

RAPORT STIINTIFIC FINAL

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

Cuprins

Rezumatul proiectului

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

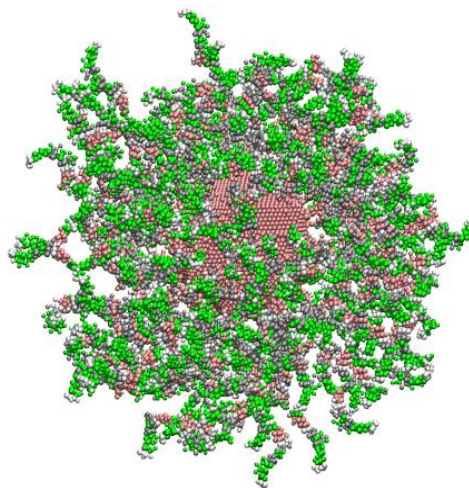


Fig. 1 Nanoparticula de aur functionalizata cu lanturi ADN

Rezumatul proiectului

nanoCrAud cuprinde 3 obiective principale : O1 - Optimizarea acoperirii cu oligonucleotide a GNP-urilor; O2 - Investigarea conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu lanturi AND; O3 - Investigarea detaliata a conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9. Cele 3 obiective cu activitatile aferente au fost realizate in totalitate.

Descrierea detaliata a activitatilor prevazute in fiecare etapa este prezentata in sectiunile urmatoare, incepand cu prezentarea metodelor si programelor utilizate in constructia complexului CRISPR/Cas9-Gold.

Articolul cu titlul "Size and surface coverage density are major factors in determining thiol modified gold nanoparticles characteristics" a fost publicat in anul 2022 in revista **Computational and Theoretical Chemistry**, iar articolul mentioneaza finantarea prin proiectul de fata. In acest studiu, au fost investigate proprietatile structurale ale nanoparticulelor de aur functionalizate utilizand simulari de dinamica moleculara pentru diferite densitati de acoperire a suprafetei. Dimensiunea nanoparticulelor de aur si densitatea de acoperire a moleculelor pe suprafata reprezinta elemente cheie utilizate in manipularea proprietatilor nanoparticulelor

functionalizate, factor esential pentru proiectarea rationala a unor vehicule de livrare bazate pe nanoparticule functionalizate.

Rezultatele au fost comunicate la **3 conferinte internationale** si **7 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/PNCDI/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 final se incheie cu cateva concluzii majore asupra rezultatelor obtinute, impreuna cu lista de referinte folosite.

1. INTRODUCERE

Pentru a intelege cum interactioneaza nanomaterialele cu sisteme biologice, si anume proteine sau acizi nucleici este de mare importanta intelegerea acestora la nivel molecular **(1)**. Studiile cu privire la mecanisme sunt necesare pentru design-ul unor noi nanomateriale cu proprietati imbunatatite si impact negativ mai redus atat pentru mediul inconjurator, cat si pentru sanatate **(2)**. Din gama larga de materiale diferite, nanoparticulele de aur (GNPs) au fost exploatate pe scara larga pentru livrarea la tinta a medicamentelor, bioimaging datorita proprietatilor lor atractive, care decurg din dimensiunea, arhitectura și funcționalizarea lor reglabile **(3; 4; 5; 6; 7)**.

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

GNPs pot fi functionalizate usor in diferite forme si dimensiuni **(8)**. Raportul mare suprafata/volum permite functionalizarea facila cu diferite tipuri de liganzi **(9)**. Acoperirea monostrat rezultata modifica proprietatile fizico-chimice ale suprafetei nanoparticulei functionalizate . Prin urmare, comportamentul GNPs determinat de proprietățile acoperirii monostrat **(9)**. Prin utilizarea moleculelor cu caracteristici specifice, proprietatile suprafetei sunt modificate pentru a controla biocompatibilitatea, interactiunile preferentiale intre moleculele ligand, precum si ajustarea sarcinii de la suprafata GNPs etc **(10)**.

Terapia genica utilizeaza diverse strategii pentru a furniza gene sanatoase in celule cu scopul de a trata, preveni sau vindeca bolile **(11)**. Spre deosebire de vectorii virali, vectorii non-virali prezinta citotoxicitate, imunogenitate si mutageneza scazuta. Vectorii non-virali, cum ar fi nanoparticulele metalice prezinta avantaje multiple, fiind mai sigure, mai usor de produs, la un pret accesibil, usor de functionalizat pentru a imbunatati transfectia si pot incapsula acizi nucleici de aproape orice dimensiune **(12; 13; 14)**. Nanoparticulele se prezinta in diferite forme, cele

sferice fiind utilizate pe scara larga datorita sintezei facile si capacitatii de a functionaliza usor suprafata lor cu diversi liganzi (15; 16). Pentru a utiliza nanoparticulele functionalizate ca agent terapeutic in domeniul medical, este necesara o molecula ligand, precum si o strategie de atasare a acestuia pe suprafata (17).

Din cauza dimensiunii extraordinar de mici a nanoparticulelor, metodele experimentale prezinta limitari (18). Din acest motiv, experimental este dificila intelegerea aprofundata a vehiculelor de livrare bazate pe nanoparticule si a potentialului de a imbunatati design-ul GNP-urilor cu aplicabilitate in biomedicina (18). Complementar, simularile de dinamica moleculara pot explica mecanismele de baza ale sistemelor moleculare implicate la un nivel de precizie atomistic (19). Dimensiunile si complexitatea sistemelor CRISPR/Cas9 necesare pentru a observa schimbarile conformationale care stau la baza functiei CRISPR-Cas9 necesita modelarea la scara larga a acestui sistem (20). Prin simulari de dinamica moleculara au fost determinate mecanismele moleculare necesare pentru a proiecta vehicule eficiente de livrare CRISPR/Cas9-Gold.

2. PROGRAME SI MODELE UTILIZATE

VMD (21) - program de vizualizare 3-D utilizat pentru sisteme biomoleculare de mari dimensiuni.

NAMD (22) - 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 (23) – 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).

CHARMM (24) – 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 (25) – camp de forte coarse-grained, unde interactiunile nelegate se bazeaza pe reproducerea profilelor experimentale de energie libera, iar interactiunile legate derivate din simulari atomistice.

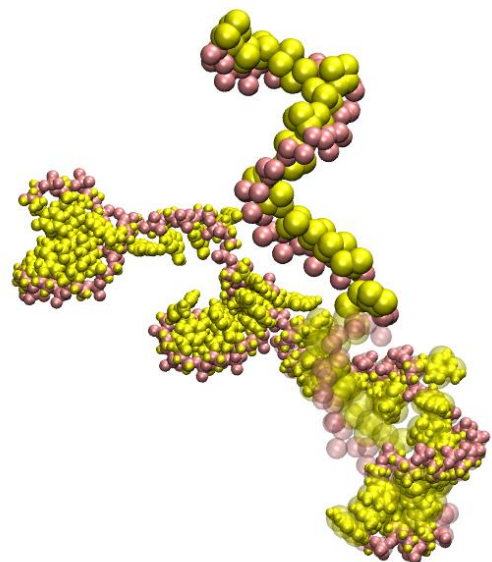


Fig 2.1 Maparea reziduurilor atomistice in bead-uri coarse-grained

3. INFRASTRUCTURA TEHNICA

Deoarece sistemele 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, este necesara utilizarea unor tehnici de simulare pentru accelerarea proceselor. Pentru efectuarea calculelor paralele intensive au fost folosite programele de modelare/vizualizare moleculară NAMD si VMD. 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 unitatile de procesare grafica (GPU-uri), acestea fiind indispensabile in accelerarea calculelor aferente sistemelor de interes. Au fost utilizate statiile de calcul 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)

✓ **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 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 si 2 placi grafice (GPU 1 x GeForce RTX 3070TI 8GB VRAM, DDR6, GPU 1 x GeForce RTX 3080TI 10GB VRAM, DDR6)

✓ **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. 3.1 Statii de calcul

4. DETALII DE MODELARE SI IMPLEMENTARE

ETAPA I

Obiectiv principal

- Optimizarea acoperirii cu oligonucleotide a GNP-urilor

Obiective specifice

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

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 TGATATGAATGAAACTCATCAAATATGCGTGTTAGTGTAATGAA
CTTCTATTTAATTTTGAGGCTCTGCAAAGTCTTTAAAGGAGCAGCAGAATGGCTTCAACTATCTGAGTGAC
ACTGTGAAGGAGATGGCCAAGAAAGCACCTTCAGAAATATGCCAGAAATATCTGTCAGAATTT
mdx sgRNA GATCCTAATACGACTCACTATAGGCTTTGAAAGAGCAATAAAA
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
mdx target ssDNA 5'...AGTCTTTGAAAGAGCAATAAAATGGCTTC...3'
Regiunea target este adiacenta la TGG – PAM motif
```

Activitatea 1.2 - Optimizarea acoperirii cu oligonucleotide a GNP-urilor

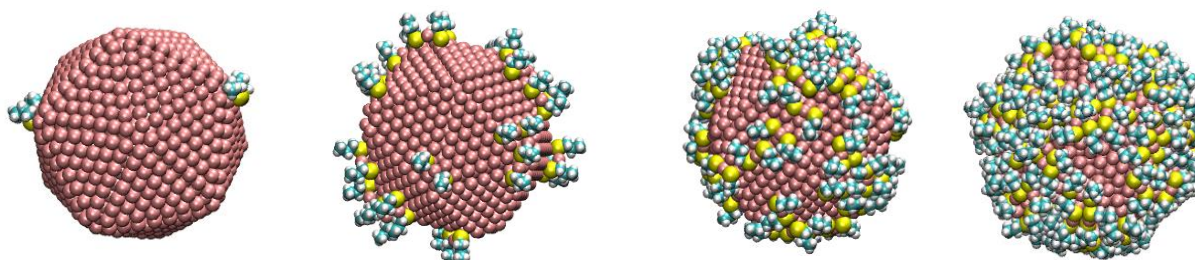
Tabel 1. Reprezentarea atomistica a nanoparticulelor de aur (atom aur - roz) cu un diametru de 5 nm si functionalizate cu grupari tiol (atom sulf – galben, atom carbon – turcoaz, atom hydrogen - alb)

1

12

25

50



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.

ETAPA II

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

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
GTTCTTTAAAGGAGCAGCAGAATGGCTTCAACTATCTGAGTGACACTGTGAAGGAGATGGCCAAGAAAGC
ACCTTCAGAAATATGCCAGAAATATCTGTCAGAATTT

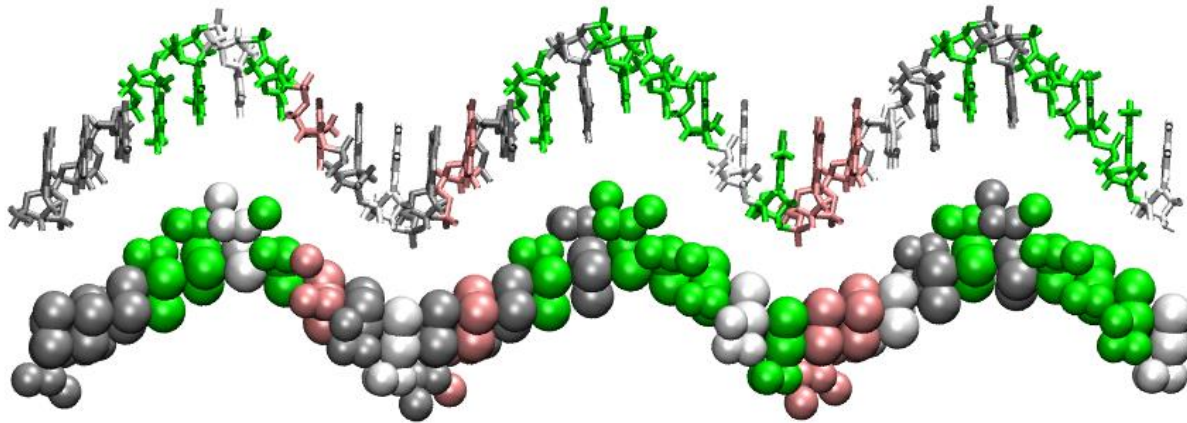


Fig. 4.1 Secventa ssADN reprezentare atomistica/coarse-grained AAATTCTGACAGATATTTCTGGCATATTTTC
 Au fost construite nanoparticule functionalizate de diferite densitati de acoperire a suprafetei, considerand diametre diferite ale acestora. Acest lucru ne-a permis sa reducem numarul de nanoparticule functionalizate 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) (26). 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 (26).

Activitate 2.3 - Extragerea unghiurilor de inclinare a lanturilor ADN modificate tiolic

Sistemul complet solvat format din nanoparticule functionalizate cu oligonucleotide poate atinge zeci/ sute de nanometri. Prin urmare, simularea a milioane de atomi devine nerealista, iar utilizarea modelelor coarse-grained devine necesara pentru a reduce numarul de grade de libertate. Din simularile realizate in cadrul **Activitatii 2.3** am extras unghiurile medii de inclinare ale lantului ssADN-SH cu suprafata nanoparticulei (vezi Fig.4.3).

Pentru diferite densitati de acoperire a suprafetei, numarul lanturilor ADN care interactioneaza intre ele se modifica, rezultand astfel o impachetare diferita a acestora pe suprafata.

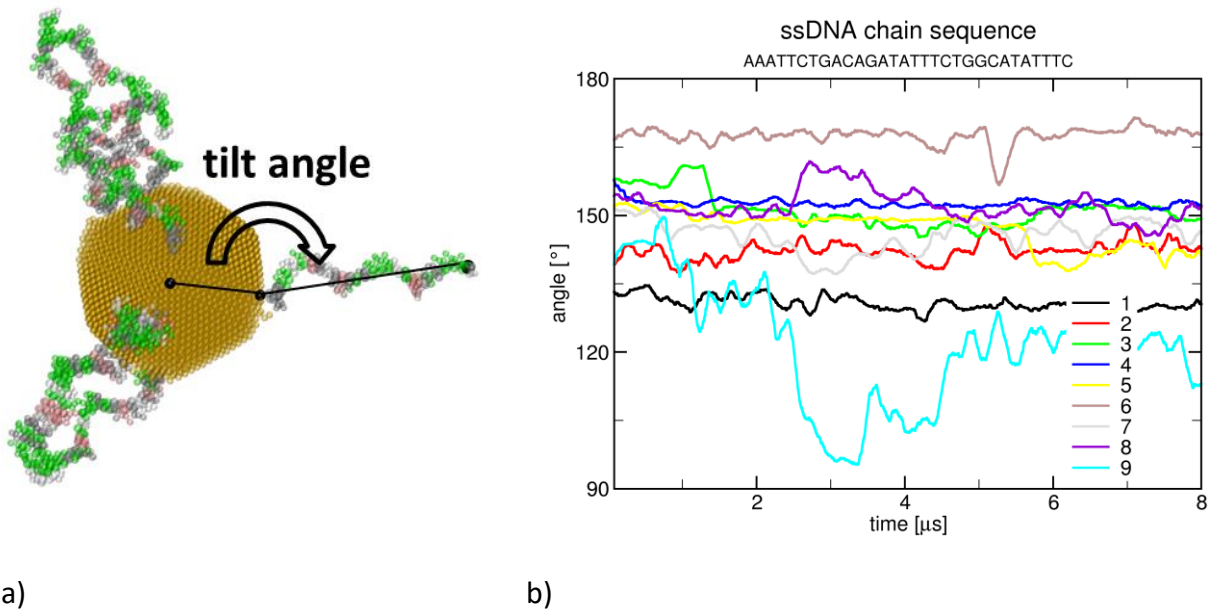


Fig. 4.2 a) Reprezentarea unghiului mediu de inclinare ale lantului monocatenar ADN-SH; b) unghiurile medii de inclinare ale lantului monocatenar ADN-SH cu tiol cu suprafața nanoparticulei.

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.

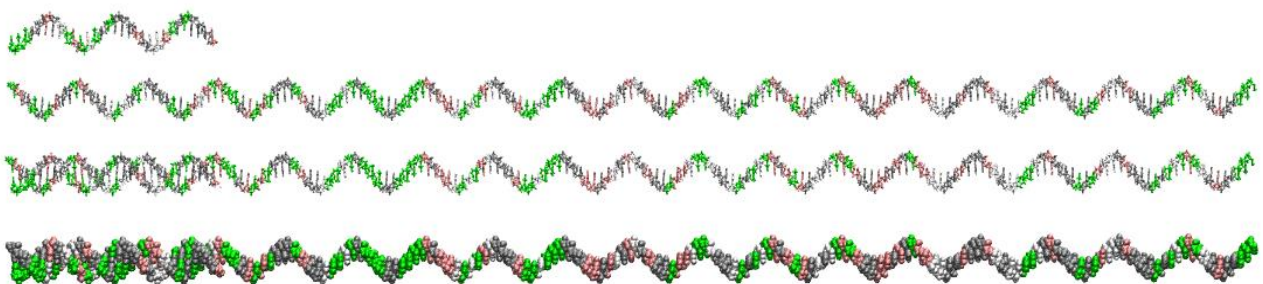


Fig. 4.3 Reprezentarea atomistica/coarse-grained a complexului ssADN-SH + donor ssADN
 Initial au fost construite structure atomistice aferente secvențelor prezentate in cadrul **Activitatii 2.1**. Ulterior, secvențele oligonucleotidelor (ssADN-SH, ADN donor) determinate pe baza sgRNA au fost hibridizate cu ajutorul programului VMD. 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.

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.

ETAPA III

Obiectiv principal

- Investigarea conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9

Obiective specifice

- Constructia sistemelor aferente conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9
- Investigarea computationally a conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9
- Analiza structurala a complexului CRISPR/Cas9-GNP
- Diseminare realizata prin intermediul paginii web a proiectului si a raportului stiintific de etapa

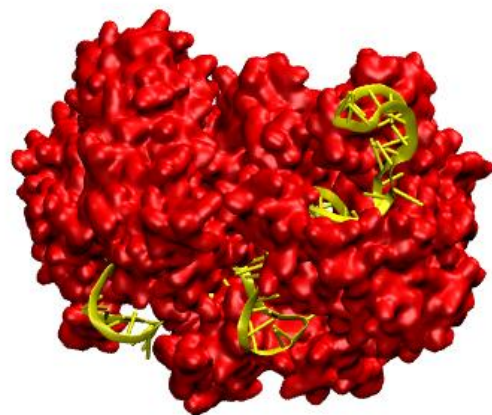


Fig. 1 Ribonucleoproteina Cas9 (rosu) si sgRNA (galben)

In acest proiect, am imbinat diferite metode de simulare a sistemelor biomoleculare si algoritmi pentru a acoperii o scala de timp relevanta pentru a descrie interactia ribonucleoproteinei Cas9, atat cu nanoparticulele functionalizate, cat si cu acizii nucleici. Am implementat o abordare de modelare multiscalara, folosind datele structurale 3D obtinute experimental pentru a construi sistematic modelele semi-atomistice care descriu acelasi sistem pe scale de timp si lungime. Am utilizat simulari de dinamica moleculara. Am folosit simulari de dinamica moleculara pentru a studia sistemul format din conjugati GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9.

Activitate 3.1 - Constructia sistemelor aferente conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9

Secvente necesare pentru simularile de dinamica moleculara a conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9:

Tiol-ssADN /5ThioMC6-D/**AAATTCTGACAGATATTTCTGGCATATTTTC**
ssADN donor

TGATATGAATGAAACTCATCAAATATGCGTGTTAGTGTAATGAACTTCTATTTAATTTTGAGGCTCTGCAAA
 GT**TCTTTAAAGGAGCAGCAGAATGGC**TTCAACTATCTGAGTGACACTGTGAAGGAGATGGCCAAGAAAGC
 ACCTTCAGAAATAT**GCCAGAAATATCTGTCAGAATTT**

mdx sgARN

GATCCTAATACGACTCACTATAGG**TCTTTGAAAGAGCAATAAAA****GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA**
AATAAGGC

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

Regiunea target este adiacenta la TGG – PAM motif

Constructia GNP decorate cu lanturi ADN modificate

tiolic

1. Nanoparticule de aur

In constructia nanoparticulelor am folosit un model icosaedric, care prezinta fete (1,1,1), fiind aproape sferic (26). Acest invelis exterior de tip Mackay a fost utilizat deoarece structura nanoparticulelor este energetic mai favorabila (27). Am construit nanoparticule de aur de diferite dimensiuni cu diametre de 5, 10, respectiv 15 nm (vezi Fig. 3.1).

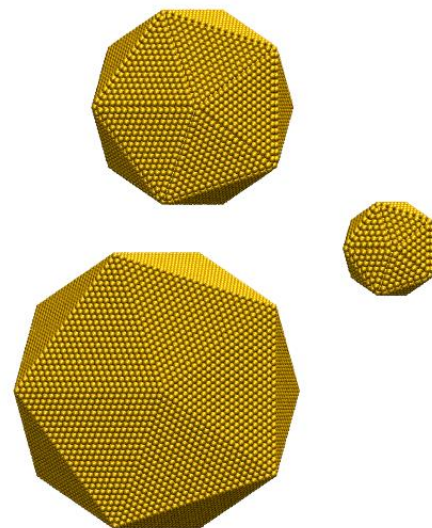


Fig. 4.4 Nanoparticule de aur

2. Nanoparticule de aur modificate tiolic

Monostratul utilizat in acoperirea nanoparticulelor de aur este alcatuit din molecule tiol care au compozitia chimica $S-[CH_2]_2-CH_3$. Atomii de sulf aferenti moleculelor de tiol se leaga covalent de atomii de aur de suprafata ai nanoparticulei de aur, fiind 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 (28; 29).

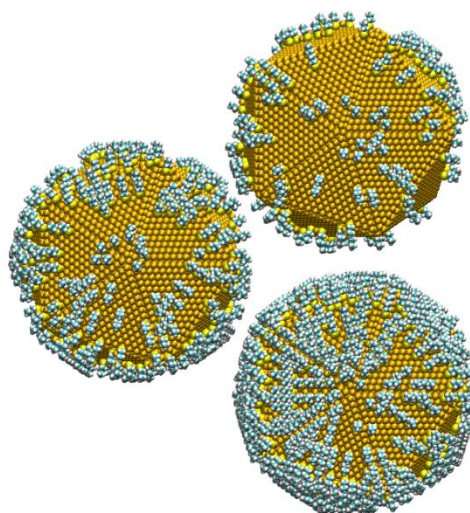


Fig. 4.5 Nanoparticule de aur modificate tiolic

3. Nanoparticule de aur functionalizate DNA

Structura atomistica initiala a lanturilor ADN 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. Lanturile ssADN modificate cu tiol (ssADN-tiol) au fost legate de atomii de la suprafata nanoparticulei. Au fost construite nanoparticule functionalizate de diferite densitati de acoperire a suprafetei, considerand diametre diferite ale acestora.

Modelarea pur atomistica a nanoparticulelor functionalizate in solutie nu este realistica la nivelul actual de putere computationala, prin urmare utilizarea modelelor semi-atomistice devine necesara. In aceasta abordare, un grup de atom reprezinta un site de interactie reducand astfel numarul de grade de libertate in timpul modelarii si permite simularea unor sisteme de mari dimensiuni. Cu ajutorul structurilor atomistice a nanoparticulelor de aur functionalizate cu ADN am construit fisierele aferente structurilor coarse-grained necesare pentru efectuarea simularilor de dinamica

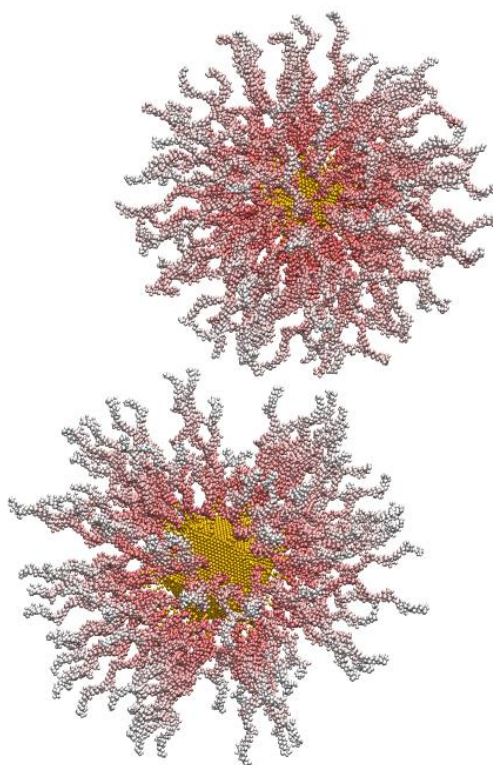


Fig. 4.6 Nanoparticule de aur functionalizate

moleculara. Au fost construite nanoparticule functionalizate de diferite densitati de acoperire a suprafetei, considerand diametre diferite ale acestora.

4. Nanoparticule functionalizate cu ADN hibrid

Lantul ADN modificat cu tiol (ssADN-tiol) si secventa de ADN donor au fost determinate pe baza sgARN. In constructia nanoparticulelor de aur functionalizate s-a realizat hibridizarea secventelor complementare ale lanturilor AND: ssADN-tiol, ADN donor.

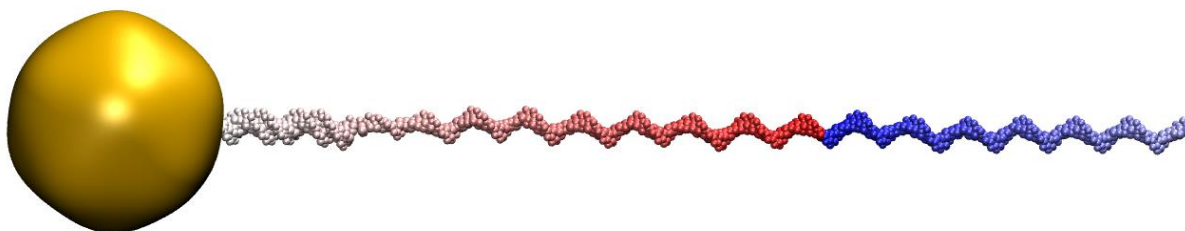
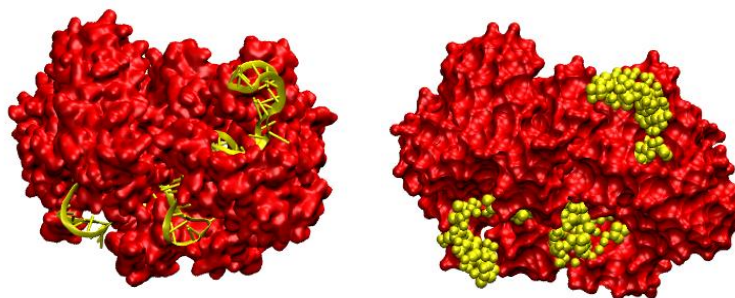


Fig. 4.7 Nanoparticula de aur functionalizata cu ADN hibrid

5. Ribonucleoproteina Cas9

A fost extrasa din baza de date Protein Data Bank, structura 3-D 5FQ5.pdb, obtinuta prin cristalografie de raze X (30). Utilizand secventa proteica a Cas9 in format FASTA am inlocuit partile lipsa din structura cristalina a proteinei. Pentru obtinerea coordonatelor lipsa am folosit Interfata Modeller (31) din programul Chimera (32). Extragand coordonatele din structurile atomistica a ribonucleoproteinei Cas9, respectiv am construit fisierele aferente structurilor coarse-grained necesare pentru efectuarea simularilor de dinamica moleculara.



Atomistic

Coarse-grained

Fig. 4.8 Ribonucleoproteina Cas9 (rosu) si sgRNA (galben)

Activitate 3.2 - Investigarea prin simulări de dinamică moleculară a conjugatilor GNP-oligonucleotide complexati cu ribonucleoproteina Cas9

Simulări atomistice

Simularile atomistice au fost realizate utilizând programul NAMD 2.13 (22). Pentru toate simularile a fost folosit câmpul de forțe CHARMM36 (24) și câmpul de forțe INTERFACE (33). Toate simularile MD au fost realizate în ansamblul NPT. Pentru particulele de apă a fost folosit modelul TIP3P (24) și au fost adăugați ioni de Cl^- și Na^+ cu o concentrație de 150 mM. Controlul temperaturii a fost realizat cu termostatul Nose-Hoover (22), iar presiunea utilizează barostatul Parrinello-Rahman (22).

În toate simularile am utilizat pasul de integrare de 2 fs, distanța de tăiere folosită a fost de 12 Å, iar funcția de comutare a fost setată la 9 Å pentru toate interacțiunile de scurtă distanță. Cu excepția interacțiunilor electrostatice, care au fost actualizate la fiecare al doilea pas, toate celelalte interacțiuni au fost actualizate la fiecare pas. Pentru a minimiza efectele de margine au fost aplicate condiții de periodicitate, iar interacțiunile electrostatice de lungă distanță au fost tratate folosind metoda Particle Mesh Ewald (PME) (22). Condiții la limita periodice au fost folosite în toate sistemele.

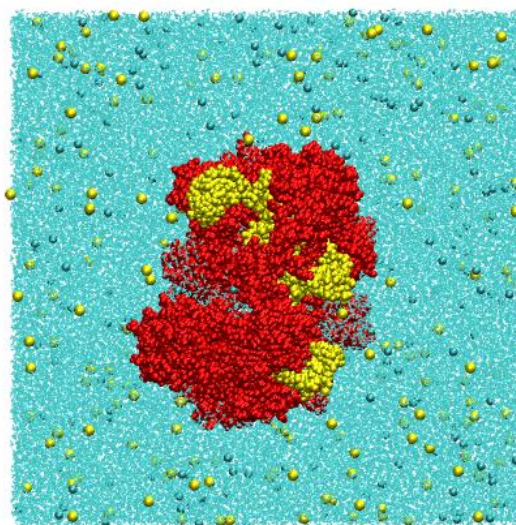


Fig. 4.9 Sistem atomistic solvata

Simulări coarse-grained

Descrierea coarse-grained a nanoparticulelor este cea din modelul atomistic, cu excepția sarcinilor. Toți atomii de Au și S sunt considerați neutri în modelul coarse-grained (25). Moleculele tiol sunt construite din particule Martini interconectate de tip S, C1. Parametrii pentru legături și unghiuri liganzilor sunt cei aferenți pentru câmpul de forțe Martini. Acești liganzi sunt legați de atomii de aur de la suprafața nanoparticulelor prin legături Au-S. Lanțurile de ADN monocatenar sunt legate prin intermediul moleculelor tiol de nanoparticula de aur. Sistemele coarse grained au fost solvate (apa MARTINI (25)) și neutralizate cu ajutorul ionilor de sodiu și clor pentru a avea concentrația molară de 0.15 mol/L.

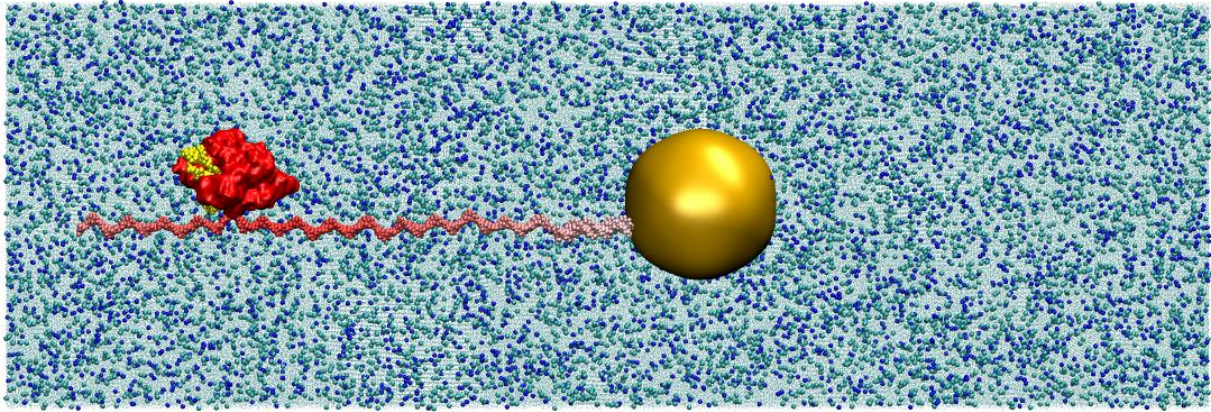


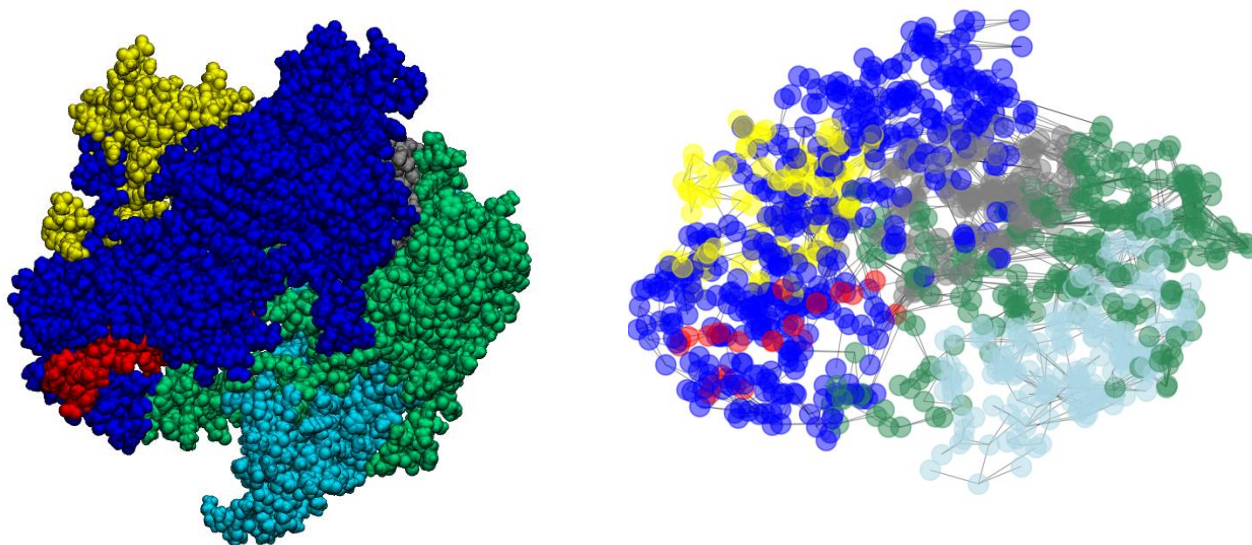
Fig. 4.10 Sistem coarse grained solvatat

Campul de forte MARTINI (25) a fost folosit in toate simularile coarse-grained. Programul Gromacs versiunea 2019 (23) a fost utilizat in toate simularile efectuate, folosind un pas de integrare de 10 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 sistemelor.

Sinteza simulari de dinamica moleculara realizate:

1. simulari atomistice nanoparticule modificate tiolic
2. simulari coarse-grained nanoparticule functionalizate DNA
3. simulari coarse-grained nanoparticule functionalizate DNA hibrid
4. simulari atomistice Cas9, respectiv Cas9/sgRNA
5. simulari coarse-grained proteina Cas9/sgRNA
6. simulari coarse-grained nanoparticulei functionalizate DNA hibrid in interactie cu proteina Cas9/sgRNA

Activitate 3.3 - Analiza comportamentului structural al complexului CRISPR/Cas9-GNP



a)

b)

Fig. 4.11 Proteina Cas9: a) Reprezentare atomistica cu sfere Van der Waals a proteinei Cas9 (RuvC – verde, Bridge helix – rosu, Rec I – albastru, Rec II – galben, HNH – gri si PAM interacting - cyan); b) Reteaua de legaturi de hidrogen a proteinei Cas9 identificate cu ajutorul interfetei Bridge2 (34), legaturile de hidrogen fiind reprezentate cu linii negre .

Funcția catalitică și legarea proteinei Cas9 este mediata de un număr redus de rezidu-uri funcționale care mențin structura proteinei. În continuare, sunt prezentate instrumente de analiză pentru identificarea site-urilor funcționale.

Proteina Cas9 leagă structura sgARN prin diferite site-uri de interacție, aflate în domenii diferite - reprezentate în culori diferite în Fig. 4.7 a). Procesul exact de legare al sgrNA de proteina Cas9 nu este cunoscut, dar există o schimbare conformatională majoră la legarea acestuia care produce activarea Cas9. Rețelele mediate de molecule de apă între diferite părți ale proteinei Cas9 sunt esențiale pentru înțelegerea dinamicii conformationale și funcționării ribonucleoproteinei. Din acest motiv au fost identificate rețelele de legături de hidrogen și interacții hidrofobice - vezi Fig.4.7 b).

Au fost identificate legăturile de hidrogen predominante (vezi Fig. 4.8), iar analizele de centralitate (grad de centralitate - numărul de muchii care se conectează direct la nod) ne-au permis să clasificăm Ruvc, Bridge helix, Rec I , Rec II , HNH și PAM interacting în funcție de importanța relativă pentru conectivitate (vezi Fig. 4.8). Cu ajutorul acestor grafice a fost realizată o imagine de ansamblu a proteinei Cas9, unde dinamica structurală este necesară în construcția rețelelor dintre motivele funcționale.

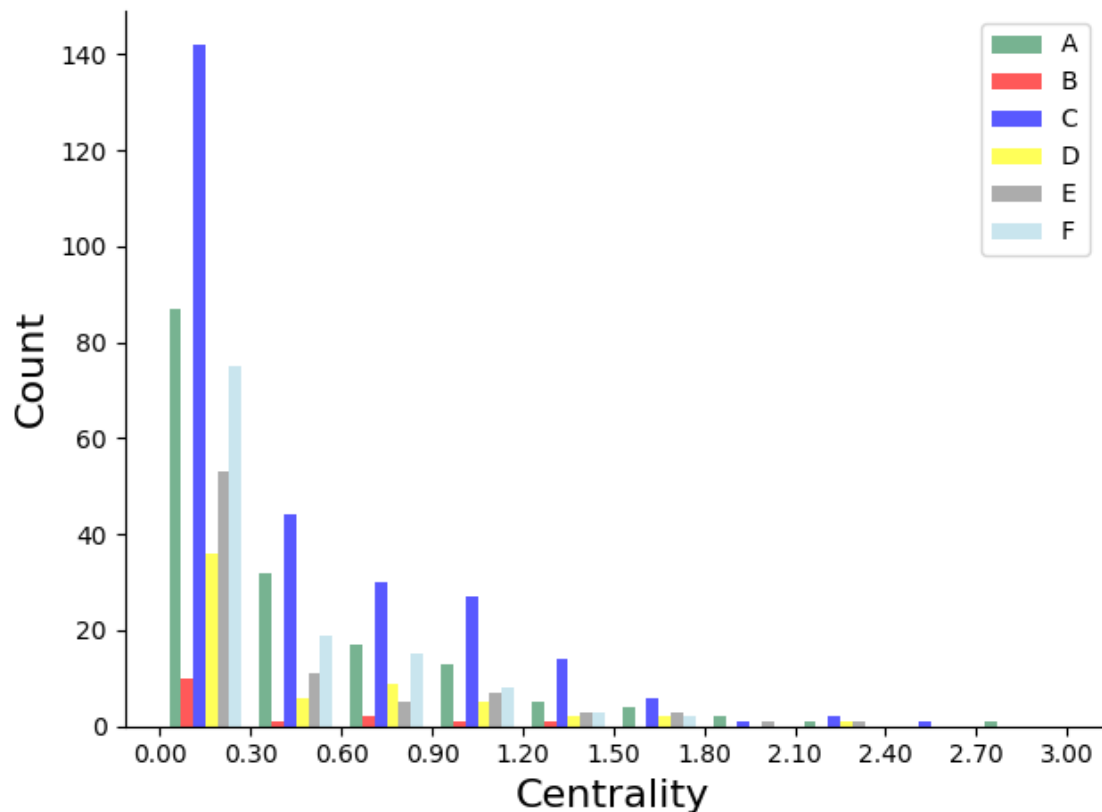
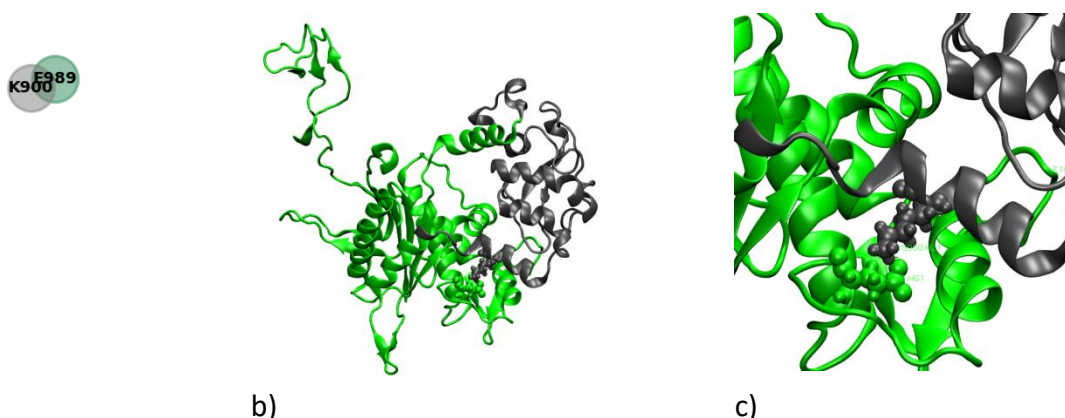


Fig. 4.12 Histograma legaturilor de hidrogen obtinuta cu plugin-ul MD Statistics din Bridge2 (34)

In Fig. 4.9 este reprezentata reseaua de legaturi de hidrogen unde sunt colorate in verde si gri domeniile proteinei Cas9, RuvC si respectiv HNH. Aceasta grupare a fost identificata prin analiza de legaturi de hidrogen - vezi Fig. 4.9 a), iar legatura de hidrogen selectata E989 - K900.



a) Legatura de hidrogen selectata E989 - K900, unde side-chain-urile selectate ale proteinei Cas9 sunt colorate in verde si gri aferente RuvC si HNH; b) Reprezentare atomistica NewCartoon a RuvC si HNH, precum pozitionarea legaturii de hidrogen; c) Zoom pozitionare legatura de hidrogen E989 - K900.

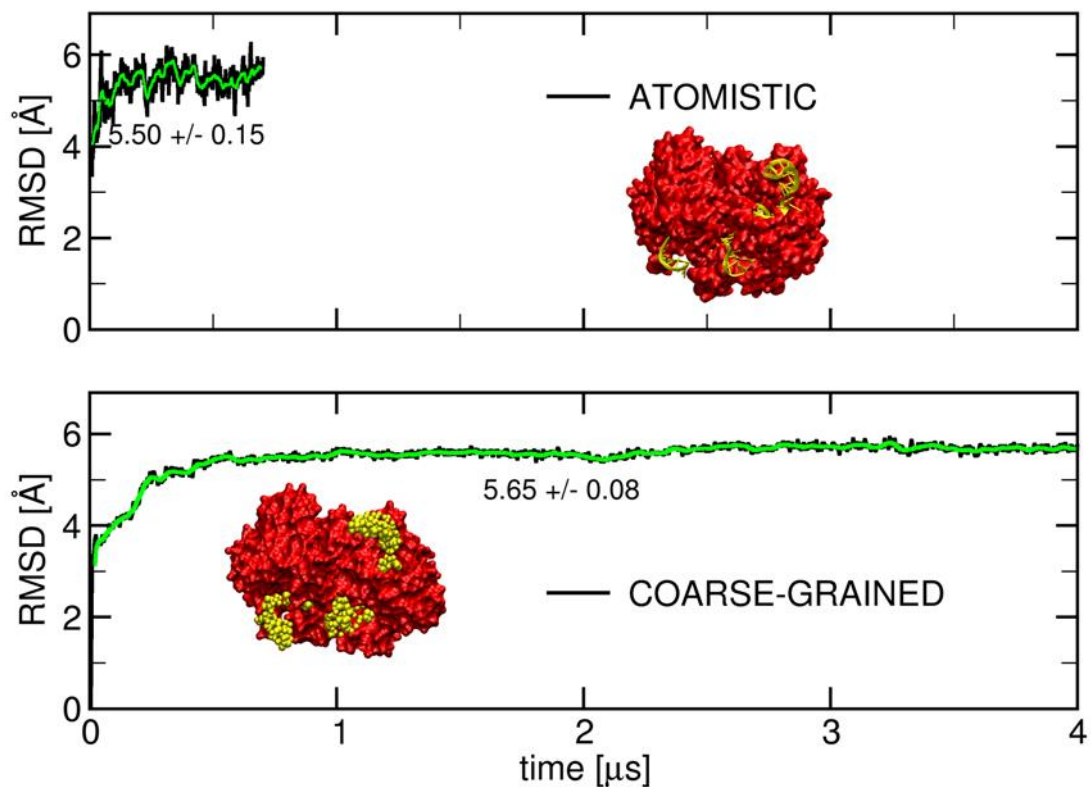


Fig. 4.14 Root Mean Square Deviation (RMSD) descrie stabilitatea structurala a atomilor/bead-urilor proteinei Cas9 in cadrul simularilor multiscalare de dinamica moleculara a ribonucleoproteinei. Am realizat modelarea multiscalara a complexului, folosind datele structurale 3D obtinute experimental pentru a construi sistematic modelele semi-atomistice care descriu acelasi sistem pe scale de timp si lungime diferite

Modelarea exclusiv atomistica a nanoparticulelor functionalizate cu lanturi ADN impreuna cu ribonucleoproteina Cas9, ioni si solvent nu este realistica avand in vedere puterea de calcul actuala. Astfel, a fost necesar sa utilizam modele coarse-grained pentru a simula sistemul compact. Au fost validate modelele coarse-grained (vezi Fig. 4.10) urmarind consistenta datelor structurale (am urmarit ca simularile coarse-grained sa produca aceleasi rezultate ca simularile atomistice pentru componentele sistemului, ribonucleoproteina si nanoparticule functionalizate cu lanturi ADN). Au fost testate componentele sistemului separat, ribonucleoproteina Cas9 si nanoparticulele functionalizate cu lanturi ADN hibridizat, pentru a realiza integrarea metodelor pentru sistemul compact.

O limitare majora a programelor de dinamica moleculara ca GROMACS pentru acest studiu este incapacitatea de a trata realist interactiunile electrostatice de distanta lunga in modelele coarse-grained, care sunt necesare pentru a modela nanoparticule functionalizate de dimensiuni mari in solutie. In concluzie, in aceasta directie este necesara dezvoltarea ulterioara a metodologiei.

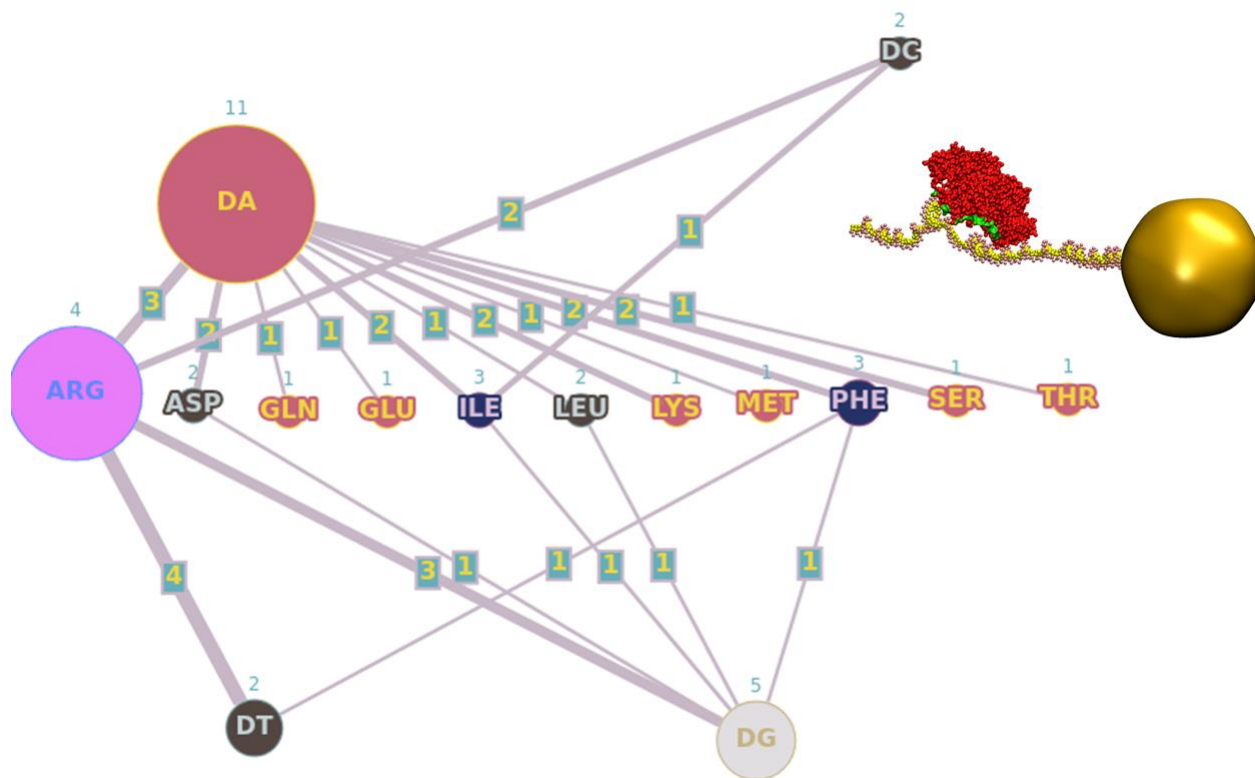


Fig. 4.15 Graful de conectivitate dintre bazele azotate ale ADN-ului donor si aminoacizii aferenti ribonucleoproteinei Cas9 (DA – adenina, DC – citozina, DG – guanina, DT - timina) in cadrul complexului CRISPR/Cas9-GNP. Cifrele de pe muchii reprezinta numarul contactelor dintre o baza azotata si un aminoacid

Pentru a avea o imagine de ansamblu la interactia dintre ADN donor si proteina Cas9 am reprezentat graful de conectivitate dintre bazele azotate ale ADN-ului donor si aminoacizii aferenti ribonucleoproteinei Cas9 (vezi Fig. 4.11). Suprafata proteinei Cas9 aflata in contact cu lantul ADN donor atasat de nanoparticula functionalizata este reprezentata in Fig. 4.11 in culoare verde. In urma analizei simularilor de dinamica moleculara, proteina si lanturile ADN aferente nanoparticulei functionalizate prezinta o interactiune puternica si prezinta contacte specifice, preponderent bazele azotate: adenina si guanina. In urma analizei grafului de conectivitate, putem observa ca interfata este dominata de rezidu-uri hidrofilice.

Pentru a studia comportamentul structural al complexului CRISPR/Cas9-GNP am identificat proprietati fizico-chimice, care reflecta abilitatea nanoparticulelor functionalizate de a forma complexi cu proteine (hidrofobicitate, capacitate de legare, etc.). Abordarea multiscalara de modelare ne-a permis sa identificam o parte din mecanismele moleculare relevante in proiectarea unor vehicule eficiente de livrare CRISPR/Cas9-Gold.

5. CONCLUZII PROIECT

1. Au fost dezvoltate modelele coarse-grained ale nanoparticulelor functionalizate adecvate pentru modelarea complexului CRISPR/Cas9-GNP in conditii fiziologice. Abordarea de modelare multiscalara a fost impartita in 3 etape:
 - a. Constructia modelelor moleculare ale ribonucleoproteinei Cas9 bazate pe datele structurale 3D obtinute experimental
 - b. Simulari multiscalare de dinamica moleculara a ribonucleoproteinei Cas9
 - c. Modelarea conjugatilor GNP-oligonucleotide hibridizati cu ADN in interactie cu ribonucleoproteina Cas9
2. Metoda de simulare dezvoltata prezinta o imbunatatire majora a viteza de calcul, cu cel putin un ordin de marime mai rapida in raport cu simularile atomistice. Elementele complexului CRISPR/Cas9-GNP au fost investigate separat, iar integrarea completa a metodelor ne-a permis studiul acestui complex de mari dimensiuni.
3. Am identificat si calculat noi descriptori fizico-chimici, care reflectă capacitatea nanomaterialelor de a forma complexi cu biomolecule (hidrofobicitate si capacitate de legare a aminoacizilor).
4. Constructia acestui cadru general a pornit de la un studiu de caz privind distrofia musculara, dar metodologia dezvoltata poate fi aplicata direct pentru alte tipuri de gene tinta, deoarece modelarea noastra se bazeaza pe principiile fizice ale interactiunilor moleculare.
5. **nanoCrAuD** ofera o noua strategie de screening, reducand nevoia de testare in vivo, pentru a identifica implicatii asupra bolii. Mai mult, am identificat cateva puncte slabe ale abordarilor computationale existente, daca sunt aplicate la interfata bio/nano, si am sugerat solutiile, care pot servi ca baza pentru dezvoltarea unor instrumente inteligente de evaluare a nanoparticulelor functionalizate.

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**, 1209, 113581 (2022), doi: [10.1016/j.comptc.2021.113581](https://doi.org/10.1016/j.comptc.2021.113581).

Conferinte internationale

1. Alexandra Farcas, Lorant Janosi and Simion Astilean, *DNA-conjugated gold nanoparticles as key components in the design of non-viral CRISPR/Cas9-Gold-based delivery vehicles*, Sixth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, "**IC-ANMBES 2022**", 8-10 June 2022, Brasov, 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.
3. 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.

Workshop-uri

1. **Gene And Cell Therapies For Healthy Ageing**, 12 April 2022, ABC-RI International Forum, Spring Edition 2022, Lisbon, Portugal (online).
2. **CRISPR without the cut: CRISPRa/i for modulating gene expression**, 2 March 2022, Science/AAAS Custom Publishing Office (online).
3. **Tips & tricks to help you characterize CRISPR gene edits**, 23 February 2022, QIAGEN, Hilden, Germany (online).
4. **World CRISPR Day**, 20 October 2021, Synthego (online workshop).
5. **4th Annual CRISPR Virtual Event**, 29 September 2021, Labroots (online workshop).
6. **Martini 3.0 online workshop**, 1-3 September 2021, Groningen, The Netherlands (online workshop).
7. **Hünfeld 2021: Workshop on Computer Simulation and Theory of Macromolecules**, 23-24 April 2021, Göttingen, Germany (online workshop).

7. REFERINTE

1. A. Albanese, P. S. Tang, and W. C. W. Chan, The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14 (2012), pp. 1– 16, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.
2. A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-bio Interface. *Nat. Mater.* 8 (2009), pp. 543– 557, doi: 10.1038/nmat2442.
3. 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. 1954–1.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. K. Haume, N.J. Mason, A.V. Solov'yov, Modeling of nanoparticle coatings for medical applications, *The European Physical Journal D*, 70 (2016), p. 181, doi:10.1140/epjd/e2016-70282-6.
9. S. Rana, A. Bajaj, R. Mout, V.M. Rotello, Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64 (2012), pp. 200-216, doi:10.1016/j.addr.2011.08.006.
10. R.C. Van Lehn, A. Alexander-Katz, Structure of mixed-monolayer-protected nanoparticles in aqueous salt solution from atomistic molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. C*, 117 (2013), pp. 20104-20115, doi: 10.1021/jp406035e.
11. 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.
12. M. K. Riley, Vermerris W. Recent advances in nanomaterials for gene delivery-a review. *Nanomaterials* 7 (2017), p. 94. doi: 10.3390/nano7050094.
13. 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.
14. 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: 10.1.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. O.A. Perfilieva, D.V. Pyshnyi, 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.
27. D. Bochicchio, R. Ferrando Size-Dependent Transition to High-Symmetry Chiral Structures in AgCu AgCo, AgNi, and AuNi Nanoalloys, *Nano Letters*, 10 (10) (2010), pp. 4211-4216, doi: 10.1021/nl102588p.
28. W.D. Luedtke, U. Landman Structure, Dynamics, and Thermodynamics of Passivated Gold Nanocrystallites and Their Assemblies *J. Phys. Chem. B*, 100 (1996), pp. 13323-13329, 10.1021/jp961721g.
29. M.J. Hostetler, J.E. Wingate, ..., R.W. Murray Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size *Langmuir*, 14 (1998), pp. 17-30, 10.1021/la970588w.
30. <https://www.rcsb.org/>.
31. B. Webb, ... A. Sali, Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller, *Curr Protoc Bioinformatics.* 54 (2016), pp. 5.6.1–5.6.37, doi: 10.1002/cpbi.3.
32. E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, ... Ferrin, T.E. "UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *J. Comput. Chem.* 25 13 (2004): pp. 1605-1612., 10.1002/jcc.20084.
33. 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/la3038.
34. M. Siemers, A.-N. Bondar, Interactive Interface for Graph Based Analyses of Dynamic H-Bond Networks: Application to Spike Protein S, *J. Chem. Inf. Model*, 61 (2021), pp.2918-3014, doi:10.1021/acs.jcim.1c00306.