

Vilniaus universitetas  
Fizikos fakultetas  
Cheminės fizikos institutas

Laurynas Diska

**Vandenilinių ryšių tinklo įtakos restrikcijos endonukleazės DNR sekos kirpimo  
mechanizme modeliavimas tankio funkcionalių metodais**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Teorinės fizikos ir astrofizikos

Studijų programa

Studentas	Laurynas Diska
Leisti ginti	2018-05-25
Darbo vadovas	doc. Dr. Mindaugas Mačernis
Recenzentas	Dr. Stepas Toliautas
Instituto direktorius	Prof. Dr. (HP) Valdas Šablinskas

Vilnius 2018

## Turinys

<b>ĮVADAS</b>	3
1. DNR ir restrikcijos endonukleazė BcnI	5
1.1. Deoksiribonukleorūgštis (DNR)	5
1.2. Monomerinė restrikcijos endonukleazė BcnI	6
1.3. CRISPR/Cas9	8
2. Tiriamojo darbo modeliavimo metodai	9
3. Tiriamojo darbo modeliavimo eiga	11
3.1. DNR nukleobazių modeliavimas	11
3.2. Restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų aktyvieji centrai	12
3.3. Restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų sąveika su DNR grandinės nukleobazių poromis	14
3.3.1. Restrikcijos endonukleazės BcnI sąveikos su C-G DNR nukleobazių pora modeliavimas	15
3.3.2. Restrikcijos endonukleazės BcnI sąveikos su A-T DNR nukleobazių pora modeliavimas	18
3.4. Vandenilinių ryšių tinklo įtakos restrikcijos endonukleazės BcnI DNR kirpimo mechanizmui modeliavimas	21
3.4.1. ONIOM metodikos taikymas restrikcijos endonukleazės BcnI geometrijos optimizacijai	23
3.4.2. Kirpimo mechanizmo aktyviųjų centrų su Ca/Mg atomais skirtumų analizė	24
3.4.3. Vandenilinių ryšių tinklo įtakos tyrimas	26
<b>IŠVADOS IR PASIŪLYMAI</b>	30
<b>SANTRAUKA</b>	31
<b>SUMMARY</b>	32
<b>LITERATŪRA</b>	33

## IVADAS

Šiais laikais daug kalbama apie inovacinius tyrimus, kuriuose naudojama genų redagavimo technologija CRISPR, taip pat vadinama CRISPR/Cas9. Mokslo pasaulis yra nuolatos stebinamas šios revoliucinės technologijos, kadangi ji yra paprastesnė, pigesnė ir kur kas efektyvesnė nei iki šiol naudotos DNR modifikavimo strategijos. [1] Terminas CRISPR reiškia grupuotas, reguliariais tarpais pasikartojančias trumpas palindromines sekas (angl. Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), o Cas9 – su CRISPR susijęs baltymas. Pavadinime atsispindi svarbiausios funkcijos, kurios buvo nustatytos šios technologijos atradimo metu, tačiau nesuteikia aiškaus atsakymo kaip visa ši sistema veikia. CRISPR technologija yra paprastas, tačiau galingas genų redagavimo įrankis. Šis įrankis leidžia mokslininkams lengvai keisti DNR sekas ir modifikuoti genų funkcijas. [2] Ši technologija gali būti pritaikyta daugybėje sričių, iš kurių pagrindinės būtų tokios: genetinių defektų korekcija, lygų gydymas ir paplitimo stabdymas, maistinių kultūrų derliaus gerinimas. Nepaisant didelio susidomėjimo šia genų redagavimo technologija ir gausybės per paskutinius metus publikuotų mokslinių straipsnių, į pagrindinius klausimus, kurie leistų paaiškinti technologijos veikimo mechanizmą, iki šiol nėra išsamiai atsakyta[3]. Šiuo metu didžiausias dėmesys yra telkiamas į technologijos pritaikymo galimybes, praktinę genų redagavimo naudą ir kylančius etinius klausimus. Tačiau tokie klausimai kaip tikslus veikimo mechanizmas, kaip veikia DNR grandinės atpažinimo mechanizmas, kas sąlygoja sekos kirpimo funkciją, lieka ne iki galo atsakyti.

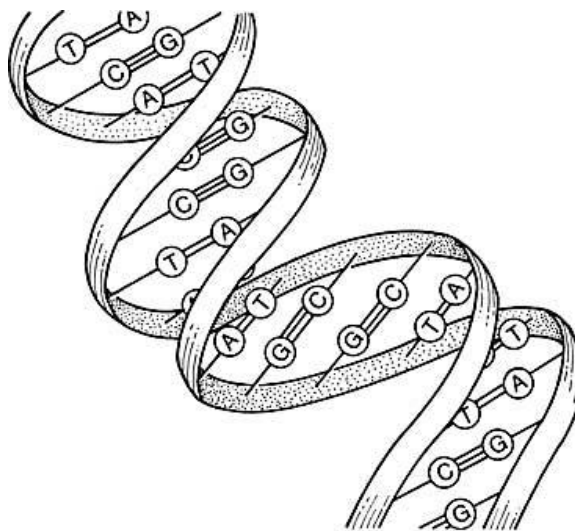
DNR grandinėje yra saugoma svarbiausia informacija apie gyvuosius organizmus. DNR randama visuose eukariotinių ląstelių branduoliuose, ir joje yra užkoduota genetinė informacija, atsakinga už organizmų funkcionavimą, augimą ir reprodukciją. Kadangi ši informacija yra labai svarbi, kartu su gyvybės formomis evoliucionavo ir DNR grandinės apsaugos mechanizmai. Vienas iš pagrindinių šių apsaugos mechanizmų yra restrikcijos ir modifikacijos sistemos (RM), kurios yra naudojamos apsisaugoti nuo nuolatinio bakteriofagų puolimo bei svetimos DNR. Šios sistemos yra sudarytos iš dviejų skirtingų baltyminių katalizatorių, kurie kartu veikia tarsi molekulinės „žirkklės“ ir sunaikina priešišką genetinę informaciją.

Šiame moksliniame tiriamajame darbe buvo siekiama atsakyti į minėtus klausimus ir suteikti įžvalgą, kuri leistų suvokti vykstančius procesus ir paaiškinti DNR grandinės atpažinimo ir kirpimo veikimo mechanizmus. Darbe buvo naudojama restrikcijos endonukleazės BcnI bei DNR grandinės fragmentai, paimti iš PDB (angl. Protein Data Bank) duomenų bazės. Kristalografiniai duomenys buvo naudojami kaip pradinė sistema, kuri toliau buvo modeliuojama naudojantis kvantinės chemijos metodais. Molekulinio modeliavimo pagalba buvo siekiama plačiau ištirti kaip restrikcijos fermentai atpažįsta specifines sekas, kokie aplinkos veiksniai sąlygoja „kirpimo“ funkciją, suprasti aktyviųjų centrų sandarą ir mechanizmų veikimo principus.

## 1. DNR ir restrikcijos endonukleazė BcnI

### 1.1. Deoksiribonukleorūgštis (DNR)

DNR – tai yra gijos pavidalo nukleotidų grandinė, savyje sauganti genetines instrukcijas visų gyvų organizmų augimui, vystymuisi, funkcionalumui ir reprodukcijai. Deoksiribonukleorūgštis (DNR) ir ribonukleorūgštis (RNR) yra nukleorūgštys, kurios kartu su baltymais, riebalais ir angliavandeniais (polisacharidais) sudaro keturių pagrindinių makromolekulių grupę, kuri yra gyvybiškai svarbi visoms žinomoms gyvybės formoms. DNR susideda iš deoksiribonukleotidų, kurie atitinkamai yra sudaryti iš heterociklinės azoto bazės ir angliavandens deoksiribozės. Pagrindinis skirtumas tarp šių nukleotidų yra azoto bazės ir visa DNR makromolekulė yra sudaryta iš keturių deoksiribonukleotidų[4]: adenino, timino, guanino ir citozino. Grandinė yra sudaryta iš dviejų tarpusavyje susivijusių polinukleotidų grandinių, kuri atitinkamai yra sudaryta iš deoksiribonukleotidų porų. Poros yra formuojamos pagal griežtas taisykles ir tarpusavyje jungiamos fosfodiesterinėmis jungtimis į polinukleotidinę grandinę. Adenino (A) nukleotidai vandeniliniiais ryšiais yra jungiami su timino (T) nukleotidais, o citozino (C) – jungiami su guanino (G) nukleotidais.



1 pav. Deoksiribonukleorūgšties sandara

Adenino nukleotidai sujungiami su timino nukleotidais į poras dviejų vandenilinių ryšių pagalba, o citozino nukleotidai su guanino nukleotidais – trijų vandenilinių ryšių pagalba. Prie nukleotido yra jungiamas monosacharidas ir šios molekulės kartu sudaro deoksiribonukleotidus, kurie tuomet atitinkamai sujungiami į bendrą grandinę fosfodiesterinėmis jungtimis. Fosfodiesterinės jungtys ir monosacharidai yra DNR grandinės „rėmas“. Daugelis atliktų tyrimų atskleidžia, kad DNR grandinės kirpimo procesas pradedamas suskaidant fosfodiesterines jungtis ir toliau tokiu būdu atskiriant deoksiribonukleotidų poras. Dvi polinukleotidinės grandinės, kurių pora sudaro DNR, yra išrikiuotos priešingomis kryptimis. Visos gyvybės formos pasižymi individualia DNR struktūra – skiriasi azoto bazių kiekis grandinėje, poros yra jungiamos į skirtingas sekas. Vis dėlto ši kintanti ypatinga dviejų bazių porų seka DNR grandinėje nulemia visų gyvybės formų įvairovę Žemėje, joje yra saugoma visa organizmo genetinė informacija, kuri nulemia visas jo savybes.

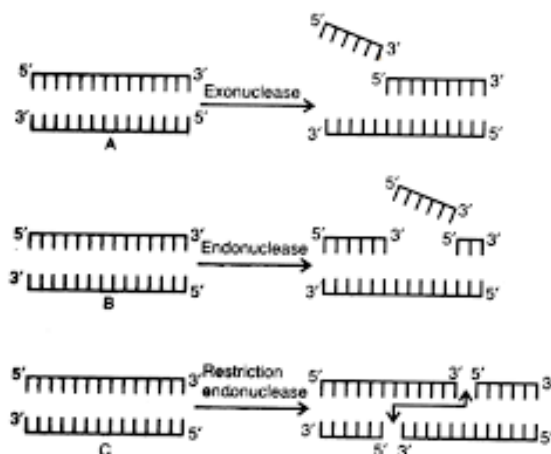
Šiame mokslo tiriamajame darbe didesnis dėmesys skiriamas restrikcijos endonukleazei BcnI ir jos kompleksams su DNR, kadangi detali nukleotidų analizė buvo atlikta Bakalauro studijų baigiamajame darbe [5].

## **1.2. Monomerinė restrikcijos endonukleazė BcnI**

Nukleazės[6] – tai fermentai, kurie yra atsakingi už DNR grandinės fosfodiesterinių jungčių karpymą hidrolizės būdu. Šie fermentai[7] yra skirstomi į dvi grupes pagal tai, kokios nukleorūgštys yra skaidomos ir kokia fermento padėtis nukleorūgšties atžvilgiu. Atsižvelgiant į skaidomos nukleorūgšties tipą, nukleazės yra skirstomos į deoksiribonukleazes ir ribonukleazes. Pirmuoju atveju nukleazės yra atsakingos už DNR molekulių skaidymą, antruoju – už RNR molekulių skaidymą. Priklausomai nuo nukleazių padėties molekulėje, šios taip pat yra skirstomos į endonukleazes, kurios yra atsakingos už molekulės skaidymą grandinės viduje, ir egzonukleazes, kurios yra atsakingos už molekulių skaidymą grandinės galuose. Jeigu endonukleazės padėtis yra priklausoma nuo molekulės aplinkoje esančių nukleotidų sekos, tuomet ši nukleazė yra vadinama

specifine endonukleaze. Restrikcijos endonukleazė BcnI būtent ir yra specifinė endonukleazė, kuri skaido DNR atpažindama konkrečias nukleobazių sekas.

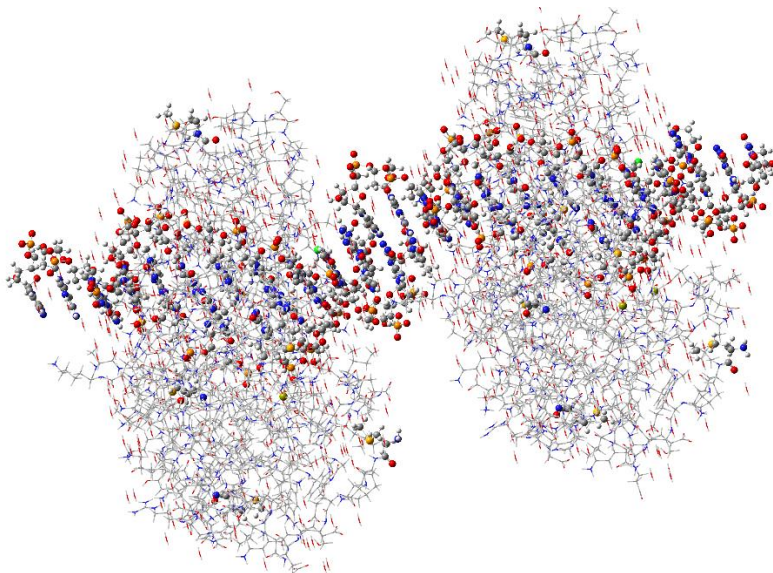
Gamtoje šie fermentai yra plačiai paplitę bakterijose. Pagrindinis šių fermentų tikslas yra apsaugoti bakteriją nuo nuolatinio bakteriofagų antpuolio ir sunaikinti priešišką genetinę informaciją.



2 pav. Nukleazių rūšys.

Restrikcijos endonukleazė BcnI skelia dvigubą DNR[8], kurioje yra CC/SGG seka (S yra arba citozinas, arba guaninas, / nurodo skelimo vietą), ir sukuria du atskirus produktus. BcnI funkcionuoja kaip monomeras, kuris sąveikauja su DNR ir vienu metu skelia tik vieną iš polinukleotidinių grandinių. Restrikcijos endonukleazė BcnI sąveikaudama su DNR sudaro specifinius ryšius su visomis penkiomis atpažintos sekos bazėmis, o ne tik su grandinės skelimo vietos pora. BcnI pasižymi unikaliu mechanizmu, kuris leidžia atpažinti centrinę nukleobazių porą ir atlikti kirpimą tiksliai nurodytoje vietoje. Tuo tikslu, kad atpažinti minėtas sekas, BcnI restrikcijos endonukleazė turi dvigubą atpažinimo centrą, kuris geba atpažinti skirtingas C:G (citozino-guanino) ir G:C nukleobazių poras. Šis dvigubas atpažinimo centras yra sudarytas iš dviejų histidino aminorūgščių, iš kurių viena yra papildyta vienu vandenilio atomu. BcnI kirpimo mechanizmo aktyvųjį centrą sudaro du pavieniai kalcio (Ca) atomai, kurių aplinkoje yra trys vandens molekulės ir kelios nukleorūgščių molekulės. Detalesnė kirpimo ir atpažinimo centrų analizė pateikta sekančiuose skyriuose. Kirpimo ir atpažinimo mechanizmai kartu leidžia atlikti

ypatingai tikslų DNR grandinės skelimą. Šiame moksliniame darbe buvo siekiama išanalizuoti šių mechanizmų veikimo principus. Šiame darbe buvo analizuojama ir izoliuota restrikcijos endonukleazė BcnI, ir junginiuose su DNR.



3 pav. Restrikcijos endonukleazė BcnI kartu su DNR.

### 1.3. CRISPR/Cas9

CRISPR[9] – tai yra sistema, randama bakterijos ląstelėse, kuri dalyvauja imuninės sistemos gynybos mechanizme. Sekose yra kaupiami bakterijų puolusių virusų DNR fragmentai. Bakterija naudoja puolančiojo viruso fragmentus ir sukuria specifinius DNR fragmentus, vadinamus CRISPR rinkiniais. Šie rinkiniai leidžia bakterijos gynybos mechanizmui „prisiminti“ priešiškus virusus ir kovoti su jais ateityje. Bakterijos naudoja šią sistemą, norėdamos sukarchyti įsibrovusių virusų, kurie grasina ląstelės gyvybei, DNR. Šiais laikais ši molekulinė sistema yra pritaikyta visai kitais tikslais – siekiant pakeisti bet kokią raidę organizmo DNR grandinėje. Tai leistų ištaisyti ligas sukeliančias klaidas, kurios buvo paveldėtos arba dalinimosi metu įsiterpusios į genetinį kodą. Šio mechanizmo pritaikymo spektras yra labai platus – nuo derliaus, galvijų genų modifikavimo, - iki žmogaus. Cas9 yra vienas iš fermentų, naudojamų DNR grandinės karpymo procese. Šiomis dienomis ši technologija yra smarkiai paplitusi ir intensyviai naudojama kaip viena iš efektyviausių technologijų genų inžinerijos srityje.



CRISPR rinkinys yra sudarytas iš trumpų pasikartojančių sekų[10], kurios tarpusavyje yra atskirtos unikaliais tarpikliais. CRISPR pasikartojančios sekos paprastai yra sudarytos nuo 28 iki 37 bazinių porų, nors griežtos ribos nėra – buvo stebėtos ir 23 bazinių porų sekos ir 55 bazinių porų sekos. Tarpiklių sekos paprastai yra sudarytos iš 32-38 bazinių porų. Nauji tarpikliai gali atsirasti iškart kai tik imuninė sistema reaguoja į fagų infekciją. CRISPR masyvas paprastai yra sudarytas iš penkiasdešimties pasikartojančios sekos-tarpiklio vienetų.

## 2. Tiriamojo darbo modeliavimo metodika

Kompiuterinė chemija – tai chemijos mokslo sritis, kurioje fizikiniai modeliai naudojami kompiuterinėms simuliacijoms, siekiant detaliau išanalizuoti ir paaiškinti cheminius procesus. Šiems tikslams naudojamos efektyvios kompiuterinės programos, kurios leidžia nustatyti molekulinę struktūrą ir įvairias jų savybes. Pritaikyti kvantinės chemijos metodai leidžia modeliuoti įvairias molekulinę sistemas, sudėtingus kompleksus. Tai yra galingas įrankis, kuris leidžia efektyviai ir greitai sumodeliuoti įvairias sistemas, ir gautus rezultatus pritaikyti praktikoje sutaupant ne tik laiko, bet ir resursų. Kompiuterinis modeliavimas dažnai gali paaiškinti eksperimentinius rezultatus, kurie atspindi realius nagrinėjamus procesus. Kompiuterinės chemijos skaičiavimų metodai [11] yra skirstomi į *ab initio*, DFT, pusempirius [12] ir molekulių mechanikos metodus. Kvantinėje chemijoje *ab initio* metodas yra galingas įrankis[11], leidžiantis charakterizuoti atomų ir molekulių elektroninę struktūrą. Vienas skaičiavimo metodų – elektronų banginės funkcijos paieška sprendžiant Šrėdingerio lygtį. Tam tikslui elektronų banginė funkcija yra atvaizduojama kaip tiesinė Sleiterio determinantų kombinacija. Kitas Šrėdingerio lygties sprendimo būdas remiasi tankio funkcionalo artiniu [13]. Tankio funkcionalo teorija (DFT) iš esmės išplėtė kvantmechaninių skaičiavimų galimybes. Šiuo metu tai yra galingas įrankis, leidžiantis gauti rezultatus, artimus eksperimentiniams. Tankio funkcionalo metodo pagrindas – dvi Hohenbergo ir Kohno teoremos. Tiriamos sistemos pilnutinė energija nagrinėjama kaip elektronų

tankio funkcija. Pusempiriai kvantinės chemijos skaičiavimų metodai daugiausiai remiasi aproksimacijomis ir naudoja empirinių duomenų parametrus.

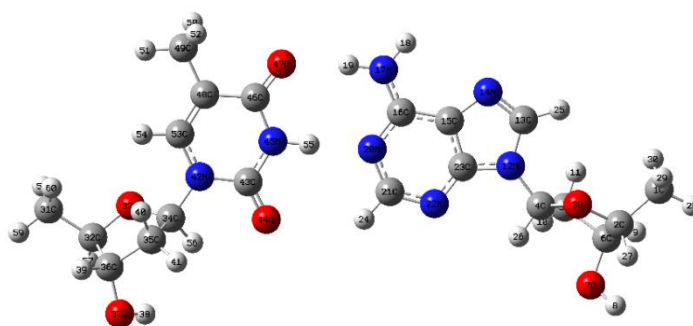
Šiame darbe buvo naudojama lygmenų suskirstymo metodika ONIOM. Ši metodika leidžia efektyviai analizuoti didelius molekulinis kompleksus, jų struktūros pokyčius ir savybes, ir leidžia sutaupyti kompiuterinių resursų sąnaudas. Darbe tiriama molekuliniai kompleksai yra suskirstomi į kelis lygmenis, priklausomai nuo junginio kompleksiskumo. Į aukščiausią lygmenį įtraukiamas svarbiausią vaidmenį tiriamajame procese vykdantis aktyvusis centras ir šio sluoksnio geometrijos optimizacijai yra naudojami tiksliausi DFT kvantinės chemijos skaičiavimų metodai. Į vidurinį ir žemąjį sluoksnis įtraukiamas pirmasis sluoksnis tiriamo proceso aktyviojo centro aplinkoje ir šio sluoksnio geometrijos optimizacijai naudojami ne tokie tikslūs pusempiriai skaičiavimų metodai. Kadangi tiriamos sistemos pasižymi atomų gausa, siekiant sumažinti kompiuterinių resursų sąnaudas, vidurinis ir žemasis sluoksnis paprastai buvo užšaldyti – draudžiamas atomų judėjimas. Tokiu būdu sukuriama aplinka, kuri leidžia tiksliau analizuoti vykstančius procesus nagrinėjamuose aktyviuosiuose centruose. Skaičiavimų metodai pasirinkti atsižvelgiant į buvusių mokslinių tiriamųjų darbų rezultatų analizę[3][5].

Šiame darbe naudoti kristalografiniai duomenys paimti iš PDB (angl. Protein Data Bank[14]) duomenų bazės. Kirpimo ir atpažinimo mechanizmų aktyvieji centrai buvo modeliuojami etapais, pasitelkiant kompiuterinės chemijos skaičiavimų sąsają WebMo15.0[15] ir kvantinės chemijos skaičiavimų paketą Gaussian09[16]. Moksliniam darbui atlikti buvo naudojamas Lietuvos nacionalinio fizinių ir technologijos mokslų centro(LNFTMC) aukšto našumo superkompiuteris Vilniaus universitete, Fizikos fakultete („HPC“ Saulėtekis“).

### 3. Tiriomojo darbo modeliavimo eiga

#### 3.1. DNR nukleobazių modeliavimas

Pirmajame darbo etape buvo nagrinėtas atpažinimo mechanizmo aktyvusis centras. Tuo tikslu pradėta buvo nuo DNR nukleotidų ir jų porų geometrijos optimizacijos. Gauti rezultatai toliau buvo lyginami su ankstesnio modeliavimo rezultatais[5]. Palyginus gautus rezultatus buvo pasirinkti tinkamiausi skaičiavimų metodai bei bazinių funkcijų rinkiniai. Modeliavimui buvo naudojami DFT hibridinis tankio funkcionalas B3LYP kartu su 6-311G(d,p) bazinių funkcijų rinkiniu. Šiame etape buvo sumodeliuotos keturios skirtingos nukleobazių struktūros, kurios toliau buvo naudojamos nukleobazių porų formavimo procese. Šios struktūros ankstesniuose darbuose buvo optimizuotos ne vieną kartą, tačiau šiuo atveju buvo įskaityti fosfodiesterio „tiltelio“ fragmentai. Anksčiau šie fragmentai nebuvo įtraukiami į skaičiavimus. Šie fragmentai neturi didelės įtakos atskirų porų geometrijos optimizacijai, tačiau naudojant lygmenų metodiką ONIOM, jie sistemai suteikia papildomo stabilumo ir tikslumo. Gavus optimizuotas geometrijas, toliau buvo formuojamos nukleobazių poros.



4 pav. Adenino ir Timino nukleobazių pora.

Gautos poros toliau buvo naudojamos restrikcijos endonukelazės BcnI DNR sekos atpažinimo mechanizmo aktyviajam centrui modeliuoti. Gavus optimizuotų struktūrų energijas buvo nustatytos ryšio energijos.

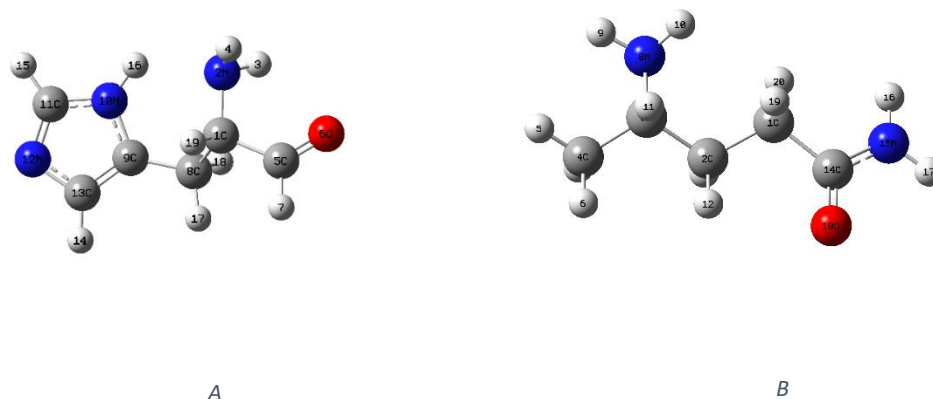
1 lentelė. Optimizuotų DNR nukleobazių geometrijų energijos.

	<b>E, eV</b>	<b>ZPE, eV</b>	<b>E+ZPE, eV</b>	<b><math>\Delta E</math>, eV</b>
A-T	-43 905,1095	13,2138	-43 891,8957	0,5551
C-G	-44 342,1001	12,7485	-44 329,3516	1,3606

Ryšio energijos buvo skaičiuojamos iš nukleobazių poros optimizuotos pilnutinės energijos atimant individualias nukleobazių pilnutines energijas. Gauti rezultatai atskleidžia, kad DNR grandinės kirpimo atveju, lengviau būtų atskeliama adenino ir timino nukleobazių pora. Toliau buvo nagrinėjami porų kompleksai kartu su atpažinimo mechanizmo aktyviojo centro fragmentais.

### 3.2. Restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų aktyvieji centrai

Restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų aktyviuosius centrus sudaro keturi skirtingi molekuliniai junginiai. Trys iš minėtų junginių yra histidino nukleorūgšties konformerai, o ketvirtasis junginys, atsirandantis BcnI mutanto aktyviajame centre, yra glutamino nukleorūgštis. Histidino nukleorūgšties molekuliniai junginiai yra paimti iš PDB duomenų bazės kristalografinių duomenų. Glutamino nukleorūgšties šioje duomenų bazėje nėra, todėl šis junginys buvo modeliuojamas naudojantis kompiuterinės chemijos vizualizacijos paketu GaussView 5.0.9. Šios keturios struktūros pateikiamos žemiau esančiame paveiksle (žr. Pav.5).



5 pav. A- histidino aminorūgštis. B - glutamino aminorūgštis

Esminis skirtumas tarp skirtingų histidino konformerų yra vandenilio atomo (H-16) erdvinė padėtis heterociklinės bazės atveju. Trečiasis histidino konformas turi papildomą vandenilį ir todėl bendras viso junginio krūvis tampa teigiamas. Gamtoje randamos tik neutralios histidino rūgšties molekulės, tačiau jas kokybiškai atskirti yra sudėtinga. Atlikus atskirų junginių geometrijos optimizaciją ir virpesių analizę, buvo sumodeliuoti atpažinimo mechanizmo aktyvieji centrai ir paskaičiuotos šių struktūrų energijos. Detalūs skaičiavimų rezultatai pateikiami moksliniame tiriamajame darbe[3]. Gavus optimizacijos rezultatus, toliau buvo galima modeliuoti DNR nukleobazių porų ir restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų aktyviųjų centrų tarpusavio sąveiką. Dviejų histidinių poros pradinės erdvinės pozicijos buvo pasirinktos remiantis kristalografiniais duomenimis. Glutamino nukleorūgšties (Q) erdvinė pozicija mutanto aktyviajame centre buvo pasirinkta mechaniškai, atsižvelgiant į panašumus su histidino nukleorūgšties pozicija. Žemiau lentelėje pateikiamos nagrinėjamų nukleorūgščių porų optimizuotos energijos.

2 lentelė. Restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų atpažinimo centrus sudarančių junginių energijos.

	E, eV	ZPE, eV	E+ZPE, eV	$\Delta E$ , eV
His-His	-25 777,4871	8,4519	-25 769,0353	9,1838
His-His+	-25 788,6547	8,8165	-25 779,8382	10,0818
Q-His	-23 300,5912	9,0587	-23 291,5325	4,8545
Q-His+	-23 311,6363	9,4124	-23 302,2239	5,6409

Atskirų junginių pilnutinės energijos sutampa su ankstesniais skaičiavimais [17]. Visgi pastebėta, kad minėtame tiriamajame darbe prie tiriamų junginių optimizuotų energijų nebuvo pridėtos nulinių virpesių energijos (ZPE). Šio darbo metu gauti rezultatai papildo ir patikslina ankstesnius skaičiavimus. Siekiant surasti pilnutines junginių energijas, privaloma paskaičiuoti nulinių virpesių energijas ir pridėti prie gaunamos optimizuotos energijos. To neatlikus gauti rezultatai nėra tikslūs. Šiame darbo etape buvo siekiama patikrinti ir palyginti modeliavimo rezultatus[17]. Gauti rezultatai skiriasi nuo turimų. Šį skirtumą galimai nulemia naudotos skirtingos metodikos. Gavus ir įvertinus šiuos rezultatus, toliau buvo modeliuojami bendri DNR ir restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų reakcijų centrų kompleksai.

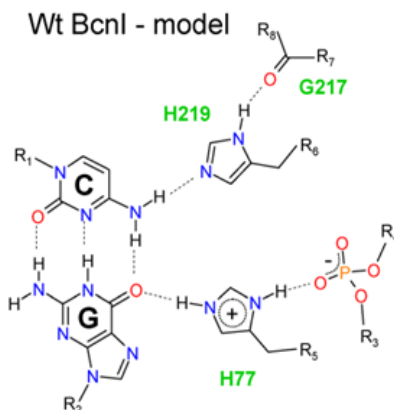
### 3.3. Restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų sąveika su DNR grandinės nukleobazių poromis

Pirmoji užduotis šiame darbo etape buvo nustatyti atskirų restrikcijos endonukleazės BcnI ir mutantų fragmentų tikslias pozicijas junginiuose su DNR grandinės nukleobazių poromis po geometrijos optimizacijos. Toliau, žinant kiekvieno aktyviojo centro segmento poziciją DNR atžvilgiu, toliau buvo galima modeliuoti atpažinimo mechanizmo aktyvųjį centrą. Šio darbo etapo vienas iš pagrindinių tikslų buvo sumodeliuoti ir išanalizuoti aktyviuosius centrus bei jų pilnutines energijas. Buvo siekiama atkartoti gamtoje vykstančias reakcijas. Siekiant šio tikslo buvo suplanuota atlikti skaičiavimus naudojantis skirtingų lygmenų metodu ONIOM. Taip pat buvo

planuojama įskaičiuoti pirmąjį sluoksnį dominančios reakcijos aplinkoje, siekiant gauti stabilų kompleksą. Atlikus geometrijos optimizaciją galima nustatyti kokioje erdvinėje padėtyje turėtų jungtis nukleorūgščių molekulės ir toliau modeliuoti restrikcijos endonukleazės BcnI atpažinimo mechanizmo aktyvųjį centrą. Tokio pobūdžio modeliavimas atliktas visiems keturiems minėtiems endonukleazės ir mutantų aktyviųjų centrų fragmentams.

### 3.3.1. Restrikcijos endonukleazės BcnI sąveikos su C-G DNR nukleobazių pora modeliavimas

Šiame modeliavimo etape buvo siekiama patikrinti hipotezę, kuri teigia, kad baltymo kirpimo mechanizmas galimai priklauso nuo restrikcijos endonukleazės BcnI atpažinimo mechanizmo aktyviųjų centrų kompleksų su DNR grandinės nukleobazių poromis ryšio energijų. Iškelta hipotezė, jog didesnė komplekso ryšio energija nulemia tai, kad restrikcijos endonukleazė ilgesnį laiko tarpą išbūna toje DNR grandinės dalyje. Tai atitinkamai reikštų, kad kuo ilgesni laiko tarpą baltymas išbūna vienoje vietoje prisijungęs prie DNR, tuo daugiau laiko atsiranda kirpimo procesui. Siekiant patikrinti šią hipotezę, buvo siekiama pastebėti koreliaciją tarp ryšio energijų ir kirpimo fakto.



6 pav. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos atpažinimo mechanizmo aktyvaus centro modelis, kai molekulinis junginys kerpamas per guanino nukleobazę.

Darbe buvo nagrinėjami keturi restrikcijos endonukleazės BcnI atpažinimo mechanizmo aktyvieji centrai, minėti skyriuje 3.2. Aukščiau pateiktame paveiksle (žr. Pav.6) atvaizduojamas vienas iš keturių atpažinimo reakcijos aktyviųjų centrų. Gamtoje randami tik neutralios histidino aminorūgšties kompleksai, likusieji aktyvieji centrai yra dirbtinai susintetinti baltymo mutantai. Esminius skirtumus tarp šių keturių kompleksų sudaro histidino aminorūgščių fragmentų erdvinė pozicija aktyviajame centre. Kristalografiniuose duomenyse pateikiami histidino fragmentai yra žymimi atitinkamai H77 ir H219. Jie yra identiški, vis dėlto priklausomai nuo jų padėties DNR nukleobazių poros atžvilgiu, fragmentų struktūra yra minimaliai modifikuojama. Histidino aminorūgštis, kuri jungiasi prie guanino nukleobazės, įgyja papildomą vandenilio atomą ir bendras fragmento krūvis tampa teigiamas. Detali modeliavimų informacija pateikiama moksliniame tiriamajame darbe[18].

Siekiant patvirtinti, arba atmesti, iškeltą hipotezę buvo paskaičiuotos ryšio energijos atskirai kiekvienam aktyviajam centrui dviem skirtingais atvejais. Pirmuoju atveju baltymo fragmentai buvo jungiami iš vienos DNR grandinės pusės, antruoju – iš priešingos DNR grandinės pusės. Žemiau pateikiami modeliavimo rezultatai. (žr. Lentelė 3)

3 lentelė. DNR nukleobazių (CG) ir restrikcijos endonukleazės BcnI kompleksų energijos neįskaičiuojant pirmojo sluoksnio.

Aktyvusis centras		$E(\text{hartree})$	$E(\text{CG})$ (hartree)	$E(\text{His/his+})$ (hartree)	$E(\text{His+})$ (hartree)	$E(\text{H219Q})$ (hartree)	$\Delta E, eV$
Neįskaitant pirmojo sluoksnio	Wt BcnI-struct_C	-51 308,47	-25 518,42	-25 789,07	-	-	0,9756
	Wt BcnI-model_G	-51 308,47	-25 518,42	-25 789,07	-	-	0,9756
	H77A BcnI-model_C	-38 419,22	-25 518,42	-	-12 899,23	-	1,5608
	H77A BcnI-model_G	-38 419,22	-25 518,42	-	-12 899,23	-	1,5608
	H219Q BcnI-model_C	-48 831,50	-25 518,42	-	-	-23 311,61	1,4656
	H219Q BcnI-model_G	-48 831,31	-25 518,42	-	-	-23 311,61	0,7607



Aukščiau pateiktoje lentelėje rezultatai gaunami modeliavimuose neįskaičiuojant pirmojo sluoksnio. Ryšio energija, kaip minėta skyriuje 3.1, buvo gauta apskaičiuojant komplekso pilnutinę energiją ir ją atimant iš izoliuotų komplekso sudėtinių dalių pilnutinių energijų. Modeliavimo rezultatai atskleidžia, kad neįskaičius pirmojo sluoksnio, ryšio energijos faktiškai nepriklauso nuo nukleazės jungimosi prie DNR grandinės būdo. Abiem atvejais pasiekiamas globalus minimumas. Todėl, siekiant toliau nagrinėti iškeltą hipotezę, skaičiavimuose buvo įskaičiuotas pirmasis sluoksnis. Pirmąjį sluoksnį sudaro papildomi molekuliniai fragmentai, kurie tiesiogiai jungiasi su tiriamais aktyviaisiais centrais. Toliau pateikiami modeliavimo rezultatai, gaunami modeliavimuose įskaičius pirmąjį sluoksnį.

4 lentelė. DNR nukleobazių (CG) ir restrikcijos endonukleazės BcnI kompleksų energijos įskaičiuojant pirmąjį sluoksnį.

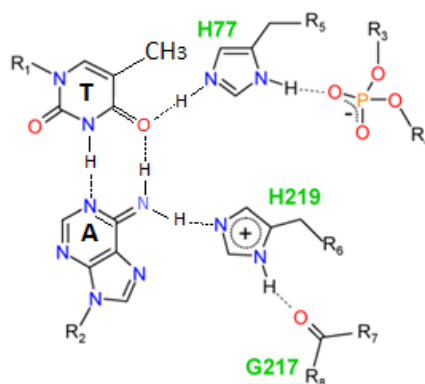
Aktyvusis centras		$E(\text{hartree})$	$E(\text{CG})$ (hartree)	$E(\text{His/his+})$ (hartree)	$E(\text{His+})$ (hartree)	$E(\text{H219Q})$ (hartree)	$\Delta E, eV$
Įskaitant pirmąjį sluoksnį	Wt BcnI-structure_C	-37 844,20	-25 518,22	-12 325,35	-	-	0,6200
	Wt BcnI-model_G	-37 844,49	-25 518,22	-12 325,16	-	-	1,1045
	H77A BcnI-model_C	-31 686,56	-25 518,22	-	-6 167,55	-	0,7828
	H77A BcnI-model_G	-31 686,79	-25 518,22	-	-6 167,55	-	1,0117
	H219Q BcnI-model_C	-38 451,96	-25 518,22	-	-	-12 933,48	0,2583
	H219Q BcnI-model_G	-38 452,05	-25 518,22	-	-	-12 933,00	0,8322

Į skaičiavimus įtraukus pirmąjį sluoksnį iš karto buvo pastebėtas ryšio energijų išsiskyrimas. Padaryta išvada, kad pirmasis sluoksnis akivaizdžiai vaidina svarbų vaidmenį restrikcijos endonukleazės BcnI atpažinimo mechanizme. Remiantis iškelta hipoteze, aktyvusis centras Wt BcnI-structure turėtų atpažinti citozino nukleobazę, visgi gaunama, kad ryšio energija yra didesnė šiam kompleksui jungiantis atvirkščiu būdu. Gautos energijos toliau buvo lyginamos tarpusavyje. Detali ryšio energijų skirtumų analizė atlikta moksliniame tiriamajame darbe (III) [18]. Gauti rezultatai parodė, kad ryšio energijos skaičiavimuose, kuriuose nebuvo įskaitytas pirmasis sluoksnis, yra praktiškai identiškios. Energijų skirtumai atsiranda tik tuomet, kai į skaičiavimus yra įtraukiamas pirmasis sluoksnis. Vis dėlto, į modeliavimą įtraukus pirmąjį sluoksnį, gaunami rezultatai neleidžia patvirtinti iškeltos hipotezės, kad didesnė ryšio energija koreliuoja su kirpimo faktu. To pasekoje galima daryti išvadą, kad restrikcijos endonukleazės BcnI DNR atpažinimo mechanizme dalyvauja papildomi nenumatyti veiksniai. Šie nenumatyti veiksniai galėtų būti būtent vandenilinių ryšių tinklas, kuris įtraukiamas į skaičiavimus sekančiame etape.

### **3.3.2. Restrikcijos endonukleazės BcnI sąveikos su A-T DNR nukleobazių pora modeliavimas**

Sekančiame darbo etape buvo tiriami tokie patys restrikcijos endonukleazės BcnI atpažinimo mechanizmo aktyvieji centrai (žr. Skyrius 3.3.1), tik šį kartą junginiai buvo sudaromi su adenino ir timino nukleobazių poromis. Priešingai nei pirmuoju atveju, šių kompleksų kristalografinių duomenų nėra. Todėl visi sekantys modeliavimai buvo atlikti mechaniškai ir buvo stengiamasi kuo tiksliau atkartoti nukleazės fragmentų erdvines pozicijas citozino ir guanino nukleobazių porų atžvilgiu. Toliau pateikiamas vienas iš atpažinimo reakcijos aktyviųjų centrų. (žr. Pav. 7)

## Wt Bcl1 - structure



7 pav. Aktyvaus centro modelis, kai DNR molekulė kerpama per T nuokleobazę.

Aukščiau nepavaizduoti atpažinimo centrai yra identiški C-G poros atvejams. Kaip ir prieš tai sekusiajame skyriuje, siekiant patvirtinti, arba paneigti, iškeltą hipotezę, buvo paskaičiuotos ryšio energijos atskirai kiekvienam atpažinimo mechanizmo aktyviajam centrui dviem skirtingai atvejais. Pirmuoju atveju baltymo fragmentai yra jungiami iš vienos DNR grandinės pusės, antruoju – jungiami iš priešingos DNR grandinės pusės.

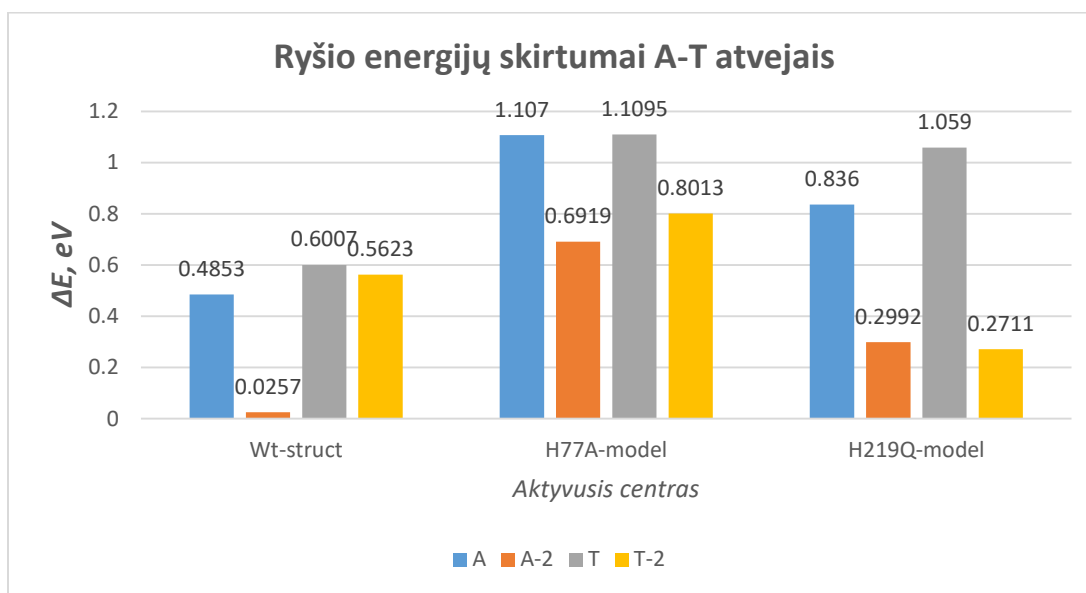
5 lentelė. DNR nukleobazių (AT) ir restrikcijos endonukleazės BcnI kompleksų energijos neįskaičiuojant pirmojo sluoksnio.

Aktyvusis centras		$E(\text{hartree})$	$E(\text{AT})$ (hartree)	$E(\text{His/his+})$ (hartree)	$E(\text{His+})$ (hartree)	$E(\text{H219Q})$ (hartree)	$\Delta E, \text{eV}$
Neįskaitant pirmojo sluoksnio	<i>Wt BcnI-struct_A</i>	-1868,5443	-921,3374	-947,2043	-	-	0,0026
	<i>Wt BcnI-model_T</i>	-1868,5552	-921,3374	-947,2110	-	-	0,6007
	<i>H77A BcnI-model_A</i>	-1395,1358	-921,3374	-	-473,7729	-	1,1070
	<i>H77A BcnI-model_T</i>	-1395,1358	-921,3374	-	-473,7729	-	1,1095
	<i>H219Q BcnI-model_A</i>	-1777,5090	-921,3374	-	-	-856,1561	0,8360
	<i>H219Q BcnI-model_T</i>	-1777,5071	-921,3374	-	-	-856,1460	1,0590

Aukščiau pateiktoje lentelėje galima pastebėti, kad ryšio energijos skiriasi ir neįskaičius pirmojo sluoksnio. Šį neatitikimą galimai nulėmė tai, kad aktyvieji centrai buvo modeliuojami rankiniu būdu, o ne paimti iš kristalografinių duomenų bazės. Vis dėlto pirmojo mutanto (H77A) atveju pastebimas atitikimas su C-G porų modeliavimo rezultatais, kadangi ryšio energijos yra praktiškai identiškos abejais prisijungimo atvejais. Kaip ir skyriuje 3.3.1, siekiant toliau analizuoti iškeltą hipotezę, į skaičiavimus buvo įtrauktas pirmasis sluoksnis. Detali ryšio energijų skirtumų analizė atlikta moksliniame tiriamajame darbe (III) [18].

Gavus atitinkamų modeliavimų rezultatus galima daryti išvadą, kad pirmojo sluoksnio įskaitymas turi svarbios reikšmės tyrimo rezultatams. Visi atliekami tolimesni tyrimai turėtų būti atliekami įskaičius pirmąjį sluoksnį. Vis dėlto gautos ryšio energijos mutantų aktyviesiems centrams nepasižymi dideliais skirtumais, ir rezultatai nepriklauso nuo prisijungimo būdo. Kaip ir C-G nukleobazių porų atveju, gauti rezultatai neleidžia patvirtinti iškeltos hipotezės ir šiuo atveju

ryšio energija nekoreliuoja su kirpimo faktu. Gautos energijos toliau buvo palygintos tarpusavyje (žr. Grafikas 1).



1 grafikas. Aktyviųjų centrų modeliavimo rezultatai (AT).

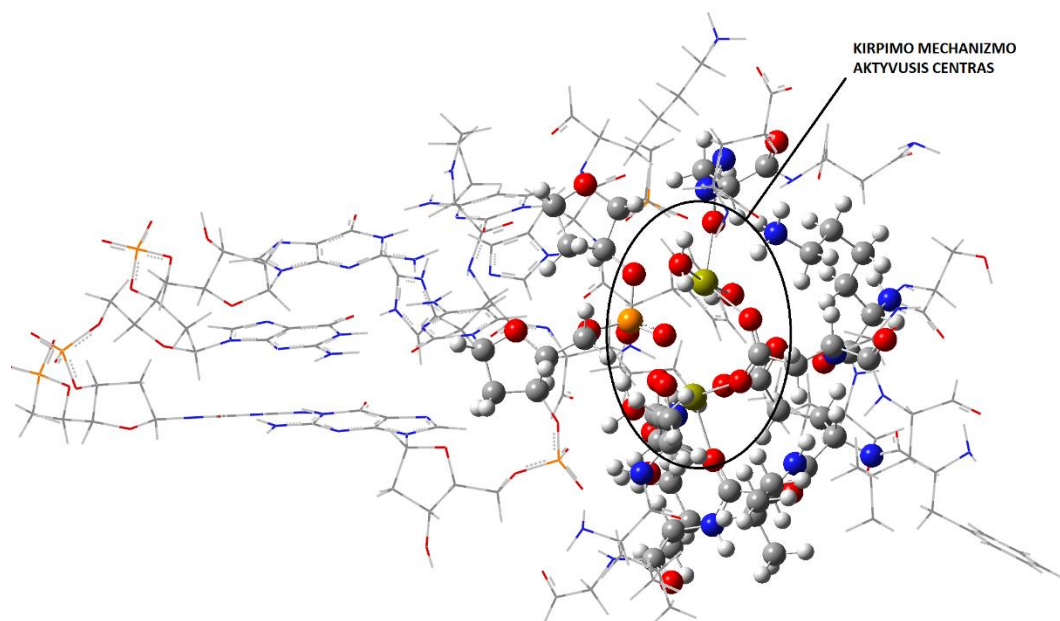
Aukščiau pateikiamame grafike A (mėlyna spalva) raide žymimas stulpelis atvaizduoja restrikcijos endonukleazės BcnI atpažinimo mechanizmo aktyviojo centro ryšio energiją adenino nukleobazės atpažinimo atveju. A-2 pažymėtas stulpelis atvaizduoja ryšio energijas, gaunamas į skaičiavimus įtraukus pirmąjį sluoksnį. Šiame darbo etape gauti rezultatai taip pat nerodo koreliacijos tarp ryšio energijos ir kirpimo fakto. Tai atitinkamai reiškia, kad atpažinimo mechanizme, kaip ir C-G poros atveju (žr. Skyrius 3.3.1), taip pat dalyvauja nenumatyti veiksniai.

### 3.4. Vandenilinių ryšių tinklo įtakos restrikcijos endonukleazės BcnI DNR kirpimo mechanizmui modeliavimas

Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmo aktyvusis centras kristalografiniuose duomenyse yra sudarytas iš dviejų kalcio atomų (Ca), kurie vandenilinių ryšių

pagalba yra prisijungę kelis papildomus fragmentus. Kirpimo mechanizmo aktyvusis centras yra tame pačiame baltyme kaip ir atpažinimo reakcijos aktyvusis centras. Vis dėlto kirpimo mechanizmo aktyvusis centras jungiasi prie DNR grandinės skirtingoje vietoje, palyginus su atpažinimo mechanizmu, ir artimoje aktyviojo centro aplinkoje nėra susijęs su atpažinimo mechanizmo aktyviuoju centru. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmas prie DNR grandinės jungiasi per fosfodiesterines jungtis (žr. Pav. 8). Šiame darbo etape yra nagrinėjama hipotezė, kad kirpimo mechanizme dalyvauja natūralus tirpiklis – vanduo. Galima daryti prielaidą, kad būtent vandens molekulių įtaka yra tas ankstesniuose skyriuose minėtas nenumatytas veiksnys. Modeliavimas buvo vykdomas dviem etapais. Pirmajame etape restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmo aktyviojo centro struktūra buvo modeliuojama be vandens molekulių aktyviojo centro aplinkoje. Jei gaunama stabili sistema, galima pereiti į antrąjį etapą. Antrame etape aktyviojo centro struktūros buvo modeliuojamos kartu su vandens molekulėmis aktyviojo centro aplinkoje. Tokiu metodu buvo siekiama įvertinti vandenilinių ryšių tinklo įtaką restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmui.

Įvertinus gautus rezultatus, aktyviojo centro kalcio atomai (Ca) buvo pakeisti magnio atomais (Mg) ir atlikti tokie patys skaičiavimai. Tokiu būdu buvo siekiama įvertinti ar struktūra išlaiko stabilumą pakeitus pagrindinius elementus. Yra žinoma, kad kai restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmo aktyviajame centre yra magnio atomai, nukleazė atlieka DNR kirpimo veiksmą, o kai atomai yra kalcio – kirpimo veiksmas negalimas. Sukeitus sunkiuosius atomus vietomis buvo siekiama išanalizuoti šią teoriją ir pamėginti atkartoti eksperimentiškai gaunamus rezultatus.



8 pav. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmo aktyvusis centras.

### 3.4.1. ONIOM metodikos taikymas restrikcijos endonukleazės BcnI geometrijos optimizacijai

Šiame darbo etape restrikcijos endonukleazė BcnI kartu su DNR grandinės seka buvo suskirstytos į du skirtingus lygmenis. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos atpažinimo mechanizmo aktyvusis centras, šiuo atveju, kartu su DNR grandinės seka ir keliais papildomais

nukleazės aminorūgščių fragmentais buvo įtraukti į žemąjį ONIOM lygmenį ir užšaldyti. Minėtam lygmeniui optimizuoti buvo naudojamas pusempiris kvantinės chemijos skaičiavimų metodas PM 6. Pagrindinis dėmesys buvo skiriamas kirpimo mechanizmo aktyviajam centrui, į kurį taip pat buvo įtrauktos kelios papildomos aminorūgštys. Ši molekulinė junginių grupė buvo įtraukta į aukštąjį ONIOM lygmenį. Šio lygmens fragmentų optimizacijai buvo naudojamas DFT kvantinės chemijos metodas B3LYP kartu su pastovios koreliacijos poliarizuotu cc-pVDZ bazinių funkcijų rinkiniu. Žemasis sluoksnis buvo sudarytas iš 473 atomų, aukštasis – iš 157 atomų. Pirmasis sluoksnis įtrauktas į skaičiavimus todėl, kadangi suteikia tiriamai sistemai struktūrinio stabilumo ir leidžia gauti tikslesnius rezultatus. Dėl didelio atomų skaičiaus ir sudėtingų kompleksų, kompiuteriniai modeliavimai reikalavo daug laiko ir resursų.

Sekančiame darbo etape, siekiant įvertinti vandenilio ryšio įtaką restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmui, buvo naudojama trijų lygmenų ONIOM metodika. Aukštojo sluoksnio atomai buvo perkelti į vidurinį sluoksnį ir užšaldyti, o fosfodiesterinė „tiltelio“ grandinė, kartu su artimiausia vandens molekule, buvo palikti aukštajame sluoksnyje. Vidurinio sluoksnio optimizavimui buvo naudojami DFT kvantinės chemijos skaičiavimų metodai.

### **3.4.2. Kirpimo mechanizmo aktyviųjų centrų su Ca ir Mg atomais skirtumų analizė**

Restrikcijos endonukleazės BcnI kirpimo mechanizmo aktyvusis centras kristalografiniuose duomenyse yra sudarytas iš kalcio atomų. Siekiant sulygtinti gaunamus modeliavimo rezultatus su realiais eksperimentiniais duomenimis, minėti kalcio atomai buvo pakeisti magnio atomais. Toliau buvo optimizuojami aktyvieji centrai abiem atvejais ir ieškoma esminių struktūrinių skirtumų tarp gautų optimizuotų geometrijų. Tuo tikslu buvo pasirinkta pamatuoti atstūmus tarp svarbiausių aktyviojo centro atomų.



6 lentelė. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmo aktyviųjų centrų esminiai geometriniai skirtumai kalcio atomų atveju.

	$R_{306(Ca)-202(O), \text{Å}}$	$R_{305(Ca)-202(O), \text{Å}}$	$R_{306(Ca)-305(Ca), \text{Å}}$	$R_{305(Ca)-308(O), \text{Å}}$	$R_{201(P)-202(O), \text{Å}}$
<b>Kristalografiniai duomenys</b>	2,5686	2,2720	4,0539	2,3559	1,4888
<b>BcnI Wt-struct(beH<sub>2</sub>O)</b>	2,4198	2,3969	4,1344	3,6987	1,5575
<b>BcnI Wt-struct(H<sub>2</sub>O)</b>	2,4225	2,4152	4,1355	2,4049	1,5567

Aukščiau pateikiamoje lentelėje yra sužymėti esminiai optimizuotų struktūrų geometriniai skirtumai kalcio atomų atveju. Atstumas tarp atomų yra matuojamas angstromais. Buvo pamatuoti abiejų aktyviojo centro kalcio atomų atstumai iki fosfodiesterio jungties, taip pat atsižvelgta į atstumą tarp pačių atomų ir kelis papildomus nuotolius, kurie galėtų turėti įtakos kirpimo mechanizmo veikimo principui. Gauti rezultatai yra palyginami su kristalografiniais duomenimis, kurie yra savotiškas atskaitos taškas galimoms išvadoms. Iš šeštoje lentelėje pateikiamų rezultatų galima daryti išvadą, kad vandenilinių ryšių tinklo aplinkoje esanti sistema yra mažiausiai nukrypusi nuo kristalografinių duomenų. Vandenilinių ryšių tinklo įtaka bus detalčiau aptariama sekančiame skyriuje. Gavus aukščiau lentelėje pateiktus rezultatus, toliau vietoje kalcio atomų buvo įstatyti magnio atomai ir taip pat buvo atlikta geometrijos optimizacija. Šios optimizacijos rezultatai pateikiami žemiau esančioje lentelėje.

7 lentelė. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmo aktyviųjų centrų esminiai geometriniai skirtumai magnio atomų atveju.

	$R_{306(Mg)-202(O), \text{Å}}$	$R_{305(Mg)-202(O), \text{Å}}$	$R_{306(Mg)-305(Mg), \text{Å}}$	$R_{305(Mg)-308(O), \text{Å}}$	$R_{201(P)-202(O), \text{Å}}$
<b>Kristalografiniai duomenys</b>	2,5686	2,2720	4,0539	2,3559	1,4888
<b>BcnI Wt-struct(beH<sub>2</sub>O)</b>	2,1320	2,1677	3,4483	4,2689	1,5896
<b>BcnI Wt-struct(H<sub>2</sub>O)</b>	2,1512	2,3294	3,7984	2,1430	1,5678

Šiuo atveju pastebimas didesnis geometrijos iškraipymas negu kalcio atomų atveju. Gauti geometrijos optimizacijos rezultatai atskleidžia, kad restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos karpymo mechanizmo aktyvusis centras reikšmingai nukrypsta nuo pradinių kristalografinių duomenų. Aktyviojo centro molekulės yra tankiau suglaudamos ir gauta geometrinė struktūra aiškiai skiriasi nuo geometrinės struktūros, kurios aktyvieji centrai sudaryti iš kalcio atomų. Taip pat galima pastebėti ir didesnę vandenilinių ryšių tinklo įtaką kompleksų geometrijai. Vis dėlto siekiant tinkamai įvertinti vandenilinių ryšių tinklo įtaką restrikcijos endonukleazės BcnI kirpimo mechanizmui, buvo apskaičiuotos optimizuotų struktūrų pilnutinės energijos ir gauti rezultatai buvo palyginti tarpusavyje.

### 3.4.3. Vandenilinių ryšių tinklo įtakos tyrimas

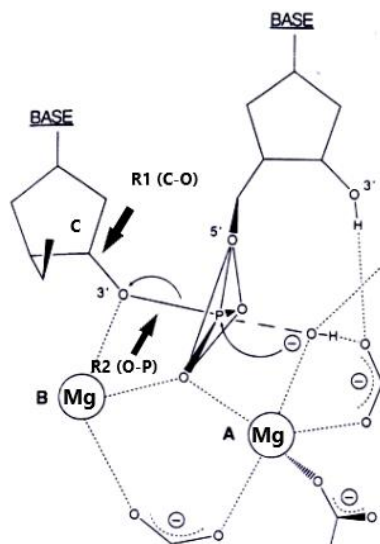
Šiame darbo etape buvo siekiama įvertinti vandenilinių ryšių tinklo įtaką restrikcijos endonukleazės BcnI kirpimo mechanizmo aktyviajam centrui. Tuo tikslu buvo paskaičiuotos pilnutinės energijos, homo ir lumo orbitalių energijos ir paskaičiuotas jų skirtumas. Gauti tyrimo rezultatai pateikiami lentelėje toliau.

8 lentelė. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo mechanizmo geometrijos optimizacijos energijos.

	$E, eV$	$ZPE, eV$	$E+ZPE, eV$	$E_{HOMO}, eV$	$E_{LUMO}, eV$	$\Delta E_{HOMO/LUMO}, eV$
<b>BcnI Wt-struct(beH<sub>2</sub>O,Ca)</b>	-158 300,44	34,5597	-158 265,88	-1,5491	0,2653	1,8145
<b>BcnI Wt-struct(H<sub>2</sub>O,Ca)</b>	-158 300,04	34,5126	-158 265,53	-0,2830	0,1750	0,4580
<b>BcnI Wt-struct(beH<sub>2</sub>O,Mg)</b>	-132 390,53	-	-	-	-	-
<b>BcnI Wt-struct(H<sub>2</sub>O,Mg)</b>	-132 426,72	-	-	-	-	-

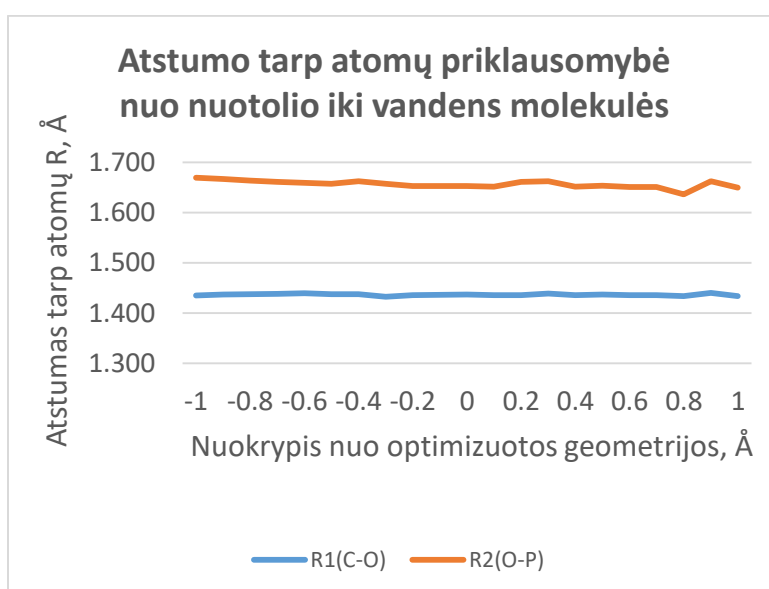
Kadangi apytiksliai 600 atomų kompleksai yra masyvus, deja nespėta gauti visų norimų rezultatų. Virpesinę analizę pavyko atlikti tik restrikcijos endonukleazėms BcnI, kurių aktyviajame centre yra kalcio atomai. Vis dėlto gautų rezultatų pakanka padaryti preliminarias išvadas ir visgi įvertinti vandenilinių ryšių tinklo įtaką. Iš aukščiau pateiktų rezultatų ir 3.4.2 skyriuje pateikiamų modeliavimo rezultatų galima daryti išvadą, kad vandenilinių ryšių tinklas ir yra tas nenumatytas veiksnys, kuris dalyvauja tiek kirpimo, tiek atpažinimo mechanizmų procese. Iš 6 ir 7 lentelių duomenų didelio skirtumo tarp rezultatų kalcio atomų atveju pastebėti negalima. Tačiau šis skirtumas atsiranda vietoje kalcio atomų įstačius magnio atomus. Šis skirtumas tarp cheminių elementų indukuoja, kad magnio atomų atveju, restrikcijos endonukleazė BcnI galimai kerpa DNR grandinės seką, o kalcio atomų atveju – kirpimo procesas nevyksta. Taip pat galima pastebėti didelį skirtumą tarp aukščiausios užimtos elektroninės orbitalės (homo) ir žemiausios neokupuotos elektroninės orbitalės (lumo) energijų dviem skirtingais atvejais: kai aktyviojo centro aplinkoje yra vandens molekulių, ir kai aplinkoje nėra vandens molekulių. Homo ir lumo energijų skirtumas leidžia apibūdinti molekulinės sistemos stabilumą ir tvirtumą. Kuo didesnis šis energijų skirtumas, tuo stabilesnė tirama sistema. Šiuo atveju galima pastebėti, kad į skaičiavimus įtraukus vandenilinių ryšių tinklą, minėtas homo ir lumo energijų tarpas sumažėja daugiau nei keturis kartus. Remiantis gautu rezultatu galima daryti išvadą, kad į modeliuojamo aktyviojo centro aplinką įtraukus vandens molekules, bendras visos molekulinės sistemos stabilumas sumažėja. Galima daryti prielaidą, kad dėl šios priežasties, restrikcijos endonukleazė BcnI sėkmingai nukerpa DNR grandinę.

Siekiant paremti šią prielaidą buvo atliktos kelios simuliacijos, kuriose buvo keičiamas atstumas tarp vandens molekulės ir fosfodiesterio grandinės deguonies atomo. Atstumas buvo keičiamas žingsniais po 0,1 angstromo artinant ir tolinant vandens molekulę ir buvo atliekama geometrijos optimizacija. Atlikus optimizaciją buvo išmatuojamas atstumas tarp deguonies ir anglies atomų R1 (C-O) ir atstumas tarp deguonies ir fosforo atomų R2 (O-P) (žr. 9 pav.).



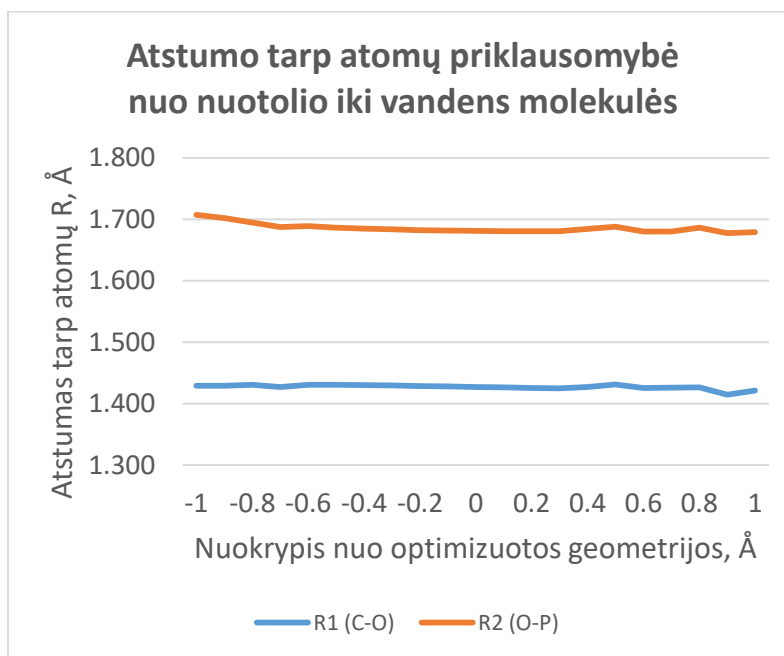
9 pav. Restrikcijos endonukleazės BcnI DNR kirpimo mechanizmo aktyvusis centras.

Šiomis simuliacijomis buvo siekiama patikrinti kokią įtaką DNR grandinės fosfodiesterio „tilteliui“ daro vandens molekulė, skirtingu atstumu nutolusi nuo šios jungties. Buvo siekiama pastebėti kokybinį atstumų skirtumą ir tokiu būdu identifikuoti kirpimo procesą. Buvo modeliuojama dvidešimt skirtingų vandens molekulių pozicijų dviem atvejais: kai kirpimo mechanizmo aplinkoje yra papildomų vandens molekulių ir kai aplinkoje šių molekulių nėra. Gauti rezultatai pateikiami grafikuose žemiau (žr. 2 ir 3 grafikai).



2 grafikas. Atstumo tarp atomų priklausomybė nuo nuotolio iki vandens molekulės, kai aplinkoje nėra papildomų vandens molekulių

Iš aukščiau pateiktų rezultatų galima pastebėti, kad skirtingu atstumu nutolusi pasirinkta vandens molekulė nedaro jokios įtakos pirmajam ryšiui R1 (C-O). Taip pat galima pastebėti, kad antrajam ryšiui R2 (O-P) daroma įtaka yra minimali, tačiau priartinus vandens molekulę 0,8-1 angstromo atstumu prie DNR jau galima pastebėti nežymų atstumo augimą. Siekiant įvertinti vandenilinių ryšių tinklo įtaką, prie šios modeliuojamos sistemos buvo pridėtos papildomos vandens molekulės ir atlikta identiška serija matavimų. Gauti rezultatai pateikiami grafike žemiau (žr. 3 grafikas).



3 grafikas. Atstumo tarp atomų priklausomybė nuo nuotolio iki vandens molekulės, kai aplinkoje yra papildomos vandens molekulės

Gauti rezultatai sutampa su pirmaisiais modeliavimo rezultatais (žr. 2 grafikas). Skirtingos vandens molekulės pozicijos neįtakoja tiriamų jungčių R1 ir R2. Visgi galima pastebėti tą patį R2 (O-P) ryšio atstumo augimą priartinus vandens molekulę 0,8-1 angstromo atstumu. Įvertinus gautus abiejų modeliavimų rezultatus galima daryti išvadą, kad vandenilinių ryšių tinklas neturi reikšmingos įtakos DNR sekos fosfodiesterio grandinės jungtims. Visgi norint paremti šį teiginį toliau reikėtų naudoti molekulių mechanikos metodus ir modeliuoti cheminių ryšių pokyčius.

## IŠVADOS IR PASIŪLYMAI

Pirmajame darbo etape naudojantis kvantinės chemijos metodais buvo sumodeliuoti DNR nukleobazių bei restrikcijos endonukleazės BcnI ir jos mutantų kompleksai. Modeliavimo rezultatai praktiškai atitinka senesnius rezultatus, vis dėlto pastebėta, kad ankstesniame darbe[17] buvo praleistos nulinių virpesių energijos.

Lyginant pirmame etape gautus rezultatus su minėto darbo[17] modeliavimo rezultatais, galima daryti išvadą, kad sąveikos geometrija turi didelės įtakos skaičiavimų rezultatams, nes gautos ryšių energijos vietomis nesutampa. Norint suprasti vykstančius procesus pereita prie procesų modeliavimo pačiame baltyme.

Antrajame darbo etape pasitelkus kvantinės chemijos metodus buvo sumodeliuoti restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos atpažinimo ir kirpimo mechanizmų aktyvieji centrai. Šiame darbe prie keturių atpažinimo mechanizmo aktyviųjų centrų buvo pridėtas pirmasis sluoksnis. Pastebėta, kad pirmojo sluoksnio įskaitymas turi svarbios įtakos tolimesniems skaičiavimams. Remiantis gautais modeliavimo rezultatais galima paneigti išsikeltą hipotezę, kad restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos atpažinimo mechanizmo aktyviųjų centrų ryšio energijos koreliuoja su kirpimo faktu. Norint toliau analizuoti vykstančius procesus, buvo pereita prie procesų modeliavimo DNR kirpimo mechanizmo aktyviojo centro aplinkoje.

Modeliavimo rezultatai DNR kirpimo mechanizmo aktyviojo centro aplinkoje atskleidė, kad vandenilinių ryšių tinklas daro įtaką kirpimo mechanizmui. Aplinkoje esantis vanduo padeda sumažinti molekulinės sistemos stabilumą ir tvirtumą, ir tokiu būdu lengviau leidžiama atlikti DNR grandinės kirpimą. Palyginus kirpimo mechanizmą su kalcio ir magnio atomais modeliavimo rezultatus, pastebėta, kad kalcio atomų atvejų geometrinė kompleksų struktūra nedaug pakinta nuo pradinių kristalografinių duomenų. Magnio atomų atveju geometrija yra glaudesnė, bendra komplekso energija sumažėja. Šie rezultatai sutampa su eksperimentiniais duomenimis, kuriuose kirpimas vykdomas su magnio atomais aktyviajame centre.

Laurynas Diska

Vandenilinių ryšių tinklo įtakos restrikcijos endonukleazės DNR sekos kirpimo mechanizme modeliavimas tankio funkcionalių metodais

### **SANTRAUKA**

CRISPR/Cas9 yra galingas inovatyvus įrankis, naudojamas šiuolaikiniuose tyrimuose. Susidomėjimas šia technologija per paskutinius metus pastoviai auga. Šio darbo tikslas buvo ištirti restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos kirpimo ir atpažinimo mechanizmus, išanalizuoti vykstančius procesus ir suprasti mechanizmų veikimo principus. Šiame darbe buvo tiriamos trumpos palindrominės DNR grandinės sekos kartu su restrikcijos endonukleaze BcnI. Naudojantis kvantinės chemijos metodais buvo nagrinėjami restrikcijos endonukleazės BcnI DNR sekos atpažinimo ir kirpimo mechanizmai. Modeliavimo rezultatai padėjo atsakyti į iškeltus klausimus, išanalizuoti iškeltas hipotezes. Vandenilinių ryšių tinklas yra papildomas veiksnys, dalyvaujantis DNR sekos kirpimo reakcijose. Gauti modeliavimo rezultatai leidžia daryti išvadą, kad vandenilinių ryšių tinklas sumažina molekulinės sistemos stabilumą ir tvirtumą, ir tai leidžia restrikcijos endonukleazei BcnI nukirpti DNR grandinę.

Laurynas Diska

Density functional modeling of hydrogen bonding network influence on restriction endonuclease DNA sequence snipping and recognition mechanism

### **SUMMARY**

CRISPR/Cas9 is a powerful tool, that is being used in the most recent research. Interest in this technology is rising every year. The main aim of this study was to investigate restriction endonuclease BcnI DNA sequence snipping and recognition mechanisms, to analyze ongoing processes and to understand the principles of operation of mechanisms mentioned. The work of this research is focused on short palindromic repeats in DNA and restriction endonuclease BcnI. Restriction endonuclease BcnI DNA sequence snipping and recognition mechanisms were analyzed with the help of quantum chemistry methods. Modeling results helped to get answers for most of the questions, analyze hypothesis, that were presented. Hydrogen bonding network is an additional factor, that is involved in the DNA sequence snipping mechanism. The obtained simulation results allow to conclude that the hydrogen bonding network reduces the stability and strength of the molecular system, which allows the restriction endonuclease BcnI to cut the DNA sequence.



## LITERATŪRA

1. TheConversation [interaktyvus]. [Žiūrėta 2018m. gegužės mėn. 10d.]. Prieiga per internetą: <https://theconversation.com/what-is-crispr-gene-editing-and-how-does-it-work-84591>.
2. Livescience [Interaktyvus]. [Žiūrėta 2018m. gegužės mėn. 10d.]. Prieiga per internetą: <https://www.livescience.com/58790-crispr-explained.html>.
3. Diska Laurynas. Kvantinės chemijos metodais aktyvaus centro modeliavimas DNR sekos kirpimo mechanizmo restrikcijos endonukleazėje. Antros pakopos studijų mokslo tiriamasis darbas(II). 2017m. Vilnius.
4. Alberts B.; Johnson A; Lewis J; Raff M; Roberts K & Walter P (2002). Molecular Biology of the Cell (4th ed.). Garland Science. ISBN 0-8153-3218-1. pp. 120–121.
5. Diska Laurynas. Alicino molekulinis modeliavimas. Pagrindinių studijų kursinis darbas. 2016m. Vilnius.
6. Yang, Wei. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. Quarterly Reviews of Biophysics 44, I (2011), pp. 1-93. ©Cambridge University Press 2010. Doi:10.1017/S0033583510000181.
7. Zhao, Haiyan; Lin Zihan; Lynn Y., Anna; Varnado Brittany; Beutler A., John; Murelli P., Ryan; Le Grice F. J., Stuart; Tang Liang. Two distinct modes of metal ion binding in the nuclease active site of a viral DNA-packaging terminase: insight into the two-metal-ion catalytic mechanism. Nucleic Acids Research, 2015 1. Doi: 10. 1093/nar/gkv1018.
8. Sokolowska Monika; Kaus-Drobek Magdalena; Czapinska Honorata; Tamulaitis Gintautas; Szczepanowski H. Roman; Urbanke Claus; Siksnys Virginijus, Bochtler Matthias. Monomeric Restriction Endonuclease BcnI in the Apo Form and in an Asymmetric Complex with Target DNA. Journal of Molecular Biology. Volume 369, Issue 3, 8 June 2007, Pages 722-734.
9. Ledford, Heidi. CRISPR'S Mysteries.280.Nature.VOL 541.19 January 2017. ©2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature.

10. Ran Ann F.; Hsu D. Patrick; Wright Jason; Agarwala Vineeta; Scott A. David; Zhang Feng. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8, 2281-2308. 2013. Doi:10.1038/nprot.2013.143.
11. Mindaugas Mačernis. Aplinkos poveikis fotoindukuotiems reiškiniams organinėse molekulėse. Daktaro Disertacija. 2011m.
12. Foresman, James B.; Frisch, Æ. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Second edition. 1993m. – 335psl. – ISBN 978-0963676931.
13. Koch, Wolfram; Holthausen C., Max. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. Second Edition. Copyright © 2001 Wiley-VCH Verlag GmbH. ISBNs: 3-527-30372-3 (Softcover); 3-527-60004-3 (Electronic).
14. BcnI restrikcijos endonukleazės ir jos atpažįstamos DNR sekos kristalografinė struktūra:<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2ODI>.
15. WebMo [interaktyvus]. [Žiūrėta 2018m. gegužės mėn 11d.]. Prieiga per internetą:[www.webmo.net](http://www.webmo.net).
16. Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
17. Bašinskas Gytis. DNR sekos atpažinimo restrikcijos endonukleazėje modeliavimas kvantinės chemijos metodais. Antros pakopos studijų mokslinis tiriamasis darbas. 2012m. Vilnius.

18. Diska Laurynas. Restrikcijos endonuklezės DNR sekos atpažinimo mechanizmo aktyvaus centro modeliavimas DFT metodais. Antros pakopos studijų mokslinis tiriamasis darbas (III). 2018, Vilnius.