chemistry** (in evaluare).

### Conferinte internationale

1. Alexandra Farcas, Lorant Janosi and Simion Astilean, *Molecular dynamics investigation of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles*, **13th International Conference Processes in Isotopes and Molecules (PIM2021)**, 22-24 September 2021, Cluj-Napoca, Romania.

2. Alexandra Farcas, Lorant Janosi and Simion Astilean, *Optimizing the surface coverage density of thiol-coated gold nanoparticles*, **TIM 20-21 Physics Conference (TIM20-21)**, 11-13 November 2021, Timisoara, Romania.

### Workshop-uri

1. **World CRISPR Day**, 20 October 2021, Synthego (online workshop).

2. **4th Annual CRISPR Virtual Event**, 29 September 2021, Labroots (online workshop).

3. **Martini 3.0 online workshop**, 1-3 September 2021, Groningen, The Netherlands (online workshop).

4. **Hünfeld 2021: Workshop on Computer Simulation and Theory of Macromolecules**, 23-24 April 2021, Göttingen, Germany (online workshop).

## 7. REFERINTE

1. K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem.B* 107 (2003), p. 668. doi: 10.1021/jp026731y.
2. A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson, Rose-Bengal-conjugated gold nanorods for in vivo photodynamic and photothermal oral cancer therapies. *Biomaterials* 35 (2014), pp. 1954–1966. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.066.
3. H. Chen, X. Kou, Z. Yang, W. Ni, and J. Wang. Shape- and size dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir* 24 (2008), 5233-5237. doi: 10.1021/la800305j.
4. S. Li, L. Zhang, T. Wang, L. Li, C. Wang, and Z. Su, The facile synthesis of hollow Au nanoflowers for synergistic chemo-photothermal cancer therapy. *Chem. Commun.* 51 (2015), pp. 14338-14341. doi: 10.1039/C5CC05676D.
5. T. Xiao, J. Huang, D. Wang, T. Meng, and X. Yang. Au and Au-Based nanomaterials: synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications. *Talanta* 206 (2019), p. 120210. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120210.
6. A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* 8 (2009), p. 543.
7. G. A. R. Gonçalves and R. de Melo Alves Paiva, Gene therapy: advances, challenges and perspectives, *Einstein*: 15(3) (2017), pp. 369–375. doi: 10.1590/S1679-45082017RB4024
8. M. K. Riley, Vermerris W. Recent advances in nanomaterials for gene delivery-a review. *Nanomaterials* 7 (2017), p. 94. doi: 10.3390/nano7050094.
9. Y. Ding, Z. Jiang, K. Saha, C. S. Kim , S. T. Kim, R. F. Landis, V. M. Rotello. 2014. Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol. Ther.* 22(6) (2014), pp. 1075-1083. doi: 10.1038/mt.2014.30.
10. R. Shahbazi, G. Sghia-Hughes, J. L. Reid, S. Kubek, K. G. Haworth, O. Humbert, H.-P. Kiem & J. E. Adair. Targeted homology-directed repair in blood stem and progenitor cells with CRISPR nanoformulations. *Nat. Mater.* 18 (2019), pp. 1124-1132. doi: 10.1038/s41563-019-0385-5.
11. B. Klebowski, J. Depciuch, M. Parlińska-Wojtan, J. Baran. Applications of noble metal-based nanoparticles in medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018), p. 4031. doi: 10.3390/ijms19124031.



12. L. L. Tayo, Stimuli-responsive nanocarriers for intracellular delivery. *Biophys. Rev.* 9 (2017), pp. 931-940. doi: 10.1007/s12551-017-0341-z.
13. D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, and C. A. Mirkin, Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew. Chem.* 49 (2010), p. 3280. doi: 10.1002/anie.200904359.
14. J. I. Cutler, E. Auyeung, and C. A. Mirkin, Spherical nucleic acids, *J. Am. Chem. Soc.* 34 (3) (2012), pp. 1376-1391. doi: 10.1021/ja209351u.
15. A. Heuer-Jungemann, P. K. Harimech, T. Brown, A. G. Kanaras. 2013. Gold Nanoparticles and Fluorescently-Labelled DNA as a Platform for Biological Sensing. *Nanoscale.* 5 (2013), p. 9503. doi: 10.1039/c3nr03707j.
16. D. Bartzak, O. L. Muskens, T. Sanchez-Elsner, A. G. Kanaras, T. M. Millar Manipulation of in Vitro Angiogenesis Using Peptide Coated Gold Nanoparticles. *ACS Nano.* 7 (2013), p. 5628. doi: 10.1021/nn402111z.
17. S. Sultana, N. Djaker, S. Boca-Farcau, M. Salerno, N. Charnaux, S. Astilean, H. Hlawaty, M. L. de la Chapelle. Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. *Nanotechnology* 26 (5) (2015), p. 055101. doi: 10.1088/0957-4484/26/5/055101.
18. S. Suarasan, T. Simon, S. Boca, C. Tomuleasa, S. Astilean, Gelatin-coated Gold Nanoparticles as Carriers of FLT3 Inhibitors for Acute Myeloid Leukemia Treatment. *Chem. Biol. Drug Des.* 87 (6) (2016), p. 927. doi: 10.1111/cbdd.12725.
19. X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.*, 23 (3) (2008), pp. 217-228. doi: 10.1007/s10103-007-0470-x.
20. R. Cao-Milán, L.M. Liz-Marzán, Gold nanoparticle conjugates: recent advances toward clinical applications *Expert Opin. Drug Deliv.*, 11 (5) (2014), pp. 741-752, doi: 10.1517/17425247.2014.891582.
21. Kyriazi M.-E., D. Giust, A. H. El-Sagheer, P. M. Lackie, O. L. Muskens, T. Brown, A. G. Kanaras, Multiplexed mRNA Sensing and Combinatorial-Targeted Drug Delivery Using DNA-Gold Nanoparticle Dimers. *ACS Nano.* 12 (2018), p. 3333. doi: 10.1021/acsnano.7b08620.
22. Sokolov K., M. Follen, J. Aaron, I. Pavlova, A. Malpica, R. Lotan, R. Richards-Kortum 2003. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.*, 63 (9) (2003), pp. 1999-2004.

23. S. Kumar, J. Aaron, K. Sokolov, Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nat. Protoc.*, 3 (2) (2008), pp. 314-320. doi: 10.1038/nprot.2008.1.
24. Q. Sun and A. Selloni, Interface and Molecular Electronic Structure vs Tunneling Characteristics of CH<sub>3</sub>- and CF<sub>3</sub>-Terminated Thiol Monolayers on Au(111). *J. Phys. Chem. A*, 110 (40) (2006), pp. 11396–11400. doi: 10.1021/jp064905w.
25. S. W. Cho, S. Kim, J. M. Kim, and J.-S. Kim. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol* 31 (2013), p. 230. doi: 10.1038/nbt.2507.
26. R.G. Rayavarapu, W. Petersen, C. Ungureanu, J.N. Post, T.G. van Leeuwen, S. Manohar, Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques, *J. Biomed. Imaging*, 2007 (2007), pp.1-10 doi: 10.1155/2007/29817.
27. Á.G. Barrientos, J.M. de la Fuente, T.C. Rojas, A. Fernández, S. Penadés 2003. Gold Glyconanoparticles: synthetic polyvalent ligands mimicking Glycocalyx-like surfaces as tools for Glycobiological studies. *Chem. A Eur. J.*, 9 (9) (2003), pp. 1909-1921. doi: 10.1002/chem.200204544.
28. R. Wang, S. Zuo, D. Wu, J. Zhang, W. Zhu, K.H. Becker, et al. Microplasma-assisted synthesis of colloidal gold nanoparticles and their use in the detection of cardiac troponin I (cTn-I) Plasma Process. *Polym.*, 12 (4) (2015), pp. 380-391. doi: 10.1155/2007/29817.
29. M. K.Yu, J. Park, S. Jon, Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics*, 2 (1) (2012), p. 3. doi: 10.7150/thno.3463.
30. J. Chen, F. Saeki, B.J. Wiley, H. Cang, M.J. Cobb, Z.-Y. Li, L. Au, H. Zhang, M. B. Kimmey, X. Li, and Y. Xia, Gold nanocages: bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents. *Nano Lett.*, 5 (3) (2005), pp. 473-477. doi: 10.1021/nl047950t.
31. S. Ramakrishna, A.-B. Kwaku Dad, J. Beloor, R. Gopalappa, S. Lee, H. Kim 2014. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 24 (2014), p. 1020. doi: 10.1101/gr.171264.113.
32. L. Arms, Advantages and Limitations of Current Techniques for Analyzing the Biodistribution of Nanoparticles, *Front Pharmacol.* 9 (2018), p. 802. doi: 10.3389/fphar.2018.00802.
33. C. G. Ricci, J. S. Chen, Y. Miao, M. Jinek, J. A. Doudna, J. A. McCammon, and G. Palermo. Deciphering Off-Target Effects in CRISPR-Cas9 through Accelerated Molecular Dynamics. *ACS Cent. Sci.* 5 (4) (2019), pp. 651–662. doi: 10.1021/acscentsci.9b00020.

34. G. Palermo, Structure and Dynamics of the CRISPR-Cas9 Catalytic Complex. Structure and Dynamics of the CRISPR-Cas9 Catalytic Complex. *J. Chem. Inf. Model.* 59 (5) (2019), pp. 2394-2406. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00988.
35. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics. *J. Molec. Graphics* 14, 33 (1996), pp. 33-8, 27-8, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
36. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, K. Schulten, Scalable Molecular Dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26, 1781 (2005), pp. 1781-802, doi: 10.1002/jcc.20289.
37. David Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, Herman J. C. Berendsen, GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem* 26 (16), 1701 (2005), doi: 10.1002/jcc.20291.
38. 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., CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* 31 671 (2010), pp. 671–690, doi: 10.1002/jcc.21367.
39. 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), pp. 7812-24, doi: 10.1021/jp071097f.
40. S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, and W. Im., CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 29 (2008), pp.1859-1865, doi: 10.1002/jcc.20945.
41. H. Heinz, T.-J. Lin, R. Kishore Mishra, and F. S. Emami. Thermodynamically consistent force fields for the assembly of inorganic, organic, and biological nanostructures: the INTERFACE force field. *Langmuir* 29 (2013), pp. 1754-1765, doi: 10.1021/la3038846.
42. S. Salassi, F. Simonelli, D. Bochicchio, R. Ferrando-Orcid, and G. Rossi, Au Nanoparticles in Lipid Bilayers: A Comparison between Atomistic and Coarse-Grained Models. *J. Phys. Chem. C* 121, 20 (2017), pp. 10927-10935, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b12148.

43. O. A. Perfilieva, D. V. Pyshnyi, and A. A. Lomzov. Molecular dynamics simulation of polarizable gold nanoparticles interacting with sodium citrate. *J. Chem. Theory Comput.* 15 (2) (2019), pp. 1278–1292, doi: 10.1021/acs.jctc.8b00362.