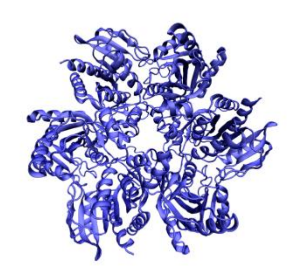
MD – PNP

PRIMJER POTVRDE REZULTATA MD SIMULACIJA EKSPERIMENTIMA

Heksamer *vs.* dimer - purinska nukleozidna fosforilaza (PNP) iz bakterije *E. coli*

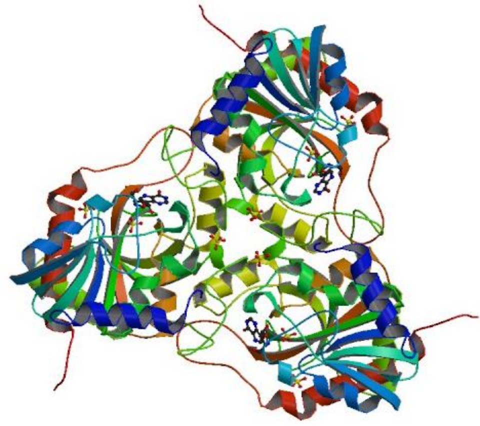
- sudjeluje u pomoćnom metaboličkom putu purina:

purin nukleozid + P_i $\rightleftharpoons$ purinska baza + pentoza-1-fosfat



purinska nukleozidna fosforilaza ~ PNP

- humani PNP je trimer:



Zašto heksamer, a ne dimer?

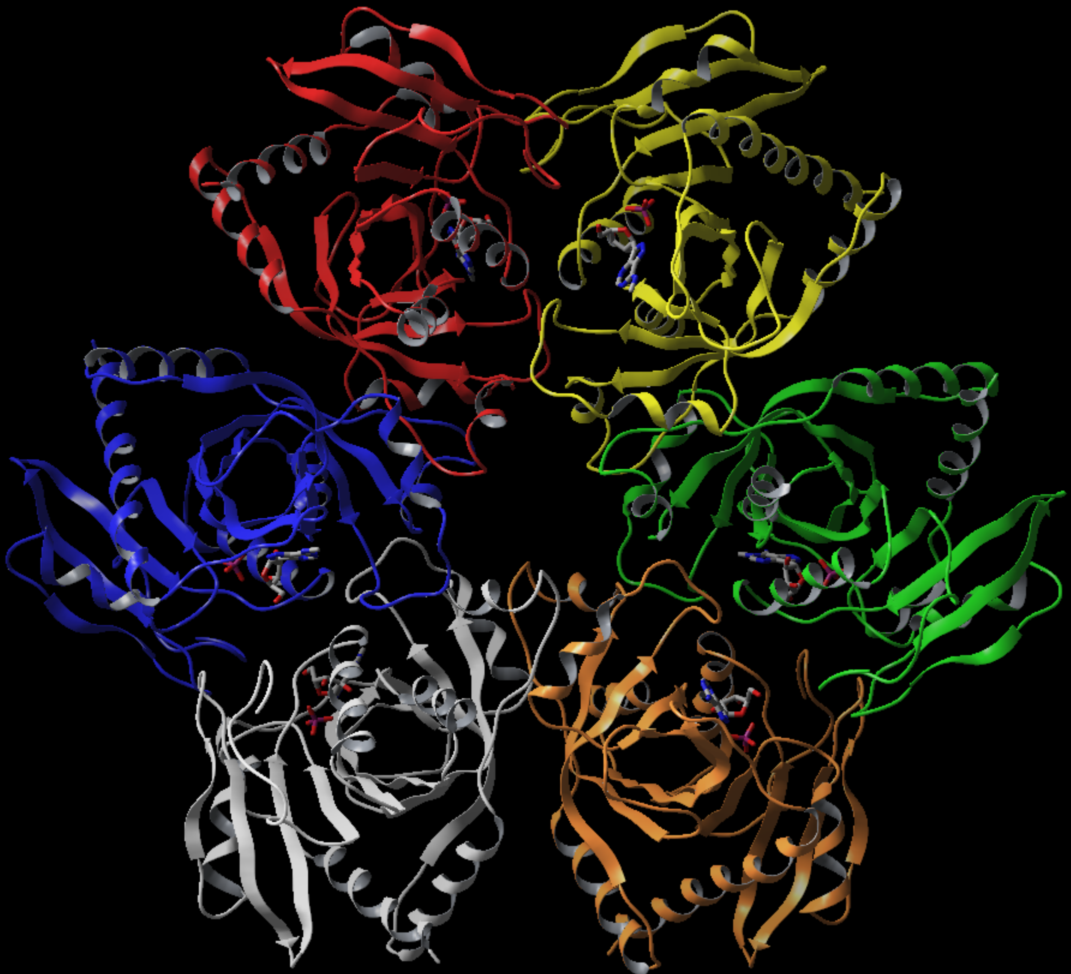
(ili kako razbiti heksamer u tri dimera)

- nema kooperativnosti, evolucijski je preferiran trimerni oblik, …

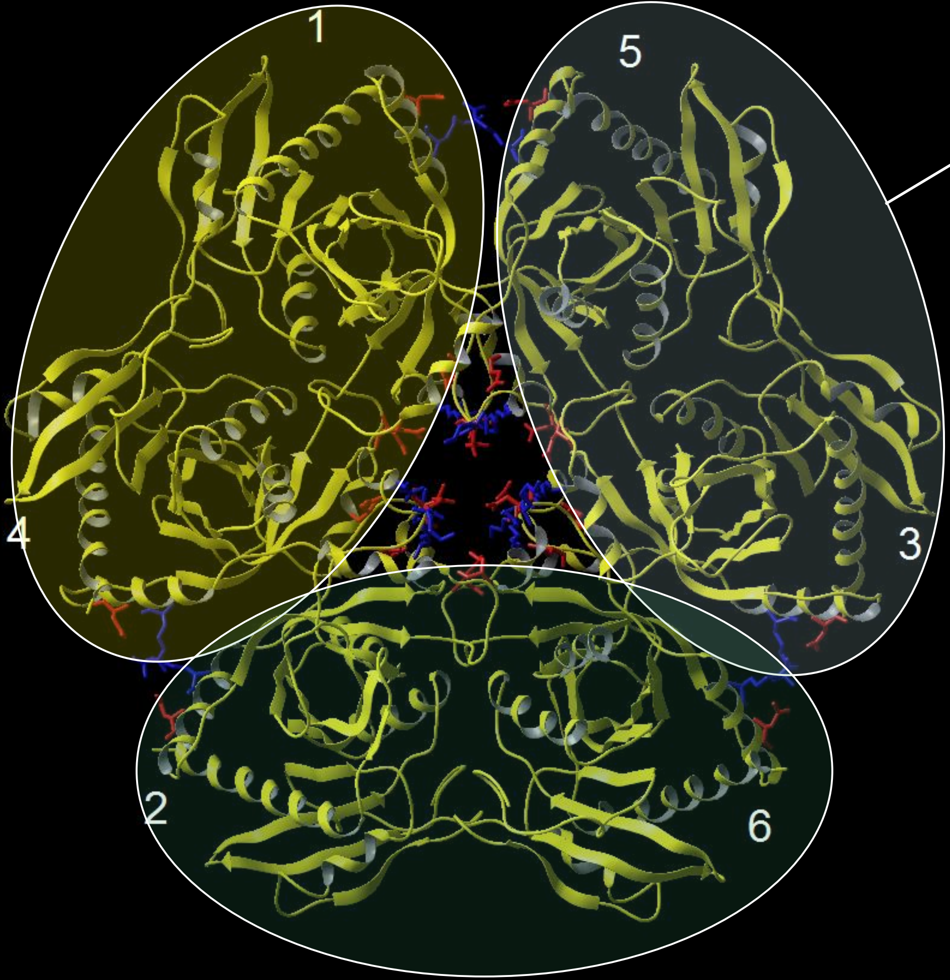
APO-PNP: 1ECP

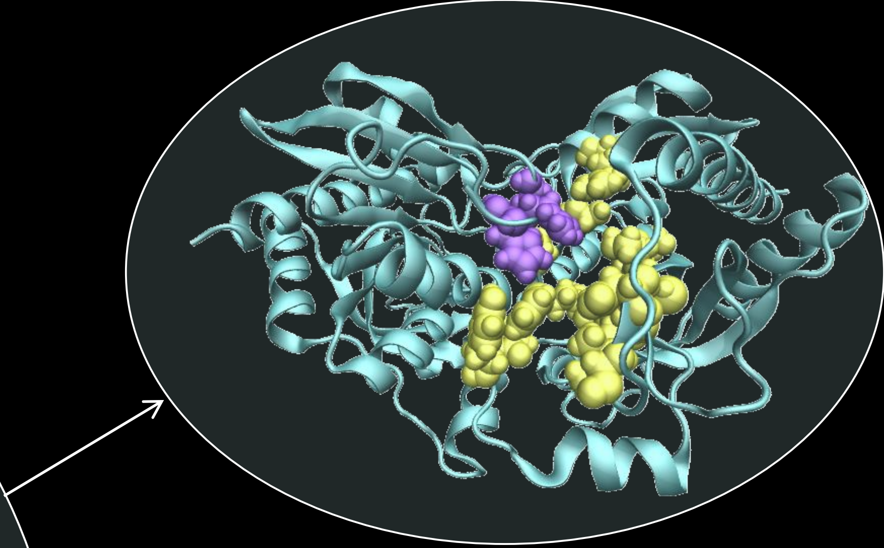
(C.MAO,W.J.COOK,M.ZHOU,G.W.KOSZALKA,T.A.KRENITSKY, S.E.EALICK.
STRUCTURE **5** 1373 1997; RESOLUTION: 2.00 Å)

AMM-PNP: 1K9S
(G.KOELLNER,A.BZOWSKA,B.WIELGUS-KUTROWSKA,M.LUIC,
T.STEINER,W.SAENGER,J.STEPINSKI *J.MOL.BIOL.* **315**, 351. 2002;
RESOLUTION: 2.00 Å)



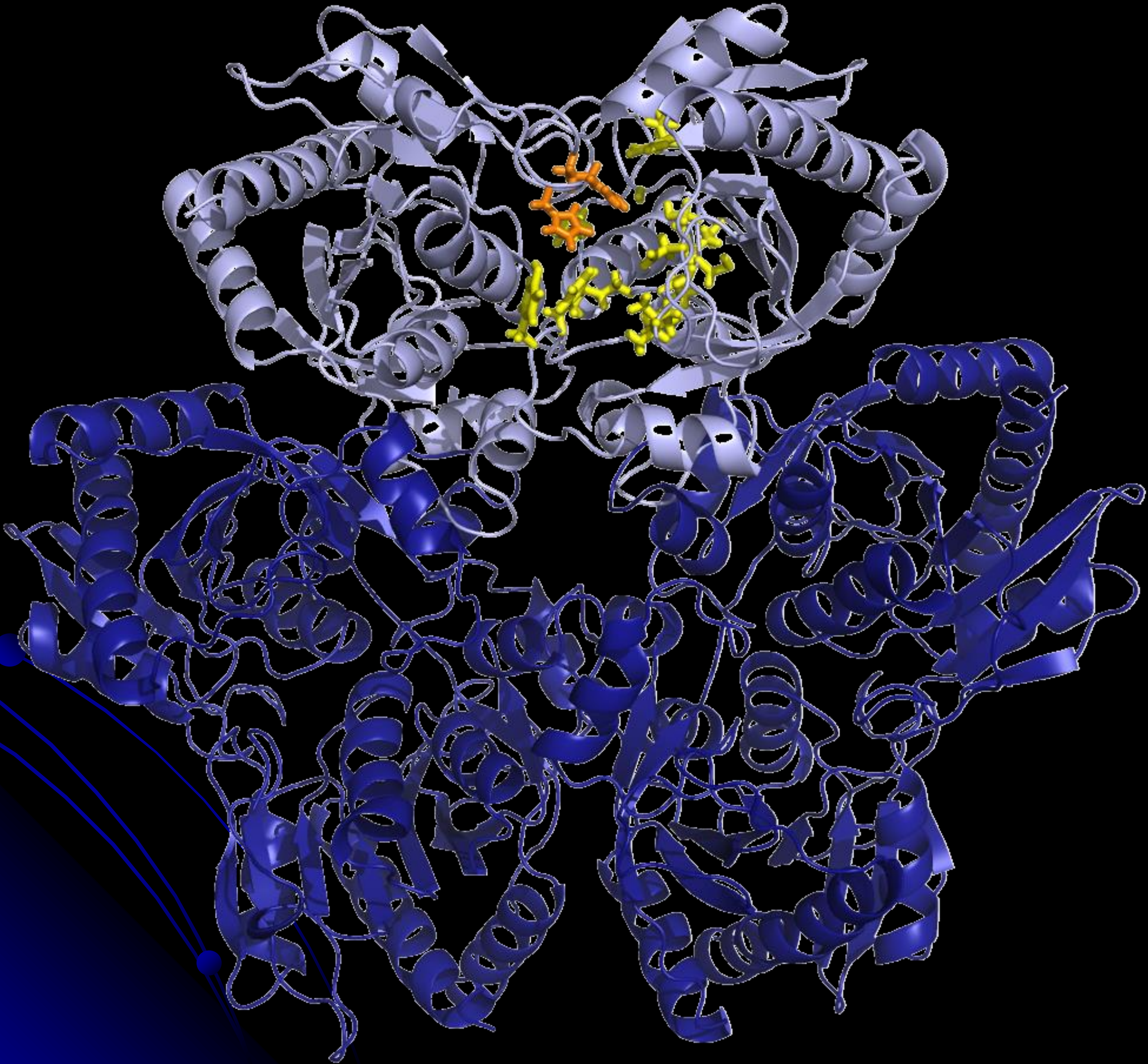
PNP protein





- nema kooperativnosti između podjedinica u heksameru, evolucijski je preferiran trimerni oblik, …

PNP protein

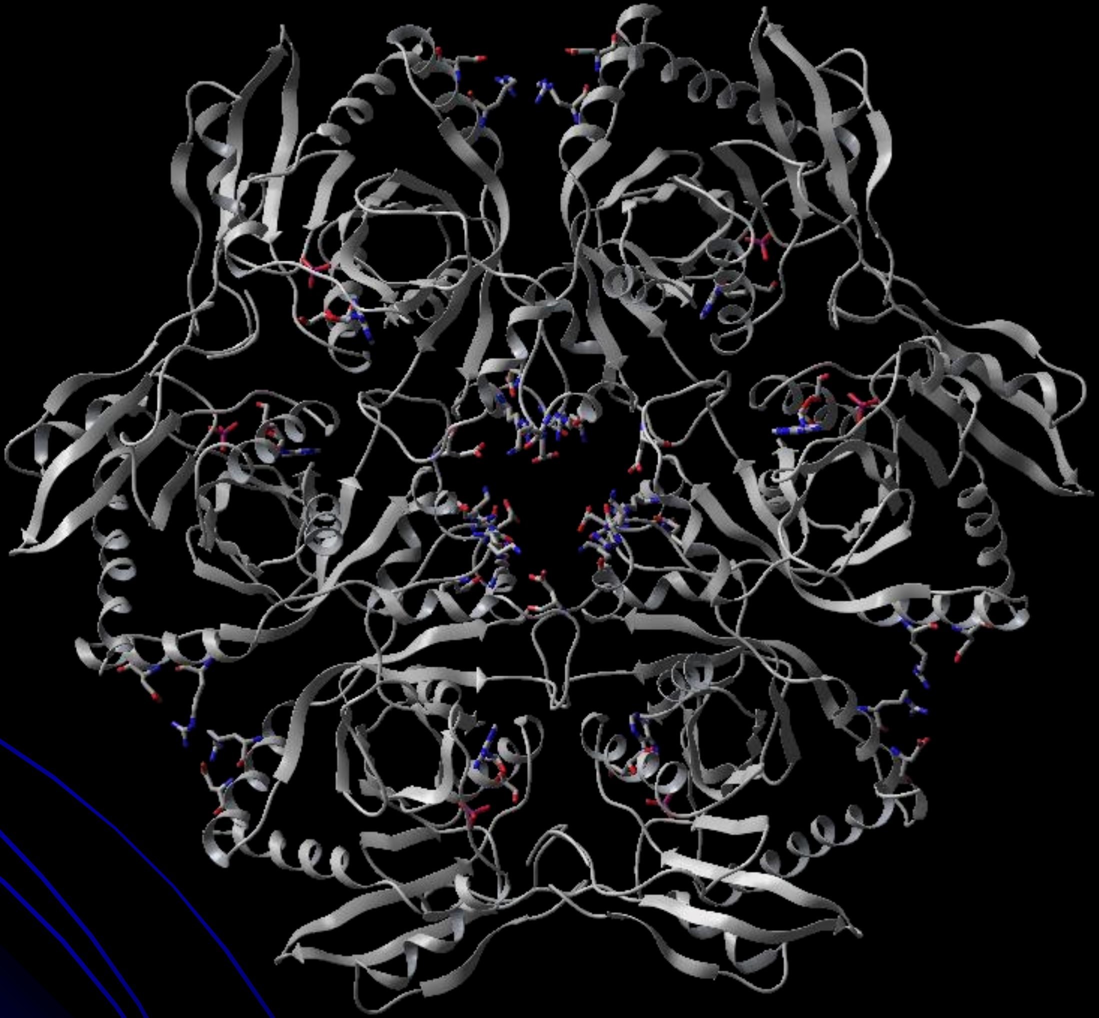


Zašto heksamer, a ne dimer?

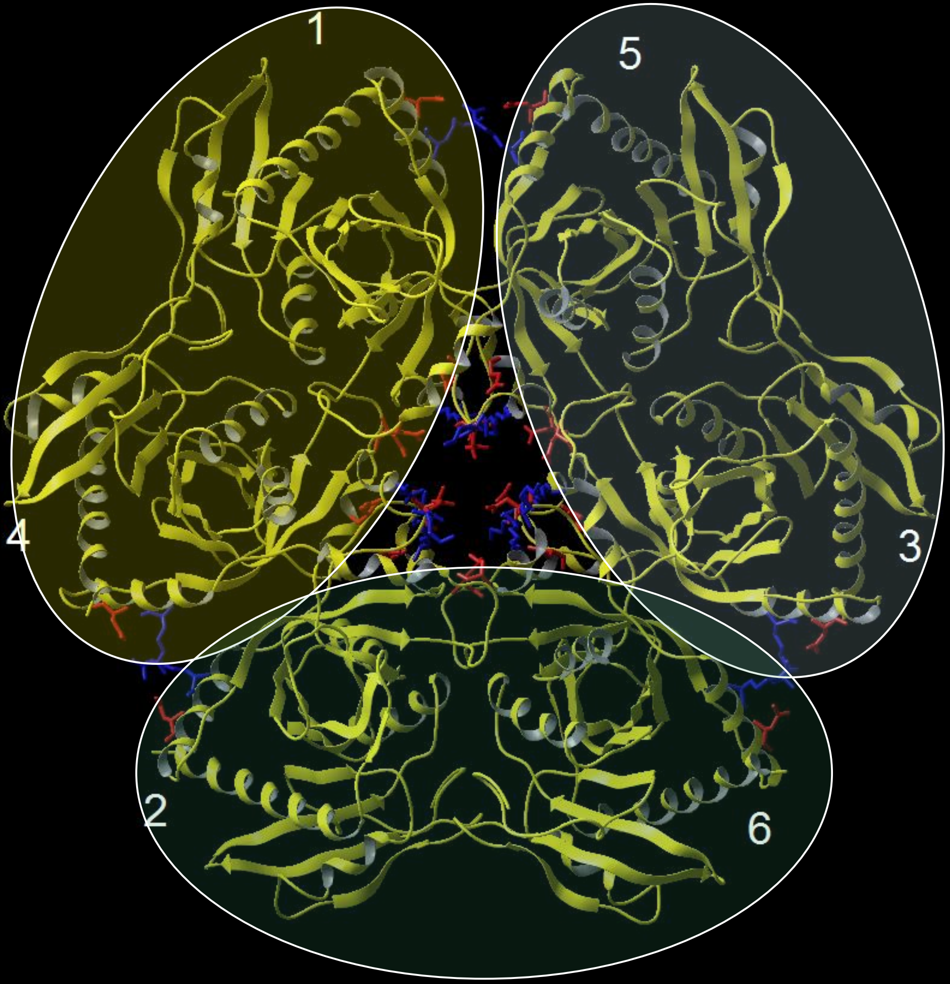
(ili kako razbiti heksamer u tri dimera)

CILJ: **POKUŠATI PRONAĆI MUTACIJE KOJE BI HEKSAMER RAZBILE NA TRI DIMERA (PO MOGUĆNOSTI NA DIMERE KOJI SU KATALITIČKI AKTIVNI).**

PNP protein



PNP protein



METODE:

računalne metode temeljenje na polju sila:

-molekularna mehanika – *anal* modul Amber 8 paketa, serveri (PISA, PPI, …)

- molekularna dinamika

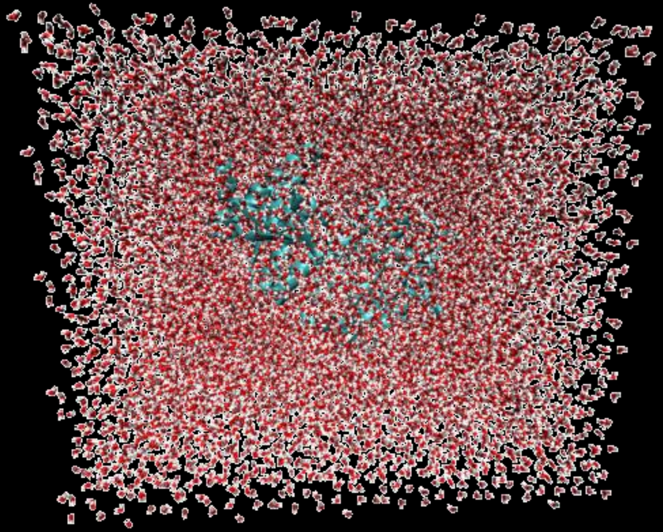
- kristalne strukture – PDB kodovi: 1ECP, 1K9S

- polarni vodici dodani programom WHATIF

- amber ff03 polje sila, parametrizacija supstrata

- periodični uvjeti, eksplicitno prisutno otapalo

- oko 185 000 atoma

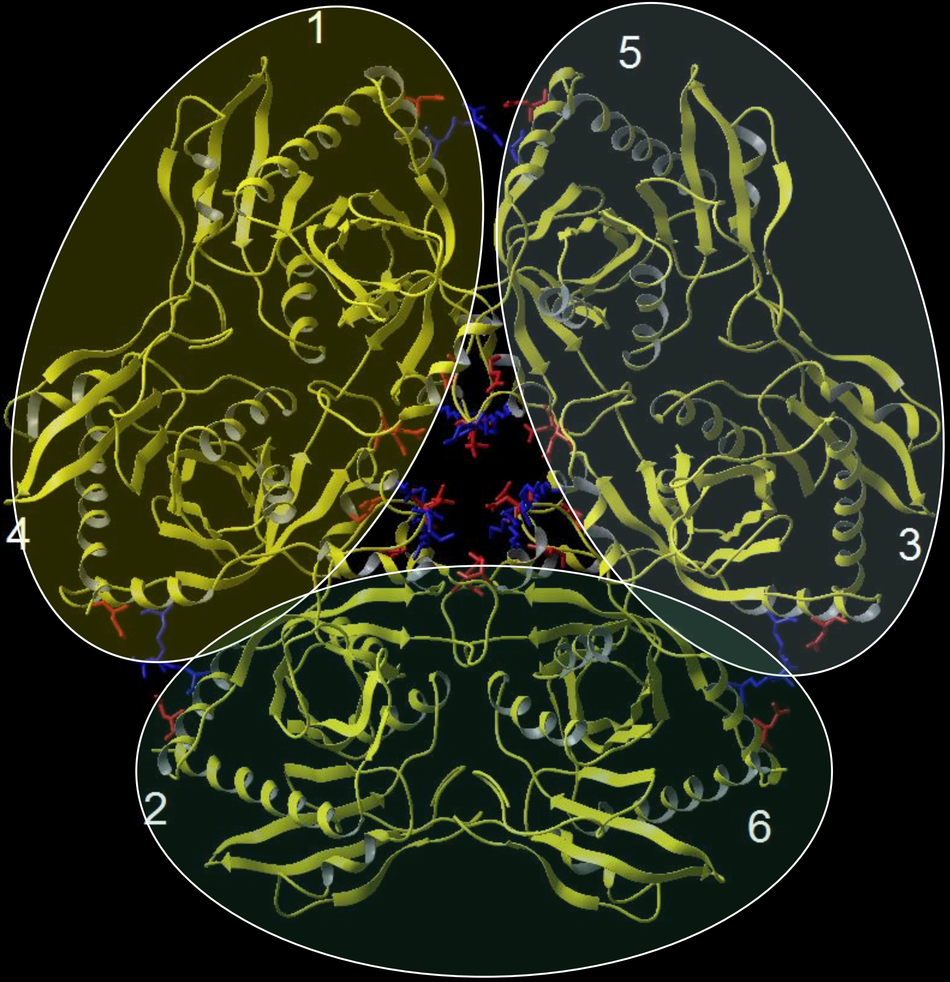


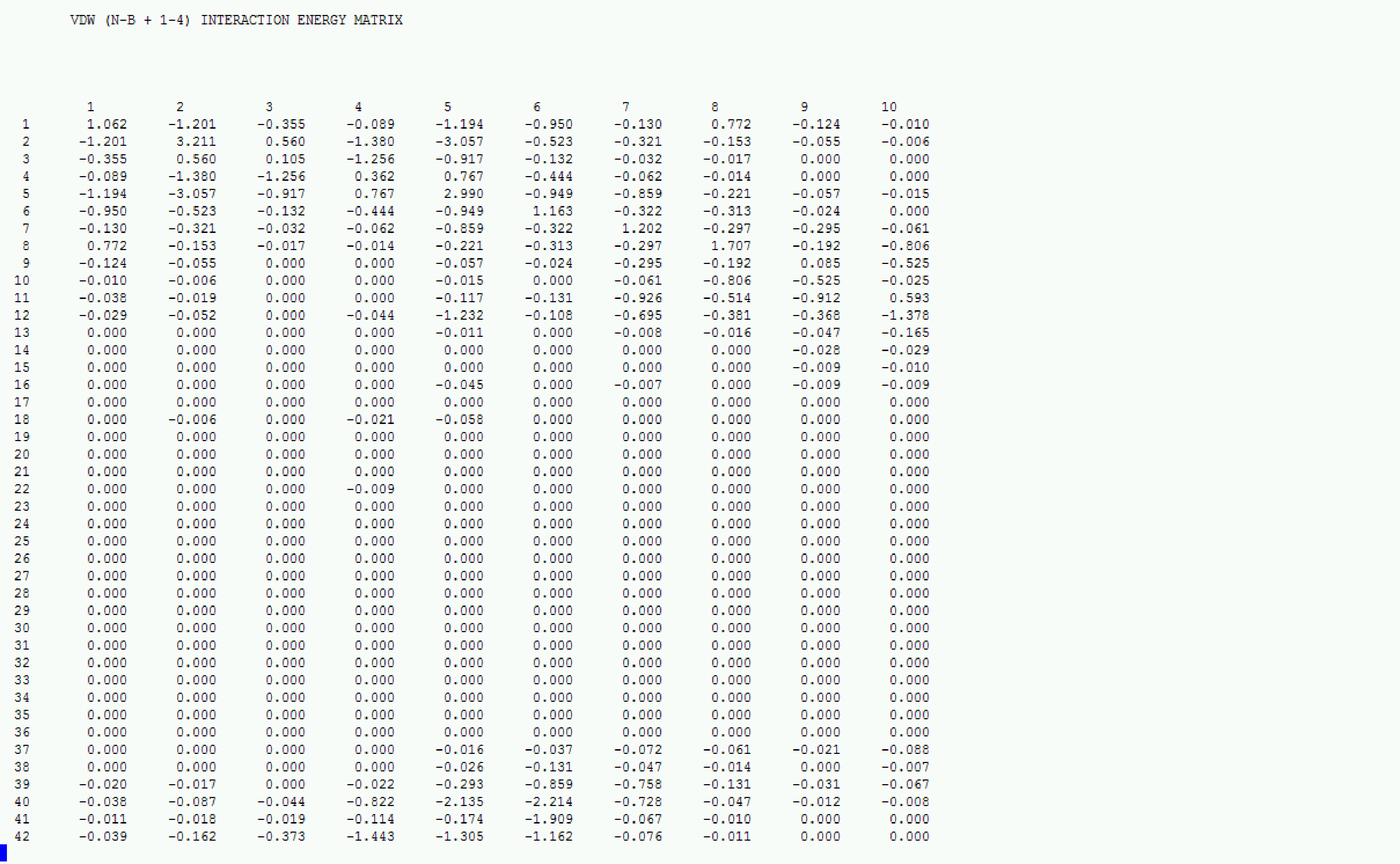
Pripremili i pokrenuli MD simulacije:

1. WT – APO **HEKSAMER** I **DIMER**
2. WT – **HEKSAMER** I **DIMER** SA “SUPSTRATIMA” (NUKLEOZID I FOSFAT)

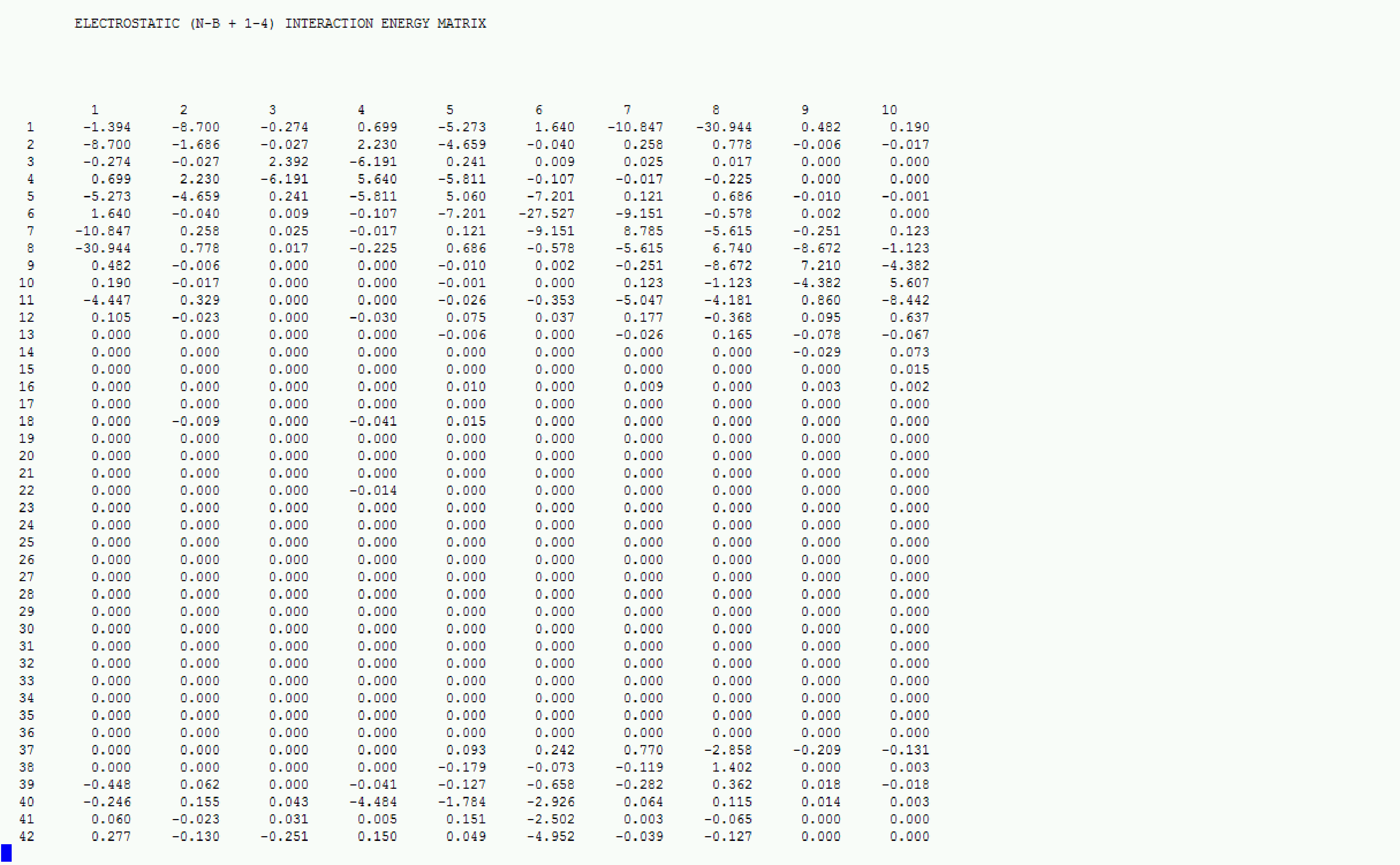
- u međuvremenu, molekularnom mehanikom istraživali interakcije između dimera u heksameru

PNP protein

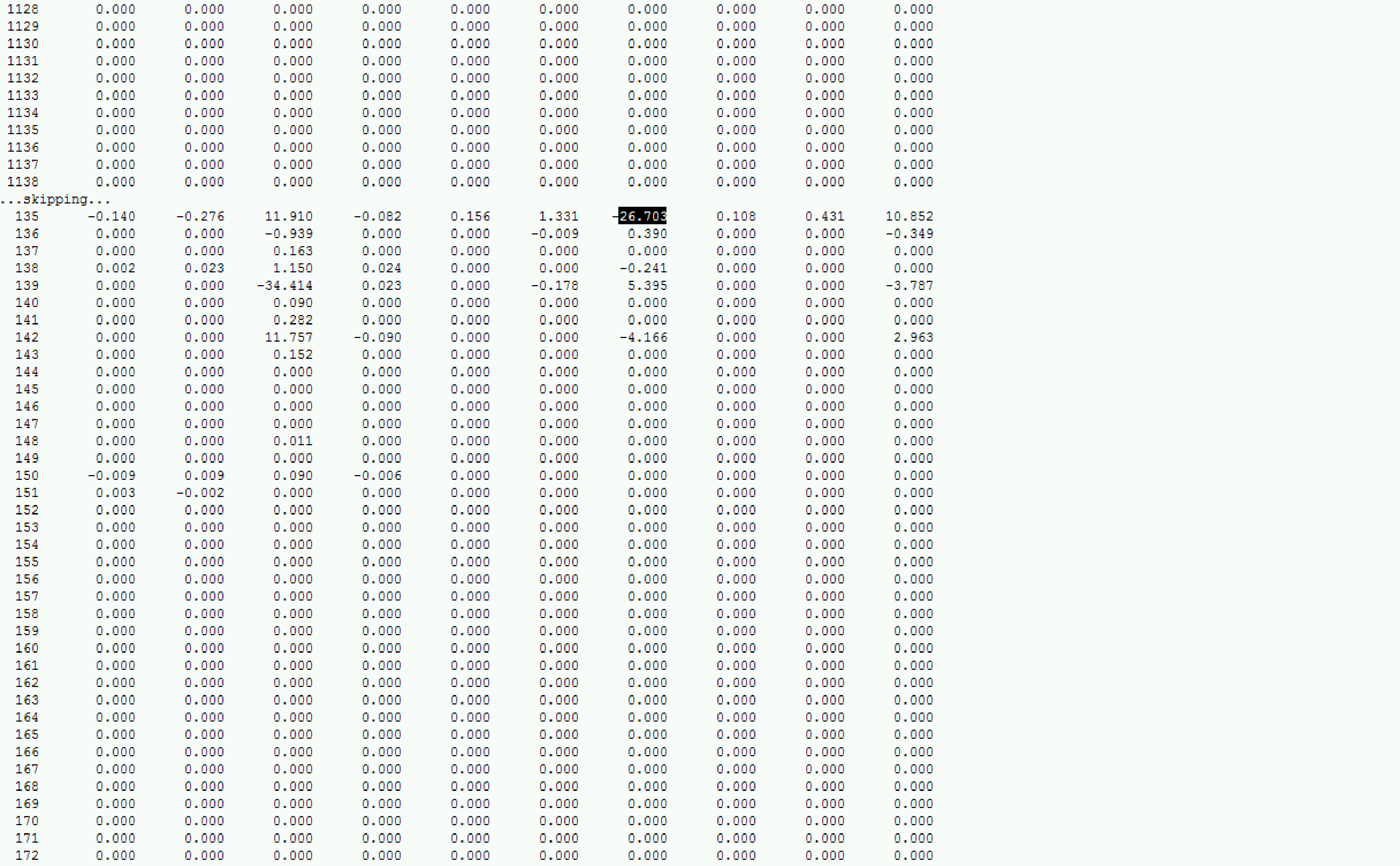




```
       VDW (N-B + 1-4) INTERACTION ENERGY MATRIX



          1         2         3         4         5         6         7         8         9        10
  1     1.062    -1.201    -0.355    -0.089    -1.194    -0.950    -0.130     0.772    -0.124    -0.010
  2    -1.201     3.211     0.560    -1.380    -3.057    -0.523    -0.321    -0.153    -0.055    -0.006
  3    -0.355     0.560     0.105    -1.256    -0.917    -0.132    -0.032    -0.017     0.000     0.000
  4    -0.089    -1.380    -1.256     0.362     0.767    -0.444    -0.062    -0.014     0.000     0.000
  5    -1.194    -3.057    -0.917     0.767     2.990    -0.949    -0.859    -0.221    -0.057    -0.015
  6    -0.950    -0.523    -0.132    -0.444    -0.949     1.163    -0.322    -0.313    -0.024     0.000
  7    -0.130    -0.321    -0.032    -0.062    -0.859    -0.322     1.202    -0.297    -0.295    -0.061
  8     0.772    -0.153    -0.017    -0.014    -0.221    -0.313    -0.297     1.707    -0.192    -0.806
  9    -0.124    -0.055     0.000     0.000    -0.057    -0.024    -0.295    -0.192     0.085    -0.525
 10    -0.010    -0.006     0.000     0.000    -0.015     0.000    -0.061    -0.806    -0.525    -0.025
 11    -0.038    -0.019     0.000     0.000    -0.117    -0.131    -0.926    -0.514    -0.912     0.593
 12    -0.029    -0.052     0.000    -0.044    -1.232    -0.108    -0.695    -0.381    -0.368    -1.378
 13     0.000     0.000     0.000     0.000    -0.011     0.000    -0.008    -0.016    -0.047    -0.165
 14     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000    -0.028    -0.029
 15     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000    -0.009    -0.010
 16     0.000     0.000     0.000     0.000    -0.045     0.000    -0.007     0.000    -0.009    -0.009
 17     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 18     0.000    -0.006     0.000    -0.021    -0.058     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 19     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 20     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 21     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 22     0.000     0.000     0.000    -0.009     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 23     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 24     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 25     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 26     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 27     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 28     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 29     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 30     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 31     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 32     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 33     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 34     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 35     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 36     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000     0.000
 37     0.000     0.000     0.000     0.000    -0.016    -0.037    -0.072    -0.061    -0.021    -0.088
 38     0.000     0.000     0.000     0.000    -0.026    -0.131    -0.047    -0.014     0.000    -0.007
 39    -0.020    -0.017     0.000    -0.022    -0.293    -0.859    -0.758    -0.131    -0.031    -0.067
 40    -0.038    -0.087    -0.044    -0.822    -2.135    -2.214    -0.728    -0.047    -0.012    -0.008
 41    -0.011    -0.018    -0.019    -0.114    -0.174    -1.909    -0.067    -0.010     0.000     0.000
 42    -0.039    -0.162    -0.373    -1.443    -1.305    -1.162    -0.076    -0.011     0.000     0.000
```



```
      ELECTROSTATIC (N-B + 1-4) INTERACTION ENERGY MATRIX



               1          2          3          4          5          6          7          8          9         10
  1       -1.394     -8.700     -0.274      0.699     -5.273      1.640    -10.847    -30.944      0.482      0.190
  2       -8.700     -1.686     -0.027      2.230     -4.659     -0.040      0.258      0.778     -0.006     -0.017
  3       -0.274     -0.027      2.392     -6.191      0.241      0.009      0.025      0.017      0.000      0.000
  4        0.699      2.230     -6.191      5.640     -5.811     -0.107     -0.017     -0.225      0.000      0.000
  5       -5.273     -4.659      0.241     -5.811      5.060     -7.201      0.121      0.686     -0.010     -0.001
  6        1.640     -0.040      0.009     -0.107     -7.201    -27.527     -9.151     -0.578      0.002      0.000
  7      -10.847      0.258      0.025     -0.017      0.121     -9.151      8.785     -5.615     -0.251      0.123
  8      -30.944      0.778      0.017     -0.225      0.686     -0.578     -5.615      6.740     -8.672     -1.123
  9        0.482     -0.006      0.000      0.000     -0.010      0.002     -0.251     -8.672      7.210     -4.382
 10        0.190     -0.017      0.000      0.000     -0.001      0.000      0.123     -1.123     -4.382      5.607
 11       -4.447      0.329      0.000      0.000     -0.026     -0.353     -5.047     -4.181      0.860     -8.442
 12        0.105     -0.023      0.000     -0.030      0.075      0.037      0.177     -0.368      0.095      0.637
 13        0.000      0.000      0.000      0.000     -0.006      0.000     -0.026      0.165     -0.078     -0.067
 14        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000     -0.029      0.073
 15        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.015
 16        0.000      0.000      0.000      0.000      0.010      0.000      0.009      0.000      0.003      0.002
 17        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 18        0.000     -0.009      0.000     -0.041      0.015      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 19        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 20        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 21        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 22        0.000      0.000      0.000     -0.014      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 23        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 24        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 25        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 26        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 27        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 28        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 29        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 30        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 31        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 32        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 33        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 34        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 35        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 36        0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 37        0.000      0.000      0.000      0.000      0.093      0.242      0.770     -2.858     -0.209     -0.131
 38        0.000      0.000      0.000      0.000     -0.179     -0.073     -0.119      1.402      0.000      0.003
 39       -0.448      0.062      0.000     -0.041     -0.127     -0.658     -0.282      0.362      0.018     -0.018
 40       -0.246      0.155      0.043     -4.484     -1.784     -2.926      0.064      0.115      0.014      0.003
 41        0.060     -0.023      0.031      0.005      0.151     -2.502      0.003     -0.065      0.000      0.000
 42        0.277     -0.130     -0.251      0.150      0.049     -4.952     -0.039     -0.127      0.000      0.000
```



```
 1128       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1129       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1130       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1131       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1132       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1133       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1134       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1135       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1136       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1137       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
 1138       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
...skipping...
  135      -0.140     -0.276     11.910     -0.082      0.156      1.331    -26.703      0.108      0.431     10.852
  136       0.000      0.000     -0.939      0.000      0.000     -0.009      0.390      0.000      0.000     -0.349
  137       0.000      0.000      0.163      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  138       0.002      0.023      1.150      0.024      0.000      0.000     -0.241      0.000      0.000      0.000
  139       0.000      0.000    -34.414      0.023      0.000     -0.178      5.395      0.000      0.000     -3.787
  140       0.000      0.000      0.090      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  141       0.000      0.000      0.282      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  142       0.000      0.000     11.757     -0.090      0.000      0.000     -4.166      0.000      0.000      2.963
  143       0.000      0.000      0.152      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  144       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  145       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  146       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  147       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  148       0.000      0.000      0.011      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  149       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  150      -0.009      0.009      0.090     -0.006      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  151       0.003     -0.002      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  152       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  153       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  154       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  155       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  156       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  157       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  158       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  159       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  160       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  161       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  162       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  163       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  164       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  165       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  166       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  167       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  168       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  169       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  170       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  171       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
  172       0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000      0.000
```

INTERAKCIJE

1. **ARG 135 – ASP 139**

2. **ARG 117 – ASP 122**

   ARG 117 – ASP 124

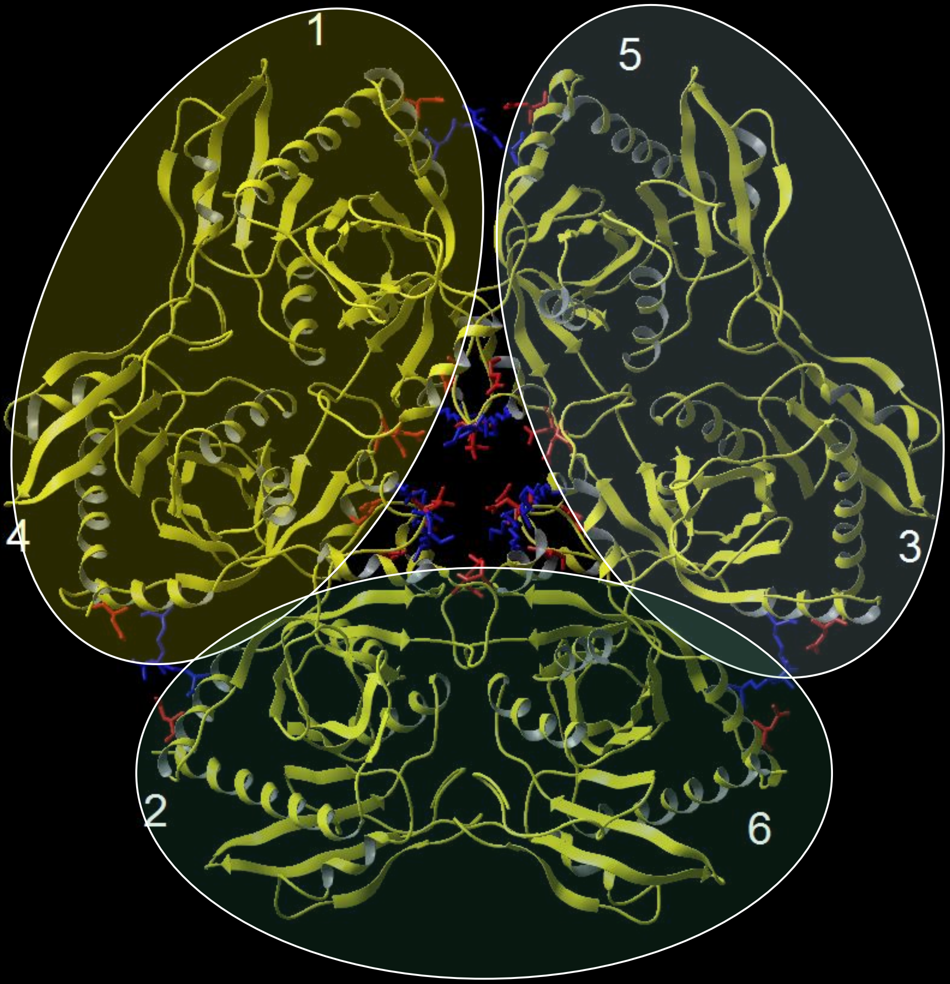
3. **ASP 163 – LYS 121**

NAJJAČE INTERAKCIJE :

1. ARG 135 – ASP 139

1	**5**	135	139	-26.703
1	**5**	139	135	-34.414
2	**4**	135	139	-34.096
2	**4**	139	135	-31.687
3	**6**	135	139	-48.946
3	**6**	139	135	-47.393

PNP protein



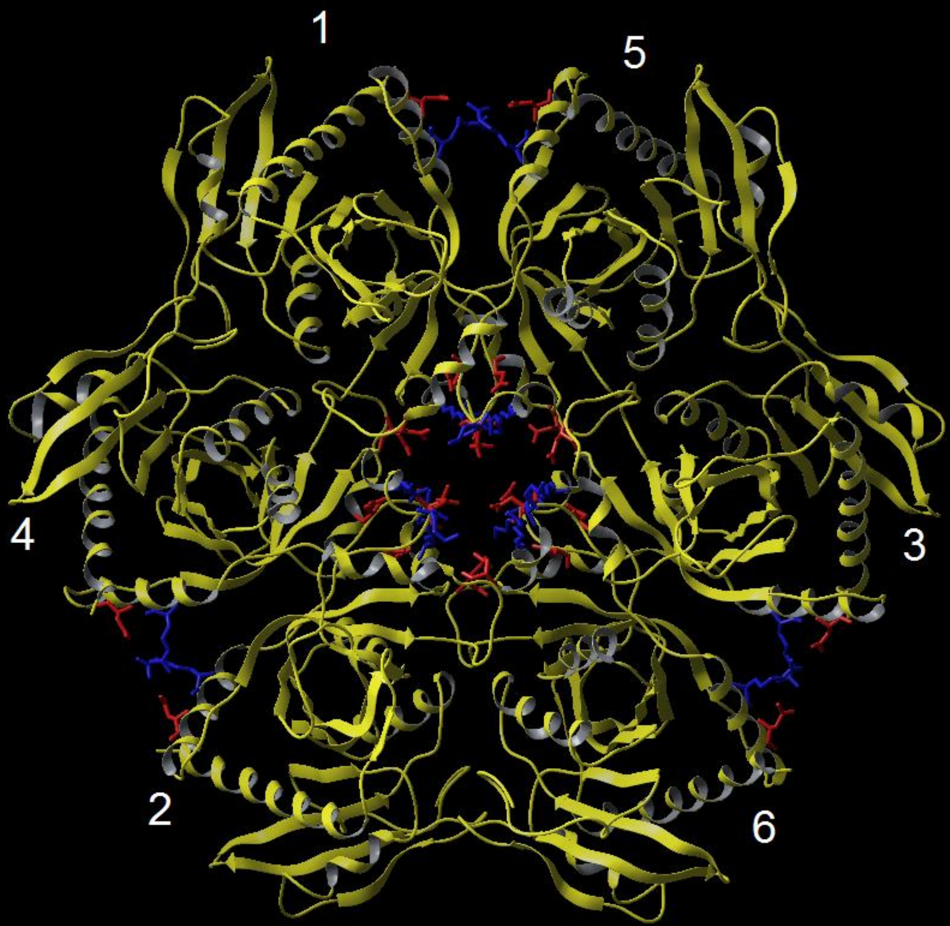
2. ARG 117 – ASP 122
i
ARG 117 – ASP 124

1	5	117	122	-40.982
1	5	117	124	-40.610
2	4	117	122	-42.464
2	4	117	124	-32.309
3	6	117	122	-19.656
3	6	117	124	-41.324

3. ASP 163 - LYS 121

1	5	163	121	-41.492
1	5	165	121	-34.095
2	4	163	121	-36.140
2	4	165	121	-37.605
3	6	163	121	-42.927
3	6	165	121	-11.323

PNP protein



INTERAKCIJE

1. **ARG 135– ASP 139**
2. **ARG 117 – ASP 122 te ARG 117 – ASP 124**
3. **ASP 163 – LYS 121**

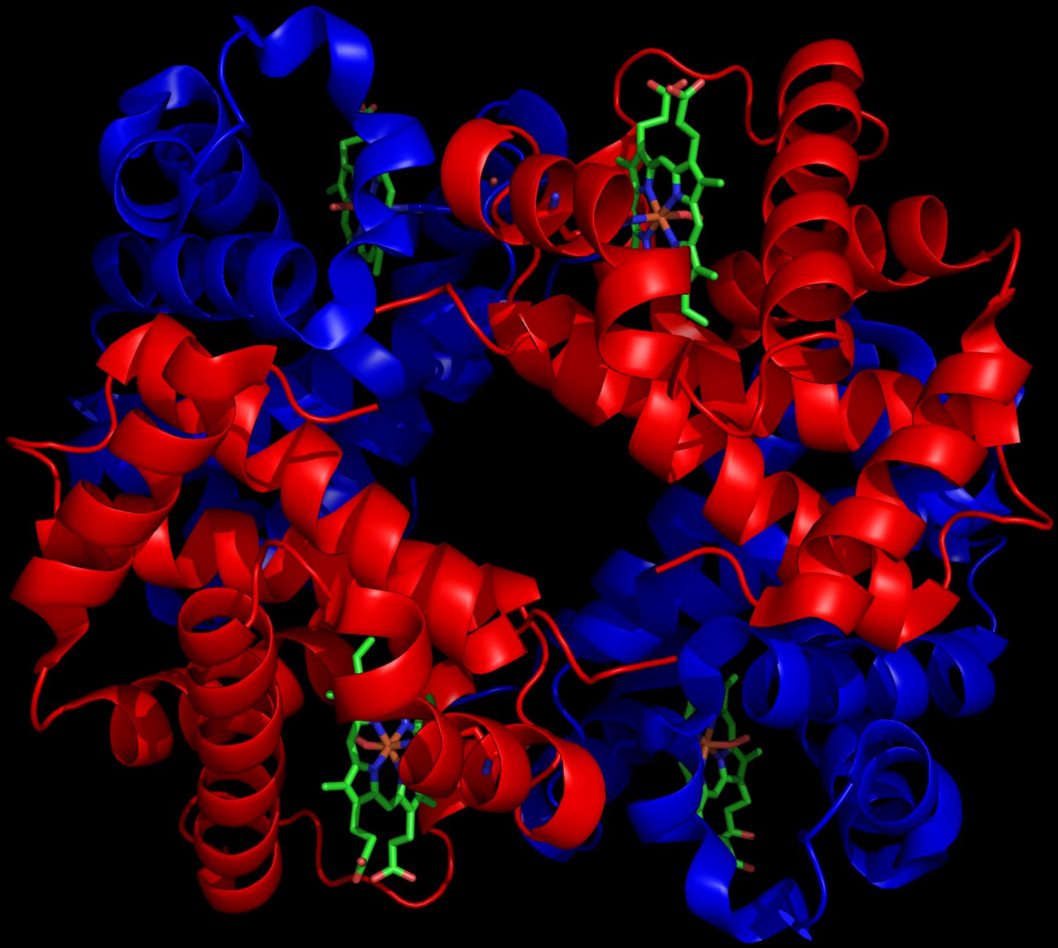
MUTACIJE u ALA:

1. ASP 139

2. ARG 117

3. LYS 121

kvaterna struktura



- **HEMOGLOBIN** – školski primjer globularne kvaterne strukture

- **nekovalentna asocijacija više polipedinih lanaca u multimerni kompleks**
- više podjedinica (ako su identične - homomultimeri, ako ne - heteromultimeri)
- broj, simetrija i odnos podjedinica definira kvaternu strukturu
- često postoji **kooperativnost** između podjedinica
- broj podjedinica je višekratnik od **2** ili **3**

<u>određivanje kvaterne strukture:</u>

broj podjedinica – elektroforeza i kemijske metode

aranžman podjedinica – kristalografija, elektronska mikroskopija, …

- glavni doprinos povezivanju podjedinica u kvaterne strukture daje **hidrofobni efekt – komplementarne površine (izvrstan “sterički fit”)** na dodiru podjedinica među kojima se stvara mnoštvo **van der Waalsovih** interakcija između **hidrofobnih** amino kiselina

INTERAKCIJE

1. **ARG 135– ASP 139**
2. **ARG 117 – ASP 122 te ARG 117 – ASP 124**
3. **ASP 163 – LYS 121**

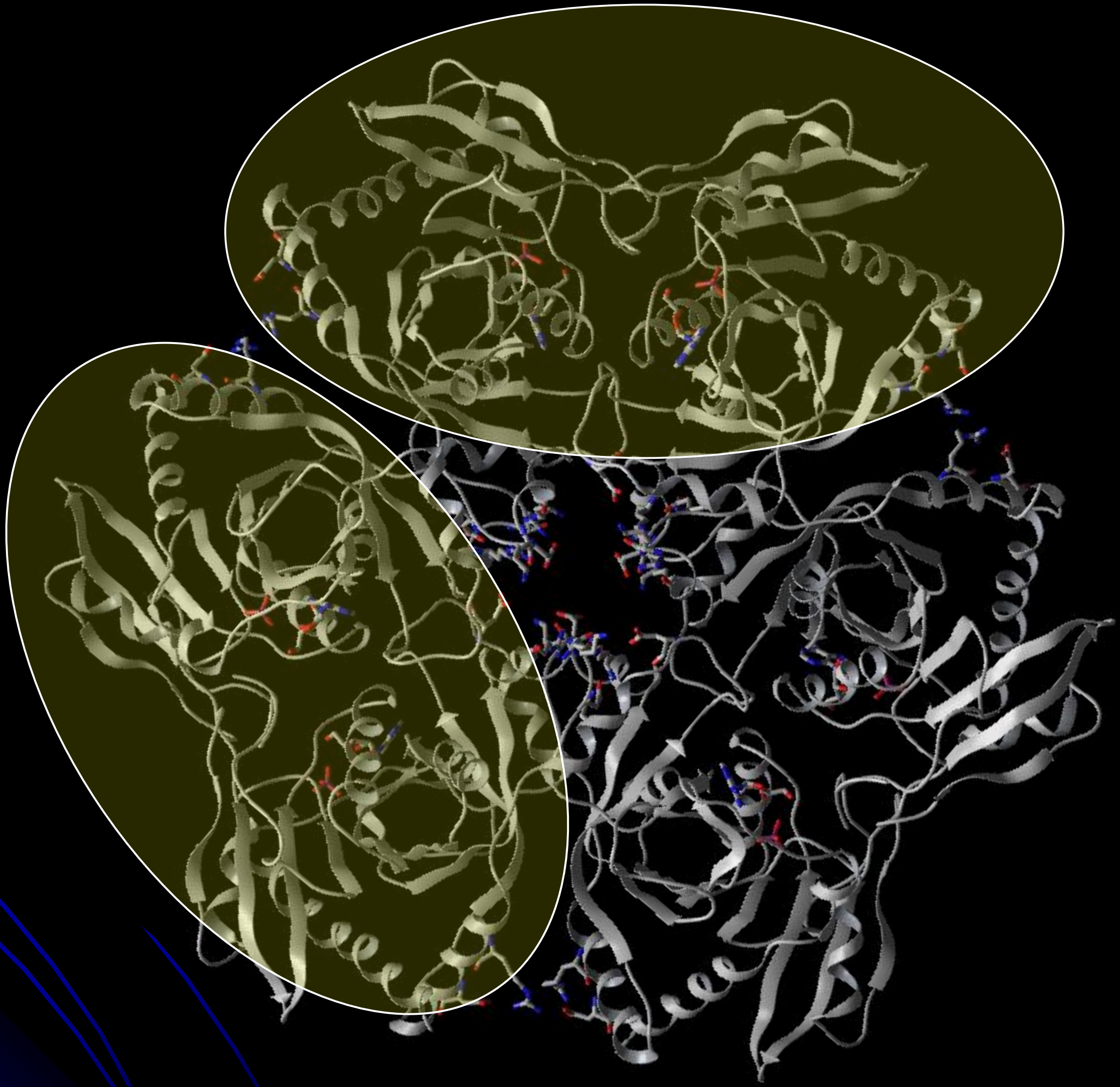
~~[illegible]ACIJE [illegible]ALA:~~

~~1. A[illegible]9~~

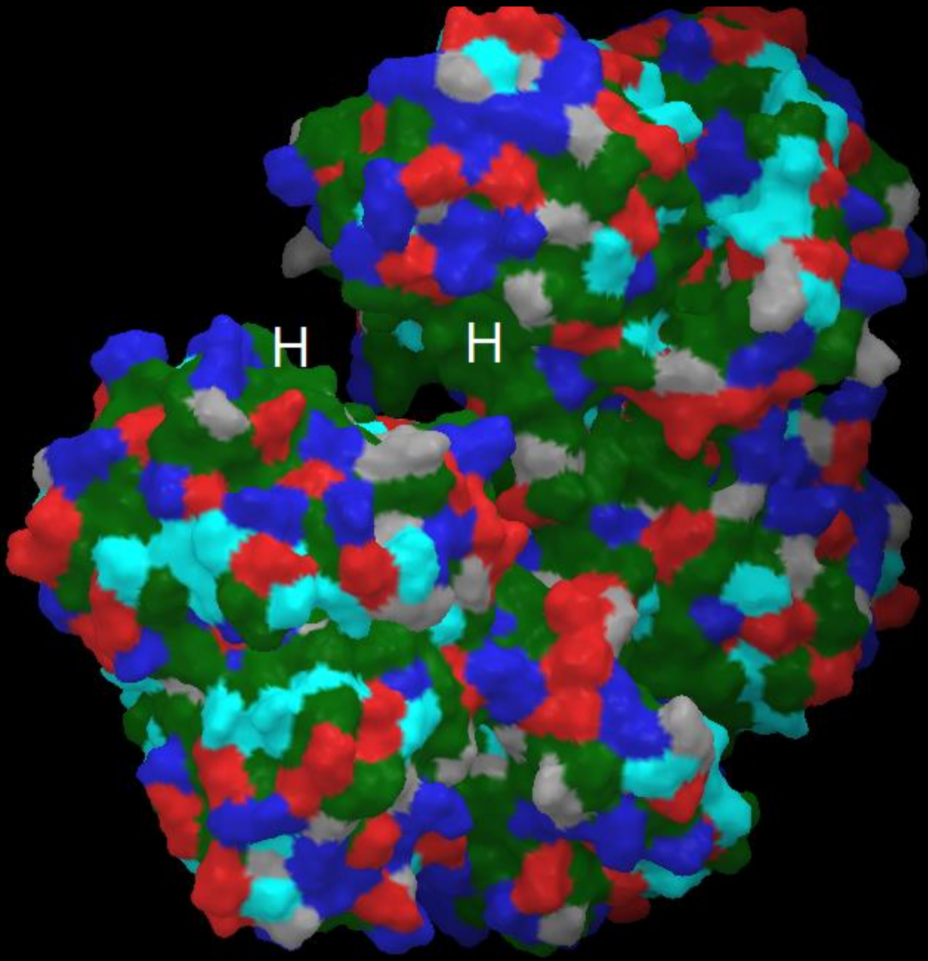
~~2. [illegible]G 1[illegible]~~

~~3. LYS 121~~

PNP protein



PNP protein



INTERAKCIJE

1. **ARG 135– ASP 139**
2. **ARG 117 – ASP 122 te ARG 117 – ASP 124**
3. **ASP 163 – LYS 121**

~~UTACIJE ALA:~~

~~1. A~~

~~2. 7~~

~~LYS 12~~

MUTACIJE

1. ASP 139 u ARG
2. ARG 117 u GLU
3. LYS 121 u GLU

DOVODE DO

RASPADA

HEKSAMERA !

(EKSPERIMENTALNO

POTVRĐENO)

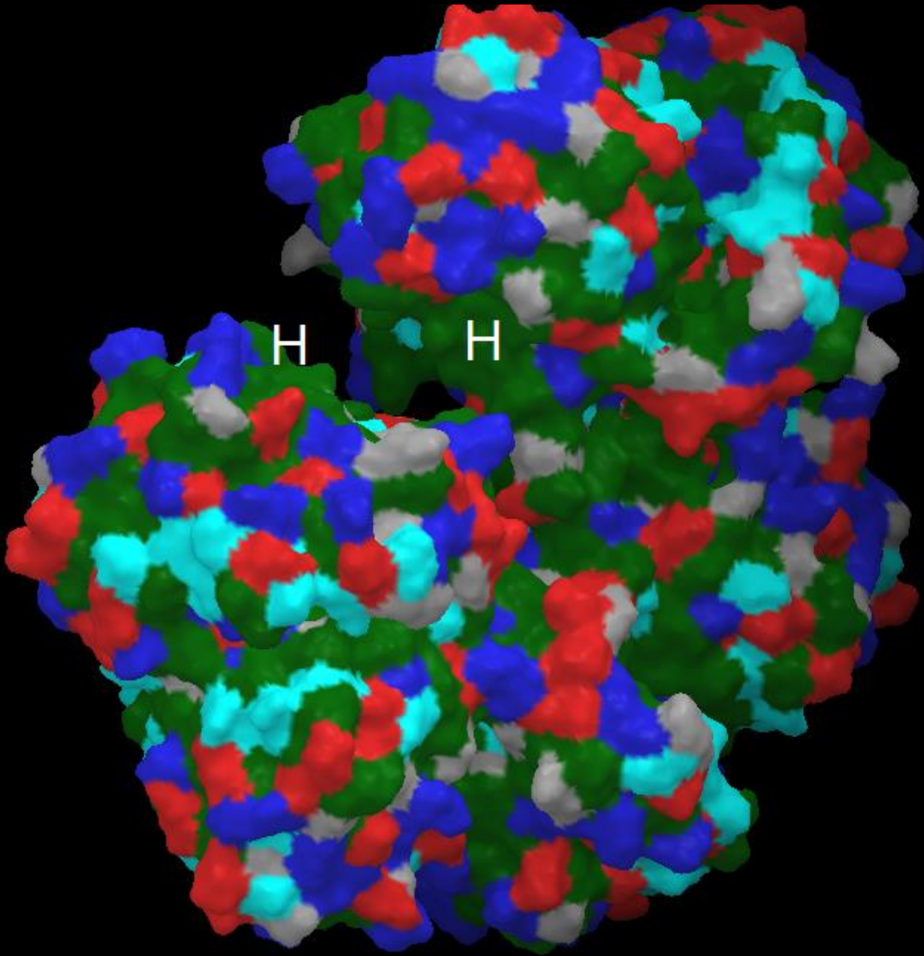
- našli smo mutacije koje uzrokuju **raspad heksamera**

- slijedeći korak: pokušati naći mutacije koje **stabiliziraju dimerni oblik u otopini**

- **MD simulacije** dimernog i heksamernog oblika divljeg tipa PNP proteina poslužile su nam da pronađemo **regije** koje najviše pridonose nestabilnosti dimera u otopini

- odabir slijedećih mutacija temeljio se na pokušaju stabilizacije tih regija

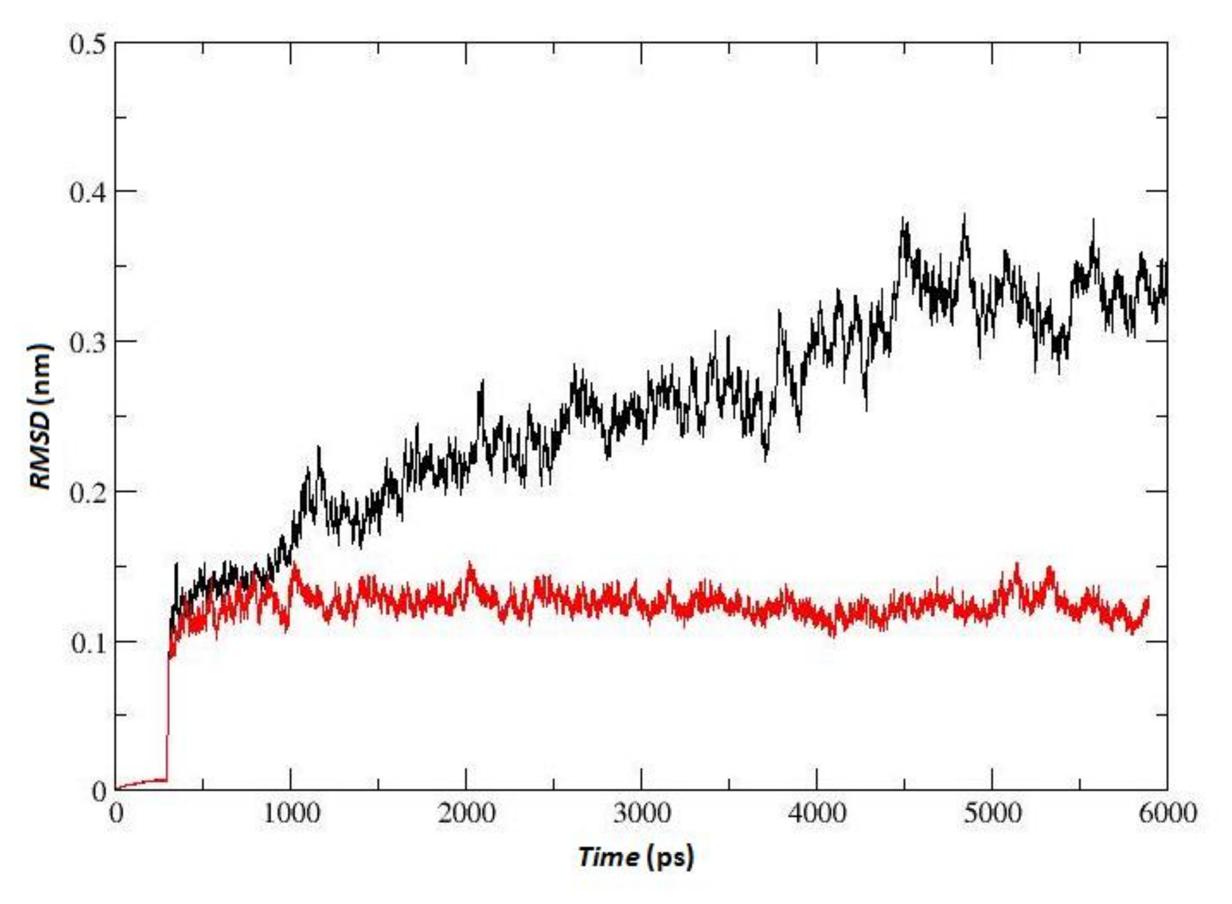
PNP protein



MD SIMULACIJE:

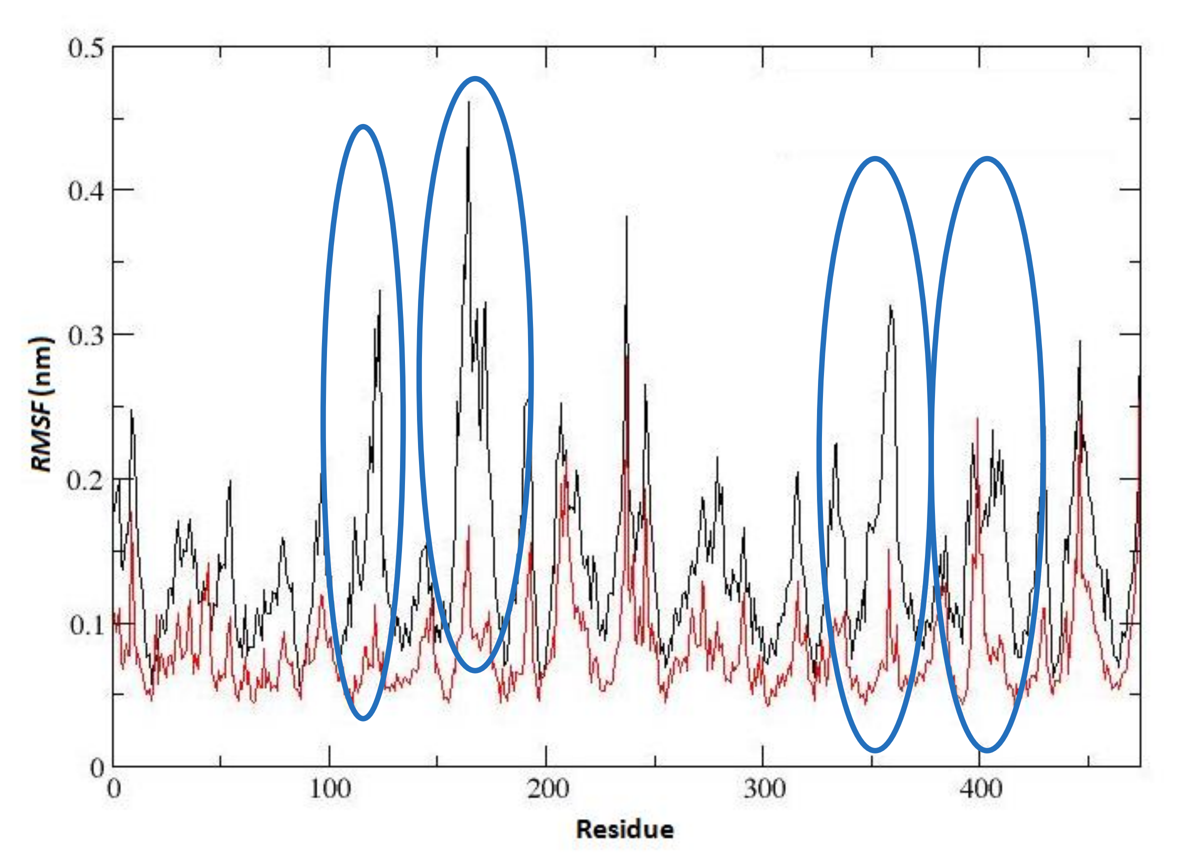
1. WT – APO **HEKSAMER** I **DIMER**
2. WT – **HEKSAMER** I **DIMER** SA “SUPSTRATIMA” (NUKLEOZID **I** FOSFAT)

MD SIMULACIJE: **APO WT – HEKSAMER I DIMER**



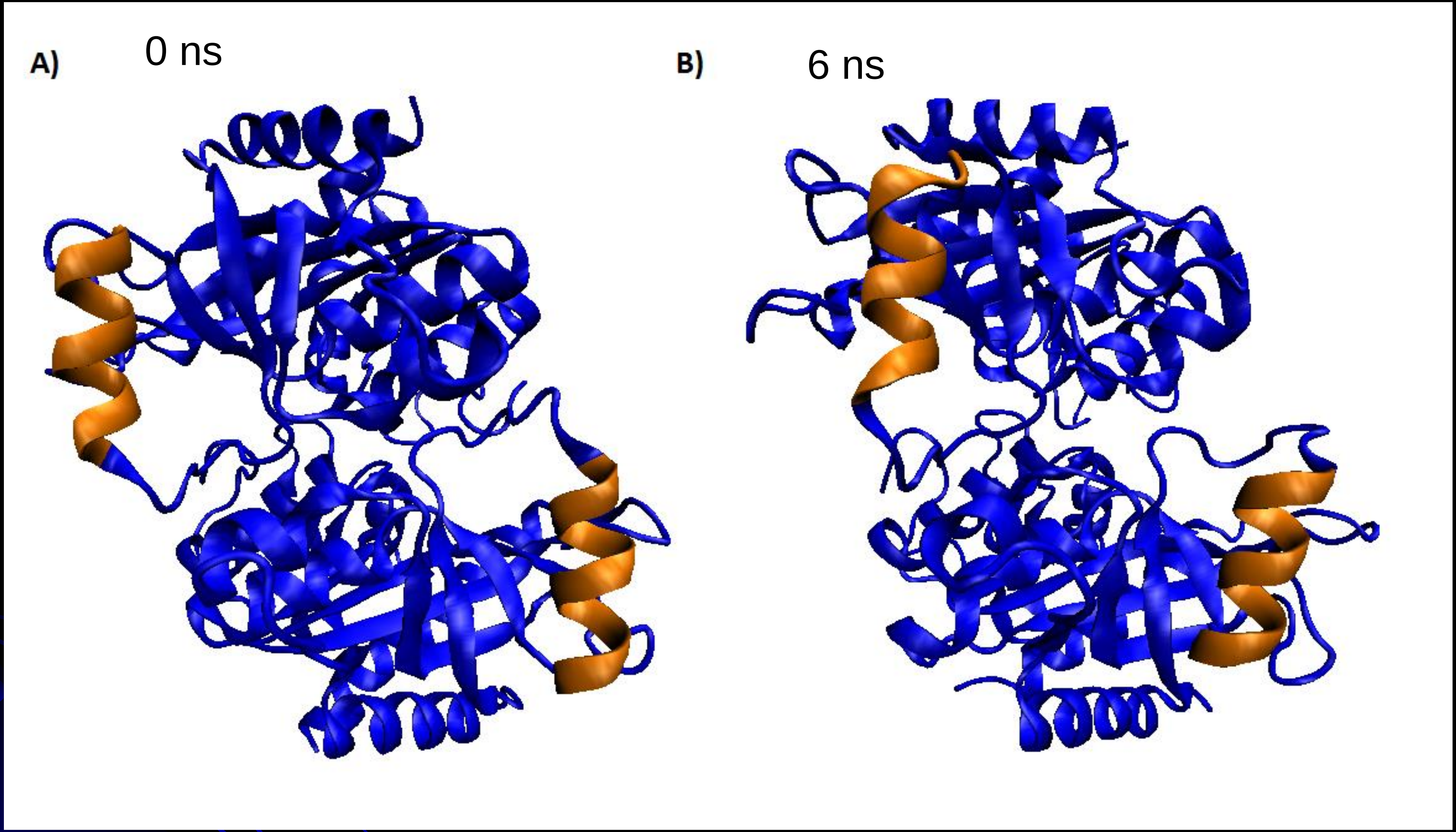
Apo WT– heksamer (crveno) i dimer (crno)

MD SIMULACIJE: **APO WT – HEKSAMER I DIMER**

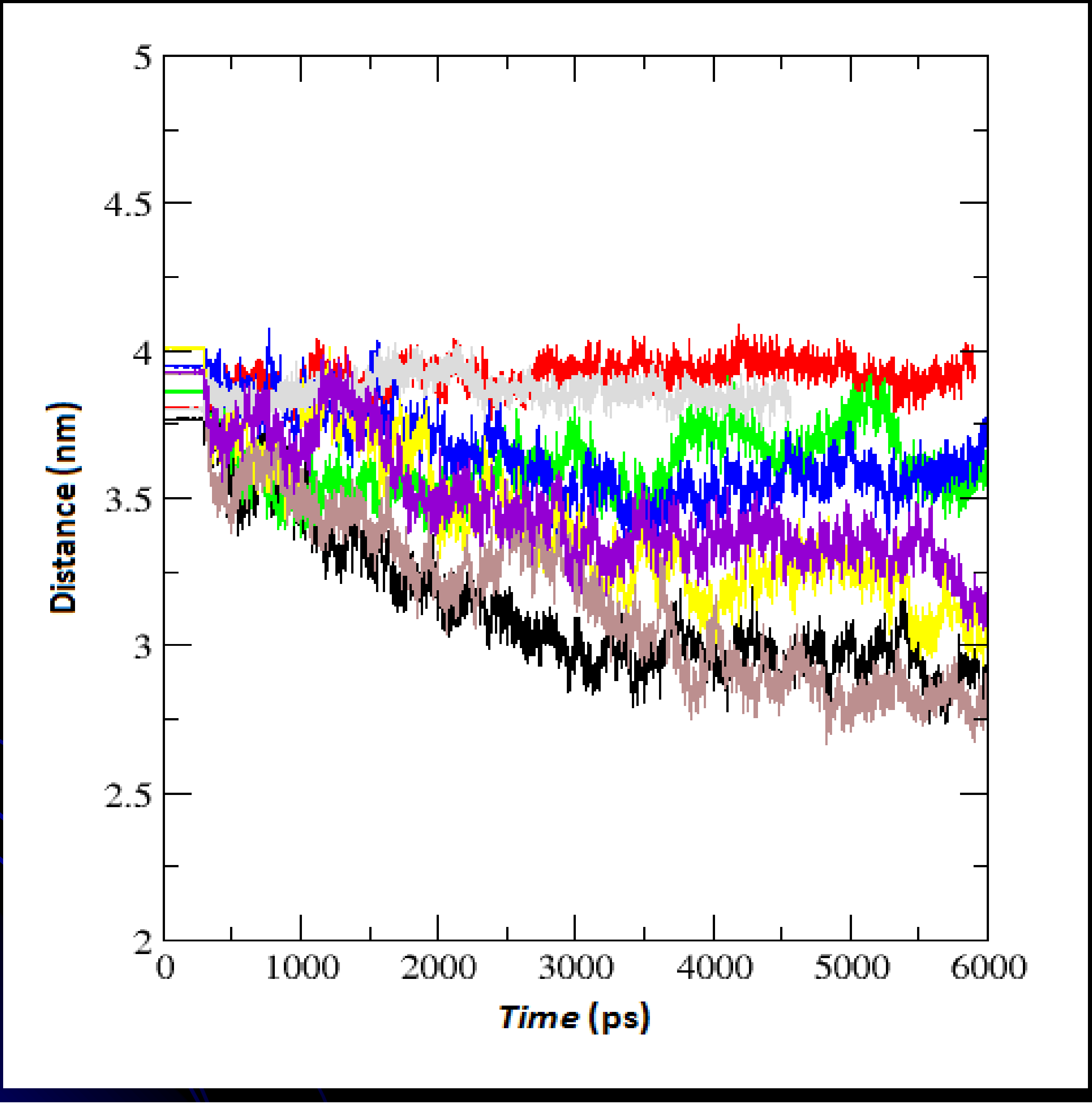


Apo WT– heksamer (crveno) i dimer (crno)

MD SIMULACIJE: **APO WT DIMER**

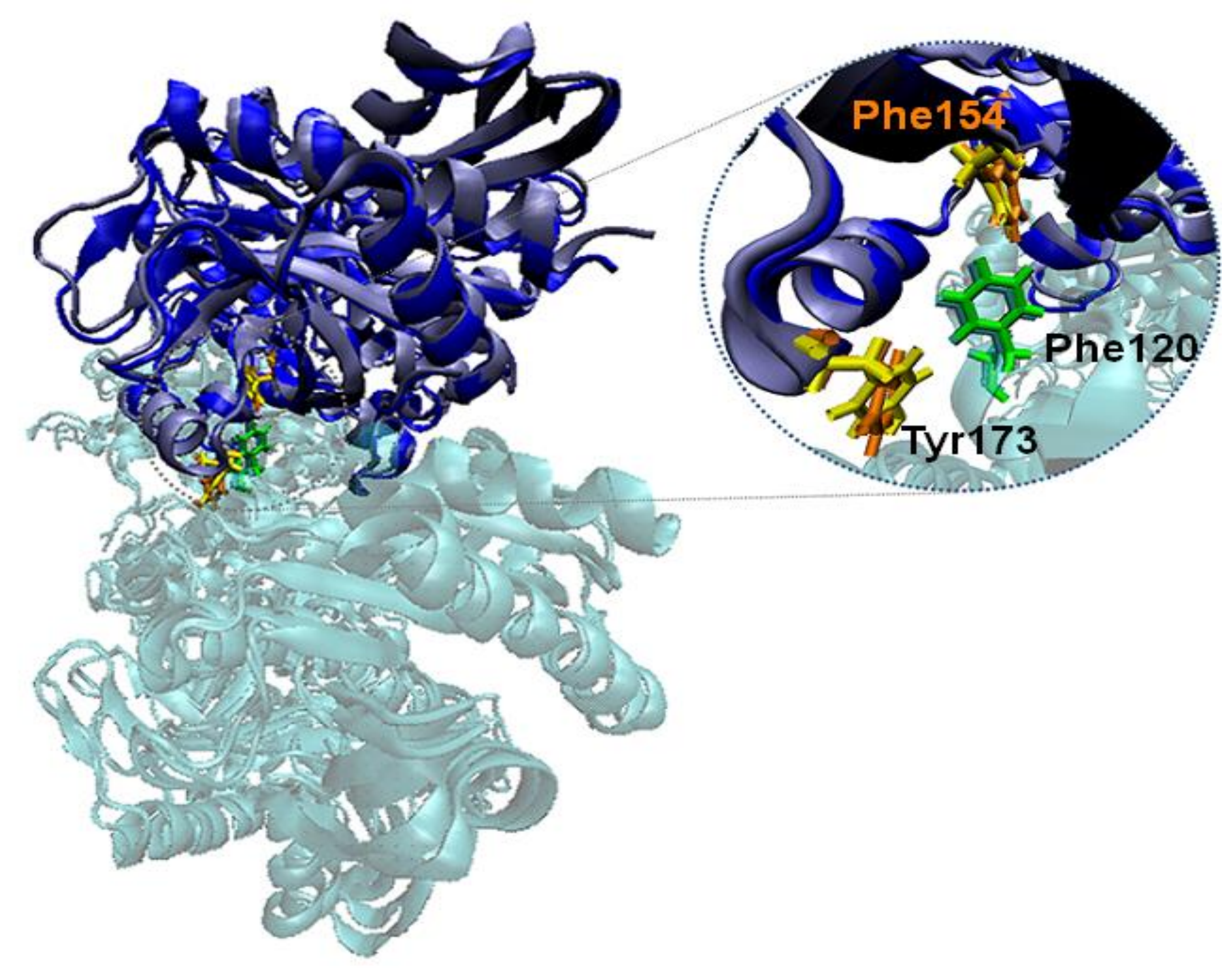


MD SIMULACIJE

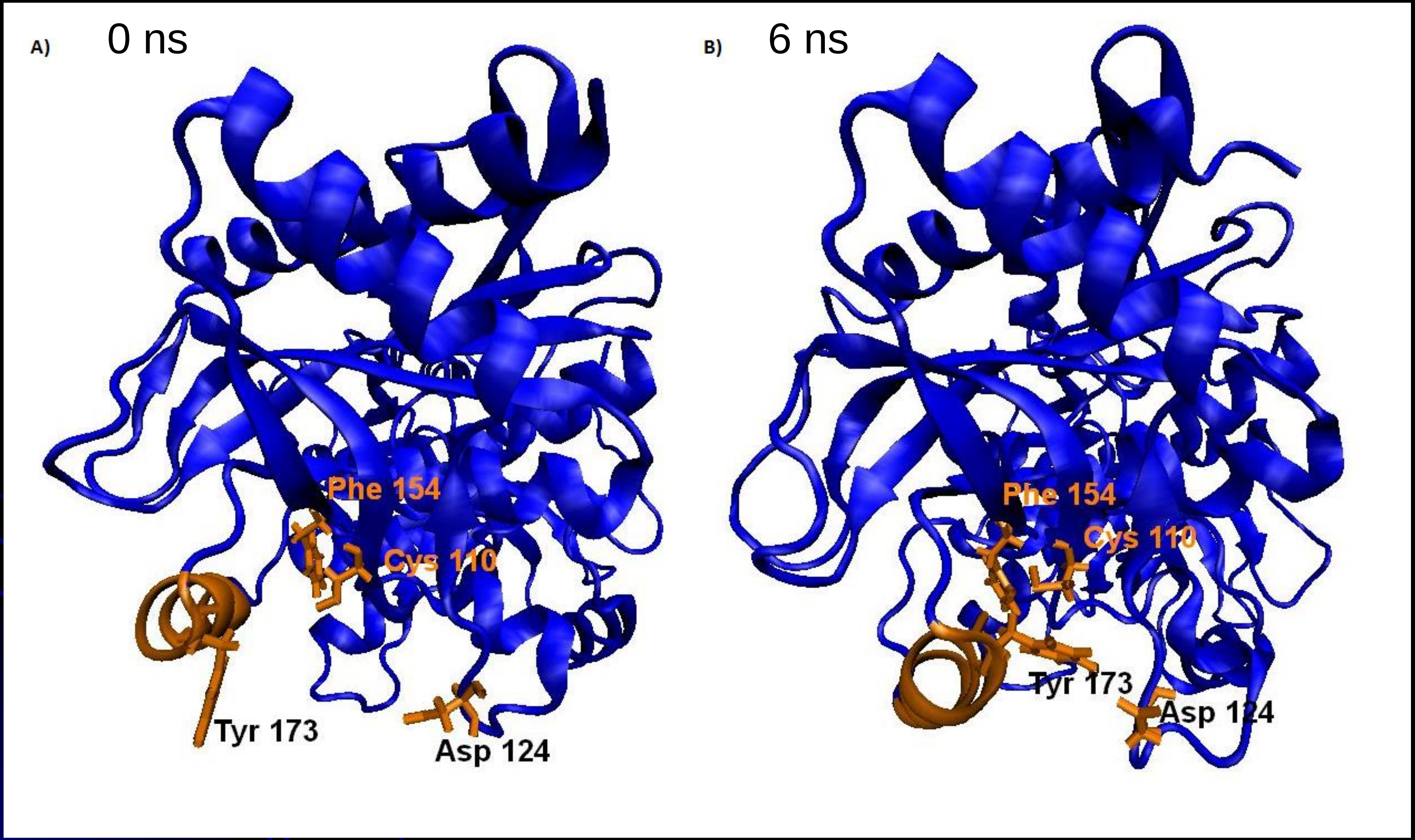


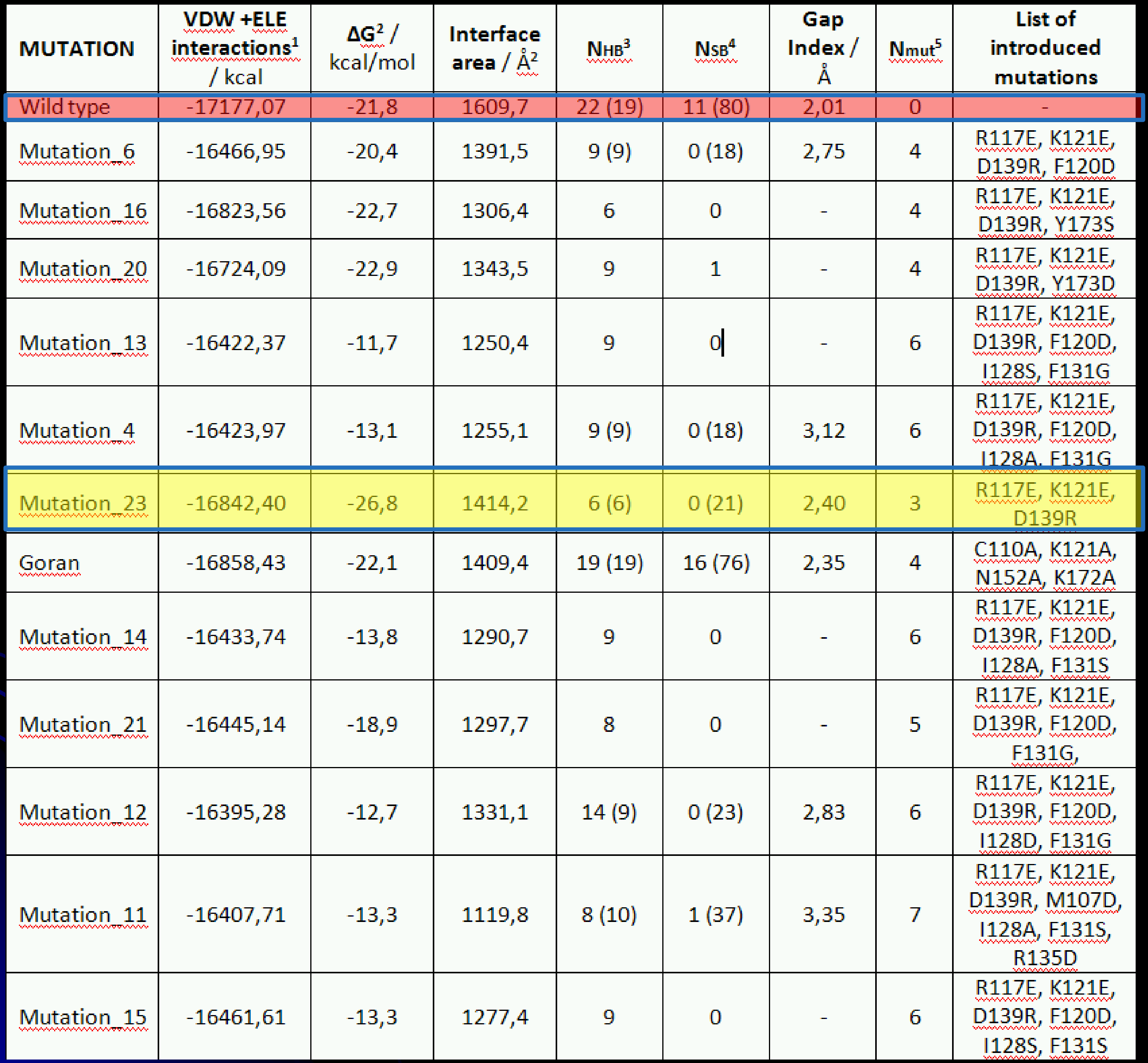
UDALJENOST CENTRA MASA HELIKSA: **APO dimer (crno)** **APO heksamer**

U HEKSAMERU



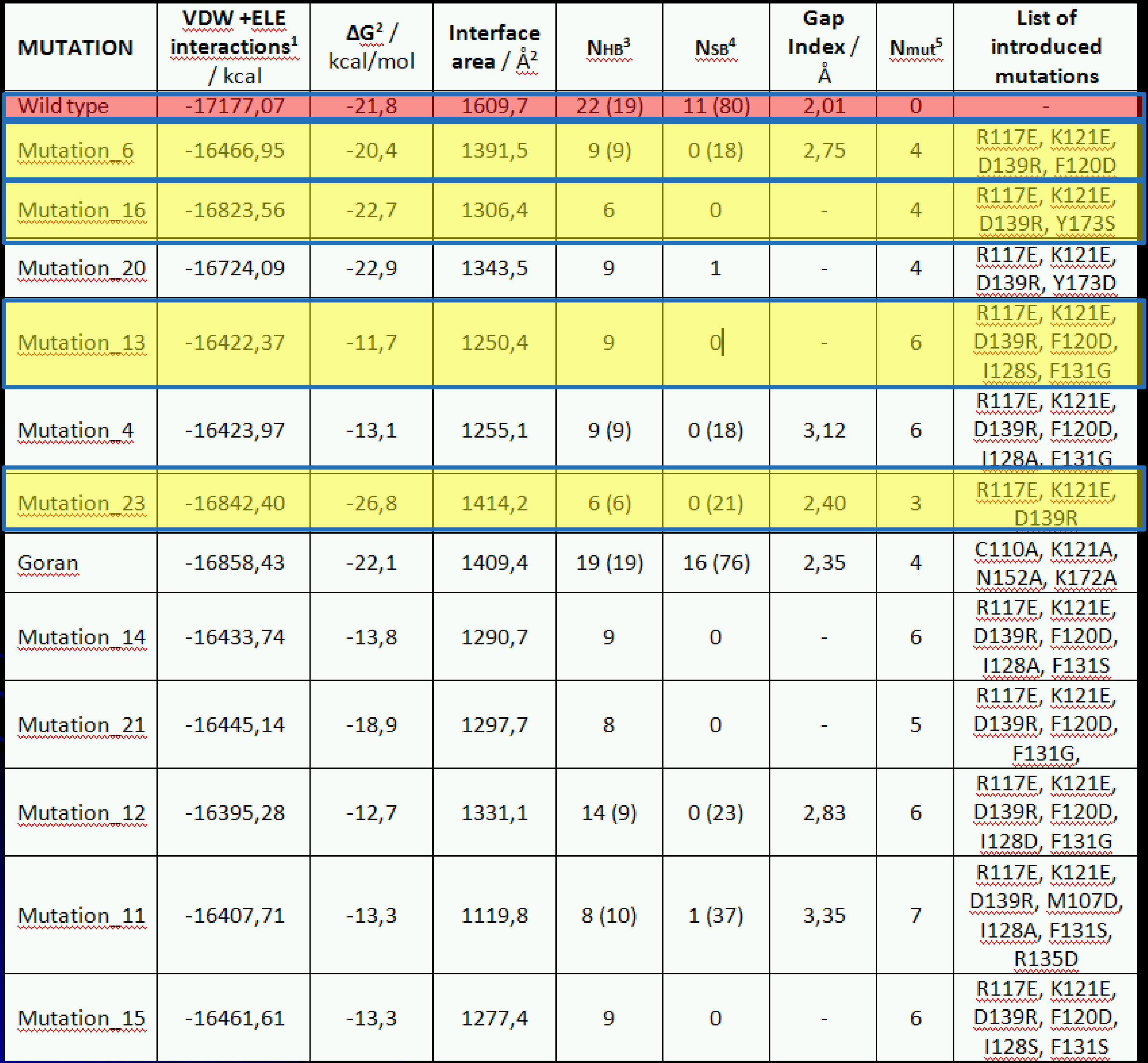
MD SIMULACIJA: **APO WT DIMER**





MUTATION	VDW +ELE interactions[1] / kcal	ΔG[2] / kcal/mol	Interface area / Å^2	N_{HB}[3]	N_{SB}[4]	Gap Index / Å	N_{mut}[5]	List of introduced mutations
Wild type	-17177,07	-21,8	1609,7	22 (19)	11 (80)	2,01	0	-
Mutation_6	-16466,95	-20,4	1391,5	9 (9)	0 (18)	2,75	4	R117E, K121E, D139R, F120D
Mutation_16	-16823,56	-22,7	1306,4	6	0	-	4	R117E, K121E, D139R, Y173S
Mutation_20	-16724,09	-22,9	1343,5	9	1	-	4	R117E, K121E, D139R, Y173D
Mutation_13	-16422,37	-11,7	1250,4	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128S, F131G
Mutation_4	-16423,97	-13,1	1255,1	9 (9)	0 (18)	3,12	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131G
Mutation_23	-16842,40	-26,8	1414,2	6 (6)	0 (21)	2,40	3	R117E, K121E, D139R
Goran	-16858,43	-22,1	1409,4	19 (19)	16 (76)	2,35	4	C110A, K121A, N152A, K172A
Mutation_14	-16433,74	-13,8	1290,7	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131S
Mutation_21	-16445,14	-18,9	1297,7	8	0	-	5	R117E, K121E, D139R, F120D, F131G,
Mutation_12	-16395,28	-12,7	1331,1	14 (9)	0 (23)	2,83	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128D, F131G
Mutation_11	-16407,71	-13,3	1119,8	8 (10)	1 (37)	3,35	7	R117E, K121E, D139R, M107D, I128A, F131S, R135D
Mutation_15	-16461,61	-13,3	1277,4	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128S, F131S

MUTATION	VDW +ELE interactions[1] / kcal	ΔG[2] / kcal/mol	Interface area / Å^2	N_{HB}[3]	N_{SB}[4]	Gap Index / Å	N_{mut}[5]	List of introduced mutations
Mutation_10	-16553,98	-13,6	1120,2	10 (10)	1 (25)	3,36	7	R117E, K121E, D139R, M107S, I128A, F131S, R135D
Mutation_8	-16607,11	-14,4	1116,5	9 (10)	1 (23)	3,40	7	R117E, K121E, D139R, M107T, I128A, F131S, R135D
Mutation_5	-16654,40	-11,2	1259,9	11 (10)	0 (24)	3,08	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131R
Mutation_9	-16633,55	-21,6	1421,3	12 (13)	1 (27)	2,77	4	R117E, K121E, D139R, I128D
Mutation_7	-16797,36	-19,6	1144,8	9 (10)	0 (22)	3,15	6	R117E, K121E, D139R, I128A, F131G,Y173A
Mutation_2	-16805,21	-22,8	1309,7	6 (6)	0 (22)	2,68	4	R117E, K121E, D139R, I128G
Mutation_18	-16810,36	-26,3	1417,4	6	0	-	4	R117E, K121E, D139R, V169G
Mutation_19	-16881,81	-27,0	1412,9	5	0	-	4	R117E, K121E, D139R, F167S
Mutation_17	-16843,21	-25,6	1399,6	7	0	-	4	R117E, K121E, D139R, V169S
Mutation_1	-16904,17	-19,3	1372,5	12 (13)	0 (28)	2,52	4	R117E, K121E, D139R, F131R
Mutation_3	-16979,63	-21,9	1393,4	10 (10)	0 (24)	2,50	4	R117E, K121E, D139R, I128Q
Mutation_22	-17183,04	-18,9	1527,2	23	18	-	1	Y173S



MUTATION	VDW +ELE interactions[1] / kcal	ΔG[2] / kcal/mol	Interface area / Å^2	N_{HB}[3]	N_{SB}[4]	Gap Index / Å	N_{mut}[5]	List of introduced mutations
Wild type	-17177,07	-21,8	1609,7	22 (19)	11 (80)	2,01	0	-
Mutation_6	-16466,95	-20,4	1391,5	9 (9)	0 (18)	2,75	4	R117E, K121E, D139R, F120D
Mutation_16	-16823,56	-22,7	1306,4	6	0	-	4	R117E, K121E, D139R, Y173S
Mutation_20	-16724,09	-22,9	1343,5	9	1	-	4	R117E, K121E, D139R, Y173D
Mutation_13	-16422,37	-11,7	1250,4	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128S, F131G
Mutation_4	-16423,97	-13,1	1255,1	9 (9)	0 (18)	3,12	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131G
Mutation_23	-16842,40	-26,8	1414,2	6 (6)	0 (21)	2,40	3	R117E, K121E, D139R
Goran	-16858,43	-22,1	1409,4	19 (19)	16 (76)	2,35	4	C110A, K121A, N152A, K172A
Mutation_14	-16433,74	-13,8	1290,7	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131S
Mutation_21	-16445,14	-18,9	1297,7	8	0	-	5	R117E, K121E, D139R, F120D, F131G,
Mutation_12	-16395,28	-12,7	1331,1	14 (9)	0 (23)	2,83	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128D, F131G
Mutation_11	-16407,71	-13,3	1119,8	8 (10)	1 (37)	3,35	7	R117E, K121E, D139R, M107D, I128A, F131S, R135D
Mutation_15	-16461,61	-13,3	1277,4	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128S, F131S

MD SIMULACIJE DIMERA-MUTANATA:

-mutant 23 (inicijalna mutacija)

- mutant 6
- mutant 13
- mutant 16

WT – APO DIMER I HEKSAMER

WT – AMM DIMER I HEKSAMER

In silico mutacije – MD simulacije

PNP – divlji tip

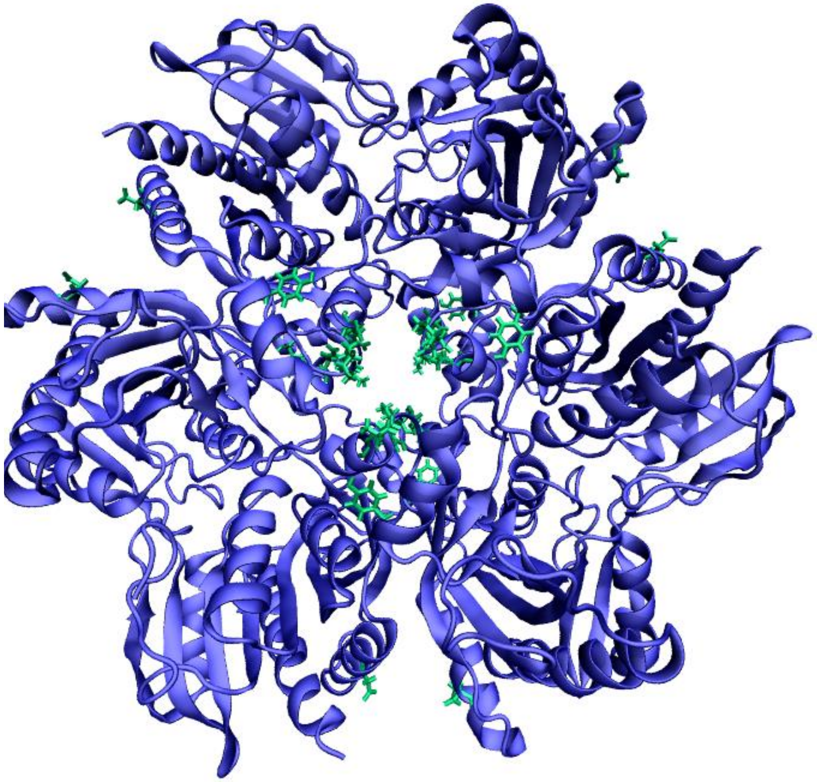
Mutant_23

Mutant_6

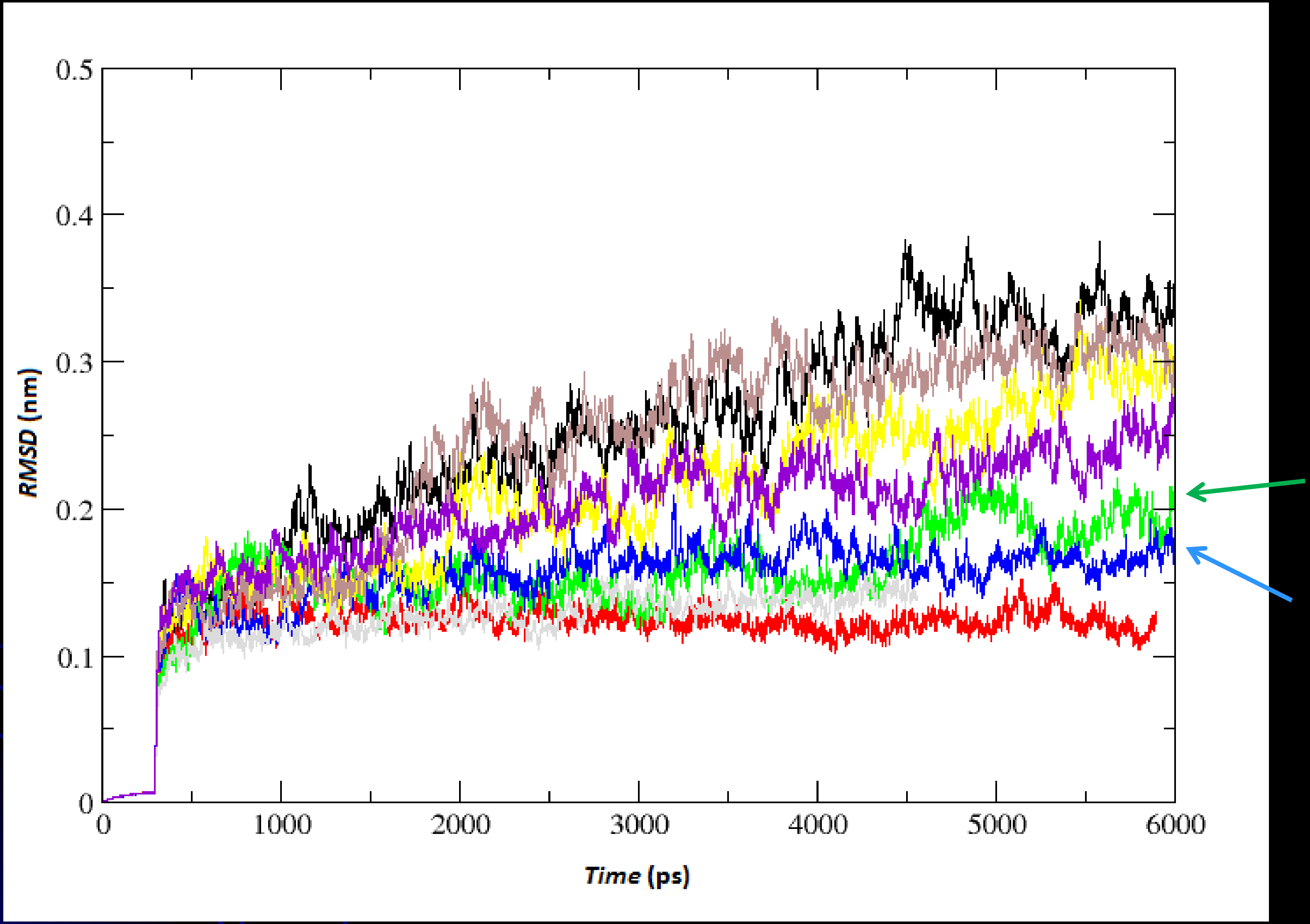
Mutant_13

Mutant_16

- Arg117Glu, Lys121Glu
- Asp139Arg, Tyr173Ser

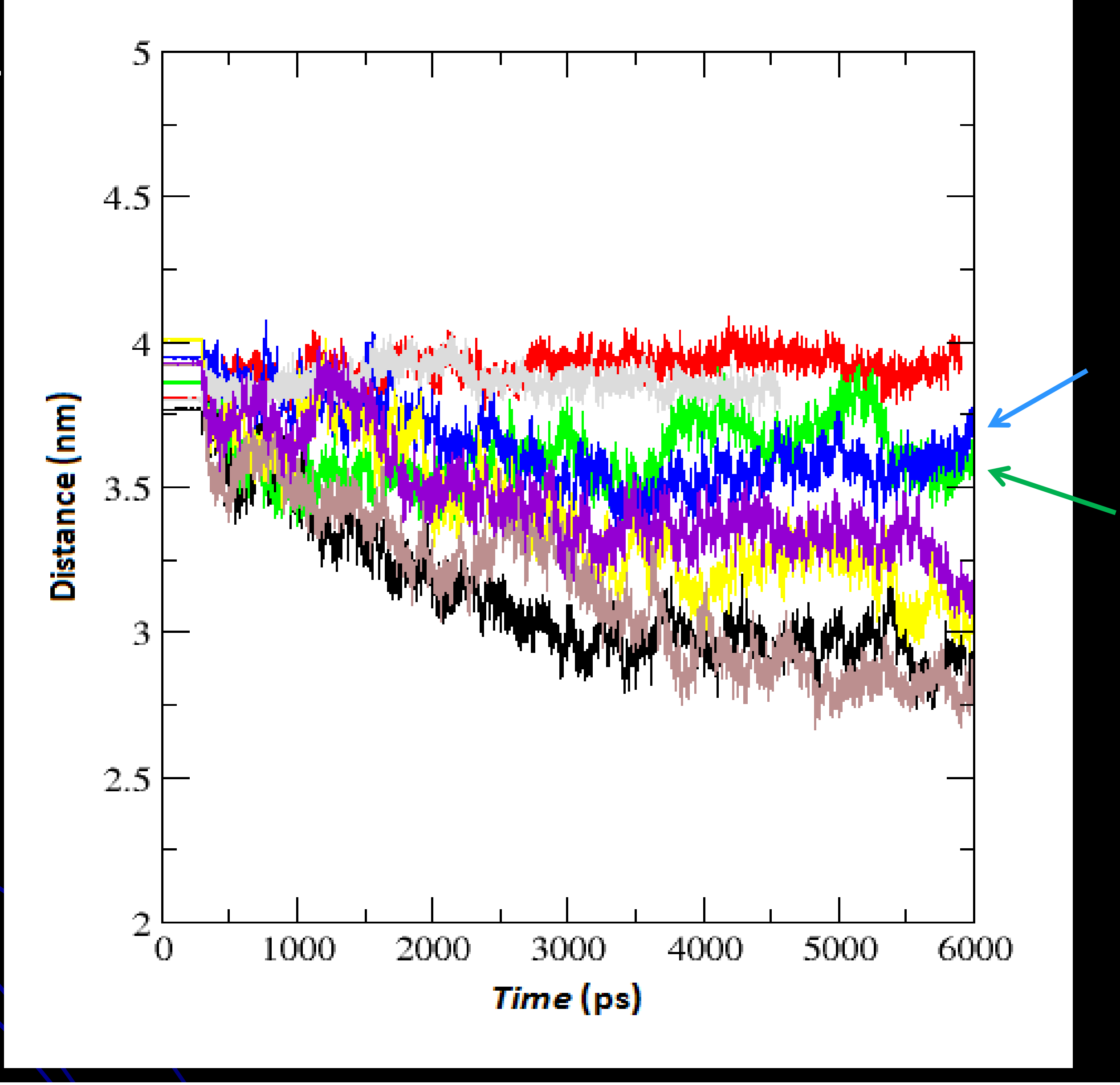


MD SIMULACIJE



RMSD backbone:**APO form of dimer**, **APO form of hexamer** **AMM form of dimer** **AMM form of hexamer** **Mutation_23 dimer** **Mutation_6 dimer** **Mutation_13 dimer** **Mutation_16 dimer**

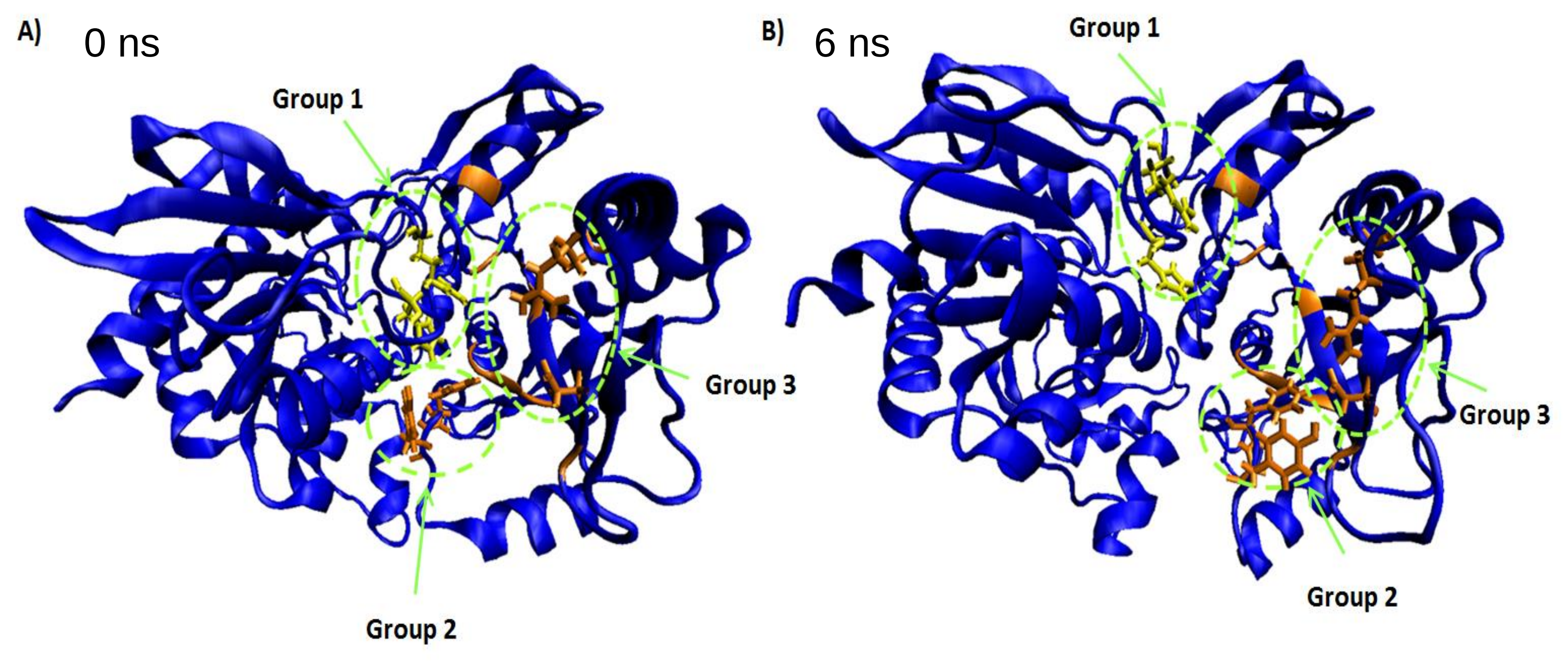
MD SIMULACIJE



UDALJENOST HELIKSA: **APO form of dimer (crno)** **APO form of hexamer** **AMM form of dimer** **AMM form of hexamer** **Mutation_23 dimer** **Mutation_6 dimer** **Mutation_13 dimer** **Mutation_16 dimer**

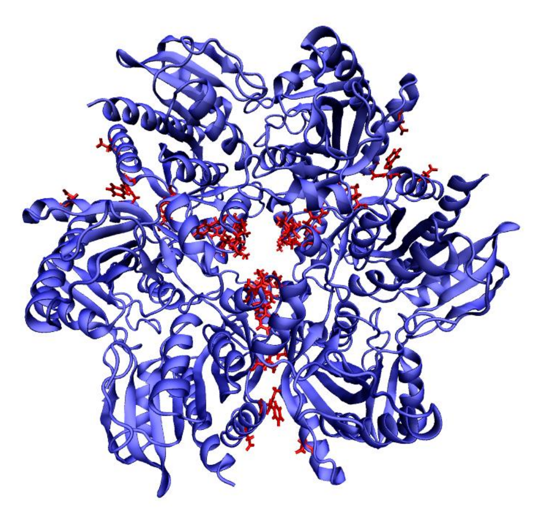
AKTIVNO MJESTO _ Mutant_13

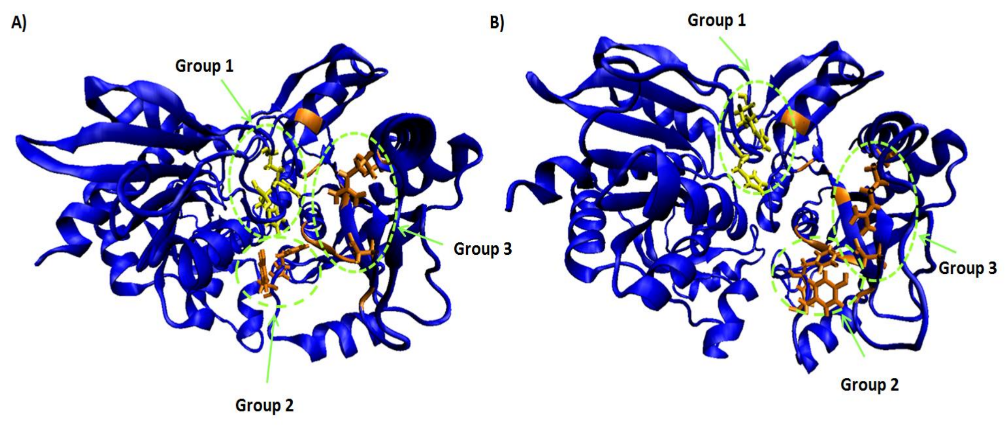
- kako bi dobili aktivni dimer, nužno je da aktivno mjesto sačuva svoju topologiju
- promjena izgleda aktivnog mjesta uočena je kod većine dimera (u većoj ili manjoj mjeri)
- prisutnost “supstrata” (nukeozid i fosfor) **stabiliziraju** aktivno mjesto u dimeru!

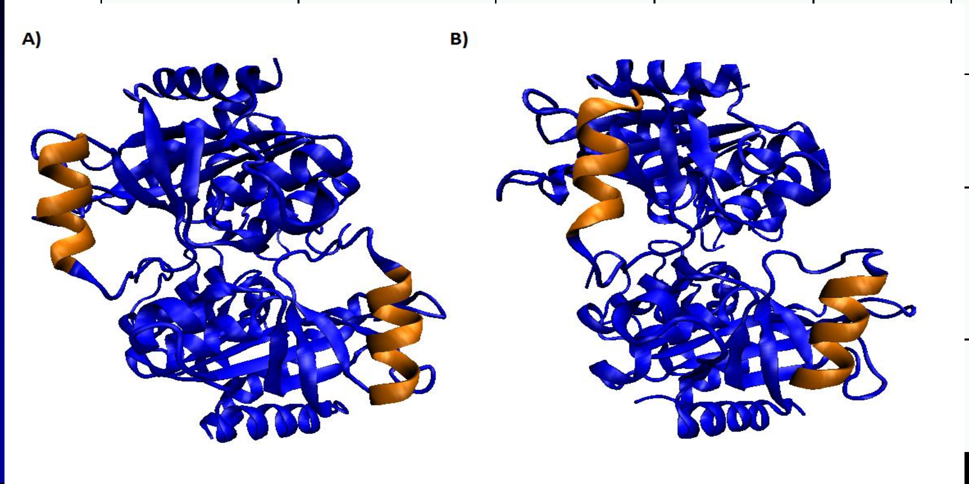


MUTATION	VDW +ELE interactions[1] / kcal	ΔG[2] / kcal/mol	Interface area / $Å^2$	N_{HB}[3]	N_{SB}[4]	Gap Index / Å	N_{mut}[5]	List of introduced mutations
Wild type	-17177,07	-21,8	1609,7	22 (19)	11 (80)	2,01	0	-
Mutation_6	-16466,95	-20,4	1391,5	9 (9)	0 (18)	2,75	4	R117E, K121E, D139R, F120D
Mutation_16	-16823,56	-22,7	1306,4	6	0	-	4	R117E, K121E, D139R, Y173S
Mutation_20	-16724,09	-22,9	1343,5	9	1	-	4	R117E, K121E, D139R, Y173D
Mutation_13	-16422,37	-11,7	1250,4	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128S, F131G
Mutation_4	-16423,97	-13,1	1255,1	9 (9)	0 (18)	3,12	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131G
Mutation_23	-16842,40	-26,8	1414,2	6 (6)	0 (21)	2,40	3	R117E, K121E, D139R
Goran	-16858,43	-22,1	1409,4	19 (19)	16 (76)	2,35	4	C110A, K121A, N152A, K172A
Mutation_14	-16433,74	-13,8	1290,7	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131S
Mutation_21	-16445,14	-18,9	1297,7	8	0	-	5	R117E, K121E, D139R, F120D, F131G,
Mutation_12	-16395,28	-12,7	1331,1	14 (9)	0 (23)	2,83	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128D, F131G
Mutation_11	-16407,71	-13,3	1119,8	8 (10)	1 (37)	3,35	7	R117E, K121E, D139R, M107D, I128A, F131S, R135D
Mutation_15	-16461,61	-13,3	1277,4	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128S, F131S

MUTATION	VDW +ELE interactions[1] / kcal	ΔG[2] / kcal/mol	Interface area / Å^2	N$_{HB}$[3]	N$_{SB}$[4]	Gap Index / Å	N$_{mut}$[5]	List of introduced mutations
Wild type	-17177,07	-21,8	1609,7	22 (19)	11 (80)	2,01	0	-
Mutation_6	-16466,95	-20,4	1391,5	9 (9)	0 (18)	2,75	4	R117E, K121E, D139R, F120D
Mutation_16	-16823,56	-22,7	1306,4	6	0	-	4	R117E, K121E, D139R, Y173S
			1343,5	0	1		4	R117E, K121E,
Mutation_14	-16433,74	-13,8	1290,7	9	0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128A, F131S
					0	-	5	R117E, K121E, D139R, F120D, F131G,
					0 (23)	2,83	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128D, F131G
					1 (37)	3,35	7	R117E, K121E, D139R, M107D, I128A, F131S, R135D
					0	-	6	R117E, K121E, D139R, F120D, I128S, F131S



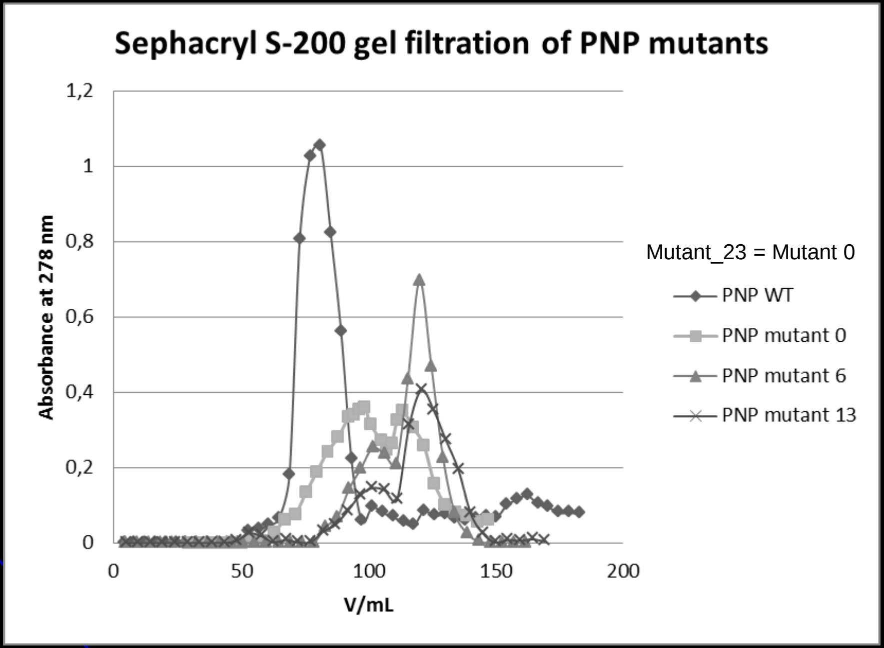




EKSPERIMENTI

Eksperimentalni rezultati: uvedene mutacije uzrokovale su raspad heksamernog oblika. Nastali dimerni oblici nisu katalitički aktivni.

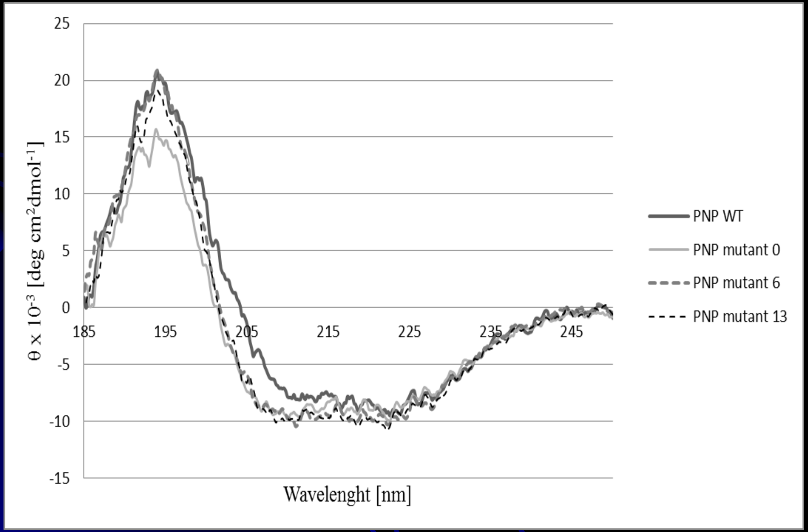
- potvrđeno eksperimentima ultracentrifuge



EKSPERIMENTI

Eksperimentalni rezultati: uvedene mutacije uzrokovale su raspad heksamernog oblika. Nastali dimerni oblici nisu katalitički aktivni.

- potvrđeno eksperimentima CD spektroskopije



	% of the whole structure			
	WT	Mutant **0**	Mutant **6**	Mutant **13**
α-Helices	27.0	29.0	31.1	31.3
β-Strands	20.0	21.0	17.4	17.2
Turns	23.5	23.0	24.0	23.3
Loops	29.4	27.0	30.0	28.6

EKSPERIMENTI

-mjerenje enzimske aktivnosti UV/Vis spektrofotometrijom:

NITI JEDAN MUTANT NE POKAZUJE ZNAČAJNIJU AKTIVNOST!

EKSPERIMENTI SU POTVRDILI RAČUNALNE REZULTATE

ILI

RAČUNALNI REZULTATI OMOGUĆAVAJU INTERPRETACIJU EKSPERIMENTALNIH REZULTATA NA MOLEKULARNOJ RAZINI

B. Bertoša *et al. FEBS J*, **281** (2014) 1860-1871.