



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Martina Manenica

**MEHANIZAM AKTIVACIJE PROTEINA MNTR IZ
BAKTERIJE *HALALKALIBACTERIUM HALODURANS*
ZA VEZANJE NA DNA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Martina Manenica

**ACTIVATION MECHANISM OF MNTR PROTEIN
FROM THE BACTERIUM *HALALKALIBACTERIUM
HALODURANS* FOR DNA BINDING**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Professor Branimir Bertoša, PhD

Zagreb, 2025

Ovaj doktorski rad izrađen je na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija Kemija pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje na kojem se temelji ova disertacija napravljeno je u sklopu projekta Manganovi metalosenzori (IP-2020-02-3446) čiji je voditelj B. Bertoša i financiran je od strane Hrvatske zaklade za znanost.



Zahvale

Za početak, neizmjerno hvala mom dragom mentoru prof. dr. sc. Branimiru Bertoši. Svemir slučajnosti morao se poklopiti da prvi profesor kojeg sam srela još na upisima, a dok sam kao zbumjena brucošica ispunjavala formulare nakon neprospavane noći u Promet Makarskoj, bude isti profesor koji će mentorirati moj finalni korak u akademskom životu. Vaš vječno pozitivan stav te opušten i veseli pristup studentima već na samom početku ostavili su prvi i pravi dojam o PMF Kemiji i svemu lijepom što me čekalo! Hvala Vam prije svega na tome, a onda i na ogromnoj podršci, motivaciji, razumijevanju u ovim finalnim trenutcima!

Hvala svim računalcima, a osobito Zoe koja nam je svima utabala put u ovoj MntR priči. Hvala Ani na predivnoj suradnji koja se samo poželjeti može dok je nastajao naš prvi rad. I hvala što je pronašla vremena uskakati čak iz Heidelberga! Hvala Katarini što me spasila u najtežim trenutcima ovog putovanja kad se umalo srušilo sve jer - falio je onaj jedan papir...

Hvala ekipi *Trećeg elementa*, zbog vas sam zavoljela znanost još više, pa čak i onu čudnu fiziku i astronomiju. Imali smo jednu sjajnu priču, vjerujem da ćemo nekad opet stvarati zajedno!

Osobito hvala F + A ekipi s posla, posebno uredskim bubašvabama na motivaciji, podršci i svim veselim trenutcima bez kojih ovaj suživot 9-5-posla i 5-9-doktorata ne bi bio ni približno tako opušten i zabavan!

Hvala Jani, Petri, Emi, Filipu, Matiji, Mančiju (poredani po starini-prvo cure-*op.a.*) na podršci, druženjima i uvijek nekim planovima. Hvala što ste bili tu i kad je najgore i kad je najbolje, što ste dio moje priče i kad se tuguje i kad se fešta!

Hvala Sari i Puti, Veks i Emiju, Kati Polucimerici i svim dodatnim pridošlicama iz Trpanjske, zbog vas sam se zaista osjećala kao student!

Hvala štalici, mojoj *trauma bonded* ekipici. S vama je sve zabava i smijeh (ali doslovno - sve).

umetni sticker

Hvala Dorici, Laći, Mari, Tihi, Petri i malim curama... definicija ste onog - prijatelj ne pita, prijatelj je tu, makar nas 100+ kilometara dijelilo...

Hvala mojoj južnjačkoj, veseloj i energičnoj familiji, u kojoj se glasno priča, ali i glasno voli. Zbog vas sam to što jesam. Najviše hvala Majki i Čaći, a posebno mome malom bratu Kruni, koji je izrastao u sjajnog čovjeka. Neizmjerno sam ponosna i sretna što te imam. I daj diplomiraj više da majka popuni vitrinu!

I neizmjerno hvala Ediju! Sa mnom si pregrmio kad su stisli zadnji rokovi, bio mi i motivator i kritičar, i kuhar i recenzent, i šofer i lektor i hodajući kalendar... i najvažnije i najteže – hvala što si pregledao reference! *Even dough* ćeš reći da je ovo previše veznika. Mogu opet obećati da sljedeća stvar neće biti u zadnji tren, ali sve znaš <3

I za kraj – hvala Ryanairu!

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. Bakterija <i>Halalkalibacterium halodurans</i>	4
2.2. Regulacija esencijalnih prijelaznih iona metala u bakterijama.....	5
2.3. Regulacija koncentracije iona mangana u bakterijskim stanicama putem proteina MntR .	7
2.4. Simulacije molekulske dinamike (MD) za biomakromolekule	15
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. MD simulacije raznih formi proteina <i>HhMntR</i>	26
3.2. MD simulacije holo- i apoproteina <i>HhMntR</i> u kompleksu s operatorskom sekvencom <i>mntA</i>	28
3.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza trajektorija dobivenih MD simulacijama	30
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Parametrizacija iona mangana u holoproteinu <i>HhMntR</i>	31
4.2. Konformacijska analiza specifičnosti holo- i apoproteina <i>HhMntR</i> u MD simulacijama ..	41
4.3. Konformacijska analiza mutanata holoproteina <i>HhMntR</i>	54
4.4. Izgradnja kompleksa proteina <i>HhMntR</i> i DNA za proučavanje MD simulacijama	63
4.5. Konformacijska analiza MD simulacija kompleksa proteina <i>HhMntR</i> i pripadne operatorske sekvene <i>mntA</i>	67
4.6. Analiza intermolekulskih interakcija na sučelju DNA-vezne domene proteina <i>HhMntR</i> i pripadne operatorske sekvene <i>mntA</i>	76
§ 5. ZAKLJUČAK	89
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	91
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	92
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MEHANIZAM AKTIVACIJE PROTEINA MNTR IZ BAKTERIJE *HALALKALIBACTERIUM HALODURANS* ZA VEZANJE NA DNA

Martina Manenica

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Halalkalibacterium halodurans je industrijski važna alkalofilna bakterija koja, da bi preživjela, zahtijeva precizan i osjetljiv regulacijski mehanizam održavanja homeostaze iona mangana (Mn^{2+}). Ključni protein u regulacijskom mehanizmu bakterije *H. halodurans* je MntR - transkripcijski faktor koji selektivno veže ione Mn^{2+} i poslijedično DNA, regulirajući time gensku ekspresiju proteina uključenih u homeostazu Mn^{2+} . Simulacije molekulske dinamike u trajanju 400-1200 ns korištene su za proučavanje strukturnih i dinamičkih svojstava različitih formi proteina s obzirom na prisutnost Mn^{2+} iona u veznom mjestu. Kada MntR ima Mn^{2+} u veznom mjestu, dolazi do približavanja DNA-veznih domena te rigidnije konformacije proteina. Takav protein ostvaruje specifične i stabilne interakcije u simulacijama s DNA. MntR u slobodnoj formi zauzima širu i fleksibilniju strukturu, koja se na DNA veže nespecifičnim i kratkoživućim interakcijama. Time je slobodnom proteinu omogućeno lateralno kretanje duž DNA, do trenutka vezanja Mn^{2+} u vezna mesta i aktivacije proteina za specifično vezanje u velike utore DNA.

(96 + XXXV stranica, 56 slika, 12 tablica, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: bakterija *Halalkalibacterium halodurans*/ homeostaza/ operatorska sekvenca DNA/ regulator transporta mangana, MntR/ simulacije molekulske dinamike (MD)

Mentor: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Rad prihvaćen: 5. ožujka 2025.

Ocenitelji:

1. dr. sc. Ivan Kodrin, izv. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2. dr. sc. Aleksandra Maršavelski, izv. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
3. dr. sc. Antonija Tomić, zn. sur., Institut Ruđer Bošković, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ACTIVATION MECHANISM OF MNTR PROTEIN FROM THE BACTERIUM *HALALKALIBACTERIUM HALODURANS* FOR DNA BINDING

Martina Manenica

University of Zagreb, Faculty of Science, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Halalkalibacterium halodurans is an industrially important alkalophilic bacterium that, in order to survive, requires a precise and sensitive regulatory mechanism to maintain homeostasis of manganese ions (Mn^{2+}). The key protein in the regulatory mechanism of the bacterium *H. halodurans* is MntR - a transcription factor that selectively binds the Mn^{2+} ion and consequently DNA, thereby regulating gene expression of proteins involved in Mn^{2+} homeostasis. Molecular dynamics simulations lasting 400-1200 ns are used to study the structural and dynamic properties of different protein forms with regard to the presence of Mn^{2+} ions in the binding site. When MntR has Mn^{2+} in its binding site, the DNA-binding domains come closer, and the conformation of the protein becomes more rigid. Such a protein achieves specific and stable interactions in simulations with DNA. In its free form, MntR occupies a wider and more flexible structure, which binds to DNA through non-specific and short-lived interactions. This enables the free protein to move laterally along the DNA, until the binding of Mn^{2+} in the binding sites activates the protein for specific binding in the large grooves of DNA.

(96 + XXXV pages, 56 figures, 12 tables, 77 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: bacterium *Halalkalibacterium halodurans*/ DNA operator sequence in DNA/ homeostasis/ Manganese Transport Regulator, MntR/ Molecular dynamics (MD) simulations

Supervisor: Professor Branimir Bertoša, PhD

Thesis accepted: March 5th, 2025

Reviewers:

1. Assistant Professor Ivan Kodrin, PhD, Faculty of Science, University of Zagreb
2. Assistant Professor Aleksandra Maršavelski, PhD, Faculty of Science, University of Zagreb
3. Antonija Tomić, PhD, Research Associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

§ 1. UVOD

Prijelazni metali esencijalni su mikronutrijenti u živim organizmima na svim taksonomskim razinama. Od prokariotske stanice do eukariotske stanice kompleksnog višestaničnog organizma, svi sustavi zahtijevaju vrlo precizan i pouzdan mehanizam kontrole optimalne koncentracije - homeostaze - metalnih iona. Bilo da je riječ o suficitu ili deficitu metalnih iona, može doći do letalnih posljedica za organizam.^{1,2} Metalni ioni mogu imati razne uloge u stanici, kao kofaktori u metaboličkim procesima, faktori prilikom smatanja proteina, stabilizatori tercijarne strukture proteina i sl.³

Da bi održavale homeostazu metalnih iona, bakterije imaju vrlo složenu mrežu opskrbe, pohrane i ekstrakcije metalnih iona iz stanica. Glavni akteri u tim biološkim mehanizmima su metalosenzorni proteini, također poznati i kao metaloregulatori ili metaloregulatorni transkripcionalni faktori. Upravo zadnji pojam ističe glavni mehanizam djelovanja, a taj je da u ovisnosti o selektivno vezanom metalnom ionu u vezno mjesto metalosenzornog proteina, dolazi do vezanja ili odvajanja tog metaloregulatora s DNA, čime se regulira transkripcija specifičnog gena. Ti geni kodiraju proteine koji poslijedično utječu na unos, skladištenje ili izlučivanje specifičnog metalnog iona iz stanice. Sami metalosenzorni proteini su najčešće alosterički regulirani, što znači da se njihova struktura i afinitet vezanja na DNA mijenja u ovisnosti o tome imaju li vezan odgovarajući metalni ion u vezno mjesto, najčešće upravo onaj čiju koncentraciju reguliraju.^{3,4} Većini bakterija esencijalni metalni ion za metaboličke je procese željezo (Fe^{2+}), a jedan od metalnih iona koji se također pojavljuje kao osnovni metabolički mikronutrijent je manganov (II) ion (Mn^{2+}). Primjerice, bakterije poput *Bacillus subtilis*, *Bacillus japonicum* i *Halalkalibacterium halodurans* za pravilno funkciranje trebaju stroge kontrolne mehanizme koncentracije Fe^{2+} i Mn^{2+} unutar stanice. Kod ovih bakterija, Mn^{2+} igra ključnu ulogu u sporulaciji.^{5,6}

Za *Halalkalibacterium halodurans*, bakteriju koja pronalazi industrijsku primjenu zbog otpornosti na visoki pH okruženja u kojem živi, dugo je postojalo uvjerenje da pripada rodu *Bacillus* zbog morfoloških sličnosti, no nedavno je došlo do taksonomske promjene.^{7,8} Genom dviju bakterija je sličan po veličini, no geni su locirani na različitim mjestima. Tako je za regulator transporta manganovih iona MntR iz bakterije *B. subtilis* poznato na koje se operatorske sekvene u DNA veže,⁹ no za *H. halodurans* još nisu literaturno zabilježena vezna

mjesta. Ipak, neki biokemijski mehanizmi ovih bakterija i njima pripadni proteini su slični. MntR iz *B. subtilis* i iz *H. halodurans* imaju 78 % strukturne sličnosti na razini primarne strukture, odnosno sekvence proteina. Evolucijski su ostale sačuvane upravo aminokiseline koje prilikom smatanja proteina dolaze u odgovarajući položaj da mogu vezati Mn²⁺. Iako su građeni od dvije homologne monomerne jedinice, za ovakve proteine pokazano je da su u stanici uvijek dimeri, neovisno o tome imaju li vezan Mn²⁺.¹⁰ Značajna razlika je u fleksibilnosti i položaju DNA-veznih domena koje su u slobodnoj, apo-formi proteina bez vezanog iona mangana vrlo fleksibilne i često izmjenjuju konformaciju. Prilikom vezanja metalnih iona u vezno mjesto dolazi do pomicanja ravnoteže prema rigidnijoj konformaciji koja je adekvatnija za vezanje na DNA.¹¹ Oba proteina su homodimeri u kojima svaki monomer ima dimerizacijsku domenu i DNA-veznu domenu. MntR iz bakterije *H. halodurans* kristaliziran je u apo- (bez vezanih Mn²⁺, apoprotein) i holo-formi (s vezana dvaиона Mn²⁺ u jednoj podjedinici, te jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici, holoprotein).¹⁰ Unatoč poznatim strukturama, još uvijek nije objašnjeno koja strukturalna razlika dovodi do različitog afiniteta prema DNA, osobito uzimajući u obzir visoku međusobnu sličnost struktura i nejasnu diferencijaciju u morfologiji. Također, do sada nije poznat mehanizam stabilizacije apoproteina, kao ni alosterički mehanizam promjene unutar holoproteina koji se događa kao posljedica vezanja metalnih iona Mn²⁺.

1.1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je istražiti molekulski mehanizam koji započinje vezanjem iona mangana i dovodi do povećanja afiniteta manganovog transkripcijskog faktora MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* za vezanje na DNA. Navedeni cilj nastojao se ostvariti prvenstveno simulacijama molekulske dinamike proteina s ionima Mn²⁺ i bez njih u veznom mjestu. Razumijevanje molekulskog mehanizma omogućilo je uvid u alosteričke promjene do kojih dolazi uslijed vezanja metalnih iona Mn²⁺, čime se na molekulskoj razini mijenja struktura proteina i afinitet vezanja na DNA. Također, istražena je interakcija proteina s i bez vezanih iona Mn²⁺ s operatorskom sekvencom na DNA, kako bi se utvrdili molekulski mehanizmi koji pridonose afinitetu i specifičnosti vezanja MntR na pripadnu operatorsku sekvencu DNA.

1.1.2. Metode i opseg rada

Kako bi se detaljno proučile razlike i specifičnosti molekulske strukture proteina MntR uslijed vezanja iona Mn²⁺ u vezno mjesto, primjenjene su računalne metode simulacija molekulske dinamike (MD simulacije) u trajanju od 400 do 1200 ns. Upravo takav pristup omogućio je uvid u dinamičke i strukturne specifičnosti proteinskih struktura na atomskoj razini, čime se može objasniti detaljan alosterički mehanizam promjene uslijed vezanja iona Mn²⁺, koji dovodi do promjene u afinitetu MntR za vezanje na odgovarajuću operatorsku sekvencu u DNA.

U prvoj fazi istraživanja utvrđena je optimalna parametrizacija Mn²⁺ u veznim mjestima proteina MntR usporednom veznih i neveznih parametara. Kako bi se utvrdile razlike i specifičnosti struktura aktivnog proteina s vezanim ionima Mn²⁺ (holoproteina), i proteina bez prisutnih iona Mn²⁺ (apoproteina), u drugoj fazi provedene su dodatne MD simulacije. Time su pronađene ključne nekovalentne interakcije između određenih bočnih ograna koje karakteriziraju strukturu apo- i holoproteina. U trećoj fazi mutirani su ključni bočni ogranci kako bi se dodatno potvrdilo da upravo te interakcije karakteriziraju alosteričke promjene do kojih dolazi u samom proteinu uslijed vezanja iona Mn²⁺. U sljedećoj fazi bilo je potrebno dokazati da je holoprotein zaista u optimalnoj konformaciji za vezanje na DNA. Nakon utvrđivanja operatorske sekvene nukleotida na koje se MntR veže u genomu *H. halodurans*, izgrađen je 3D model DNA. Molekulskim uklapanjem (engl. *molecular docking*) dobiveni su najvjerojatniji kompleksi proteina i DNA te su u petoj fazi provedene MD simulacije dobivenih kompleksa. Za kraj su detaljnom analizom intermolekulske interakcije u kompleksima MntR-DNA određene ključne nekovalentne interakcije koje omogućavaju apoproteinu dinamičko lateralno kretanje po DNA, a holoproteinu stabilno i specifično vezanje na DNA uočeno u MD simulacijama.

1.1.3. Hipoteza istraživanja

Usljed vezanja Mn²⁺ iona u vezno mjesto proteina MntR, dolazi do konformacijske promjene proteina. Konformacijska promjena se prvenstveno odražava na položaj DNA-veznih domena te na položaj aminokiselinskih bočnih ograna i učestalost nekovalentnih interakcija između ključnih aminokiselina. Vezanjem Mn²⁺ iona, protein MntR poprima formu koja ima veći afinitet i specifičnost za vezanje na pripadnu operatorsku sekvencu DNA.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Bakterija *Halalkalibacterium halodurans*

Bakterija *Halalkalibacterium halodurans*, ranije u literaturi poznata kao *Bacillus halodurans* je štapićasta, aerobna, Gram-pozitivna bakterija koja može stvarati spore i mobilna je zahvaljujući bičevima prisutnim na vanjskoj površini bakterije.^{12–14} Morfološki je vrlo slična bakteriji *Bacillus subtilis*, ali je na osnovu genetičkih istraživanja odvojena u posebnu taksonomsku jedinicu. Prvi put izolirana iz tla, ova bakterija osobito je zanimljiva jer se može adaptirati na vrlo visok pH. Njezin optimalni pH u okolišu u kojem raste je između 9 i 10, na temperaturi 30–40 °C i pri udjelu NaCl od 2 %. Upravo činjenica da bakterija preferira visoki pH, te podnosi udio soli NaCl i do 12 %,¹⁵ što ju čini alkalofilnom i halofilnom, nametnula je samu bakteriju kao zanimljiv model za proučavanje ekstremofila.¹⁶

Istraživanja na *H. halodurans* mogu imati direktnu primjenu u biotehnologiji. Još ranije je utvrđeno da bakterija kasnije prepoznata kao *H. halodurans* spontano i inducibilno proizvodi β-galaktozidazu te da je indukcija brža pri pH 10,2 nego pri 7,2.¹⁴ Također, *H. halodurans* proizvodi haloduracin, lantibiotik s antimikrobnom aktivnošću, koji može pronaći primjenu u farmaceutskoj, kao i u prehrambenoj industriji za očuvanje kvalitete hrane. Njezini enzimi, ksilanaza A i N, pektinaza, amilaza i proteaza, također pronalaze industrijsku primjenu upravo zbog toga što većina njih može izdržati visoku temperaturu i pH. Termostabilne i alkalne ksilanaze pronalaze primjenu u papirnoj industriji, prehrambenoj industriji, proizvodnji biogoriva, tekstilnoj industriji itd.¹⁷

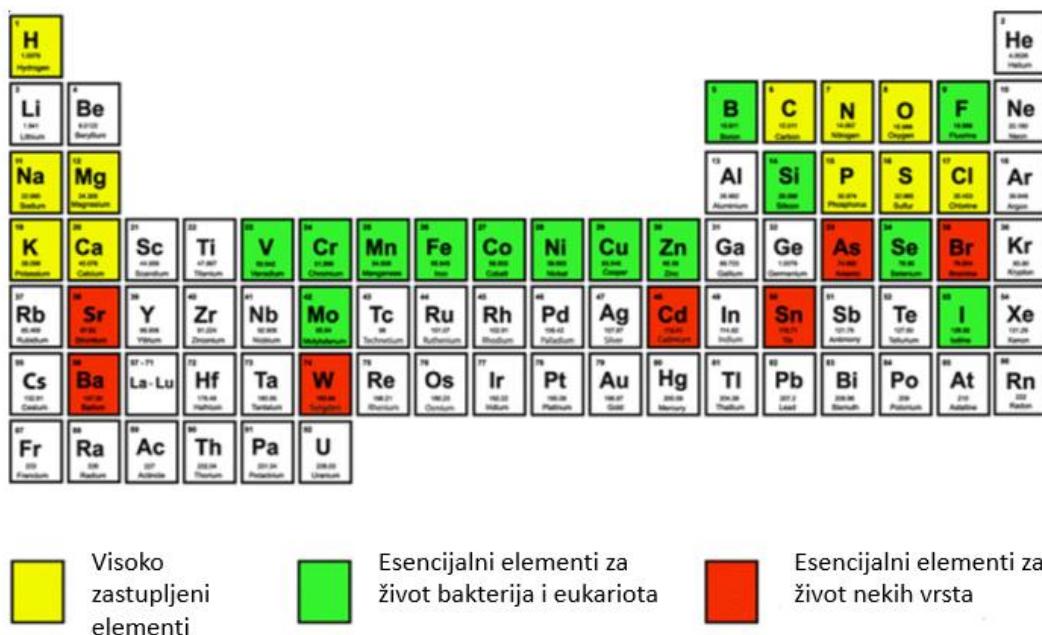
Interes industrije potaknuo je daljnja istraživanja genoma *H. halodurans*. Genom sadrži 4,25 Mb s 4066 anotiranih gena koji kodiraju proteine. Genom je uspoređen s genomom bakterije *B. subtilis* koja je smatrana srodnom vrstom u tom periodu. Iako su sastav GC baza i veličina genoma skoro identični između vrsta, većina proučavanih gena razmještena je na potpuno različitim lokacijama.⁷ Time je još jednom potvrđeno da, iako morfološki srodne, bakterije *B. subtilis* i *H. halodurans* pripadaju različitim rodovima.

2.2. Regulacija esencijalnih prijelaznih iona metala u bakterijama

2.2.1. Esencijalni ioni metala u živim organizmima i homeostaza

Metalni ioni sudjeluju u brojnim biološkim procesima, poput enzimskih reakcija, strukturne potpore, metaboličkih procesa, stanične signalizacije i sl. Iako se metali prijelazne skupine trivijalno nazivaju *teškima*, što sugerira njihovu štetnost za žive organizme, brojni od njih omogućuju život na zemlji kakav poznajemo (slika 2.1). Primjerice, željezovi ioni ključni su za prijenos kisika putem hemoglobina, cinkov ion je esencijalan za više od 300 enzima, a bakrovi ioni sudjeluju u energetskim procesima i ključni su za metabolizam željezovih iona.^{18,19}

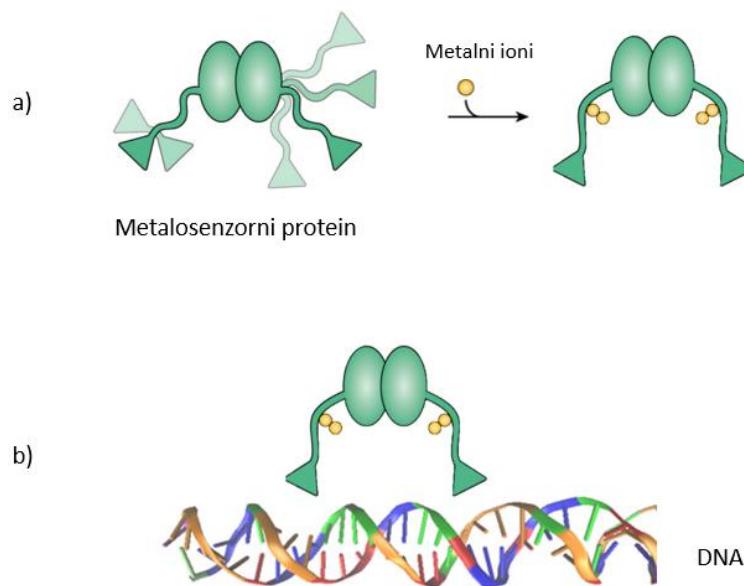
Upravo održavanje optimalne koncentracije određenih iona metala u stanicama živih organizama zahtijeva vrlo precizne mehanizme regulacije. I višak i manjak određenih iona mogu dovesti do opasnih uvjeta za živu stanicu, pa čak i smrti, stoga živi organizmi preferiraju stabilne uvjete homeostaze. Homeostaza je riječ grčkog podrijetla; *homeo* dolazi od grčke riječi za slično (grč. ὁμοιος, *homoios*), a *staza* sugerira stabilnost (grč. στάσις, *stasis*). U principu, homeostaza označava niz procesa kojima živi organizmi osiguravaju stabilne uvjete u svojim stanicama, kao i međustaničnom prostoru u slučaju višestaničnih organizama. To postižu tako što imaju različite uvjete prilagodbe i mogućnost odgovora na promjene u vanjskom okruženju.²⁰



Slika 2.1. Zastupljenost kemijskih elemenata u živim organizmima. Preuzeto i obrađeno prema ref. ²¹

2.2.2. Održavanje homeostaze u bakterijskim stanicama

Iako naizgled jednostavni, prokariotski organizmi i bakterije imaju vrlo kompleksne mehanizme održavanja optimalne koncentracije iona metala u svojoj stanici. Višak metalnih iona može dovesti do kataliziranja neželjenih reakcija, nepravilnog smatanja proteina te aktivacije metaloproteina vezanjem sličnog iona, što može rezultirati inaktivacijom nekih procesa ili nepoželjnim alosteričkim efektima. Također, bakterija se može naći u okolišu koji je u deficitu s njoj esencijalnim metalnim ionima, što zahtjeva i pravilno skladištenje metalnih iona unutar stanice kako bi stanica imala dovoljno iona za nužne procese. Time je jasno da je precizna regulacija ključna, a ona se najčešće odvija putem vrlo osjetljivih i specifičnih metalosenzornih proteina ili metaloregulatora. Vezanjem karakterističnog metalnog iona na metalosenzorni protein dolazi do alosteričke promjene i aktivacije metaloproteina. Aktivirani metaloprotein često ima ulogu transkripcijskog faktora te regulira transkripciju gena za proteine koji će odgovoriti na višak ili manjak iona u stanici. Jedan od mogućih odgovora je vezanje aktiviranog metaloproteina na odgovarajuću sekvencu u DNA (slika 2.2), što može dovesti do represije ili aktivacije transkripcije gena koji kodiraju potrebne proteine.²⁻⁴

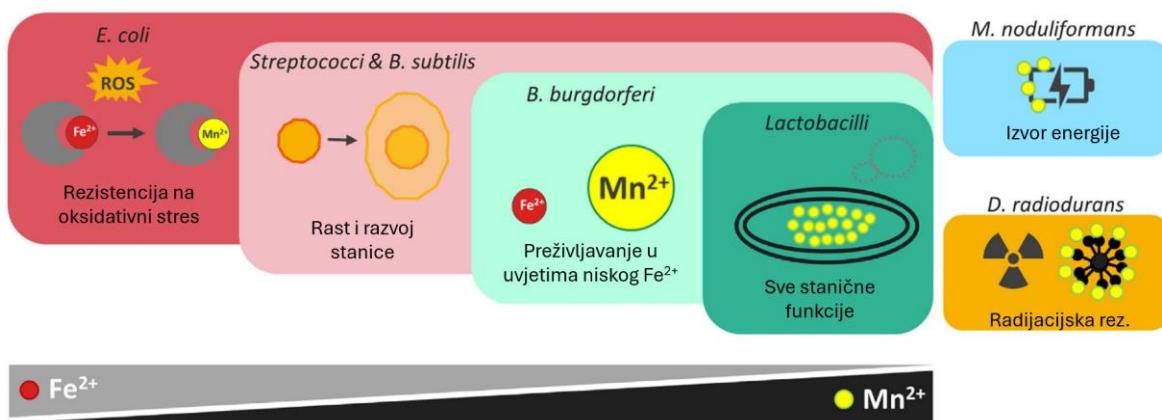


Slika 2.2. a) Vezanje metalnih iona na metalosenzorni protein. b) Vezanje aktiviranog metalosenzornog proteina na DNA. Preuzeto i obrađeno prema ref.⁵

2.3. Regulacija koncentracije iona mangana u bakterijskim stanicama putem proteina MntR

2.3.1. Uloga i regulacija iona mangana u bakterijskim stanicama

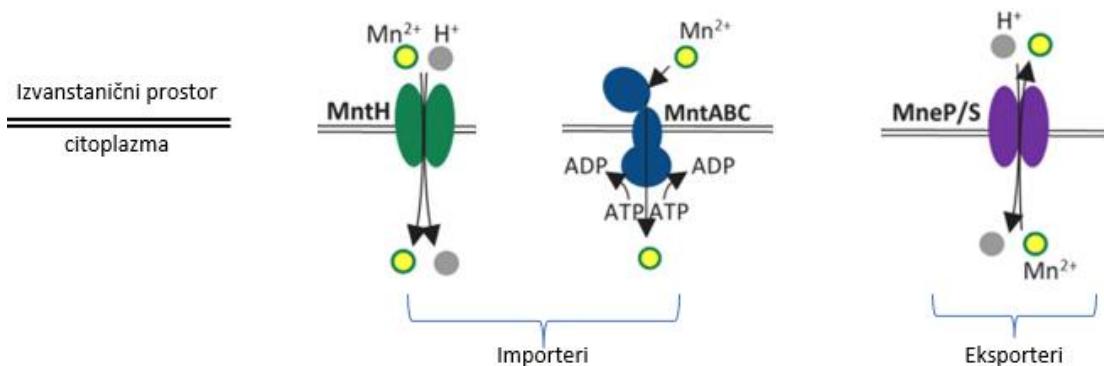
Manganov ion je jedan od esencijalnih prijelaznih iona metala u bakterijskim stanicama. Većinom je prisutan kao dvovalentni kation Mn^{2+} . Baš kao i drugi ioni prijelaznih metala, ima različite uloge: kofaktor je brojnim enzimima, sudjeluje u signalizaciji, asocira s brojnim biomakromolekulama i sl. Iako se metabolizam većine bakterija zasniva na homeostazi iona željeza (Fe^{2+}/Fe^{3+}), Mn^{2+} im je ključan u odgovoru na oksidacijski stres (slika 2.3). Primjer takve bakterije je *Escherichia coli*.^{22,23} Pojedine bakterije pokazuju veću zavisnost o Mn^{2+} , primjerice *Bacillus subtilis*. Kod ove bakterije je zanimljivo da većina metabolizma ovisi o Fe^{2+}/Fe^{3+} , no za pravilan rast i sporulaciju potreban je i Mn^{2+} .^{6,24} S obzirom na morfološku sličnost, isto vrijedi i za bakteriju *H. halodurans*. Nadalje, bakterije iz rođova *Lactiplantibacillus* i *Lacticaseibacillus*, ranije poznatih kao jedan rod *Lactobacillus*, trebaju Mn^{2+} za sve vitalne stanične funkcije. Međutim, višak Mn^{2+} u stanicama može dovesti do značajnih funkcionalnih smetnji, poput krivo smotanih ili lažno aktiviranih metalosenzornih proteina, stoga su potrebni vrlo precizni mehanizmi regulacije.⁵



Slika 2.3. Različite uloge Mn^{2+} u bakterijama. Prikazana je metabolička ovisnost o manganovom (II) ionu, Mn^{2+} , u odnosu na željezov (II) ion, Fe^{2+} . Preuzeto i obrađeno prema ref.⁵

Regulacija iona Mn^{2+} u bakterijskim stanicama odvija se putem kontrole brojnih proteinskih pumpi koje imaju ulogu importera i eksportera specifičnih za Mn^{2+} . Za prepoznavanje količine iona Mn^{2+} u stanicama ključni su metalosenzorni proteini osjetljivi na Mn^{2+} , koji uslijed vezanja iona Mn^{2+} djeluju kao transkripcijски faktori u transkripciji gena za importere i eksportere. Dodatno, neke bakterijske vrste imaju i ribosomske sklopke osjetljive na Mn^{2+} . Načelno su

poznata dva tipa importera iona mangana u bakterijskim stanicama: MntH iz obitelji NRAMP transporter (engl. *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*), te MntABC importer iz obitelji ATP-veznih kazeta (engl. *ATP-Binding Cassette*, ABC).²⁴⁻²⁶ MntH je simporter protona H⁺ i iona Mn²⁺, a MntABC unosi Mn²⁺ u stanicu uz utrošak ATP-a (slika 2.4). Primjeri eksportera pronađenih u *B. subtilis* su MneP i MneS pumpe koje su antiporteri protona H⁺ i iona Mn²⁺.²⁷



Slika 2.4. MntH (zeleno) i MntABC (plavo) importeri iona mangana. MneP/MneS eksporterionia mangana (ljubičasto). Preuzeto i obrađeno prema ref.⁵

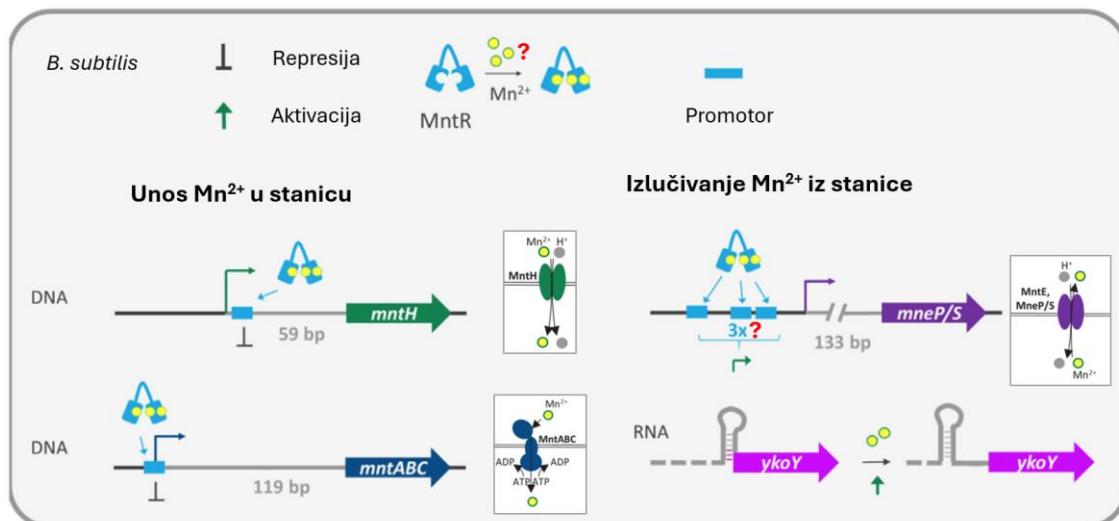
2.3.2. Regulator transporta mangana MntR

Glavni metalosenzorni protein osjetljiv na ione mangana u *B. subtilis* i *H. halodurans* je regulator transporta manganovih iona MntR (engl. *Manganese Transport Regulator*). MntR iz *B. subtilis* i MntR iz *H. halodurans*, u dalnjem tekstu *BsMntR* i *HhMntR*, dijele 78 % sličnosti u primarnoj sekvenci.¹⁰ Oba proteina su homodimeri. Aktiviraju se vezanjem iona Mn²⁺ u vezno mjesto. Svaka podjedinica ima dva vezna mjesta za Mn²⁺, pa je to ukupno četiri iona Mn²⁺ koja se trebaju vezati na protein da bi se aktivirao i obnašao ulogu transkripcijskog faktora.^{9,28,29}

U uvjetima blago povišene koncentracije Mn²⁺ u stanicu (~ 10 μM), Mn²⁺ se veže na vezno mjesto MntR proteina i MntR je aktiviran time za vezanje na DNA (slika 2.5). Za *B. subtilis* je pokazano da će se tada vezati na operatorsku sekvencu na dvostrukoj zavojnici DNA koja odgovara *mntA* ili *mntH* operatoru. Nizvodno od tih operatorka nalaze se geni za kodiranje MntABC i MntH pumpe.²⁴ Budući da MntR sjeda na mjesto koje se preklapa sa σ^A-ovisnim promotorom kojeg prepozna RNA polimeraza, RNA polimeraza se ne može vezati i time je transkripcija gena spriječena te se sprječava dodatni unos Mn²⁺ u stanicu.²⁵

Kada koncentracija Mn²⁺ dodatno poraste, MntR će se vezati na promotore *mneP* i *mneS*, nakon kojih nizvodno slijede geni za sintezu MneP i MneS pumpi koje su eksporter suviška

Mn^{2+} . Vezanjem MntR dolazi do aktivacije transkripcije tih gena i na membranu se ugrađuju novosintetizirane pumpe za izbacivanje suviška Mn^{2+} iz bakterijske stanice.²⁷ Dosada se pretpostavljalo da je za aktivaciju transkripcije eksportera potrebno više aktivnih MntR proteina, no broj nije bio točno određen, što je istaknuto crvenim upitnikom na slici 2.5. Nedavna istraživanja pokazuju da je za aktivaciju transkripcije *mneP* gena potrebno vezanje četiri aktivna MntR proteina na regulatornu regiju *mneP* promotora, a rezultati su dobiveni na osnovu krio-EM metode.³⁰ Također, jedna od nejasnoća koja se često pojavljuje u literaturi odnosi se na broj iona Mn^{2+} koji su potrebni za aktivaciju proteina. Iako bi se na osnovu svih poznatih literurnih podataka o *BsMntR*^{9,11,31,32} dalo zaključiti da je sigurno riječ o četiri ionu, dva u svakom vezom mjestu, slika 2.5 prikazuje tri iona. Razlog ovog nesuglasja vjerojatno se krije u nedavno dobivenoj kristalnoj strukturi *HhMntR*.¹⁰



Slika 2.5. Regulacija transporta iona mangana u bakterijskoj stanici *B. subtilis*. Preuzeto i obrađeno prema ref.⁵

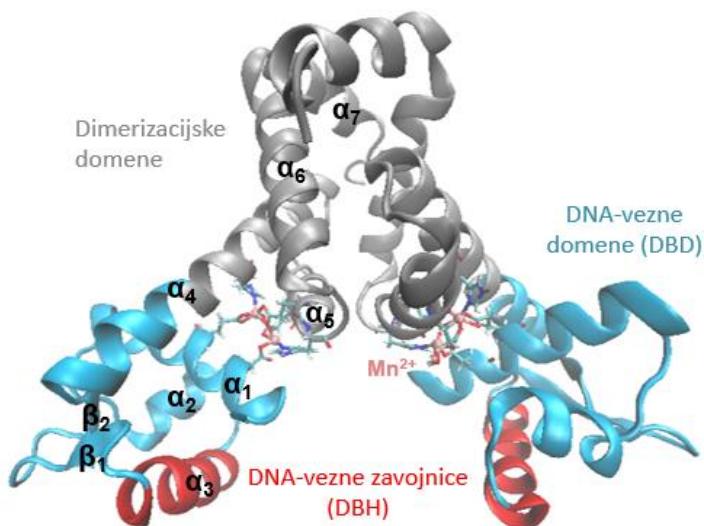
Dodatno, u literaturi dosada nisu bila poznata mjesta na koja se MntR veže u genomu bakterije *H. halodurans*. Nakon anotacije gena bioinformatičkom pretragom za podjedinice proteina mntABC koje čine geni *mntA*, *mntB* i *mntC*, najvjerojatnija mjesta vezanja određena su upravo usporedbom s genomom *B. subtilis*.³³

2.3.3. Struktura proteina *HhMntR*

Protein MntR iz bakterije *H. halodurans* pripada obitelji DtxR/IdeR proteina čija je uloga održavanje homeostaze metalnih iona. MntR selektivno i specifično reagira na koncentraciju radijusom većih iona kao što su manganovi (II) ili kadmijevi (II) ioni. Vezanjem iona u vezno

mjesto, protein mijenja konformaciju i prelazi u aktivan oblik koji je prikladan za vezanje na DNA.

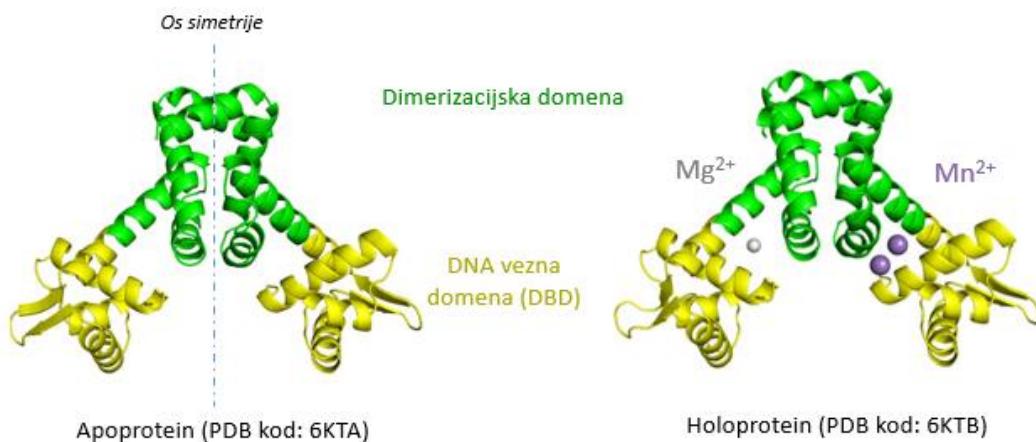
Proteini iz obitelji DtxR/IdeR su u funkcionalnom obliku homodimeri, a svaki monomer građen je od tri domene: N-terminalne DNA-vezne domene, dimerizacijske domene i C-terminalne SH3-slične domene. Svaki monomer sadrži dva vezna mesta za ione metala. Primarno vezno mjesto smješteno je između DNA vezujuće i dimerizacijske domene, dok je sekundarno vezno mjesto smješteno između dimerizacijske i SH3-slične domene. Protein MntR iz bakterije *H. halodurans* također funkcioniра kao homodimer, ali za razliku od proteina DtxR/IdeR ne sadrži SH3 sličnu domenu na C-kraju niti sekundarno vezno mjesto za ione Mn^{2+} . Svaki monomer sadrži 139 aminokiselina i dva vezna mesta za ione Mn^{2+} te je građen od sedam α -zavojnica i dvije β -ploče povezane neuređenom petljom (slika 2.6). Na sučelju DNA-vezne domene (bočni ogranci 1-71) i dimerizacijske domene (bočni ogranci 72-139) nalazi se vezno mjesto za ione mangana.¹⁰



Slika 2.6. Struktura proteina MntR iz *H. halodurans* s ionima Mn^{2+} koji su prikazani kao svijetlo ružičaste kuglice vezane na aminokiselinske bočne grange (štapići). Struktura je prikazana pomoću programa VMD.³⁴

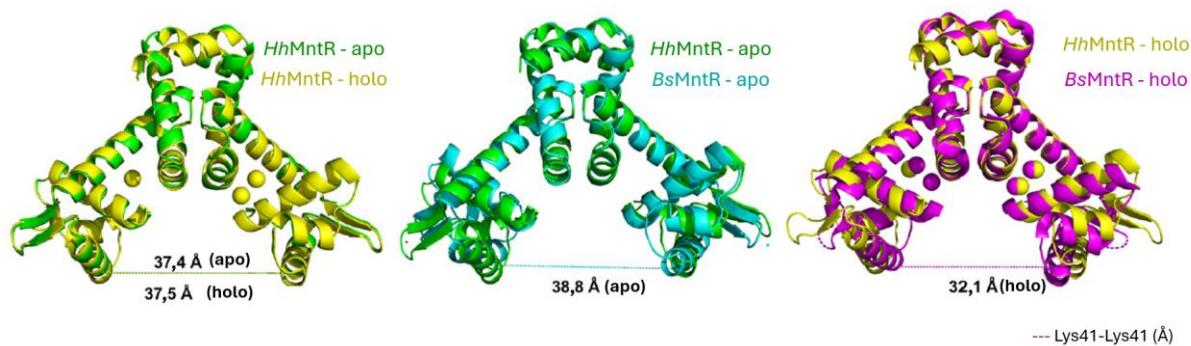
Iako je riječ o simetričnom homodimeru koji bi prema svim saznanjima trebao vezati dva iona Mn^{2+} u oba vezna mesta za potpunu aktivnost, kristalna struktura dobivena 2019. godine dovodi tu hipotezu u pitanje. Naime, forma proteina kristalizirana s ionima metala u jednoj podjedinici ima dva iona Mn^{2+} (holoprotein), dok se u drugoj podjedinici nalazi samo jedan značajno manji ion magnezija, Mg^{2+} (slika 2.7).¹⁰ Također, nema jasne diferencijacije između

strukture proteina koji nema prisutne ione metala (apoproteina) i strukture proteina s vezanim ionima metala (holoproteina).



Slika 2.7. Struktura proteina MntR iz *H. halodurans* bez iona metala (apoprotein, lijevo) i s ionima Mn²⁺ i Mg²⁺ (holoprotein, desno). Preuzeto i obrađeno prema ref.¹⁰

Za razliku od apo- i holoproteina iz *H. halodurans* koji pokazuju iznenađujuću sličnost u strukturi, srođni MntR iz *B. subtilis* pokazuju dvije konformacije ovisno o tome ima li ili nema vezane ione Mn²⁺ u vezna mjesta. Kada se izmjeri udaljenost između C_α atoma dva bočna ogranka lizina u DNA-veznoj domeni, rednog broja 41, *BsMntR* pokazuje značajno sužavanje prilikom vezanja Mn²⁺: udaljenost Lys41-Lys41 se s 38,8 Å smanji na 32,1 Å (slika 2.8). Sužavanje je očekivano ako se uzme u obzir da je krajnji cilj vezanje DNA-veznih zavojnica u velike utore DNA koji su udaljeni 34 Å.^{35,36} S druge strane, udaljenost Lys41-Lys41, koja u apoproteinu *HhMntR* iznosi 37,4 Å, u holoproteinu *HhMntR* je gotovo nepromijenjena: 37,5 Å. Stoga je teško razlučiti koja konformacijska razlika uvjetuje aktivaciju i vezanje *HhMntR* na DNA.

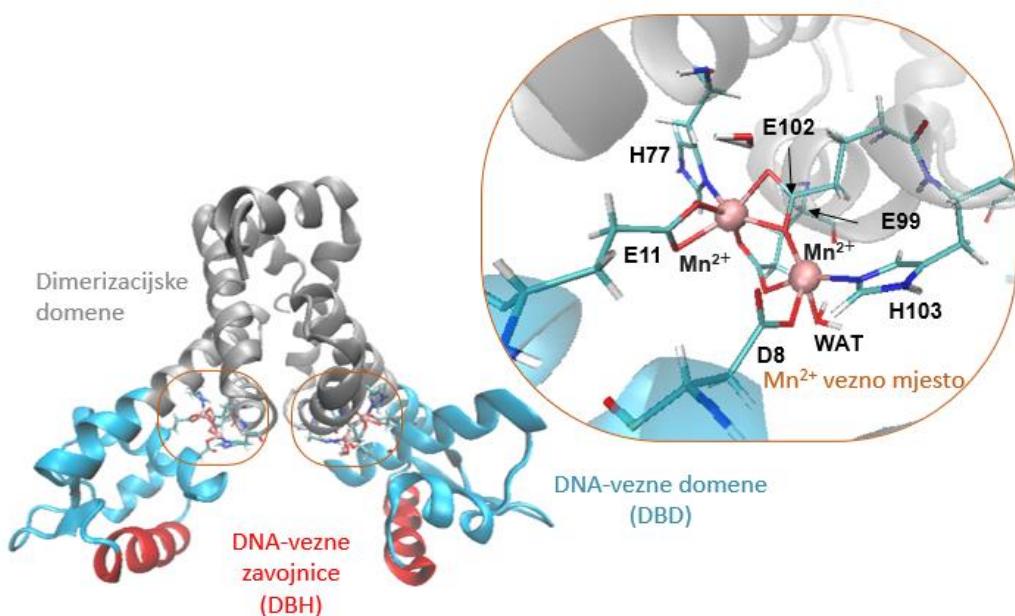


Slika 2.8. Protein MntR iz *H. halodurans* u apo-formi (zeleno) i holo-formi (žuto). Protein MntR iz *B. subtilis* u apo-formi (plavo) i holo-formi (ružičasto). Prikazana je udaljenost između C_α atoma dva lizina-41 u DNA-veznim domenama (Lys41-Lys41). Preuzeto i obrađeno prema ref.¹⁰

Također, kada se uzme u obzir da prema ovoj kristalnoj strukturi holoprotein *HhMntR* sadrži ukupno tri iona metala, dva iona Mn^{2+} i jedan ion Mg^{2+} , jasno je odakle potječe pretpostavka prikazana u ranije navedenom mehanizmu aktivacije na slici 2.5. Uzimajući u obzir sva znanja o MntR proteinima, nameće se potreba za dodatnim istraživanjima po pitanju točnog broja iona koje *HhMntR* veže te konformacijske promjene do koje potencijalno dolazi uslijed vezanja.

2.3.4. Vezno mjesto za ione mangana u proteinu *HhMntR*

Binuklearno vezno mjesto za ione Mn^{2+} nalazi se na sučelju DNA-vezne domene i dimerizacijske domene proteina *HhMntR*. Prvi Mn^{2+} ostvaruje sedam, a drugi pet koordinacijskih veza s ukupno šest aminokiselina: Asp8 i Glu11 koje pripadaju α_1 zavojnici iz DNA-vezne domene, His77 koji se nalazi na α_4 zavojnici koja spaja dvije domene te Glu99, Glu102 i His103 koji pripadaju α_5 zavojnici dimerizacijske domene^{28,32} (slika 2.9). Tri aminokiseline (His77, Glu102 i His103) evolucijski su očuvane unutar obitelji proteina IdeR/MntR, dvije aminokiseline (Asp8 i Glu99) konzervirane su unutar obitelji proteina MntR, dok se aminokiselina Glu11 specifično nalazi u proteinu MntR iz bakterija *H. Halodurans*, *B. subtilis* i *E. coli*.¹⁰



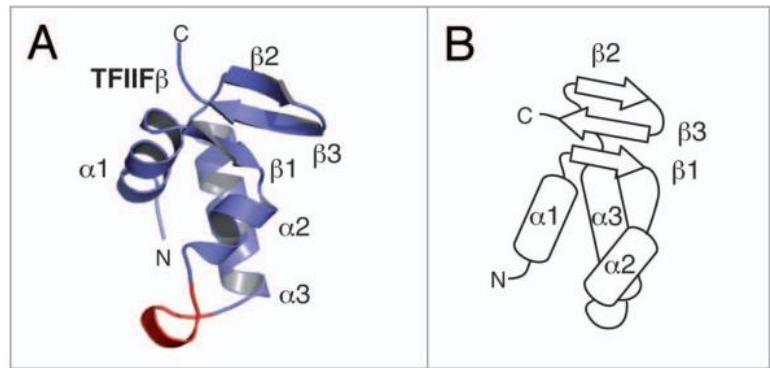
Slika 2.9. Struktura proteina MntR iz *H. halodurans* obrađena prema ref.^{10,11,32} s vezanim ionima Mn^{2+} u veznom mjestu. Detaljna koordinacija binuklearnog veznog mjestu prikazana je u narančastom okviru. Struktura je prikazana pomoću programa *VMD*.³⁴

Literaturno je poznato da, ovisno o tome koje aminokiseline koordiniraju drugi Mn²⁺ u binuklearnom centru te o udaljenosti između dva Mn²⁺, *BsMntR* može zauzeti AB ili AC konformaciju. U konformaciji AB drugi manganov (II) ion koordiniran je aminokiselinama Asp8, Glu11, Glu102 i His103, a udaljenost između manganovih (II) iona iznosi 3,3 Å.²⁸ Kod AC konformacije drugi manganov (II) ion koordiniran je aminokiselinama Asp8, Glu99, Glu102 i His103, a udaljenost iona iznosi 4,4 Å.³² Protein *HhMntR* zauzima AC konformaciju s udaljenosti između manganovih (II) iona od 4,5 Å.¹⁰ Novija istraživanja pokazuju da je AC konformer u *BsMntR* biološki relevantniji jer se AB konformacija mogla dobiti samo u monoklinskoj kristalnoj formi na 100 K, a svi kristali dobiveni na sobnoj temperaturi, pri neutralnom pH (6,5-8,5) i u heksagonskoj formi odgovarali su AC konformeru.³² Dodatna potvrda svakako su računalna istraživanja proteina *BsMntR* koja su pokazala da je Mn²⁺ u prvom veznom mjestu koordiniran sa Glu11, His77, Glu99 i Glu102, a drugi Mn²⁺ s Asp8, Glu99, Glu102, His103 i molekulom vode.¹¹

Kada su ioni Mn²⁺ prisutni u veznom mjestu, struktura cijelog proteina MntR se mijenja, što omogućuje postizanje aktivne konformacije optimalne za vezanje na DNA. Ta promjena najviše se očituje u položaju i međusobnoj udaljenosti DNA-veznih domena. Sam mehanizam alosteričke promjene nije sasvim razjašnjen. Posljednja istraživanja za *BsMntR* pokazuju da nije riječ o dvije diskretne strukture, već da prilikom vezanja iona Mn²⁺ u vrlo fleksibilnu strukturu apoproteina dolazi do smanjenja dinamike i pomicanja ravnoteže prema rigidnijoj formi proteina koja je podobnija za vezanje na DNA.¹¹ Za *HhMntR* mehanizam aktivacije nije literaturno poznat, dapače, visoka sličnost između apo- i holoproteina dovodi u pitanje hipoteze postavljene prema strukturno vrlo sličnom *BsMntR*.

2.3.5. DNA-vezna domena proteina *HhMntR*

Ključna domena za funkciju proteina *HhMntR* je N-terminalna DNA-vezna domena koju čini motiv zavojnica-petlja-zavojnica s krilom (engl. *winged Helix-Turn-Helix motif* ili *wHTH*). Tipično, ovaj motiv se sastoji od tri α-zavojnice i tri β-ploče koje se slažu u nizu N-kraj-α₁-β₁-α₂-α₃, nakon čega slijedi krilo, građeno od dvije β-ploče povezane petljom (slika 2.10). Za HTH motive s krilom se smatra da ostvaruju čvršće i specifičnije interakcije s DNA jer upravo krilo može ostvariti dodatne interakcije i tako poduprijeti α₃ zavojnicu koja ulazi u direktnu interakciju s DNA.^{35,37}



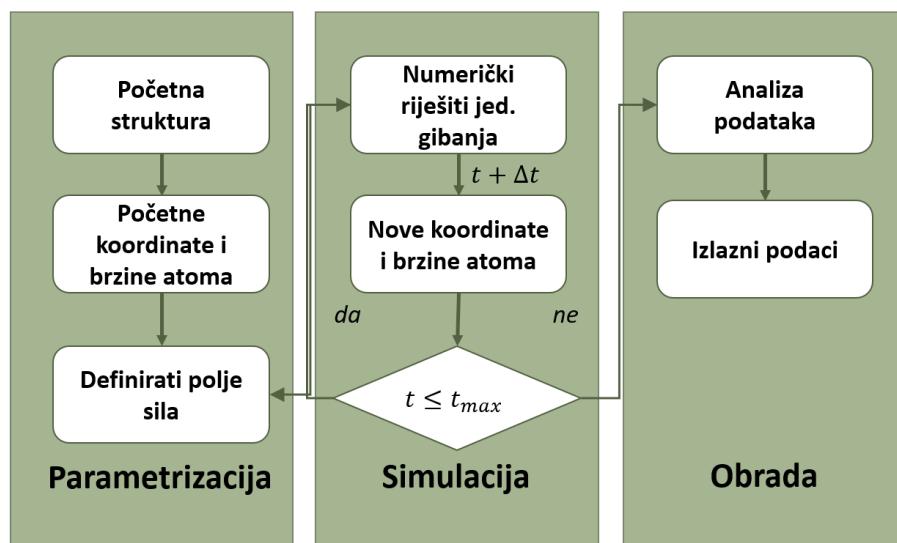
Slika 2.10. Prikaz motiva zavojnica-petlja-zavojnica s krilom (engl. *winged Helix-Turn-Helix motif* ili *wHTH*). Preuzeto i obradeno prema ref.³⁷

DNA-vezna α_3 zavojnica ulazi u veliki utor DNA. U proteinu *HhMntR* na tom dijelu nalaze se pozitivno nabijene aminokiseline, Lys41, Lys45 i Lys48 za koje se pretpostavlja da ostvaruju direktnu interakciju s negativno nabijenom DNA.¹⁰

2.4. Simulacije molekulske dinamike (MD) za biomakromolekule

2.4.1. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD) je računalna metoda kojom se opisuje gibanje molekula i atoma unutar zadanoj sustava. Riječ je o *in silico* metodi koja omogućava uvid u mikroskopska svojstva sustava. Sama provedba može se podijeliti u tri faze: pripremu sustava za simulaciju (parametrizaciju), simulaciju i obradu podataka (slika 2.11). Parametrizaciji prethodi izgradnja početne 3D strukture sustava na temelju strukture određene difrakcijom rendgenskih zraka ili NMR-om, odnosno modela generiranog računalnim metodama (primjerice programom AlphaFold³⁸). Početne koordinate atoma sustava mogu biti preuzete iz baza podataka kao što je PDB (engl. *Protein Data Bank*).³⁹ Početne brzine zadaju se najčešće prema Maxwell-Boltzmanovoj raspodjeli uz pretpostavku da je sustav u termodinamičkoj ravnoteži. Potom je potrebno definirati polje sila, koje se odnosi na funkciju i skup parametara koji se koriste za izračun potencijalne energije sustava. Time se dobivaju jednadžbe gibanja koje se rješavaju numerički. Njihova rješenja su koordinate i brzine atoma u sljedećem vremenskom intervalu. Na takav način dobiva se trajektorija koju je moguće analizirati i vizualizirati primjenom odgovarajućih računalnih programa.^{40,41}



Slika 2.11. Faze simulacija molekulske dinamike. Preuzeto i obrađeno prema ref.⁴¹

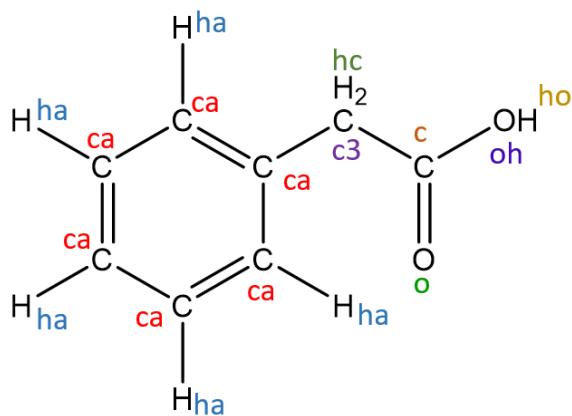
2.4.2. Polja sila

Polje sila odnosi se na funkciju i skup parametara koji se koriste za izračun potencijalne energije sustava atoma i molekula u molekulskoj mehanici, molekulskoj dinamici, Monte-Carlo simulacijama i drugim računalnim metodama temeljenim na polju sila. Konceptualno,

definicija polja sila odgovara definiciji iz klasične fizike, s naglaskom da parametri polja sila u kemiji opisuju energijski profil, odnosno plohu potencijalne energije (engl. *Potential Energy Surface*, PES).^{40,41}

Sile koje djeluju na pojedinačni atom dane su kao gradijent potencijalne energije po koordinatama odgovarajućeg atoma. Kada se poznaju koordinate atoma sustava, moguće je proučavati konformaciju sustava, što je često glavni cilj većine istraživanja koja koriste polje sila u kemiji. Važno je naglasiti da vrijednost potencijalne energije dobivene za jedan sustav korištenjem polja sila nema izravno fizikalno značenje. Različita polja sila daju različite absolutne vrijednosti energija, no kad se uspoređuju konformacije dobivene unutar istog polja sila, moguće je kvantificirati razlike i time donijeti zaključke o najučestalijim konformacijama sustava.^{40,41}

Budući da se ne mogu zadati isti parametri za, primjerice, atom ugljika u alifatskom lancu i karbonilni ugljik, polja sila razlikuju vrste atoma prema interakcijama koje ostvaruju s drugim atomima u sustavu te prema njihovom formalnom naboju (slika 2.12).⁴² Većina polja sila atomima pridružuje točkasti naboј, dok se polarizabilnost može uvesti korištenjem naprednijih polja sila. Danas postoje brojna polja sila koja se razlikuju prema vrsti i broju atoma za koje su definirani parametri, a neka se razlikuju i u samom izrazu za potencijalnu energiju. Općenita polja sila sadrže parametre za velik broj tipova atoma, dok specijalizirana polja sila, razvijena za određene klase molekula, imaju precizno definirane parametre i najpogodnije ih je koristiti za takve sustave. Za biološke makromolekule najčešće se koriste AMBER, CHARMM, GROMOS i OPLS polja sila.^{43,44}



Slika 2.12. Strukturna formula 2-feniloctene kiseline s pridruženim odgovarajućim tipovima atoma u polju sila *General Amber Force Field*, GAFF. Obrađeno prema ref.^{45,46}

2.4.3. AMBER polje sila

Sam pojam „AMBER“ (engl. *Assisted Model Building with Energy Refinement*) ima dvojako značenje: odnosi se na nekoliko polja sila koja su razvijena za opis sustava biomakromolekula u molekulskoj dinamici (AMBER), kao i na programski paket koji omogućuje pokretanje i analizu simulacija molekulske dinamike (Amber). Izgradnju programa započela je sedamdesetih godina prošlog stoljeća istraživačka grupa Petera Kollmana, a danas na razvoju i poboljšanju sustava radi više od 40 istraživačkih grupa diljem svijeta. Pregled trenutno preporučenih i najčešće korištenih polja sila u Amberu dan je u tablici 2.1. Ukoliko sustav od interesa sadrži više različitih klasa molekula i iona, primjerice, metaloprotein vezan na DNA, potrebno je za svaku klasu molekula odabrati odgovarajuće polje sila.^{40,46,47}

Tablica 2.1. Pregled aktualnih polja sila dostupnih u programu Amber22 i sustava za koje se preporuča korištenje. Preuzeto i obrađeno prema ref.⁴⁷

Sustav za koji se preporuča korištenje	Naziv polja sila	Detalji i preporučeni tip otapala
Proteini	ff19SB	Poboljšani parametri koji opisuju bočne ogranke aminokiselina. Preporuča se koristiti OPC tip vode.
	ff14SB	Alanin i glicin korišteni kao osnova za parametre koji opisuju atome iz okosnice. Preporuča se koristiti TIP3P model vode.
	ff14SBBonlysc	Torzijski kutovi bočnih ogrankaka dobiveni su kvantno-mehaničkim računima. Polje sila ne sadrži korekciju za TIP3P model vode pa se preporuča korištenje implicitnog otapala.
Nukleinske kiseline	OL15	Preporuča se za DNA. Tip vode TIP3P ili OPC, ovisno o veličini sustava.
	OL3	Preporuča se za RNA.
Ligandi – male organske molekule	GAFF2	
Ugljikohidrati	GLYCAMS-06j	
Lipidi	LIPID21	
Ioni		Odabratim prema tipu vode koji se koristi.

2.4.4. Forma funkcionala i parametri nužni za AMBER polja sila

Funkcija AMBER polja sila u jednostavnoj formi (bez članova koji opisuju polarizaciju i otapalo) dana je izrazom:

$$E_{total} = \sum_{kov. \text{ veza}} k_b (r - r_o)^2 + \sum_{val. \text{ kut}} k_\theta (\theta - \theta_o)^2 + \sum_{tor. \text{ kut}} V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon R_{ij}} \right] \quad (2.1)$$

gdje su k_b , r_o , k_θ , θ_o , V_n , γ , A_{ij} , B_{ij} , q_i i q_j parametri polja sila. Izraz 2.1. uključuje vezne članove: istezanje kovalentne veze, savijanje valentnog kuta i rotaciju torzijskog kuta te nevezne članove kojima se opisuju interakcije atoma koje dijele najmanje četiri kovalentne veze. Funkcija ne sadrži član koji bi opisivao energijski doprinos gibanja „izvan ravnine“, tako da se restrikcije za savijanje aromatskih prstenova uvode putem člana koji opisuje torzijske kutove.⁴⁶

Prvi član u potencijalu danom jednadžbom 2.1 predstavlja energijski doprinos istezanja veze koji je opisan harmonijskim potencijalom:

$$E_{kov. \text{ veza}} = \sum_{kov. \text{ veza}} k_b (r - r_o)^2 \quad (2.2)$$

gdje je u AMBER poljima sila k_b konstanta sile dana u $\text{kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$, s ravnotežnom duljinom veze r_o u \AA . Iako je istezanje veze preciznije opisano anharmonijskim potencijalom, uobičajeno je koristiti harmonijski potencijal koji dobro aproksimira istezanje veze prilikom manjih oscilacija oko ravnotežnog položaja bez pucanja ili nastajanja novih veza, kakve se očekuju u simulacijama molekulske dinamike za biomakromolekule. Važno je naglasiti da simulacije neće davati pouzdane rezultate ukoliko se postavi visoka temperatura sustava gdje je za očekivati izraženije oscilacije veza.⁴⁶

Drugi član u potencijalu danom jednadžbom 2.1 predstavlja energijski doprinos promjene valentnih kutova koji je opisan harmonijskim potencijalom:

$$E_{val. \text{ kut}} = \sum_{val. \text{ kut}} k_\theta (\theta - \theta_o)^2 \quad (2.3)$$

gdje je u AMBER poljima sila k_θ konstanta sile dana u $\text{kcal mol}^{-1} \text{ rad}^{-2}$, s ravnotežnim valentnim kutem veze θ_o u radijanima (rad).

Treći član u jednadžbi 2.1 opisuje rotaciju torzijskog kuta i izražen je Fourierovom serijom:

$$E_{tor.kut} = \sum_{tor. \text{ kut}} V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (2.4)$$

gdje je V_n torzijska energijska barijera u kcal/mol, γ faza u stupnjevima, n periodičnost. Budući da opisuje rotaciju oko kovalentne veze, jasno je zašto je ovaj član izražen periodičkom funkcijom. Međutim, ovaj član je vrlo specifičan za svako polje sila i zahtjeva posebnu pozornost. Primjerice, ovaj član omogućuje razlikovanje *cis* i *trans* konfiguracija molekula koje mogu značajno varirati u energijama. Detaljnijim opisom torzijskih kutova račun se značajno komplicira, zbog čega torzijski kutovi postaju jedan od najvećih izazova parametrizacije.^{46,48}

Posljednji član izraza 2.1. opisuje nekovalentne interakcije atoma koje dijele najmanje četiri kovalentne veze, a kombinacija je Lennard-Jonesovog potencijala za izračun doprinosa van der Waalsovih interakcija i Coulombova zakona za točkaste naboje:

$$E_{\text{nekovalentne int.}} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (2.5)$$

gdje su A_{ij} i B_{ij} empirijski dobiveni parametri ovisno o vrsti atoma između kojih se računa interakcija, q_i i q_j su parcijalni (točkasti) naboji, a R_{ij} je udaljenost između njih. Dielektrična konstanta otapala uvedena je u izraz kao parametar ϵ , no ona je makroskopsko svojstvo medija i podrazumijeva velike udaljenosti. Zato se uvodi korekcija u vidu prostorno ovisne dielektrične konstante koja uzima u obzir udaljenost na kojoj se naboji nalaze:

$$\epsilon = \frac{\epsilon_0 - \epsilon_c}{r_{eff} - r_{con}} (r - r_{con}) + \epsilon_c \quad (2.6)$$

gdje je ϵ_c vrijednost dielektrične konstante pri najmanjoj udaljenosti na kojoj se naboji mogu naći (r_{con}), a ϵ_0 vrijednost koja se uzima kada su naboji na dovoljnoj udaljenosti da je opravdano koristiti makroskopsko svojstvo medija ($r \geq r_{eff}$).^{46,48}

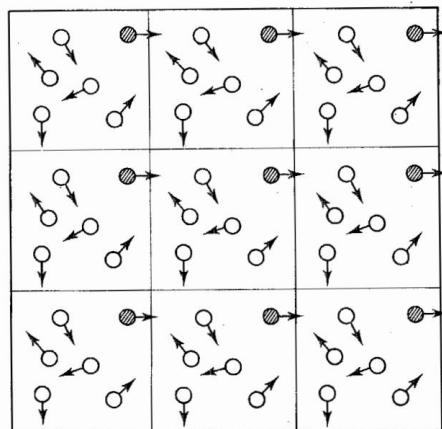
2.4.5. Priprema struktura biomakromolekula za MD simulacije

Za parametrizaciju MD simulacije potrebno je pripremiti 3D strukturu željene biomakromolekule u formatu koji će biti kompatibilan s računalnim programom koji će se koristiti. Većina 3D struktura proteina, DNA i drugih biomakromolekula, koje su određene različitim tehnikama poput kristalografske rendgenske zrakama, NMR-a i krio-elektronske mikroskopije (krio-EM), pohranjena je u javno dostupnim bazama podataka, poput *Protein Data Bank* (PDB).³⁹ No, tako određene strukture ne moraju biti kompletne, pa se cijelovita struktura može izgraditi usporedbom poznate primarne sekvence s drugim homolognim biomakromolekulama i preslikavanjem koordinata, što je poznato i kao homologno modeliranje.⁴⁹ Programi za to se baziraju na usporedbama molekule od interesa s evolucijski

srodnim molekulama koje služe kao predložak za sravnjivanje aminokiselinskih sekvenci. Većina eksperimentalno dobivenih struktura nema precizno određene položaje za atome vodika, zbog čega je protonacija sljedeći ključni korak. U proteinima različita protonacija bočnih ograna aminokiselina može značajno utjecati na funkciju i strukturu cijele molekule. Većina programa za određivanje protonacijskih stanja aminokiselina zasniva se na iteracijskom postupku kojim se mijenja orientacija i protonacijsko stanje aminokiselinskih ostataka u cilju pronalaska strukture s energijski optimalnom mrežom vodikovih veza.⁵⁰

Kako bi sustav podvrgnut računalnim simulacijama što vjernije odražavao realne uvjete, biomakromolekula od interesa se “otapa“ u otapalu (okružuje modelom otapala), najčešće vodi, s dodatkom anorganskih soli. Otapalo se može uključiti implicitno ili eksplisitno u simulacije. Implicitni modeli tretiraju molekule otapala kao kontinuum s određenim dielektričnim i međufaznim svojstvima.⁵¹ Eksplisitni modeli otapala direktno uključuju pojedinačne molekule otapala u račun potencijalne energije, ali se računalna kompleksnost smanjuje ograničavanjem stupnjeva slobode gibanja atoma molekula otapala. Iako su eksplisitni modeli i dalje računalno „skuplji“ od implicitnih, daju vjerodostojnije rezultate. Jedan od najčešće korištenih modela molekula vode je TIP3P model u kojem je voda kruto tijelo koje posjeduje dipolni moment i može se translatirati i rotirati u prostoru, no nema mogućnost vibracije veza i savijanja valentnog kuta.⁵²

Dodatno je u sustavu potrebno definirati rubne uvjete jer na rubovima simulacijske kutije dolazi do gubitka molekula vode. Najčešće se primjenjuju periodični rubni uvjeti (engl. *Periodic Boundary Conditions*, PBC). U principu, središnja simulacijska kutija replicira se u prostoru u sve tri dimenzije te je time sa svih stana okružena svojim replikama. Svaka molekula koja tijekom simulacije izade s jedne strane središnje kutije u susjednu repliku, s druge strane će u nju ući iz odgovarajuće replike, čime se osigurava zatvorenost sustava i rješava problem rubnih uvjeta (slika 2.13). Sama kutija ne mora nužno biti kubičnog oblika, već može imati i oblik krnjeg oktaedra, heksagonske prizme ili romboidnog dodekaedra.⁵³ Time se oblik optimira da su svi rubovi kutije dovoljno i približno jednako udaljeni od biomakromolekule te se osigurava efekt otapala koji sprječava da jedna slika biomakromolekule ostvari interakciju s drugom. Dodatna prednost je da se pritom ne simulira „višak“ molekula otapala gdje su biomakromolekula i njezina slika svakako dovoljno udaljene, primjerice, u rubovima kubične kutije.

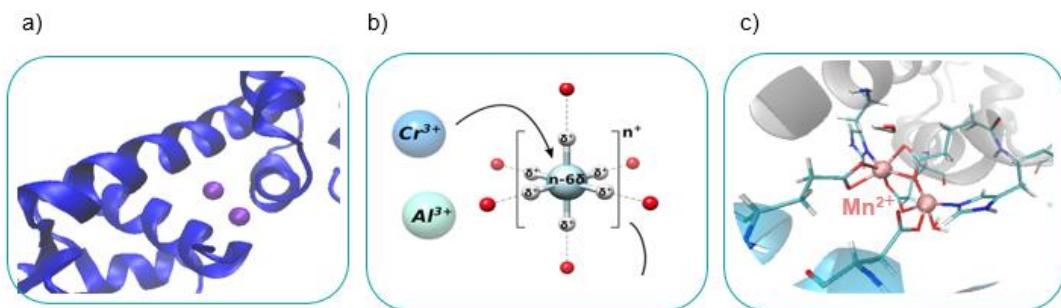


Slika 2.13. Periodični rubni uvjeti u dvije dimenzije. Preuzeto prema ref.⁵³

Na samom kraju, ukoliko je cilj postići elektroneutralnost sustava, moguće je dodati odgovarajući broja aniona ili kationa, najčešće natrijevih ili kloridnih za koje postoje pouzdani parametri u većini široko korištenih polja sila. Također, dodatkom iona moguće je regulirati i ionsku jakost sustava.⁴⁶

2.4.6. Parametrizacija metalnih iona u sustavima metaloproteina

Osim u otopini kao hidratizirani ioni, metalni kationi prisutni su u biološkim sustavima i u direktnim interakcijama s proteinima. Otpriklike 40 % proteinskih struktura pohranjenih u PDB bazi imaju metalne katione kao sastavni dio strukture. Ukoliko se metaloproteini žele proučavati MD simulacijama, potrebno je pravilno parametrizirati metalne ione kako bi se što točnije opisale njihove interakcije unutar sustava. Literaturno je poznato više pristupa parametrizacije takvih sustava (slika 2.14).^{54,55}



Slika 2.14. Parametrizacija metalnih iona. a) Nevezni model. Prikaz pomoću programa VMD.³⁴ b) Model lažnog (engl. *dummy*) kationa. Preuzeto i obrađeno prema ref.⁵⁶. c) Vezni model. Prikaz pomoću programa VMD.

Najjednostavniji pristup parametrizaciji metalnih iona temelji se na neveznom modelu koji interakcije između metalnih kationa i ostalih atoma u sustavu opisuje samo na osnovu elektrostatskih i van der Waalsovih doprinosa (slika 2.14.a). U AMBER polju sila, za izračun van der Waalsovih doprinosa najčešće se koristi 12-6 Lennard-Jonesov model, a karakterizira ga jednostavna forma i izvrsna transferabilnost između različitih sustava. Uključuje parametre za više od 60 iona, uzimajući u obzir valencije od monoivalentnih do četverovalentnih. Kasnije je razvijen 12-6-4 Lennard-Jonesov model, koji dodatno uključuje član koji opisuje ion-inducirani dipol interakcije koje opadaju s r^4 . Dodatne modifikacije uključuju i ion-ligand interakcije, pa će se tako razlikovati polarizabilnost za, primjerice, acetat⁵⁷ ili imidazol.⁵⁸ Nevezni model je primarno kvalitativan opis sustava jer ne uzima u obzir transfer elektrona između metalnih iona i njegovih liganada, već cijelobrojni naboji ostaju na ionima.⁵⁴

Model lažnog kationa (engl. *cationic dummy atom model*) za cilj ima opisati kovalentne veze između metalnog kationa i liganada koji ga koordiniraju na način da se fiktivni naboј postavlja u međuprostor između njih (slika 2.14.b). Iako djeluje elegantno, zahtjeva precizan parametrizacijski proces i nerijetko je potrebno koristiti puno empirijski dobivenih parametara.⁵⁶

Prema veznom modelu, interakcije između metalnih iona i liganada koji ga koordiniraju opisuju se kovalentnom vezom (slika 2.14.c). Naime, u parametrizaciju se osim van der Waalsovih i elektrostatskih parametara uključuju i parametri duljine veza, kao i parametri za vezne i torzijske kutove. Najčešće se parametri dobivaju kvantno-mehaničkim računom, a ponekad su dostupni i na osnovu eksperimenta. Nedostatak veznog modela leži u njegovoј krutosti, odnosno nemogućnosti promjene koordinacijskog broja metalnih iona ili izmjene liganada tijekom simulacija. No, pokazano je da većina metalnih iona sporije izmjenjuje koordinacijske brojeve kada se nalaze u veznom mjestu u proteinu nego kada su slobodni u otopini. S obzirom da se većina MD simulacija odvija na nanosekundnoj do mikrosekundnoj skali, nije za očekivati da bi u eksperimentalnim uvjetima došlo do promjene koordinacijskog broja te je time aproksimacija opravdana i smatra se da je vezni model adekvatan.^{54,59}

2.4.7. Minimizacija energije

Nakon odabira polja sila, dodavanja otapala i potrebnog broja iona, kao i parametrizacije ključnih metalnih iona ukoliko je struktura od interesa metaloprotein, moguće je krenuti u sljedeći korak – optimizaciju strukture. Početne strukture često imaju nepovoljne interakcije

koje su, primjerice, artefakti same kristalizacije, poput prevelikih ili premalih udaljenosti između atoma u kovalentnoj vezi, nepovoljnih valentnih i torzijskih kutova i sl. Dodatno, kada se biomakromolekula se okružuje otapalom, potrebno je optimirati i interakcije između biomakromolekule i molekula otapala. Zato je potrebno sustav dovesti u jedan od lokalnih minimuma na plohi potencijalne energije koji su blizu početnoj strukturi. Taj korak naziva se minimizacija energije, odnosno optimizacija geometrije. Budući da je riječ o optimizaciji funkcije više varijabli, odnosno funkcije polja sila, račun je izrazito složen te se za rješavanje primjenjuju numeričke metode. Algoritmi koji se pri tome koriste temelje se na iteracijskom postupku kojim se postupno približavamo minimumu funkcije, a dijele se, s obzirom na red derivacije funkcije potencijalne energije, na optimizacijske metode nultog, prvog i drugog reda. Uzimajući u obzir brzinu i potrebnu preciznost, u ovom koraku najčešće se primjenjuju metode prvog reda – metoda najstrmijeg spusta i metoda konjugiranih gradijenata.⁵³

2.4.8. Simulacije uravnoteženja (ekvilibracije)

Prije pokretanja produkcijske faze MD simulacije, potrebno je uravnotežiti sustav, odnosno simulacijama uravnoteženja (ekvilibracije) stabilizirati ključne parametre energije, temperature, tlaka, gustoće otapala, itd. U većini slučajeva eksperimentalni uvjeti podrazumijevaju konstantan tlak i temperaturu te se u svrhu što boljeg oponašanja tih uvjeta u MD simulacijama nastoji generirati izobarno-izotermni (*NPT*) ansambl. Za to je prvo potrebno dovesti sustav na željenu temperaturu generiranjem kanonskog ansambla (*NVT*). Pritom se volumen održava konstantnim dok se temperatura postepeno mijenja do željene vrijednosti. Nakon toga temperatura se određeni vremenski interval održava konstantnom kako bi se postigla odgovarajuća gustoća otapala u sustavu. S obzirom na to da se temperatura može prikazati kao funkcija raspodjele kinetičke energije (E_k) po česticama u sustavu (jednadžba 2.7), najjednostavniji način regulacije temperature je skaliranjem brzine čestica.

$$E_k = \frac{3}{2} N k_B T = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2} \quad (2.7)$$

2.4.9. Produkcijska faza MD simulacija

Nakon što su atomima pridružene početne brzine prema Maxwell-Boltzmannovoj raspodjeli (jednadžba 2.8) za zadanu temperaturu, započinje produkcijska faza MD simulacije. Uslijed gibanja atoma prema zadanim brzinama dolazi do promjene njihovih položaja, čime se mijenja

i konformacije cijele molekule. Nova konformacija ima drugačiju potencijalnu energiju, tj. sustav se nalazi u novoj točki na plohi potencijalne energije. Sila F (jednadžba 2.9) koja uzrokuje gibanje atoma povezana je s ukupnom potencijalnom energijom E_{uk} (jednadžba 2.10). Deriviranjem izraza za E_{uk} dobiva se skup Newtonovih jednadžbi gibanja (jednadžba 2.11), čijim se rješavanjem određuju položaji atoma u vremenu, odnosno trajektorija sustava.

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}} \quad (2.8)$$

$$m_i a_i = m_i \frac{\delta^2 r_i}{\delta t^2} = F_i \quad (2.9)$$

$$F_i = -\nabla E_{uk} \quad (2.10)$$

$$m_i \frac{\delta^2 r_i}{\delta t^2} = -\nabla E_{uk} \quad (2.11)$$

U tim izrazima k_B je Boltzmannova konstanta, m_i masa atoma, v_i brzina atoma, a T temperatura.⁵³

Budući da je sila koja djeluje na jedan atom u molekuli ovisna o položaju tog atoma, ali i položaju svih ostalih atoma s kojima je u interakciji, skup Newtonovih jednadžbi gibanja za atome u molekuli nema analitičko rješenje te je potrebno primijeniti numeričke metode rješavanja. Najčešće korišteni algoritmi su *Verletov* algoritam i *leap-frog* algoritam, te njihove inačice poput *Beemanovog* algoritma ili *velocity Verlet* algoritma. Osnovna aproksimacija koja omogućava rješavanje jednadžbi numeričkim putem je da je sila koja djeluje na atom konstantna tijekom odabranog vremenskog koraka. Taj korak je obično 1 fs (10^{-15} s), što odgovara 1/10 periode istezanja C-H veze. Finalni rezultat MD simulacija je trajektorija, koja prikazuje vremensku ovisnost atoma u sustavu. Trajektoriju je moguće vizualizirati putem programa za vizualizaciju, te kvantitativno analizirati određene pojave u sustavu koje iz mikroskopske perspektive mogu objasniti neka makroskopska svojstva sustava.⁵³

2.4.10. Kvantitativna analiza trajektorije

Promjene tijekom MD simulacija mogu se pratiti vizualizacijom trajektorije u specijaliziranim programima, ali i kvantificirati mjeranjem različitih parametara koji omogućuju usporedbu svih konformacija unutar trajektorije.

Korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. *Root Mean Square Deviation*) ili *RMSD* je statistički pokazatelj sličnosti dvaju konformacija iste molekule. Prema izrazu 2.12, predstavlja

mjeru prosječne udaljenosti ekvivalentnih atoma dvije strukture, gdje je N ukupan broj atoma koje uspoređujemo, a δ_i udaljenost između dva ekvivalentna atoma.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad (2.12)$$

Korijenom srednjeg kvadrata fluktuacija (engl. *Root Mean-Square Fluctuation*) ili *RMSF* prati se fluktuacija pojedinog atoma ili skupa atoma u određenom vremenskom intervalu. Cilj ove analize je utvrditi koliko neki atom, bočni ogranač ili regija fluktuiraju u sustavu, te time identificirati ključne regije za pomnije istraživanje dinamičkih svojstava. Računa se prema izrazu 2.13, gdje je r_i položaj atoma i tijekom simulacije, $r_{i,\text{ref}}$ položaj atoma i u odabranoj referentnoj strukturi, a t ukupno vrijeme trajanja trajektorije.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{t_j}^t (r_i(t_j) - r_{i,\text{ref}})^2} \quad (2.13)$$

Radius giracije (engl. *Radius of Gyration*) ili *RG* predstavlja korijen srednje sume kvadrata udaljenosti pojedinih jedinica (npr. pojedinih aminokiselina ili nukleotida) od središta biomakromolekule. Radius giracije se često uzima kao dobra procjena volumena biomakromolekule u otopini. Računa se prema izrazu 2.14, gdje je r_i udaljenost i-te jedinice od središta mase biomakromolekule, m_i je masa jedinice, a N_{ak} je ukupan broj jedinica.⁵³

$$RG = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{ak}}} r_i^2 m_i}{\sum_{i=1}^{N_{\text{ak}}} m_i}} \quad (2.14)$$

Praktična analiza koja za cilj ima grupirati različite populacije struktura u jednoj trajektoriji prema sličnosti geometrijskih parametara je klasterska analiza (engl. *cluster analysis*). Broj populacija i geometrijski parametar po kojem će se utvrditi sličnost se unaprijed zadaje, a klasteriranje se odvija odabriom određenog algoritma. Što je manja razlika u odabranom geometrijskom parametru, to su dvije uspoređivane strukture sličnije. Jedan od poznatih algoritama za klasteriranje je *K-means*. *K-means* algoritam slaže matricu koja sadrži *RMSD* vrijednosti između svih struktura u trajektoriji te ih na temelju tih vrijednosti razvrstava u kategorije, odnosno klastere. Na temelju dobivenih podataka, može se zaključiti koji klaster ima najveću populaciju, pa time centralna struktura tog klastera, odnosno centroid klastera, predstavlja statistički najzastupljeniju konformaciju u proučavanoj trajektoriji.⁶⁰

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MD simulacije raznih formi proteina *HhMntR*

3.1.1. Priprema strukture proteina za MD simulacije

Pretragom PDB³⁹ baze podataka koja sadrži koordinate 3D struktura biomakromolekula pronađene su strukture koje odgovaraju proteinu *HhMntR*. Preuzete su dvije strukture proteina: bez vezanih iona mangana s PDB kodom 6KTA, kasnije u tekstu – apoprotein, te struktura s PDB kodom 6KTB, s dva iona mangana u jednoj monomerskoj jedinici i jednim ionom magnezija u drugoj monomernoj jedinici, kasnije u tekstu – holoprotein. Za potrebe MD simulacija holoproteina s ionima mangana u veznom mjestu oba monomera, monomer koji sadrži ione mangana iz strukture 6KTB preklopljen je s monomerom koji sadrži ion magnezija pomoću programa *VMD*³⁴, čime su dobivene koordinate iona mangana u drugom veznom mjestu. Takva struktura je spremljena i korištena u dalnjim koracima. Za potrebe MD simulacija mutiranog proteina *HhMntR*, mutacije bočnih ogranaka ciljanih aminokiselina uvedene su pomoću funkcije *Rotamer* programa *Chimera*.⁶¹

Budući da biomakromolekule pohranjene u PDB bazi nemaju atome vodika, oni se moraju dodati naknadno. Ovisno o broju polarnih atoma vodika H⁺, razlikovat će se naboј bočnih ogranaka aminokiselina, a time i nekovalentne interakcije s drugim bočnim ograncima ili molekulama u sustavu. Za potrebe uvođenja polarnih vodikovih atoma u sve strukture korišten je računalni program *H++*,⁵⁰ a odabran je pH 7, koji odgovara pH bakterijske citoplazme⁶² u kojoj se nativno nalazi protein od interesa. Nepolarni atomi vodika uvedeni su obradom strukture u modulu *t leap* programa *Amber21*.⁴⁶.

3.1.2. Parametrizacija sustava

Svi nužni parametri polja sila uvedeni su pomoću potprograma *t leap*, čime su generirane datoteke koje sadrže sve informacije ključne za provođenje MD simulacija. Proteini su parametrizirani poljem sila *ff14SB*.⁶³ Uloga iona mangana istražena je primjenom dvaju različitih modela: veznog i neveznog. Uz nevezni model korišteni su nevezni parametri za dvoivalentne katione 12-6-4 Lennard-Jonesovog tipa.⁶⁴ S druge strane, da bi se opisala koordinacijska veza iona mangana s bočnim ograncima aminokiselina u veznom mjestu, bilo je potrebno uvesti parametre ranije dobivene kvantno-mehaničkim pristupom, korištenjem DFT

računa. Vezni parametri za ione mangana preuzeti su prema veznom mjestu za ion mangana u MntR proteinu iz bakterije *B. subtilis*.¹¹ Cijeli sustav otopljen je u eksplicitnom otapalu, korištenjem TIP3P modela vode te neutraliziran dodatkom potrebnog broja iona natrija ili klora. Pritom su zadani periodični rubni uvjeti, a simulacijska kutija bila je ili kubičnog oblika ili oblika krnjeg oktaedra, s dimenzijama prilagođenim tako da istraživani sustav bude udaljen najmanje 10 ili 20 Å od granice kutije.

3.1.3. Minimizacija, ekvilibracija i produkcijska faza MD simulacija

Budući da je za MD simulacije poželjno da je početna geometrija molekule u najbližem minimumu na plohi potencijalne energije, potrebno je optimizirati duljine kovalentnih veza, vezne kutove i sl. Za sve sustave, minimizacija energije provedena je u pet ciklusa, pri čemu se svaki sastojao od 200 koraka primjenom metode najstrmijeg spusta i 800 koraka primjenom metode konjugiranog gradijenta. U prva tri ciklusa, primjenom harmonijskog potencijala konstante sile 100 kcal mol⁻¹ Å⁻¹, ograničena su gibanja određenih atoma. Točnije, u prvom ciklusu fiksirani su položaji svih atoma osim onih molekula otapala, čime je omogućeno isključivo minimiziranje geometrije otapala. U drugom ciklusu, uklonjena je restrikcija za atome vodika, što je omogućilo optimiziranje njihove geometrije, dok je u trećem ciklusu restrikcija postavljena na okosnicu proteina te su optimizirani položaji bočnih ogranaka proteina. U četvrtom ciklusu, ponovljena je restrikcija na okosnicu proteina, ali s manjom konstantom sile od 50 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. U posljednjem, petom ciklusu minimizacije energije, uklonjene su sve restrikcije te je time optimizirana geometrija cijelog sustava.

Nakon minimizacije energije, uslijedila je ekvilibracija sustava, kako bi se uravnotežili ključni parametri poput tlaka, temperature, energije, gustoće otapala i sl. Posljednja struktura iz koraka minimizacije iskorištena je kao prva struktura u ekvilibraciji. U prvom ciklusu ekvilibracije nametnut je konstantan volumen, a temperatura se linearno podizala od 0 do 300 K tijekom 300 ps. Gibanje atoma proteina i iona mangana bilo je ograničeno primjenom harmonijskog potencijala konstante sile od 32 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. U drugom i trećem ciklusu ekvilibracije nametnut je konstantan tlak (1 bar) i temperatura (310 K) te su uklonjene sve restrikcije. Druga simulacija ekvilibracije trajala je 200 ps, a treća 500 ps.

U produkcijskoj fazi MD simulacija također je primijenjen konstantan tlak od 1 bara i konstantna temperatura od 310 K. Ukupno trajanje za razne sustave bilo je između 500 ns i 1,25 μs.

3.2. MD simulacije holo- i apoproteina *HhMntR* u kompleksu s operatorskom sekvencom *mntA*

3.2.1. Priprema 3D strukture DNA

Primarna sekvenca operatorske regije *mntA* u DNA na bakterijskom kromosomu *H. halodurans*, na koju se veže *HhMntR*, preuzeta je iz literature^{33,65} te je 3D struktura izgrađena prema parametrima B-forme DNA programom 3DNA 2.0.⁶⁶ Struktura same molekule DNA u eksplisitnom vodenom otapalu pripremljena je korištenjem modula *t leap* u programu *Amber21*.⁴⁶ Atomi DNA parametrizirani su korištenjem *OL15*⁶⁷ polja sila. Eksplisitnim TIP3P modelom vode ispunjena je simulacijska kutija u obliku krnjeg oktaedra na način da je između DNA i ruba kutije minimalno 10 Å. Sustav je neutraliziran dodatkom potrebnog broja iona magnezija, Mg²⁺ i iona klora, Cl⁻.

3.2.2. MD simulacije strukture DNA

U cilju relaksacije i dobivanja najzastupljenije konformacije DNA koja će se koristiti u dalnjim koracima provedena je MD simulacija molekule DNA koja odgovara operatorskoj sekvenci *mntA*. MD simulacija provedena je kako je opisano u odjeljku 3.1.3., s tim da su restrikcije uvedene na atome DNA umjesto proteina. Na taj način generirana je trajektorija od 240 ns.

3.2.3. Molekulsko uklapanje holo- i apoproteina *HhMntR* u kompleks s DNA

Odabrane konformacije DNA i proteinske strukture od interesa (predstavnik najzastupljenijeg klastera u MD simulaciji holo- i apoproteina *HhMntR*) korištene su u dalnjim koracima za uklapanje proteina i DNA u kompleks. Pritom je korišten program za molekulsko uklapanje *pyDockDNA*.⁶⁸ DNA i protein za svaki sustav su učitani u program, a sam program odabire molekulu s najvećom udaljenošću između dva para atoma kao receptor. Program generira 10000 struktura i rangira ih prema zadanom sustavu bodovanja. Pritom za prvih 100 struktura generira i 3D modele. Tablica 3.1 prikazuje koje strukture su korištene za dobivanje kompleksa DNA i proteina.

Tablica 3.1. Strukture korištene za molekulsko uklapanje.

DNA	Početna struktura	Protein	Početna struktura
Relaksirana B-forma operatorske sekvence <i>mntA</i>	Centroid najzastupljenijeg klastera u MD simulaciji u trajanju od 240 ns	Holoprotein - <i>HhMntR</i> s vezanim Mn ²⁺ u oba vezna mesta	Centroid najzastupljenijeg klastera u MD simulaciji u trajanju od 1250 ns
		Apoprotein - <i>HhMntR</i> bez Mn ²⁺	

3.2.4. Priprema struktura i MD simulacije kompleksa holo- i apoproteina *HhMntR* s DNA

Za MD simulacije korišteni su odabrani kompleksi DNA i proteina dobiveni molekulskim uklapanjem. Pomoću programa *VMD*, originalne strukture proteina i DNA dobivene iz samostalnih MD simulacija poravnate su sa strukturama dobivenim molekulskim uklapanjem. Time su generirane strukture s odgovarajućom protonacijom i nazivljem aminokiselina, što je omogućilo primjenu veznih parametara za ione mangana u slučaju holoproteina.

Također, program *VMD* je korišten za generiranje sustava u kojima je protein udaljen 20 Å od DNA, manualnim translatiranjem proteina od DNA. Da bi se provele MD simulacije, strukture su pripremljene korištenjem modula *t leap*. Za protein je korišteno polje sila *ff14SB*, a za DNA polje sila *OL15*. Eksplicitnim modelom vode TIP3P popunjena je simulacijska kutija u obliku oktaedra na način da je između DNA i ruba kutije minimalno 20 Å. Sustav je neutraliziran dodatkom potrebnog broja iona natrija, Na⁺ i iona klora, Cl⁻.

3.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza trajektorija dobivenih MD simulacijama

3.3.1. Vizualizacija i analiza geometrijskih parametara trajektorija dobivenih iz MD simulacija

Trajektorije su vizualizirane programom *VMD*. Svi geometrijski parametri, kao i vodikove veze, analizirani su koristeći modul *cpptraj*⁶⁹ iz programskog paketa *Amber21*. Da bi se utvrdile razlike u geometriji između početne strukture i svake sljedeće, mjereno je više različitih geometrijskih parametara: *RMSD*, *RMSF*, *RG* i sl. Pritom je odabrana cijela struktura proteina i DNA, ili dio od posebnog interesa poput DNA-veznih domena. Također, u *cpptraj* modulu mjerene su i udaljenosti između određenih atoma od interesa te centara mase određenih skupina, poput bočnih ogranaka aminokiselina i sl. Rezultati svih kvantitativnih analiza prikazani su grafički u programu *RStudio* pomoću paketa *ggplot2*.⁷⁰

3.3.2. Analiza mreže nekovalentnih interakcija

Vodikove veze analizirane su pomoću programskog alata *Hydrogen Bonds* koji je dodatak programu *VMD*. Parametri za vodikove veze postavljeni su u skladu s preporukama autora, pri čemu maksimalna udaljenost između donora i akceptora iznosi $\leq 3,0 \text{ \AA}$, a kut donor–vodik–akceptor ne prelazi 20° .⁷¹

Isti parametri primijenjeni su za analize trajektorija u modulu *cpptraj* komandom *hbonds* kako bi se dobila dva skupa podataka za usporedbu. Za parove atoma uključenih u formiranje vodikovih veza, kao i drugih uočenih nekovalentnih interakcija, poput π - π interakcija, zasebno su mjerene udaljenosti između donora i akceptora, kao i prostornog kuta između njih. Cilj je bio utvrditi učestalost interakcije za vrijeme trajanja trajektorije.

3.3.3. Klasterska analiza

Na pojedinim trajektorijama provedena je klasterska analiza primjenom *K-means* algoritma⁷² za klasteriranje dostupnog u *cpptraj* modulu. Odabrani geometrijski parametar na čijoj sličnosti se zasnivalo klasteriranje struktura u 10 različitih kategorija bio je *RMSD*. Na predstavnicima klastera (centroidima) provedena je i analiza elektrostatskog potencijala korištenjem programa *APBS*.⁷³

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

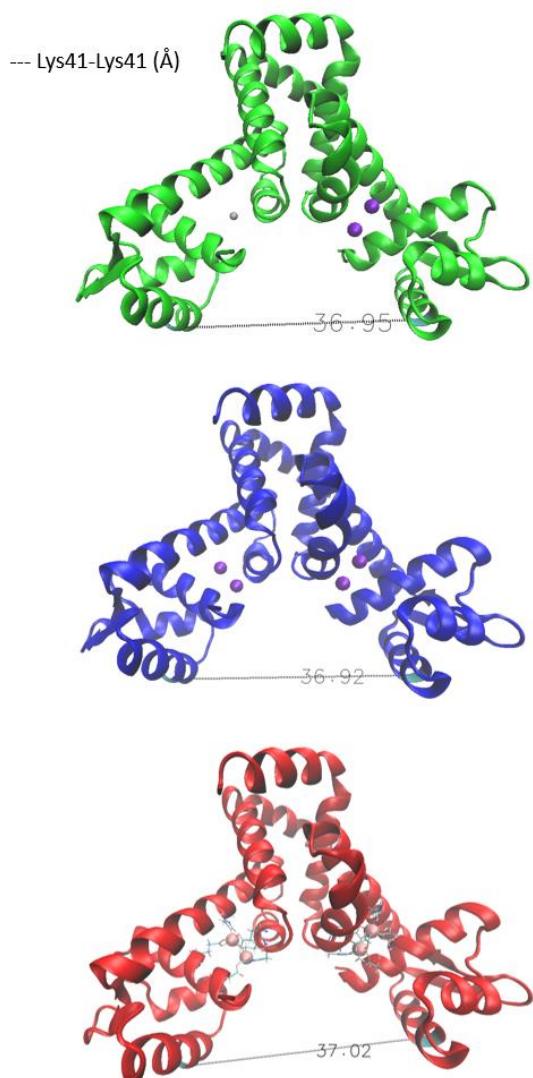
4.1. Parametrizacija iona mangana u holoproteinu *HhMntR*

4.1.1. Početne strukture holoproteina *HhMntR* s veznim i neveznim parametrima

U cilju istraživanja holo- i apoproteina *HhMntR* MD simulacijama bilo je potrebno u prvom koraku riješiti problem parametrizacije iona mangana. Holoprotein *HhMntR* kristaliziran je s dva iona Mn²⁺ u jednoj podjedinici te jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici. Prema literaturi, ovaj protein trebao bi imati dva iona Mn²⁺ u svakoj podjedinici koji su s bočnim ograncima proteina vezani koordinacijskom vezom. Kako bi se utvrdilo kako prisutnost Mn²⁺, kao i način njegovog uvođenja u strukturu proteina, odnosno parametrizacija, utječe na MD simulacije, isprobane su različite parametrizacije. Počevši od kristalne strukture iz PDB baze koda 6KTB, pripremljena su tri sustava holoproteina:

- 1) Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici
- 2) Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice
- 3) Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice

Kao što je vidljivo na slici 4.1, nakon minimizacije se ne mogu jasno uočiti razlike između struktura. Kao parametar usporedbe koji zorno govori o razlikama u konformaciji proteina, uzimajući u obzir biološku ulogu proteina i poznate literaturne podatke, uzeta je udaljenost između C_α atoma aminokiselina Lys41 iz svake podjedinice. Udaljenosti su redom: 36,95 Å za holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici, 36,92 Å za holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice te 37,02 Å za holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (slika 4.1). Lee i suradnici su u kristalnoj strukturi 6KTB proteina mjerili udaljenost Lys41-Lys41 koja je iznosila 37,5 Å.¹⁰ Budući da su vrijednosti početnih struktura za MD simulaciju usporedive s literaturnom vrijednošću za strukturu 6KTB, može se zaključiti da sama priprema strukture i minimizacija nije vidno utjecala na konformaciju proteina.

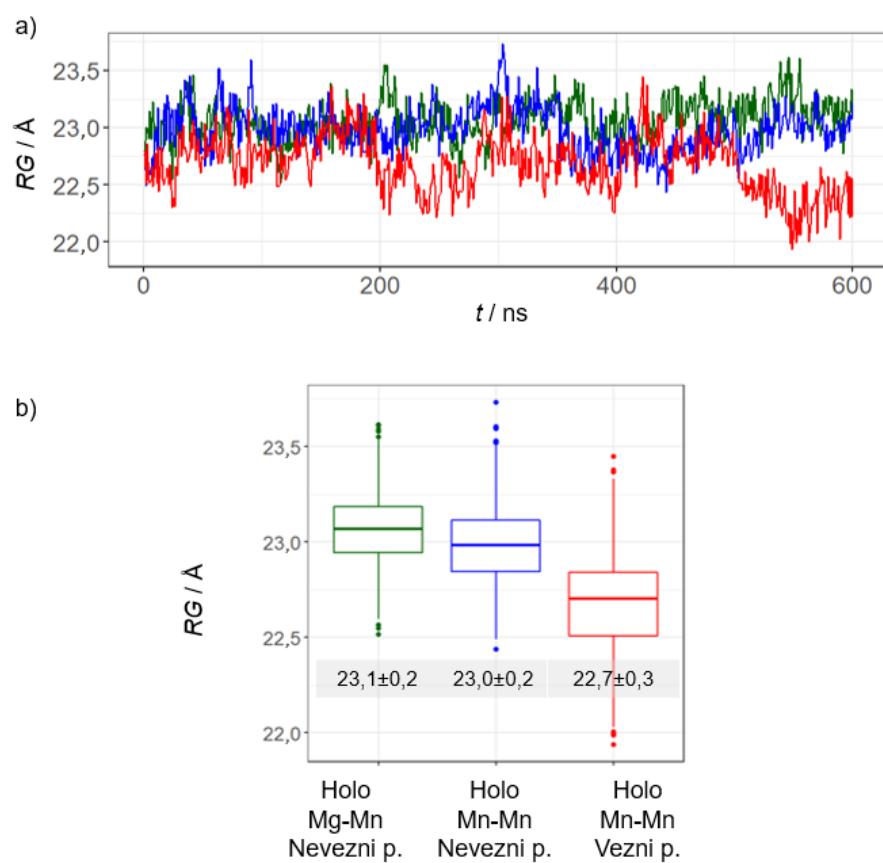


Slika 4.1. Početne strukture holoproteina *HhMntR* nakon minimizacije. Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u jednoj i jednim ionom Mg^{2+} u drugoj podjedinici (**zeleno**). Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (**plavo**). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (**crveno**). Udaljenost između C_{α} atoma Lys41-Lys41 prikazana je sivom isprekidanom crtom i brojčanom vrijednošću izraženom u Å. Metalni ioni u veznim mjestima prikazani su kuglicama.

4.1.2. Fluktuacije holoproteina *HhMntR* s veznim i neveznim parametrima za ione mangana u MD simulacijama

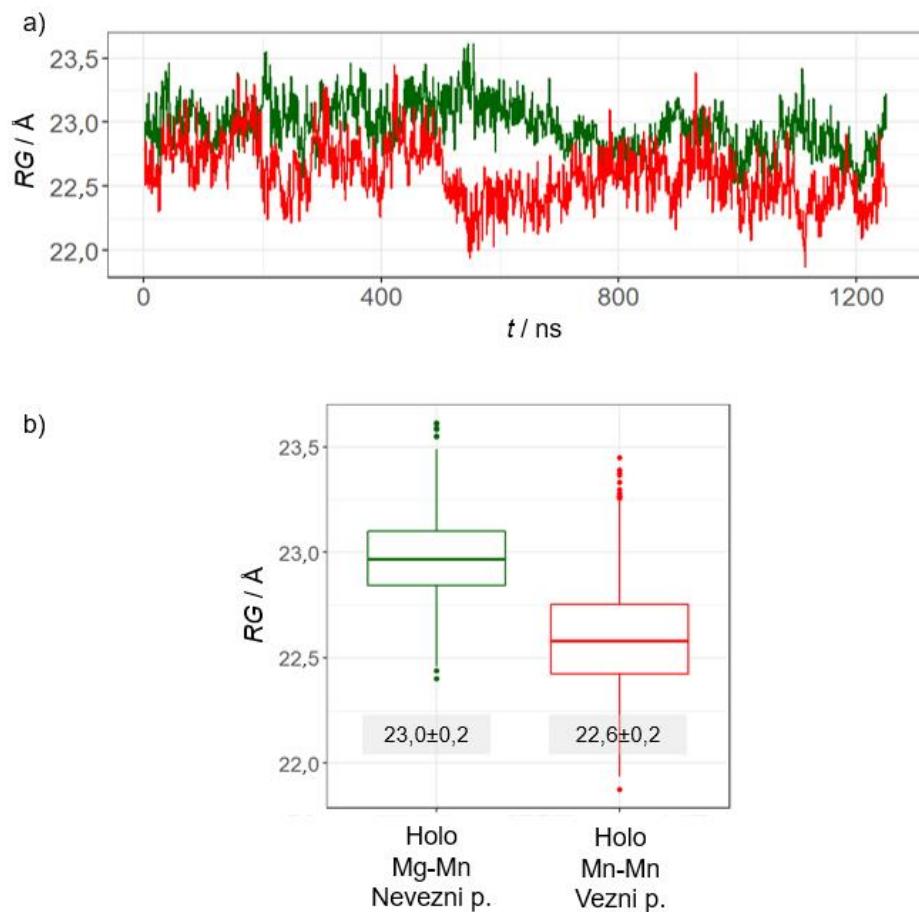
Optimizirane strukture podvrgnute su MD simulacijama u trajanju od 600 ns te su dobivene trajektorije analizirane. Budući da je fokus istraživanja na strukturnim promjenama, a jedna od hipoteza sugerira sužavanje konformacije proteina nakon vezanja Mn^{2+} u vezno mjesto, konformacijska promjena proteina u vidu smanjenja volumena analizirana je mjeranjem promjene radijusa giracije tijekom simulacije (slika 4.2). Holoprotein s neveznim parametrima

za dva iona Mn^{2+} u jednoj i jednim ionom Mg^{2+} u drugoj podjedinici i holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice pokazuju sličan profil radijusa giracije tijekom MD simulacija, pri čemu se radius giracije od početka simulacije neznatno mijenja i postiže slične vrijednosti. To sugeriraju i srednje vrijednosti koje su usporedive, redom navođenja: $23,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ i $23,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$ (srednja vrijednost \pm standardna devijacija). Samim time jasno je da nema značajne razlike bilo da je u veznom mjestu za vrijeme MD simulacije smješten Mg^{2+} ili Mn^{2+} . Iako je Mg^{2+} manji kation, te je samo jedan u veznom mjestu, s obzirom na vrlo sličan tretman dvovalentnih iona u neveznoj parametrizaciji, dobivaju se slični rezultati. S druge strane, bitna razlika uočava se kod holoproteina s veznim parametrima gdje nakon 500 ns dolazi do smanjenja radijusa giracije, što se može tumačiti kao smanjenje volumena kojeg struktura zauzima, tj. sužavanje cijelokupne strukture proteina. Uočeno smanjenje u volumenu doprinosi i nižoj srednjoj vrijednosti, koja u ovom slučaju odgovara $22,7 \pm 0,3 \text{ \AA}$.



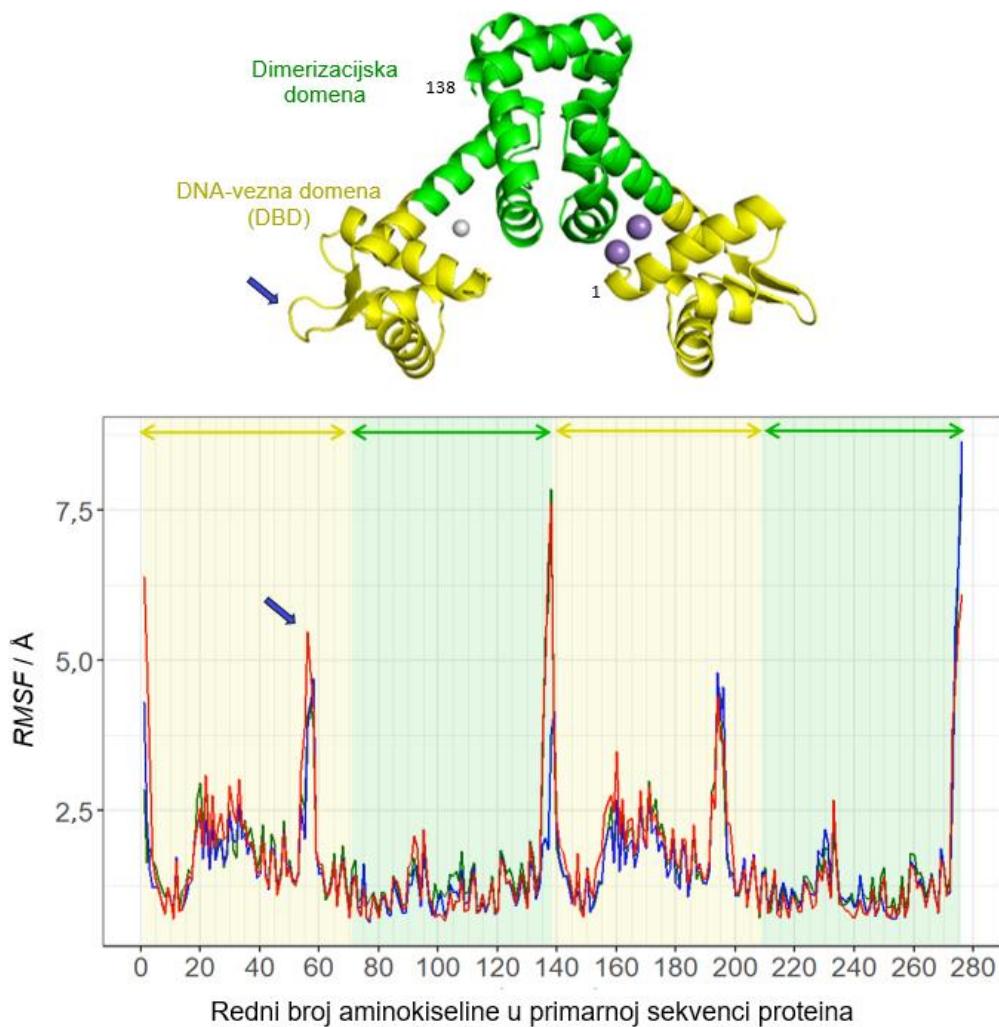
Slika 4.2. Radijus giracije za MD simulacije u trajanju od 600 ns. Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u jednoj i jednim ionom Mg^{2+} u drugoj podjedinici (**zeleno**). Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (**plavo**). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (**crveno**). a) Promjena radijusa giracije tijekom simulacije. b) Kutijasti dijagram (engl. *box-plot*) radijusa giracije sa srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom.

S obzirom da se uočeno smanjenje radijusa giracije holoproteina s veznim parametrima događa pred kraj trajektorije, MD simulacija je produžena i analizirana. Za usporedbu, odabrana je jedna od dvije MD simulacije s neveznim parametrima, jer se očekuje sličan obrazac kod obje, čime se postiže značajna ušteda računalnih resursa. Tijekom produljenih simulacija, uočeno je da se trend nastavlja, tj. radius giracije holoproteina s veznim parametrima i dalje ostaje manji od početnog. No, s vremenom se smanjuje i radius giracije holoproteina s neveznim parametrima, ali ipak nedovoljno da bi prosječna vrijednost nakon duplo duljeg trajanja simulacije značajno pala (smanjena je sa $23,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ na svega $23,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$) (slika 4.3).



Slika 4.3. Radijus giracije za MD simulacije u trajanju od 1250 ns. Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u jednoj i jednim ionom Mg^{2+} u drugoj podjedinici (**zeleno**). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (**crveno**). a) Promjena radijusa giracije tijekom simulacije. b) Kutijasti dijagram (engl. *box-plot*) sa srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom.

Radius giracije sugerira da je holoprotein s veznim parametrima postigao suženiju konformaciju te je potrebno deducirati gdje je promjena najviše izražena. Jedna od analiza koja obuhvaća cijeli protein je i *RMSF* analiza kojom se mogu odrediti razlike u fluktuacijama bočnih ograna proteina. Za ovu fazu, uspoređeni su i grafički prikazani rezultati za sve tri provedene MD simulacije (slika 4.4). Početna kristalna struktura holoproteina 6KTB određena je bez posljednjeg glutaamata u oba monomerna lanca, te je kao takva i simulirana. Obično posljednje aminokiseline u sekvenci jako fluktuiraju u MD simulacijama, jednako kao i u otopini, te značajno, a često i nerealno, povećavaju prosječno fluktuiranje. Iz tog razloga, aminokiselina nije dodana naknadno prilikom obrade strukture za MD simulacije, a prema ponašanju prve i preposljednje aminokiseline, Met1 i Glu138 za prvi monomer, te Met139 i Glu276 za drugi monomer, jasno je da je dinamika na N-terminalnom i C-terminalnom dijelu proteina značajno izraženija od ostatka. Kad se fokus stavi na ostatak proteina, iz *RMSF* profila jasno je da DNA-vezne domene proteina fluktuiraju značajnije od dimerizacijskih. Najvišu fluktuaciju postiže regija s rednim brojevima 56-58 koja odgovara petlji bogatoj aminokiselinama s konjugiranim bočnim ograncima: Arg56-Tyr57-Arg58. Budući da je riječ o neuređenoj petlji, očekivane su velike fluktuacije. Međutim, njezin položaj u DNA-veznoj domeni i dvostruki pozitivni naboj sugeriraju moguću ulogu u vezanju petlje na negativno nabijenu DNA, što se svakako nameće kao zanimljivo pitanje koje je istraženo i opisano u narednim poglavljima. Budući da niti *RMSF* analiza niti *RMSD* analiza (slika D1) nisu pokazala značajne razlike između tri uspoređene trajektorije, kako bi se donijeli konkretni zaključci o tome doprinose li vezani Mn²⁺ sužavanju strukture holoproteina i postizanju optimalne konformacije za vezanje na DNA, potrebno je detaljnije pogledati promjene u strukturi.

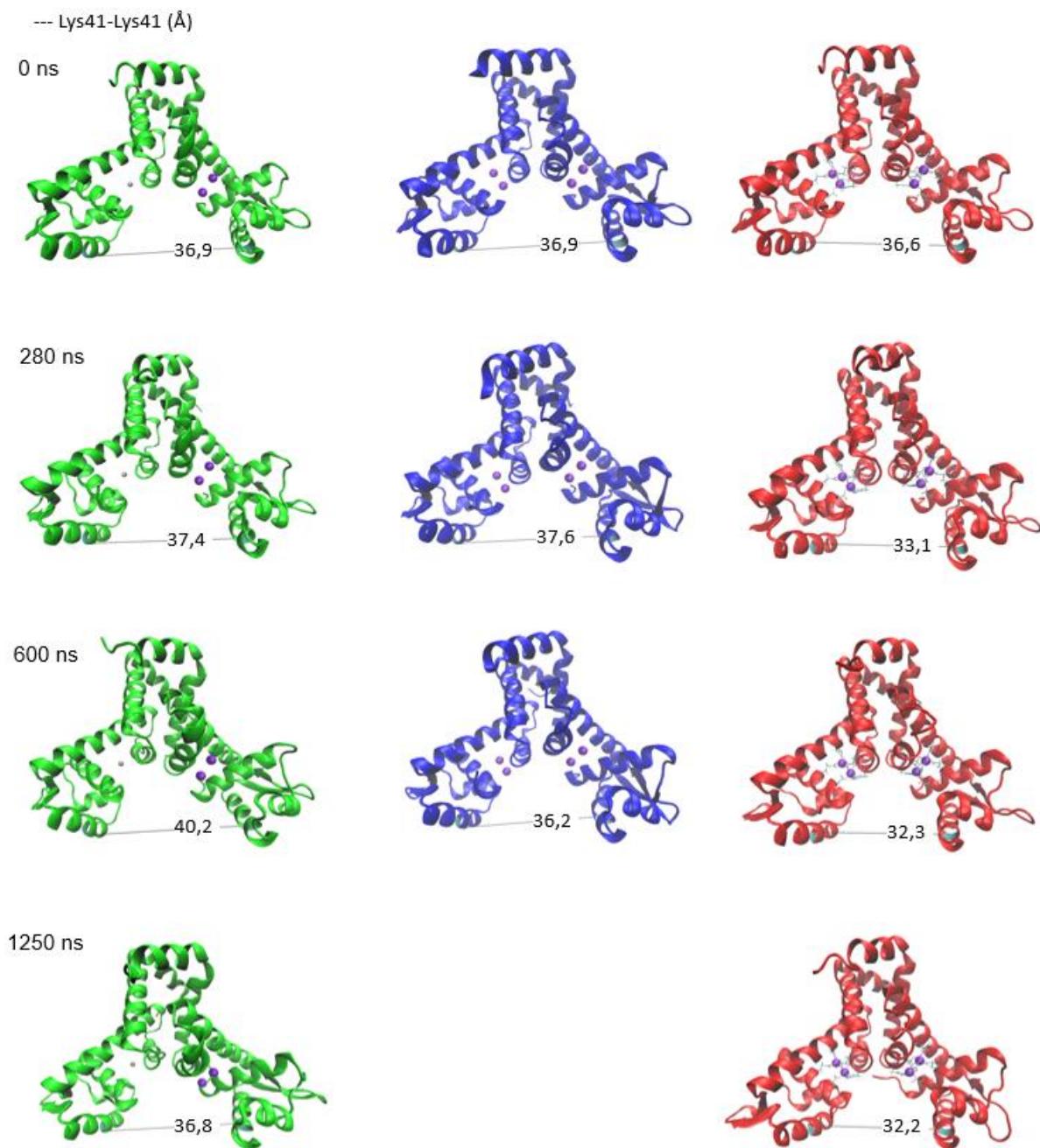


Slika 4.4. a) Holoprotein s dva iona Mn^{2+} (ljubičasto) u jednoj i jednim ionom Mg^{2+} u drugoj podjedinici (bijelo). Plava strelica označava neuređenu petlju s aminokisinama rednih brojeva 56-58. Slika je preuzeta i obrađena prema ref. ¹⁰ b) RMSF profili izračunati za teške atome iz bočnih lanaca: holoproteina s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u jednoj i jednim ionom Mg^{2+} u drugoj podjedinici (zeleno), holoproteina s neveznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (plavo), te holoproteina s veznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (crveno).

4.1.3. Udaljenost između DNA-veznih domena proteina HhMntR s veznim i neveznim parametrima za ione mangana u MD simulacijama

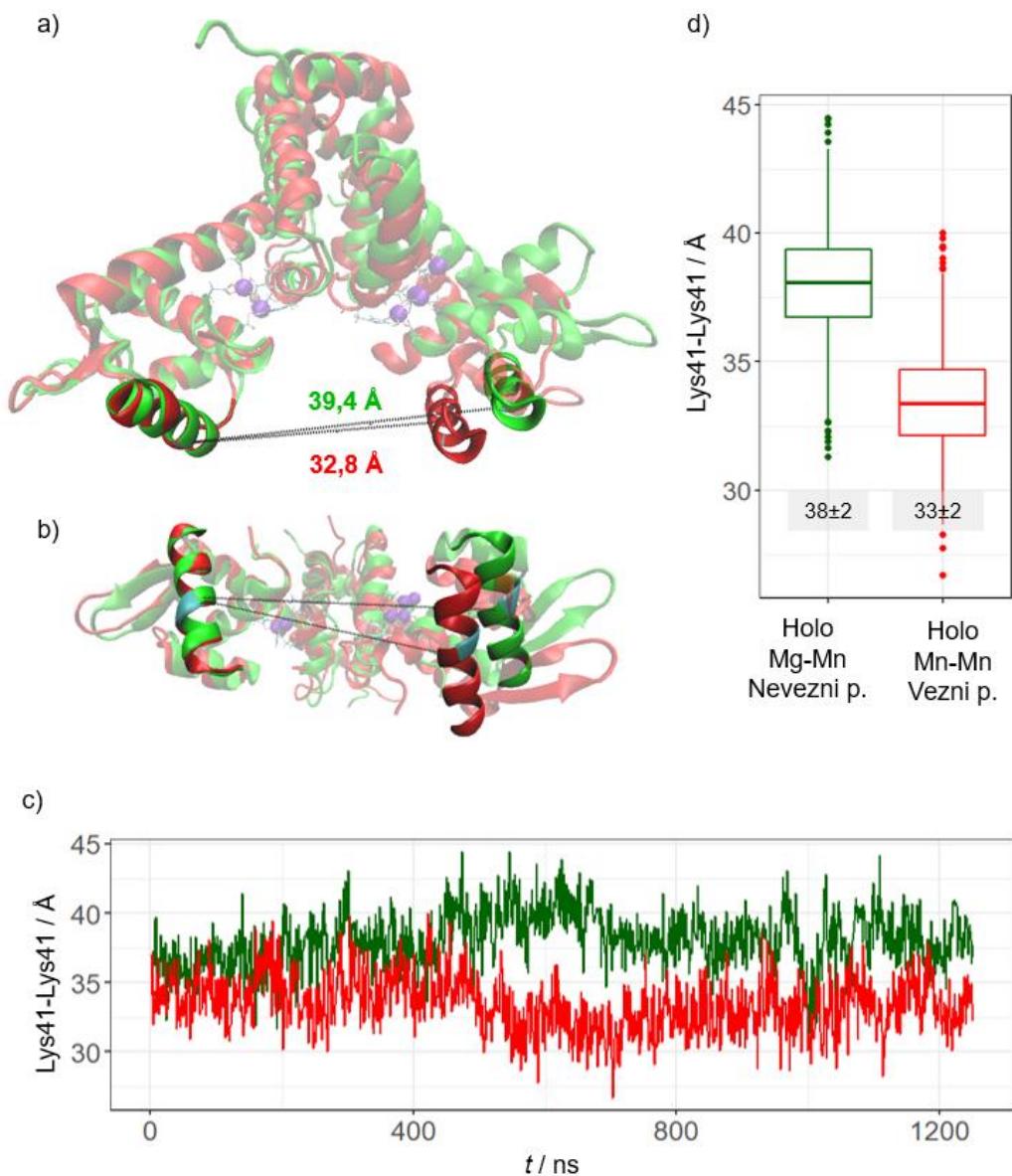
Kako bi se proučile razlike između MD simulacija holoproteina s različito opisanim metalnim ionima u veznom mjestu, jedna od praktičnih mjera za proučavanje je udaljenost između C_{α} atoma Lys41-Lys41 u dvije DNA-vezne domene koja se koristi u literaturi¹⁰ i koja ujedno ukazuje na udaljenost između DNA-veznih domena. Konformacije odabrane iz MD simulacija, prikazane na slici 4.5, ukazuju da ne dolazi do značajnih promjena u strukturama holoproteina u kojima se koriste nevezni parametri za ione metala. S druge strane, za holoprotein s veznim

parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice moguće je uočiti sužavanje strukture i približavanje DNA-veznih domena tijekom simuacije.



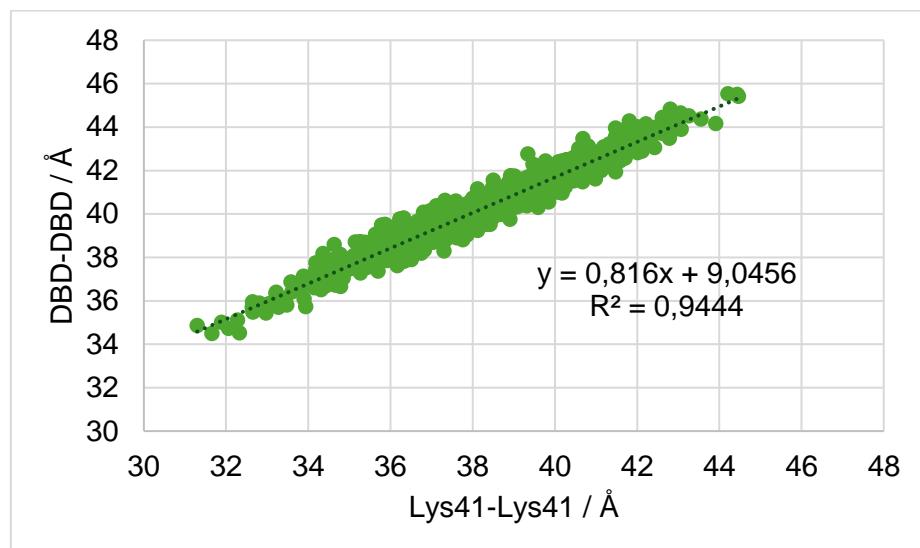
Slika 4.5. Strukture *HhMntR* dobivene nakon 0, 280, 600 i 1250 ns MD simulacija. Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici (**zeleno**). Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (**plavo**). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (**crveno**). Udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41 u dvije DNA-vezne domene prikazana je isprekidanom sivom linijom i dana je vrijednost u Å. Metalni ioni prikazani su kuglicama.

Za kvantifikaciju rezultata u nastavku, fokus je ponovno stavljen na dva krajnja slučaja. Udaljenost Lys41-Lys41 u holoproteinu s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici (38 ± 2 Å) ostaje gotovo jednak početnoj udaljenosti u 6KTB kristalnoj strukturi (37,5 Å). U holoproteinu s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice, prosječna udaljenost Lys41-Lys41 je 33 ± 2 Å. Dakle, došlo je do signifikantnog sužavanja strukture i približavanja DNA-veznih domena jednom kad su u strukturu uvedeni vezni parametri (slika 4.6). Dobivena vrijednost za holoprotein sada je usporediva s literaturnom vrijednošću za homologni holoprotein *BsMntR* iz bakterije *B. subtilis* (32,1 Å) za koji se vjeruje da je u odgovarajućoj konformaciji za vezanje u dva velika utora na DNA koja su međusobno u pravilu udaljena 34 Å.^{35,36} Za usporedbu, prosječna udaljenost Lys41-Lys41 tijekom MD simulacije u trajanju od 600 ns za holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice je 35 ± 2 Å. Ovime je pokazano da nije bilo dovoljno samo „otopiti“ kristalnu strukturu 6KTB *in silico*, niti uvesti ione mangana umjesto magnezija, već je bilo nužno ione mangana povezati kovalentno. Dakle, upravo vezni parametri za ione mangana u holoproteinu nužni su kako bi se struktura dovela u aktivnu konformaciju za koju se smatra da ima značajan afinitet za vezanje na DNA te protein obavlja svoju funkciju transkripcijskog faktora. U dalnjim koracima istraživanja, za holoprotein će se koristiti vezni parametri s dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice te će se jednoznačno navoditi kao holoprotein.



Slika 4.6. a) Strukture *HhMntR* dobivene nakon 740. ns MD simulacije s naznačenom udaljenošću između C_α atoma Lys41-Lys41. Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici (**zeleno**). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (**crveno**). b) Prikaz iz donje perspektive. c) Udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41 u vremenu. d) Kutijasti dijagram (engl. *box-plot*) udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41 sa srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom.

Dodatno, da bi se potvrdila pretpostavka da je mjerjenje udaljenosti između C_α atoma Lys41-Lys41 dovoljno dobra mjera koja sugerira i udaljenost DNA-veznih domena, korelacija je provjerena u slučaju holoproteina s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici (slika 4.7). Dobivena korelacija s $R^2 = 0,94$ jasno sugerira da je Lys41-Lys41 praktična i pouzdana mjera za praćenje udaljenosti dvaju DNA-veznih domena, a primjenjuje se i u literaturi¹⁰ te time olakšava usporedbe.

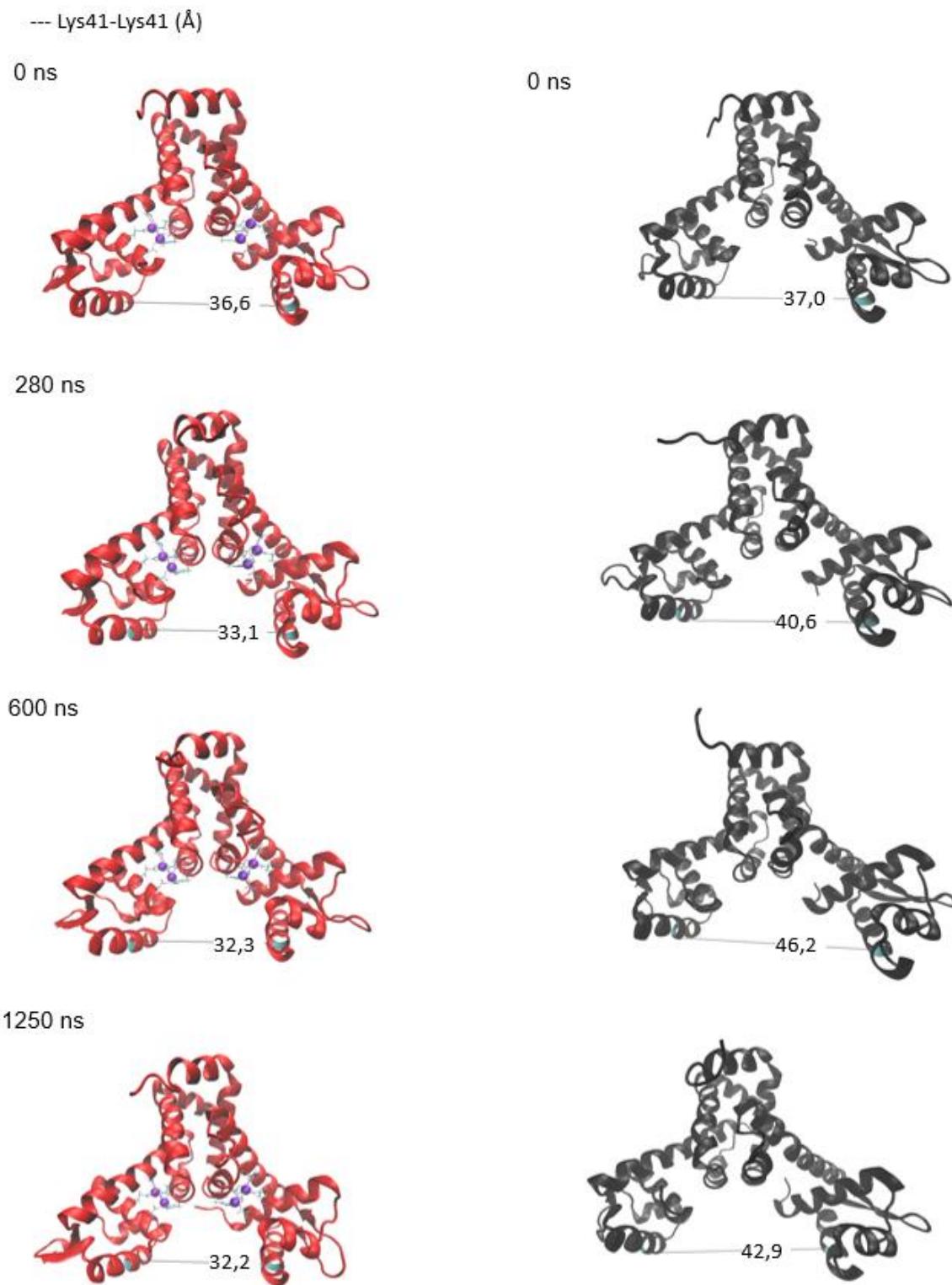


Slika 4.7. Udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41 i centra mase DNA-veznih domena (DBD) u holoproteinu s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ u drugoj podjedinici.

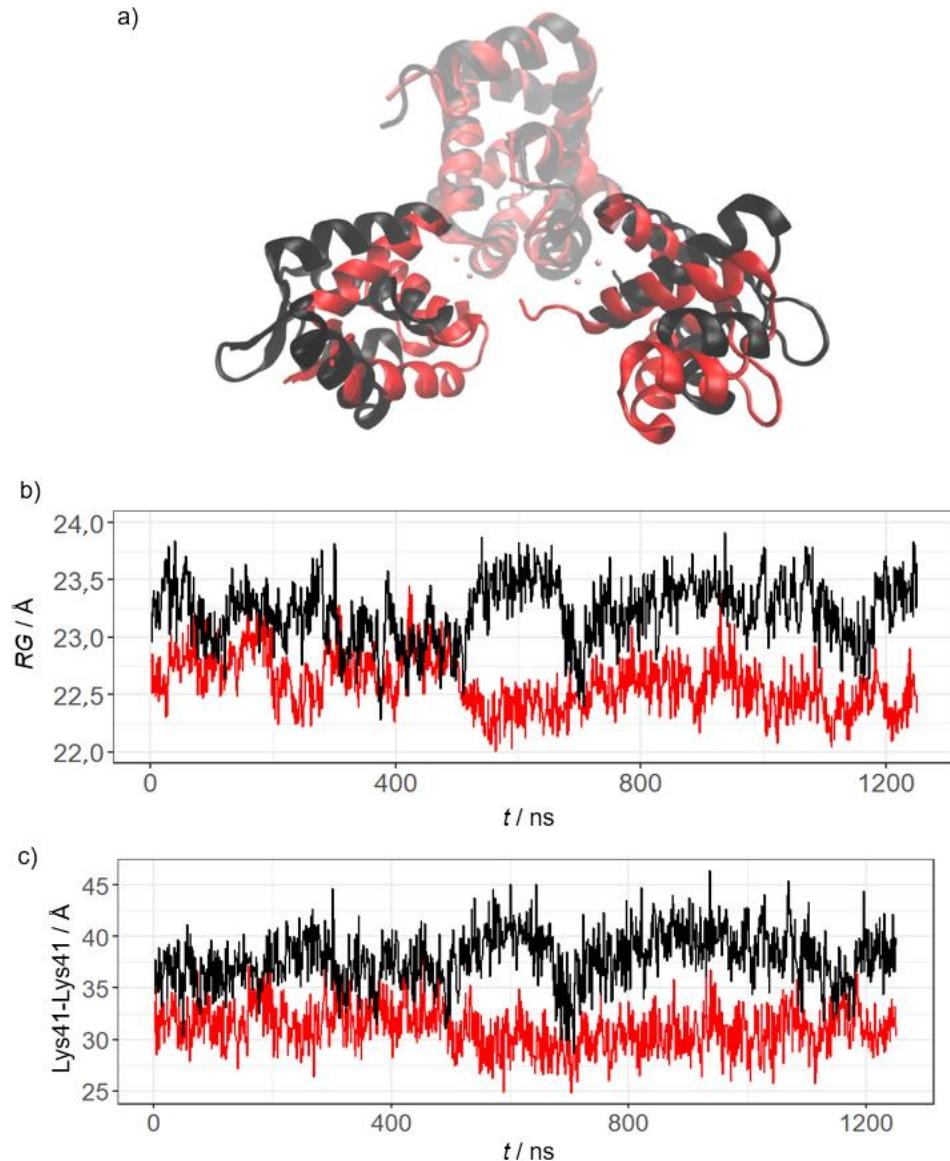
4.2. Konformacijska analiza specifičnosti holo- i apoproteina *HhMntR* u MD simulacijama

4.2.1. Dinamička svojstva holo- i apoproteina *HhMntR*

Za proučavanje dinamike apoproteina *HhMntR* korištena je kristalna struktura oznake 6KTA. Nakon MD simulacije u trajanju od 1250 ns provedene su analize trajektorije u svrhu usporedbe sa strukturom holoproteina s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice, koji se u dalnjem tekstu navodi jednoznačno kao holoprotein *HhMntR*. Već vizualnom inspekcijom trajektorija jasno je da dolazi do drugačijeg obrasca ponašanja apoproteina u odnosu na holoprotein. Iako počinju od sličnih konformacija, tijekom simulacije dolazi do značajnih razlika u konformacijama između apoproteina i holoproteina. Te razlike prvenstveno se odražavaju u položaju DNA-veznih domena koje se tijekom MD simulacije apoproteina međusobno udaljavaju, dok se kod holoproteina međusobno približavaju (slika 4.8.). Vizualno uočeno međusobno udaljavanje DNA-veznih domena kvantificirano je mjeranjem prosječne udaljenosti C_α atoma Lys41-Lys41 tijekom MD simulacije koja za apoprotein iznosi 40 ± 2 Å, a za holoprotein 33 ± 2 Å. Dakle, iako oba proteina ulaze u simulaciju s gotovo jednakim konformacijama kod kojih je udaljenost C_α atoma Lys41-Lys41 približno 37 Å u oba slučaja, tijekom MD simulacija ta se udaljenosti značajno mijenja između apoproteina i holoproteina. Uočena razlika u skladu je s teoretskim prepostavkama o funkciji apoproteina i holoproteina *HhMntR*-a. Naime, udaljenost kod holoproteina odgovara udaljenosti dva susjedna velika utora kod DNA od 34 Å,^{35,36} dok je kod apoproteina udaljenost prevelika da se obje DNA-vezne domene istodobno smjeste u dva susjedna velika utora DNA. Uočene razlike dodatno potvrđuju i prosječne vrijednosti radiusa giracije tijekom simulacija koje iznose $23,2 \pm 0,3$ Å za apoprotein i $22,5 \pm 0,2$ Å za holoprotein (slika 4.9.).



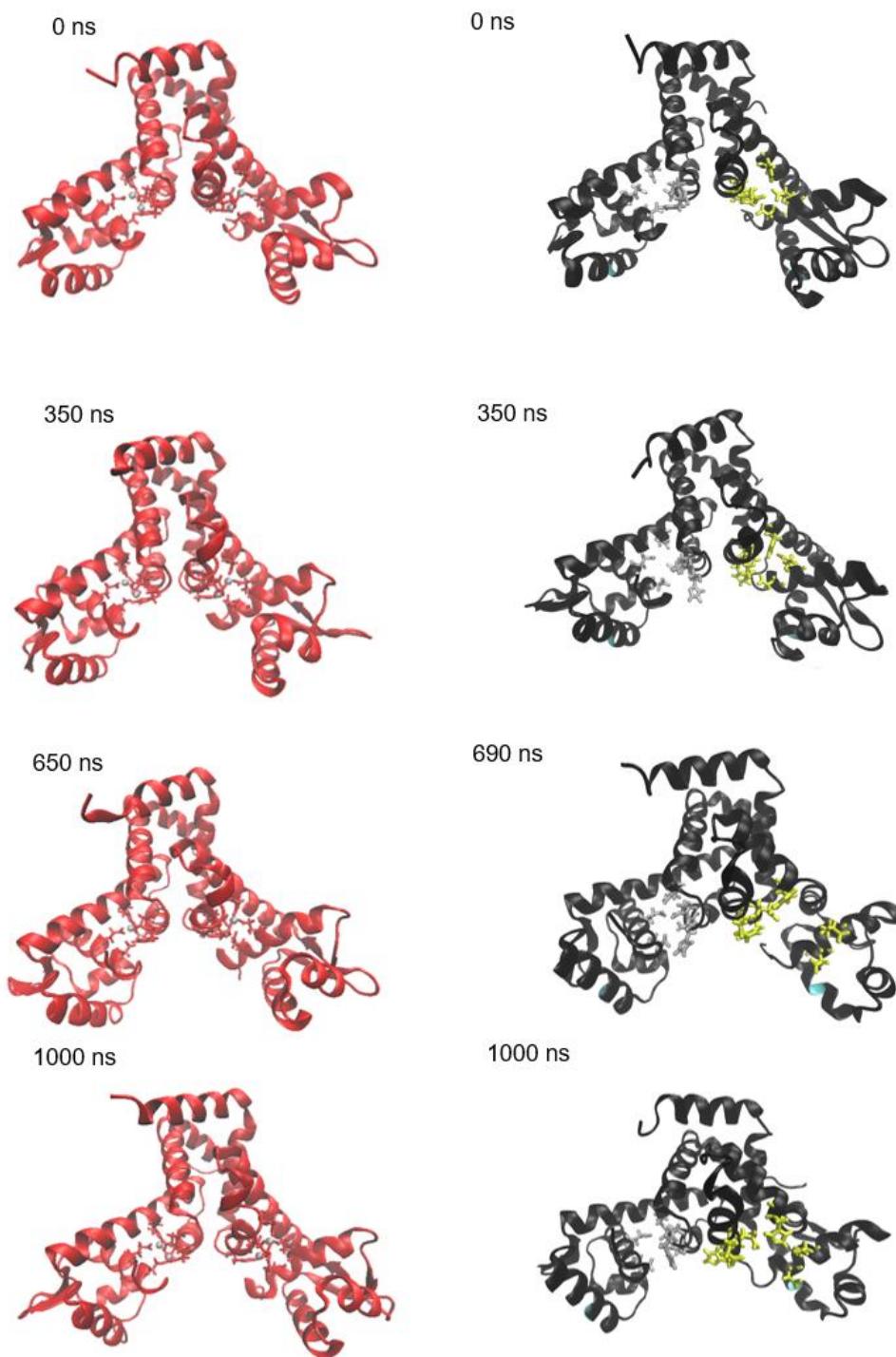
Slika 4.8. Strukture *HhMntR* dobivene nakon 280, 600 i 1250 ns MD simulacija (kubična kutija veličine 10 Å). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (crveno). Apoprotein (crno). Udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41 prikazana je sivom crtom i brojčanom vrijednošću izraženom u Å.



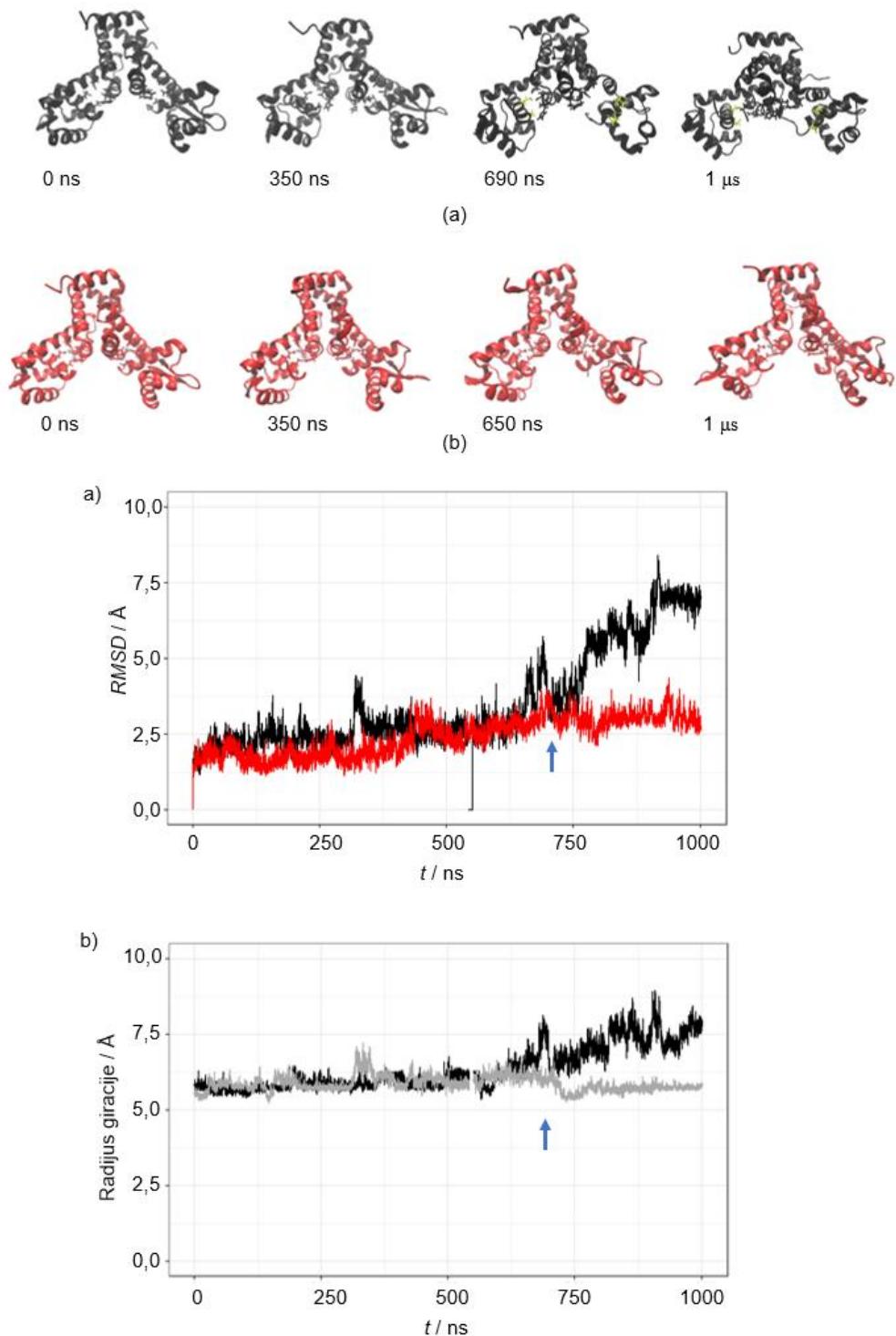
Slika 4.9. a) Sravnjene strukture holoproteina s veznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice (crveno) i apoproteina (crno) na kraju MD simulacija ukupnog trajanja 1250 ns (kubična kutija veličine 10 Å). Promjena b) radijusa giracije i c) udaljenost između C α atoma Lys41-Lys41 u dvije DNA-vezne domene tijekom MD simulacija navedenih struktura.

4.2.2. Dinamička svojstva holo- i apoproteina HhMntR u povećanoj simulacijskoj kutiji

Odabir veličine simulacijske kutije može utjecati na rezultat simulacije. Kako bi se provjerila dostatnost veličine kutije tijekom simulacija kod kojih su protein i rub kutije bili udaljeni 10 Å, drugi skup simulacija ponovljen je u kubičnoj kutiji u kojoj su protein i rub kutije udaljeni 20 Å (slika D2). Također, time se dobivaju dodatne replike simulacije sustava koje počinju iz različitog lokalnog minimuma. Dok holoprotein pokazuje generalno ponašanje koje je u skladu i s prethodno opisanom simulacijom (slika D3, tablica D1), kod apoproteina dolazi do dezintegracije veznog mjesta (slika 4.10). Vezno mjesto u nedostatku metalnih iona na okupu drže vodikove veze između bočnih ograna aminokiselina koje inače vežu ione Mn²⁺.³³ No, očito produžene simulacije mogu dovesti i do njihovog prekidanja i potpune promjene izgleda veznog mjesta, pa i strukture proteina. Da upravo promjena u strukturi veznog mjesta utječe na cijelu strukturu proteina, vidi se iz promjene radijusa giracije veznog mjesta i RMSD-a cijelog proteina tijekom simulacije koji pokazuju jasan skok u vrijednostima nakon 600 ns trajanja MD simulacije (slika 4.11).



Slika 4.10. Strukture *HhMntR* dobivene nakon 0, 350, 650/690 i 1000 ns MD simulacije (kubična kutija veličine 20 Å). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (**crveno**). Apoprotein (**crno**) s bočnim ograncima aminokiselina koje vežu ione Mn²⁺ u lancu A (**sivo-vezno mjesto A**) i lancu B (**žuto-vezno mjesto B**).

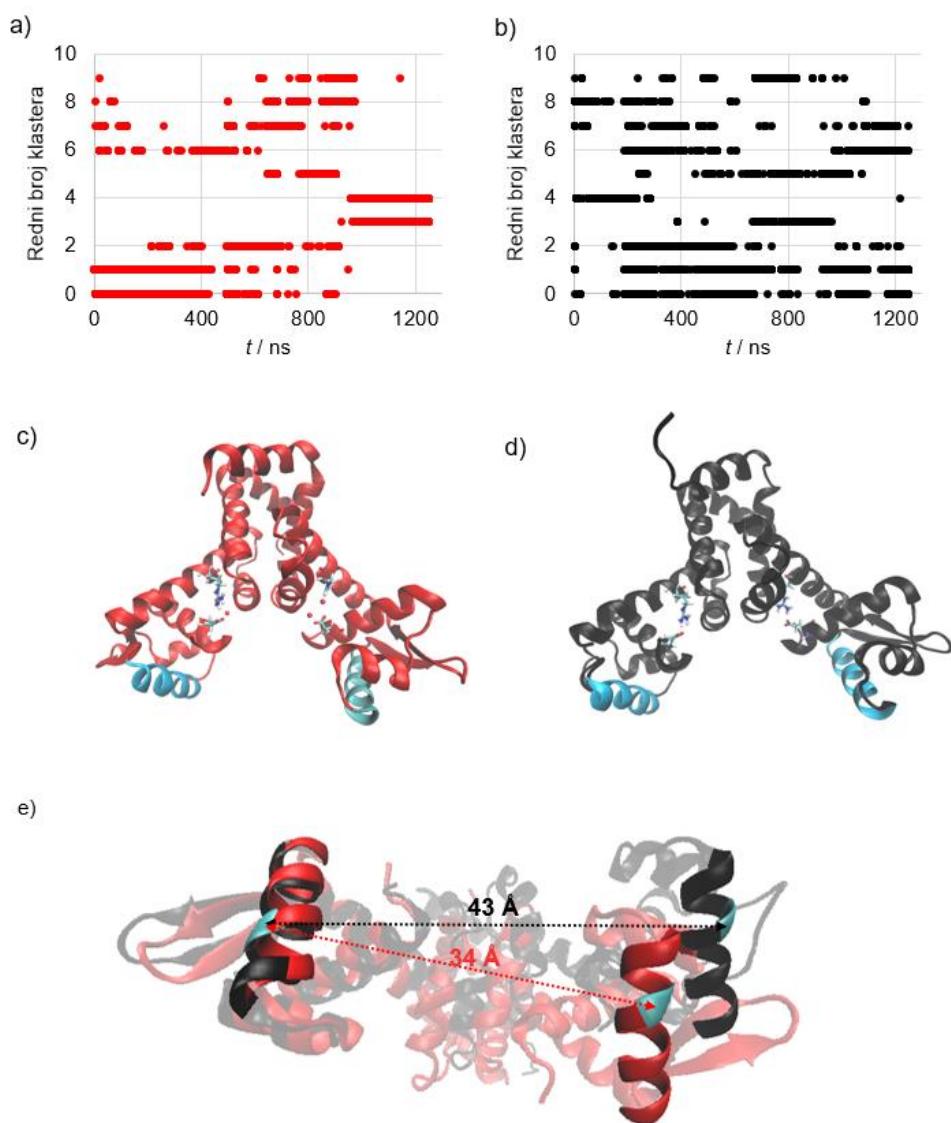


Slika 4.11. RMSD profil apoproteina (crno) i holoproteina (crveno) i b) radijus giracije veznog mesta A (sivo) i B (crno) u apoproteinu tijekom MD simulacija provedenih u kubičnoj kutiji veličine 20 Å. Radijus giracije veznog mesta izračunat je za aminokiseline Asp8, Glu11, His77, Glu99, Glu102 i His103. Skok u RMSD i RG vrijednostima označen je plavom strelicom. Prekid nakon 500 ns (crna crta/praznina) je uzrokovani tehničkom greškom pohranjivanja trajektorije za vrijeme MD simulacije i ne utječe na cijelokupnu trajektoriju.

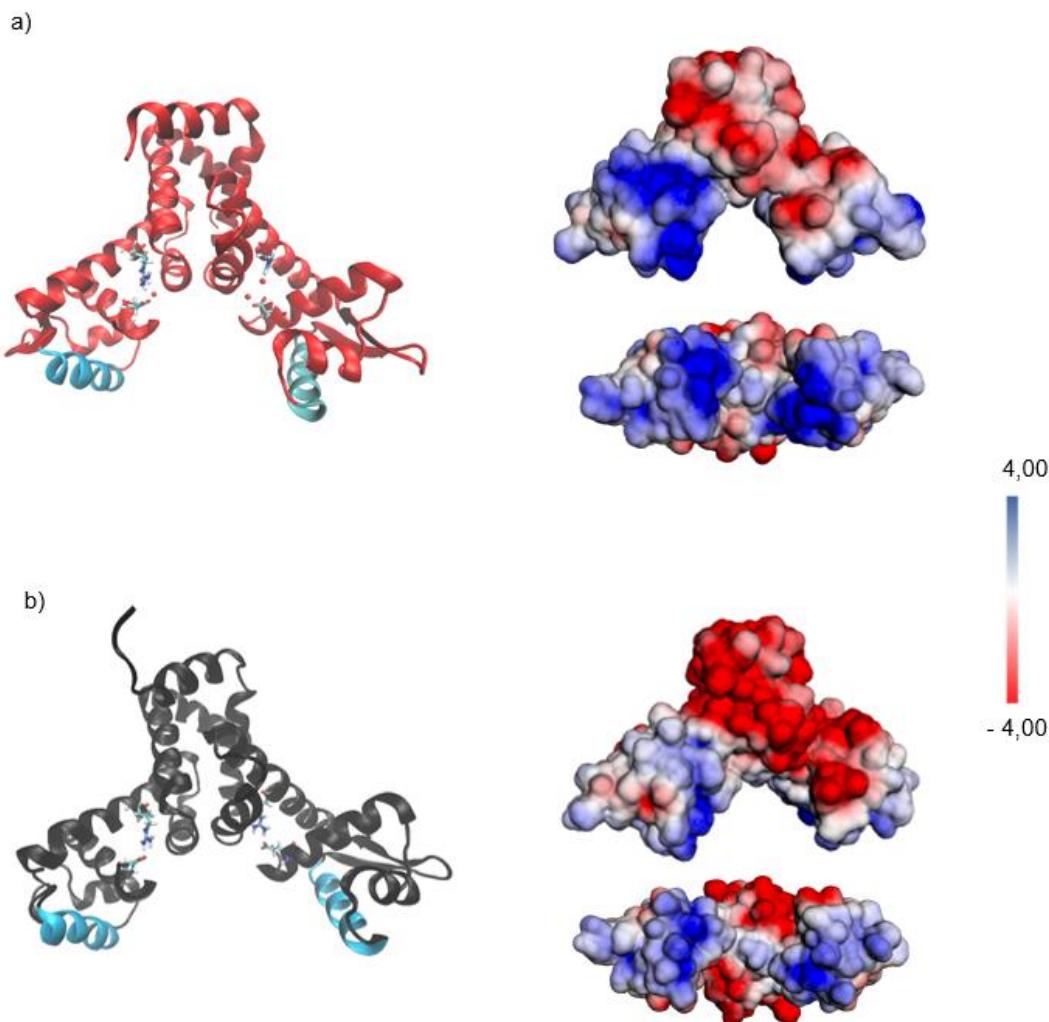
4.2.3. Rezultati klasterske analize holo- i apoproteina HhMntR

Na MD simulacijama u trajanju od 1250 ns provedena je klasterska analiza te su konformacije sortirane u 10 grupa na osnovu *RMSD* vrijednosti. Prema zastupljenosti klastera u vremenu vidljivo je da apoprotein češće mijenja konformacije tijekom simulacija, dok se holoprotein duže zadržava u sličnim konformacijama (slika 4.12.a,b). Proučavajući detaljnije strukturu referentne konformacije najzastupljenijeg klastera (centroida) s rednim brojem 0 uočava se da ona ima karakteristike opažene za holoprotein tijekom MD simulacije. Klaster 0 holoproteina ima suženiju konformaciju s DNA-veznim domenama koje se nalaze bliže jedna drugoj (slika 4.12.c,e) u odnosu na početnu konformaciju proteina (slika 4.1). Kod apoproteina dolazi do širenja konformacije i DNA-vezne domene su udaljene 43 Å. Ta udaljenost značajno je veća od 34 Å što bi odgovaralo teoretskoj udaljenosti dva velika utora u DNA.^{35,36}

Analiza elektrostatskog potencijala provedena je na strukturi centroida najzastupljenijeg klastera s rednim brojem 0 te je jasno uočljiva razlika između holoproteina i apoproteina (slika 4.13). U holoproteinu, DNA-vezne domene obiluju pozitivnim nabojem. Osim toga, prisutni ioni mangana dodatno pridonose ukupnom pozitivnom naboju koji je prvenstveno koncentriran u području DNA-veznih domena, što zajedno rezultira povećanim afinitetom holoproteina prema negativno nabijenoj DNA.



Slika 4.12. Prikaz zastupljenosti klastera u vremenu za a) holoprotein i b) apoprotein u MD simulacijama u trajanju od 1250 ns. Struktura centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za c) holoprotein i d) apoprotein. e) Udaljenost između C_{α} atoma Lys41-Lys41 u dvije DNA-vezne domene u klasteru 0 za odgovarajući protein.

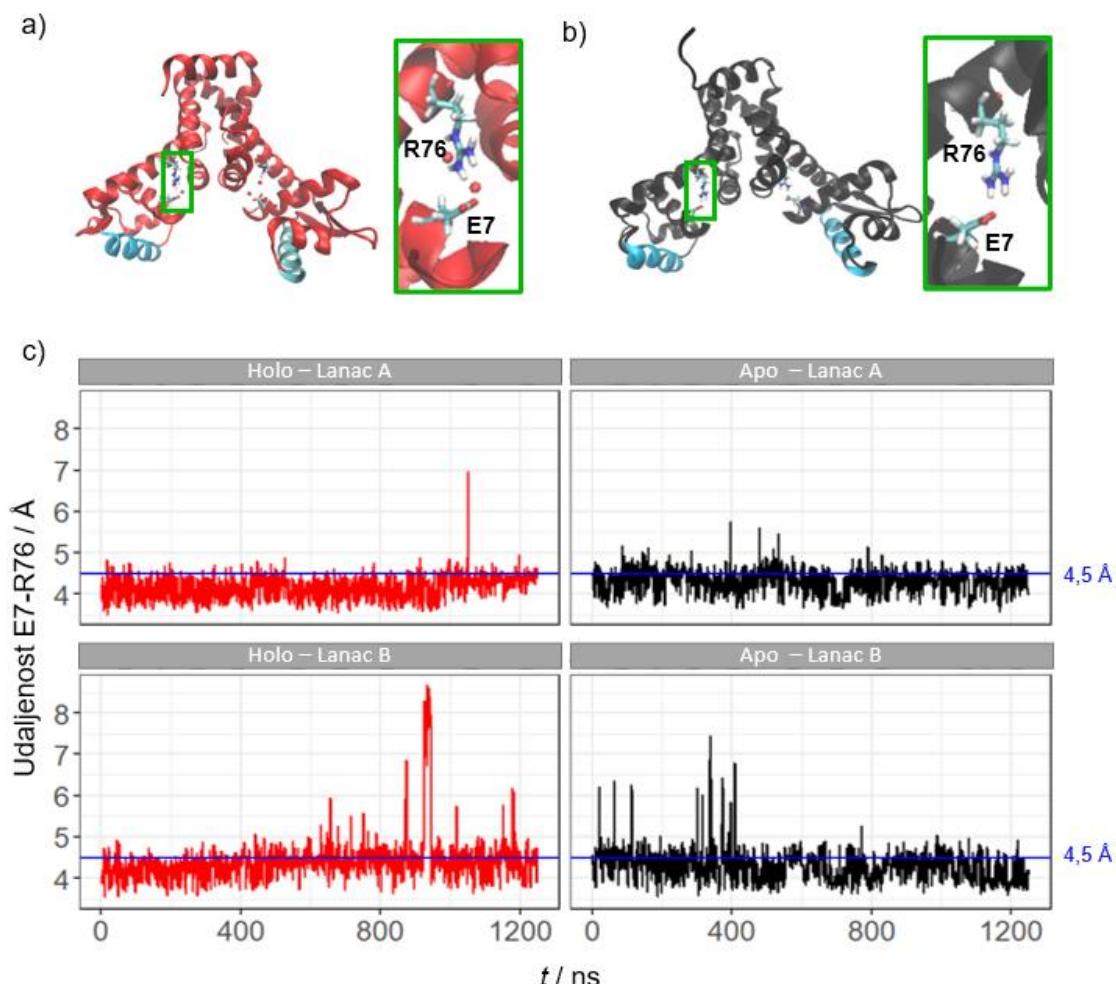


Slika 4.13. Elektrostatski potencijal (mV) strukture centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za a) holoprotein i b) apoprotein. Na slikama lijevo, DNA-veznice prikazane su tirkizno plavom bojom, aminokiseline veznog mesta prikazane su modelom štapića, a manganovi ioni kao crvene kuglice.

4.2.4. Mreža nekovalentnih interakcija u MD simulacijama holo- i apoproteina

Intramolekulske nekovalentne interakcije, prvenstveno vodikove veze, istražene su u sustavu apo- i holoproteina tijekom MD simulacija u trajanju od 1250 ns. Pronađene su brojne vodikove veze s visokom zastupljenostišću tijekom simulacija (tablice D2 i D3), osobito između bočnih ogranaka udaljenih za 4 aminokiseline jer oni održavaju sekundarnu strukturu α -zavojnice proteina koja je dominantna u *HhMntR*-u. Visoko zastupljena vodikova veza u oba sustava je Glu7-Arg76 (slika 4.14). Osim visoke zastupljenosti, ono što ju čini osobito zanimljivom je njen položaj: Glu7 dio je DNA-vezne domene, a Arg76 dimerizacijske domene proteina. Također, sama veza smještena je blizu veznog mesta za Mn^{2+} . Prosječne udaljenosti između

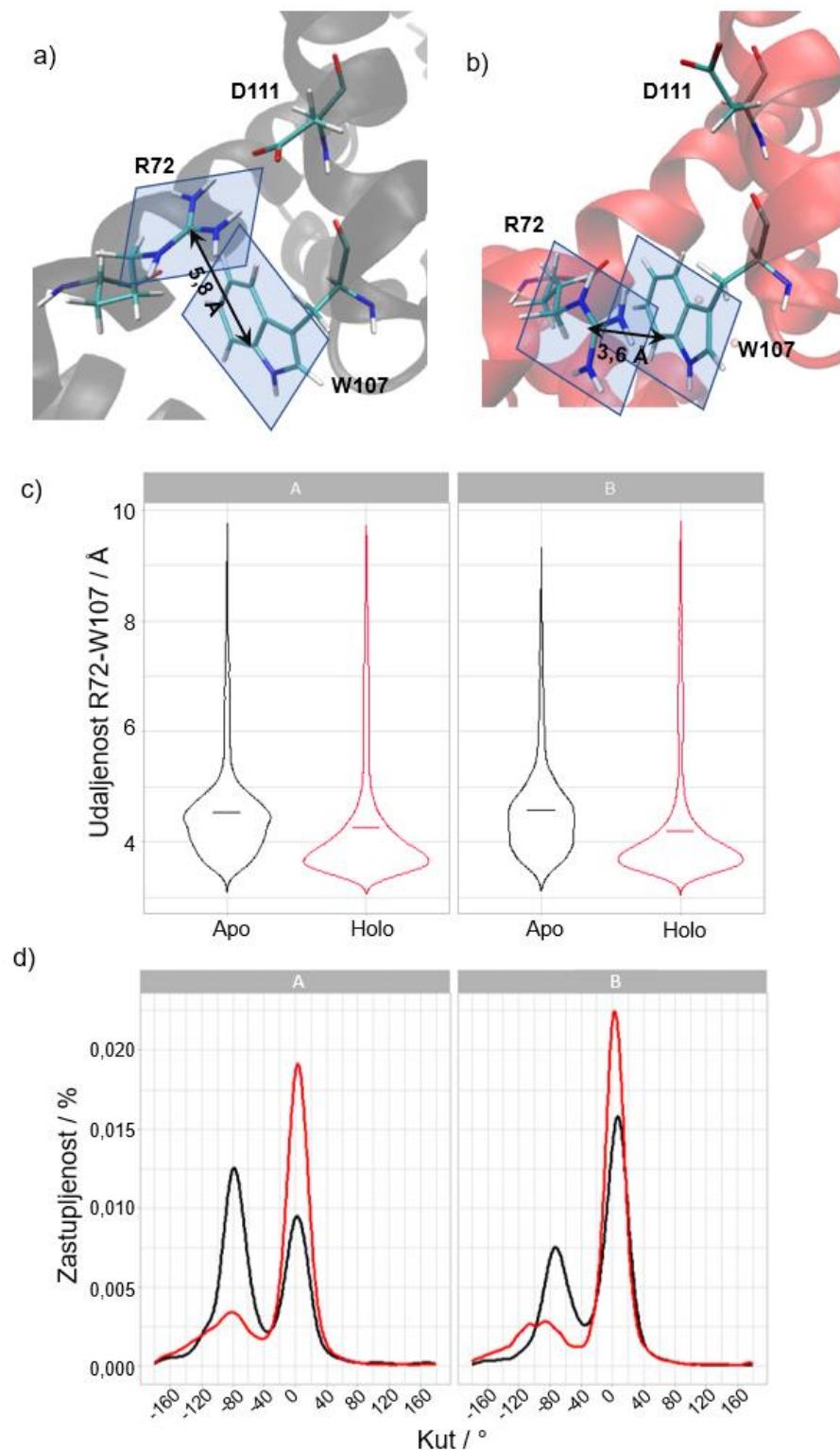
karboksilnog ugljika bočnog ogranka Glu7 i gvanidinskog ugljika Arg76 gotovo su jednake u obje proučavane strukture: $4,2 \pm 0,3 \text{ \AA}$ (holoprotein, lanac A), $4,4 \pm 0,5 \text{ \AA}$ (holoprotein, lanac B), $4,3 \pm 0,3 \text{ \AA}$ (apoprotein, lanac A), te $4,3 \pm 0,4 \text{ \AA}$ (apoprotein, lanac B). Samim time sugerira se njezina važnost za održavanje forme i funkcije proteina.



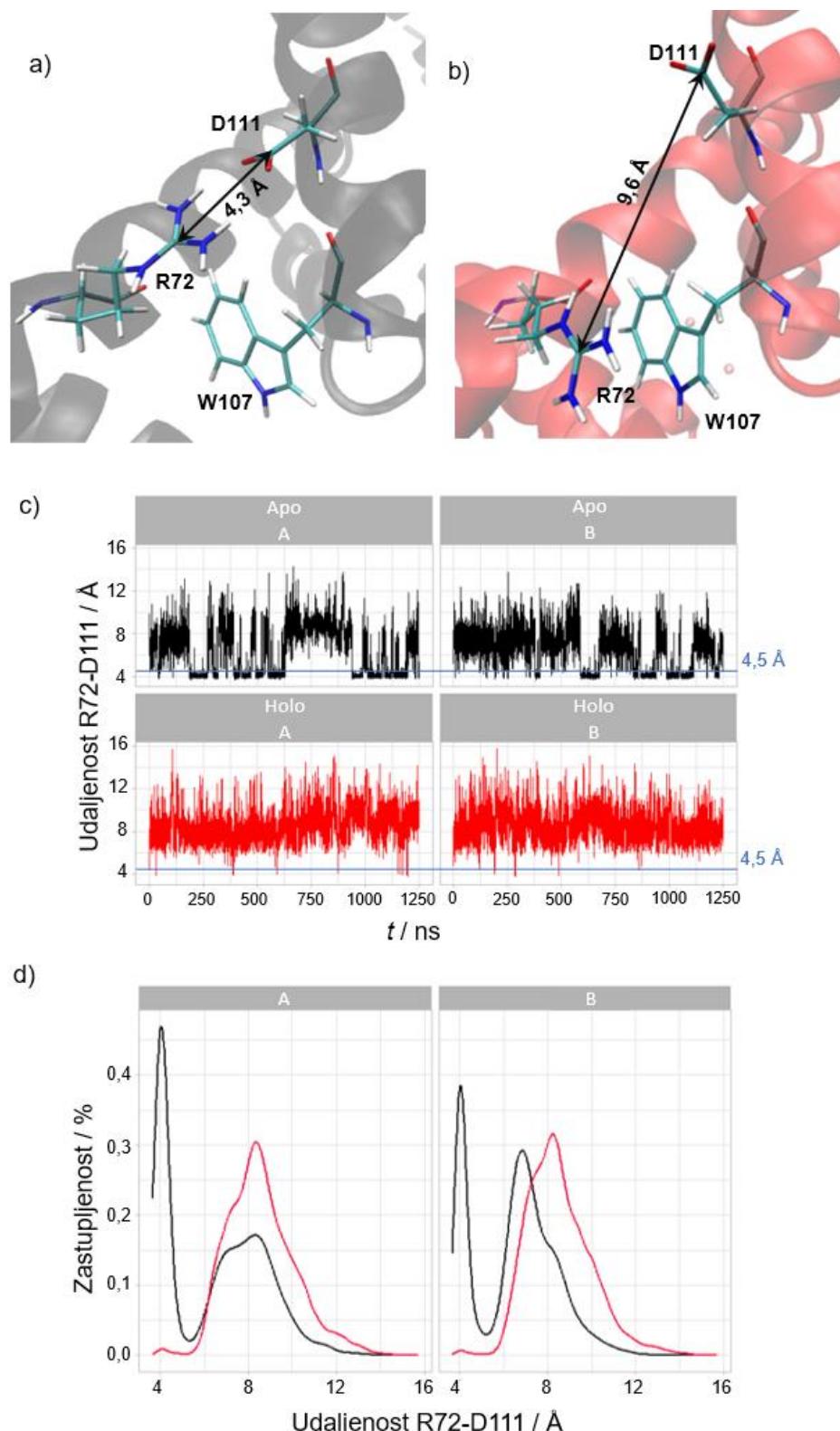
Slika 4.14. Položaji Glu7 (E7) i Arg76 (R76) u strukturi centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za a) holoprotein i b) apoprotein. Zelenim okvirom označen je uvećani dio strukture. c) Udaljenost između karboksilnog ugljika bočnog ogranka Glu7 i gvanidinskog ugljika Arg76 za vrijeme 1250 ns MD simulacije. Na svim panelima apoprotein je označen kao *apo* (crno), a holoprotein *holo* (crveno). A i B označavaju lance, odnosno monomere proteina.

Pomnijom pretragom moguće je prepoznati i interakcije koje su specifične za holoprotein. U MD simulaciji holoproteina Arg72, smješten na rubu dvije domene, provodi značajan dio simulacijskog vremena u blizini Trp107, na udaljenosti od približno 4 Å koja je povoljna za ostvarivanje nekovalentne interakcije (slika 4.15). S obzirom na geometriju bočnih ogranaka, kada dvije plohe koje zatvaraju funkcionalne skupine stoje paralelno jedna drugoj, ovu interakciju moguće je okarakterizirati kao kation- π interakciju. Pozitivno nabijeni arginin i elektronima bogat π -sustav aromatskog triptofana stupaju u interakciju koja se smatra jednom od najjačih nekovalentnih elektrostatskih interakcija u proteinima.⁷⁴ U apoproteinu, bočni ogranci Arg72 i Trp107 mogu se također naći relativno blizu, na približnoj udaljenosti od 4,5 Å, ali zauzimaju dvije različite konformacije. U jednom slučaju dominira paralelna konformacija s prostornim kutem 0° gdje može nastati kation- π privlačenje, a u drugom je prostorni kut 80°, što značajno oslabljuje ovu interakciju.

Dodatna interakcija koja razlikuje apo- i holoprotein je vodikova veza između Arg72 i Asp111 koja je uglavnom prisutna tijekom MD simulacija apoproteina (slika 4.16). Iako nije prisutna tijekom čitave MD simulacije, Arg72 i Asp111 povremeno se približavaju na udaljenost od oko 4 Å što je optimalno za snažnu interakciju, dok su u drugim trenutcima udaljeni približno 7 Å. U holoproteinu, ovi bočni ogranci uglavnom se nalaze na udaljenosti od 8 Å, što nije povoljno za ostvarivanje interakcije, zbog čega je Arg72-Asp111 interakcija specifična za apoprotein.



Slika 4.15. Položaji ravnina u kojima leže gvanidinska skupina Arg72 (R72) i indolna skupina Trp107 (W107) u strukturi centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za a) holoprotein i b) apoprotein. c) Udaljenost između gvanidinskog ugljika Arg72 i centra mase bočnog ogranka Trp107 tijekom 1250 ns MD simulacije. d) Zastupljenost prostornog kuta između ravnina koje zatvaraju planarni bočni ogranci Arg72 i Trp107. Na svim panelima apoprotein je označen kao *apo* (crno), a holoprotein *holo* (crveno). A i B označavaju lance, odnosno monomere proteina.



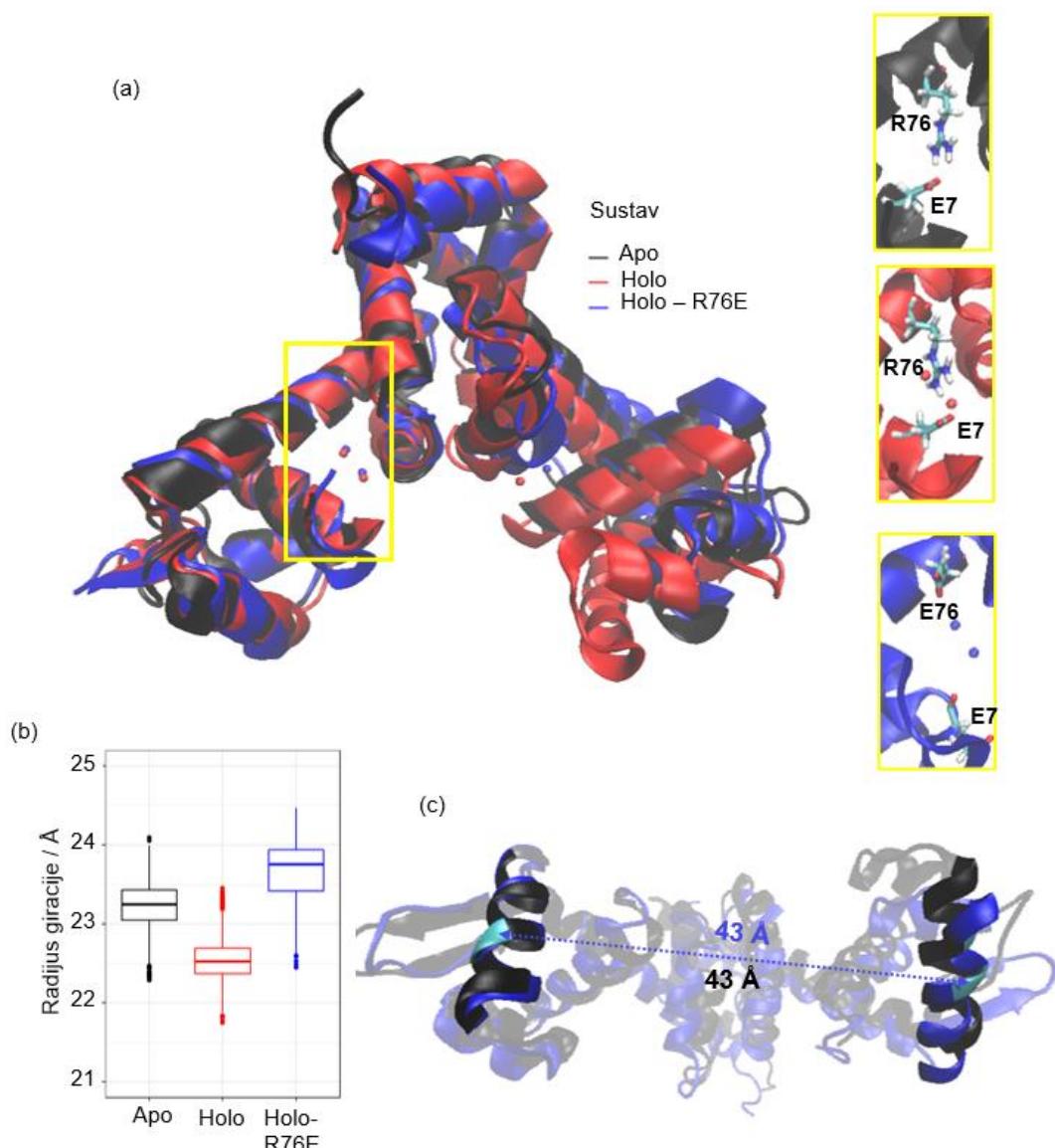
Slika 4.16. Položaji Arg72 (R72), Trp107 (W107) i Asp111 (D111) u strukturi centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za a) holoprotein i b) apoprotein. c) Udaljenost između gvanidinskog ugljika Arg72 i C γ atoma Asp111 tijekom 1250 ns MD simulacije. d) Zastupljenost udaljenosti opisanih pod c). Na svim panelima apoprotein je označen kao *apo* (crno), a holoprotein *holo* (crveno). A i B označavaju lance, odnosno monomere proteina.

4.3. Konformacijska analiza mutanata holoproteina *HhMntR*

4.3.1. Dinamička svojstva mutanta holoproteina R76E

Kako bi se potvrdila funkcija vodikovih veza s visokom zastupljeničću, pripremljene su strukture holoproteina u kojima su ključni bočni ogranci mutirani. Kako bi se utvrdila uloga visoko zastupljene nekovalentne interakcije Glu7-Arg76 (odломak 4.2.4.), provedeno je 500 ns MD simulacije holoproteina s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice, pri čemu je pozitivno nabijeni bočni ogranak Arg76 (R76) mutiran u negativno nabijeni Glu76 (E76). Blizina istoimenih naboja omogućila je međusobno odbijanje ta dva bočna ogranka, što je rezultiralo izostankom nekovalentne interakcije na sučelju dimerizacijske i DNA-vezne domene. Vizualizacija dobivene trajektorije za mutant holoproteina R76E (kraćeg naziva holomutant-R76E), te strukture centroida najzastupljenijeg klastera dobivenog klasterskom analizom, otkrila je visoku strukturalnu sličnost apoproteina i holomutanta-R76E.

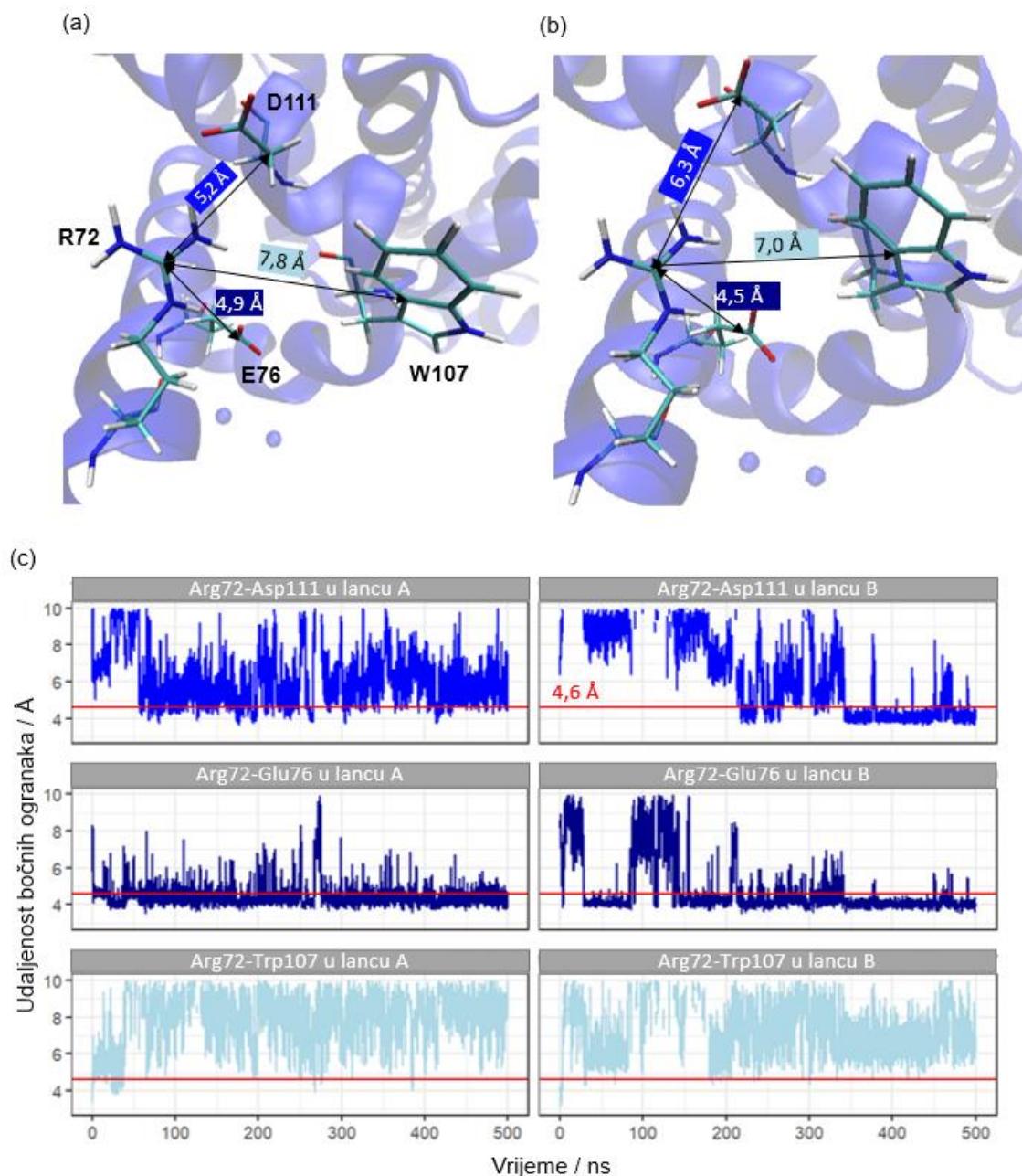
Međusobno udaljavanje DNA-veznih domena tijekom MD simulacija holomutanta R76E, koje se može opisati kao širenje konformacije proteina, kvantificirano je mjerenjem radiusa giracije ($23,7 \pm 0,4$ Å, slika 4.17) te udaljenosti Lys41-Lys41 (43 ± 3 Å). Obje vrijednosti veće su od prosječnih vrijednosti određenih za apo- i holoprotein (odломak 4.2.1.). Time je potvrđeno da holomutant-R76E gubi formu holoproteina bez obzira na prisutne ione Mn²⁺ u veznom mjestu te pokazuje veću sličnost s apoproteinom.



Slika 4.17. Analiza MD simulacija holomutanta-R76E. a) Položaji Glu7 (E7) i Arg76 (R76) te mutiranog Glu76 (E76) u strukturi centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za holoprotein (crveno), apoprotein (crno), te holomutant-R76E (plavo). Žutim okvirom označen je uvećani dio strukture. b) Kutijasti dijagram radijusa giracije za navedene strukture. c) Udaljenost između C_{α} atoma Lys41-Lys41 u dvije DNA-vezne domene u klasteru 0 za odgovarajući protein.

Posebno je zanimljivo razmotriti prisutnost Glu76 u strukturi, s obzirom na to da unosi dodatni negativni naboj u područje na sučelju dimerizacijske i DNA-vezne domene. Glu76 stupa u interakciju s Arg72 koji se pritom odmiče od Trp107, što onemogućuje nastanak kation- π interakcije specifične za holoprotein (slika 4.18). S druge strane, u holomutantu-R76E značajno je zastupljena interakcija Arg72-Asp111, specifična za apoprotein. Time se dodatno

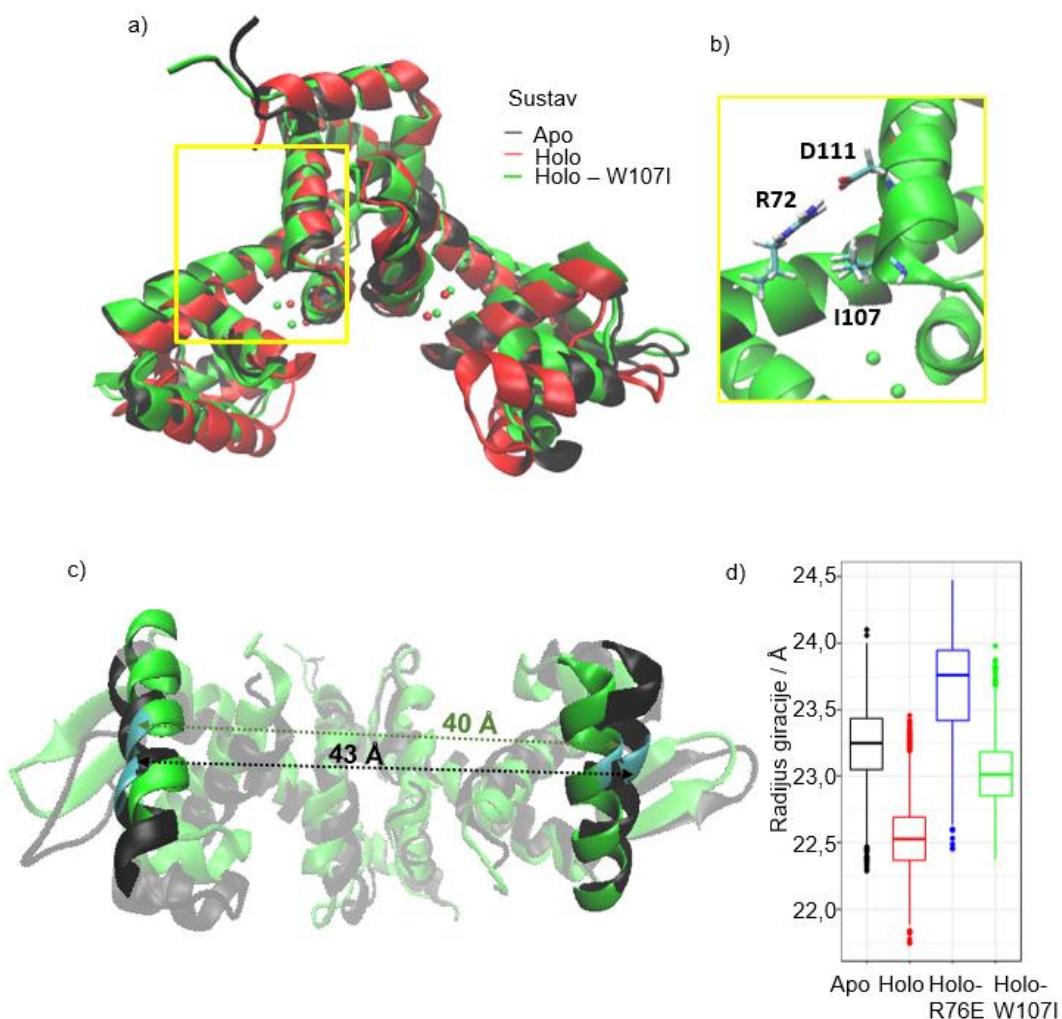
potvrđuje da je mutacija aminokiseline koja sudjeluje u ključnoj nekovalentnoj interakciji dovela holoprotein u formu za koju je malo vjerojatno da bi se uspješno vezala na DNA jer je sličnija apoproteinu. Dakle, nekovalentna interakcija Glu7-Arg76 ima ključnu ulogu u održavanju pravilne forme i funkcije proteina *HhMntR*.



Slika 4.18. Položaji Arg72 (R72), Glu76 (E76), Trp107 (W107) i Asp111 (D111) u strukturi centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za holomutant-R76E u a) lancu A i b) lancu B. c) Udaljenosti između različitih parova aminokiselina tijekom MD simulacije holomutanta-R76E određene korištenjem sljedećih referentnih atoma: gvanidinskog atoma ugljika Arg72, C_γ atoma Asp111, C_δ atoma Glu76 te centra mase Trp107.

4.3.2. Dinamička svojstva mutanta holoproteina W107I

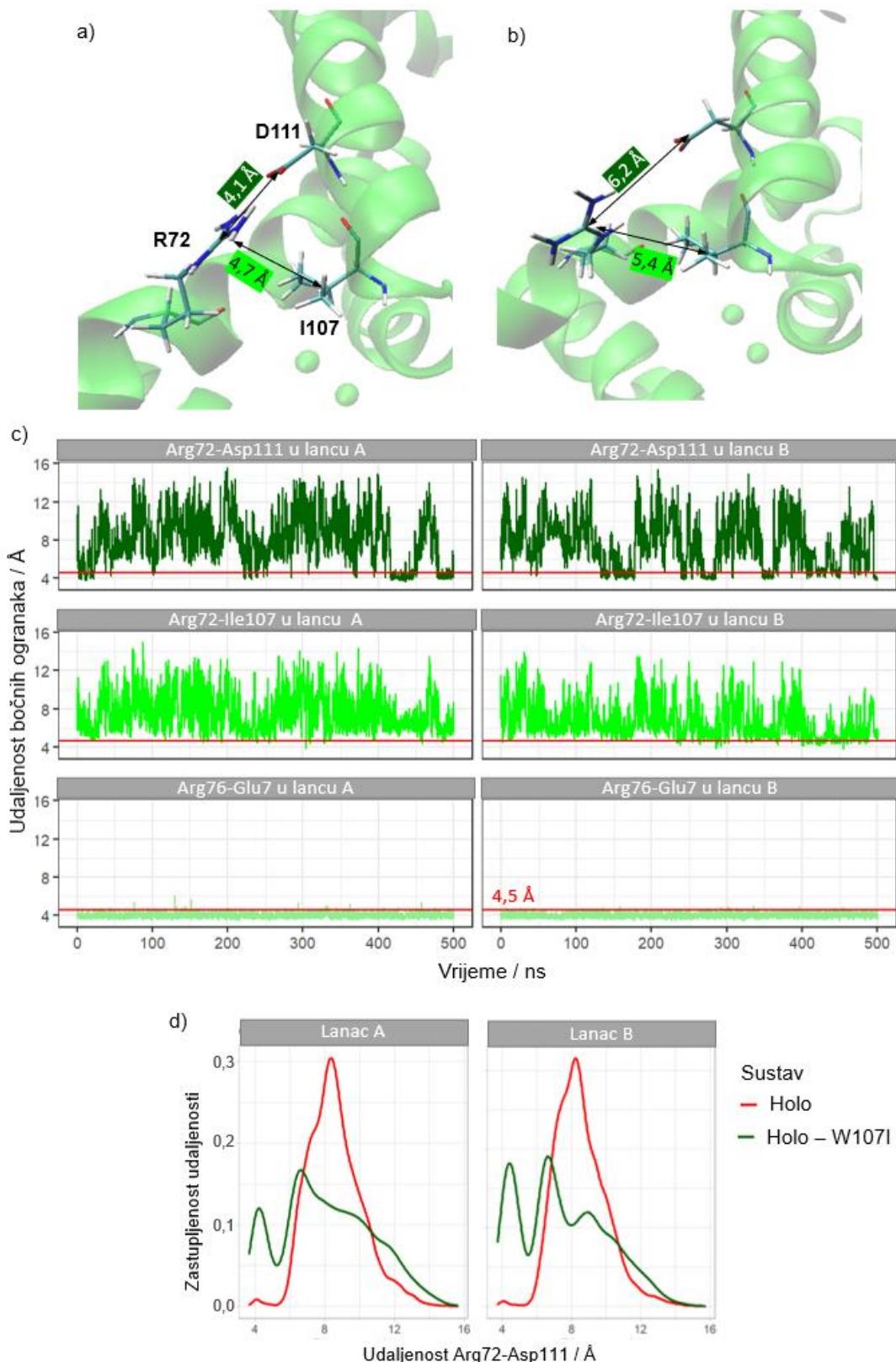
Kako bi se pobliže proučila uloga interakcijskog centra Arg72-Trp107-Asp111, provedeno je 500 ns MD simulacije strukture holoproteina s veznim parametrima za dva iona Mn^{2+} u obje podjedinice u kojem je aromatski bočni ogrank Trp107 mutiran u nepolarni alifatski Ile107 (I107), u dalnjem tekstu holomutant-W107I. Time se nije promijenio naboј u sustavu, ali je onemogućena kation- π interakcija prisutna u holoproteinu. MD simulacije holomutanta-W107I pokazuju dinamiku sličnu onoj kod holomutanta-R76E i apoproteina (slika 4.19) gdje je opaženo širenje cjelokupne konformacije proteina i udaljavanja DNA-veznih domena.



Slika 4.19. Analiza MD simulacije mutanta holoproteina W107I. a) Položaji Arg72 (R72) i Asp111 (D111) te mutiranog Ile107 (I107) u strukturi centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za holoprotein (crveno), apoprotein (crno) te holomutant-W107I (zeleno). Žutim okvirom označen je uvećani dio strukture pod b). c) Udaljenost između C_{α} atoma Lys41-Lys41 u dvije DNA-vezne domene u klasteru 0 za odgovarajući protein. d) Kutijasti dijagram radijusa giracije za nevedene strukture.

Dodatna zanimljivost je prisutnost interakcije Arg72-Asp111 koja je inače karakteristika apoproteina i ne bi se očekivala u MD simulaciji holoproteina (slika 4.20). S obzirom na to da u holomutantu-W107I Arg72 nema drugog partnera s kojim bi stupio u interakciju, on ostvaruje interakciju s Asp111 te time dodatno potvrđuje sličnost s apoproteinom. Vrlo važna interakcija Glu7-Arg76 je i dalje očuvana te je prisutna u obje podjedinice za vrijeme trajanja cijele MD simulacije.

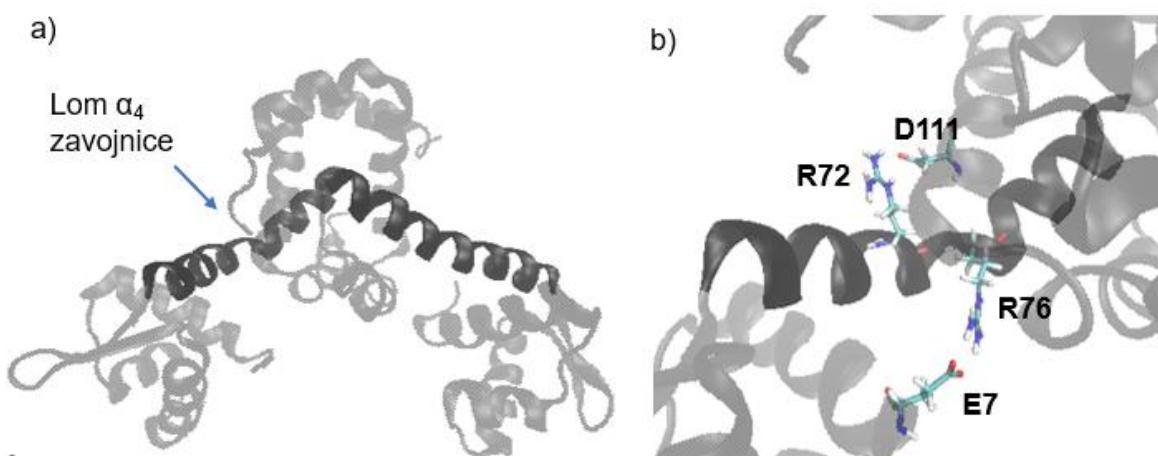
Sumarno, ovim rezultatima je potvrđena uloga interakcijskog centra Arg72-Trp107-Asp111 u stabilizaciji različitih formi proteina HhMntR. Kation- π interakcija Arg72-Trp107 primarno nastaje u holoproteinu, dok je apoprotein karakteriziran interakcijom Arg72-Asp111. Ta interakcija uočena je i u holomutantu-W107I koji, unatoč prisutnim ionima Mn²⁺ s veznim parametrima, tijekom MD simulacije zauzima formu sličniju apoproteinu što ga čini potencijalno inaktivnim u bakterijskoj stanici.



Slika 4.20. Položaji Arg72 (R72), Asp111 (D111) i Ile107 (I107) u strukturi centroida najzastupljenijeg klastera (klaster 0) za holomutant-W107I u a) lancu A i b) lancu B. c) Udaljenosti između bočnih ogranačaka različitih parova aminokiselina tijekom MD simulacija određene korištenjem sljedećih referentnih atoma: gvanidinskog ugljika Arg72, C_γ atoma Asp111, C_β atoma Ile107 i C_δ atoma Glu7. d) Zastupljenost udaljenosti između gvanidinskog ugljika Arg72 i C_γ atoma Asp111.

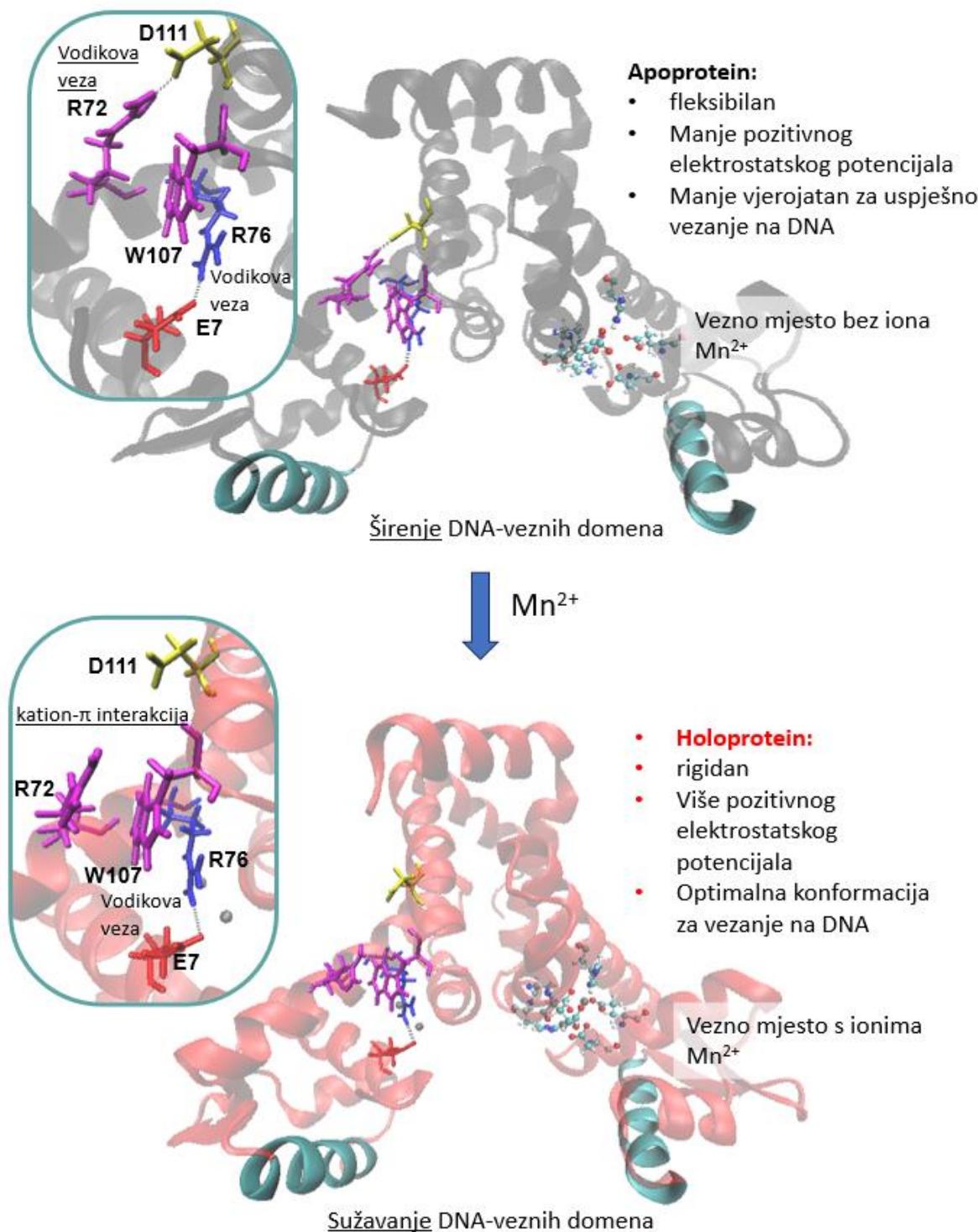
4.3.3. *Mehanizam konformacijske promjene u proteinu HhMntR uslijed vezanja iona Mn²⁺* MD simulacije i detaljna analiza nativnih struktura proteina *HhMntR*, kao i opisanih mutanata, omogućile su prijedlog mehanizma za aktivaciju proteina uslijed vezanja iona Mn²⁺ u vezno mjesto. Iako bočni ogranci Glu7 i Arg76 nisu dio veznog mjesta za Mn²⁺, blizina veznom mjestu i snažna interakcija prisutna u svim formama proteina sugerira koliko je nekovalentna interakcija Glu7-Arg76 ključna za održavanje strukture i funkcije *HhMntR*. Ove dvije aminokiseline evolucijski su očuvane u sličnim proteinima.¹⁰ MntR proteini iz bakterija *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Mycobacterium tuberculosis* na 76. mjestu u sekvenci imaju upravo arginin, a *Corynebacterium diphtheriae* DtxR i *Thermoplasma acidophilum* IdeR imaju lizin koji, također zahvaljujući pozitivnom naboju na bočnom ogranku, može ostvarivati slične interakcije. Karboksilni negativno nabijeni član interakcijskog para prisutan je i u ovim proteinima: MntR iz *B. subtilis*, *C. diphtheriae* i *T. acidophilum* imaju glutamat na 7. mjestu, a *E. coli* MntR ima aspartat. Upravo evolucijska očuvanost, zajedno s deformacijom strukture holoproteina dobivenom nakon mutacije Arg76 u Glu76, dovode do zaključka o značaju interakcije Glu7-Arg76 za održavanje pravilne strukture proteina, sa i bez vezanih iona Mn²⁺.

Drugi interakcijski set opažen u blizini veznog mjesta za ione Mn²⁺, a koji sam nije dio veznog mjesta, je Arg72-Trp107-Asp111. MD simulacije apo- i holoproteina započele su tako da su Arg72 i Trp107 bili na položaju koji im je omogućio kation-π interakciju. Ta interakcija ostala je prisutna u holoproteinu, a u apoproteinu se pojavila dodatna interakcija s Asp111. Njezina prisutnost dodatno je potvrđena u holomutantu-W107I koji nije imao aromatski prsten s kojim bi Arg72 interreagirao. S obzirom na to da za ostvarenje takve interakcije mora doći do blagog savijanja α₄-zavojnice, moguće je pretpostaviti da upravo izmjena u interakcijskom sustavu, točnije okretanje Arg72 od unutrašnjeg Trp107 prema vanjskom Asp111 uočeno u apoproteinu dovodi do loma α₄-zavojnice (slika 4.21) koja je ranije opisana.^{29,33} Upravo taj lom omogućuje veću fleksibilnost DNA-vezne domene, što je karakteristika MD simulacija apoproteina.



Slika 4.21. a) Lom α₄-zavojnice uočen u strukturi apoproteina tijekom MD simulacije u kubičnoj kutiji veličine 20 Å. B) Položaji Arg72 (R72), Asp111 (D111), Glu7 (E7) i Arg76 (R76) u blizini veznog mesta za ion Mn²⁺.

Međusobna udaljenost DNA-veznih domena glavni je strukturni parametar koji određuje razliku između holoproteina i apoproteina svih srodnih MntR. Ona direktno sugerira i funkcionalnost proteina, za kojeg se očekuje da će u holoproteinu, s prisutnim ionima Mn²⁺, zauzeti rigidniju, stabilniju strukturu s DNA-veznim domenama na udaljenosti prilagođenoj za vezanje na DNA. Takva promjena se za vrijeme MD simulacija dogodila jedino u holoproteinu s vezanim ionima Mn²⁺, dok su oba holomutanta pokazala veću sličnost s apoproteinom (slika 4.22). Time je jasno pokazano da nekovalentne interakcije u blizini veznog mesta direktno utječu na strukturnu stabilnost proteina *HhMntR* koja će posljedično dovesti do aktivacije proteina i vezanja na DNA.

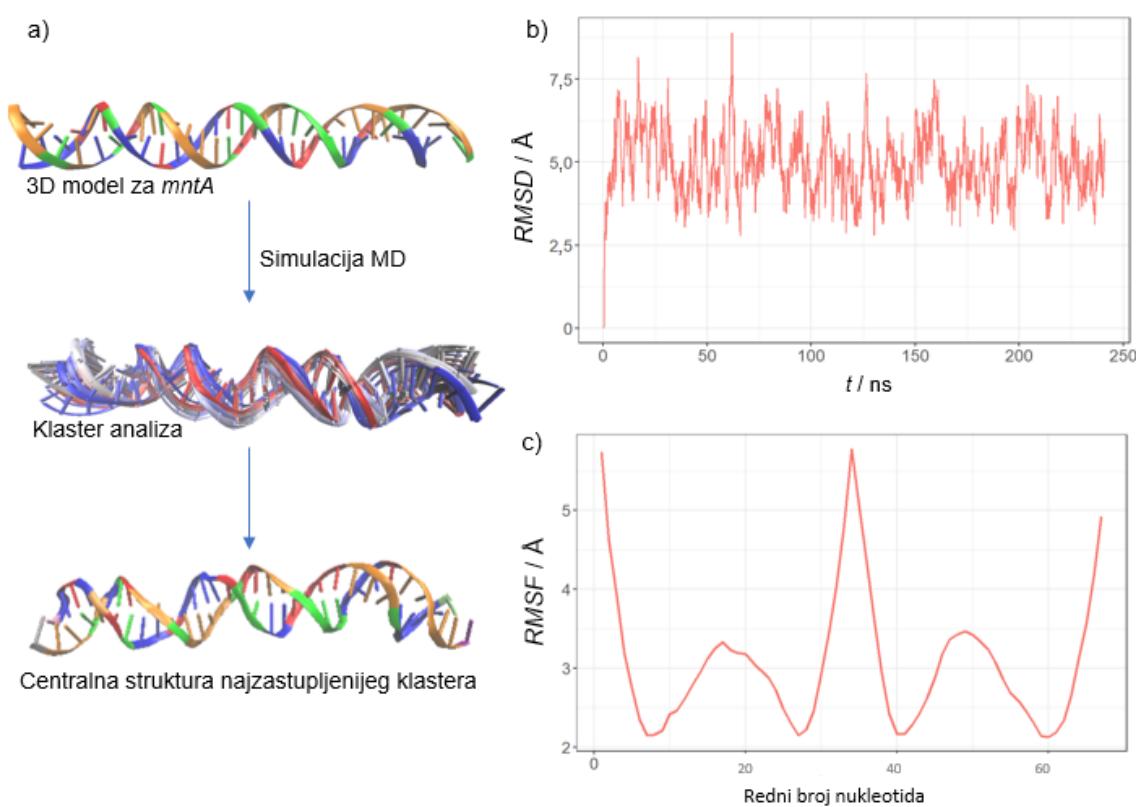


Slika 4.22. Konformacijske promjene uočene u *HhMntR*-u uslijed vezanja iona Mn²⁺. Različite karakteristike holoproteina (crveno) i apoproteina (crno) su podrtane.

4.4. Izgradnja kompleksa proteina *HhMntR* i DNA za proučavanje MD simulacijama

4.4.1. Dinamička svojstva strukture DNA koja odgovara operatorskoj sekvenci *mntA*

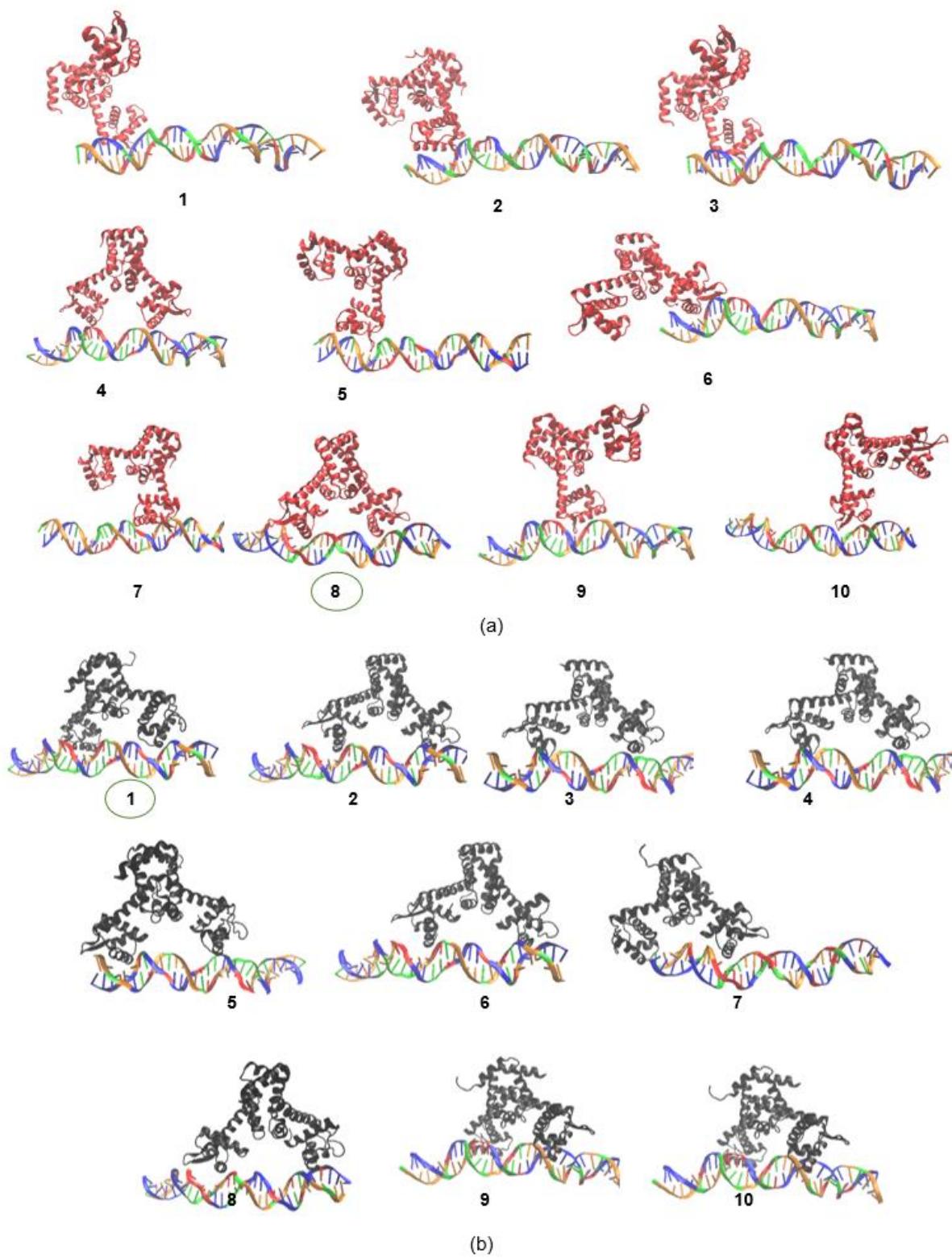
Da bi se potvrdila hipoteza da je struktura holoproteina s vezanim ionima Mn^{2+} u veznom mjestu dobivena MD simulacijama pogodnija za pravilno vezanje proteina *HhMntR* na DNA u odnosu na apoprotein, potrebno je izgraditi kompleks proteina i DNA te simulirati takav sustav. Najvjerojatnija operatorska sekvenca *mntA* (tablica D4) dobivena bioinformatičkom analizom³³ izgrađena je kao 3D model. Dobivena struktura bila je savršena B-forma DNA te ju je bilo potrebno relaksirati MD simulacijama (slika 4.23). Tijekom 240 ns MD simulacije DNA je ostala u formi stabilne dvostrukе zavojnice. Očekivano, najfleksibilniji su sami krajevi DNA, a ostatak strukture je prilično stabilan. Nakon klasterske analize struktura centroida najzastupljenijeg klastera odabrana je za daljnje korake istraživanja.



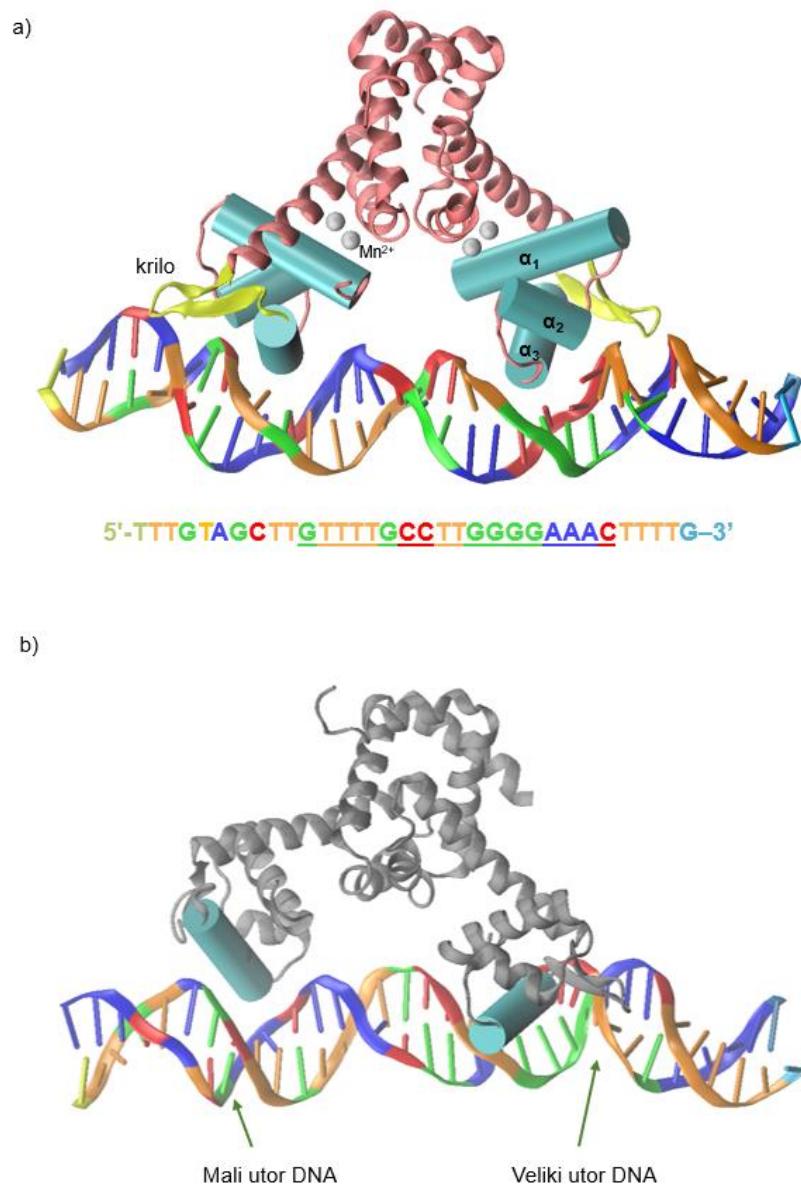
Slika 4.23. Shema izgradnje 3D strukture operatorske sekvence *mntA*. Analize MD simulacije operatorske sekvence *mntA*: b) RMSD graf i c) RMSF graf izračunati uzimajući u obzir sve teške atome okosnice DNA.

4.4.2. Molekulsко uklapanje holo- i apoproteina *HhMntR* na operatorsku sekvencu *mntA*

Za izgradnju kompleksa proteina *HhMntR* i DNA korištena je metoda molekulskog uklapanja. Time je dobiven niz klastera koji su poredani prema sustavu bodovanja od najvjerojatnijeg do najmanje vjerljivog (tablice D5 i D6). Na slici 4.24 prikazani su rezultati za prvih 10 klastera za protein-DNA sustav u kojem je za protein uzeta struktura centroida najzastupljenijeg klastera u simulaciji holoproteina u kubičnoj kutiji od 10 Å, s vezanim ionima Mn²⁺, a za DNA relaksirana operatorska sekvencia *mntA* dobivena u prethodnom koraku kao struktura centroida najzastupljenijeg klastera u MD simulaciji same DNA. Isti postupak ponovljen je i za apoprotein. S obzirom na to da je program optimiran na kristalnim strukturama proteina i DNA, relaksirana forma DNA vjerljivija u otopinskim sustavima kakva je živa bakterijska stanica predstavljala je izazov za samu analizu, baš kako i autori programa navode.⁶⁸ Unatoč tome, sve dobivene strukture ostvaruju isključivo kontakt s DNA preko DNA-veznih domena (slika 4.24). Stabilnost i dinamika interakcije između DNA i proteina bit će istražena u sljedećem koraku primjenom MD simulacija za cijeli kompleks, a pritom će se koristiti kompleksi koji su odabrani po kriteriju blizine obje DNA-vezne domene proteina velikim utorima DNA (slika 4.25).



Slika 4.24. Prvih 10 klastera dobivenih metodom molekulskog uklapanja za: a) holoprotein i b) apoprotein *HhMntR* s operacijskom sekvencom *mntA*. Zelenom kružnicom su obilježeni klasteri korišteni kao početne strukture u MD simulacijama.

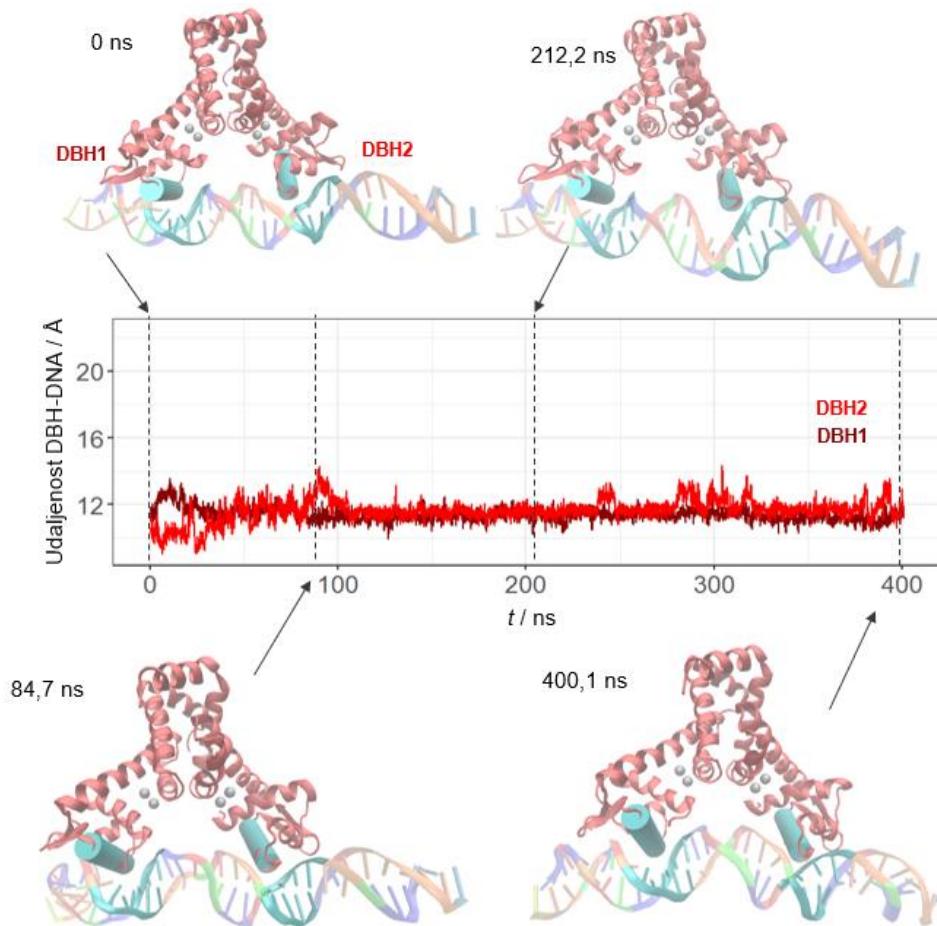


Slika 4.25. Odabrani *HhMntR*-DNA kompleks dobiven metodom molekulskog uklapanja za: a) holoprotein i b) apoprotein *HhMntR* s operatorskom sekvencom *mntA*. Značajni elementi strukture DNA i proteina obilježeni su na slici.

4.5. Konformacijska analiza MD simulacija kompleksa proteina *HhMntR* i pripadne operatorske sekvene *mntA*

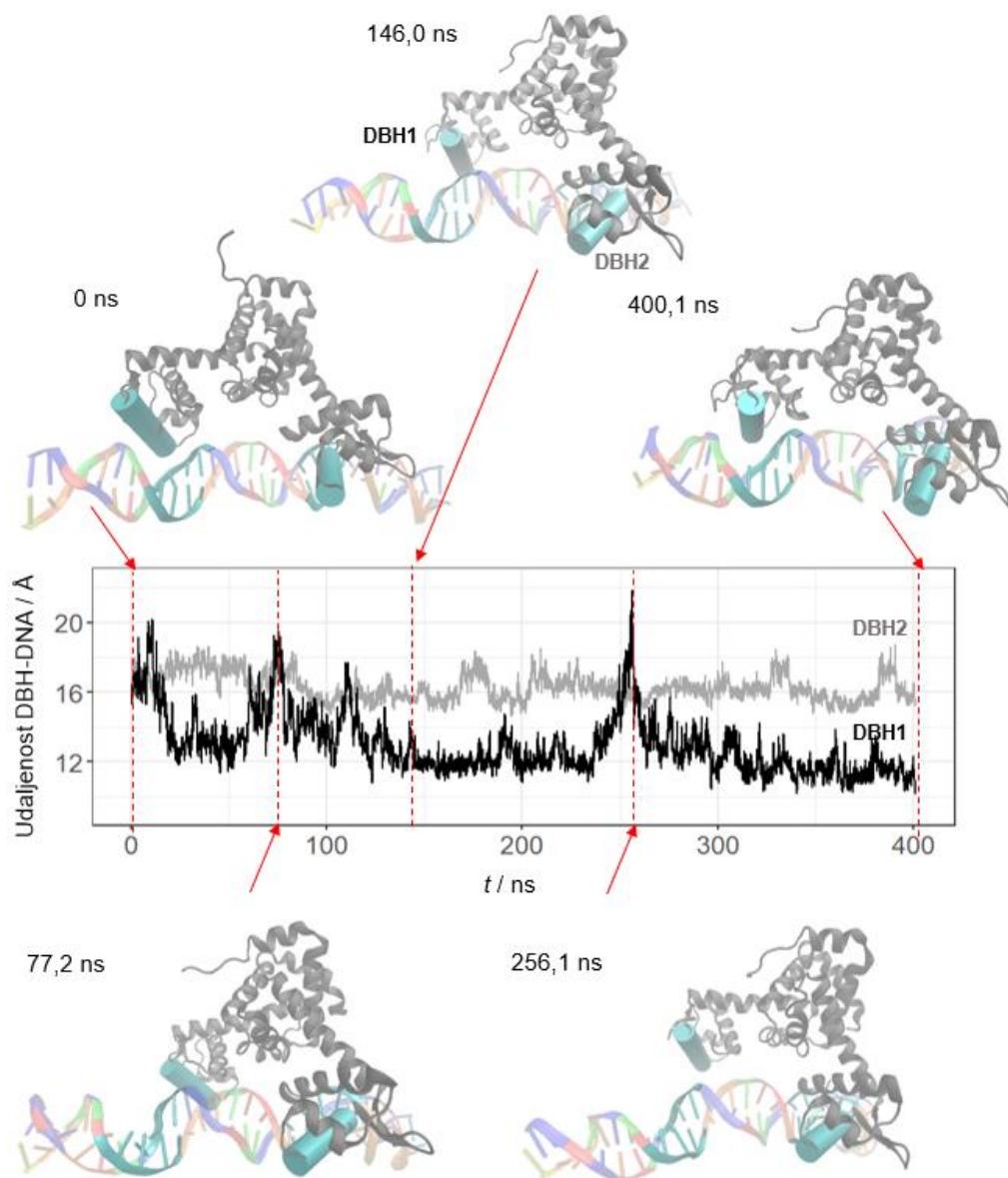
4.5.1. Dinamička svojstva kompleksa proteina *HhMntR* i operatorske sekvene *mntA* dobivenog molekulskim uklapanjem

Kako bi se istražila stabilnost i dinamika kompleksa dobivenog u prethodnom koraku molekulskim uklapanjem proteina *HhMntR* na operatorsku sekvenu DNA, provedena je MD simulacija u trajanju od 400 ns. Analiza dobivene trajektorije pokazala je da u slučaju holoproteina s vezanim ionima Mn²⁺, holoprotein ostaje stabilno pozicioniran na DNA (slika 4.26). Točnije, obje DNA-vezne zavojnice α_3 stabilno su smještene u velikim utorima DNA. Mjerenje udaljenosti centra masa bočnih ogranača aminokiselina koje pripadaju zavojnici i nukleotida koji pripadaju velikom utoru pokazalo je da u slučaju lanca A ta udaljenost iznosi $11,4 \pm 0,4$ Å (DBH1), a u slučaju lanca B $11,6 \pm 0,7$ Å (DBH2).



Slika 4.26. Udaljenost DNA-veznih zavojnica α_3 (DBH, **tirkizno plavo, cilindar**) holoproteina *HhMntR* (**crveno**) i velikih utora operatorske sekvene *mntA* tijekom 400 ns MD simulacije koja je započeta od strukture kompleksa dobivenog molekulskim uklapanjem. Ioni Mn²⁺ (**sivo**) su prikazani kao kuglice. Udaljenosti su mjerene u odnosu na centar mase bočnih ogranača aminokiselina koje pripadaju DNA-veznim zavojnicama α_3 (DBH, **tirkizno plavo, cilindar**) i centru mase nukleotida koji pripadaju velikom utoru.

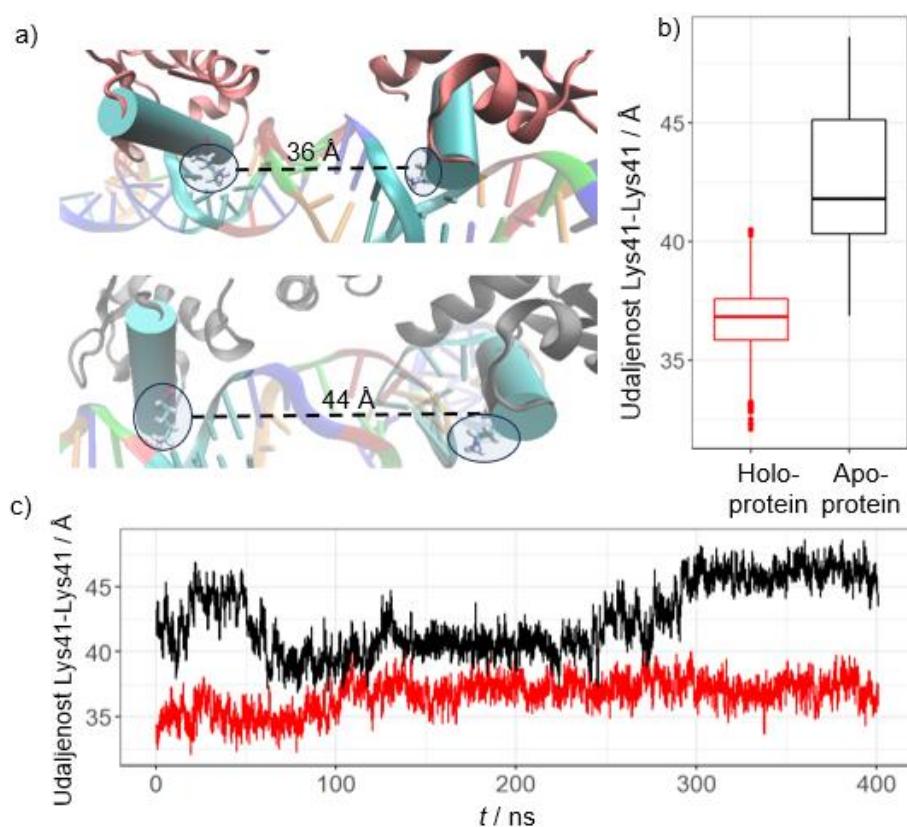
S druge strane, apoprotein pokazuje potpuno drugačije ponašanje. MD simulacija je započeta od strukture dobivene molekulskim uklapanjem apoproteina na operatorsku sekvencu DNA, gdje su dvije DNA-vezne zavojnice bile pozicionirane u blizini velikih utora na DNA. Međutim, DNA-vezne zavojnice ne ostaju na poziciji ostvarenoj molekulskim uklapanjem, već asociraju i disociraju iz velikih utora (osobito DNA-vezna zavojnica lanca A, DBH1) mnogo češće nego što je to bio slučaj kod holoproteina (slika 4.27). Maksimalne i minimalne vrijednosti udaljenosti između DNA-veznih zavojnica α_3 i velikih utora razlikuju se pri vezanju holo- i apoproteina na DNA. Kod apoproteina, te se udaljenosti kreću u rasponu od približno 12 Å, gdje bi se mogla očekivati interakcija, do 20 Å, gdje je interakcija manje vjerojatna. Prosječne udaljenosti su 13 ± 2 Å za DBH1 te $16,3 \pm 0,8$ Å za DBH2. Nakon 77,2 ns MD simulacije DBH1 napušta veliki utor u potpunosti, ali se ne odvaja od molekule DNA. Detaljnijim vizualnim pregledom uočeno je da manje udaljenosti poput one u 146,0 ns nisu dokaz prisutnosti DBH1 u velikom utoru, već da je DBH1 pozicionirana s vanjske strane DNA te je u kontaktu s fosfodiesterskom okosnicom. DBH2 je većinu simulacije smještena s vanjske strane DNA, u kontaktu s fosfodiesterskom okosnicom. S obzirom na to da je okosnica DNA negativno nabijena, a proteinske DNA-vezne zavojnice bogate pozitivno nabijenim lizinima (Lys41, Lys45 i Lys48), očekivano je da će postojati interakcija, makar nespecifična i kratkotrajna.



Slika 4.27. Udaljenost DNA-veznih zavojnica α_3 (DBH, **tirkizno plavo, cilindar**) apoproteina *HhMntR* (**crno**) i velikih utora operatorske sekvenze *mntA* tijekom MD simulacije od 400 ns koja je započeta od strukture kompleksa dobivene molekulskim uklapanjem. Udaljenosti su mjerene u odnosu na centar mase DNA-veznih zavojnica α_3 (**tirkizno plavo**) i centar mase nukleotida koji pripadaju velikom utoru.

4.5.2. Konformacijska analiza kompleksa HhMntR-DNA tijekom MD simulacije

Ranije pretpostavljena važna karakteristika strukture proteina koja direktno utječe na njegovu funkciju svakako je udaljenost Lys41-Lys41 koja sugerira udaljenost DNA-veznih domena. Tijekom MD simulacija kompleksa holoproteina i operatorske sekvene *mntA*, DNA-vezne zavojnice ostale su blizu jedna drugoj s prosječnom udaljenošću od $36 \pm 1 \text{ \AA}$. S druge strane, tijekom MD simulacija kompleksa apoproteina i operatorske sekvene *mntA* uočeno je dinamičnije ponašanje, pa tako i udaljenost Lys41-Lys41 pokazuje veće amplitude. Prosječna vrijednost C_α atoma Lys41-Lys41 je $43 \pm 3 \text{ \AA}$, a grafički prikaz jasno ukazuje na promjenjivu dinamiku (slika 4.28).



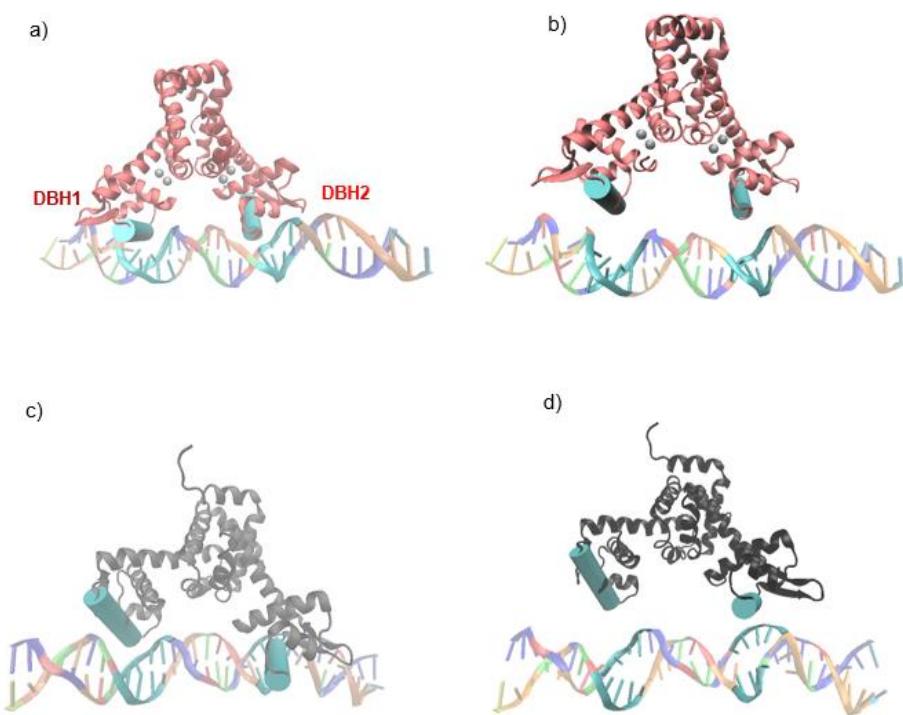
Slika 4.28. a) Udaljenosti između C_α atoma dva ekvivalentna lizina iz dvije DNA-vezne domene (Lys41-Lys41) u strukturama holoproteina (crveno) i apoproteina (crno) dobivenih nakon 400 ns MD simulacija koje su započete od struktura kompleksa dobivenih molekulskim uklapanjem. Udaljenosti Lys41-Lys41 prikazane: b) primjenom kutijastog dijagrama (engl. *box-plot*) i c) tijekom trajektorija.

Kako bi se utvrdilo utječe li prisutnost DNA značajno na promjenu strukture proteina *HhMntR* i obratno, napravljene su *RMSD* analize proteina i DNA u MD simulacijama kompleksa holoproteina i apoproteina s DNA. Analize pokazuju da nije došlo do značajnih promjena (slika D4). Također, apoprotein je zadržao konformaciju vrlo sličnu početnoj, nije se dogodila denaturacija kakva je uočena ranije u simulaciji gdje je samo apoprotein bio prisutan (odjeljak 4.2.2). Ovime je također potvrđena ranije dana hipoteza da je holoprotein nakon MD simulacija s veznim parametrima za Mn^{2+} ostvario pravilnu konformaciju za stabilno vezanje na DNA, dok „raširena“ konformacija apoproteina nije u povoljnoj konformaciji za vezanje na DNA.

Usporedba dinamike apoproteina i holoproteina tijekom MD simulacija kompleksa s DNA pokazuje da holoprotein ostvaruje stabilniju i dugotrajniju interakciju, čvrsto se pozicionirajući u veliki utor DNA, dok apoprotein dinamično mijenja pozicije na DNA, ostvarujući kratkoživuće interakcije s velikim utorom, kao i okosnicom DNA. Dane opservacije mogu objasniti mogući mehanizam aktivacije proteina *HhMntR* u bakterijskoj stanici. Dakle, apoprotein je lociran u blizini DNA dok je koncentracija iona Mn^{2+} niska. Pritom dinamički ostvaruje i mijenja interakcije s raznim dijelovima DNA, kako velikim utorima, tako i negativno nabijenom fosfodiesterском okosnicom s vanjske strane. Jednom kad koncentracija Mn^{2+} u stanici poraste, dolazi do vezanja Mn^{2+} u vezno mjesto i time nastaje holoprotein, koji je sada u prikladnoj konformaciji da stupa u stabilnu interakciju s velikim utorima na DNA, pri čemu dolazi do represije transkripcije gena *mntA* za importere Mn^{2+} .

4.5.3. Dinamička svojstva kompleksa *HhMntR* i operatorske DNA u MD simulacijama započetim od strukture gdje je protein udaljen 20 Å od DNA

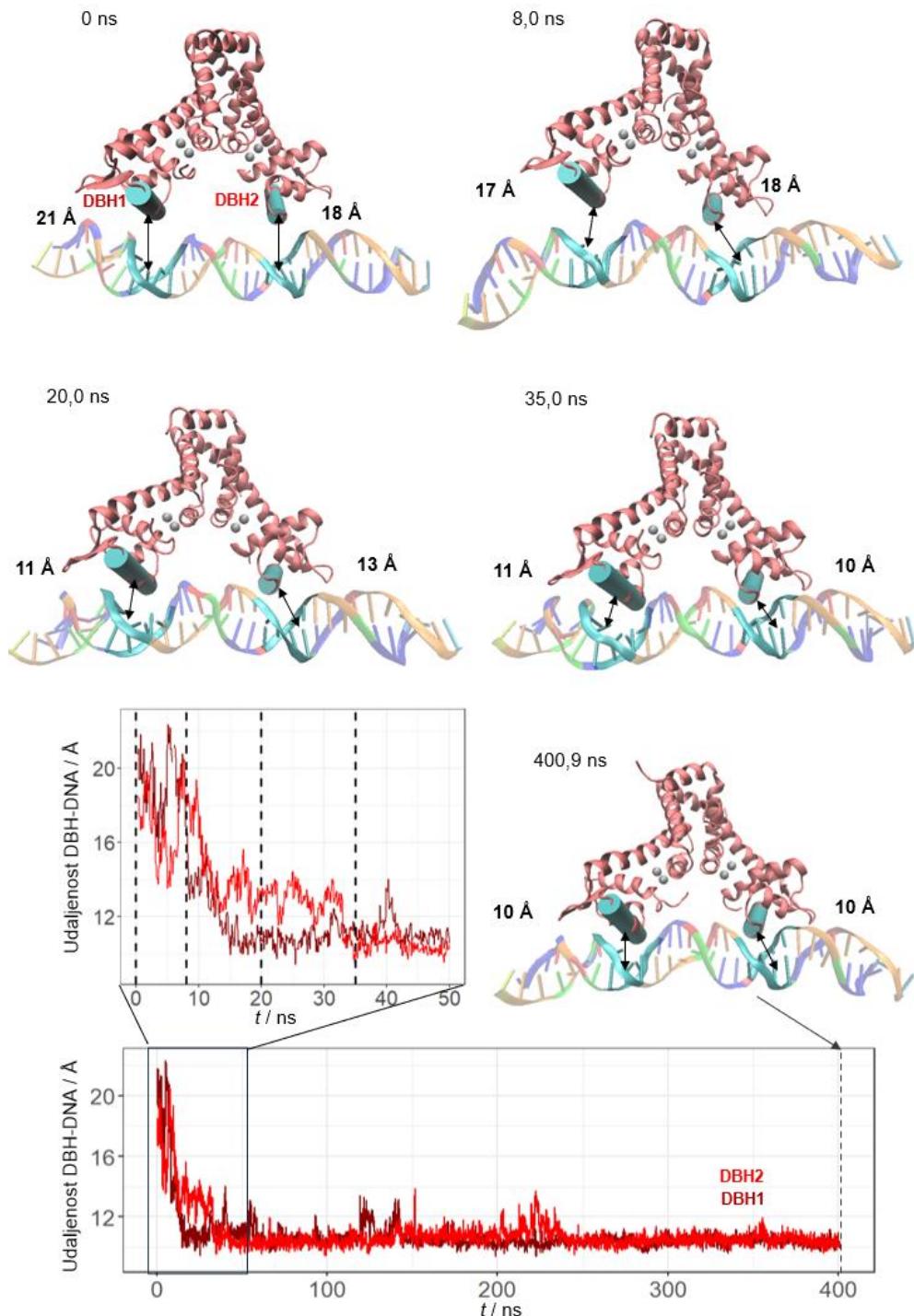
Ranije opisane MD simulacije kompleksa proteina *HhMntR* i pripadne operatorske sekvene *mntA* daju jasnu sliku o stabilizaciji kompleksa jednom kada su ioni Mn²⁺ prisutni u veznom mjestu proteina. Kako bi se istražio proces nastanka kompleksa, simulirani su sustavi u kojima je protein u početnoj strukturi odvojen na udaljenost 20 Å od DNA, mjereno kao udaljenost centra mase bočnih ogranačaka DNA-vezne zavojnice α_3 i nukleotida koji pripadaju velikom utoru (slika 4.29). Jednak pristup primjenjen je na kompleks koji je sadržavao i holo- i apoprotein te su provedene MD simulacije u trajanju od 400 ns.



Slika 4.29. Početne strukture za MD simulacije: a) holoproteina (crveno) i c) apoproteina (crno/sivo) i operatorske sekvene *mntA* dobivene molekulskim uklapanjem, te b) holoproteina (crveno) i d) apoproteina (crno/sivo) odvojenih za 20 Å od operatorske sekvene *mntA*. Ioni Mn²⁺ (sivo) su prikazani kao kuglice u veznim mjestima.

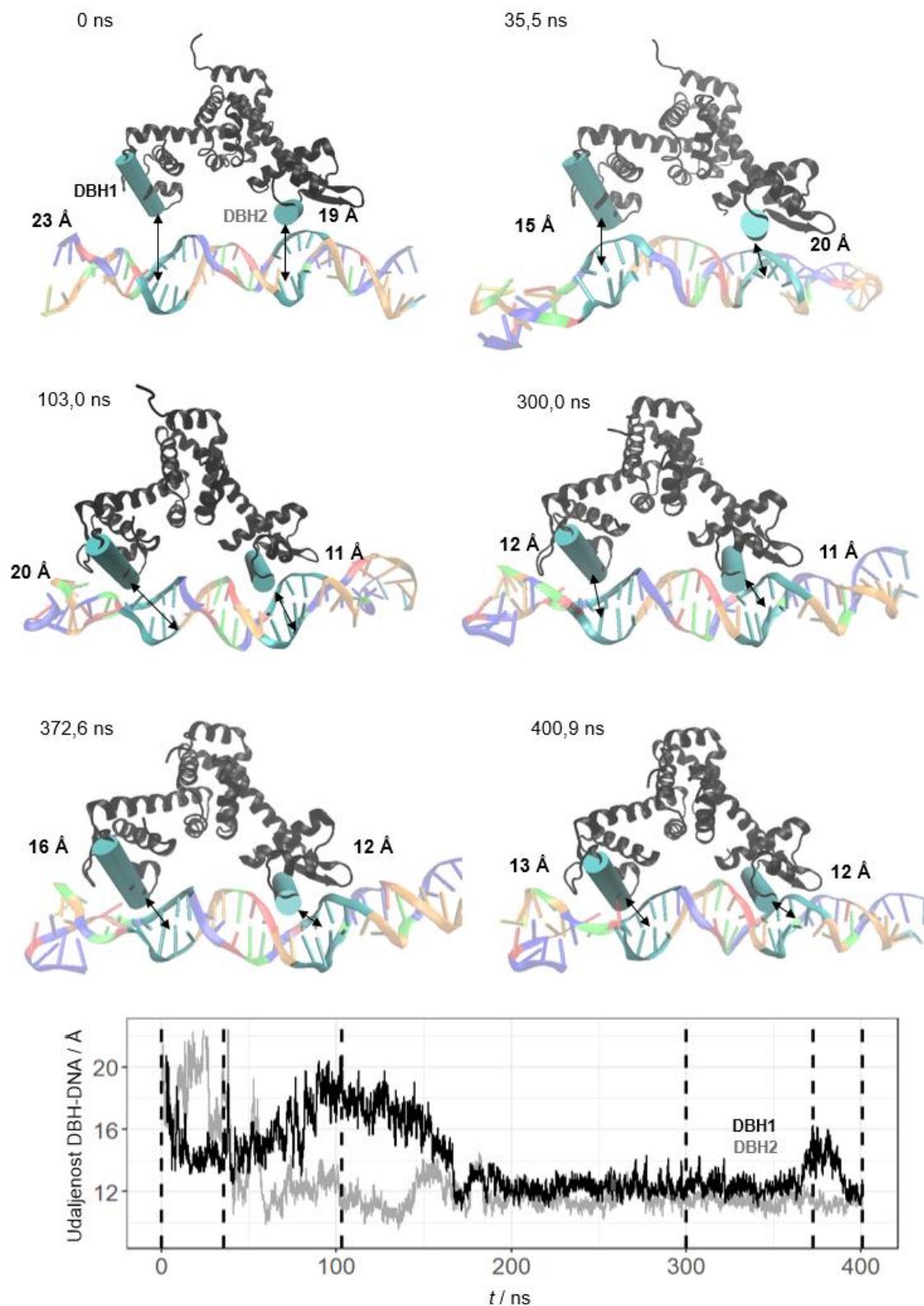
Za nastanak stabilnog kompleksa između holoproteina i DNA bilo je potrebno 50 ns MD simulacija tijekom kojih je holoprotein uspostavio stabilne i specifične interakcije s velikim utorima DNA (slika 4.30). Početna udaljenosti od 20 Å postupno se smanjila na približno 10 Å te je takva i ostala do kraja simulacije. Općenito, obrazac ponašanja u MD simulaciji koja započinje od strukture gdje su holoprotein i DNA međusobno udaljeni gotovo je jednak ponašanju u MD simulaciji koja započinje od već sparenog holoproteina i DNA u kompleks.

Dodatno, ni protein ni DNA ne podlježu značajnoj promjeni konformacije (slika D4). Dakle, holoprotein *HhMntR* ima odgovarajuću konformaciju za interakciju s velikim utorima DNA i stvaranje stabilnog kompleksa.



Slika 4.30. Udaljenost između DNA-veznih zavojnica α_3 (DBH, tirkizno plavo, cilindar) holoproteina *HhMntR* (crveno) i velikih utora operatorske sekvene *mntA* tijekom MD simulacije u trajanju od 400 ns koja je započeta od strukture u kojoj su protein i DNA udaljeni 20 Å. Ioni Mn²⁺ (sivo) su prikazani u veznom mjestu. Udaljenosti su mjerene u odnosu na centar mase α_3 DNA-veznih zavojnica (tirkizno plavo) i centar mase nukleotida koji pripadaju velikom utoru.

S druge strane, u MD simulaciji apoproteina, koji je u početnoj strukturi bio udaljen za 20 Å od DNA, bilo je potrebno više od 150 ns da stupi u kontakt s DNA (slika 4.31). Naizgled, apoprotein ostvaruje interakciju s velikim utorima DNA, no pomnijom vizualizacijom uočava se da DNA nema stabilnu formu dvostrukе zavojnice. Točnije, dio dvostrukе zavojnice DNA u blizini prve DNA-vezne zavojnice (DBH1) se razmotao, stvarajući neprirodno veliki utor u koji je ušla DBH1. Takvo razmotavanje zna se dogoditi u simulacijama DNA u nestabilnim sustavima kada dolazi do pucanja vodikovih veza između nukleotidnih parova.⁷⁵ Dakle, apoprotein će ostvariti interakcije s DNA čak i kada se u početku nalazi dalje od DNA. Priroda interakcija između pozitivno nabijenih proteinskih DNA-veznih zavojnica i negativne DNA dovoljna je za njihovo međusobno pronalaženje, no interakcija kao takva ne opisuje realno ponašanje proteina u bakteriji jer nije za očekivati da će transkripcijski faktor razmotati DNA zavojnicu. Simulacije su rađene s kraćim segmentom DNA koja je inače dugačka molekula i u interakciji je s brojnim proteinima koji su zasluzni za održavanje njezine tercijarne strukture, pa se ovakav događaj ne bi očekivao. No, može se tumačiti na način da apoprotein u toj mjeri nema odgovarajuću konformaciju za ostvarivanje stabilne i efektivne interakcije s DNA koja bi dovela do toga da *HhMntR* odradi svoju ulogu transkripcijskog faktora.

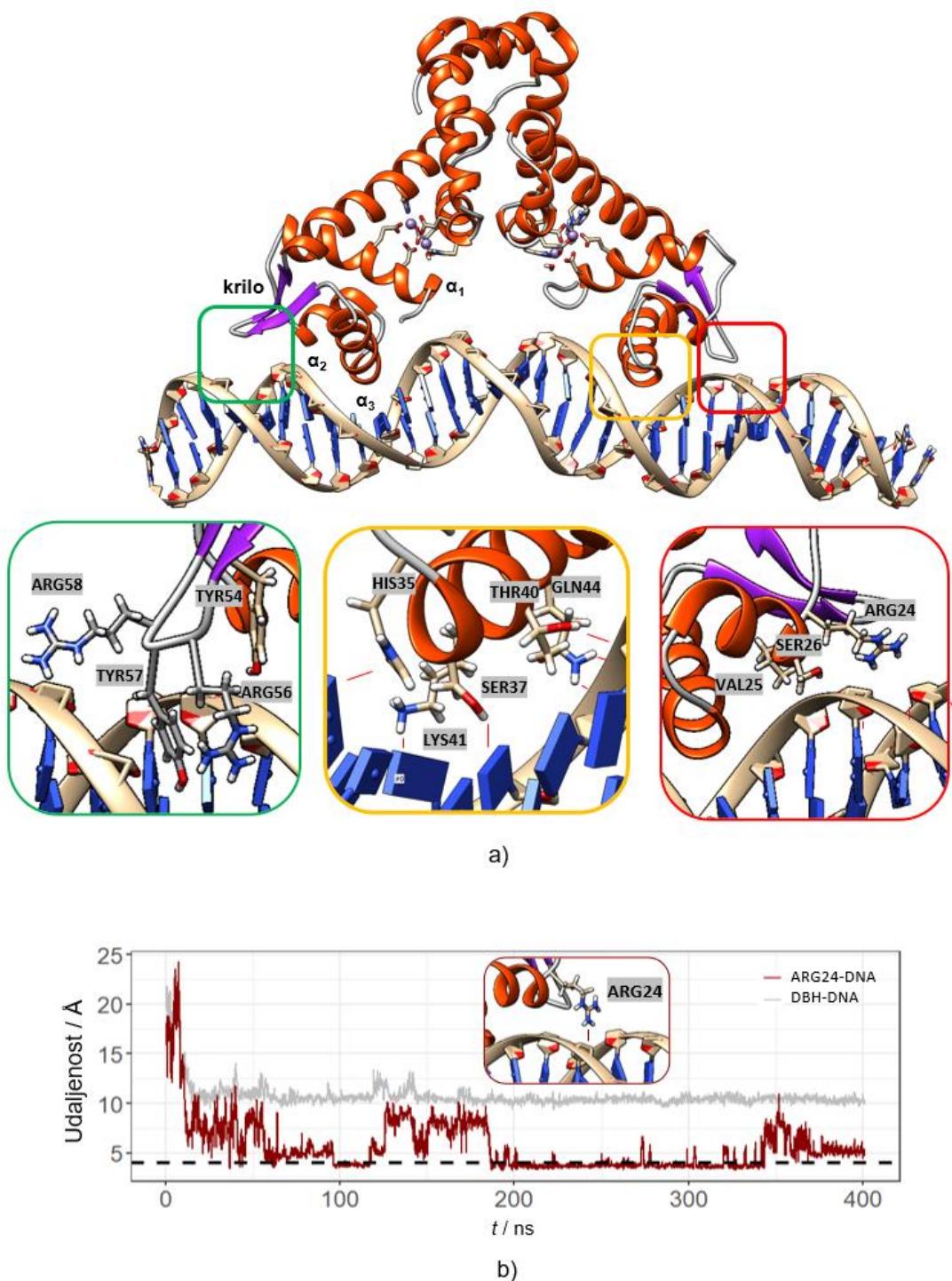


Slika 4.31. Udaljenost između DNA-veznih zavojnica α_3 (DBH, **tirkizno plavo, cilindar**) apoproteina *HhMntR* (**crno**) i velikih utora operatorske sekvene *mntA* tijekom MD simulacije u trajanju od 400 ns koja je započela od strukture u kojoj su protein i DNA udaljeni 20 Å. Udaljenosti su mjerene u odnosu na centar mase DNA-veznih zavojnica (**tirkizno plavo**) i centar mase nukleotida koji pripadaju velikom utoru.

4.6. Analiza intermolekulske interakcije na sučelju DNA-vezne domene proteina *HhMntR* i pripadne operatorske sekvene *mntA*

Kako bi se detaljno opisala mreža nekovalentnih interakcija na sučelju DNA-vezne domene proteina *HhMntR* i pripadne operatorske sekvene *mntA* te utvrdilo koji tip interakcija dovodi do specifičnog i stabilnog vezanja holoproteina na DNA, a koje su karakteristične interakcije koje dovode do nespecifičnog i kratkotrajnog vezanja apoproteina, analizirane su sve provedene MD simulacije. Uočeno je da se isti obrazac interakcija javlja u obje MD simulacije holoproteina, tj. kada je holoprotein u početku u kompleksu s DNA, kao i kada stupi u interakciju s 20 Å udaljenom DNA (slika 4.32). Taj rezultat sugerira da su upravo nekovalentne interakcije glavni čimbenik pravilnog pozicioniranja DNA-veznih zavojnica holoproteina u velike utore DNA s obzirom na to da se pozicija DNA-vezne zavojnice α_3 značajno ne mijenja nakon što se ostvare neke od spomenutih interakcija, primjerice između Arg24 i fosfodiesterske zavojnice DNA (slika 4.32.b). S druge strane, apoprotein ostvaruje više različitih tipova interakcija koje nisu karakteristične za holoprotein.

Preliminarna analiza pokazala je da se interakcije mogu podijeliti u dvije skupine prema lokalizaciji: 1) nekovalentne interakcije između zavojnica α_1 , α_2 i α_3 DNA-vezne domene proteina *HhMntR* i velikih utora te 2) nekovalentne interakcije između krila u DNA-veznoj domeni i malih utora DNA. Također, podjelu je moguće napraviti i prema specifičnosti, ovisno o tome ostvaruje li aminokiselinski bočni ogranač proteina interakciju s fosfodiesterskom zavojnicom ili direktno s nukleobazom DNA (tablice D7-D10).

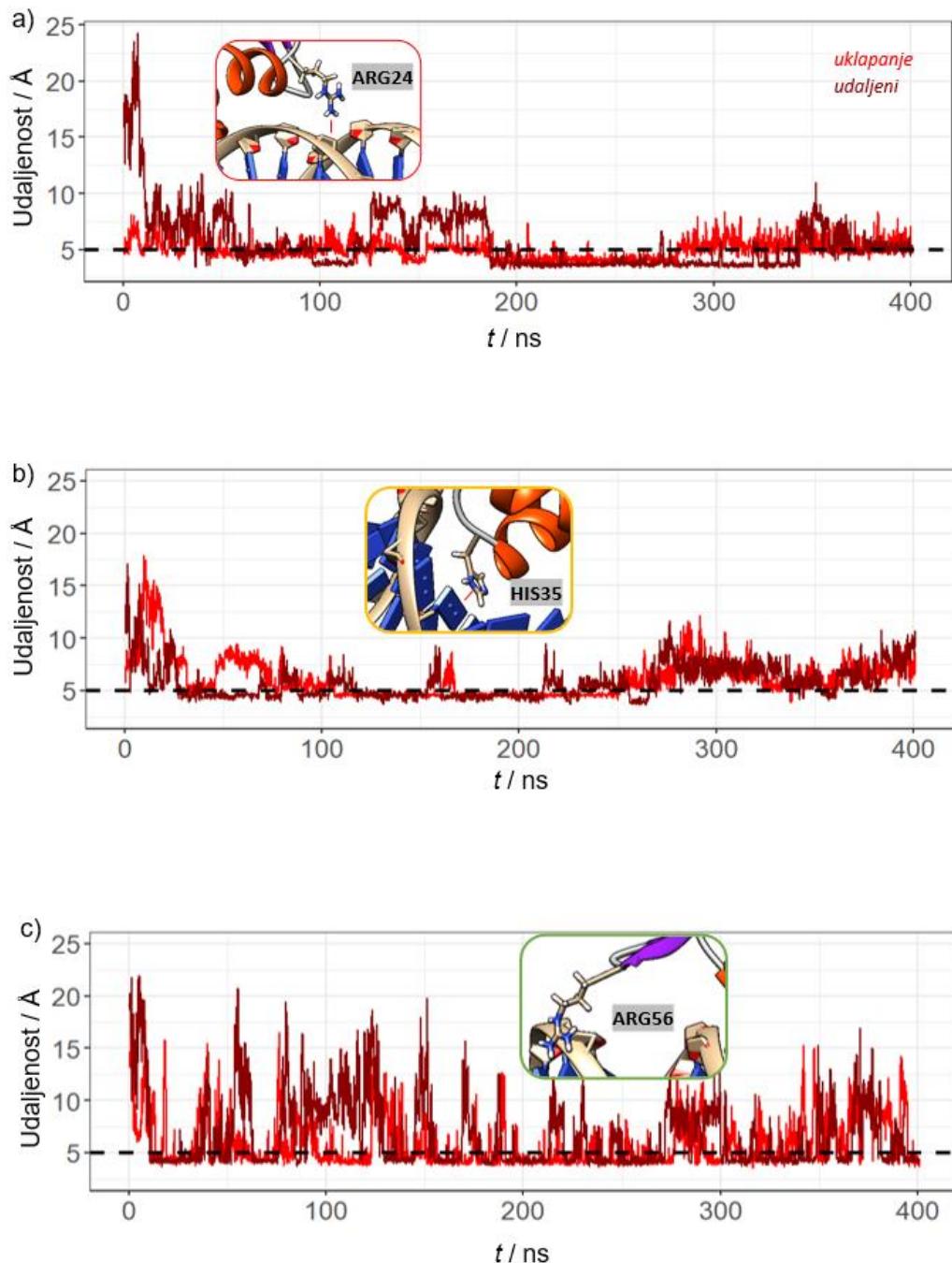


Slika 4.32. Mreža nekovalentnih interakcija u kompleksu holoprotein-DNA. a) Holoprotein *HhMntR* (crveno/ljubičasto) i operatorska sekvenca *mntA* (bež/plavo) na kraju MD simulacije od 400 ns koja je počela od kompleksa dobivenog molekulskim uklapanjem. Naglašene su interakcije koje s DNA ostvaruju: krilo DNA-vezne domene (zeleni okvir), DNA-vezna zavojnica α_3 (žuti okvir) i α_2 zavojnica sa susjednom petljom (crveni okvir). b) Udaljenost centra mase DNA-vezne zavojnice α_3 holoproteina i velikog utora DNA (sivo) i udaljenost između N ϵ dušikovog atoma Arg24 i susjednog atoma fosfora nukleotida DT291 tijekom MD simulacije u kojoj su protein *HhMntR* i DNA na početku udaljeni za 20 Å (tamno crveno).

4.6.1. Nekovalentne interakcije između zavojnica α_1 , α_2 i α_3 DNA-vezne domene proteina *HhMntR* i velikih utora operatorske sekvene *mntA*

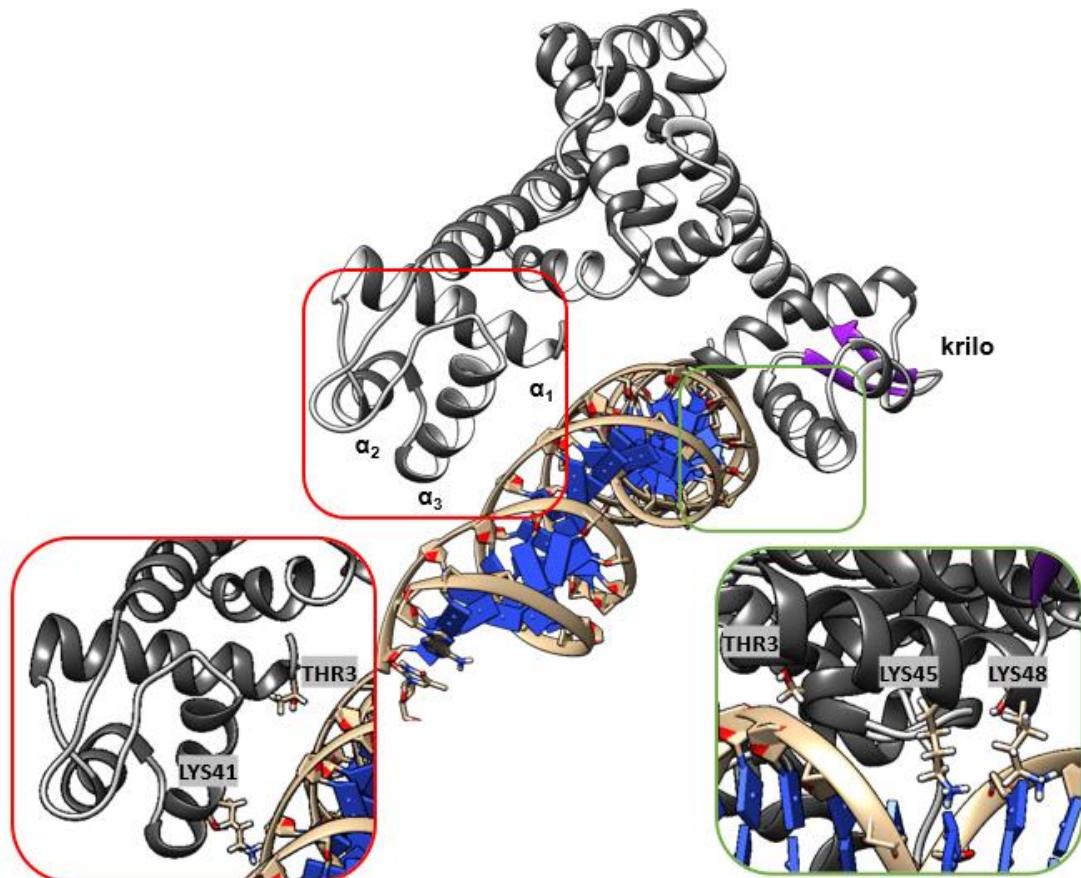
Najzastupljenija nekovalentna interakcija na sučelju DNA-vezne domene holoproteina *HhMntR* i dvostrukе zavojnice DNA pripadne operatorske sekvene *mntA* je između bočnog ogranka Ser26 na zavojnici α_2 i fosfodiesterskih grupa DNA okosnice koja zatvara velike utore. Čak 94 % vremena ova interakcija postoji u MD simulaciji holoproteina i DNA koja je započela od strukture dobivene molekulskim uklapanjem, a prisutna je i u simulaciji gdje su protein i DNA razdvojeni za 20 Å u početnoj strukturi. Odmah u blizini na petlji između α_1 i α_2 zavojnica nalazi se pozitivno nabijeni Arg24 koji također s visokom zastupljeničću participira u interakciji s fosfodiesterском okosnicom (slika 4.33.a). Usporedba obje simulacije holoproteina i DNA pokazuje da interakcija nastaje u trenutku stvaranja kompleksa i ostaje prisutna tijekom cijele simulacije. Zajedno sa Val25, koji u vodikovoj vezi sudjeluje s dušikom iz peptidne veze, Arg24 i Ser26 čine interakcijski set s fosfodiesterском okosnicom DNA. Time učvršćuju poziciju DNA-vezne domene i omogućuju DNA-veznoj zavojnici- α_3 (DBH) pravilno pozicioniranje u veliki utor DNA.

Iako bi se za pozitivnim lizinima bogatu DBH očekivalo da će upravo ti bočni ogranci nositi većinu interakcija s DNA, dominantnu interakciju ostvaruje Ser37. Kisikov atom u bočnom ogranku Ser37 donor je vodikove veze prema nukleobazama DNA, a sudjeluje u specifičnoj interakciji s atomom kisika u timinu te kisika i dušika u gvaninu. Dok Ser37 ostvaruje vodikovu vezu direktno s bazama, susjedni His35 ostvaruje nespecifičnu interakciju izmjenjujući donore vodikove veze na imidazolnom prstenu s akceptorima na fosfodiesterском okosnici DNA (slika 4.33.b). Od lizinskih bočnih ogranaka, Lys41 ostvaruje interakciju direktno s nukleobazama, no druga dva lizina, Lys45 i Lys48, ne pojavljuju se prilikom pretrage vodikovih veza (tablica D7 i D8). To sugerira da ne provode dovoljno vremena na udaljenosti od 3,2 Å da bi ostvarili vodikovu vezu. S obzirom na to da ipak pridonose pozitivnim nabojem cjelokupnoj DNA-veznoj domeni,³³ moguće je hipotetizirati da doprinose ukupnom učinku elektrostatskog privlačenja pozitivno nabijene DNA-vezne domene proteina i negativno nabijene DNA. U nedavno opisanoj krio-EM strukturi homolognog proteina *BsMntR* u interakciji s regulatornom regijom *mneP* operatora, gdje su 4 proteina smještena u velike uteore DNA, pokazano je da glavninu interakcija nose upravo His35, Pro36, Ser37 i Lys41, potvrđujući time važnu ulogu ovih bočnih ogranaka u ostvarivanju specifičnih interakcija s DNA.³⁰



Slika 4.33. Udaljenost između: a) Arg24@NE i pripadnog atoma fosfora DT325@P, odnosno DT291@P, b) centra mase His35 i atoma fosfora u DG303@P, odnosno DT302@P, te c) Arg56@CZ i atoma fosfora u DT346@P, odnosno DT345@P tijekom MD simulacije započete od strukture dobivene molekulskim uklapanjem (**crveno**), odnosno strukture u kojoj su holoprotein *HhMntR* i operatorska sekvenca *mntA* na početku udaljeni za 20 Å (**tamno crveno**).

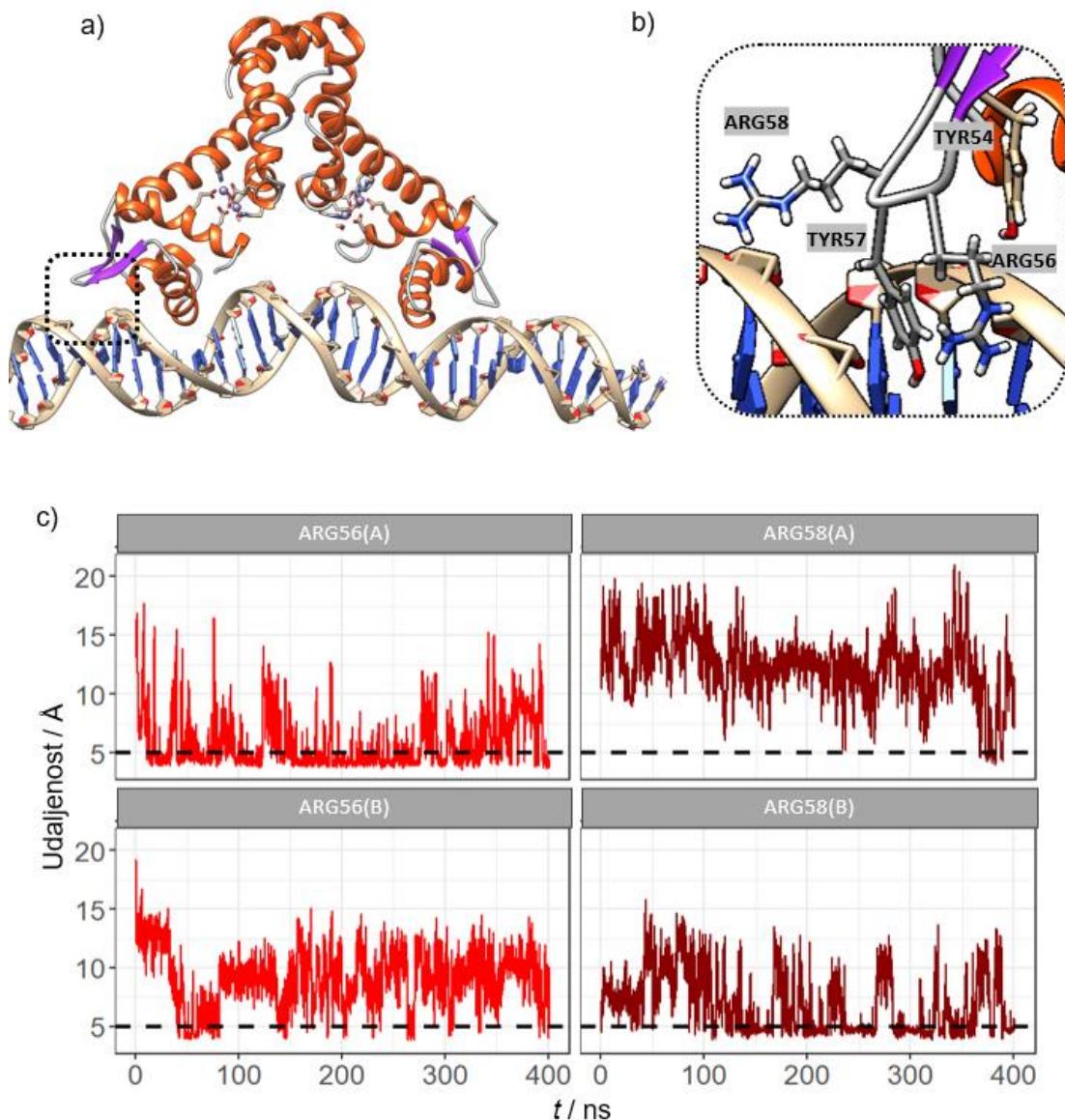
Interakcijski profil između apoproteina i operatorske sekvene *mntA* pokazuje značajno drugačija obilježja od sustava holoproteina i operatorske sekvene *mntA*. Budući da apoprotein nije stabilno pozicioniran u velikim utorima, već dinamički izmjenjuje pozicije na DNA, na isti način mijenjaju se i interakcije koje imaju kraće vrijeme trajanja, pa time i manju zastupljenost u MD simulacijama (tablice D9 i D10). Većinu interakcija nosi upravo DBH, no iznenadujuć je broj i zastupljenost interakcija između α_1 -zavojnice i DNA. Pomnija vizualna pretraga ukazuje da se takav tip interakcija događa kada apoprotein "sjedi" na DNA, a interakcijsko sučelje je s unutarnje strane proteina i vanjske strane DNA (slika 4.34). Upravo tada u interakciji sudjeluju i Lys45 i Lys48, što govori o njihovoj ulozi u nespecifičnom vezanju apoproteina i DNA. Na taj način apoprotein obitava u blizini DNA, izmjenjujući kratkoživuće i nespecifične interakcije, sve do vezanja iona Mn^{2+} u vezno mjesto čime nastaje aktivni holoprotein koji se može specifično vezati.



Slika 4.34. Mreža nekovalentnih interakcija prikazana u strukturi kompleksa između apoproteina *HhMntR* (crno) i operatorske sekvene *mntA* (bež/plavo) dobivenoj nakon 218 ns MD simulacije koja je započeta od kompleksa dobivenog molekulskim uklapanjem. Naglašene su interakcije koje s DNA ostvaruju α_1 -zavojnica i DNA-vezna zavojnica α_3 (crveni i zeleni okvir) proteina *HhMntR*.

4.6.2. Nekovalentne interakcije između krila u DNA-veznoj domeni proteina HhMntR i malih utora DNA

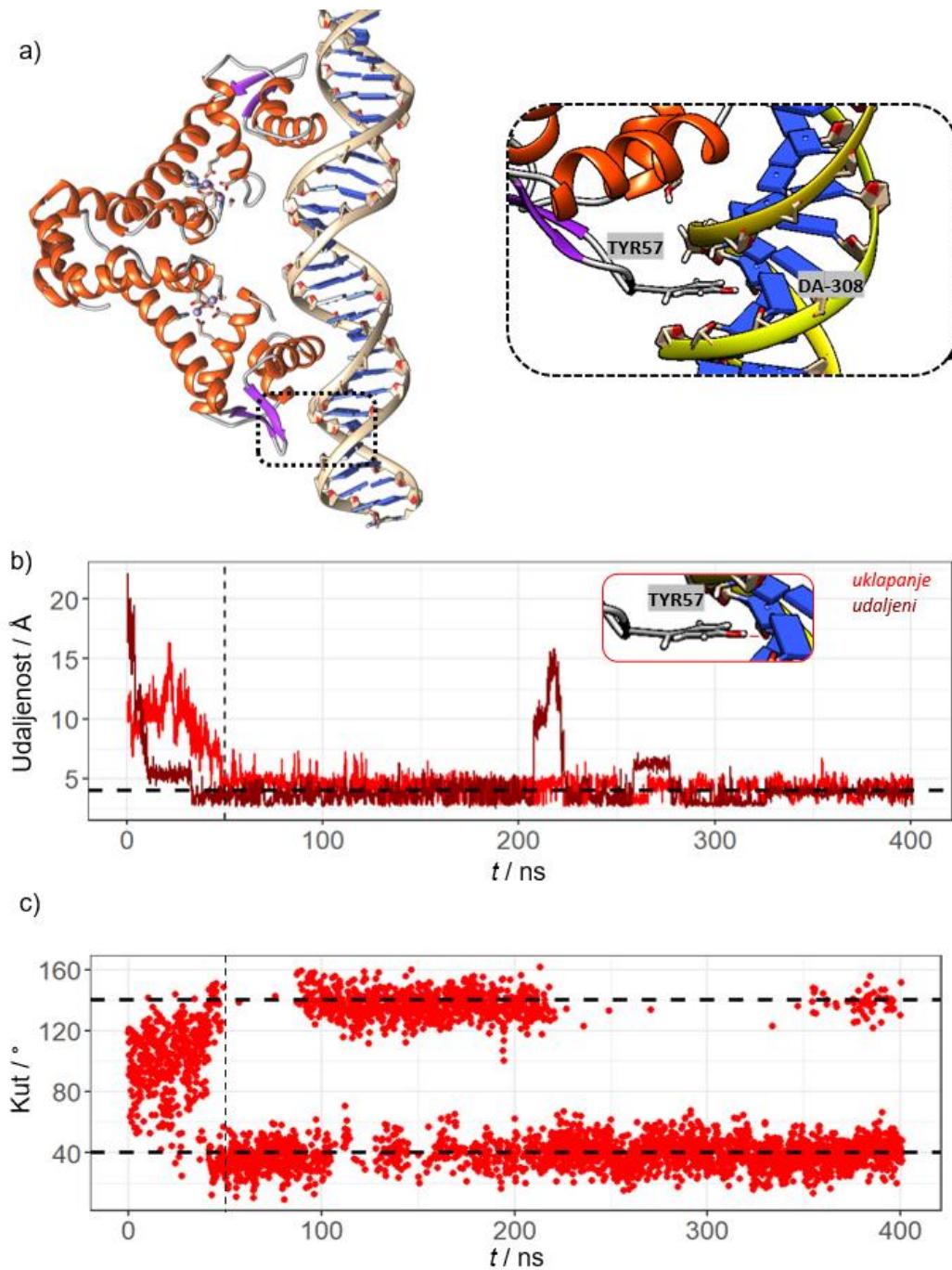
Motiv krila u DNA-veznoj domeni vrlo je česta strukturalna forma u proteinima koji ostvaruju interakciju s DNA.³⁵ Građen je od dvije β-ploče i petlje između njih. Ta je petlja u proteinu HhMntR bogata aminokiselinama s konjugiranim vezama u bočnim ograncima, točnije čini ju niz Arg56-Tyr57-Arg58. Detaljna analiza MD simulacije holoproteina i DNA koja započinje sa strukturom dobivenom molekulskim uklapanjem otkrila je zanimljiv obrazac ponašanja Arg56 i Arg58. Naime, barem jedan od njih je u interakciji s fosfodiesterom okosnicom DNA. Dok u lancu A dominaciju ima Arg56, u lancu B dva arginina se izmjenjuju (slika 4.35). Time cijela petlja ostaje snažno vezana za vanjsku stranu malog utora, pomažući na taj način pravilnoj orientaciji DNA-vezne domene i smještanju ključnih zavojnica u velike utore. Isti interakcijski profil uočen je i kod MD simulacije koja je započela sa strukturom u kojoj su holoprotein i DNA udaljeni za 20 Å (tablica D8, slika 4.33.c).



Slika 4.35. Mreža nekovalentnih interakcija u kompleksu holoprotein-DNA. Krilo DNA-vezne domene holoproteina *HhMntR* (crveno/ljubičasto) i operatorska sekvenca *mntA* (bez/plavo) na kraju MD simulacije u trajanju od 400 ns koja je započela od kompleksa dobivenog molekulskim uklapanjem. b) Uvećan prikaz interakcija koje s DNA ostvaruje petlja između dvije β-ploče (crni okvir). c) Udaljenost između aminokiselinskog bočnog ogranka u holoproteinu *HhMntR* i atoma fosfora na okosnici dvostrukе zavojnice operatorske sekvene *mntA*, točnije: ARG56(A)@CZ-DT346@P, ARG56(B)@CZ-DT311@P, ARG58(A)@CZ-DT346@P, ARG58(B)@CZ-DC310@P. Crvenom bojom prikazane su vrijednosti za lanac A, a tamnocrvenom za lanac B.

Između dva arginina u petlji proteina *HhMntR* smjestio se Tyr57 (slika 4.36.a). U MD simulacijama holoproteina, dok arginini ostvaruju interakcije s vanjskim dijelom malog utora DNA, Tyr57 ulazi u mali utor i ostvaruje specifične interakcije. Nastaje vodikova veza između hidroksilne skupine na tirozinu i dušika ili kisika susjednih nukleobaza (tablice D7 i D8). Prosječna udaljenost između centra mase Tyr57 i susjednog adenina je $4,3 \pm 0,8$ Å u MD simulaciji koja započinje od kompleksa dobivenog molekulskim uklapanjem, tj. 4 ± 2 Å u MD simulaciji gdje su holoprotein i DNA na početku udaljeni za 20 Å (mjereno od 50. ns simulacije). S obzirom na aromatičnost prstena tirozina i način pozicioniranja između nukleobaza, ova interakcija može biti ojačana i π - π slaganjem. U MD simulaciji koja započinje sa strukturu komopleksa dobivenom molekulskim uklapanjem, interakcija između Tyr57 i susjedne nukleobaze nije prisutna na samom početku, već nastaje oko 40. ns i ostaje prisutna do kraja simulacije (slika 4.36.b). Tyr57 se nakon približavanja i uspostave interakcije nalazi u dvije različite pozicije, pod kutom od 40° ili 140° u odnosu na nukleobazu (slika 4.36.c). Dakle, Tyr57 dodatno pospješuje interakciju petlje iz krila DNA-vezne domene holoproteina *HhMntR* s malim utorom na DNA sudjelujući u ukošenom π - π slaganju s nukleobazama, što je ranije prepoznato kao čest motiv na sučelju proteina i DNA kada je u pitanju tirozinski bočni ogrankak.⁷⁶

Osim Tyr57 na petlji, postoji i Tyr54 u β -ploči krila koji se nalazi nešto dalje (slika 4.35.b), pa je u mogućnosti ostvarivati vodikovu vezu s vanjskom okosnicom DNA, točnije njezinim fosfodiesterskim grupama (tablice D7 i D8). S obzirom na broj i zastupljenost interakcija koje s DNA ostvaruje fleksibilna petlja u krilu DNA-vezne domene, ovaj set aminokiselina s konjugiranim vezama u bočnim ograncima predstavlja vrlo važan segment za pravilno pozicioniranje holoproteina *HhMntR* prilikom vezanja na DNA.

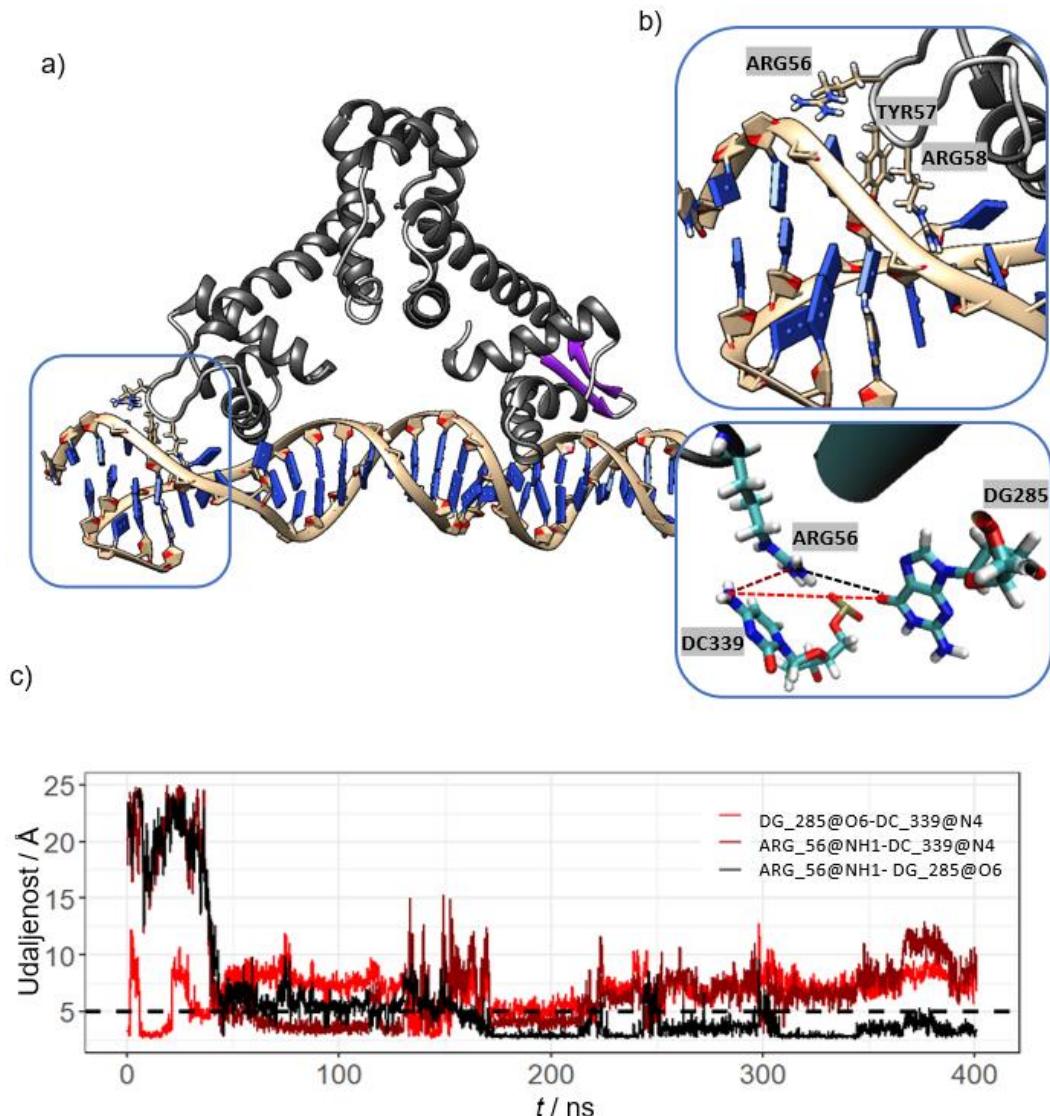


Slika 4.36. Mreža nekovalentnih interakcija u kompleksu holoprotein-DNA. a) Krilo DNA-vezne domene holoproteina *HhMntR* (ljubičasto) i operatorska sekvenca *mntA* (žuto/plavo) na kraju MD simulacije u trajanju od 400 ns koja je započela od kompleksa dobivenog molekulskim uklapanjem. Naglašene su interakcije koje s DNA ostvaruje Tyr57 koji se nalazi na petlji između dvije β -ploče. b) Udaljenost između aminokiselinskog bočnog ogranka u holoproteinu *HhMntR* i atoma fosfora na okosnici dvostrukе zavojnice operatorske sekvene *mntA*, točnije: Tyr57(B)@OH-DA308@P. Crvenom bojom prikazane su vrijednosti za lanac A, a tamnocrvenom za lanac B. c) Promjena kuta kojeg zatvara ravnina u kojoj leži aromatski prsten Tyr57 i ravnina u kojoj leži nukleobaza DA-308 u vremenu.

S druge strane, dinamika cijelog apoproteina značajno je drugačija, pa tako i same petlje u krilu DNA-vezne domene. Ostvaruju se vrlo zastupljene i specifične interakcije (tablice D9 i D10), no pažljivom vizualnom inspekcijom moguće je uočiti da upravo te interakcije nastaju u momentu razdvajanja dvostrukе zavojnice DNA u MD simulaciji gdje su apoprotein i DNA na početku odvojeni za 20 Å. Uočena dezintegracija DNA dovodi do nastanka neprirodno velikog utora. Pritom pucaju vodikove veze između nukleobaza i upravo set aminokiselina s konjugiranim vezama u bočnim ograncima s petlje proteina ulazi u direktnu interakciju s nukleobazama (slika 4.37.a). Proučavanjem udaljenosti vidljivo je da vodikove veze između nukleotidnog para DG285-DT339 pucaju oko 40. ns, kada nastaju direktne vodikove veze između Arg56 i navedenih nukleotida (slika 4.37.b,c). Direktna interakcija između aminokiselina proteina i nukleotida DNA koja dovodi do pucanja DNA-karakterističnih vodikovih veza koje održavaju stabilnost dvostrukе zavojnice nije nešto što bi se očekivalo za transkripcijski faktor u biološkom sustavu. Ovaj rezultat možda nije direktno povezan s *in vitro* uvjetima, ali sugerira koliku važnost u kontekstu intermolekulskih nekovalentnih interakcija ima petlja krila DNA-vezne domene bogata aminokisinama, a konjugiranim vezama u bočnim ograncima. Također, s obzirom na to da se ovakvo razmatanje DNA dogodilo samo u slučaju apoproteina i nije uočeno u simulacijama holoproteina, još jednom se potvrđuje da apoprotein nema pravilnu konformaciju za stabilno vezanje na DNA koja bi dovela do izvršenja uloge transkripcijskog faktora, odnosno u slučaju operatorske sekvene *mntA* do represije transkripcije gena.

Dakle, petlja u krilu DNA-vezne domene bogata aminokiselinama, a konjugiranim vezama u bočnim ograncima proteina *HhMntR*, ostvaruje niz zanimljivih interakcija s malim utorom DNA, susjednim velikom utorom u kojeg sjeda DNA-vezna zavojnica α_3 . Poznato je od ranije da samo krilo u DNA-veznim proteinima ima ulogu stabilizacije DNA-vezne domene, pružajući dodatnu potporu za specifične interakcije koje se trebaju dogoditi u velikom utoru. Primjerice, mutant proteina ToxR koji ima alaninske bočne ogranke na mjestu ovih aminokiselina u petlji nije se mogao vezati na DNA.⁷⁷ Dodatna potvrda rezultatima MD simulacija provedenim u ovom radu svakako su i krio-EM strukture proteina *BsMntR* u kojima je jasno vidljivo da su Tyr54, Lys56 i Arg58 u interakciji s fosfodiesterском okosnicom *mneP* operadora.³⁰ S obzirom na to da na 56. mjestu u *B. subtilis* i *H. halodurans* nije ista aminokiselina, ali je riječ o lizinu, odnosno argininu, koji oba imaju pozitivno nabijeni bočni ogrank, te da su ostale ključne aminokiseline na odgovarajućim pozicijama identične, vidljivo

je da je petlja evolucijski očuvan čimbenik, čime se još jednom sugerira njezina važnost u interakcijama na sučelju DNA i proteina.



Slika 4.37. Mreža nekovalentnih interakcija u kompleksu apoprotein-DNA. a) Krilo DNA-vezne domene apoproteina *HhMntR* (crno) i operatorska sekvenca *mntA* (žuto/plavo) na kraju MD simulacije u trajanju od 400 ns koja je započeta od strukture s proteinom udaljenim 20 Å od DNA. b) Uvećani prikaz interakcija koje s DNA ostvaruje niz Arg56-Tyr57-Arg58 (plavi okvir). c) Udaljenost između navedenih atoma aminokiselinskog bočnog ogranka u apoproteinu *HhMntR* i nukleobaza operatorske sekvence *mntA*.

4.6.3. Predloženi mehanizam nastanka kompleksa proteina HhMntR i DNA

Holoprotein i apoprotein *HhMntR* pokazuju specifičan obrazac ponašanja u MD simulacijama kada su u kompleksu s DNA i kada kompleks tek treba nastati od udaljenog proteina i DNA. Ono što je bitno naglasiti je da je u svim varijantama MD simulacija upravo DNA-vezna domena karakterizirana strukturnim motivom krilo-zavojnica-petlja-zavojnica (engl. *wing-Helix-Turn-Helix, wHTH*) proteina bila u interakciji s DNA. Stabilne interakcije s nukleobazama velikog utora DNA ostvaruju se preko α_3 zavojnice, s His35, Pro36, Ser37 i Lys41 kao glavnim nositeljima interakcije. Interakcije s fosfodiesterским grupama velikih utora dodatno stabiliziraju položaj α_3 zavojnice, a ostvaruju se preko bočnih ogrankaka Arg24, Val25 i Ser26 na α_2 zavojnici. Dodatna potpora i stabilizacija proteina provodi se kroz niz vodikovih veza između pozitivno nabijenih arginina Arg56 i Arg58 u fleksibilnoj petlji krila DNA-vezne domene i negativne okosnice susjednog malog utora u DNA. Dok Arg56 i Arg58 ostaju na površini, Tyr57, kao aromat u petlji, može ući u mali utor i sudjelovati u $\pi-\pi$ slaganju s nukleobazama, čime se učvršćuje položaj petlje na malom utoru DNA, a time i cijelog proteina.

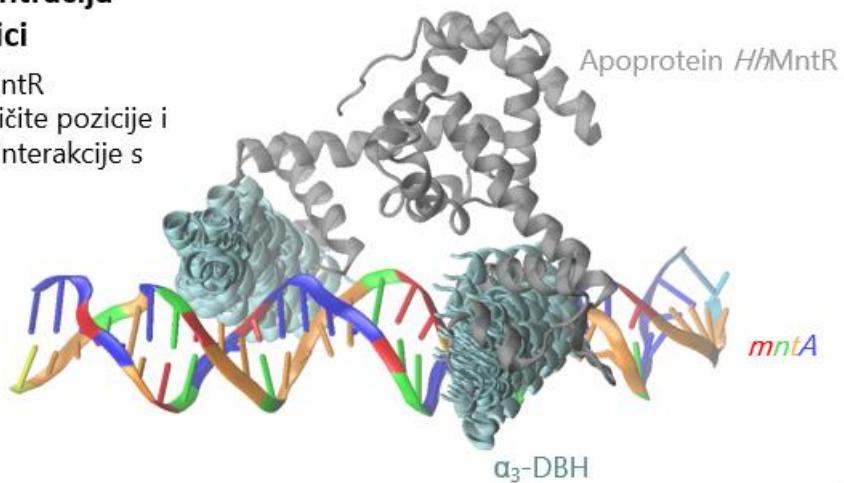
S druge strane, apoprotein ostvaruje kratkoživuće interakcije, ovisno o položaju na DNA. U jednom od položaja, kada apoprotein „sjedi“ na DNA, značajne interakcije ostvaruju se putem α_1 zavojnice, primjerice putem bočnog ogranka Thr3. U tom položaju interakcije ostvaruju i Lys45 i Lys48, kao nositelji pozitivnog naboja DNA-vezne zavojnice α_3 , a time i elektrostatskog privlačenja s negativno nabijenom DNA.

Stoga, moguće je prepostaviti da u uvjetima niske koncentracije Mn^{2+} u bakterijskoj stanici apoprotein provodi vrijeme u blizini DNA, ostvarujući kratkoživuće i nespecifične interakcije vođene elektrostatskim privlačenjem primarno s vanjskom okosnicom DNA. Na taj način apoproteinu je omogućeno fleksibilno „kretanje“ u blizini DNA (slika 4.38) do porasta koncentracije Mn^{2+} u stanici, odnosno vezanja Mn^{2+} u vezno mjesto i nastanka aktivnog holoproteina. Aktivirani holoprotein, zauzimajući suženu i rigidniju strukturu, sada može sjesti u velike uteore DNA i stabilno se vezati dugoživućim interakcijama te time provesti ulogu transkripcionskog faktora, u ovom slučaju represirajući transkripciju gena *mntA* za importere dodatnih iona Mn^{2+} u stanicu.

Niska koncentracija Mn²⁺ u stanici

Mn²⁺ u stanici

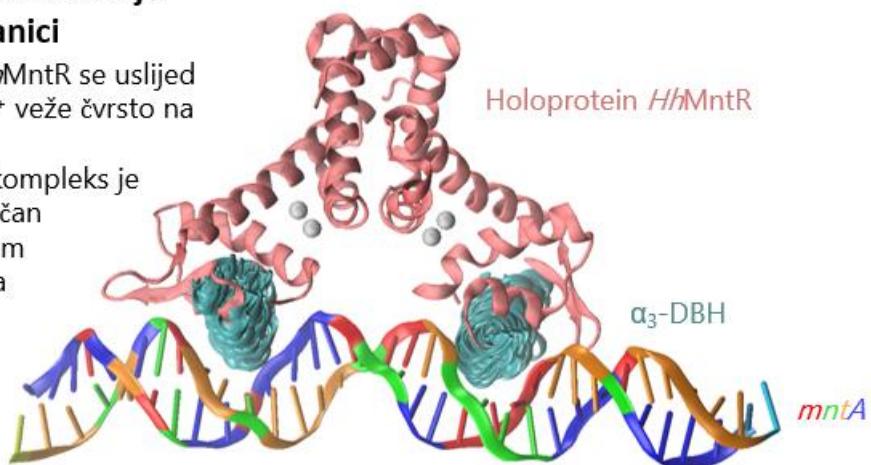
- Slobodni *H/hMntR* izmjenjuje različite pozicije i nekovalentne interakcije s DNA



Visoka koncentracija Mn²⁺ u stanici

Mn²⁺ u stanici

- Aktivirani *H/hMntR* se uslijed vezanja Mn²⁺ veže čvrsto na DNA
- MntR-DNA kompleks je stabilan i ojačan nekovalentnim interakcijama



Slika 4.38. Apoprotein i operatorska sekvenca *mntA* u uvjetima niske koncentracije iona Mn²⁺ u bakterijskoj stanici *H. halodurans* (gore). Holoprotein i operatorska sekvenca *mntA* u uvjetima visoke koncentracije iona Mn²⁺ u bakterijskoj stanici *H. halodurans* (dolje).

§ 5. ZAKLJUČAK

Simulacijama molekulske dinamike pokazano je da protein MntR iz bakterije *H. halodurans* zauzima različite konformacije u otopini, ovisno o tome ima li prisutne ione Mn²⁺ u veznim mjestima. Kada su u holoproteinu primjenjeni vezni parametri za opis iona Mn²⁺, došlo je do značajne konformacijske promjene. Udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41 na DNA-veznim domenama smanjila se s početnih 37 Å na 33 Å, što odgovara udaljenosti dva susjedna velika utora kod DNA. S druge strane, kod apoproteina, koji nema prisutne ione mangana u veznim mjestima, došlo je do širenja konformacije i udaljavanja C_α atoma Lys41-Lys41 s početnih 37 Å na 40 Å.

Detaljnom analizom nekovalentnih interakcija pokazano je da je jedna od ključnih vodikovih veza koja osigurava strukturnu stabilnost proteina *HhMntR* u obje forme, s i bez vezanih iona Mn²⁺, veza između Glu7 i Arg76. Mutacijom Arg76 u Glu76 došlo je do značajne konformacijske promjene holomutanta koji je, unatoč vezanim ionima Mn²⁺ u vezno mjesto, poprimio strukturne i dinamičke karakteristike apoproteina. Primjerice, udaljenost DNA-veznih domena, mjerena kao udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41, u holomutantu iznosi 43 Å na kraju simulacije. Također, pronađene su nekovalentne interakcije specifične za apoprotein i za holoprotein, a glavnu razliku čine interakcijski partneri bočnog ogranka Arg72. U holoproteinu, bočni ogrank Arg72 leži u ravnini paralelnoj bočnom ogranku Trp107, čime je omogućena kation-π interakcija. Ta interakcija nije prisutna u apoproteinu u kojem Arg72 ostvaruje vodikovu vezu s Asp111. Mutiranjem bočnog ogranka Trp107 u alifatski Ile107 u holoproteinu, dominantna je postala upravo interakcija Arg72-Asp111, a sam holomutant je zauzeo konformaciju sličniju apoproteinu. Time je detaljno opisana mreža nekovalentnih interakcija u blizini veznog mjesta koja definira specifičnosti struktura apo- i holoproteina *HhMntR*.

Uklapanjem dobivenih konformacija proteina *HhMntR* na DNA koja odgovara operatorskoj sekvenci gena *mntA* dobivena su dva tipa kompleksa: holoprotein-DNA i apoprotein-DNA. U MD simulaciji DNA-vezne domene holoproteina ostale su čvrsto vezane u velike utore DNA, pokazujući time da je riječ o stabilnom i specifičnom vezanju, dok su DNA-vezne domene apoproteina dinamički asocirale i disocirale s molekulom DNA. Slično ponašanje opaženo je u simulacijama koje su za cilj imale opisati nastanak kompleksa jer su u početnoj strukturi protein i DNA bili udaljeni za 20 Å. Holoprotein je već nakon 50 ns simulacije ostvario interakcije s

DNA putem DNA-veznih domena te je ostao čvrsto vezan do kraja simulacije. S druge strane, apoproteinu je trebalo više od 150 ns da ostvari kontakt s DNA, pri čemu je ta interakcija bila nespecifična i mijenjala se tijekom simulacije.

Istražene su i karakteristične nekovalentne interakcije na sučelju DNA i proteina. Stabilne interakcije s velikim utorom DNA holoprotein ostvaruje putem DNA-vezne α_3 zavojnice, preciznije s His35, Pro36, Ser37 i Lys41 kao glavnim nositeljima. Bočni ogranci Arg24, Val25 i Ser26 na α_2 zavojnici u interakciji su s negativnom okosnicom DNA i time dodatno stabiliziraju položaj DNA-vezne α_3 zavojnice u velikom utoru. Pozitivno nabijeni bočni ogranci Arg56 i Arg58 u fleksibilnoj petlji krila DNA-vezne domene ostvaruju interakcije s fosfodiesterskom okosnicom susjednog malog utora na DNA, dok Tyr57 ulazi u mali utor i sudjeluje u $\pi-\pi$ slaganju s nukleobazama. Time petlja krila DNA-vezne domene bogata aminokiselinama s konjugiranim vezama u bočnim ograncima u interakciji s malim utorom dodatno učvršćuje položaj cijelog holoproteina na DNA.

Apoprotein dinamički izmjenjuje položaje na operatorskoj sekvenci DNA, a interakcije koje ostvaruje su kratkoživuće i manje specifične u odnosu na holoprotein. Upravo brza izmjena interakcijskog profila omogućuje apoproteinu asociranje i disociranje s DNA, što upućuje na mogući mehanizam aktivacije proteina za vezanje na DNA. Slobodni apoprotein nalazi se u blizini DNA u uvjetima niske koncentracije Mn^{2+} u bakterijskoj staniči, a jednom kada koncentracija iona Mn^{2+} poraste, dolazi do vezanja iona Mn^{2+} u vezno mjesto na proteinu i aktivacije, čime *HhMntR* zauzima konformaciju holoproteina. Aktivni holoprotein u svojoj rigidnijoj formi ima DNA-vezne domene u optimalnom položaju za vezanje na velike utore operatorske sekvence DNA. Stabilnim i specifičnim vezanjem *HhMntR* sada može obaviti funkciju transkripciskog faktora i represirati transkripciju gena za importere koji bi unijeli dodatne Mn^{2+} u stanicu.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

<i>BsMntR</i>	Regulator transporta mangana iz bakterije <i>Bacillus subtilis</i>
DBD	DNA-vezna domena (engl. <i>DNA-Binding Domain</i>)
DBH	DNA-vezna zavojnica (engl. <i>DNA-Binding Helix</i>)
<i>HhMntR</i>	Regulator transporta mangana iz bakterije <i>Halalkalibacterium halodurans</i>
HTH	Motiv zavojnica-okret-zavojnica (engl. <i>Helix-Turn-Helix motif</i>)
MD	Molekulska dinamika
<i>mntA</i>	Gen u genomu bakterije <i>B. subtilis</i> i <i>H. halodurans</i> za podjedinicu A proteina MntABC
MntABC	MntABC importer iz obitelji ATP-veznih kazeta (engl. <i>ATP-Binding Cassette, ABC</i>)
MntH	Simporter protona H ⁺ i iona Mn ²⁺ iz obitelji NRAMP transportera (engl. <i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein</i>)
MntP	Eksporter iona Mn ²⁺
MntR	Regulator transporta manganovih iona
MntS	Mali protein za eksport iona Mn ²⁺
<i>RG</i>	Radijus giracije
<i>RMSD</i>	Korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. <i>Root Mean Square Deviation</i>)
<i>RMSF</i>	Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (engl. <i>Root Mean-Square Fluctuation</i>)
w-HTH	Motiv krilo-zavojnica-okret-zavojnica (engl. <i>winged Helix-Turn-Helix motif</i>)
α_3 -DBH	α_3 DNA-vezna zavojnica

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, G. L. Holliday i J. M. Thornton, *J Biol Inorg Chem* **13** (2008) 1205–1218.
2. S. L. Begg, *Biochem Soc Trans* **47** (2019) 77–87.
3. K. A. Baksh i D. B. Zamble, *J Biol Chem* **295** (2020) 1673–1684.
4. P. Chandrangs, C. Rensing i J. D. Helmann, *Nat Rev Microbiol* **15** (2017) 338–350.
5. E. F. Bosma, M. H. Rau, L. A. Van Gijtenbeek, S. Siedler i C. Hansen, *FEMS Microbiol Rev* **028** (2021) doi: 10.1093/femsre/fuab028.
6. N. S. Jakubovics i H. F. Jenkinson, *Microbiology (N Y)* **147** (2001) 1709–1718.
7. H. Takami i K. Horikoshi, *Extremophiles* **4** (2000) 99–108.
8. H. Takami i K. Horikoshi, *Biosci Biotechnol Biochem* **63** (1999) 943–945.
9. S. A. Lieser, T. C. Davis, J. D. Helmann i S. M. Cohen, *Biochemistry* **42** (2003) 12634–12642.
10. M. Y. Lee, D. W. Lee, H. K. Joo, K. H. Jeong i J. Y. Lee, *PLoS One* **14** (2019) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224689>.
11. Z. Jelić Matošević, K. Radman, J. Loubser, I. Crnolatac, I. Piantanida, I. Cukrowski, I. L. Ašler i B. Bertoša, *Int J Mol Sci* **24(2)957** (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms24020957>
12. E. W. Boyer, M. B. Ingle i G. D. Mercer, *Int J Syst Bacteriol* **23** (1973) 238–242.
13. P. Nielsen, D. Fritze i F. G. Priest, *Microbiology (N Y)* **141** (1995) 1745–1761.
14. Y. Ikura i K. Horikoshi, *Agric Biol Chem* **43** (1979) 85–88.
15. A. Joshi, S. Thite, P. Karodi, N. Joseph i T. Lodha, *Front Microbiol* **12** (2021) 12:722369. doi: 10.3389/fmicb.2021.722369.
16. F. D. R. Wencker, S. E. Lyon i R. R. Breaker, *Front Microbiol* **15** (2024) 15:1465811. doi: 10.3389/fmicb.2024.1465811.
17. A. Burlacu, C. P. Cornea i F. Israel-Roming, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* **20** (2016) 335-342.
18. M. A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana i V. M. Nurchi, *J Inorg Biochem* **195** (2019) 120–129.
19. J. M. Moulis, *Biomolecules* **10** (2020) 1–26.
20. G. E. Billman, *Front Physiol* **11(200)** (2020) doi: 10.3389/fphys.2020.00200.

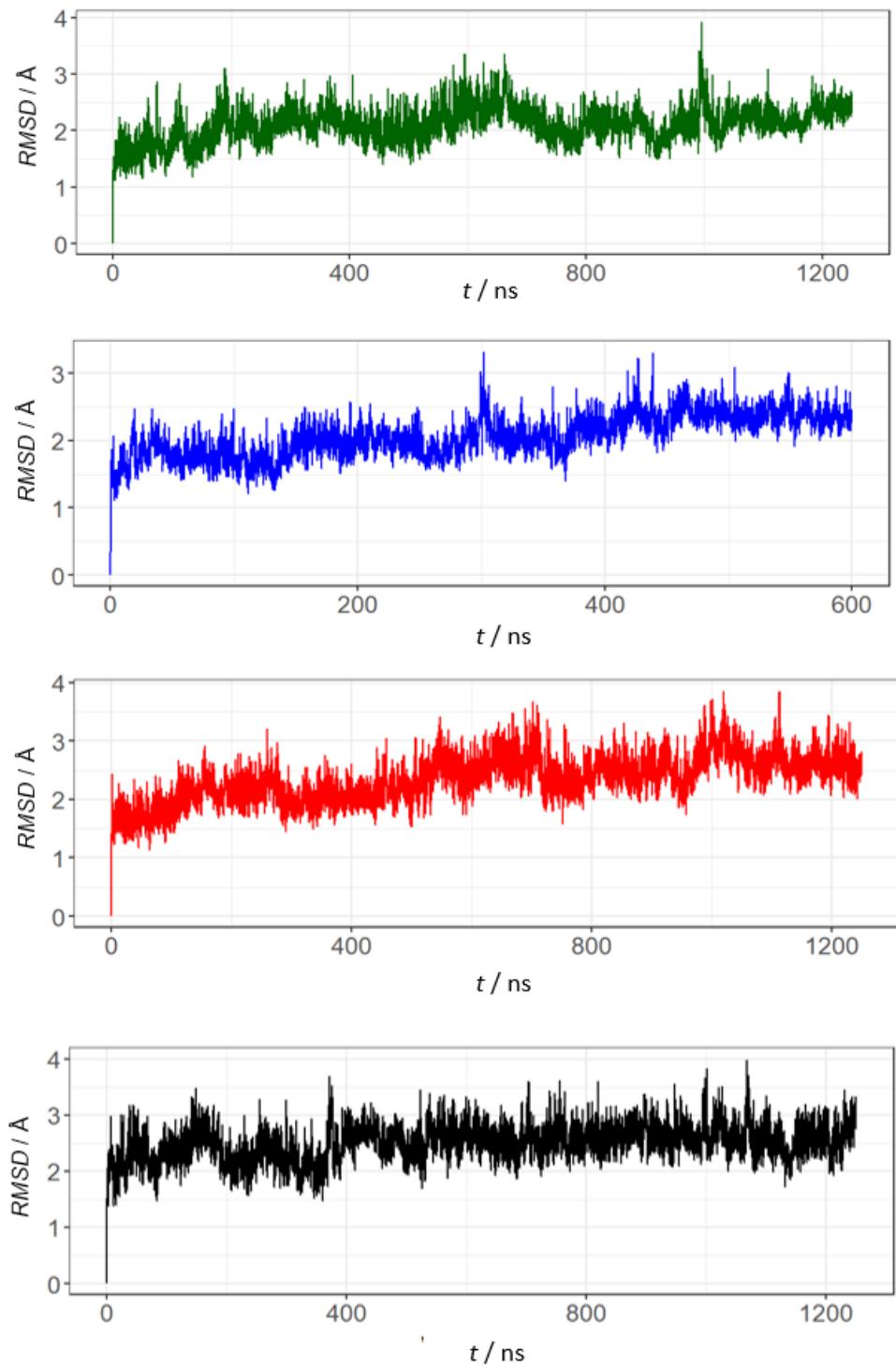
21. <https://www.chemistryworld.com/features/a-chemical-account-of-evolution/5133.article> (preuzeto 15.11.2024.)
22. A. Anjem, S. Varghese i J. A. Imlay, *Mol Microbiol* **72** (2009) 844–858.
23. S. Paruthiyil, A. Pinochet-Barros, X. Huang i J. D. Helmann, *J Bacteriol* **202** (2020).
24. Q. Que i J. D. Helmann, *Mol Microbiol* **35** (2000) 1454–1468.
25. E. Guedon, C. M. Moore, Q. Que, T. Wang, R. W. Ye i J. D. Helmann, *Mol Microbiol* **49** (2003) 1477–1491.
26. J. D. Helmann, *J Biol Chem* **289** (2014) 28112–28120.
27. X. Huang, J. H. Shin, A. Pinochet-Barros, T. T. Su i J. D. Helmann, *Mol Microbiol* **103** (2017) 253–268.
28. A. Glasfeld, E. Guedon, J. D. Helmann i R. G. Brennan, *Nat Struct Biol* **10** (2003) 652–657.
29. M. A. DeWitt, J. I. Kliegman, J. D. Helmann, R. G. Brennan, D. L. Farrens i A. Glasfeld, *J Mol Biol* **365** (2007) 1257–1265.
30. H. Shi, Y. Fu, V. Kodyte, A. Andreas, A. J. Sachla, K. Miller, R. Shrestha, J. D. Helmann, A. Glasfeld i S. Ahuja, *Nat Commun* **16** (2025) <https://doi.org/10.1038/s41467-025-57412-6>.
31. A. M. McGuire, B. J. Cuthbert, Z. Ma, K. D. Grauer-Gray, M. Brunjes Brophy, K. A. Spear, S. Soonsanga, J. I. Kliegman, S. L. Griner, J. D. Helmann i A. Glasfeld, *Biochemistry* **52** (2013) 701–713.
32. J. I. Kliegman, S. L. Griner, J. D. Helmann, R. G. Brennan i A. Glasfeld, *Biochemistry* **45** (2006) 3493–3505.
33. A. M. Knez, Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2023., str. 30-54.
34. W. Humphrey, A. Dalke i K. Schulten, *J Mol Graph* **14** (1996) 33–38.
35. L. Aravind, V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu i L. M. Iyer, *FEMS Microbiol Rev* **29** (2005) 231–262.
36. R. E. Franklin i R. G. Gosling, *Nature 1953* **171** (1953) 740–741.
37. M. Teichmann, H. Dumay-Odelot i S. Fribourg, *Transcription* **3** (2012) 2–7.
38. J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A.

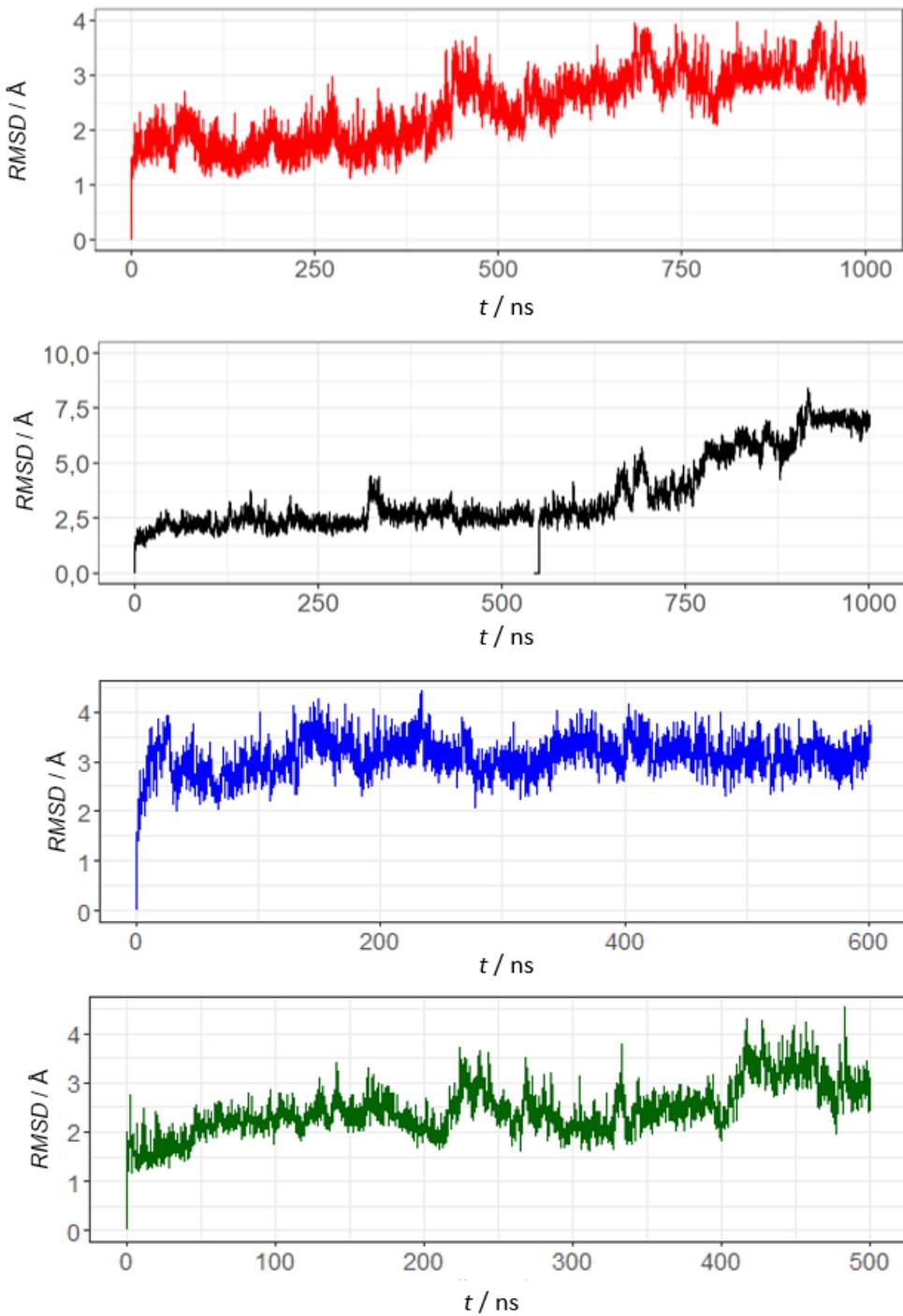
- Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli i D. Hassabis, *Nature* **596** (2021) 583–589.
39. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov i P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res* **28** (2000) 235–242.
40. R. Salomon-Ferrer, D. A. Case i R. C. Walker, *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* **3** (2013) 198–210.
41. O. Büyüköztürk, M. J. Buehler, D. Lau i C. Tuakta, *Int J Solids Struct* **48** (2011) 2131–2140.
42. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman i D. A. Case, *J Comput Chem* **25** (2004) 1157–1174.
43. <https://manual.gromacs.org/documentation/current/user-guide/force-fields.html> (preuzeto 24.1.2025.)
44. V. Gapsys i B. L. de Groot, *Elife* **9** (2020) e57589.
45. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman i D. A. Case, *J Comput Chem* **25** (2004) 1157–1174.
46. D. A. Case, H. M. Aktulga, K. Belfon, I. Y. Ben-Shalom, S. R. Brozell, D. S. Cerutti, T. E. I. Cheatham, G. A. Cisneros, V. W. D. Cruzeiro, T. A. Darden, R. E. Duke, G. Giambasu, M. K. Gilson, H. Gohlke, A. W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S. A. Izmailov, C. Jin, K. Kasavajhala, M. C. Kaymak, E. King, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T. S. Lee, S. LeGrand i, P. Li, C. Lin i P. A. Kollman, *Amber* 2021 (2021).
47. <https://manual.gromacs.org/documentation/current/user-guide/force-fields.html> (preuzeto 24.1.2025.)
48. C. Tian, K. Kasavajhala, K. A. A. Belfon, L. Raguette, H. Huang, A. N. Miguez, J. Bickel, Y. Wang, J. Pincay, Q. Wu i C. Simmerling, *J Chem Theory Comput* **16** (2020) 528–552.
49. V. K. Vyas, R. D. Ukawala, M. Ghate i C. Chintha, *Indian J Pharm Sci* **74** (2012) doi: 10.4103/0250-474X.102537.
50. R. Anandakrishnan, B. Aguilar i A. V. Onufriev, *Nucleic Acids Res* **40** (2012) doi: 10.1093/nar/gks375.
51. J. Zhang, H. Zhang, T. Wu, Q. Wang i D. Van Der Spoel, *J Chem Theory Comput* **13** (2017) 1034–1043.

52. P. Mark i L. Nilsson, *Journal of Physical Chemistry A* **105** (2001) 9954–9960.
53. A. R. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications* (2001) 165–252.
54. P. Li i K. M. Merz, *Chem Rev* **117** (2017) 1564–1686.
55. <https://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial20/> (preuzeto 30.1.2025.)
56. Q. Liao, A. Pabis, B. Strodel i S. C. L. Kamerlin, *J Phys Chem Lett* **8** (2017) 5408–5414.
57. M. Jafari, Z. Li, L. F. Song, L. Sagresti, G. Brancato i K. M. Merz, *J Phys Chem B* **128** (2024) 684–697.
58. Z. Li, L. F. Song, G. Sharma, B. K. Fındık i K. M. Merz, *J Chem Theory Comput* **19** (2023) 619–625.
59. M. B. Peters, Y. Yang, B. Wang, L. Füsti-Molnár, M. N. Weaver i K. M. Merz, *J Chem Theory Comput* **6** (2010) 2935–2947.
60. J. Shao, S. W. Tanner, N. Thompson i T. E. Cheatham, *J Chem Theory Comput* **3** (2007) 2312–2334.
61. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng i T. E. Ferrin, *J Comput Chem* **25** (2004) 1605–1612.
62. J. L. Slonczewski, M. Fujisawa, M. Dopson i T. A. Krulwich, *Adv Microb Physiol*, **55** (2009) 1–317.
63. J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser i C. Simmerling, *J Chem Theory Comput* **11** (2015) 3696–3713.
64. P. Li, L. F. Song i K. M. Merz, *J. Phys. Chem. B* **119** (2015) 883–895.
65. A. M. Knez, M. Manenica, Z. Jelić Matošević i B. Bertoša, *J Biomol Struct Dyn* (2024) doi: 10.1080/07391102.2024.2314265.
66. S. Li, W. K. Olson i X. J. Lu, *Nucleic Acids Res* **47** (2019) W26–W34.
67. M. Zgarbová, J. Šponer, M. Otyepka, T. E. Cheatham, R. Galindo-Murillo i P. Jurečka, *J Chem Theory Comput* **11** (2015) 5723–5736.
68. L. A. Rodríguez-Lumbreras, B. Jiménez-García, S. Giménez-Santamarina i J. Fernández-Recio, *Front Mol Biosci* **9** (2022) 9:988996. doi: 10.3389/fmolb.2022.988996.
69. D. R. Roe i T. E. Cheatham, *J Chem Theory Comput* **9** (2013) 3084–3095.
70. H. Wickham, *ggplot: Elegant Graphics for Data Analysis* (2016) 187–260.
71. <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/hbonds/> (preuzeto: 18.10.2024.)
72. <https://amberhub.chpc.utah.edu/clustering-a-protein-trajectory/> (preuzeto: 18.10.2024.)

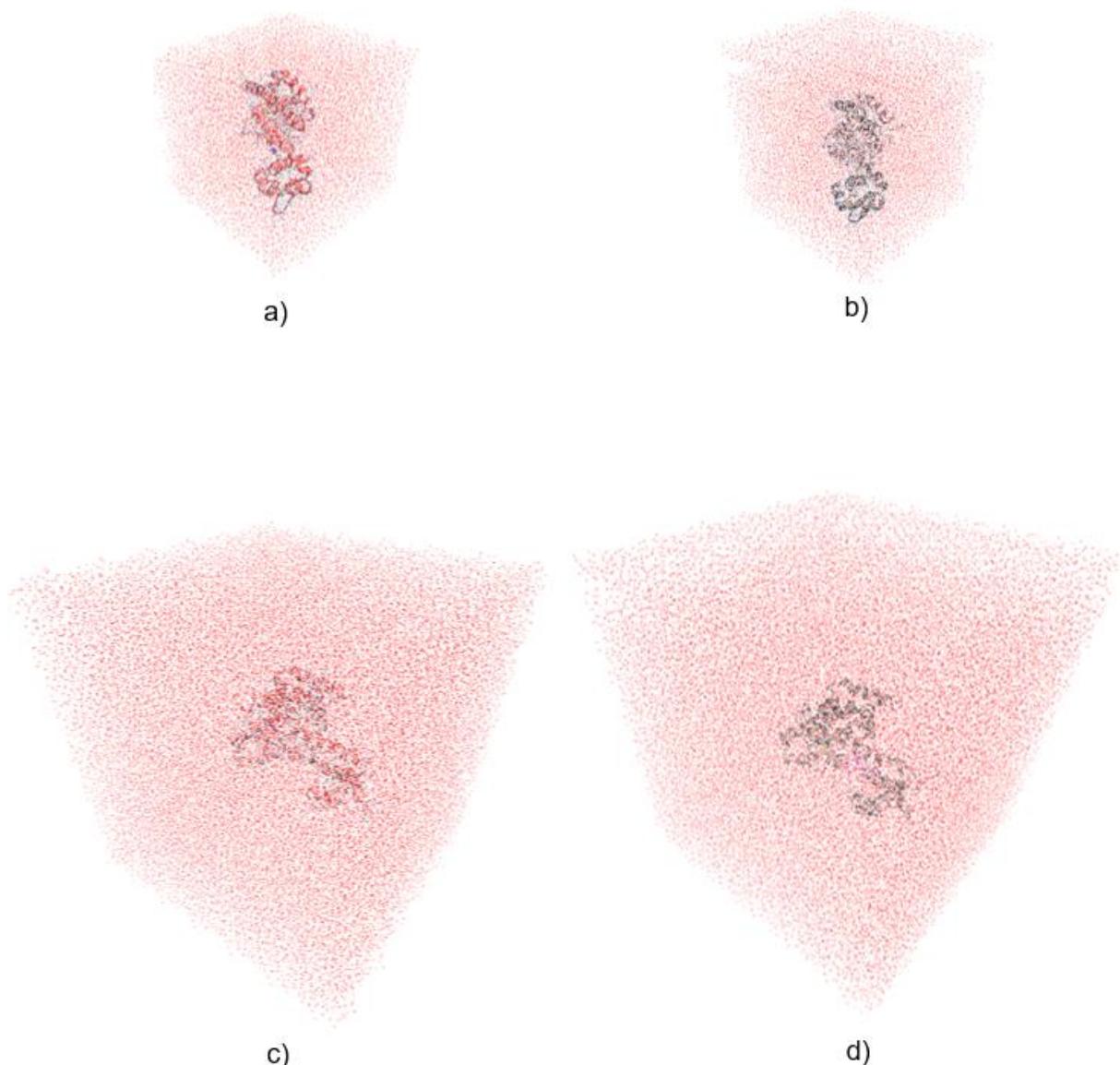
73. E. Jurrus, D. Engel, K. Star, K. Monson, J. Br ii, L. E. Felberg, D. H. Brookes, L. Wilson, J. Chen, K. Liles, M. Chun, P. Li, D. W. Gohara, T. Dolinsky, R. Konecny, D. R. Koes, J. E. Nielsen, T. Head-Gordon, W. Geng, R. Krasny, G. W. Wei, M. J. Holst, J. A. McCammon i N. A. Baker, *Protein Science* **27** (2018) 112–128.
74. J. P. Gallivan i D. A. Dougherty, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (1999) 9459–9464.
75. M. Zgarbová, M. Otyepka, J. Šponer, F. Lankaš i P. Jurečka, *J Chem Theory Comput* **10** (2014) 3177–3189.
76. K. A. Wilson, J. L. Kellie i S. D. Wetmore, *Nucleic Acids Res* **42** (2014) 6726–6741.
77. S. J. Morgan, E. L. French, S. C. Plecha i E. S. Krukonis, *PLoS One* **14** (2019) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221936>.

§ 8. DODATAK

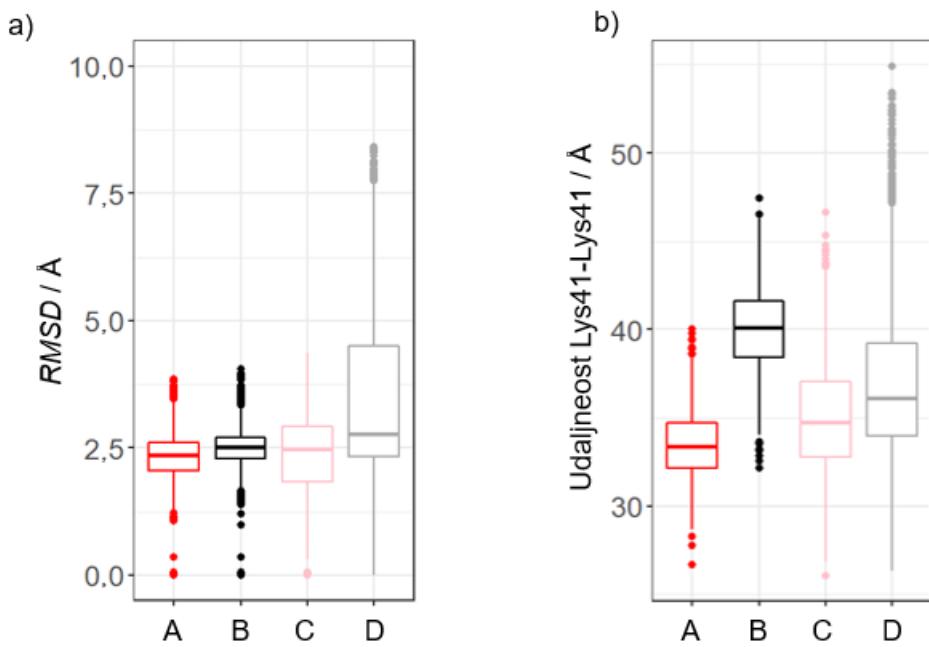




Slika D1. RMSD profili izračunati tijekom MD simulacija. Od gore: Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u jednoj i jednim ionom Mg²⁺ drugoj podjedinici (**zeleno**). Holoprotein s neveznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (**plavo**). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (**crveno**). Apoprotein (**crno**). Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice, kubična kutija od 20 Å (**crveno**). Apoprotein, kubična kutija od 20 Å (**crno**). Prekid nakon 500 ns (crna crta) je uzrokovan tehničkom greškom pohranjivanja trajektorije za vrijeme simulacije MD i ne utječe na cijelokupnu trajektoriju. Holomutant-R76E s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice, kubična kutija od 20 Å (**plavo**). Holomutant-W107I s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjelinice, kubična kutija od 20 Å (**plavo**).



Slika D2. Kubična kutija u vremenu 0 ns korištena u MD simulacijama s kubičnom kutijom ispunjenom eksplicitnim otapalom: veličine 10 Å za a) holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice i b) apoprotein, te veličine 20 Å za c) holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice i d) apoprotein.



Slika D3. Kutjasti dijagram: a) RMSD vrijednosti i b) udaljenosti između C_α atoma Lys41-Lys41 određenih tijekom MD simulacija: holoproteina s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice (crveno - A), apoproteina (crno - B), holoproteina s veznim parametrima za dva iona Mn²⁺ u obje podjedinice u kubičnoj kutiji od 20 Å (ružičasto - C) i apoproteina u kubičnoj kutiji od 20 Å (sivo-D).

Tablica D1. Srednje vrijednosti i pripadne standardne devijacije određene za RMSD i udaljenost između C_α atoma Lys41-Lys41 tijekom MD simulacija. Za svaki sustav navedena je i veličina simulacijske kutije u Å.

Sustav	RMSD / Å	Udaljenost Lys41-Lys41 / Å
Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn ²⁺ u obje podjedinice (10 Å) – A	$2,3 \pm 0,4$ Å	33 ± 2 Å
Apoprotein (10 Å) – B	$2,5 \pm 0,3$ Å	40 ± 2 Å
Holoprotein s veznim parametrima za dva iona Mn ²⁺ u obje podjelinice (20 Å) – C	$2,4 \pm 0,6$ Å	35 ± 3 Å
Apoprotein (20 Å) – D	4 ± 2 Å	37 ± 4 Å

Tablica D2. Zastupljenost vodikovih veza (prema kriteriju udaljenosti $< 3.2 \text{ \AA}$) u MD simulaciji holoproteina u trajanju od 1250 ns. Oznake aminokiselina 1-138 odgovaraju lancu A, a 139-276 lancu B.

Donor vodikove veze	Akceptor vodikove veze	Zastupljenost / %
SER263-Bočni ogranač	ASP261-Bočni ogranač	74,60
SER244-Bočni ogranač	ASP97-Bočni ogranač	69,05
SER125-Bočni ogranač	ASP123-Bočni ogranač	67,46
ASP78-Okosnica	VAL74-Okosnica	59,52
THR40-Bočni ogranač	PRO36-Okosnica	57,94
THR63-Bočni ogranač	ASP50-Okosnica	54,76
THR178-Bočni ogranač	PRO174-Okosnica	53,97
SER49-Bočni ogranač	LYS45-Okosnica	53,17
ARG76-Bočni ogranač	GLU7-Bočni ogranač	52,38
SER106-Bočni ogranač	ASP108-Bočni ogranač	52,38
LYS67-Okosnica	THR63-Okosnica	50,79
THR201-Bočni ogranač	ASP188-Okosnica	50,79
ARG126-Bočni ogranač	TYR119-Okosnica	48,41
ARG24-Bočni ogranač	ASP27-Bočni ogranač	48,41
ARG264-Bočni ogranač	TYR257-Okosnica	46,83
ILE13-Okosnica	TYR9-Okosnica	46,83
ILE151-Okosnica	TYR147-Okosnica	46,83
ILE199-Okosnica	VAL191-Okosnica	46,83
LYS205-Okosnica	THR201-Okosnica	46,83
ARG162-Bočni ogranač	ASP165-Bočni ogranač	46,03
TYR75-Okosnica	LYS71-Okosnica	44,44
ARG214-Bočni ogranač	GLU145-Bočni ogranač	43,65
ASH235-Bočni ogranač	SER106-Bočni ogranač	42,86
VAL181-Okosnica	VAL177-Okosnica	42,86
ASP216-Okosnica	VAL212-Okosnica	42,06
VAL43-Okosnica	VAL39-Okosnica	41,27
SER187-Bočni ogranač	LYS183-Okosnica	40,48
VAL255-Okosnica	ILE251-Okosnica	40,48
LYS71-Okosnica	LYS67-Okosnica	38,89
VAL117-Okosnica	ILE113-Okosnica	38,89
LEU60-Okosnica	ALA23-Okosnica	38,10
LYS158-Okosnica	LEU154-Okosnica	38,10
LYS48-Okosnica	GLN44-Okosnica	36,51
LEU10-Okosnica	MET6-Okosnica	35,71
LEU217-Okosnica	TYR213-Okosnica	35,71
LYS209-Okosnica	LYS205-Okosnica	35,71
LEU46-Okosnica	MET42-Okosnica	34,13
TYR213-Okosnica	LYS209-Okosnica	34,13
LEU148-Okosnica	MET144-Okosnica	33,33
LYS186-Okosnica	GLN182-Okosnica	33,33
VAL212-Okosnica	GLY208-Okosnica	33,33
GLN272-Bočni ogranač	ILE225-Okosnica	32,54

ILE225-Okosnica	PHE221-Okosnica	32,54
VAL53-Okosnica	ILE61-Okosnica	32,54
GLN134-Okosnica	LEU130-Okosnica	31,75
VAL191-Okosnica	ILE199-Okosnica	31,75
ARG150-Okosnica	AP1146-Okosnica	30,95
ILE239-Okosnica	ASH235-Okosnica	30,95
LYS20-Okosnica	LEU16-Okosnica	30,95
THR63-Okosnica	TYR51-Okosnica	30,95
ARG12-Okosnica	AP18-Okosnica	30,16
LEU32-Okosnica	ILE28-Okosnica	30,16
ILE69-Okosnica	LYS65-Okosnica	28,57
VAL236-Okosnica	ILE232-Okosnica	28,57
ALA29-Okosnica	VAL25-Okosnica	27,78
ARG269-Okosnica	LEU265-Okosnica	27,78
GLN272-Okosnica	LEU268-Okosnica	27,78
LEU79-Okosnica	TYR75-Okosnica	27,78
SER244-Okosnica	ASP97-Bočni ogranač	27,78
THR201-Okosnica	TYR189-Okosnica	27,78
ALA167-Okosnica	VAL163-Okosnica	26,98
ASP129-Okosnica	SER125-Okosnica	26,98
ASP47-Okosnica	VAL43-Okosnica	26,98
LEU222-Okosnica	LEU218-Okosnica	26,98
LEU84-Okosnica	LEU80-Okosnica	26,98
LYS65-Bočni ogranač	SER49-Okosnica	26,98
PHE83-Okosnica	LEU79-Okosnica	26,98
ASP185-Okosnica	VAL181-Okosnica	26,19
LEU184-Okosnica	MET180-Okosnica	26,19
LYS203-Bočni ogranač	SER187-Okosnica	26,19
VAL74-Okosnica	GLY70-Okosnica	26,19
ARG214-Okosnica	ARG210-Okosnica	25,40
ARG76-Okosnica	ARG72-Okosnica	25,40
GLN256-Okosnica	GLY252-Okosnica	25,40
GLY114-Okosnica	ILE110-Okosnica	25,40
HD1103-Bočni ogranač	GLU7-Bočni ogranač	25,40
ILE248-Okosnica	SER244-Okosnica	25,40
LYS206-Okosnica	ALA202-Okosnica	25,40
LYS68-Okosnica	ALA64-Okosnica	25,40
ASH235-Okosnica	HIP231-Okosnica	24,60
ILE232-Okosnica	ASP228-Okosnica	24,60
THR40-Okosnica	PRO36-Okosnica	24,60
VAL89-Okosnica	LEU84-Okosnica	24,60
ASN275-Bočni ogranač	ASP115-Bočni ogranač	23,81
GLU193-Okosnica	GLY197-Okosnica	23,81
ILE207-Okosnica	LYS203-Okosnica	23,81
ILE61-Okosnica	VAL53-Okosnica	23,81
LEU170-Okosnica	ILE166-Okosnica	23,02

ASP267-Okosnica	SER263-Okosnica	22,22
GLU145-Okosnica	THR141-Okosnica	22,22
GU2237-Okosnica	TYR233-Okosnica	22,22
ILE17-Okosnica	ILE13-Okosnica	22,22
ILE87-Okosnica	PHE83-Okosnica	22,22
LYS41-Okosnica	SER37-Okosnica	22,22
VAL227-Okosnica	LEU222-Okosnica	22,22
GLN44-Okosnica	THR40-Okosnica	21,43
GLU260-Okosnica	GLN256-Okosnica	21,43
LEU73-Okosnica	ILE69-Okosnica	21,43
LYS223-Okosnica	GLU219-Okosnica	21,43
LYS85-Okosnica	GLU81-Okosnica	21,43
TYR119-Okosnica	ASP115-Okosnica	21,43
TYR257-Okosnica	ASP253-Okosnica	21,43
TYR257-Bočni ogranač	TYR119-Bočni ogranač	21,43
GLU55-Okosnica	GLY59-Okosnica	20,63
HIP93-Okosnica	ASP90-Okosnica	20,63
PHE221-Okosnica	LEU217-Okosnica	20,63

Tablica D3. Zastupljenost vodikovih veza (prema kriteriju udaljenosti $< 3.2 \text{ \AA}$) u MD simulaciji apoproteina u trajanju od 1250 ns. Oznake aminokiselina 1-139 odgovaraju lancu A, a 140-278 lancu B.

Donor vodikove veze	Akceptor vodikove veze	Zastupljenost / %
SER125-Bočni ogranač	ASP123-Bočni ogranač	75,40
SER106-Bočni ogranač	ASP235-Bočni ogranač	73,02
SER263-Bočni ogranač	ASP261-Bočni ogranač	71,43
THR40-Bočni ogranač	PRO36-Okosnica	63,49
ARG162-Bočni ogranač	ASP165-Bočni ogranač	61,90
SER187-Bočni ogranač	LYS183-Okosnica	52,38
VAL181-Okosnica	VAL177-Okosnica	52,38
THR178-Bočni ogranač	PRO174-Okosnica	51,59
ARG76-Bočni ogranač	GLU7-Bočni ogranač	50,79
GLU240-Okosnica	VAL236-Okosnica	50,79
ARG214-Bočni ogranač	GLU145-Bočni ogranač	50,00
ARG126-Bočni ogranač	TYR119-Okosnica	49,21
ILE199-Okosnica	VAL191-Okosnica	49,21
SER49-Bočni ogranač	LYS45-Okosnica	49,21
THR201-Bočni ogranač	ASP188-Okosnica	49,21
THR63-Bočni ogranač	ASP50-Okosnica	48,41
LYS71-Okosnica	LYS67-Okosnica	46,03
SER244-Bočni ogranač	ASP97-Bočni ogranač	46,03
ARG24-Bočni ogranač	ASP27-Bočni ogranač	44,44
ARG264-Bočni ogranač	TYR257-Okosnica	44,44
ASP78-Okosnica	VAL74-Okosnica	42,86
LYS205-Okosnica	THR201-Okosnica	42,86

LYS209-Okosnica	LYS205-Okosnica	42,86
LEU217-Okosnica	TYR213-Okosnica	41,27
ASN137-Bočni ogranač	ASP253-Bočni ogranač	40,48
HIP231-Bočni ogranač	ASP235-Bočni ogranač	40,48
LYS67-Okosnica	THR63-Okosnica	40,48
ASP216-Okosnica	VAL212-Okosnica	38,89
LEU60-Okosnica	ALA23-Okosnica	38,89
ARG250-Bočni ogranač	ASP253-Bočni ogranač	38,10
ILE151-Okosnica	TYR147-Okosnica	38,10
VAL255-Okosnica	ILE251-Okosnica	38,10
VAL43-Okosnica	VAL39-Okosnica	37,30
LYS20-Bočni ogranač	ASP27-Bočni ogranač	36,51
ILE13-Okosnica	TYR9-Okosnica	35,71
LYS186-Okosnica	GLN182-Okosnica	35,71
LEU148-Okosnica	MET144-Okosnica	34,92
TYR213-Okosnica	LYS209-Okosnica	34,92
LYS85-Okosnica	GLU81-Okosnica	34,13
VAL53-Okosnica	ILE61-Okosnica	33,33
GLU193-Okosnica	GLY197-Okosnica	32,54
LEU198-Okosnica	ALA161-Okosnica	32,54
LYS223-Okosnica	GLU219-Okosnica	32,54
ARG269-Okosnica	LEU265-Okosnica	31,75
ARG72-Bočni ogranač	ASP111-Bočni ogranač	30,95
ILE155-Okosnica	ILE151-Okosnica	30,95
LEU46-Okosnica	MET42-Okosnica	30,95
LYS158-Okosnica	LEU154-Okosnica	30,95
LYS20-Okosnica	LEU16-Okosnica	30,95
VAL191-Okosnica	ILE199-Okosnica	30,95
ASP111-Okosnica	TRP107-Okosnica	30,16
GLU11-Okosnica	GLU7-Okosnica	30,16
LEU184-Okosnica	MET180-Okosnica	30,16
LYS48-Okosnica	GLN44-Okosnica	30,16
THR178-Okosnica	PRO174-Okosnica	30,16
VAL117-Okosnica	ILE113-Okosnica	30,16
VAL227-Okosnica	LEU222-Okosnica	30,16
PHE221-Okosnica	LEU217-Okosnica	29,37
TYR75-Okosnica	LYS71-Okosnica	29,37
VAL89-Okosnica	LEU84-Okosnica	29,37
ARG131-Okosnica	LEU127-Okosnica	28,57
ILE207-Okosnica	LYS203-Okosnica	28,57
LEU79-Okosnica	TYR75-Okosnica	28,57
PHE83-Okosnica	LEU79-Okosnica	28,57
TYR75-Bočni ogranač	ASP111-Bočni ogranač	28,57
ARG58-Bočni ogranač	GLU55-Bočni ogranač	27,78
GLU102-Okosnica	VAL98-Okosnica	27,78
LYS65-Bočni ogranač	SER49-Okosnica	27,78

THR201-Okosnica	TYR189-Okosnica	27,78
THR40-Okosnica	PRO36-Okosnica	27,78
THR63-Okosnica	TYR51-Okosnica	27,78
ALA29-Okosnica	VAL25-Okosnica	26,98
GLN134-Okosnica	LEU130-Okosnica	26,98
TYR233-Bočni ogranač	GLU219-Bočni ogranač	26,98
GLH149-Okosnica	GLU145-Okosnica	26,19
LEU222-Okosnica	LEU218-Okosnica	26,19
VAL236-Okosnica	ILE232-Okosnica	26,19
ALA167-Okosnica	VAL163-Okosnica	25,40
HIP215-Bočni ogranač	GLU240-Bočni ogranač	25,40
LYS41-Okosnica	SER37-Okosnica	25,40
ARG210-Bočni ogranač	ASP249-Bočni ogranač	24,60
GLU156-Okosnica	TYR152-Okosnica	24,60
GLY208-Okosnica	GLY204-Okosnica	24,60
GLY70-Okosnica	GLY66-Okosnica	24,60
ILE110-Okosnica	SER106-Okosnica	24,60
LEU32-Okosnica	ILE28-Okosnica	24,60
LYS206-Okosnica	ALA202-Okosnica	24,60
TYR152-Okosnica	LEU148-Okosnica	24,60
GLU145-Okosnica	THR141-Okosnica	23,81
ILE69-Okosnica	LYS65-Okosnica	23,81
LYS203	SER187-Okosnica	23,81
GLN182-Okosnica	THR178-Okosnica	23,02
GLN44-Okosnica	THR40-Okosnica	23,02
LEU170-Okosnica	ILE166-Okosnica	23,02
VAL74-Okosnica	GLY70-Okosnica	23,02
ASP97-Okosnica	HIP93-Okosnica	22,22
HIP215-Okosnica	LEU211-Okosnica	22,22
LYS68-Okosnica	ALA64-Okosnica	22,22
TYR119-Bočni ogranač	TYR257-Bočni ogranač	22,22
VAL212-Okosnica	GLY208-Okosnica	22,22
ASP129-Okosnica	SER125-Okosnica	21,43
ASP267-Okosnica	SER263-Okosnica	20,63
HIP104-Bočni ogranač	GLY100-Okosnica	20,63
SER244-Okosnica	ASP97-Bočni ogranač	20,63

Tablica D4. Sekvenca dvostrukke zavojnice DNA koja odgovara operatorskoj sekvenci *mntA* s danim rednim brojevima nukleobaza koji su navedeni u trajektorijama MD simulacija.

Redni broj u MD simulaciji		
Nukleobaza	Apoprotein	Holoprotein
5-T	279	283
T	280	284
T	281	285
G	282	286
T	283	287
A	284	288
G	285	289
C	286	290
T	287	291
T	288	292
G	289	293
T	290	294
T	291	295
T	292	296
T	293	297
G	294	298
C	295	299
C	296	300
T	297	301
T	298	302
G	299	303
G	300	304
G	301	305
G	302	306
A	303	307
A	304	308
A	305	309
C	306	310
T	307	311
T	308	312
T	309	313
T	310	314
T	311	315
3-G	312	316
A	313	317
A	314	318
A	315	319
A	316	320
A	317	321
G	318	322
T	319	323
T	320	324

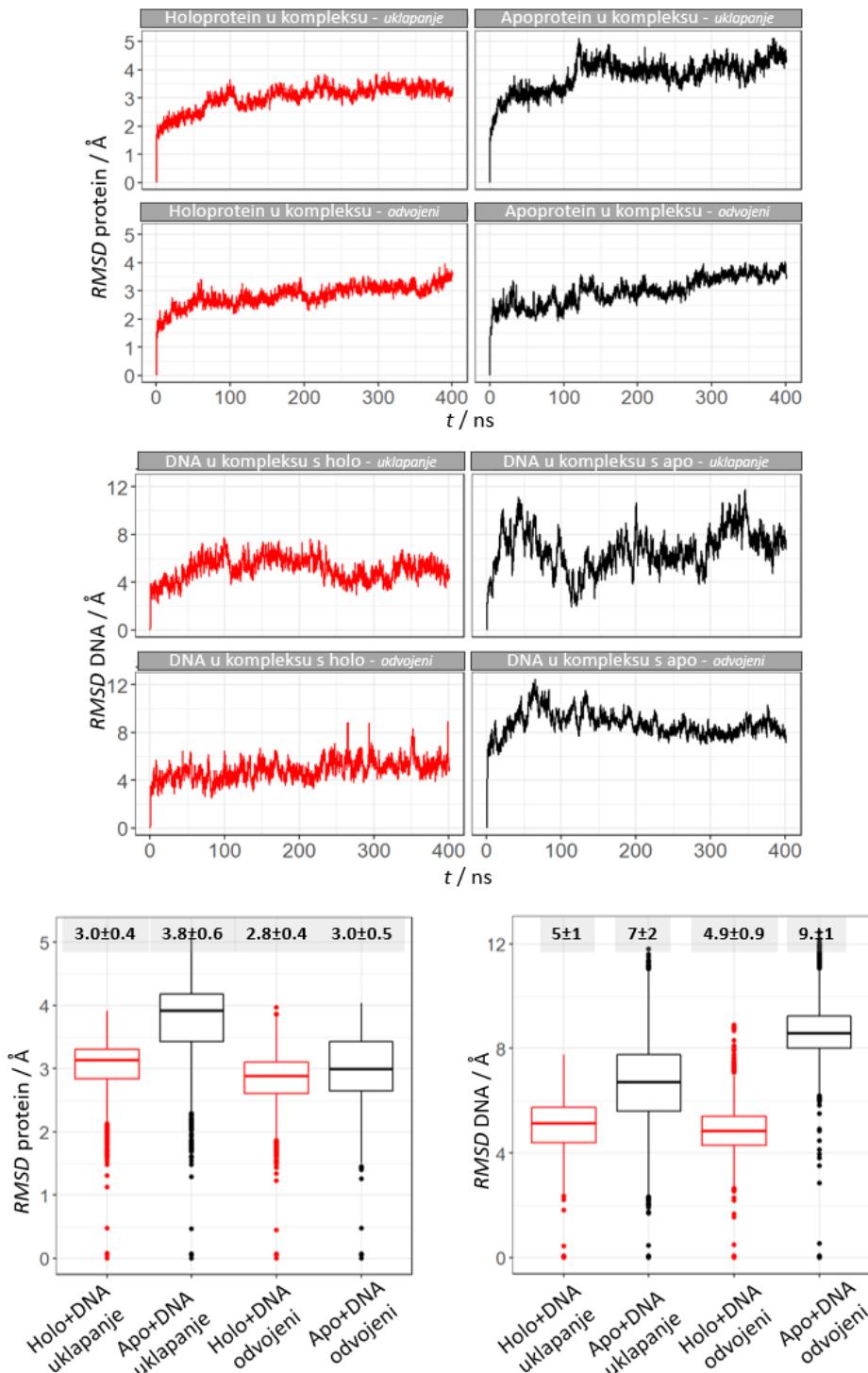
T	321	325
C	322	326
C	323	327
C	324	328
C	325	329
A	326	330
A	327	331
G	328	332
G	329	333
C	330	334
A	331	335
A	332	336
A	333	337
A	334	338
C	335	339
A	336	340
A	337	341
G	338	342
C	339	343
T	340	344
A	341	345
C	342	346
A	343	347
A	344	348
3-A	345	349

Tablica D5. Molekulsko uklapanje holoproteina *HhMntR* na operatorsku sekvencu *mntA* u relaksiranoj formi DNA. Prikazani su rezultati za prvih 10 klastera.

Konfiguracija	Elektrostatski doprinos	Deslovacija	VdW	Rang PyDockDNA pristup (bez desolvacije)	
3926	-47.577	31.349	11.346	-46.442	1
4177	-49.322	35.525	33.034	-46.019	2
2438	-44.038	31.456	1.986	-43.839	3
1294	-44.622	26.401	20.623	-42.560	4
5222	-43.642	15.211	21.722	-41.470	5
3695	-39.012	28.142	-18.682	-40.880	6
8745	-40.413	33.931	-4.322	-40.845	7
2128	-34.415	15.082	-46.285	-39.044	8
8390	-43.410	12.573	47.639	-38.646	9
9853	-39.204	24.777	10.347	-38.169	10

Tablica D6. Molekulsko uklapanje holoproteina *HhMntR* na operatorsku sekvencu *mntA* u relaksiranoj formi DNA. Prikazani su rezultati za prvih 10 klastera.

Konfiguracija	Elektrostatski doprinos	Deslovacija	VdW	Rang PyDockDNA pristup (bez desolvacije)	
2344	-76.133	48.165	-6.038	-76.737	1
8103	-80.022	26.232	40.104	-76.012	2
6731	-83.682	44.094	77.983	-75.884	3
3812	-78.138	41.899	24.724	-75.666	4
4599	-80.125	32.112	45.273	-75.598	5
5593	-76.642	24.299	12.193	-75.423	6
7647	-73.985	37.258	-12.041	-75.189	7
3305	-74.336	23.601	-8.040	-75.140	8
7654	-74.587	41.590	-3.012	-74.888	9
9742	-71.744	39.607	-12.049	-72.949	10



Slika D4. RMSD grafovi proteina i DNA u provedenim MD simulacijama: kompleks holoproteina i DNA tijekom 400 ns MD simulacije započete od strukture dobivene molekulskim uklapanjem (*Holo+DNA uklapanje*), kompleks apoproteina i DNA tijekom 400 ns MD simulacije započete od strukture dobivene molekulskim uklapanjem (*Apo+DNA uklapanje*), kompleks holoproteina i DNA tijekom 400 ns MD simulacije započete od strukture gdje je protein udaljen 20 Å od DNA (*Holo+DNA odvojeni*), kompleks apoproteina i DNA tijekom 400 ns MD simulacije započete od strukture gdje je protein udaljen 20 Å od DNA (*Apo+DNA odvojeni*).

Tablica D7. Zastupljenost vodikovih veza (prema kriteriju udaljenosti $< 3.2 \text{ \AA}$) u MD simulaciji ukupnog trajanja od 400 ns holoproteina *HhMntR* i operatorske sekvene *mntA* započetoj od strukture dobivene molekulskim uklapanjem. Prikazane su interakcije između proteina i DNA okosnice (plavo) te proteina i DNA nukleobaza (narančasto) sa zastupljenošću $> 5\%$. Lanac proteina naveden je u zagradi pored oznake aminokiseline.

Lokacija aminokiseline u proteinu	Akceptor vodikove veze	Atom vodika u vezi	Donor vodikove veze	Zastupljenost / %	Prosječna udaljenost / \AA	Prosječni kut / °
$\alpha_1-\alpha_2$ petlja	DC_290@OP1	ARG_24(A)@HE	ARG_24(A)@NE	19	2,84	158
	DG_289@O3'	ARG_24(A)@HH21	ARG_24(A)@NH2	6	2,85	148
	DT_325@OP1	ARG_24(B)@HE	ARG_24(B)@NE	19	2,83	157
	DT_325@OP1	ARG_24(B)@HH11	ARG_24(B)@NH1	25	2,81	158
	DT_324@O3'	ARG_24(B)@HH21	ARG_24(B)@NH2	10	2,87	153
	DT_325@OP1	ARG_24(B)@HH21	ARG_24(B)@NH2	9	2,85	150
α_2 -zavojnica	DC_290@OP1	VAL_25(A)@H	VAL_25(A)@N	39	2,87	158
	DC_290@OP2	SER_26(A)@H	SER_26(A)@N	78	2,83	159
	DC_290@OP2	SER_26(A)@HG	SER_26(A)@OG	94	2,66	165
	DT_325@OP2	SER_26(B)@HG	SER_26(B)@OG	39	2,72	163
	DT_325@OP1	SER_26(B)@HG	SER_26(B)@OG	37	2,72	164
$\alpha_2-\alpha_3$ petlja	HID_35(A)@NE2	DC_339@H41	DC_339@N4	26	2,92	163
	DG_303@OP2	HID_35(B)@H	HID_35(B)@N	18	2,86	153
	DG_303@OP2	HID_35(B)@HD1	HID_35(B)@ND1	42	2,81	160
α_3 -DBH	DT_292@O4	SER_37(A)@HG	SER_37(A)@OG	62	2,72	161
	DG_293@O6	SER_37(A)@HG	SER_37(A)@OG	21	2,72	161
	SER_37(B)@OG	DC_327@H41	DC_327@N4	30	2,86	163
	DG_304@O6	SER_37(B)@HG	SER_37(B)@OG	14	2,75	159
	DG_303@N7	SER_37(B)@HG	SER_37(B)@OG	12	2,80	160
	DG_303@O6	SER_37(B)@HG	SER_37(B)@OG	10	2,72	160
	DT_291@OP2	THR_40(A)@HG1	THR_40(A)@OG1	64	2,68	167
	DG_293@N7	LYS_41(A)@HZ1	LYS_41(A)@NZ	10	2,90	154
	DG_293@N7	LYS_41(A)@HZ2	LYS_41(A)@NZ	9	2,90	155
	DG_293@N7	LYS_41(A)@HZ3	LYS_41(A)@NZ	9	2,90	155
	DT_292@OP2	GLN_44(A)@HE22	GLN_44(A)@NE2	67	2,82	161
krilo - β -ploča	DC_290@OP1	TYR_54(A)@HH	TYR_54(A)@OH	28	2,65	167
	DT_291@OP2	TYR_54(A)@HH	TYR_54(A)@OH	22	2,73	162
	DC_326@OP1	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	70	2,74	163
	DC_327@OP2	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	7	2,70	160
krilo - zavojnica između β -ploča	DC_346@OP1	ARG_56(A)@HE	ARG_56(A)@NE	14	2,86	159
	DA_345@OP1	ARG_56(A)@HE	ARG_56(A)@NE	8	2,84	157
	DC_346@OP2	ARG_56(A)@HE	ARG_56(A)@NE	6	2,86	154
	DA_345@OP1	ARG_56(A)@HH12	ARG_56(A)@NH1	6	2,81	155
	DC_346@OP2	ARG_56(A)@HH21	ARG_56(A)@NH2	27	2,80	159
	DC_346@OP1	ARG_56(A)@HH21	ARG_56(A)@NH2	8	2,82	155
	DA_345@OP1	ARG_56(A)@HH21	ARG_56(A)@NH2	6	2,83	153

	DC_327@OP1	ARG_56(B)@HE	ARG_56(B)@NE	42	2,84	153
	DC_327@OP2	ARG_56(B)@HE	ARG_56(B)@NE	5	2,84	154
	DC_327@OP1	ARG_56(B)@HH11	ARG_56(B)@NH1	6	2,83	154
	DC_327@OP1	ARG_56(B)@HH21	ARG_56(B)@NH2	39	2,81	152
	DC_326@O3'	ARG_56(B)@HH21	ARG_56(B)@NH2	6	2,87	151
	DC_327@OP2	ARG_56(B)@HH21	ARG_56(B)@NH2	5	2,83	151
	DC_326@OP1	TYR_57(B)@H	TYR_57(B)@N	54	2,85	159
	DA_308@N3	TYR_57(B)@HH	TYR_57(B)@OH	6	2,86	159
	DT_325@O2	TYR_57(B)@HH	TYR_57(B)@OH	6	2,78	158
	DC_310@OP1	ARG_58(B)@HE	ARG_58(B)@NE	7	2,86	153
	DC_310@OP1	ARG_58(B)@HH12	ARG_58(B)@NH1	22	2,80	155
	DT_311@OP1	ARG_58(B)@HH12	ARG_58(B)@NH1	6	2,83	157
	DC_310@OP1	ARG_58(B)@HH21	ARG_58(B)@NH2	11	2,81	155
	DC_310@OP1	ARG_58(B)@HH22	ARG_58(B)@NH2	16	2,82	151

Tablica D8. Zastupljenost vodikovih veza (prema kriteriju udaljenosti $< 3.2 \text{ \AA}$) u MD simulaciji ukupnog trajanja od 400 ns holoproteina *HhMntR* i operatorske sekvene *mntA* započetoj od strukture u kojoj su protein i DNA udaljeni 20 \AA . Prikazane su interakcije između proteina i DNA okosnice (plavo), te proteina i DNA nukleobaza (narančasto) sa zastupljenošću $> 5\%$. Lanac proteina naveden je u zagradi pored oznake aminokiseline.

Lokacija aminokiselina u proteinu	Akceptor vodikove veze	Atom vodika u vezi	Donor vodikove veze	Zastupljenost / %	Prosječna udaljenost / \AA	Prosječni kut / °
$\alpha_1-\alpha_2$ petlja	DT_291@OP1	ARG_24(A)@HE	ARG_24(A)@NE	88	2,83	164
α_2 -zavojnica	DT_291@OP2	SER_26(A)@H	SER_26(A)@N	7	2,84	153
	DT_291@OP2	SER_26(A)@HG	SER_26(A)@OG	7	2,83	155
$\alpha_2-\alpha_3$ petlja	DA_337@OP2	HID_35(A)@H	HID_35(A)@N	12	2,83	154
	DA_337@OP2	HID_35(A)@HD1	HID_35(A)@ND1	11	2,88	162
	DT_302@OP1	HID_35(B)@HD1	HID_35(B)@ND1	15	2,67	167
	DT_302@OP2	HID_35(B)@HD1	HID_35(B)@ND1	14	2,84	163
α_3 -DBH	DG_293@O6	SER_37(A)@HG	SER_37(A)@OG	7	2,82	157
	DG_303@N7	SER_37(B)@HG	SER_37(B)@OG	7	2,81	158
	DA_337@OP2	SER_37(A)@HG	SER_37(A)@OG	7	2,84	155
	DT_302@OP2	SER_37(B)@HG	SER_37(B)@OG	7	2,83	157
	DG_303@O6	LYS_41(B)@HZ2	LYS_41(B)@NZ	8	2,82	154
	DG_303@O6	LYS_41(B)@HZ3	LYS_41(B)@NZ	8	2,82	155
	DG_303@O6	LYS_41(B)@HZ1	LYS_41(B)@NZ	8	2,80	155
krilo - β -ploča	DC_327@OP2	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	6	2,85	157
krilo - petlja između β -ploča	DA_345@OP2	ARG_56(A)@HH	ARG_56(A)@NH2	85	2,84	163
	DT_325@O2	TYR_57(B)@HH	TYR_57(B)@OH	5	2,84	157
	DA_308@N3	TYR_57(B)@HH	TYR_57(B)@OH	5	2,81	158

Tablica D9. Zastupljenost vodikovih veza (prema kriteriju udaljenosti $< 3.2 \text{ \AA}$) u MD simulaciji ukupnog trajanja od 400 ns apoproteina *HhMntR* i operatorske sekvene *mntA* započetoj od strukture dobivene molekulskim uklapanjem. Prikazane su interakcije između proteina i DNA okosnice (plavo), te proteina i DNA nukleobaza (narančasto) sa zastupljenošću $> 5\%$. Lanac proteina naveden je u zagradi pored oznake aminokiseline.

Lokacija aminokiseline u proteinu	Akceptor vodikove veze	Atom vodika u vezi	Donor vodikove veze	Zastupljenost / %	Prosječna udaljenost / \AA	Prosječni kut / °
α_1 -zavojnica	DC_323@OP2	MET_1(B)@H1	MET_1(B)@N	9	2,84	153
	DC_323@OP2	MET_1(B)@H2	MET_1(B)@N	8	2,85	152
	DC_323@OP2	MET_1(B)@H3	MET_1(B)@N	7	2,85	153
	DC_323@O5'	MET_1(B)@H2	MET_1(B)@N	7	2,85	150
	DC_323@O5'	MET_1(B)@H1	MET_1(B)@N	6	2,85	150
	DC_323@O5'	MET_1(B)@H3	MET_1(B)@N	6	2,84	150
	DA_334@OP1	THR_3(A)@HG1	THR_3(A)@OG1	21	2,72	163
	DG_294@OP1	THR_3(A)@HG1	THR_3(A)@OG1	18	2,69	164
	DG_294@OP2	THR_3(A)@HG1	THR_3(A)@OG1	7	2,66	166
	DA_334@OP1	SER_5(A)@H	SER_5(A)@N	14	2,87	158
	DG_294@OP1	SER_5(A)@H	SER_5(A)@N	7	2,88	158
	DA_334@OP1	SER_5(A)@HG	SER_5(A)@OG	27	2,62	166
	DG_294@OP1	SER_5(A)@HG	SER_5(A)@OG	14	2,67	164
	DT_297@OP2	SER_5(B)@HG	SER_5(B)@OG	81	2,64	166
	DC_335@OP1	TYR_9(A)@HH	TYR_9(A)@OH	12	2,69	161
α_3 -DBH	DC_335@OP2	TYR_9(A)@HH	TYR_9(A)@OH	7	2,73	164
	DT_297@OP1	TYR_9(B)@HH	TYR_9(B)@OH	69	2,72	161
	DT_297@OP2	TYR_9(B)@HH	TYR_9(B)@OH	13	2,74	162
	DA_336@OP2	SER_38(A)@HG	SER_38(A)@OG	17	2,66	164
	DT_298@OP2	SER_38(B)@HG	SER_38(B)@OG	70	2,64	166
	DT_298@OP1	SER_38(B)@HG	SER_38(B)@OG	21	2,68	166
	DG_299@OP1	LYS_41(B)@HZ2	LYS_41(B)@NZ	7	2,81	157
	DG_299@OP1	LYS_41(B)@HZ3	LYS_41(B)@NZ	6	2,80	157
	DG_299@OP1	LYS_41(B)@HZ1	LYS_41(B)@NZ	6	2,81	157
	DT_298@OP1	LYS_41(B)@HZ1	LYS_41(B)@NZ	5	2,80	158
	DC_335@OP1	GLN_44(A)@HE22	GLN_44(A)@NE2	25	2,82	164
	DA_336@OP2	GLN_44(A)@HE21	GLN_44(A)@NE2	10	2,87	164
	DC_335@OP1	LYS_45(A)@HZ1	LYS_45(A)@NZ	11	2,78	158
	DC_335@OP1	LYS_45(A)@HZ3	LYS_45(A)@NZ	11	2,78	157
	DC_335@OP1	LYS_45(A)@HZ2	LYS_45(A)@NZ	10	2,78	157
	DG_299@N7	LYS_45(B)@HZ3	LYS_45(B)@NZ	9	2,89	155
	DG_299@N7	LYS_45(B)@HZ1	LYS_45(B)@NZ	9	2,89	155
	DG_299@N7	LYS_45(B)@HZ2	LYS_45(B)@NZ	8	2,88	155

	DG_301@O6	LYS_48(B)@HZ3	LYS_48(B)@NZ	6	2,84	153
	DG_301@O6	LYS_48(B)@HZ1	LYS_48(B)@NZ	6	2,83	153
	DG_301@O6	LYS_48(B)@HZ2	LYS_48(B)@NZ	6	2,82	152
	SER_49(B)@OG	DC_323@H42	DC_323@N4	6	2,90	162
krilo - β -ploča	DC_323@OP2	TYR_51(B)@HH	TYR_51(B)@OH	51	2,69	162
	DA_284@OP2	TYR_54(A)@HH	TYR_54(A)@OH	15	2,69	163
	DA_284@OP1	TYR_54(A)@HH	TYR_54(A)@OH	13	2,68	166
krilo - zavojnica između β -ploča	DA_284@OP2	ARG_56(A)@HH11	ARG_56(A)@NH1	6	2,82	155
	DT_283@OP2	ARG_56(A)@HH21	ARG_56(A)@NH2	7	2,82	158
	DT_283@OP1	TYR_57(A)@HH	TYR_57(A)@OH	9	2,68	162
α_4 -zavojnica	DC_322@OP2	LYS_66(B)@HZ3	LYS_66(B)@NZ	24	2,81	160
	DC_322@OP2	LYS_66(B)@HZ2	LYS_66(B)@NZ	23	2,80	160
	DC_322@OP2	LYS_66(B)@HZ1	LYS_66(B)@NZ	20	2,80	159
	DC_323@OP1	LYS_66(B)@HZ2	LYS_66(B)@NZ	9	2,81	163
	DC_323@OP1	LYS_66(B)@HZ1	LYS_66(B)@NZ	7	2,82	160
	DC_323@OP1	LYS_66(B)@HZ3	LYS_66(B)@NZ	7	2,82	160
$\alpha_5-\alpha_6$ zavojnica	DC_295@OP1	HIP_104(A)@HE2	HIP_104(A)@NE2	12	2,77	158

Tablica D10. Zastupljenost vodikovih veza (prema kriteriju udaljenosti $< 3.2 \text{ \AA}$) u MD simulaciji ukupnog trajanja od 400 ns apoproteina *HhMntR* i operatorske sekvence *mntA* započetoj od strukture u kojoj su protein i DNA udaljeni 20 \AA . Prikazane su interakcije između proteina i DNA okosnice (plavo), te proteina i DNA nukleobaza (narančasto) sa zastupljenosću $> 5\%$. Lanac proteina naveden je u zagradi pored oznake aminokiseline.

Lokacija aminokiseline u proteinu	Akceptor vodikove veze	Atom vodika u vezi	Donor vodikove veze	Zastupljenost / %	Prosječna udaljenost / \AA	Prosječni kut / °
α_1 -zavojnica	DC_295@OP2	SER_5(B)@HG	SER_5(B)@OG	21	2,69	165
	DC_295@OP2	TYR_9(B)@HH	TYR_9(B)@OH	5	2,72	162
α_3 -DBH	DA_336@OP2	HIE_35(A)@H	HIE_35(A)@N	6	2,88	163
	DA_337@OP2	HIE_35(A)@HE2	HIE_35(A)@NE2	17	2,81	157
	DC_296@OP2	HIP_35(B)@H	HIP_35(B)@N	39	2,83	165
	DC_296@OP1	HIP_35(B)@HD1	HIP_35(B)@ND1	36	2,78	155
	DT_297@OP2	HIP_35(B)@HD1	HIP_35(B)@ND1	12	2,79	160
	DT_297@OP2	SER_37(B)@HG	SER_37(B)@OG	58	2,65	165
	DA_337@OP2	SER_37(A)@HG	SER_37(A)@OG	6	2,67	165
	DC_296@OP2	SER_38(B)@HG	SER_38(B)@OG	68	2,68	164
	DC_296@O5'	SER_38(B)@HG	SER_38(B)@OG	6	2,82	151
	DA_336@OP2	SER_38(A)@HG	SER_38(A)@OG	29	2,64	166
	DA_336@OP1	SER_38(A)@HG	SER_38(A)@OG	6	2,63	167
	DA_337@N7	LYS_41(A)@HZ3	LYS_41(A)@NZ	7	2,89	155
	DA_337@N7	LYS_41(A)@HZ1	LYS_41(A)@NZ	7	2,89	156

	DA_337@N7	LYS_41(A)@HZ2	LYS_41(A)@NZ	6	2,89	156
	DA_326@N7	GLN_44(B)@HE21	GLN_44(B)@NE2	5	2,90	161
	DC_325@OP2	LYS_48(B)@HZ2	LYS_48(B)@NZ	5	2,80	157
	DC_325@OP2	LYS_48(B)@HZ3	LYS_48(B)@NZ	5	2,79	157
krilo - β -ploča	DC_323@OP1	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	8	2,69	164
	DC_323@OP2	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	6	2,76	159
	DC_324@OP2	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	6	2,71	162
	DG_285@OP2	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	8	2,68	164
	DA_284@OP2	TYR_54(B)@HH	TYR_54(B)@OH	6	2,71	163
krilo - zavojnica između β -ploča	DT_321@O2	ARG_56(B)@HH12	ARG_56(B)@NH1	20	2,81	153
	DA_305@OP1	ARG_56(B)@HH12	ARG_56(B)@NH1	9	2,82	157
	DC_322@O2	ARG_56(B)@HH22	ARG_56(B)@NH2	25	2,80	159
	DA_305@OP1	ARG_56(B)@HH22	ARG_56(B)@NH2	10	2,82	158
	DC_339@O2	ARG_56(A)@HE	ARG_56(A)@NE	7	2,84	154
	DA_284@OP2	ARG_56(A)@HH11	ARG_56(A)@NH1	24	2,80	159
	DG_285@O6	ARG_56(A)@HH12	ARG_56(A)@NH1	22	2,83	156
	DG_285@N7	ARG_56(A)@HH12	ARG_56(A)@NH1	9	2,90	154
	DA_284@N7	ARG_56(A)@HH12	ARG_56(A)@NH1	9	2,89	151
	DC_339@N3	ARG_56(A)@HH11	ARG_56(A)@NH2	6	2,89	151
	DG_285@O6	ARG_56(A)@HH22	ARG_56(A)@NH2	25	2,81	157
	DG_285@N7	ARG_56(A)@HH23	ARG_56(A)@NH3	14	2,89	156
	TYR_57(A)@OH	DC_339@H41	DC_339@N4	8	2,89	159
	DC_322@OP1	TYR_57(B)@HH	TYR_57(B)@OH	9	2,71	165
	DC_339@O3'	TYR_57(A)@HH	TYR_57(A)@OH	19	2,79	159
	DA_305@OP1	ARG_58(B)@HH12	ARG_58(B)@NH1	6	2,77	156
	DT_283@OP2	ARG_58(A)@HH12	ARG_58(A)@NH1	10	2,81	156
	DG_282@OP2	ARG_58(A)@HH13	ARG_58(A)@NH2	9	2,81	156
	DG_282@OP2	ARG_58(A)@HH22	ARG_58(A)@NH2	10	2,80	155
	DT_283@OP2	ARG_58(A)@HH23	ARG_58(A)@NH2	7	2,81	153
	DT_281@OP1	ARG_58(A)@HH21	ARG_58(A)@NH2	6	2,79	154

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Martina Manenica

Datum rođenja: 02. kolovoza 1996.

Mjesto rođenja: Metković, Hrvatska

Radno iskustvo

- 2020.- Istraživač-znanstvenik II u istraživanju i razvoju farmaceutskih proizvoda – Razvoj formulacija Hikma d.o.o. (ranije Xellia d.o.o.)
- 2019.-2023. Voditeljica i autorica znanstvene emisije *Treći element* na trećem programu HRT-a

Obrazovanje

- 2021.- Doktorski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, smjer: Fizikalna kemija
- 2018.-2020. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, smjer: Biokemija i fizikalna kemija, diplomski rad: *Biofizička svojstva proteina regulatora citokineze 1, PRC1, u fazama mitoze ljudskih stanica*
- 2015.–2018. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2011.–2015. Gimnazija Metković, Metković

Nagrade i priznanja

2020. Medalja Kemijskog odsjeka za izvrstan uspjeh na studiju
2019. Rektorova nagrada za individualni znanstveni rad pod naslovom *Nukleacija novih svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu putem proteinskog kompleksa augmina*

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- 2017.-2019. Voditeljica studentskog volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*
- 2017.-2019. Supervizorica studentskog volonterskog projekta *BASF Kids' Lab-Malci genijalci*
- 2016.-2019. Otvoreni dan kemije (Dan i noć na PMF-u)

Članci u časopisu

1. **M. Manenica**, B. Bertoša, Molecular basis of protein-DNA interactions between *Halalkalibacterium halodurans* MntR and its DNA operator sequence, *International Journal of Biological Macromolecules* (2025), rad prihvaćen za publikaciju
2. A. M. Knez, **M. Manenica**, Z. Jelić Matošević, B. Bertoša, Allosteric mechanism of MntR transcription factor from alkalophilic bacterium *Halalkalibacterium halodurans*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-12 (2024) DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2024.2314265>
3. V. Štimac, I. Koprivec, **M. Manenica**, J. Simunić, I. M. Tolić, Augmin prevents merotelic attachments by promoting proper arrangement of bridging and kinetochore fibers. *eLife*, 11:e83287 (2022) DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.83287>

Patenti i patentne prijave

1. **M. Manenica**, E. Kovačević, E. Meštrović, Liquid dalbavancin compositions, US12070485B2, patent odobren 27.04.2024.
2. **M. Manenica**, E. Kovačević, E. Meštrović, Liquid dalbavancin compositions, WO2024079224A1, patentna prijava 11.10.2023.
3. **M. Manenica**, I. Berišić, A. Bevetek Moćnik, S. Grubešić, Ready-to-administer product comprising a norepinephrine formulation, WO2024022966A1, patentna prijava 25.07.2022.

Posterska i usmena priopćenja

1. **M. Manenica**, How to see molecules and their interactions? - Synergy between lab experiments and supercomputers, Summer School of Science Zagreb, Hrvatska, 28.07.2024-08.08.2024. (usmeno priopćenje)
2. **M. Manenica**, A. M. Knez, Z. Jelić Matošević, B. Bertoša, Allosteric Mechanism of MntR Transcription Factor from Bacterium *Halalkalibacterium halodurans* and Its

Interaction with DNA, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska, 26.-27.04.2024. (usmeno priopćenje)

3. **M. Manenica**, A. M. Knez, Z. Jelić Matošević, B. Bertoša, Computational study of DNA binding affinity of MntR from alkalophilic bacterium *Halalkalibacterium halodurans*, BioExcel Summer School on Biomolecular Simulations, BioExcel, Pula, Italija, 10.-15.09.2023. (postersko priopćenje)
4. **M. Manenica**, A. M. Knez, Z. Jelić Matošević, B. Bertoša, Conformational Dynamics of *H. halodurans* MntR Transcription Factor - Significance of Hydrogen Bond Network, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska, 21.-22.04.2023. (postersko priopćenje)