

## 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

### **1. INTRODUCERE**

In ultimul deceniu, a existat un interes ridicat pentru nanoparticulele de aur datorita proprietatilor deosebite care sunt direct legate de forma si dimensiunea acestora [1]. Nanoparticulele de aur de forma sferica au fost aplicate pe scara larga, deoarece se sintetizeaza relativ usor si se pot functionaliza cu o diversitate de liganzi prin intermediul legăturii Au – S [2]. Din multitudinea de liganzi functionali, nanoparticulele de aur functionalizate cu oligonucleotide sintetice sunt de mare interes pentru aplicatiile biomedicale, pentru ca acestea combina proprietatile optoelectronice a aurului cu proprietatile particulare ale oligonucleotidelor (selectivitate, specificitate) [2].

Tehnologia de editare genetica CRISPR / Cas9 care corectează mutațiile genetice prin repararea directionata pe baza de omologie (HDR) are un potențial ridicat de a trata o varietate de boli genetice [2]. Această tehnologie relativ noua are aplicatii directe in industria medicala, agricola si farmaceutica. Principalul obstacol intalnit in implementarea terapiei bazate pe CRISPR/Cas9 este reprezentat de realizarea unor vehicule care pot livra simultan lantul ADN si ribonucleoproteina Cas9, care sa tinteasca mutatiile punctuale intr-un mod specific. Deoarece aplicarea *in vivo* a repararii genelor nu a fost realizata cu succes prin intermediul altor tehnici disponibile (compusi pe baza de peptide sau lipide ca vectori de livrare), CRISPR / Cas9-Gold (care utilizează GNP pentru a furniza molecule de editare genică) este tehnica care directioneaza studiile experimentale pe aceasta tematica [3]. Cu toate acestea, aplicabilitatea *in vivo* a CRISPR / Cas9 este dificila din cauza clivajelor ADN în afara partii vizate a genei [4], provocand mutatii nedorite. Prin urmare, inainte de realizarea aplicatiilor clinice, proiectarea vehiculelor de livrare pe bază de CRISPR / Cas9-Gold *sigure si eficiente* ar trebui facuta pe baza intelegerii detaliate a mecanismelor moleculare de baza.

#### **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 (enzimă 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

### **2. PAGINA WEB A PROIECTULUI**

Vizibilitatea internationala este asigurată prin intermediul paginii web a proiectului:

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

[1] Kelly KL, et al, J. Phys. Chem. B 2003, 107, 668.

[2] Adli M, Nat. Commun. 2018, 9(1), 1911.

[3] Lee K, et al. Nat Biomed Eng. 2017, 1, 889.

[4] Fu Y, et al. Nat. Biotechnol. 2013, 31, 822.

### 3. PROGRAME SI MODELE UTILIZATE

**VMD** [5] - program de vizualizare 3-D utilizat pentru sisteme biomoleculare de mari dimensiuni.

**NAMD** [6] - 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** [7] - program de dinamica moleculară utilizat pentru sisteme biomoleculare la nivel atomistic si coarse-grained, utilizand o multitudine de campuri de forte (CHARMM, AMBER, ...).

**CHARMM** [8] - camp de forte atomistic care include parametri pentru proteine, acizi nucleici, lipide, carbohidrati. Energia potentiala ia in considerare interactiunile legate, cat si cele nelegate.

**Martini** [9] - camp de forte coarse-grained, unde interactiunile nelegate se bazeaza pe reproducerea profilurilor experimentale de energie libera, iar interactiunile legate sunt derivate din simulari atomistice.

### 4. 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, aferent anului 2020 au fost achizitionate in cadrul proiectului: **1 Statie de calcul** - Procesor 2 x Intel Xeon 4210 10 Core/20 Core HT, 2.2GHz RAM) si 2 placi grafice (GPU 2 x GeForce RTX 2080 Ti, 11GB GDDR6), vezi Fig. 4.1, **1 Statie de calcul** - Procesor 2 x Intel Xeon 4210 10 Core/20 Core HT, 2.2GHz RAM) si 1 placa grafica (GPU 1 x GeForce RTX 2080 Ti, 11GB GDDR6), **1 Unitate de stocare** - NAS DS420j CPU Quad-core 1.4GHz, RAM 1 GB DDR4 CAPACITY 16 TB (2 x HDD 8TB), **1 laptop** - Laptop Lenovo Legion 5 15IMH05, 15.6" Full HD, 16GB, 512GB SSD, NVIDIA GeForce GTX 1650 4GB, FreeDOS.



Fig 4.1 Statii de calcul + GPU

### 5. DETALII DE MODELARE SI IMPLEMENTARE

**Activitatea 1.1** - Filtrarea Protein Data Bank pentru identificarea unui complex Cas9-sgRNA

Proteinele au fost extrase din baza de date Protein Data Bank [10], utilizand modulul de "Cautare" si cuvantul cheie "Cas9". In urma selectiei celor 157 de structuri 3-D, a fost extrasa structura 5FQ5.pdb, obtinuta prin cristalografie de raze X, cu o rezolutie de 2.136 Å si determinate urmatoarele secvente necesare pentru simularile de dinamica moleculara a conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9:

*mdx-Thiol ssDNA* /5ThioMC6-D/AAATTCTGACAGATATTTCTGGCATATTTTC

*mdx ssDNA donor* TGATATGAATGAAACTCATCAAATATGCGTGTAGTGTAATGAA  
CTTCTATTTAATTTTGAGGCTCTGCAAAGT**TCTTTAAAGGAGCAGCAGAATGGCTTCA**  
ACTATCTGAGTGACACTGTGAAGGAGATGGCCAAGAAAGCACCTTCAGAAATATGCC  
**AGAAATATCTGTCAGAATTT**

*mdx sgRNA* GATCCTAATACGACTCACTATAGG**TCTTTGAAAGAGCAATAAAA**  
**GTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC**

*mdx target ssDNA* 5'...AGT**TCTTTGAAAGAGCAATAAAA**TGGCTTC...3'

Regiunea target este adiacenta la TGG – PAM motif

[5] Humphrey W, et al. J.Mol. Graph. 1996, 14 (1), 33-8, 27.

[7] Van Der Spoel D, et al. J. Comput. Chem 2005,26 (16), 1701.

[9] Marrink S, et al. J. Phys. Chem. B 2007, 111 (27), 7812.

[6] Phillips JC, et al. J.Comput.Chem 2005, 26(16), 1781.

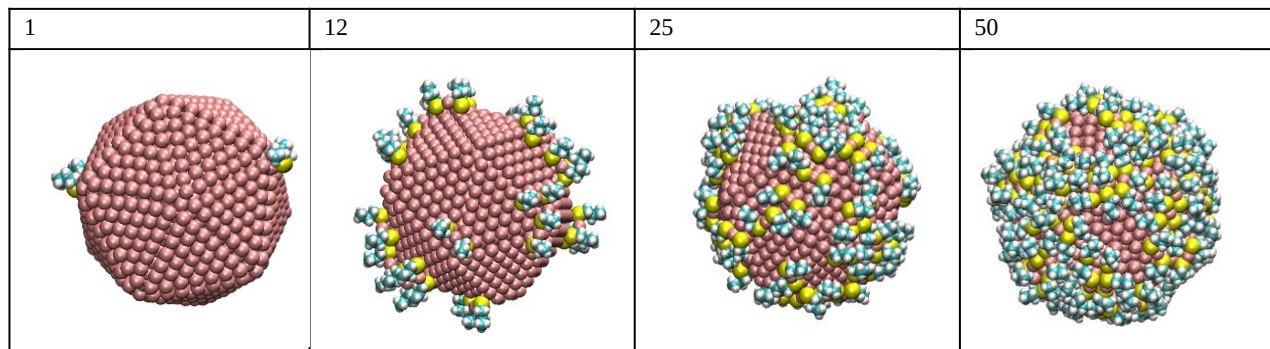
[8] Vanommeslaeghe K, et al. J.Comput.Chem.2010, 31(4), 671.

[10] <https://www.rcsb.org/>

## Activitatea 1.2 - Optimizarea acoperirii cu oligonucleotide a GNP-urilor

Efectul dimensiunii nanoparticulelor de aur si al acoperirii suprafetei acestora cu grupari tiol a fost studiat folosind simulari atomistice de dinamica moleculara. Modelul utilizat pentru nanoparticulele sferice s-a realizat prin construirea unui octaedru trunchiat (vezi Tab. 1) [11], cu un diametru maxim de aproximativ 15 nm.

**Tabel 1. Reprezentarea atomistica a nanoparticulelor de aur (atom aur - roz) cu un diametru de 5 nm si functionalizate cu grupari tiol (atom sulf – galben, atom carbon – turcoaz, atom hidrogen - alb)**

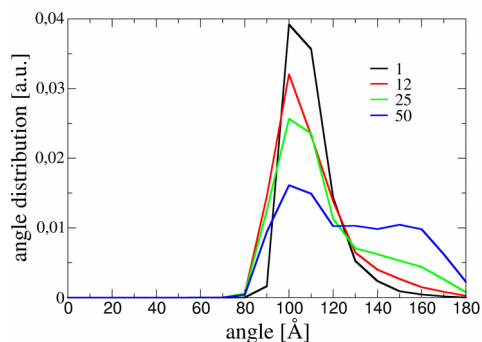


Simularile atomistice ale nanoparticulelor conjugate cu grupari tiol au fost realizate cu NAMD 2.13 [6] si a campului de forte INTERFACE FF [12], folosind pasul de integrare de 2 fs, distanta de taiere de 12 Å. Pentru a reduce efectele de margine au fost aplicate conditii de periodicitate, interactiunile electrostatice de lunga distanta au fost tratate folosind metoda Particle Mesh Ewald [13]. Temperatura a fost fixată la 310 K folosind un termostat Langevin cu un coeficient de amortizare de  $5 \text{ ps}^{-1}$ , iar presiunea a fost mentinută constantă la 1 atm utilizând un piston Langevin. Toate sistemele au fost echilibrate cateva ns inainte de a rula simulările lungi de 300 ns.

**Tabel 2. Detalii sisteme similari**

Grupari tiol (%)	Nr. de atomi	Diametru (nm)	Nr. de atomi	Diametru (nm)	Nr. de atomi	Diametru (nm)
1	34300	5	141265	10	316230	15
12	49622		179315		388466	
25	49977		180203		390507	
50	51365		180543		390896	

Simularile indica ca gruparile tiol sunt situate aproape de nanoparticula de aur sau orientate catre solvent [14] (vezi Fig. 5.1). Pentru acoperirea cu oligonucleotide a GNP-urilor, cea mai potrivita densitate de grupari tiol este cea de 50%, urmata de cea de 25%, deoarece al doilea peak care reprezinta gruparile tiol orientate catre solvent este mai pronuntat in comparatie cu cea de 1% si 12%. Aceste grupari tiolice sunt implicate in legaturi intermoleculare cu oligonucleotide.



**Fig. 5.1 Histograma gruparilor tiol**

## 6. CONCLUZII ETAPA

- Extragere date structurale din Protein Data Bank aferente proteinei Cas9
- Simulari atomistice de dinamica moleculara de nanoparticule solvate de dimensiuni si densitati de acoperire variate
- Achiziții de tehnica de calcul (2 statii de lucru de inalta performanta, unitate de stocare, laptop, consumabile).
- Elaborarea raportului stiintific de etapa

[11] Monti S, et al., Nanoscale, 2016, 8, 12929.

[13] Essmann U, et al., J. Chem. Phys. 1995, 103, 8577.

[12] Heinz H, et al., Langmuir, 2003, 29 (6), 1754.

[14] Jorgensen WL, et al., J. Chem. Phys. 1983, 79, 926.