



UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI
FACULTATEA DE FIZICĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Modelarea și simularea unor sisteme
biomoleculare complexe**

Autor:

Andrada-Elena AILENEI
(căs. TERTECI-POPESCU)

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Titus Adrian BEU

Cluj-Napoca
2023

Abstract

Polietilenimina (PEI) este unul dintre cei mai promițători vectori nevirali pentru livrarea genică datorită eficienței sale ridicate în formarea de complecși cu ADN-ul. Această teză se concentrează pe investigarea PEI la rezoluție all-atom (AA) și coarse-grained (CG).

Am dezvoltat un câmp de forțe (CF) AA pentru PEI-ul liniar și ramificat, bazat pe calcule ab initio efectuate pentru polimeri model. Ca o noutate față de studiile anterioare, am optimizat în mod consecvent sarcinile atomice parțiale și întregul set de parametri de legătură. CF-ul AA a fost validat prin simulări de dinamică moleculară (DM) ale PEI cu diferite greutatea moleculare și fracții de protonare. Proprietățile statice (raze de girație, distanțe end-to-end) și dinamice (coeficienți de difuzie) rezultate sunt în conformitate cu studiile anterioare. Am efectuat simulări DM ale formării complecșilor ADN-PEI, care au determinat conformații favorabile de atașare.

Pentru a dezvolta un CF CG pentru PEI-ul liniar, am identificat reziduurile AA întregi ca bead-uri CG și am selectat parametrii de nelegătură dintre tipurile standard Martini. Parametrii de legătură au fost derivați pe baza aplicării tehnicii Boltzmann Inversion asupra distribuțiilor de probabilitate ale lungimii legăturilor, unghiurilor și unghiurilor diedrale rezultate din simulările AA. Simulările CG ale PEI au determinat un acord foarte bun cu rezultatele AA și cele experimentale, validând CF-ul CG dezvoltat.

Câmpurile de forțe AA și CG dezvoltate pentru PEI pot fi utilizate în simulări extensive ale condensării ADN-PEI, care sunt de așteptat să ofere cunoștințe semnificative pentru realizarea protocoalelor eficiente de livrare genică.

Cuvinte cheie

câmpuri de forțe atomistice, câmpuri de forțe coarse-grained, polimeri cationici, dinamică moleculară, polietilenimină, vectori neviral, livrare genică.

Cuprins

Abstract	2
1 Livrarea genică	4
1.1 Aspecte generale	4
1.2 Prezentarea tezei	5
2 Aspecte teoretice	6
2.1 Integratori în dinamica moleculară	6
2.2 Controlul temperaturii și al presiunii	7
2.3 Câmpuri de forțe ale mecanicii moleculare	7
3 Modelarea și simularea all-atom a polietileniminei	10
3.1 Introducere	10
3.2 Parametrizarea unui câmp de forțe CHARMM pentru polietilenimină liniară	10
3.3 Parametrizarea unui câmp de forțe CHARMM pentru polietilenimină ramificată	14
3.4 Simulări all-atom ale polietileniminei liniare/ramificate	18
3.5 Simulări all-atom ale formării de complecși ADN/polietilenimină (liniară/ramificată)	21
4 Modelarea și simularea coarse-grained a polietileniminei	23
4.1 Introducere	23
4.2 Dezvoltarea unui câmp de forțe MARTINI pentru polietilenimină liniară	23
4.3 Simulări coarse-grained ale polietileniminei liniare	26
4.4 Simulări coarse-grained ale formării de complecși ADN/polietilenimină	28
5 Concluzii	30
Bibliografie	33

1

Livrarea genică

1.1 Aspecte generale

Descoperirea acidului dezoxiribonucleic (ADN) în anii 1950 a marcat începutul cercetării moderne în biologia moleculară. Acest domeniu a câștigat popularitate și interes datorită faptului că oferă perspective pentru tratarea unor boli ereditare, despre care se credea a fi incurabile până în acest moment. Conceptul de livrare a acizilor nucleici în celule prin intermediul unui purtător (vector) a fost introdus în anii 1970, punând bazele unui domeniu de cercetare nou.

Vectorii folosiți pentru livrarea genică sunt grupați în două categorii majore - virali (capside virale) și nevirali (polimeri cationici, lipide, nanoparticule anorganice), fiecare prezentând avantaje și limitări importante. Este necesar ca vectorii să aibă toxicitate scăzută, eficiență ridicată de transfecție, stabilitate bună, expresie favorabilă a transgenei, producție ușoară și să fie rentabil.

Vectorii *virali* prezintă tropism natural pentru a infecta celulele și eficiență ridicată de transfer (atât in vivo, cât și ex vivo), prezentând totuși probleme majore, cum ar fi capacitatea scăzută de împachetare a materialului genetic, și imunogenitate și toxicitate ridicate [1]. Cu toate acestea, este de remarcat faptul că majoritatea medicamentelor aprobate în prezent pentru terapia genică se bazează pe vectori virali.

Vectorii *nevirali* oferă citotoxicitate și imunogenitate scăzute, fabricație ușoară și eficiență a costurilor, dar rămân în urma purtătorilor virali prin eficiența scăzută a transfecției [2]. Datorită chimiei lor simple, costurilor reduse de producție și citotoxicității scăzute, *polimerii cationici* sunt în prezent cei mai folosiți vectori nevirali pentru protocoalele de livrare genică. Polimerii cationici condensează încărcătura genetică utilă în *poliplecși* prin interacțiuni electrostatice între grupările amino protonate ale polimerului (încărcate pozitiv) și grupările fosfat ale ADN-ului/ARN-ului (încărcate negativ). Cei mai frecvent folosiți vectori nevirali sunt polietilenimina, poli(amidoamină), poli-L-lizină, chitosanul și dendrimerii cationici [3].

Polietilenimina (PEI) este un polimer utilizat pentru livrarea genică, monomerii săi fiind alcătuiți dintr-o grupare amino (neprotonată – NH, sau protonată – NH_2^+) și doi distanțieri alifatici (CH_2). PEI poate avea geometrii diferite, și anume liniare (*LPEI*) și ramificate (*BPEI*). Distribuția aminelor primare, secundare și terțiare în PEI este legată de capacitatea sa considerabilă de “buffering”, care se referă la capacitatea PEI

de a scăpa din endozom.

Limitările măsurărilor experimentale la scară atomică creează o breșă de cunoștințe în livrarea genică privind proprietățile complexilor și mecanismele de formare și condensare ale acestora, care trebuie clarificate pentru realizarea protocoalelor practice și sigure. Ca mijloc de a depăși astfel de limitări și de a descoperi condițiile optime pentru livrare eficientă a genelor, metodele de simulare deterministe, cum ar fi dinamica moleculară (DM), sunt cele mai frecvent utilizate.

1.2 Prezentarea tezei

Primul capitol prezintă aspectele generale privind livrarea genică, studiile clinice, tipurile de vectori folosiți și limitările actuale. Al doilea capitol acoperă aspecte teoretice privind dinamica moleculară, incluzând propagatoare, termostate, barostate, și tratarea electrostaticii, împreună cu o descriere a câmpurilor de forțe în mecanica moleculară. Capitolele al treilea și al patrulea prezintă câmpurile de forțe dezvoltate și rezultatele originale ale tezei, fiind grupate în două categorii, și anume cele care implică reprezentarea all-atom (capitolul al treilea) și cele care acoperă scara coarse-grained (capitolul al patrulea). Teza se încheie cu un capitol final care rezumă rezultatele centrale ale studiului și perspectivele viitoare de cercetare.

2

Aspecte teoretice

2.1 Integratori în dinamica moleculară

Simulările sunt un mijloc eficient de a studia sistemele moleculare la scară microscopică, oferind date care nu sunt ușor accesibile în experimente [4; 5]. Dinamica moleculară este o clasă *deterministă* de simulări, pentru care traiectoria particulelor (atomi, molecule) este produsă prin rezolvarea numerică a ecuațiilor de mișcare ale lui Newton. În cazul DM clasice, forțele care acționează asupra particulelor sistemului sunt modelate prin câmpuri de forțe (CF) ale mecanicii moleculare (MM), care descriu interacțiunile de legătură și nelegătură.

Principiul central în dinamica moleculară clasică este împărțirea timpului de simulare în pași de timp discreți, calcularea forțelor care acționează asupra atomilor sistemului și actualizarea pozițiilor și vitezelor acestora prin rezolvarea ecuațiilor de mișcare ale lui Newton:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i, \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (2.1)$$

unde m_i este masa particulei i . $\mathbf{F}_i$ este forța rezultată care acționează asupra particulei i , fiind produsă de câmpurile externe și interatomice.

La fiecare pas de timp, un integrator DM, cum ar fi algoritmul *Velocity Verlet* [6; 7], este folosit pentru a propaga vitezele și pozițiile la următorul pas de timp. Metoda *Velocity Verlet* este un algoritm în doi pași, care utilizează poziții și viteze sincronizate pentru integrarea ecuațiilor de mișcare. În pasul predictor, viteza este avansată la mijlocul intervalului și poziția – pe un întreg pas de timp:

$$\begin{aligned} \mathbf{v} \left(t + \frac{\delta t}{2} \right) &= \mathbf{v}(t) + \dot{\mathbf{v}} \frac{\delta t}{2} + O(\delta t^2) \\ \mathbf{r}(t + \delta t) &= \mathbf{r}(t) + \mathbf{v} \left(t + \frac{\delta t}{2} \right) \delta t + O(\delta t^3) \end{aligned} \quad (2.2)$$

În pasul corector, accelerația și viteza sunt propagate la sfârșitul unui interval de timp complet:

$$\begin{aligned} \mathbf{a}(t + \delta t) &= \frac{\mathbf{F}(\mathbf{r}(t + \delta t))}{m} \\ \mathbf{v}(t + \delta t) &= \mathbf{v}\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) + \mathbf{a}(t + \delta t)\frac{\delta t}{2} \end{aligned} \quad (2.3)$$

Algoritmul este reversibil în timp și conservă în mod corespunzător energia totală a sistemului. Este un algoritm $O(\delta t^3)$ și are cerințe mici de stocare [8]. Velocity Verlet este metoda de integrare cel mai frecvent utilizată în programele moderne de simulare DM.

2.2 Controlul temperaturii și al presiunii

În multe aplicații, un termostat poate fi folosit pentru a menține temperatura la o valoare constantă, deoarece, în general, e necesar să se calculeze cantități din ansamblurile NVT sau NPT (număr constant de particule – N, volum constant – V sau presiune – P, respectiv, și temperatură constantă – T) [9; 10]. Multe sisteme biomoleculare au dezvăluit comportamente/proprietăți diferite la temperaturi diferite (de exemplu, folding-ul/unfolding-ul proteinelor [11]), astfel încât problema controlului temperaturii devine deosebit de importantă. Algoritmul *Berendsen* [12] implică faptul că sistemul este cuplat la o baie de căldură cu temperatura T_0 și, prin redimensionarea vitezelor particulelor, încearcă să corecteze abaterile temperaturii sistemului, T , de la T_0 .

Deoarece experimentele sunt de obicei efectuate la presiune constantă, simulările DM necesită, în general, utilizarea unui barostat pentru a produce rezultate semnificative, care pot fi ușor comparate cu datele experimentale. Algoritmul Parrinello-Rahman [13; 14] asigură o valoare constantă a presiunii în timpul simulării prin ajustarea coordonatelor particulelor și a vectorilor casetei de simulare. În special, acest algoritm generează traiectorii consistente cu un ansamblu NPT [10].

2.3 Câmpuri de forțe ale mecanicii moleculare

În domeniul chimiei computaționale și cel al dinamicii moleculare, un câmp de forțe (CF) este un model care specifică forma funcțională a energiei potențiale din care sunt derivate forțele reale care acționează asupra atomilor. Potențialul încorporează termeni pentru interacțiuni de legătură și nelegătură, așa cum este descris în cele ce urmează.

În majoritatea modelelor FF utilizate în prezent, interacțiunile de nelegătură sunt compuse din termenii de repulsie și dispersie prezenți în potențialul van der Waals și

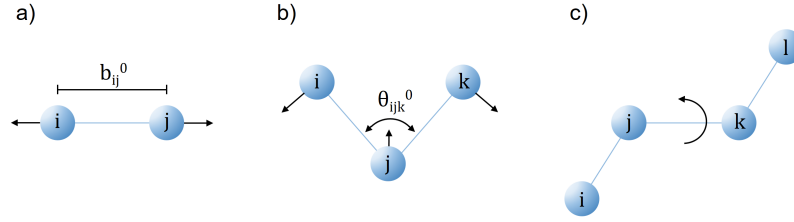


Figura 2.1: Interacțiunile de legătură. După Abraham et al. [10]

cel electrostatic ($U_{Coulomb}$). Potențialul 12 – 6 *Lennard-Jones (LJ)* este potențialul cel mai frecvent utilizat pentru interacțiunile *van der Waals*, fiind exprimat ca [15]:

$$U_{LJ}(r_{ij}) = \begin{cases} 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] & , r_{ij} < r_{cut} \\ 0 & , r_{ij} \geq r_{cut} \end{cases} \quad (2.4)$$

unde r_{ij} este interdistanța dintre atomii i și j , σ este distanța corespunzătoare potențialului nul, și ε este adâncimea gropii de potențial. r_{cut} este o distanță de trunchiere, dincolo de care interacțiunea LJ este considerată neglijabilă.

Pentru perechea de atomi i și j , termenul $(\sigma/r_{ij})^{12}$ determină repulsia la r_{ij} mici, din cauza suprapunerii orbitalilor electronici. Al doilea termen din ecuația 2.4, și anume $-(\sigma/r_{ij})^6$, caracterizează atracția la valori mari r_{ij} (corespunzătoare forțelor de dispersie London) datorită interacțiunilor dipol-dipol.

Potențialul Coulomb definește interacțiunea *electrostatică* dintre două particule caracterizate de sarcinile q_i și q_j și pozițiile $\mathbf{r}_i$ și $\mathbf{r}_j$, respectiv:

$$U_{Coulomb}(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (2.5)$$

unde $r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$ indică distanța dintre atomi i și j , ϵ_0 este permitivitatea în vid și ϵ_r este permisivitatea relativă.

Interacțiunile de legătură reprezintă extensiunea legăturilor, flexiunea unghiurilor și torsiunea unghiurilor diedrale (Figura 2.1 a, b și, respectiv, c). *Extensiunea legăturilor* (Figura 2.1a) poate fi reprezentată prin:

$$u_b(b) = \frac{1}{2}K_b(b - b_0)^2 \quad (2.6)$$

Acest potențial reproduce foarte bine minimul potențialului Morse. Cu toate acestea, ruperea legăturilor și separarea atomilor nu sunt luate în considerare în această aproximație [16].

Flexiunea unghiurilor (Figura 2.1b) poate fi modelată printr-un potențial armonic având forma legii lui Hooke [11]:

$$u_{\theta}(\theta) = \frac{1}{2}K_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad (2.7)$$

unde θ_0 este unghiul de referință și K_{θ} este constanta forței unghiului.

Un unghi diedral propriu (Figura 2.1c) este definit ca unghiul ϕ dintre planurile ijk și jkl , cu convenția că un unghi nul reprezintă izomerul geometric *cis*, iar un diedral de 180° ilustrează configurația *trans* [10]. Potențialul de torsiune a unghiurilor diedrale este definit ca:

$$u_{\phi}(\phi) = \frac{1}{2}K_{\phi}[1 + \cos(n\phi - \phi_s)] \quad (2.8)$$

unde n este multiplicitatea diedralului, iar ϕ_s este faza.

Unghiurile diedrale improprii sunt folosite pentru a modela flexiunea în afara planului, în părțile plane ale moleculelor (cum ar fi inele), iar potențialul cu care sunt modelate este armonic [10]:

$$u_{\xi}(\xi) = \frac{1}{2}K_{\xi}(\xi - \xi_0)^2 \quad (2.9)$$

ξ_0 este unghiul de referință și K_{ξ} - constanta de forță pentru flexiunea în afara planului [16].

Deoarece mișcarea unui atom ca parte a unei molecule este puternic cuplată cu mișcările altor atomi, un termen de potențial este uneori util pentru a explica efectul combinat al mișcărilor de extensiune a legăturilor și de flexiune a unghiului. În acest scop, potențialul Urey-Bradley este folosit pentru a modela interacțiunea dintre atomii nelegați 1 și 3 ca o consecință a mișcărilor de extensiune și flexiune cuplate [16]:

$$u_{UB}(r_{1,3}) = \frac{1}{2}K_{UB}(r_{1,3} - r_{1,3;0})^2 \quad (2.10)$$

unde $r_{1,3}$ reprezintă distanța curentă dintre atomii 1 și 3, iar $r_{1,3;0}$ - distanța de echilibru respectivă.

3

Modelarea și simularea all-atom a polietileniminei

3.1 Introducere

Domeniul livrării genice a beneficiat de o popularitate tot mai mare în ultimele decenii și, în mod natural, simulările de dinamică moleculară au fost folosite în acest context pentru a obține cunoștințe despre design-ul eficient al vectorilor de livrare. Cu toate acestea, din cauza naturii complicate a dezvoltării câmpurilor de forțe (CF), foarte puține studii computaționale au folosit parametri optimizați special pentru compuși simulați, bazându-se pe CF-uri de uz general. Mai exact, CF-urile folosite în studiile anterioare (de exemplu cele utilizate în Ref. 17, 18, 19 etc.) au fost doar parțial optimizate pentru PEI, având ajustate fie doar sarcinile atomice parțiale, sau termenii diedrali.

Grupul nostru a dezvoltat anterior un CF pentru PEI bazat pe reziduuri $-C-C-N-$ [20], parametrizând consecvent parametrii de legătură și sarcinile atomice. În această lucrare, definind reziduuri simetrice $(-C-N-C-)$, am parametrizat câmpuri de forțe pentru două arhitecturi PEI, și anume polimeri liniari și ramificați. Calitatea înaltă a CF-ului rezultat a fost demonstrată prin realizarea de simulări AA ale PEI având diferite dimensiuni și fracții de protonare (f_P), comparând rezultatele lor structurale și dinamice cu datele experimentale și simulând formarea de complecși ADN-PEI.

Notă: Nomenclatura polimerilor conține o literă care denotă arhitectura: L - pentru PEI liniar, sau B - pentru PEI ramificat. Este indicat și numărul de monomeri care formează (a) lanțul în cazul $LPEI$, sau (b) fiecare dintre cele trei ramuri în cazul $BPEI$. În cele din urmă, pentru a evidenția modelele de protonare, fie “-p0”, fie “-un” este atașat la numele polimerilor, “-p0” indicând PEI neprotonați și “-un” reprezentând lanțuri protonate uniform cu 1-în- n unități protonate.

3.2 Parametrizarea unui câmp de forțe CHARMM pentru polietilenimină liniară

Cu scopul de a dezvolta un câmp de forțe simplu, dar versatil, pentru polietilenimină, care ar putea fi utilizat împreună cu CHARMM pentru alți compuși de interes (cum ar

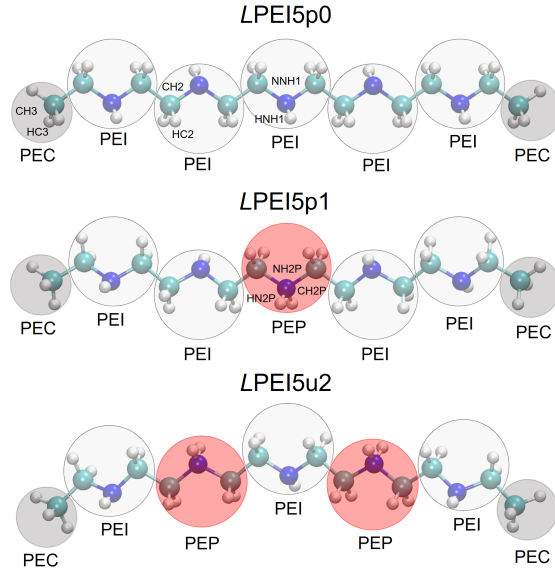


Figura 3.1: Polimeri model *LPEI* folosiți în parametrizarea câmpului de forțe AA pentru lanțuri liniare, evidențiind tipurile de reziduuri și atomi definite.

fi ADN), am ales să definim cât mai puține tipuri de atomi și reziduuri. După cum se vede în Figura 3.1, am dezvoltat CF-ul pentru *LPEI* în funcție de trei polimeri model, prin maparea grupurilor funcționale în reziduuri *simetrice*. Numai sarcini întregi (fie $0e$, fie $+1e$) au fost luate în considerare pentru reziduurile definite. În mod specific, am definit următoarele tipuri de reziduuri: *PEI*: $\text{CH}_2\text{—NH—CH}_2$ – reziduu neprotonat; *PEP*: $\text{CH}_2\text{—NH}_2^+\text{—CH}_2$ – reziduu protonat; și CH_3 – grupare metil de capăt.

Pentru a caracteriza în mod adecvat conectivitatea dintre atomii adiacenți din lanț, am definit nouă tipuri de atomi: *CH2* și *HC2*: – Atomi de C și H din PEI; *NNH1* și *HNH1*: – Atomi de N și H ai grupării NH din PEI; *CH2P*: – atom de C din PEP; *NH2P* și *HN2P*: – Atomi de N și H ai grupării NH_2^+ din PEP; și *CH3* și *HC3*: – Atomi de C și H din PEC.

3.2.1 Parametrii Lennard-Jones

Potențialul Lennard-Jones (LJ) are forma:

$$U_{LJ} = \sum_{\text{atoms } i,j} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3.1)$$

unde ε_{ij} este adâncimea gropii de potențial, și $R_{\min,ij}$ este poziția la care potențialul este minim.

Parametrii Lennard-Jones, însemnând valorile ε și $R_{\min}$ pentru fiecare tip de atom

din noul model LPEI au fost alocați pe baza celui mai potrivit corespondent din CHARMM36. Atomii CH2 și CH2P au fost identificați cu atomi de carbon alifatic pentru grupările CH₂, adiacente grupărilor amino neutre și, respectiv, pozitive, iar CH3 - cu C alifatic pentru grupările CH₃. Atomii NHN1 și NH2P au fost modelați ca atomi de azot neutru de dimetilamină-(CH₃-NH-CH₃) și, respectiv, azot secundar din NH₂⁺. Pentru hidrogeni, am ales tipurile potrivite pe baza conectivității lor cu un atom greu: de exemplu, HC2 a fost identificat ca H alifatic pentru grupările CH₂, în timp ce HNH1 a fost descris cel mai bine de un atom de H dintr-o grupare dimetilamină.

3.2.2 Sarcini atomice parțiale

Având în vedere că unul dintre obiectivele acestei lucrări a fost acela de a dezvolta un câmp de forțe coarse-grained (CG) pentru PEI, am ales să constrângem sarcinile reziduurilor individuale (care vor deveni bead-uri CG) la valori întregi.

Potențialul Coulomb depinde de sarcinile atomice parțiale astfel:

$$U_{Coulomb} = \sum_{atoms\ i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3.2)$$

unde q_i și q_j sunt sarcinile atomilor i și j , ϵ_0 reprezintă constanta dielectrică (înmulțită cu 4π în unități SI) și r_{ij} este interdistanța $i-j$.

Pentru a parametriza sarcinile atomice parțiale, ffTK (force field ToolKit) [21] se bazează pe ideea centrală că moleculele modelate trebuie să se comporte realist în medii solvate, astfel încât moleculele de apă trebuie să aibă orientări inițiale rezonabile în raport cu compuşii considerați. În acest scop, atomii de hidrogen din PEI au fost clasificați ca *donori* în cadrul legăturilor de hidrogen, în timp ce atomii de azot din reziduurile neprotonate – ca *acceptori*. Pentru fiecare atom clasificat fie ca donator, fie ca acceptor, a fost construit un complex format din modelul LPEI și o moleculă H₂O plasată într-o poziție relativă reprezentativă. Pentru fiecare sistem LPEI-H₂O, distanța relativă și unghiul de rotație al moleculei de apă au fost optimizate cuantic, la nivel HF/6-31G(d), în timp ce celelalte grade de libertate au fost constrânse.

În conformitate cu convențiile câmpului general CHARMM, tuturor atomilor de hidrogen alifatic li s-a atribuit sarcina de +0,09e și nu au mai fost incluși în procesul de optimizare. De asemenea, am impus neutralitate modelului LPEI5p0 neprotonat, sarcina de +1e pentru LPEI5p1 și +2e pentru LPEI5u2.

3.2.3 Parametri pentru legături și unghiuri

Potențialul care descrie legăturile și unghiurile formate de atomi consecutivi are următoarea formă armonică:

$$U_{bond} + U_{angle} = \sum_{bonds} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (3.3)$$

unde K_b și K_θ sunt constantele de forță pentru legături și unghiuri, în timp ce b_0 și θ_0 sunt valorile de echilibru respective.

Pentru optimizarea parametrilor pentru legături și unghiuri, fTK se bazează pe ajustarea iterativă a energiei de distorsiune a mecanicii moleculare (MM), astfel încât să reproducă cât mai precis posibil omologul cuantic (QM). Peisajul local al suprafeței de energie potențială (SEP) poate fi descris prin matrice Hessiene, care pot fi calculate prin calcule vibraționale efectuate cu Gaussian09 [22]. Prin urmare, fTK folosește matricea Hessiană pentru a caracteriza modificarea energiei QM determinată de mici abateri ale coordonatelor interne (IC) de la geometria de echilibru. În schimb, energia de distorsiune MM este dată de energiile totale, calculate cu constante de forță și valori de echilibru trial.

Abaterile MM-QM sunt deja mici după primul pas de optimizare, scăzând și mai mult până la sfârșitul procesului de optimizare, așa cum arată și scăderea de aproximativ 61% a funcției obiectiv. Într-adevăr, valorile foarte mici ale diferențelor maxime MM-QM, și anume $\sim 2 \times 10^{-2}$ Å pentru legături și $\sim 2^\circ$ pentru unghiuri, confirmă calitatea înaltă a parametrilor. În lucrarea originală a câmpului CHARMM [23], Vanommeslaeghe et al. a indicat că diferențele în ceea ce privește datele QM trebuie să fie mai mici de 3×10^{-2} Å, și respectiv 3° pentru legăturile și unghiurile de echilibru.

Parametrii de legătură au fost mediați pe valorile lor din cele trei reziduuri centrale (adică unitățile 2, 3 și 4) ale pentamerilor model, pentru a neglija orice efecte marginale nedorite ale capetelor PEC. În ceea ce privește efectul protonării, am găsit o legătură C–N mai slabă în reziduul de PEP protonat (CH₂P–NH₂P), decât corespondentul său din reziduul PEI (CH₂–NNH₁), demonstrată printr-o scădere de 20% a constantei de forță.

O inspecție inițială a valorilor rigidității unghiurilor a demonstrat faptul că K_θ este mai mare în vecinătate sau în interiorul reziduurilor protonate. Unghiurile mai rigide găsite în prezența siturilor protonate nu sunt direct corelate cu legăturile constitutive, acestea din urmă fiind de fapt mai slabe în interiorul reziduului PEP.

3.2.4 Parametri diedrali

Potențialul unghiurilor diedrale depinde de constanta de forță K_ϕ , de multiplicitatea n și de defazarea δ și se exprimă astfel:

$$U_{dihedrals} = \sum_{dihedrals} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \quad (3.4)$$

Abordarea de a caracteriza suprafața de energie potențială prin matrice Hessiene se dovedește potrivită pentru optimizarea legăturilor și unghiurilor, deoarece descrie cu acuratețe peisajul energetic din vecinătatea minimelor. În schimb, pentru unghiurile diedrale, tratarea regiunilor de energie înaltă, care este de asemenea importantă, nu poate fi modelată prin potențiale armonice. În consecință, ffTK utilizează scanări de torsiune QM ale coordonatelor, pentru fiecare unghi diedral de-a lungul backbone-ului modelului, utilizate pentru a potrivi profilele MM. Mai exact, pentru fiecare scanare, a fost compilată o serie de optimizări QM ale geometriei la nivel MP2/6-31G(d), păstrând constrâns diedralul considerat, și permițând în același timp restului moleculei să se relaxeze complet. În ceea ce privește succesiunea optimizărilor geometriei, diedralele au fost distorsionate în pași de 10° , în intervalul simetric de -90° și $+90^\circ$.

Parametrizarea unghiurilor diedrale a implicat minimizarea iterativă a abaterilor profilului energetic MM de la datele QM până când s-a realizat o potrivire acceptabilă (și s-a obținut o eroare pătratică medie foarte mică), ceea ce a însemnat efectuarea a sute de pași de optimizare pe baza tehnicilor downhill și simulated annealing. Calitatea optimizării diedralelor este garantată de potrivirea dintre energiile de torsiune MM și QM și de setul cuprinzător de molecule model, care include cele mai scurte lanțuri care ar putea găzdui modelele de protonare necesare pentru investigațiile prezente.

Comparând contribuțiile noastre diedrale cu cele raportate în literatură (de exemplu cele din Ref. 24), am găsit abateri MM-QM semnificativ mai mici, ceea ce indică o calitate mai ridicată a parametrilor.

3.3 Parametrizarea unui câmp de forțe CHARMM pentru polietilenimină ramificată

Am introdus două noi tipuri de reziduuri pentru parametrizarea CF-ului pentru PEI ramificat, unul pentru conectorul de ramificație și al doilea pentru capete de NH_2 , deoarece BPEI prezintă experimental terminații NH_2 în mod favorabil: *PEY*: $\text{N}(\text{CH}_2)_3$ – conector de ramificație și *PEN*: $\text{NH}_2\text{—CH}_2$ – reziduu de amină terminal.

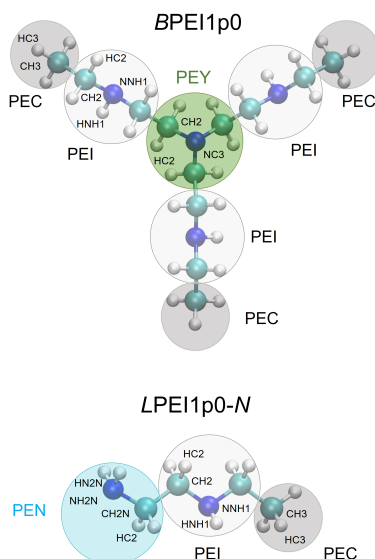


Figura 3.2: Moleculele model *BPEI1p0* și *LPEI1p0-N* utilizate în parametrizarea CF-ului pentru lanțuri ramificate, evidențiind tipurile de reziduuri și atomi definite.

Figura 3.2, prezintă cei doi polimeri model aleși pentru parametrizarea moleculelor *BPEI*: *BPEI1p0*, utilizat pentru derivarea parametrilor conectorului de ramificație (PEY) și *LPEI1p0-N*, folosit pentru terminația PEN. În cele ce urmează, litera “-N” atașată la numele moleculelor reprezintă terminarea lor în grupări NH_2 , spre deosebire de cazul în care PEI se termină în grupări metil (CH_3), care nu poartă niciun simbol distinctiv.

Am definit cinci tipuri suplimentare de atomi, ținând cont de noile conexiuni: *NC3*: – atom de N din amina terțiară; *CH2*: – atom de C din amina terțiară; *NH2N*: – atom de N din reziduul PEN terminal; *CH2N*: – atom de C din reziduul terminal PEN; și *HN2N*: – atomul de H legat de *NH2N*.

Pentru a asigura consecvența cu CF-ul parametrizat anterior pentru *LPEI*, am păstrat parametrii deja optimizați neschimbați și i-am optimizat doar pe cei care implică noile tipuri de reziduuri, PEY și PEN. Tot din motive de consecvență, am urmat metodologia implementată în fTK [21] pentru a deriva parametrii pentru *BPEI*.

Conform convenției fTK, am adoptat parametrii LJ prin analogie cu CHARMM36. Sarcinile atomice au fost optimizate în funcție de profilurile QM de interacțiune cu moleculele de apă ale polimerilor *BPEI* (la nivel HF/6-31G(d)). Parametrii pentru legături și unghiuri au fost derivați prin potrivirea energiei de distorsiune MM la profilul țintă QM. În cele din urmă, parametrii diedrali au fost extrași pe baza scanărilor de energie de torsiune, prin potrivirea suprafeței de energie potențială MM la omologul

său QM (efectuat la nivelul MP2/6-31G(d)).

3.3.1 Parametri Lennard-Jones

Tipul de atom NC3 din conectorul de ramificație a fost modelat ca atom de azot neutru din gruparea trimetilamină, iar valorile ε și R_{min} au fost adoptate din tipul NG301 definit în CHARMM36. Pentru tipurile de atomi CH2 și HC2 din reziduul PEY, am adoptat aceiași parametri LJ ca pentru echivalenții din reziduul PEI, totuși, optimizând pentru aceștia noi sarcini parțiale. Tipurile NH2N și HN2N din reziduul terminal PEN au fost modelate ca atomi de azot și, respectiv, hidrogen din metilamina, fiind identificate cu tipurile NG321 și HGPAM2 din CHARMM36. CH2N a fost modelat ca și tipul de atom CH2, menținând valorile ε și R_{min} ale tipului standard CG321.

3.3.2 Sarcini atomice parțiale

Sarcinile atomice parțiale au fost determinate din profilurile de interacțiune QM pentru complecși formați fie din BPEI1p0, fie din LPEI1p0, cu molecule de apă situate în poziții tipice relativ la molecula model. Pentru a facilita pozițiile și orientările reprezentative ale moleculelor de apă, atomii accesibili de solvent au fost clasificați pe baza abilității lor de a forma legături de hidrogen în două clase majore: *acceptori* - atomii de azot și *donori* - atomi de hidrogen din compușii model. Pentru fiecare dintre acești atomi, a fost asamblat un complex polimer-(moleculă H₂O), iar distanța și unghiul de rotație față de molecula model au fost optimizate cuantic, păstrând celelalte grade de libertate constrânse. Am impus neutralitatea pentru polimerii-model BPEI1p0 și LPEI1p0, prin urmare, doar sarcinile pentru tipurile de atomi CH2 și NC3 din PEY au fost incluse în procesul de optimizare, împreună cu cele pentru CH2N, NH2N și HN2N de la PEN.

3.3.3 Parametri pentru legături și unghiuri

Deoarece matricele Hessiene reflectă curbura SEP, fTK le folosește pentru a descrie variațiile de energie produse de distorsiuni minore ale configurației de echilibru. Mai exact, pentru fiecare coordonată internă, se produce o distorsiune minoră, iar variația de energie QM rezultată este calculată folosind matricea Hessiană. Variația de energie MM, pe de altă parte, este calculată pur și simplu utilizând parametrii trial pentru legături și unghiuri și calculând diferența dintre energiile totale care caracterizează configurațiile distorsionate și nedistorsionate. Diferența dintre energiile MM și QM este redusă iterativ până când se obține un acord acceptabil.

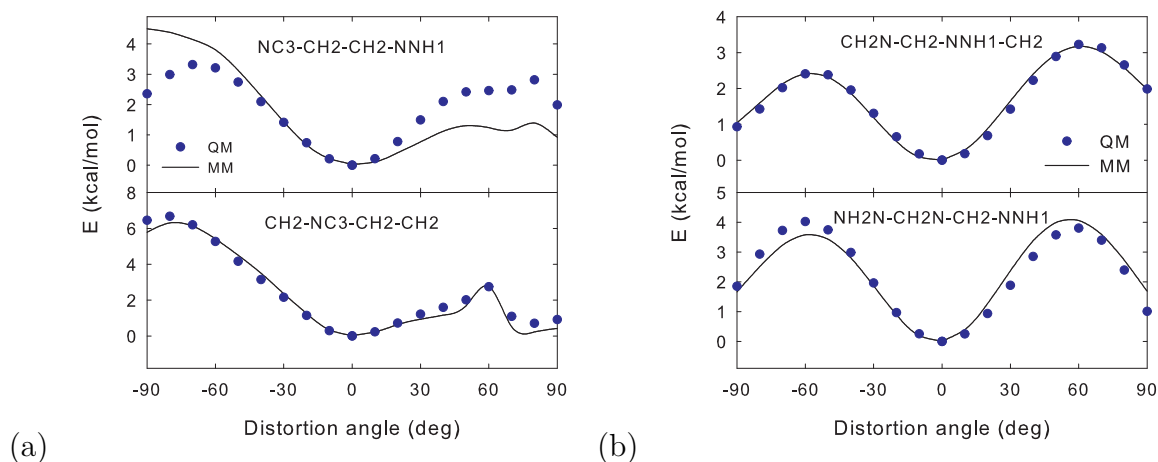


Figura 3.3: Profiluri de energie de torsiune pentru diedralele formate de atomii de backbone ai (a) *BPEI1p0* și (b) *LPEI1p0-N*.

Diferențele dintre legăturile și, respectiv, unghiurile optimizate MM și QM din etapele inițiale și finale de optimizare scad considerabil în timpul procedurii de ajustare, ceea ce se reflectă printr-o scădere cu $\sim 60\%$ a valorii funcției obiective. Diferențele respective la sfârșitul procesului de optimizare se ridică la $\sim 1,1 \times 10^{-2}$ Å pentru legături și, respectiv, $\sim 2,3^\circ$ pentru unghiuri, demonstrând potrivirea foarte bună a datelor MM și QM. Diferențele MM-QM sunt sub 3×10^{-2} Å și, respectiv, 3° pentru legături și unghiuri, așa cum sunt recomandate de autorii câmpului original CHARMM [23], indicând un acord foarte bun cu datele cuantice.

Ca o comparație cu studiile anterioare, constanta noastră de forță pentru legătura C–N din reziduu conectorului de ramificație (și anume CH2–NC3) este cu $\sim 2.4\%$ mai mică decât valoarea raportată de Mintis et al. [19], care a adoptat parametrii de legătura pentru *BPEI* din câmpul de forță General Amber [25]. Este de remarcat faptul că, parametrii de legătură nu au fost parametrizați *specific* pentru *BPEI*, ci au fost alocați prin similitudine cu structuri comparabile.

3.3.4 Parametri diedrali

Fiecare unghi diedral format din atomii de backbone a fost distorsionat din geometria de echilibru și au fost efectuate scanări de torsiune QM, care au fost folosite ca date țintă pentru potrivirea profilelor MM. Scanările au cuprins o serie de optimizări ale geometriei (la nivel MP2/6-31G(d), moleculele model fiind lăsate să se relaxeze liber în timp ce diedralul de interes era constrâns. Multiplicităților li s-au atribuit valori întregi (1, 2 sau 3) pe baza considerentelor de simetrie locală, iar defazărilor li s-a permis să

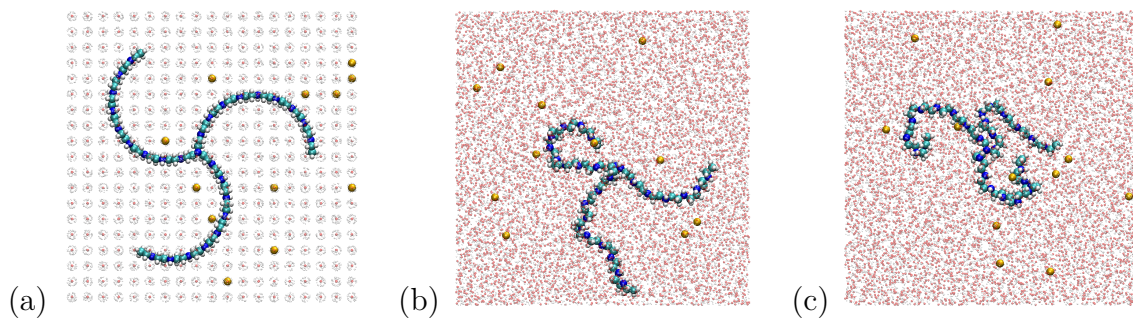


Figura 3.4: Ilustrații ale sistemului *BPEI9u2* solvatat: (a) configurația inițială, (b) după echilibrare și (c) la sfârșitul unei simulări de 10 ns.

ia numai valorile 0° sau 180° , pentru a se conforma cu standardul CHARMM.

Profilurile de energie de torsiune QM și MM pentru diedralele de backbone care implică azotul terțiar, NC3 și, alternativ, atomii de CH₂N și NH₂N din reziduul final NH₂, sunt ilustrate în Figura 3.3 (a) și (b). Corespondența dintre profilele de energie de torsiune MM și QM pentru NC3–CH₂–CH₂–NNH1 (Figura 3.3a, panoul superior) este foarte bună în jurul minimului central. Totuși, diferențele la distorsiuni mari, sunt o consecință a conectivității atomului NC3 cu cele trei ramuri, care combină acest diedral cu alte coordonate interne și are ca rezultat o mișcare mai restrânsă a azotului terțiar. Pentru restul diedralelor, există un acord foarte bun între datele MM și QM.

Parametrizarea noastră a unghiurilor diedrale iese în evidență față de lucrările anterioare [17; 19] prin potrivirea foarte bună dintre profilele de torsiune MM și QM, luând în considerare totuși o singură multiplicitate pentru fiecare diedral.

3.4 Simulări all-atom ale polietileniminei liniare/ramificate

3.4.1 Metodologie de simulare

Câmpul de forță dezvoltat a fost utilizat în simulările DM ale PEI-urilor liniare și ramificate solvate. Am considerat patru fracții de protonare uniforme (f_P), și anume: 0 (neprotonat) și $1/n$ (1-în- n unități protonate), cu n luând valorile 2, 3, și 4. Mărimile polimerilor au fost alese astfel încât toate lanțurile să acomodeze perfect toate modelele de protonare considerate. Ca regulă generală, lanțurile au fost compuse din $12N + 3$ monomeri, încadrați de grupări metil terminale (unități CH₃). Astfel, am considerat trei lungimi de lanț, și anume *LPEI* compuse din 27, 39 și 51 monomeri și *BPEI* cu ramuri egale și greutate moleculară (M_W) cât mai apropiate de polimerii liniari echivalenți.

Am solvatat sistemele în apă TIP3P [26] cu moleculele orientate aleator și poziționate pe o rețea regulată, cu scopul de a controla riguros densitatea (1 g/cm^3), și de a

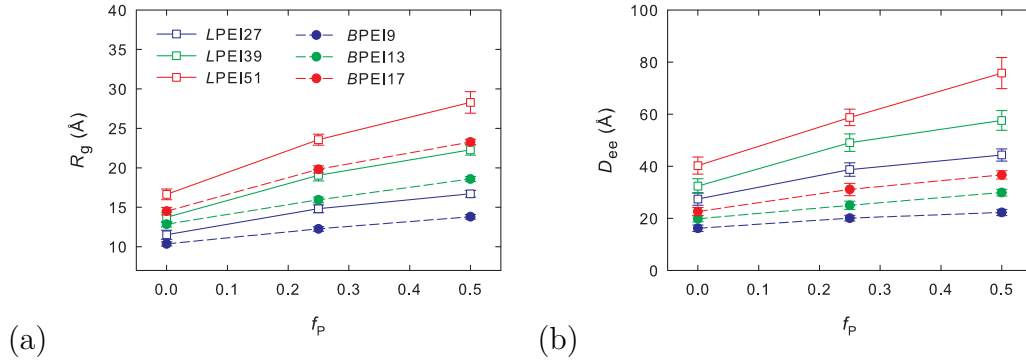


Figura 3.5: Dependența de protonare a razei de girație (a) și distanța end-to-end (b) pentru PEI ramificat (linii întrerupte), împreună cu profilele pentru PEI liniar (linii continue).

asigura ca fiecare configurație inițială este suficient de aleatoare pentru a realiza un ansamblu statistic adecvat. Ca și conformații inițiale pentru L - și B PEI am considerat aranjamentele spiralate și “triskele”, și am inserat un număr de ioni Cl^- , egal cu numărul de situsuri protonate, în poziții aleatorii pentru a neutraliza sistemele. Figurile 3.4 a, b și c ilustrează configurația inițială, evidențiind aranjamentul moleculelor de apă pe o rețea regulată și ionii de neutralizare, configurația după echilibrare și, respectiv, o ilustrație a conformației finale, pentru sisteme selectate care implică B PEI9u2.

Pentru analiza efectivă, prima nanosecundă a fiecărei simulări a fost înlăturată pentru a asigura în continuare configurații echilibrate corespunzător și pentru a neglija comportamentul tranzitoriu inițial. Erorile statistice au fost calculate după efectuarea mediilor pe ansamblu, ca abateri standard ale valorilor dependente de timp de la mărimile respective mediate în timp.

Am folosit ca integrator DM algoritmul Velocity Verlet implementat în NAMD și metoda “leap-frog” în Gromacs, cu un pas de timp de 2 fs. A fost utilizată o limită de 12 Å pentru interacțiunile de rază scurtă, iar condițiile la limită periodice (CLP) au fost aplicate în toate direcțiile carteziene. Electrostatica a fost tratată cu metoda Particle-Mesh-Ewald (PME) folosind o distanță între nodurile de rețea de 1 Å. Temperatura a fost fixată la 310 K, în timp ce presiunea a fost menținută la 1 atm.

3.4.2 Raza de girație. Distanța end-to-end

Caracteristicile structurale ale PEI-urilor liniare și ramificate simulate au fost investigate prin intermediul razei de girație (R_g) și a distanței end-to-end (D_{ee}). În domeniul științei polimerilor, raza de girație este utilizată pentru a descrie extinderea spațială a

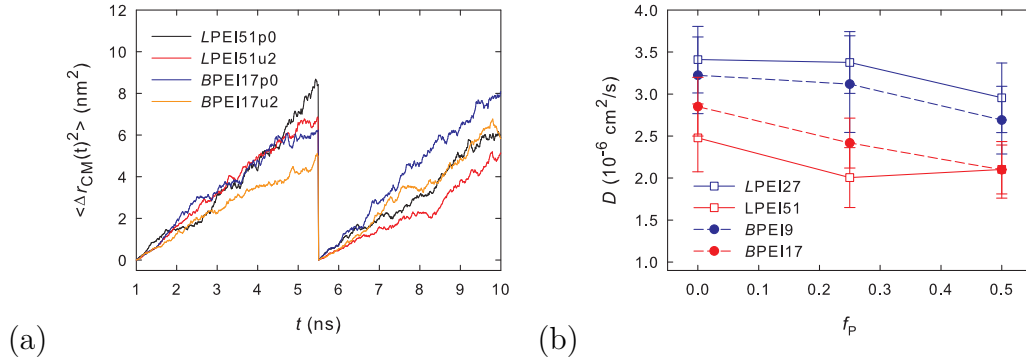


Figura 3.6: (a) Dependența de timp a deplasării medii pătratice a centrului de masă al moleculei în raport cu o poziție de referință și (b) dependența de protonare a coeficientului de difuzie, pentru LPEI51 și BPEI17 neprotonați și protonați alternativ.

polimerilor și este calculată ca:

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_{CM})^2} \quad (3.5)$$

unde N este numărul total de atomi ai polimerului, r_i este poziția atomului i și r_{CM} este poziția centrului de masă (CM) al polimerului.

Pentru PEI *liniar*, distanța end-to-end a fost calculată pur și simplu ca distanța medie dintre CM-urile grupărilor metil terminale (distanța PEC–PEC). Pentru polimerii ramificați, pe de altă parte, D_{ee} a fost calculată ca distanța medie dintre CM-urile celor trei perechi de reziduuri PEC care marchează finalul fiecăreia dintre cele trei ramuri.

Figura 3.5 ilustrează dependențele față de fracția de protonare ale valorilor R_g și D_{ee} mediate pe ansamblu și în timp pentru *L*- și *B*PEI. O creștere constantă cu fracția de protonare este evidentă atât pentru R_g , cât și pentru D_{ee} , datorită repulsiei electrostatice dintre (un număr tot mai mare de) unități încărcate pozitiv (protonate). În plus, se poate observa o deplasare la valori mai mari pentru profilele corespunzătoare ale PEI cu greutate moleculară (M_W) mai mare. Pantele profilurilor R_g și D_{ee} par să crească, de asemenea, odată cu dimensiunea moleculei, cea mai mare pantă fiind prezentată de PEI51. Am constatat că *B*PEIs prezintă în mod constant valori mai mici decât *L*PEI atât în termeni de R_g cât și D_{ee} , pentru toate greutățile moleculare și protonările considerate.

3.4.3 Coeficientul de difuzie

În vederea analizării proprietăților dinamice ale polimerilor, am calculat coeficientul de difuzie folosind formula lui Einstein:

$$D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{6t} \langle \Delta \mathbf{r}_{\text{CM}}(t)^2 \rangle \quad (3.6)$$

unde $\langle \Delta \mathbf{r}_{\text{CM}}(t)^2 \rangle$ este deplasarea medie pătratică (DMP) a CM al moleculei în raport cu o poziție de referință, mediată în timp și pe ansamblul statistic.

Dependența de timp a DMP este prezentată în Figura 3.6 (a), comparativ pentru *LPEI*51 și *BPEI*17. Ca o validare, pe ambele thread-uri considerate, DMP-ul prezintă o creștere cvasi-liniară în timp, în timp ce D fluctuează în jurul unei valori stabile. Pantele mai mari ale DMP-urilor sunt evidențiate de PEI neprotonați, indicând mobilitățile lor crescute, în comparație cu polimerii protonați alternativ. Pantele medii par să crească odată cu scăderea dimensiunii polimerului, ceea ce este un rezultat intuitiv, deoarece obiectele mai compacte, care au și greutatea moleculară mai mici, prezintă o mobilitate îmbunătățită.

Ca o constatare generală, coeficientul de difuzie (Figura 3.6b) arată o tendință descendentă atât cu creșterea protonării, cât și cu M_W . Evident, creșterea protonării determină expansiunea polimerilor, având ca rezultat scăderea mobilității. *BPEI*-urile cu cea mai mare M_W prezintă coeficienți de difuzie mai mari decât echivalentele *LPEI*, ceea ce este în concordanță cu razele de rotație mai mici găsite pentru configurațiile ramificate. În schimb, pentru PEI cu cea mai mică M_W , coeficientul de difuzie prezintă valori mai mari pentru *LPEI*, care poate fi explicat pe baza rigidității crescute a *BPEI*9 (datorată ramurilor sale scurte).

3.5 Simulări all-atom ale formării de complecși ADN/polietilenimină (liniară/ramificată)

Am folosit câmpul de forțe nou dezvoltat pentru *L*- și *BPEI*, împreună cu parametrii CHARMM pentru ADN, preluați din Ref. 27, în simulările DM ale unui dodecamer Drew-Dickerson (DDD), d[CGCGAATTCGCG]₂, care interacționează cu PEI-urile liniare sau ramificate. Polimerii au fost aranjați circular în jurul helixului ADN la 20 Å de axa acestuia. Sistemele ADN-PEI simulate au fost neutralizate cu un număr adecvat de ioni de Cl⁻ și au fost scufundate în cutii dreptunghiulare umplute cu apă TIP3P. Simulările au fost efectuate în condiții fiziologice de temperatură și presiune, și anume, temperatura a fost setată la 310 K, iar presiunea – la o valoare de 1 bar.

Pentru sistemele compuse din ADN și 4 polimeri *BPEI*5u2, Figura 3.7 ilustrează vederi de sus și laterale ale configurației inițiale, împreună cu ilustrații ale sistemului după ~ 30 ns. Inspectând vizual simulările, am constatat că *BPEI* prezintă o afinitate

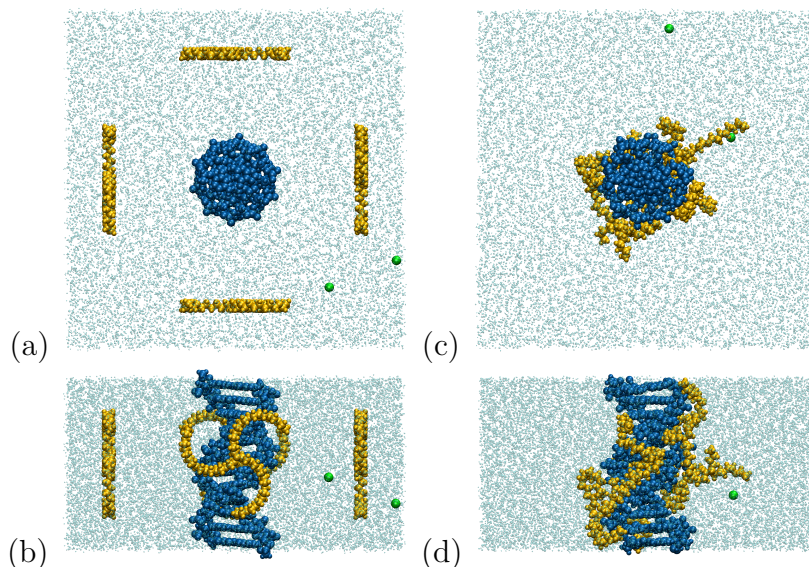


Figura 3.7: Configurația inițială (a, b) și intermediară (c, d) a sistemului compus din ADN și 4 molecule *BPEI9u2* – vederi de sus și laterale (rândul superior/inferior).

mai mare în atașarea la incizura mică a helixului de ADN, în timp ce pentru *LPEI*, aranjamentele structurate în raport cu helixul ADN-ului sunt mai puțin evidente.

Pentru a oferi o imagine asupra variației energiei libere în funcție de coordonatele de reacție, de exemplu interdistanța dintre atomi, am calculat potențialul forței medii (PFM):

$$\text{PMF} = -k_B T \log P_{\text{P-N}} + \text{const.} \quad (3.7)$$

unde k_B este constanta lui Boltzmann, T este temperatura și $P_{\text{P-N}}$ este distribuția de probabilitate radială normalizată a distanțelor dintre atomii de fosfor (P) din ADN și cei de azot (N) din PEI. Valoarea constantei este aleasă în așa fel încât minimul PFM să corespundă cu zero.

Profilurile PFM pentru sistemele ADN-*LPEI9u2*/*BPEI5u2* prezintă un minim major la $\sim 4 \text{ \AA}$, dezvăluind distanțe P-N similare în configurațiile atașate. Am descoperit că polimerul liniar studiat este capabil să formeze complexe cu ADN-ul la distanțe intermediare P-N (mai mari decât distanța medie la care PFM prezintă minimul major), în timp ce varianta ramificată pare să formeze poliplecși ADN-PEI (puțin) mai favorabil.

4

Modelarea și simularea coarse-grained a polietileniminei

4.1 Introducere

Studiile atomistice computaționale menționate în capitolele precedente au prezentat limitări majore în cazul sistemelor biomoleculare complexe, cum ar fi cele compuse din ADN și vectori de livrare, deoarece simularea unui număr masiv de atomi (milioane) devine o sarcină laborioasă, chiar și pentru computere cu performanțe înalte. Având în vedere că interesul pentru protocoale eficiente de livrare a genelor este în continuă creștere, a fost necesară o metodă care să permită simularea eficientă a sistemelor mult mai mari și, de asemenea, a unor intervale de timp mai lungi. Fără o pierdere notabilă a acurateții, metodele coarse-grained (CG) se bazează pe maparea mai multor atomi într-un singur punct de interacțiune, și astfel dimensiunea sistemului este redusă semnificativ. Costurile de calcul mai mici facilitează obținerea unor timpi de simulare considerabil mai mari, deoarece numărul redus de locuri de interacțiune implică stabilitate pe pași de timp mai mari. Martini [28–30] este un model de câmp de forțe CG popular, utilizat ca o alegere standard de modelare în studiul de față, care se bazează pe maparea, în medie, a patru atomi grei într-un singur bead CG.

4.2 Dezvoltarea unui câmp de forțe MARTINI pentru polietilenimină liniară

Am mapat reziduuri întregi de LPEI în bead-uri CG, așa cum se vede în Figura 4.1 și am identificat pozițiile acestora cu centrele de masă (CM) ale monomerilor LPEI respectivi: *PEI*: bead neprotonat care mapează monomerul $\text{CH}_2\text{--NH--CH}_2$; *PEP*: bead protonat care mapează monomerul $\text{CH}_2\text{--NH}_2^+\text{--CH}_2$; *PEC*: bead de sfârșit de lanț care mapează gruparea CH_3 (metil).

Funcția de energie potențială Martini are următoarea formă:

$$U_{\text{bonded}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{bonds}} K_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} K_\psi [1 + \cos(n\psi - \psi_0)] \quad (4.1)$$

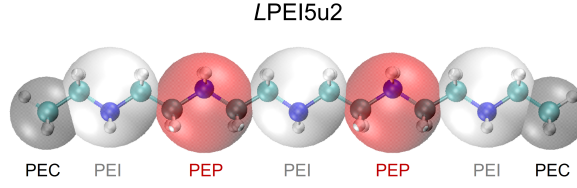


Figura 4.1: Maparea coarse-grained a *LPEI5u2*, evidențiind bead-urile definite.

$$U_{non-bonded} = \sum_{beads\ i,j} \left\{ \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right\} \quad (4.2)$$

unde interacțiunile de legătură depind de constantele de forță, K_b , K_θ și K_ψ și de legăturile și unghiurile de echilibru, b_0 și θ_0 . Potențialul diedral este dependent de multiplicitate, n , și de faza de referință, ψ_0 . Termenii de nelegătură includ interacțiunile electrostatice și Lennard-Jones (LJ), acestea din urmă fiind caracterizate prin adâncimea gropii de potențial, ϵ_{ij} , și distanța corespunzătoare potențialului de zero, σ_{ij} .

Din simulările AA, am calculat distribuțiile de probabilitate pentru legături, unghiuri și diedrale formate de CM-urile reziduurilor învecinate. Pentru termenii de legătură CG, folosind fitări cu o singură funcție, dar și cu mai multe funcții, am extras constantele de forță CG, valorile de echilibru (legături, unghiuri), multiplicitățile și fazele (ultimele două pentru termenii diedrali) prin tehnica Boltzmann inversion [31] aplicată pe distribuțiile AA de referință.

Termenilor de nelegătură li s-au atribuit parametri corespunzători tipurilor standard Martini, prin efectuarea de simulări trial CG pentru diferite combinații și prin verificarea acordului dintre razele de girație CG (R_g) și distanțele end-to-end (D_{ee}) și echivalentele lor AA. Potrivirea dintre datele CG și AA a fost cuantificată prin calcularea abaterilor pătratice medii (RMSD) ale cantităților respective.

4.2.1 Parametri de legătură prin metoda Boltzmann inversion

Parametrii CG au fost extrași folosind metoda Boltzmann inversion, direct din distribuțiile de probabilitate AA de referință. Distribuțiile de probabilitate extrase din simulările AA prezintă peak-uri multiple, ceea ce este nedorit pentru utilizarea directă a procedurii Boltzmann inversion. Pentru legătura PEI–PEI prezentată în Figura 4.2 (a), distribuția de probabilitate este determinată în mod evident de două funcții Gaussiene distincte, în timp ce distribuția PEI–PEP din Figura 4.2 (b) poate fi construită din trei funcții independente, din care niciuna nu poate fi considerată neglijabilă.

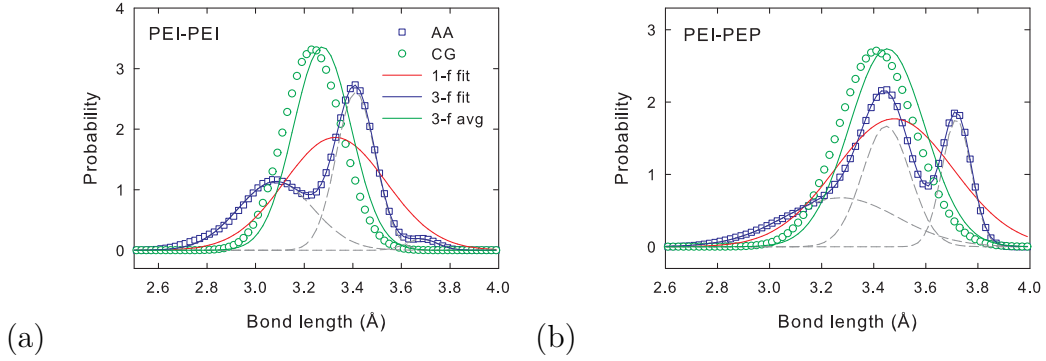


Figura 4.2: Distribuții de probabilitate pentru distanțele (a) PEI-PEI și (b) PEI-PEP. Rezultatele simulării AA- și CG (modelul SNda-Qd-3-3-P) sunt reprezentate cu pătrate albastre și, respectiv, cercuri verzi. Fitarea cu 1 funcție Gaussiană, cea cu 3 funcții și media cu 3 funcții sunt reprezentate cu linii roșii, albastre și, respectiv, verzi.

Astfel, am luat în considerare fitarea cu 3 funcții Gaussiene (3- f):

$$P = \sum_{i=1}^3 A_i e^{-U_i/k_B T}, \quad U_{i,b} = \frac{1}{2} K_{b,i} (b - b_{0,i})^2, \quad U_{i,\theta} = \frac{1}{2} K_{\theta,i} (\theta - \theta_{0,i})^2 \quad (4.3)$$

Peak-urile individuale 3- f sunt reprezentate în Figura 4.2 cu linii gri întrerupte, pozițiile distincte ale maximelor confirmând clar necesitatea unei funcții de fitare cu mai multe vârfuri.

Chiar și luând în considerare funcțiile 3- f pentru a fita distribuțiile de probabilitate AA, problema constantelor de forță unice pentru fiecare tip de legătură și unghi (specificate de funcțiile potențiale analitice) utilizate în codurile DM convenționale persistă. Am considerat inversul constantei de forță *unice* egală cu media ponderată a inverselor valorilor individuale K_b (din fitarea 3- f), după cum urmează:

$$\frac{1}{K_b} = \sum_{i=1}^3 \frac{w_i}{K_{b,i}}, \quad \frac{1}{K_\theta} = \sum_{i=1}^3 \frac{w_i}{K_{\theta,i}} \quad (4.4)$$

în timp ce valorile de echilibru pentru distanțele și unghiurile respective au fost calculate simplu ca mediile ponderate ale valorilor individuale:

$$b = \sum_{i=1}^3 w_i b_{0,i}, \quad \theta = \sum_{i=1}^3 w_i \theta_{0,i}; \quad w_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^3 S_i} \quad (4.5)$$

Distribuțiile de probabilitate AA pentru diedralele (ψ) formate din patru bead-uri consecutive au evidențiat contururi calitativ diferite față de cazul legăturilor și unghiurilor. A fost concepută o nouă schemă bazată pe forma profilurilor AA și pe faptul că

programele DM utilizate pe scară largă sunt capabile să modeleze torsiuni cu funcții multiple. Mai exact, am folosit patru funcții (4- f) pentru a fi distribuțiile de probabilitate AA:

$$P_\psi = Ae^{-U_\psi/k_BT}, \quad U_\psi = \sum_{i=1}^4 K_{\psi,i} [1 + \cos(n_i\psi - \psi_{0,i})] \quad (4.6)$$

unde multiplicitatea n_i ia valorile 1, 2, 3 și 4, în timp ce faza $\psi_{0,i}$ este fie 0° , fie 180° .

4.3 Simulări coarse-grained ale polietileniminei liniare

Am efectuat simulări DM coarse-grained ale lanțurilor LPEI solvate în apă Martini *standard* sau, alternativ, *polarizabilă*. Dimensiunile și fracțiile de protonare ale polimerilor utilizați se potrivesc cu cele considerate în studiul AA al LPEI și anume: lanțurile erau compuse din 27-, 39- și 51 de monomeri, iar fracțiile de protonare (f_P) au fost egale cu 0, 1/4, 1/3 și 1/2. Sistemele LPEI solvate au fost neutralizate prin adăugarea unui număr de ioni Cl^- (modelați prin particule Qa) egal cu numărul de bead-uri PEP.

Electrostatica a fost tratată prin metoda reaction field, utilizând o constantă dielectrică (ϵ_r) de 2.5 în cazul solvării sistemelor cu apă polarizabilă, sau, alternativ, o valoare crescută de 15 în cazul apei nepolarizabile. Am impus aceleași condiții de temperatură și presiune ca și cele utilizate pentru simulările AA, și anume 310 K și 1 bar. În acest scop, am folosit termostatul “velocity rescaling” [32] cu o constantă de cuplaj de 1 ps și barostatul Parinello-Rahman [13; 14] cu o constantă de cuplaj de 12 Å.

4.3.1 Selectarea tipurilor standard Martini potrivite

Pentru a dezvolta un câmp de forțe aditiv CG compatibil cu Martini, tipurile de bead-uri trebuie identificate cu tipuri standard Martini, astfel încât să li se atribuie parametri compatibili de nelegătură. În acest scop, am selectat diverse combinații dintre siturile standard de interacțiune pentru bead-urile noastre PEI, PEP și PEC. Concret, pentru PEI, am luat în considerare trei tipuri nepolare standard, în special Nda, Nd și N0 (precum și variantele lor S și T) și un tip polar, P2, sugerat de Mahajan și Tang [33]. Bead-ul PEP protonat a fost modelat ca o particulă încărcată ($+1e$) de tip Qda, Qd sau Q0 (împreună cu variantele S și T), ceea ce indică, de asemenea, faptul că acest bead este donor de hidrogen. Pentru comparație, am considerat în simulările noastre de testare, pentru combinația PEI-PEP, și perechea de tipuri standard selectate de Wei și Lujten [18], și anume SNda-SQd, și cea a lui Mahajan și Tang, adică P2-Qd.

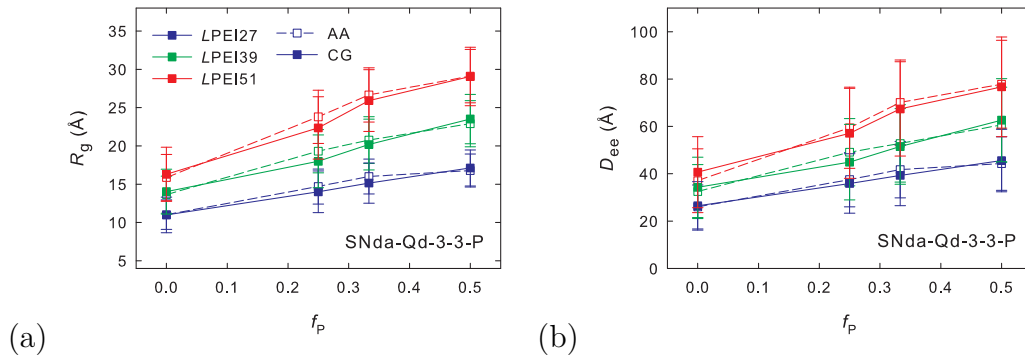


Figura 4.3: Raza de rotație (a) și distanța end-to-end (b) pentru *LPEI* folosind apă polarizabilă și modelul SNda-Qd-3-3-P FF. Valorile AA (CG) sunt reprezentate cu pătrate goale (pline) și sunt conectate cu linii întrerupte (continue).

În realizarea simulărilor CG, am luat în considerare parametrii de legătură extrași folosind funcții 3-*f* pentru legături, ambele scheme (1-*f* și 3-*f*) pentru unghiuri și fitări cu 4-*f* pentru diedrale. În secțiunile următoare, am considerat modelul “3-3” (adică modelarea cu funcții 3-*f* pentru legături și unghiuri), deoarece această schemă prezintă cea mai mică abatere pătratică medie față de valorile atomistice pentru R_g și D_{ee} , validând modelul pentru simulări care utilizează apă polarizabilă.

4.3.2 Parametri optimi PEI pentru utilizarea cu apă polarizabilă/standard Martini

Rezultatele noastre sugerează că particula PEI trebuie modelată cu tipul “Small” de bead-uri Martini, ceea ce este în concordanță cu definiția sa ca bead care mapează doar trei atomi grei, spre deosebire de maparea standard 4-la-1. Acordul dintre cantitățile structurale AA și CG poate fi ușor evaluat din Figura 4.3, care afișează valorile R_g și D_{ee} pentru modelul SNda-Qd-3-3-P (SNda - tipul standard selectat pentru bead-ul PEI; Qd - tipul bead-ului selectat pentru PEP).

Prin calcularea abaterii pătratice medii dintre valorile AA și CG pentru R_g și D_{ee} , am stabilit că cea mai potrivită combinație PEI-PEP pentru apa polarizabilă este SNda-Qd. În special, pentru modelul utilizat împreună cu apa standard, se recomandă combinația SN0-SQ0, și ca polimerii să fie slab protonați (adică fracția de protonare să fie mai mică de 0,25).

Am calculat coeficienții de difuzie pentru polimerii CG studiați folosind formula lui Einstein (utilizată și în analiza AA) iar valorile medii sunt prezentate în Figura 4.4 împreună cu cele obținute din simulări atomistice. Este cunoscut faptul că coeficientul de difuzie este o mărime sensibilă din punct de vedere numeric, așa că am obținut un

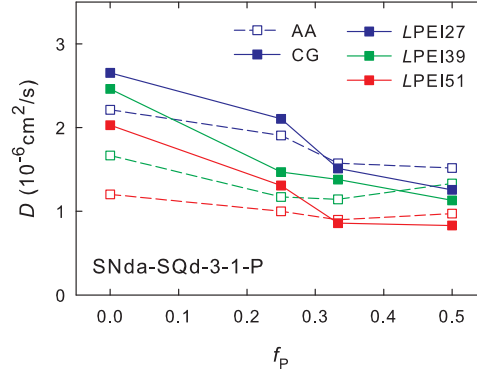


Figura 4.4: Coeficientul de difuzie pentru *LPEI* folosind apă polarizabilă și modelul SNda-SQd-3-1-P. Valorile AA (CG) sunt reprezentate cu pătrate goale (pline) și sunt conectate cu linii întrerupte (continue).

acord semi-cantitativ între datele AA și CG. Cu toate acestea, tendința generală de scădere cu gradul de protonare este păstrată. În plus, am constatat că coeficienții de difuzie CG pentru lanțurile slab protonate arată o tendință de supraestimare, în timp ce pentru polimerii puternic protonați, valorile CG par a fi mai mici decât echivalenții AA.

4.4 Simulări coarse-grained ale formării de complecși ADN/polietilenimină

Am folosit noul CF împreună cu parametrii Martini pentru acizi nucleici în simulările CG ale formării de poliplecși ADN-PEI. Am folosit modelul SNda-SQd-3-1-P nou dezvoltat pentru PEI și câmpul Martini pentru ADN dezvoltat de Uusitalo et al. [30], împreună cu apa polarizabilă [34].

Sistemele conțin un dodecamer Drew-Dickerson (DDD, cu secvența de nucleotide $d[\text{CGCGAATTCGCG}]_2$) și un număr selectat de lanțuri *LPEI*15 (4 sau respectiv 8, având fracția de protonare egală cu 1/4, sau 1/2) poziționate circular în jurul moleculei de ADN la o distanță de 25 Å de axa acesteia. Sistemele au fost plasate în cutii cubice și supuse condițiilor la limită periodice în toate direcțiile. Molecula de ADN a fost constrânsă de-a lungul axei z , și a fost adăugat un număr adecvat de ioni Na^+ sau Cl^- pentru a obține neutralitatea sistemului.

Configurațiile inițiale și intermediare pentru un sistem compus dintr-un DDD și patru polimeri *LPEI*15u2 sunt descrise în Figura 4.5. Atașarea uniformă a *LPEI* la incizurile mică și mare ale ADN-ului este evidentă în Figura 4.5 (d).

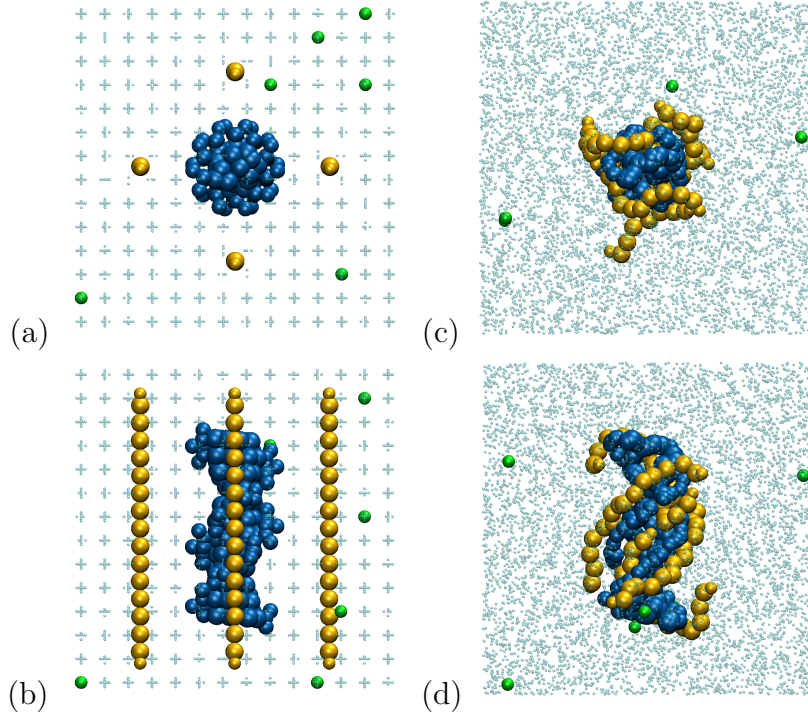


Figura 4.5: Configurația inițială (a, b) și intermediară (c, d) a sistemului coarse-grained compus din ADN și 4 molecule *LPEI15u2* - vederi de sus și laterale (rândul superior/inferior).

4.4.1 Potențialul de forță medie

Pentru a cuantifica formarea complexelor ADN-*LPEI*, am folosit potențialul de forță medie (PFM) între grupările fosfat ale ADN (mapate în bead-uri BB1) și bead-urile PEP protonate ale *LPEI*:

$$\text{PFM} = -k_B T \log P_{\text{BB1-PEP}} + \text{const.} \quad (4.7)$$

unde $P_{\text{BB1-PEP}}$ este distribuția de probabilitate normalizată a distanțelor radiale dintre BB1 și PEP.

PFM-urile pentru interacțiunea BB1-PEP pentru sistemele compuse dintr-un DDD dublu și fie 8 *LPEI15u4*, fie 8 *LPEI15u2* molecule arată că minimul principal este obținut la ~ 4.6 Å, care este mai mare decât minimul PFM obținut din simulările AA. Această discrepanță poate fi coroborată de reprezentarea mai grosieră în cazul modelării CG, împreună cu diferențele de dimensiuni ale moleculelor simulate.

Concluzii

În vederea studierii formării și condensării complexelor ADN-PEI, cel din urmă fiind cunoscut ca un vector eficient de livrare genică, și având în vedere absența câmpurilor de forță fiabile pentru PEI în literatură, prezenta teză s-a concentrat pe derivarea parametrilor de înaltă calitate pentru acest polimer cationic.

Am dezvoltat un CF atomistic bazat pe date ab initio de înaltă calitate, care a fost folosit în simulări de dinamică moleculară a polimerilor PEI solvatați. Ulterior, prin extragerea distribuțiilor de probabilitate pentru legături, unghiuri și diedrale formate din reziduuri adiacente (mapate în bead-uri), am parametrizat un CF coarse-grained pentru PEI, care a fost folosit în simulări CG ale sistemelor PEI- și ADN-PEI solvate.

Modelarea PEI la scară atomistă a implicat derivarea tuturor constantelor de forță și a valorilor de echilibru pentru legăturile, unghiurile și diedralele formate din atomi consecutivi, precum și sarcinile atomice parțiale și parametrii Lennard-Jones, necesari pentru a caracteriza forțele intramoleculare care acționează în moleculele de dimensiuni și fracții de protonare arbitrare. Câmpul de forțe AA pe care l-am dezvoltat respectă standardul CHARMM, care include parametrii pentru o multitudine de molecule biologice.

Calitatea înaltă a parametrizării prezente provine din derivarea consecventă a sarcinilor atomice parțiale, împreună cu întregul set de parametri de legătură, ceea ce este în sine o noutate în comparație cu studiile anterioare. Validarea cuprinzătoare a CF-ului a implicat efectuarea de simulări extensive de dinamică moleculară și compararea rezultatelor cu datele experimentale. În special, am găsit razele de rotație, distanțele end-to-end și coeficienții de difuzie în acord foarte bun cu omologii experimentali pentru PEI cu greutate moleculară și fracții de protonare similare.

Câmpul AA dezvoltat a fost utilizat în simulări ale formării complexelor ADN-PEI, care au arătat cele mai favorabile condiții și distanțe de atașare în ceea ce privește gradul de ramificare al PEI. În special, PEI-ul ramificat pare să prezinte o afinitate mai mare de atașare la incizura mică a ADN-ului și o formare de complexi mai eficientă decât în cazul lanțurilor liniare.

Noul CF AA pentru PEI [35; 36] este potrivit pentru simulări care implică polimeri PEI cu grade de ramificare, protonare și greutate moleculară arbitrară, reprezentând un instrument indispensabil în studiile computaționale viitoare, care vor oferi o caracterizare

completă a PEI. Nii parametri pot fi folosiți și împreună cu o mare varietate de molecule deja incluse în câmpul de forțe CHARMM, deschizând calea către o gamă largă de studii, care nu se limitează neapărat la domeniul livrării genice.

Prin maparea reziduurilor atomistice în bead-uri coarse-grained, am extras din simulările AA distribuțiile de probabilitate pentru lungimi de legături, unghiuri și diedrale formate din reziduuri consecutive și am dezvoltat un CF CG pentru PEI liniar[37; 38]. Am selectat pentru bead-urile noastre tipuri adecvate dintre site-urile de interacțiune standard Martini, astfel încât noul câmp CG este compatibil cu Martini, care este unul dintre cele mai utilizate modele CG.

Calitatea înaltă a modelului nostru CG pentru PEI este evidențiată de potrivirea foarte bună dintre proprietățile structurale CG și AA și, în consecință, de acordul cu măsurătorile experimentale. CF-ul a fost folosit în simulări ale formării de poliplecși ADN-PEI, oferind rezultate calitative, în conformitate cu observațiile experimentale.

Parametrii CG derivați pot fi utilizați, împreună cu CF-ul Martini pentru ADN, în simulări extensive de condensare ADN-PEI, care implică simularea unor sisteme de milioane de atomi pe intervale de timp de ordinul microsecundei pentru a obține rezultate fenomenologice relevante. Astfel de simulări ar putea oferi cunoștințe semnificative în ceea ce privește raportul dintre numărul atomilor de fosfor ai ADN-ului și numărul atomilor de azot din PEI, salinitatea, pH-ul și temperatura soluțiilor, de mare importanță pentru dezvoltarea protocoalelor eficiente și netoxice de livrare genică.

Lista publicațiilor

Publicații în tematica tezei

1. **A.-E. Terteci-Popescu**, T. A. Beu, “Branched Polyethyleneimine: CHARMM Force Field and Molecular Dynamics Simulations”, *Journal of Computational Chemistry*, 43 (31), 2072-2083, DOI: 10.1002/jcc.27005 (2022); IF: 3.672; AIS: 0.865.
 2. T. A. Beu, **A.-E. Ailenei**, R.-I. Costinaș, “Martini Force Field for Protonated Polyethyleneimine”, *Journal of Computational Chemistry*, 41 (4), 349-361, DOI: 10.1002/jcc.26110 (2020); IF: 3.376; AIS: 0.923.
 3. T. A. Beu, **A.-E. Ailenei**, A. Farcaș, “Atomistic and coarse-grained modeling of polyethyleneimine”, *Chemical Physics Letters*, 714, 94-98, DOI: 10.1016/j.cplett.2018.10.071 (2019); IF: 2.029; AIS: 0.367.
 4. T. A. Beu, **A.-E. Ailenei**, A. Farcaș, “CHARMM force field for protonated polyethyleneimine”, *Journal of Computational Chemistry*, 39 (31), 2564-2575, DOI: 10.1002/jcc.25637 (2018); IF: 3.194; AIS: 1.141.
- AIS TOTAL: 3.296

Alte publicații

1. **A.-E. Ailenei**, T. A. Beu, “Ion transport through gated carbon nanotubes: Molecular dynamics simulations using polarizable water”, *Journal of Molecular Structure*, 1245, 131022, DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.131022 (2021); IF: 3.196.

Conferințe

1. **A.-E. Ailenei**, R.-I. Costinaș, T. A. Beu, “Polyethyleneimine: Coarse-grained modeling and simulation”, 12th International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2019), 25-27 September 2019, Cluj-Napoca, Romania, prezentare de poster.
2. **A.-E. Ailenei**, R.-I. Costinaș, T. A. Beu, “Coarse-grained simulations of solvated polyethyleneimine”, TIM 19 Physics Conference, 29-31 May 2019, Timișoara, Romania, prezentare de poster.

Bibliografie

- [1] C. A. M. Clévio Nóbrega, Liliana Mendonça, *A Handbook of Gene and Cell Therapy* (Springer, 2020), 1st ed.
- [2] R. Narain, ed., *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy* (Elsevier, Woodhead Publishing, Cambridge, 2016).
- [3] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, *Molecular Pharmaceutics* **5**, 505 (2008).
- [4] M. Allen and D. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids*, Oxford Science Publ (Clarendon Press, 1989).
- [5] M. P. Allen, *Introduction to molecular dynamics simulation* (2004), URL <https://udel.edu/~arthij/MD.pdf>.
- [6] R. Hockney and J. Eastwood, *Computer Simulation Using Particles* (CRC Press., 1988), 1st ed.
- [7] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson, *The Journal of Chemical Physics* **76**, 637 (1982).
- [8] T. A. Beu, *Basic molecular dynamics* (2021), URL <http://www.phys.ubbcluj.ro/~titus.beu/MDsquad/chapters/C3%20Basic%20MD.pdf>.
- [9] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, and E. Lindahl, *SoftwareX* **1-2**, 19 (2015), ISSN 2352-7110, URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352711015000059>.
- [10] M. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS development team (2016), URL www.gromacs.org.
- [11] A. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications* (Pearson Education, 2001).
- [12] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, *The Journal of Chemical Physics* **81**, 3684 (1984).
- [13] M. Parrinello and A. Rahman, *Journal of Applied Physics* **52**, 7182 (1981).
- [14] S. Nosé and M. Klein, *Molecular Physics* **50**, 1055 (1983).
- [15] D. C. Rapaport, *The Art of Molecular Dynamics Simulation* (Cambridge University Press, 2004), 2nd ed.
- [16] R. J. Sadus, *Molecular Simulation of Fluids: Theory, Algorithms and Object-orientation*, v. 1 (Elsevier, 1999).
- [17] C. Sun, T. Tang, H. Uludağ, and J. E. Cuervo, *Biophysical J.* **100**, 2754 (2011).
- [18] Z. Wei and E. Luijten, *J. Chem. Phys.* **143**, 243146 (2015).
- [19] D. G. Mintis, T. S. Alexiou, and V. G. Mavrantzas, *The Journal of Physical*

- Chemistry B **124**, 6154 (2020).
- [20] T. A. Beu and A. Farcaş, J. Comput. Chem. **38**, 2335 (2017).
 - [21] C. G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, and J. C. Gumbart, J. Comput. Chem. **34**, 2757 (2013).
 - [22] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, and M. A. R. et. al., *Gaussian 09 Revision A.01*, gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
 - [23] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, et al., J. Comput. Chem. **31**, 671 (2010).
 - [24] S. Basu, R. M. Venable, B. Rice, E. Ogharandukun, J. B. Klauda, R. W. Pastor, and P. L. Chandran, Macromolecular Chemistry and Physics **220**, 1800423 (2019).
 - [25] J. Wang, P. Cieplak, and P. A. Kollman, J. Comput. Chem. **25**, 1049 (2000).
 - [26] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, J. Chem. Phys. **79**, 926 (1983).
 - [27] K. Hart, N. Foloppe, C. M. Baker, E. J. Denning, L. Nilsson, and A. D. MacKerell, Journal of Chemical Theory and Computation **8**, 348 (2011).
 - [28] S. J. Marrink, A. H. de Vries, and A. E. Mark, The Journal of Physical Chemistry B **108**, 750 (2004).
 - [29] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, and A. H. de Vries, The Journal of Physical Chemistry B **111**, 7812 (2007).
 - [30] J. J. Uusitalo, H. I. Ingólfsson, P. Akhshi, D. P. Tieleman, and S. J. Marrink, Journal of Chemical Theory and Computation **11**, 3932 (2015), pMID: 26574472.
 - [31] D. Reith, M. Pütz, and F. Müller-Plathe, Journal of Computational Chemistry **24**, 1624 (2003).
 - [32] G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, The Journal of Chemical Physics **126**, 014101 (2007).
 - [33] S. Mahajan and T. Tang, Journal of Computational Chemistry **40**, 607 (2019).
 - [34] S. O. Yesylevskyy, L. V. Schäfer, D. Sengupta, and S. J. Marrink, PLoS Comput Biol **6**, e1000810 (2010).
 - [35] T. A. Beu, A.-E. Ailenei, and A. Farcaş, Journal of Computational Chemistry **39**, 2564 (2018).
 - [36] A.-E. Terteci-Popescu and T. A. Beu, Journal of Computational Chemistry **43**, 2072 (2022).
 - [37] T. A. Beu, A.-E. Ailenei, and A. Farcaş, Chemical Physics Letters **714**, 94 (2019).
 - [38] T. A. Beu, A.-E. Ailenei, and R.-I. Costinaş, Journal of Computational Chemistry **41**, 349 (2020).