

Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Mycobacterium tuberculosis*

Brajković, Mislav

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:005298>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mislav Brajković

**Simulacije molekulske dinamike proteina
MntR iz bakterije *Mycobacterium
tuberculosis***

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Mislav Brajković

**Molecular dynamics simulations of the
MntR protein from the bacterium
*Mycobacterium tuberculosis***

Master thesis

Zagreb, 2022.

Hvala mojem mentoru prof. dr. sc. Branimiru Bertoši na brojnim sugestijama, odličnoj atmosferi i velikoj pomoći tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se Zoe Jelić Matošević na strpljivom podučavanju o računalnim metodama koje su mi bile neophodne pri praktičnoj izradi ovog diplomskog rada.

Na kraju bih želio zahvaliti svojim prijateljima i obitelji koji su mi bili neizmjerne potpora tijekom studiranja.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Manganovi metalosenzori* čiji je voditelj B. Bertoša (IP-2020-02-3446). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije

Mycobacterium tuberculosis

Mislav Brajković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Homodimerni protein MntR (engl. *Manganese Transport Regulator*) regulira unutarstaničnu koncentraciju Mn^{2+} iona u bakteriji *Mycobacterium tuberculosis* represijom gena za njihov unos. Ovaj protein stvara interakcije s DNA u holo formi (s vezanim manganom), a u apo formi (bez vezanog mangana) je neaktivan. Molekularni mehanizam aktivacije proteina za vezanje DNA nije u potpunosti razjašnjen. Kako bi se istražile razlike strukturnih i dinamičkih svojstava apo i holo strukture proteina, provedene su računalne simulacije molekulske dinamike (MD). Analizom MD simulacija ustanovljeno je da su DNA-vezujuće domene (domene HTH) i N-terminalni lanci proteina MntR međusobno bliže u simulacijama holo strukture u usporedbi s apo strukturom. Približavanje domena HTH mogući je mehanizam aktivacije proteina za vezanje molekule DNA, ali potrebne su dodatne simulacije i eksperimenti kako bi to potvrdili. Manganovi ioni uzrokovali su i smanjenje fleksibilnosti nekih α -zavojnica tijekom MD simulacija ukazujući na još jednu razliku apo i holo forme. Pronađena je mreža nekovalentnih interakcija između domena HTH i FeoA. Rezultati MD simulacija pokazuju da je ta mreža interakcija neophodna u povezivanju domena HTH i FeoA, prekidanje te mreže interakcija dovodi do odvajanja tih domena. Također, prekid te mreže interakcija uzrokuje i približavanje domena HTH među podjedinicama proteina što moguće ima utjecaj sposobnost vezanja DNA.

(62 stranica, 20 slika, 3 tablice, 65 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: protein MntR, homeostaza mangana, molekulska dinamika, alosterička aktivacija, metaloregulatorni proteini

Voditelj: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 13.01.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Molecular dynamics simulations of the MntR protein from the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*

Mislav Brajković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

MntR (*Manganese Transport Regulator*) is a homodimeric protein that regulates intracellular manganese ion concentration in the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* by repressing the Mn^{2+} intake genes. As contrast to the inactive apo structure (without bound manganese ions), the holo structure (with bound manganese ions) of MntR can form interactions with DNA. The molecular mechanism by which MntR is activated for DNA binding is unknown. Molecular dynamics (MD) simulations were performed to compare structural and dynamical properties of apo and holo MntR structures. MD simulations revealed that DNA-binding domains (HTH domains) and N-terminal chains were closer in simulations of holo structure than in apo structure. This might improve DNA binding and could represent a mechanism of MntR activation. However, this hypothesis needs to be confirmed by additional MD simulations and experiments. Another distinction between apo and holo structures is that Mn^{2+} in holo structures causes a decrease of the flexibility of some α -helices. Analyses of MD simulations identified network of non-covalent interactions between the HTH and FeoA domains. Disruption of this network caused the HTH and FeoA domains to separate, proving its critical role in inter-domain communication. In addition, breaking of the interdomain interaction network also brought the HTH domains close together, which may have an impact on DNA binding.

(62 pages, 20 figures, 3 tables, 65 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: MntR protein, manganese homeostasis, molecular dynamics, allosteric activation, metalloregulatory proteins

Supervisor: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Reviewers:

Prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Thesis accepted: 13.01.2022.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Bakterija <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.2. Prijelazni metali u biološkim sustavima	1
1.2.1. Homeostaza prijelaznih metala i nutritivni imunitet	1
1.2.2. Manganovi ioni u bakteriji <i>M. tuberculosis</i>	2
1.3. Transkripcijski faktor MntR	3
1.3.1. Porodica proteina DtxR	3
1.3.2. Funkcija	3
1.3.3. Struktura	4
1.4. Simulacije molekulske dinamike	9
1.4.1. Određivanje strukture proteina kristalografijom i NMR spektroskopijom	9
1.4.2. Osnove molekulske dinamike	10
1.4.3. Polje sila i parametrizacija	11
1.4.4. Priprema sustava i pokretanje simulacija molekulske dinamike	12
1.5. Cilj istraživanja	14
2. Materijali i metode	15
2.1. Priprema sustava za simulacije molekulske dinamike	15
2.2. Simulacije molekulske dinamike	17
2.3. Priprema <i>in silico</i> mutanata proteina MntR iz <i>M. tuberculosis</i>	19
2.4. Analiza i vizualizacija trajektorija MD simulacija	19
3. Rezultati	21
3.1. Fluktuacije N-terminalnih lanaca i njihova međusobna udaljenost	21
3.2. Razlike koordinacije iona mangana u veznom mjestu od one u kristalnoj strukturi	24
3.3. Mreža interakcija koja povezuje domene HTH i FeoA	30
3.3.1. Odvajanje domena u divljem tipu proteina MntR	30
3.3.2. Odvajanje domena u mutantima proteina MntR	38
3.4. Udaljenost domena HTH među podjedinicama apo i holo simulacija	42
3.4.1. Udaljenost domena HTH u divljem tipu proteina MntR iz bakterije <i>M. tuberculosis</i>	42
3.4.2. Udaljenost domena HTH u <i>in silico</i> mutantima proteina MntR iz bakterije <i>M. tuberculosis</i>	43
3.5. Fluktuiranje α -zavojnica	44
4. Rasprava	48
4.1. N-terminalni lanci	48

4.2. Koordinacija Mn ²⁺ iona	49
4.3. Mreža interakcija koja povezuje domene HTH i FeoA	49
4.4. Udaljenost domena HTH	51
4.5. Fluktuiranje α -zavojnica	52
<u>5. Zaključak</u>	<u>53</u>
<u>6. Literatura.....</u>	<u>54</u>
<u>7. Prilozi</u>	<u>61</u>
<u>8. Životopis.....</u>	<u>62</u>

Popis kratica:

HIV – virus humane imunodeficijencije

DtxR – porodica proteina koja je dobila ime po istoimenom proteinu engl. *Diphtheria Toxin Repressor*

MntR – engl. *Manganese Transport Regulator*, regulatorni protein ovisan o manganovim ionima

HTH – engl. *Helix-Turn-Helix* proteinski strukturni motiv, uglavnom mu je uloga u vezanju proteina na molekulu DNA

FeoA – domena proteina MntR smiještena na C-terminalnom kraju

PDB – baza podataka o strukturama proteina

MD – engl. *Molecular Dynamics*, računalna metoda kojom se simulira razvoj molekulskih sustava u vremenu

RMSF – statistički pokazatelj fleksibilnosti određenih dijelova proteina

1. Uvod

1.1. Bakterija *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis jedna je od najsmrtonosnijih respiratornih patogenih bakterija i primarni je uzročnik zarazne bolesti poznate pod imenom tuberkuloza. Ova bakterija sadrži specifičnu staničnu stijenkiju koja pruža zaštitu od različitih spojeva i lijekova te ima ulogu u virulenciji. Bacil *M. tuberculosis* svrstan je u sporo rastuće bakterije s vremenom udvostručenja od 12 do 24 sata u optimalnim uvjetima (Delogu i sur. 2013). Prilikom infekcije, bakterija *M. tuberculosis* preživljava unutar makrofaga domaćina na način da modulira prirodni razvoj fagosoma. Fagosomi koji sadržavaju te bakterije ne progresiraju u kisele lizosome, nego se u njima razvija bakterija *M. tuberculosis* što rezultira oboljenjem (Russel, 2001). Tuberkuloza predstavlja posebno veliku opasnost i glavni je uzročnik smrtnosti za pacijente zaražene HIV-om (Sharma i sur. 2005). U približno 40 % preminulih odraslih HIV pacijenata tuberkuloza je bila uzrok smrti, međutim ova brojka varira ovisno o kojem dijelu svijeta se gleda (Gupta i sur. 2015). Procjenjuje se da je 2019. godine tuberkuloza uzrokovala oko 1,4 milijuna smrti među kojima je 1,2 milijuna bilo HIV-negativno, a oko 208 tisuća HIV-pozitivno (Chakaya i sur. 2021). Istovremena infekcija bakterijom *M. tuberculosis* i virusom HIV-1 pruža prednosti za oba patogena: HIV-1 infekcija povećava vjerojatnost aktivacije tuberkuloze iz latentnog stadija, a bakterija *M. tuberculosis* pospješuje replikaciju virusa HIV-1 (Bell i Noursadeghi, 2018). Čak i nakon preboljenja, tuberkuloza je povezana s porastom dodatnih oportunističkih infekcija te progresijom HIV infekcije (Whalen i sur. 1995). Istovremeno, liječenje *M. tuberculosis* postaje sve izazovnije zbog nastanka novih sojeva rezistentnih na antibiotike. Kako bi se razvile prikladne terapije i lijekovi, potrebno je detaljno razumijevanje molekularnih mehanizama virulencije ovoga patogena. (Zondervan i sur. 2018).

1.2. Prijelazni metali u biološkim sustavima

1.2.1. Homeostaza prijelaznih metala i nutritivni imunitet

Prijelazni metali potrebni su svim živim organizmima jer su uključeni u mnoge biološke procese važne za preživljavanje. Ovi metali nalaze se u mnogim metaloproteinima, metaloenzimima, transkripcijskim faktorima i proteinima za skladištenje (Hood i Skaar, 2012). Ioni željeza, cinka i mangana posebno su važni zbog svoje uloge kofaktora u velikom broju enzima. Poznato je da kralježnjaci kao odgovor na infekciju smanjuju dostupnost tih metala patogenu što značajno usporava njegov rast (Zondervan i sur. 2018). Ovakvo limitiranje metalnih iona patogenu naziva se nutritivni imunitet. Međutim, bakterije prevladavaju ograničenost metalnih iona tako što sintetiziraju molekule koje vežu i unose te metale, time kompetirajući za metalne ione s domaćinom. Najbolje proučeni

primjer nutritivnog imuniteta je slučaj smanjenja dostupnosti iona željeza. U slučaju deficita željeza, bakterije sintetiziraju siderofore, male organske molekule (većinski < 1 kDa) koje vežu i prenose Fe^{3+} ione (Miethke i Marahiel, 2007). Patogenu se reducira dostupnost i drugih prijelaznih metala osim željeza, ponajviše cinka i mangana. Proteini porodice S100 imaju važnu ulogu u ograničavanju dostupnosti iona cinka i mangana kao obrani od intracelularnih patogena. Deplecija mangana jako je efikasna obrana od patogena poput bakterije *Borrelia burgdorferi*, koja sadrži ione mangana umjesto iona željeza u svojim metaloproteinima (Kehl-Fie i Skaar, 2010). Osim ograničavanja metalnih iona patogenu, domaćin može iskoristiti toksičnost pojedinih metala kao obranu od infekcije. Ioni bakra i/ili cinka su često korišteni od strane domaćina za intoksikaciju te ubijanje patogena (Djoko i sur. 2015).

Iako potrebni, metalni ioni mogu u suvišku biti štetni organizmu. Primjerice, suvišak slobodnih Fe^{2+} iona ulazi u Fentonovu reakciju čiji su produkt toksični kisikovi radikali (Pignatello i sur. 2006). Suvišak unutarstaničnih Mn^{2+} iona smanjuje vijabilnost bakterije *M. tuberculosis* (Pandey i sur. 2015). Prekomjerna unutarstanična koncentracija nekog metalnog iona može uzrokovati da se taj ion veže na vezno mjesto drugog metalnog iona u nekom enzimu. Primjerice, prilikom visoke koncentracije mangana u bakteriji *Bacillus subtilis* moguća je ugradnja mangana umjesto željeza u protein Fur (regulator željeza) (Chandrangsu i sur. 2017). Ugradnja nepripadajućeg metalnog iona u vezno mjesto enzima može rezultirati njegovom inaktivacijom i gubitkom funkcije. Iz navedenih je razloga održavanje homeostaze metalnih iona izrazito bitno za normalno funkcioniranje i preživljavanje organizma.

1.2.2. Manganovi ioni u bakteriji *M. tuberculosis*

Mangan je ključan nutrijent za bakterijski rast zbog svoje funkcije kofaktora u nizu proteina bitnih za staničnu diobu, obranu od oksidativnog stresa te sintezu i popravak DNA. Zato je za *M. tuberculosis* nužan unos mangana tijekom infekcije kako bi bakterija uspješno preživjela u domaćinu (Juttukonda i Skaar, 2015). Ion Mn^{2+} sadrži nesparene d^5 elektrone te nema snažne preferencije za određenu koordinacijsku geometriju. Nadalje, Mn^{2+} slabo kompetira s drugim metalnim ionima za vezno mjesto u proteinima te su njegove unutarstanične koncentracije često niske naspram drugih metalnih iona. Specifičnost vezanja iona mangana u biološkim molekulama se stoga ne može ostvariti na temelju jačine vezanja niti na temelju koordinacijske sfere (McGuire i sur. 2013). Što se tiče unosa i vezanja metalnih iona u bakteriji *M. tuberculosis*, najviše su proučeni sustavi homeostaze željeza te se ne zna puno o sustavima unosa ostalih metalnih iona u bakteriju *M. tuberculosis* (Pandey i sur. 2015). Kao što je slučaj i kod ostalih iona prijelaznih metala, manganovi su ioni toksični pri visokim koncentracijama. U slučaju visoke koncentracije unutarstaničnih manganovih iona, mangan se može vezati na vezna mjesta željeza u nekim metaloproteinima inhibirajući ili oslabljujući njihovu funkciju.

Kontrola unosa i iznosa mangana u stanicu te kontrola koncentracije manganovih iona izuzetno je važna za pravilno funkcioniranje bakterije *M. tuberculosis*.

1.3. Transkripcijski faktor MntR

1.3.1. Porodica proteina DtxR

Kontrolu biodostupnosti prijelaznih metala u bakterijskoj citoplazmi kontroliraju proteini kolektivno nazvani metaloregulatorni proteini ili metalosenzori. Oni funkcioniraju na način da vežu i tvore koordinacijske veze s jednim ili više specifičnih metalnih iona. Koordinacija metala alosterički aktivira ili inhibira vezanje metaloregulatornog proteina za specifičnu sekvencu na molekuli DNA (Capdevila i sur. 2017). Ta DNA sekvenca je često promotor za gene povezane s unosom ili iznosom metalnih iona iz stanice: transporteri metalnih iona, metalošaperoni i proteini za skladištenje.

Proteini porodice DtxR su metaloregulatorni proteini kod kojih općenito vrijedi da vezanje metalnih iona rezultira represijom ekspresije gena povezanih s unosom metalnih iona (Capdevila i sur. 2017). Dakle, proteini porodice DtxR vežu metalne ione što rezultira promjenom afiniteta proteina za molekulu DNA. U aktivnom su obliku homodimeri i na molekulu DNA vežu se N-terminalnom domenom. Porodica je dobila ime po represoru iz bakterije *Corynebacterium diphtheriae* ovisnom o željezu nazvanom DtxR (engl. *Diphtheria Toxin Repressor*) (Boyd i sur. 1990). Porodici proteina DtxR pripadaju proteini kao SloR (Spatafora i sur. 2015) iz bakterije *Streptococcus mutants* i ScaR (Stoll i sur. 2009) iz bakterije *Streptococcus gordonii*. Istraživanja proteina porodice DtxR usmjerena su na njihove strukturne specifičnosti vezanja metalnih iona i DNA (Merchant i sur. 2014). Nije ustanovljen točni mehanizam aktivacije proteina metalnim ionima, ali je općenito prihvaćeno da vezanje metalnog iona uzrokuje reorijetnaciju α -zavojnica N-terminalne domene i alosterički aktiviraju protein za vezanje na DNA (Capdevila i sur. 2017). Poznata su dva predstavnika porodice proteina DtxR u bakteriji *M. tuberculosis*: MntR (engl. *Manganese Transport Regulator*) i IdeR (engl. *Iron Dependent Repressor*). Protein IdeR je homolog proteina MntR i važan je za homeostazu željeza (Pandey i Rodriguez 2014, Cong i sur. 2018, Liu i sur. 2008). Protein MntR detaljnije je opisan u sljedećim poglavljima.

1.3.2. Funkcija

U bakteriji *M. tuberculosis* postoje različiti mehanizmi regulacije homeostaze metalnih iona (Neyrolles i sur. 2015). Proteini MntH i MntABCD glavni su transporteri Mn^{2+} iona u bakteriji *M. tuberculosis*. Homolozi ovih proteina prisutni su i puno su bolje istraženi u bakteriji *B. subtilis* gdje je MntABCD ATP-ovisan transporter, a MntH je simporter manganovih iona s protonima (Helmann,

2014). Dok mutant $\Delta mntABCD$ ima manje razoran utjecaj na vijabilnost *M. tuberculosis* u uvjetima deplecije manganovih iona nego mutant $\Delta mntH$, tek je dvostruki mutant ovih gena nevijabilan u uvjetima niske koncentracije manganovih iona (Pandey i sur. 2015). Međutim, oba gena regulirana su zajedničkim transkripcijskim faktorom, MntR (prije zvan SirR). Njegova aktivnost ovisi o dostupnosti intracelularnih Mn^{2+} iona: prvi visokoj koncentraciji slobodnih Mn^{2+} iona, MntR veže ione mangana te postaje aktivni transkripcijski represor i inhibira transkripciju gena, a pri niskoj koncentraciji, on ne veže ione mangana niti inhibira transkripciju (Pandey i sur. 2015). Afinitet proteina MntR za DNA je alosterički reguliran vezanjem manganovih iona. Molekularni mehanizam kojim mangan aktivira MntR za vezanje na DNA nije u potpunosti razjašnjen. U uvjetima visoke koncentracije Mn^{2+} iona, mutanti bakterije *M. tuberculosis* koji nisu imali protein MntR, pokazali su smanjenu aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) zbog čega je bakterija pokazivala veću osjetljivost na superokside. Mogući uzrok tome jest ugradnja Mn^{2+} iona umjesto Fe^{2+} iona u vezno mjesto superoksid dismutaze (Pandey i sur. 2015). Iz toga se zaključuje da je u uvjetima visoke koncentracije Mn^{2+} iona, protein MntR potreban za normalnu aktivnost superoksid dismutaze. Slijedi da je MntR ključan protein za preživljavanje tijekom uvjeta visoke koncentracije manganovih iona, stoga on predstavlja moguću metu antibiotika i lijekova. Suprotno tome, trajna aktivacija proteina MntR imati će učinak inhibicije unosa manganovih iona u *M. tuberculosis* uzrokujući depleciju manganom te staničnu smrt.

1.3.3. Struktura

Kristalna struktura proteina MntR iz *M. tuberculosis* objavljena je 2018. godine (Cong i sur. 2018). Dobivene su kristalne strukture apo (bez vezanog iona mangana) i holo (s vezanim ionom mangana) MntR proteina. Kristalne strukture pokazale su da je MntR bakterije *M. tuberculosis* homodimerni protein. Monomer MntR sveukupno sadrži 228 aminokiselina i sastoji se od tri domene: N-terminalne DNA-vezujuće HTH domene (engl. *Helix-Turn-Helix*), srednje dimerizacijske domene i C-terminalne FeoA domene (slika 1). Dimerizacijsku i FeoA domenu povezuje dugi lanac aminokiselina (engl. *linker loop*) od 129. do 151. aminokiseline. Za razliku od svojih homologa, MntR iz bakterije *M. tuberculosis* sadrži 12 N-terminalnih aminokiselina (slika 1). Ovakav N-terminalni lanac je specifičan za *M. tuberculosis* MntR jer niti jedan od homologa nema tako veliki početni N-terminalni lanac. Međutim, tih prvih 12 N-terminalnih aminokiselina predstavljalo je problem pri kristalizaciji, stoga je u svrhu kristalizacije eksprimiran skraćeni protein (12-228 aminokiselina) (Cong i sur. 2018). Iz tog razloga, struktura N-terminalnog lanca nije poznata. Uloga tih 12 N-terminalnih aminokiselina proteina MntR u bakteriji *M. tuberculosis* nije poznata (Cong i sur. 2018). Međutim, za neke od članova porodice proteina DtxR postoje pretpostavke o ulozi početnih N-terminalnih aminokiselina. Protein IdeR iz bakterije *M. tuberculosis* sadrži pet nestrukturnih N-terminalnih aminokiselina (Pohl i sur. 1999). Iz kristalnih struktura proteina IdeR može se pretpostaviti kako te

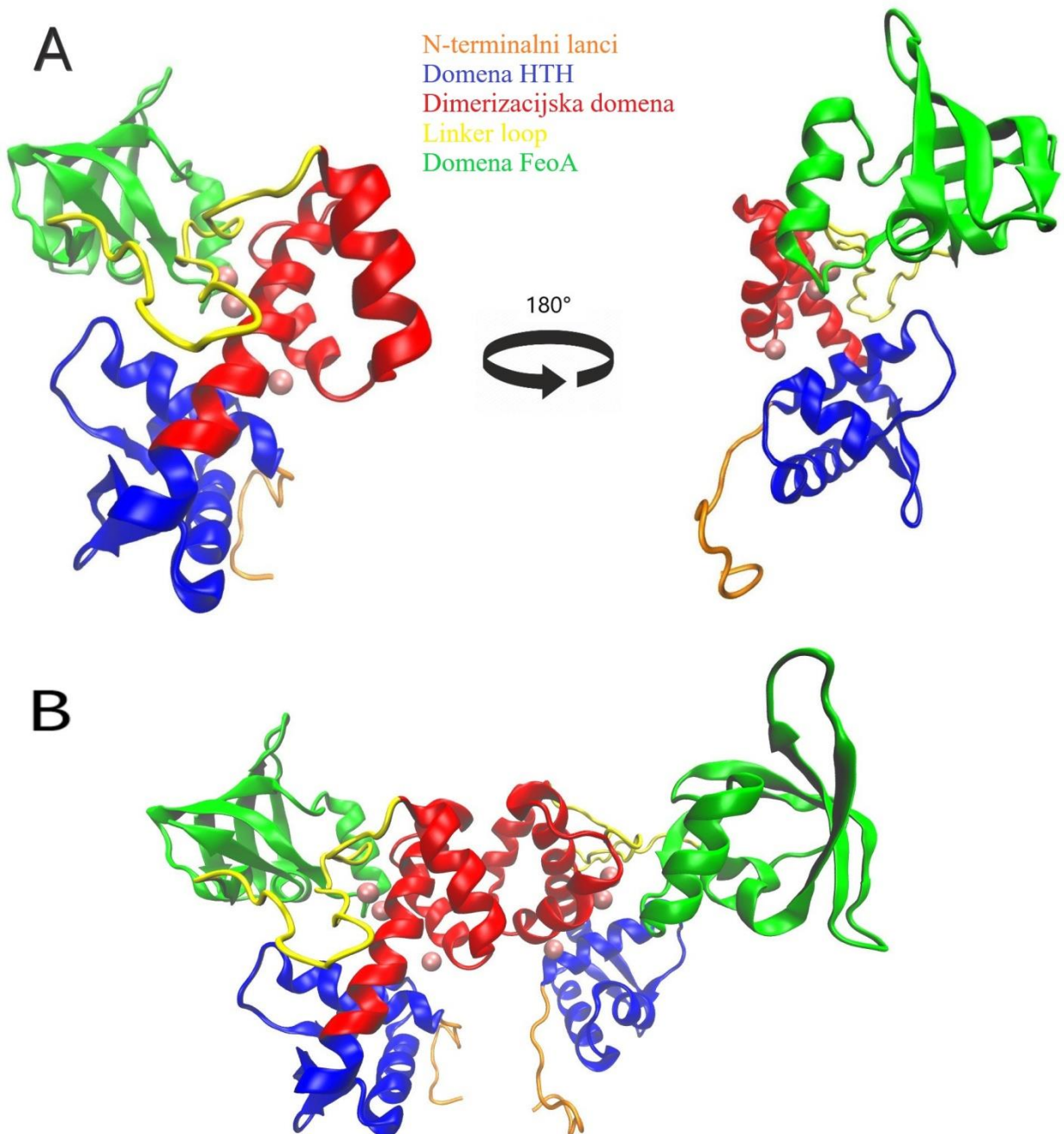
početne N-terminalne aminokiseline imaju ulogu u interakciji s DNA (Wisedchaisri i sur. 2004), a simulacije molekulske dinamike impliciraju da je interakcija ovih aminokiselina među dvjema podjedinicama dimera nužna za vezanje proteina na DNA (Ghosh i sur. 2015).

N-terminalna domena proteina MntR iz *M. tuberculosis* sadrži motiv HTH i neophodna je pri vezanju proteina na molekulu DNA. Pretpostavlja se da vezanje metalnih iona u proteinima porodice DtxR uzrokuje alosteričku promjenu koja rezultira strukturnom promjenom u domeni HTH (Capdevila i sur. 2017), iako točan mehanizam ove aktivacije nije poznat. Nadalje, usporedba kristalne strukture apo i holo forme *M. tuberculosis* MntR proteina otkriva kako holo forma ima rotirane monomere duž osi paralelne s dimerizacijskom domenom (Cong i sur. 2018). Posljedica ove rotacije je da su domene HTH između monomerima međusobno bliže u holo strukturi uspoređujući s apo strukturom. Približene domene HTH holo strukture mogu imati utjecaj da se protein lakše veže na DNA.

Uloga dimerizacijske domene je povezivanje dvaju monomera MntR proteina. Ona pretežito sadrži hidrofobne aminokiseline koje stvaraju jake hidrofobne interakcije među monomerima (Cong i sur. 2018). Neki proteini porodice DtxR su dimeri u otopini, dok su neki monomeri kod kojih do dimerizacije dolazi tek nakon vezanja metalnih iona. Primjerice, protein DtxR je monomer koji se dimerizira i aktivira vezanjem željeza (Twigg i sur. 2001). Međutim, drugi proteini porodice DtxR kao MntR iz bakterije *B. subtilis* većinski su u dimernom obliku te je jako malo monomernog oblika u otopini neovisno o vezanju metalnih iona (Leiser i sur. 2003). Drugi primjer je MntR iz bakterije *Bacillus halodurans* koji također funkcionira kao dimer u otopini (Lee i sur. 2019). Razlog zašto DtxR formira stabilne monomere u otopini je što sadrži lanac bogat prolinima koji povezuje njegovu dimerizacijsku i FeoA domenu. Interakcije domene FeoA i lanca bogatim prolinima ključne su u stabilizacij monomera u otopini (Do i sur. 2019, Wylie i sur. 2005). Većina proteina porodice DtxR nema takav lanac bogat prolinima, stoga nisu stabilni monomeri u otopini (osim proteina IdeR). U takve proteine spada i MntR iz *M. tuberculosis*.

C-terminalna FeoA domena nije prisutna u svim proteinima porodice DtxR. Primjerice, odsutna je u proteinima MntR iz bakterije *B. subtilis* (Helmann, 2014) i MntR iz bakterije *B. halodurans* (Lee i sur. 2019). Funkcija domene FeoA proteina MntR bakterije *M. tuberculosis* nije poznata (Cong i sur. 2018). Međutim, pokazano je da domena FeoA proteina MtsR iz bakterije *Streptococcus pyogenes* ima bitnu ulogu (Do i sur. 2019). MtsR iz *S. pyogenes* pripada porodici DtxR proteina i aktivnost mu ovisi o Mn^{2+} , isto kao i MntR iz *M. tuberculosis*. Domena FeoA proteina MtsR je neophodna pri multimerizaciji njegovih dimera na molekuli DNA. Dimeri proteina MtsR stvaraju interakcije s drugim dimerima MtsR pomoću domene FeoA formirajući oligomere i multimerne. Ovakva multimerizacija ovisna o domeni FeoA je neophodna za regulatornu ulogu proteina MtsR (Do i sur. 2019). Protein MtsR stvara oligomere i multimerne na promotorskim sekvencama čime regulira gensku ekspresiju. Moguće je da je ovakva oligomerizacija na specifičnom promotoru pomoću

domene FeoA uobičajen regulatorni mehanizam u proteinima porodice DtxR kojima je aktivnost ovisna o ionima mangana (Do i sur. 2019). Stoga je moguće da je uloga domene FeoA proteina MntR iz *M. tuberculosis* upravo u stvaranju multimera proteina MntR na promotoru čime se regulira ekspresija gena za unos manganovih iona.

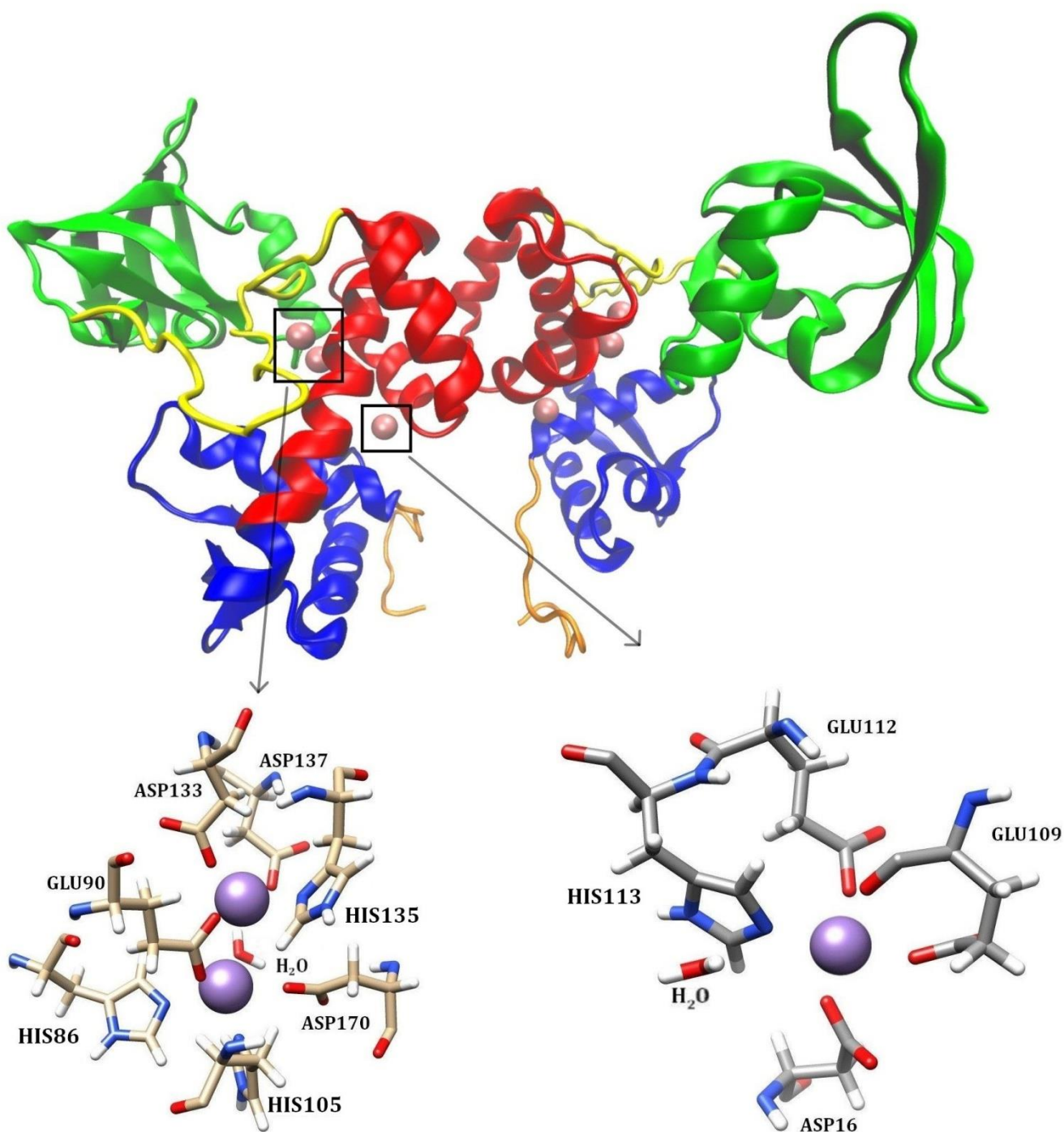


Slika 1. Struktura proteina MntR iz *M. tuberculosis*. Prikazane strukture su kristalne strukture upotpunjene korištenjem programa SWISS-MODEL i programa MODELLER. A) Struktura monomera: narančasto – N-terminalne aminokiseline koje su dio domene HTH (nadodane programom

MODELLER), plavo – domena HTH (domena koja veže DNA), crveno – dimerizacijska domena, žuto – lanac aminokiselina koje povezuje dimerizacijsku i FeoA domenu (engl. *Linker loop*), zeleno – domena FeoA. Ioni mangana označeni su ružičastim kuglicama. B) Struktura dimera – oznake domena iste kao i u slici monomera.

MntR iz bakterije *M. tuberculosis* veže tri manganova iona po podjedinici (slika 2). Vežanjem iona mangana, MntR mijenja afinitet za DNA te postaje aktivni represor i inhibira ekspresiju gena za unos Mn^{2+} iona (Pandey i sur. 2015). U kristalnoj strukturi vidljiva su dva mjesta vezanja manganovih iona po monomeru - jedno mononuklearno i drugo binuklearno vezno mjesto (Cong i sur. 2018). Jedno mjesto vezanja iona mangana pozicionirano je blizu HTH i početka dimerizacijske domene (slika 2). To mjesto sadrži jedan ion mangana koordiniran aminokiselinskim ograncima Asp16, Glu109, Glu112 i His113 te karbonilnom skupinom Glu109 i jednom molekulom vode (slika 2) tvoreći oktaedarsku koordinacijsku geometriju. Međutim, bitno je napomenuti da molekula vode koja koordinira ovaj ion mangana nije prisutna u izvornoj PDB strukturi, iako je u radu u kojem je objavljena kristalna struktura spomenuto da ta molekula vode koordinira Mn^{2+} ion (Cung i sur. 2018). Drugo mjesto vezanja iona mangana sadrži binuklearni metalni centar smješten između HTH, dimerizacijske i FeoA domene (slika 2). Jedan manganov ion koordiniran je aminokiselinskim ograncima His86, Glu90, His105 i Asp170 te molekulom vode, a drugi manganov ion koordiniran je aminokiselinskim ograncima Glu90, Asp133, His135 i Asp137 (slika 2). Udaljenost između iona mangana u binuklearnom centru iznosi oko 3,08 Å (Cong i sur. 2018).

RMSD (engl. *Root-Mean-Square Deviation*), mjera sličnosti dviju struktura temeljena na poravnanju ekvivalentnih aminokiselina, između apo i holo strukture iznosi 0,96 Å, implicirajući da u proteinu MntR ne dolazi do velike promjene prilikom vezanja manganovih iona (Cong i sur. 2018). Jedno od mogućih objašnjenja ovako malene razlike u RMSD je to da je alosterička promjena koju uzrokuje vezanje iona mangana, a čija je posljedica povećan afinitet za DNA, vrlo malena. Drugo objašnjenje je da se obje kristalne strukture – i holo i apo – nalaze u sličnoj konformaciji zbog efekta kristalnog pakiranja. Samo statička i uprosječena kristalna struktura proteina nije dovoljna kako bi se detaljnije razumjela dinamička svojstva proteina i konformacijske promjene koje nastupaju prilikom vezanja iona mangana. Promjene do kojih dolazi uslijed vezanja Mn^{2+} iona potrebno je proučiti metodom koja može dati uvide u dinamiku proteina MntR. U sklopu ovog diplomskog rada u tu svrhu upotrijebljene su simulacije molekulske dinamike.



Slika 2. Koordinacija iona mangana u proteinu MntR iz *M. tuberculosis*. MntR sadrži dva mjesta vezanja iona mangana od kojih je jedan mononuklearni metalni centar, a drugi binuklearni. U binuklearnom centru, jedan iona mangana koordiniran je s aminokiselinskim ograncima: Glu90, Asp133, His135, Asp137, a drugi aminokiselinskim ograncima His86, Glu90, His105, Asp170 te molekulom vode. Ion mangana u mononuklearnom centru koordiniraju aminokiselinski ogranci Asp16, Glu109, Glu112, His113 te karbonilna skupina Glu109 i molekula vode.

1.4. Simulacije molekulske dinamike

1.4.1. Određivanje strukture proteina kristalografijom i NMR spektroskopijom

Strukture proteina većinski su pohranjene u javno dostupnoj bazi podataka zvanj PDB (engl. *Protein Data Bank*) (Sussman i sur. 1998, Berman i sur. 2007). Baza PDB sadrži strukture proteina riješene kristalografijom, NMR (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*), elektronskom mikroskopijom ili kombinacijom više metoda. Strukture proteina pohranjene su u PDB formatu koji sadrži: redni broj atoma, tip atoma, vrsta aminokiseline, proteinski lanac, broj aminokiseline u proteinu, xyz kartezijske koordinate atoma, B faktor i okupanciju (slika 3) (engl. *Occupancy*) (Westbrook i Fitzgerald 2003).

ATOM	1	N	HIS	A	1	49.668	24.248	10.436	1.00	25.00	N
ATOM	2	CA	HIS	A	1	50.197	25.578	10.784	1.00	16.00	C
ATOM	3	C	HIS	A	1	49.169	26.701	10.917	1.00	16.00	C
ATOM	4	O	HIS	A	1	48.241	26.524	11.749	1.00	16.00	O
ATOM	5	CB	HIS	A	1	51.312	26.048	9.843	1.00	16.00	C
ATOM	6	CG	HIS	A	1	50.958	26.068	8.340	1.00	16.00	C
ATOM	7	ND1	HIS	A	1	49.636	26.144	7.860	1.00	16.00	N
ATOM	8	CD2	HIS	A	1	51.797	26.043	7.286	1.00	16.00	C
ATOM	9	CE1	HIS	A	1	49.691	26.152	6.454	1.00	17.00	C
ATOM	10	NE2	HIS	A	1	51.046	26.090	6.098	1.00	17.00	N
ATOM	11	N	SER	A	2	49.788	27.850	10.784	1.00	16.00	N
ATOM	12	CA	SER	A	2	49.138	29.147	10.620	1.00	15.00	C
ATOM	13	C	SER	A	2	47.713	29.006	10.110	1.00	15.00	C
ATOM	14	O	SER	A	2	46.740	29.251	10.864	1.00	15.00	O
ATOM	15	CB	SER	A	2	49.875	29.930	9.569	1.00	16.00	C
ATOM	16	OG	SER	A	2	49.145	31.057	9.176	1.00	19.00	O
ATOM	17	N	GLN	A	3	47.620	28.367	8.973	1.00	15.00	N
ATOM	18	CA	GLN	A	3	46.287	28.193	8.308	1.00	14.00	C
ATOM	19	C	GLN	A	3	45.406	27.172	8.963	1.00	14.00	C

Slika 3. Izgled PDB formata. Prvi stupac – oznaka atoma, drugi stupac – redni broj atoma, treći stupac – tip atoma, četvrti stupac – vrsta aminokiseline, peti stupac – oznaka proteinskog lanca, šesti stupac – redni broj aminokiseline, sedmi, osmi i deveti stupac – xyz koordinate atoma, deseti stupac – B faktor, jedanaesti stupac – okupancija i dvanaesti stupac – simbol kemijskog elementa. Preuzeto s web stranice: <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/UsersGuide/tutorials/pdbintro.html> (pristupljeno 10.12.2021.).

Najviše proteinskih struktura baze podataka PDB dobiveno je kristalografijom. Kristalografija je metoda bazirana na odbijanju X-zraka od elektronskog oblaka atoma molekule kojoj se pokušava odrediti struktura. Makromolekulski uzorak mora biti kristaliziran jer peridična struktura kristala rezultira pojačanim odbijanjem X-zraka koja pojačava signal i pospješuje određivanje strukture (Wlodawer i sur. 2008). U kristalu proteina, slični strukturni motivi svake jedinične ćelije ponavljaju se po cijelom volumenu. Na temelju difrakcije X-zraka može se odrediti izgled mape elektronske gustoće u nekom proteinu. Mape elektronske gustoće su primarni rezultat kristalografije, a na temelju

tih mapa određuju se koordinate atoma u proteinu (Wlodawer i sur. 2008). Jedan od nedostataka proteinske kristalografije je što predstavlja strukturu proteina u kristalu, a ne strukturu proteina u otopini koja je biološki relevantnija. Nadalje, za fleksibilnije dijelove proteina često nije moguće odrediti kristalnu strukturu, te su za te dijelove podaci nedostupni. Strukture proteina dobivene kristalografijom predstavljaju statičku sliku proteina. Iz tog se razloga ne može kristalografijom promatrati dinamika proteina. Također, atomi vodika se ne nalaze u izvornoj PDB datoteci jer se ne mogu detektirati kristalografijom.

Osim kristalografije, za određivanje strukture proteina jako je bitna NMR spektroskopija. Prednosti NMR spektroskopije su što proteini ne moraju biti kristalizirani te im se struktura određuje u otopini (Guerry i Herrmann, 2011). Za razliku od kristalografije, NMR spektroskopijom može se proučavati dinamika proteina. NMR spektroskopija je korisna i u proučavanju smatanja (engl. *fold*ing) proteina (Kay, 2004). Standardni pristup određivanja strukture NMR se može podijeliti u dva koraka. U prvom koraku se identificiraju kemijski pomaci NMR aktivnih jezgara u proteinu u odnosu na primarnu sekvencu proteina – na taj se način primarna sekvenca proteina izrazi kao set NMR parametara. U drugom koraku se modelira struktura proteina na temelju evaluacije velikog broja međuprotonskih kontakata (Guerry i Herrmann, 2011). Nedostaci NMR spektroskopije kao metode za određivanje strukture proteina je što je puno kompleksnija u usporedbi s kristalografijom. Nadalje, određivanje strukture NMR spektroskopijom je sporo i limitirano na kraće polipeptidne lance (Guerry i Herrmann, 2011).

1.4.2. Osnove molekulske dinamike

Računalne metode, kao što je molekulska dinamika (engl. *Molecular Dynamics*, MD), postaju sve više korištene i raširene u istraživanjima 21. stoljeća. Simulacije molekulske dinamike omogućavaju promatranje velikog broja konformacijskih promjena proteina koje ne mogu biti otkrivene samo kristalnom strukturom proteina iz razloga što kristalne strukture predstavljaju statičku sliku proteina koja je uprosječena preko brojnih suptilnih konformacijskih promjena (Liu i sur. 2020). Nadalje, simulacije molekulske dinamike omogućuju promatranje kretanja pojedinog atoma kao funkciju vremena i zato mogu poslužiti u pronalasku odgovora na neko specifično pitanje o dinamičkim svojstvima modeliranog sustava (Karplus i McCammon, 2002). Iz tog razloga, molekulska dinamika postaje važna metoda za proučavanje dinamike proteina. Računalne metode mogu se podijeliti na empirijske i kvantno-mehaničke. U MD simulacijama koje koriste empirijske metode, elektroni nisu definirani eksplicitno, već je njihov efekt modeliran implicitno. Zbog toga se u tim simulacijama ne može modelirati pucanje ili nastajanje kovalentne veze (Hollingsworth i Dror 2018). Međutim, koristeći kvantno-mehaničke metode elektroni se modeliraju eksplicitno, stoga omogućavaju modeliranje pucanja ili nastanka kovalentnih veza. Empirijske su metode bazirane na

klasičnoj mehanici te potencijalnu energiju sustava računaju koristeći polje sila (engl. *Force Field*). Kvatno-mehaničke metode računanju potencijalnu energiju sustava pomoću Schrödingerove jednačbe.

1.4.3. Polje sila i parametrizacija

Osnovna ideja računalnih simulacija temeljenih na empirijskim metodama jest propagacija nekog sustava u vremenu na temelju jednačbi klasične mehanike. Korištenjem Newtonovih zakona gibanja, mogu se predvidjeti koordinate svih atoma kao funkcija vremena. Za svaki vremenski korak, računa se sila vršena na svaki atom te se izračunata sila koristi za ažuriranje nove pozicije i brzine pojedinog atoma (Hollingsworth i Dror 2018). Najčešće se koristi vremenski korak u trajanju 1 fs. U MD simulaciji baziranoj na empirijskim metodama, potencijalna energija molekule računa se pomoću polja sila na temelju trenutne konformacije molekule. Pri računanju potencijalne energije sustava, polje sila uzima u obzir one izraze koji predstavljaju kovalentne interakcije među atomima (istezanje veze, savijanje valentnog kuta, promijene torzijskog kuta) i nekovalentne interakcije među atomima različitih molekula ili među atomima iste molekule odvojenih s više od dvije ili tri kovalentne veze (Van Gasteren i sur. 2006). Polje sila je naziv za funkcional i set parametara koji su potrebni za računanje potencijalne energije molekule. Funkcional se sastoji funkcija energetskih doprinosa prikazane jednačbom (1) čija suma daje potencijalnu energiju sustava.

$$E = E_{stretch} + E_{bend} + E_{torz} + E_{vdw} + E_{el} + E_{oop} + \sum E_{cross} \quad (1)$$

$$E_{stretch} = \frac{k_s}{2} (l - l_0)^2 \quad (2)$$

$$E_{bend} = \frac{k_b}{2} (\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

$$E_{tors} = \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] \quad (4)$$

$$E_{vdw} = \frac{A}{r^{12}} - \frac{C}{r^6} \quad (5)$$

$$E_{el} = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon r_{12}} \quad (6)$$

$$E_{oop} = \frac{1}{2} k_\xi \xi^2 \quad (7)$$

Prvi energetski doprinos u jednačbi (1) predstavlja odstupanje od optimalne duljine veze, tj. potencijalnu energiju koja se javlja zbog tog odstupanja. To odstupanje računa se prema jednačbi (2), gdje k_s predstavlja konstantu istežanja veze, l je duljina veze, a l_0 optimalna duljina veze nekog

atomskeg para. Drugi član polja sila (1) predstavlja odstupanje od optimalnog valentnog kuta – potencijalna energija koja se javlja zbog tog odstupanja. Odstupanje od optimalnog valentnog kuta se računa prema jednadžbi (3) – k_b je parametar koji predstavlja konstantu sile promjene kuta, θ je valentni kut, a θ_0 je optimalni valentni kut. Treći doprinos potencijalnoj energiji u funkcionalu dolazi zbog promjene torzijskog kuta. Energija koja se javlja kao posljedica promjene torzijskog kuta računa se pomoću jednadžbe (4), gdje V_n predstavlja rotacijsku barijeru, n njen multiplicitet, φ torzijski kut, a γ fazni pomak. Četvrti i peti doprinosi potencijalnoj energiji dolaze zbog nekovalentnih interakcija: elektrostatskih i van der Waalsovih interakcija. Nevalentne interakcije se računaju za atome odvojene s više kovalentnih interakcija. Doprinos van der Waalsovih interakcija računa se jednadžbom (5) u kojoj su A i C empirijski parametri, a r udaljenosti među atomima. Doprinos elektrostatskih interakcija računa se jednadžbom (6) – q_1 i q_2 predstavljaju parcijalne atomske naboje, a r_{12} udaljenost tih atoma te ϵ dieletričnu konstantu medija. Predzadnji član jednadžbe polja sila (1) reprezentira potencijalnu energiju koja se javlja u slučaju odstupanja atoma iz ravnine u planarnim sustava. To odstupanje računa se prema jednadžbi (7): k_ζ je empirijski parametar i ζ je kut odstupanja iz ravnine. Međutim, ne mogu se neovisno promatrati različiti doprinosi potencijalnoj energiji, stoga je često potreban posljednji član jednadžbe (1) (zvan miješani član).

Važan element polja sila su parametri od kojih se ono sastoji. Zbog parametara, polje sila može modelirati konformacijske promjene i energije nekovalentnih interakcija (Wang i sur, 2004). Nadalje, parametri moraju biti prenosivi, tj. parametri nisu optimizirani za samo jedan molekularni sustav, nego mogu služiti za njemu slične molekularne sustave. Parametri polja sila dobivaju se kvantno-mehaničkim izračunima, eksperimentalno i ugađanjem. Geometrijski parametri za kovalentne članove funkcionala polja sila dobiveni su iz kristalnih struktura malih molekula i vibracijske konstante sile dobivene su iz spektroskopskih podataka malih molekula u plinovitoj vazi (Van Gunsteren i sur. 2006). Parametri za nekovalentne interakcije dobivaju se ugađanjem tako da MD simulacije mogu predvidjeti rezultate eksperimenata: temperatura isparavanja, gustoća tekućine i slobodne (Gibbsove) energije solvatacije malih molekula. Nakon parametrizacije i kalibracije polja sila, ono se testira uporabom na biomolekulskim sustavima (proteini, nukleinske kiseline ili ugljikohidrati) u vodenoj otopini. Rade se usporedbe simulacija molekularne dinamike i dostupnih eksperimentalnih podataka. Na ovaj se način može provjeriti ispravnost nekog polja sila istraživanjem molekularnih svojstava koja su osjetljiva na specifične parametre i simulacijske uvjete (Van Gunsteren i sur. 2006).

1.4.4. Priprema sustava i pokretanje simulacija molekularne dinamike

Korištenjem molekularne dinamike predviđa se kako će se svaki atom u proteinu (ili drugom molekularnom sustavu) kretati u vremenu na temelju fizikalnog modela koji opisuje međuatomske

interakcije. Simulacije molekulske dinamike pružaju važne prednosti: pokazuju kretanje i poziciju svakog atoma u sustavu kroz vrijeme (što je teško bilo kojom eksperimentalnom tehnikom) te omogućuju precizno kontroliranje uvjeta u simulaciji (primjerice, temperatura i pH) (Hollingsworth i Dror 2018).

Prije pokretanja simulacije molekulske dinamike, molekulski sustav mora biti pripremljen tako da se nadodaju nedostajući atomi (uključujući atome vodika koji nisu prisutni u kristalnom strukturama proteina). Potrebno je nadodati nedostajuće atome vodika kako bi struktura proteina za MD simulaciju bila potpuna i valjana. Postoje razni programi koji dodaju atome vodika kristalnim strukturama (protonacija) te se pozicije dodanih atoma vodika među njima mogu razlikovati. Vrlo je bitno kako određeni programi tretiraju rotamere i protonacijska stanja određenih aminokiselina kao što je aminokiselina histidin. Imidazolni prsten aminokiseline histidin može biti protoniran na tri različita načina: protoniran δ -dušik (HID), protoniran ϵ -dušik (HIE) te protonirani δ -dušik i ϵ -dušik (HIP). Ponašanje proteina tijekom simulacije molekulske dinamike može značajno ovisiti o protonaciji histidina (Kim i sur. 2013). Nadalje, za simulacije molekulske dinamike potrebno je odabrati i dodati molekule otapala. Molekule otapala mogu se modelirati implicitno ili eksplicitno. Implicitni model otapala ne tretira otapalo kao diskretne molekule, nego ih zamjenjuje kontinuuom s dielektričnim i hidrofobnim/hidrofilnim svojstvima (Onufriev, 2008). Eksplicitni model otapala sadrži molekule otapala eksplicitno prisutne u simulacijama molekulske dinamike, no takve molekule često nemaju dopuštene sve stupnjeve slobode gibanja u svrhu štednje računalnog vremena. Eksplicitni model, iako računalno zahtjevniji, predstavlja vjerodostojniji model u odnosu na implicitni model. Međutim, prilikom korištenja eksplicitnog modela otapala potrebno je riješiti problem rubnih uvjeta – gubitak molekula vode s ruba sustava tijekom MD simulacije. Izabiru se oblik i dimenzije središnjeg poliedra otapala te se taj poliedar kopira tako da bude okružen svojom replikama čime se dobiva zatvoren sustav i rješava se problem rubnih uvjeta. Ovaj način rješavanja problema rubnih uvjeta naziva se tehnika periodičnih rubnih uvjeta.

Nakon pripreme sustava za simulacije molekulske dinamike, često se pokreće nekoliko ciklusa minimizacije energije (optimizacije geometrije). Tijekom tih se ciklusa ne mijenjaju značajno konformacije molekula, nego se optimizira njihova geometrija tako da se sustav spušta u najbliži lokalni minimum na plohi potencijalne energije. Nakon minimizacije energije, provode se i simulacije uravnoteženja (ekvilibracija) pomoću kojih se sustav stabilizira. Tijekom ekvilibracije prate se parametri poput gustoće, tlaka, temperature i kinetičke energije kako bi se provjerila stabilnost sustava. Nakon simulacije uravnoteženja, dobiva se stabilan sustav i pokreće se simulacija molekulske dinamike koja se često naziva produkcijskom fazom. Tijekom te faze simulira se gibanje svakog atoma u sustavu. Uvođenjem temperature, atomima se pridodaje kinetička energija zbog koje se atomi pomiču od svog trenutnog položaja. Taj pomak uzrokuje promjenu konformacije molekule te se, pomoću polja sila, računa nova potencijalna energija molekule. Korištenjem funkcionala polja sila i

klasične mehanike, računa se položaj svakog atoma sustava u ovisnosti o vremenu. Naime, dobivene simulacije mogu prikazati veliku raznolikost značajnih molekulskih procesa kao što su konformacijske promjene, vezanje liganda i sklapanje proteina te mogu predvidjeti ponašanje molekule u odnosu na perturbacije kao što su mutacije, fosforilacija, protonacija te dodavanje ili otklanjanje liganda (Hollingsworth i Dror 2018). Molekulskom dinamikom može se proučavati dinamika proteina i alosterički mehanizmi koji postaju sve važniji za razumijevanje bioloških procesa (Liu i Nussinov 2016). Razna su istraživanja usmjerena na analizu MD simulacija za pronalaženje alosteričkih puteva u proteinu analizom pK_a (Lang i sur. 2016).

Produkt MD simulacije naziva se trajektorija i ona predstavlja 3D film koji prikazuje konfiguraciju sustava na atomskoj razini u svakoj točki vremenskog intervala. Trajektorije omogućavaju promatranje sustava na mikroskopskoj razini. Zapažanja mikroskopskih svojstava sustava koriste se za interpretaciju i detaljnije razumijevanje makroskopskih svojstava sustava koja su dobivena eksperimentom.

MD simulacije u kombinaciji s eksperimentalnim metodama omogućuju detaljnije istraživanje bioloških molekula i biomolekulskih procesa. Usporedbom simulacija pod različitim uvjetima (primjerice prisustvo liganda, mutacije, različite temperature...) mogu se identificirati učinci tih uvjeta na protein. Napredak u brzini i efikasnosti programa i algoritama korištenih za MD simulacije omogućio je produkciju duljih simulacija na sve većim sustavima. Predviđa se da će u budućnosti MD simulacije nastaviti biti sve brže, preciznije, jeftinije i dostupnije (Hollingsworth i Dror 2018). Iz tog razloga je, računalna metoda molekulska dinamika postala neprocjenjiv alat biokemije, biofizike i molekularne biologije.

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada jest istražiti strukturne razlike te razlike u dinamičkim svojstvima apo i holo strukture proteina MntR iz *M. tuberculosis* koristeći simulacije molekulske dinamike. Potrebno je pronaći i istražiti ključne interakcije za funkciju proteina kao transkripcijskog faktora te analizirati koordinaciju iona mangana u simulacijama. S obzirom na to da se holo struktura veže na DNA, a apo struktura ne, očekuje se da će glavne razlike biti uočene u domeni HTH koja veže DNA. Usporedba simulacija proteina u prisutnosti i odsutnosti iona mangana u veznim mjestima trebala bi omogućiti uočavanje tih razlika.

2. Materijali i metode

2.1. Priprema sustava za simulacije molekulske dinamike

Iz PDB baze (Berman i sur. 2007) preuzeo sam kristalne strukture proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* (identifikator u bazi PDB: 5ZR6) (Cong i sur. 2018) i pripremio sam protein u apo (bez iona mangana u veznom mjestu) i holo (s ionima mangana u veznom mjestu) obliku proteina za simulacije molekulske dinamike (MD). U kristalnoj strukturi *M. tuberculosis* proteina MntR nedostaje prvih 12 N-terminalnih aminokiselina jer su predstavljale problem pri kristalizaciji. Kako bih upotpunio dijelove proteina koji nedostaju u kristalnoj strukturi, koristio sam alat MODELLER u sklopu programa za vizualizaciju Chimera (Yang i sur. 2012, Pettersen i sur. 2004) i mrežno dostupni program SWISS-MODEL za homologno modeliranje (Waterhouse i sur. 2018). Alat MODELLER bio je dovoljan za kompletiranje holo strukture, a za apo strukturu koristio sam i program SWISS-MODEL uz alat MODELLER. U obje strukture, i apo i holo, upotpunio sam jedan od monomera te preklapanjem tog monomera *in silico* izgradio simetrični dimer. Zadržao sam kristalne vode iz izvorne PDB datoteke holo strukture, a kristalne vode apo strukture su uklonjene od strane programa SWISS-MODEL. Koristeći navedene strukture, *in silico* sam konstruirao dva dodatna sustava: holo bez mangana (kompletiranoj holo strukturi uklonio sam sve ione mangana) i apo s manganom (ione mangana iz holo strukture postavio sam u vezna mjesta upotpunjene apo strukture). Time sam dobio četiri sustava za MD simulacije: apo, apo s manganom, holo i holo bez mangana. Iz ta četiri sustava, napravio sam dodatna četiri tako da sam svakom od njih uklonio prvih 13 aminokiselina s N-terminalnog kraja svake podjedinice (tablica 1). Te N-terminalne aminokiseline su specifične za MntR iz *M. tuberculosis*, a usporedba rezultata sa i bez N-terminalnih lanaca trebala bi mi omogućiti uvid u njihovu potencijalnu ulogu. Pripremljeno je ukupno 16 sustava za MD simulacije (tablica 1).

Tablica 1. Sustavi pripremljeni za simulacije molekulske dinamike.

Broj sustava	Struktura ^a	N-terminalni lanci ^b	Protonacija ^c
1	Apo	Sadrži	H++
2	Apo s Mn ²⁺	Sadrži	H++
3	Holo	Sadrži	H++
4	Holo bez Mn ²⁺	Sadrži	H++
5	Apo	Ne sadrži	H++
6	Apo s Mn ²⁺	Ne sadrži	H++
7	Holo	Ne sadrži	H++
8	Holo bez Mn ²⁺	Ne sadrži	H++
9	Apo	Sadrži	MolProbity
10	Apo s Mn ²⁺	Sadrži	MolProbity
11	Holo	Sadrži	MolProbity
12	Holo bez Mn ²⁺	Sadrži	MolProbity
13	Apo	Ne sadrži	MolProbity
14	Apo s Mn ²⁺	Ne sadrži	MolProbity
15	Holo	Ne sadrži	MolProbity
16	Holo bez Mn ²⁺	Ne sadrži	MolProbity

a – Naziv strukture

b – Prisutnost prvih 13 aminokiselina s N-terminalnog kraja

c – Naziv programa korištenog za protonaciju

Koristio sam dva programa za dodavanje atoma vodika: MolProbity (Chen i sur. 2010, Davis i sur. 2007) i H++ (Anandakrishnan i sur. 2012). Unutarstanični pH žive bakterije *Mycobacterium tuberculosis* aktivno se održava na vrijednosti oko 7 (Zhang i sur. 1999), stoga sam protonaciju proveo pri pH=7. MntR iz *M. tuberculosis* sadrži pet histidina u monomeru (His63, His86, His105, His113 i His135) od kojih svaki može biti protoniran na tri različita načina opisana u poglavlju 1.4.4. Dobivene protonacije pojedinačnih histidina ovisno o strukturi, podjedinici i programu korištenim za protonaciju, prikazane su u tablici 2. Protonacija se nije razlikovala u strukturama koje su sadržavale N-terminalne lance od protonacije struktura koje nisu sadržavale N-terminalne lance.

Tablica 2. Protonacijska stanja histidina u pripremljenim sustavima ovisno strukturi, lancu i programu korištenom za protonaciju. Nije bilo razlike u protonaciji struktura s N-terminalnim lancima i onima bez njih stoga su prikazane samo strukture koje su sadržavale N-terminalne lance. Isto tako, nema razlike između monomera iste strukture osim u apo strukturi protoniranoj s programom MolProbity.

		Struktura								
Program		Apo		Apo s Mn ²⁺		Holo		Holo bez Mn ²⁺		
H ⁺⁺	Histidin	Lanac A	Lanac B	Lanac A	Lanac B	Lanac A	Lanac B	Lanac A	Lanac B	
	63	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE
	86	HIP	HIP	HID	HID	HID	HID	HIP	HIP	
	105	HIP	HIP	HIE	HIE	HIE	HIE	HIP	HIP	
	113	HIP	HIP	HIE	HIE	HID	HID	HIP	HIP	
	135	HIP	HIP	HIE	HIE	HIE	HIE	HIP	HIP	
		Apo		Apo s Mn ²⁺		Holo		Holo bez Mn ²⁺		
MolProbity	Histidin	Lanac A	Lanac B	Lanac A	Lanac B	Lanac A	Lanac B	Lanac A	Lanac B	
	63	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	
	86	HIE	HID	HID	HID	HID	HID	HIE	HIE	
	105	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HID	HID	
	113	HIE	HIE	HIE	HIE	HID	HID	HIE	HIE	
	135	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	HIE	

2.2. Simulacije molekulske dinamike

Simulacije molekulske dinamike (MD) proveo sam koristeći programski paket Amber20 (Case i sur. 2020). Upotrebljavajući Amberov alat LEaP, pripremio sam sustave za MD simulacije. Koristio sam gaff (engl. General Amber Force Field) polje sila (Wang i sur. 2004) i polje sila ff14SB za parametrizaciju proteina (Tian i sur. 2019). Mangan je parametriziran koristeći Amberove

parametre za ione (Li i Merz Jr, 2014). Upotrijebio sam nevezne parametre za parametrizaciju koordinacije iona mangana. Kao eksplicitni model otapala koristio sam vodu opisanu TIP3P modelom. Nadalje, sustave sam solvativirao u kubičnoj kutiji dimenzija dovoljno velikih da je između proteina i granice kutije razmak od najmanje 10 Å. Problem rubnih uvjeta riješio sam primjenjujući periodične rubne uvjete. Elektroneutralnost svakog sustava postigao sam dodajući Na⁺ ili Cl⁻ ione dok ukupni naboj nije iznosio nula. Za računanje elektrostatskih interakcija korištena je Ewaldova sumacija.

Minimizaciju energije provodio sam u pet ciklusa optimizacije geometrije gdje se svaki ciklus sastojao od 200 koraka algoritma najstrmijeg spusta (engl. *steepest decent*) i 800 koraka algoritma konjugiranih gradijenata (engl. *conjugate gradient*). U prvom ciklusu minimizacije energije optimizirale su se molekule otapala, u drugom ciklusu atomi vodika, u trećem i četvrtom ciklusu svi atomi osim atoma proteinske okosnice, a petom ciklusu proveo sam optimizacija cijelog sustava bez ikakvih ograničenja. Kako bih stavio naglasak na relaksaciju navedenih dijelova strukture, na ostale dijelove sustava primjenjen je restriksijski harmonijski potencijal s konstantom sile od 100 kcal mol⁻¹ Å⁻² u prvom, drugom i trećem ciklusu te od 50 kcal mol⁻¹ Å⁻² u četvrtom ciklusu. Provodio sam 1 ns simulacije uravnoteženja u tri faze. Proveo sam 300 ps NVT ekvibracije s fiksiranim položajima atoma proteina te konstantnim volumenom simulacijske kutije. Tijekom te faze, temperatura je ravnomjerno i linearno rasla od 0 K do 310 K (temperatura na kojoj bakterija *M. tuberculosis* optimalno raste) (Tsukamura, 1967). Druga faza NVT ekvibracije trajala je 200 ps pri 310 K i nije imala fiksirane položaje atoma proteina. Nadalje, proveo sam još 500 ps NPT ekvibracije (treća faza), bez ograničavanja kretanja atoma, pri konstantnom tlaku (1 bar) i konstantnoj temperaturi (310 K). Nakon simulacije uravnoteženja, uslijedila je produkcijska faza od 300 ns pri temperaturi 310 K, konstantnom tlaku (1 bar), bez ograničenja kretanja atoma, u eksplicitnom TIP3P modelu vode i periodičnim rubnim uvjetima. Sve faze MD simulacije prikazane su u tablici 3. Za održavanje temperature, koristio sam Langevinov termostat s $\gamma = 3 \text{ ps}^{-1}$ (frekvencija sudara) (Davidchack i sur. 2009). Upotrijebio sam vremenski korak od 1 fs i spremao sam koordinate svakih 10 ps. Koristio sam 15 Å za graničnu udaljenost za elektrostatske i van der Waals interakcije

Tablica 3. Postupci i faze provođenje računalnih simulacija.

Faza računalne simulacije	Trajanje	Atomi kojima je dopušteno slobodno kretanje	Temperatura
Minimizacija	1000 koraka	Atomi otapala	/
Minimizacija	1000 koraka	Atomi otapala i atomi vodika	/
Minimizacija	1000 + 1000 koraka	Svi atomi osim atoma proteinske okosnice	/
Minimizacija	1000 koraka	Svi atomi	/
Ekvilibracija NVT	300 ps	Atomi otapala	0-310 K
Ekvilibracija NVT	200 ps	Svi atomi	310 K
Ekvilibracija NPT	500 ps	Svi atomi	310 K
Produkcija NPT	300 ns	Svi atomi	310 K

2.3. Priprema *in silico* mutanata proteina MntR iz *M.tuberculosis*

Na temelju dobivenih rezultata analize računalnih simulacija, identificirane su ključne aminokiseline te sam konstruirao *in silico* mutante i pripremio ih za računalne simulacije kako bih provjerio važnost tih aminokiselina. Pripremio sam tri apo i tri holo mutanata: Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala. Mutante sam protonirao korištenjem H++ programa te sam im uklonio prvih 13 N-terminalnih aminokiselina. Računalne simulacije proveo sam prema protokolu opisanom u prethodnom poglavlju i tablici 3.

2.4. Analiza i vizualizacija trajektorija MD simulacija

Za vizualizaciju dobivenih trajektorija koristio sam program VMD (engl. *Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey i sur. 1996) i UCSF Chimera (Pettersen i sur. 2004). Analizu trajektorija provodio sam u Amberovom programu cpptraj (Roe i Cheatham III 2013). Korištenjem programa cpptraj, računao sam različite kvantitativne parametre kao što je promjena korijena srednjeg kvadrata udaljenosti (engl. *Root-Mean-Square Deviation, RMSD*), analiza fluktuacija (engl. *Root-Mean-Square*

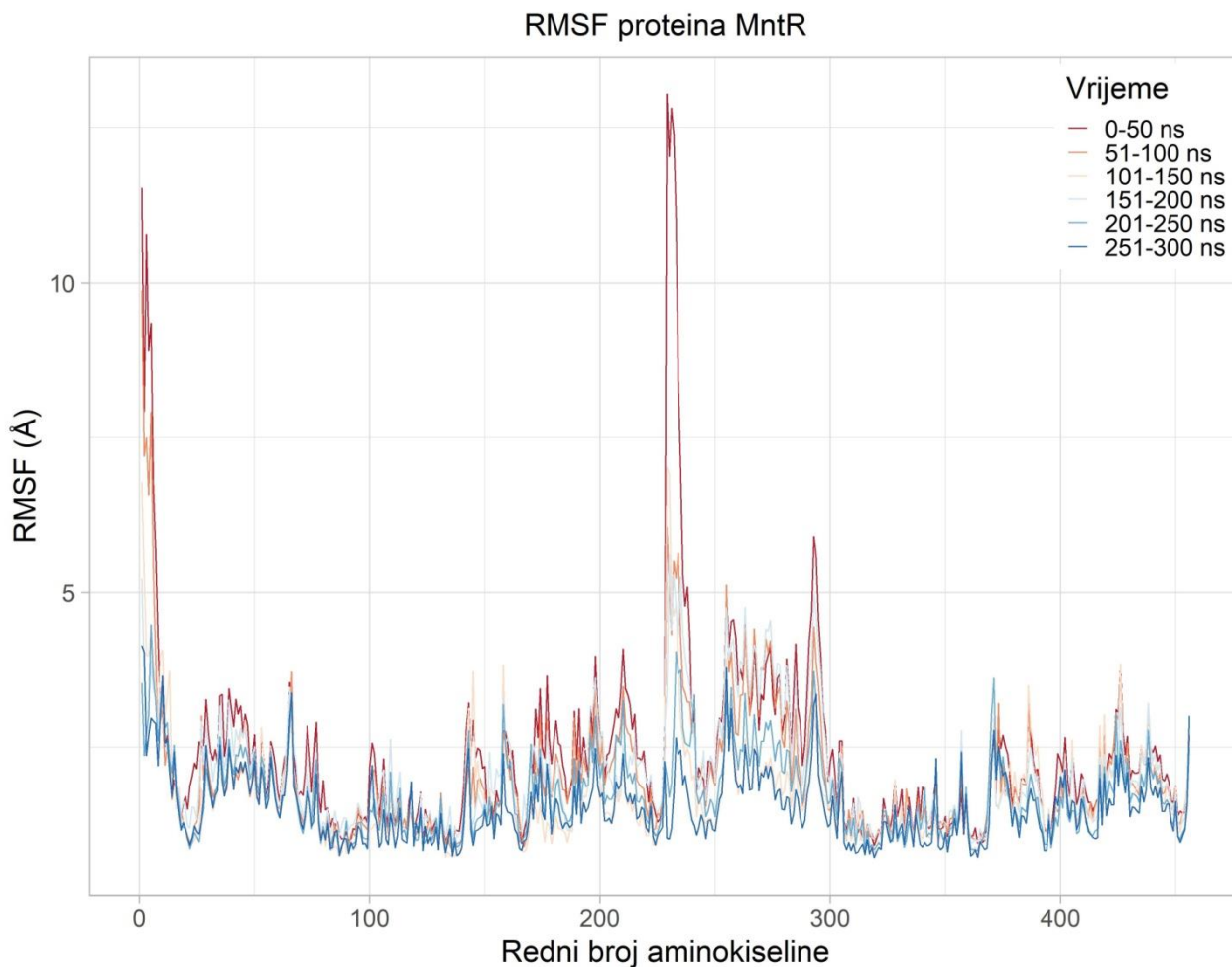
Fluctuation, RMSF), udaljenosti centara masa i radijus giracije. Rezultate kvantitativne analize prikazao sam grafički korištenjem R paketa ggplot2. Kvalitativnu analizu, vizualizaciju i izradu slika provodio sam korištenjem programa VMD.

3. Rezultati

3.1. Fluktuacije N-terminalnih lanaca i njihova međusobna udaljenost

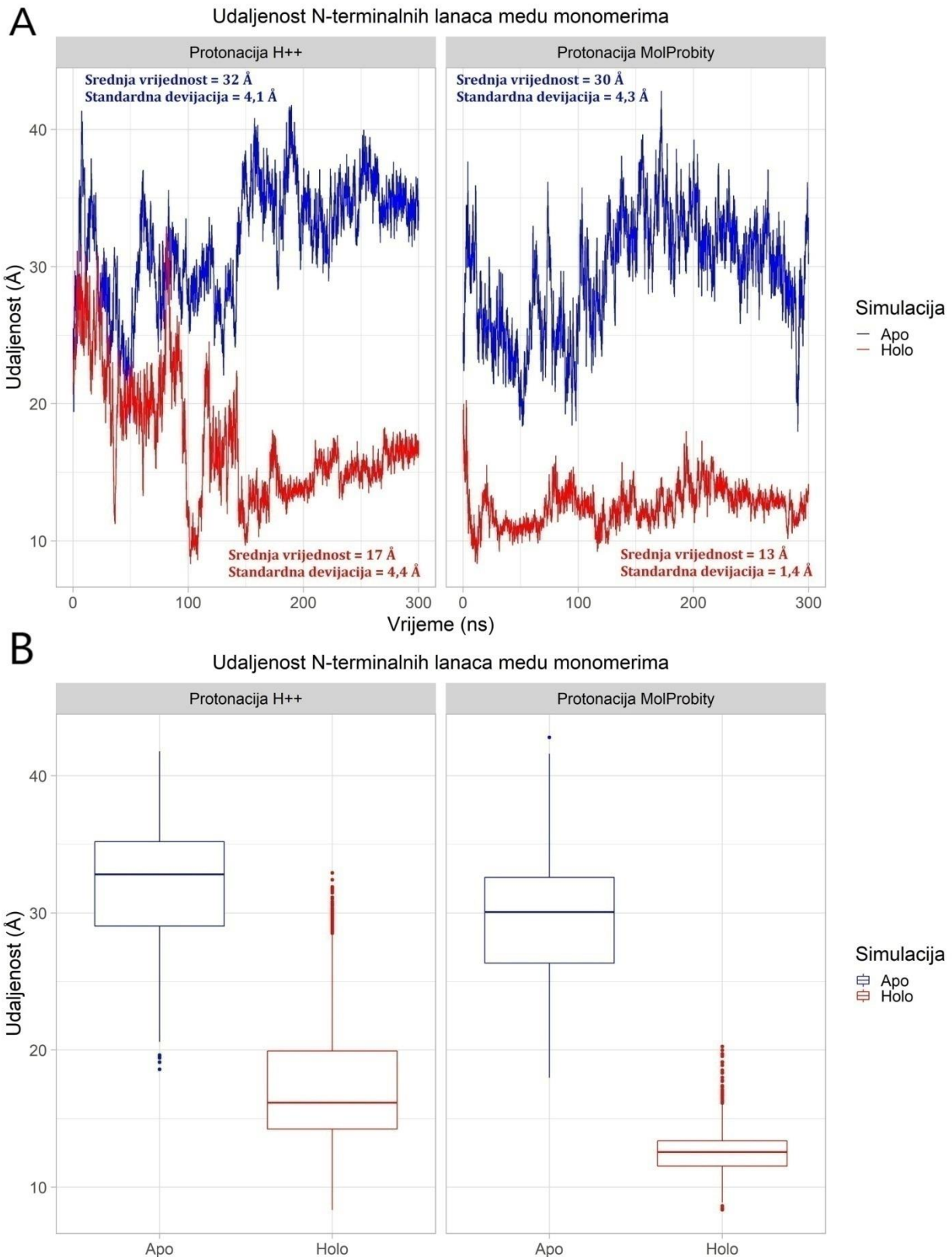
Provedene su simulacije molekulske dinamike (MD) proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* u svrhu istraživanja njegovih strukturnih i dinamičkih svojstava. MntR sadrži 12 N-terminalnih aminokiselina specifičnih za ovaj protein kojih nemaju njegovi homolozi. Ne zna se izgled tih N-terminalnih lanaca jer nisu prisutni u kristalnim strukturama, stoga ih je potrebno *in silico* izgraditi za MD simulacije. U svrhu istraživanja njihove potencijalne uloge i njihovog utjecaja na dinamička i strukturna svojstva proteina, napravljene su MD simulacije s modeliranim N-terminalnim lancima, ali i simulacije bez njih. Rezultati MD simulacija pokazali su da N-terminalni lanci imaju izrazito velike RMSF vrijednosti, indicirajući njihovu visoku fleksibilnost. Vrijednost RMSF je mjera prosječne fluktuacije neke aminokiseline i pokazatelj je koliko je ta aminokiselina fleksibilna u MD simulacijama – veća RMSF vrijednost označava da je ta aminokiselina fleksibilnija, a manja da je rigidnija tijekom simulacije. Vizualno se može zamijetiti da su N-terminalni lanci poprilično pokretni, a račun RMSF vrijednosti to potvrđuje. N-terminalni lanci stvaraju interakcije s raznim dijelovima proteina. Stvaranjem interakcije s dijelom proteina, N-terminalni lanci postaju rigidniji i stabilniji. Oni mogu stvarati interakcije s nekom od α -zavojnica domene HTH, dimerizacijskom domenom, veznim mjestom i međusobno (N-terminalni lanac jedne podjedinice stvara interakcije s N-terminalnim lancem druge podjedinice). Međutim, N-terminalni lanci ne stvaraju interakcije s veznim mjestom u simulacijama molekulske dinamike onih sustava koji su sadržavali ion mangana u veznom mjestu (simulacije holo i apo s nadodanim ionima manganoma). Nadalje, N-terminalni lanci se značajno različito kreću ovisno o simulaciji te se kretanje N-terminalnih lanaca čini stohastičkim. Nije bilo znatnih razlika u dinamičkim i strukturnim svojstvima proteina tijekom MD simulacija struktura koje su imale N-terminalne lance u odnosu na one koje nisu.

Kako bi provijerili mijenja li se fluktuacija pojedinih dijelova strukture tijekom simulacije, RMSF vrijednost za cijeli protein računala se u intervalima od 50 ns tijekom 300 ns MD simulacije (slika 4). U većini simulacija, protein MntR ima niže RMSF vrijednosti u kasnijim vremenskim intervalima MD simulacije. N-terminalni lanci imaju velike RMSF vrijednosti u usporedbi s ostatkom proteina (slika 4), ali pri kraju simulacije manje fluktuiraju indicirajući da se N-terminalni lanci stabiliziraju i stvaraju interakcije s ostatkom proteina što je potvrđeno vizualizacijom. Međutim, u nekim simulacijama N-terminalni lanci stvaraju interakcije s ostatkom proteina već na početku simulacije, stoga nemaju veliki RMSF na početku simulacije, ali pri kraju simulacije dolazi do prekida interakcija pa N-terminalni lanci tada jače fluktuiraju.



Slika 4. Fluktuiranje (RMSF vrijednosti) proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* računato u šest vremenskih intervala od 50 ns kroz 300 ns simulacije molekulske dinamike. Prikazana je MD simulacija apo strukture s N-terminalnim lancima koja je protonirana programom H++. Vremenski su intervali pokazani različitim bojama. Lanac A proteina MntR tvore aminokiseline 1-228, a lanac B 229-456.

Udaljenost centra mase N-terminalnog lanca jedne podjedinice i centra mase N-terminalnog lanca druge podjedinice računata je tijekom MD simulacija i pokazuje da su N-terminalni lanci međusobno bliže tijekom simulacija holo strukture ($17 \pm 4,4 \text{ \AA}$) od onih u simulacijama apo strukture ($32 \pm 4,1 \text{ \AA}$) (slika 5A i slika 5B). Ovaj rezultat nije ovisio o programu korištenom za protonaciju strukture (slika 5).



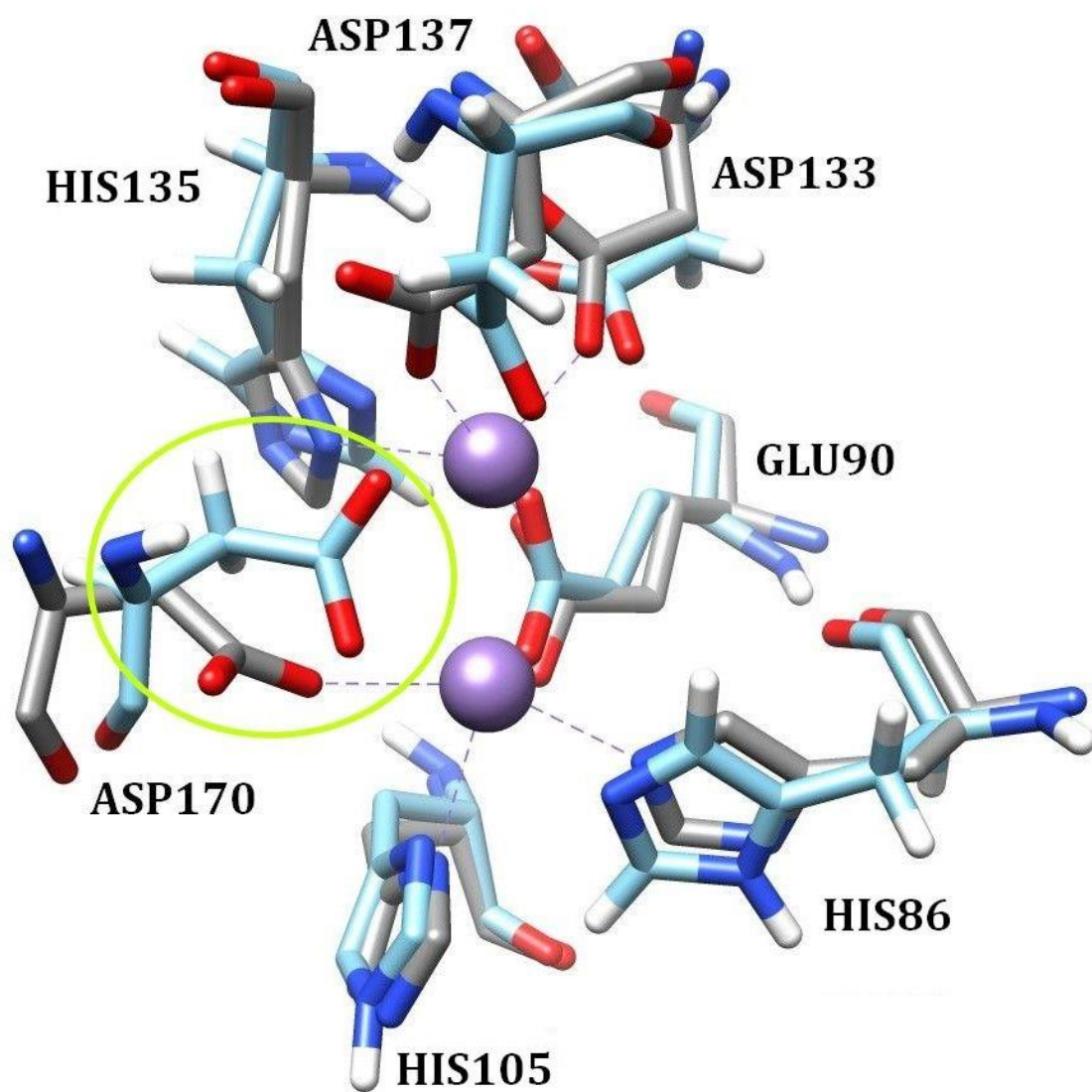
Slika 5. Udaljenost centra masa N-terminalnih lanaca među podjedinicama proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Prikazane su vrijednosti za simulacije apo (plavo) i holo (crveno) oblika proteina MntR korištenjem H++ i MolProbity programa za protoniranje. A) Ovisnost udaljenosti N-terminalnih lanaca među monomerima proteina MntR. B) Pravokutni/kutijasti dijagram (engl. *Box and Whiskers plot*) udaljenosti N-terminalnih lanaca kroz MD simulaciju.

3.2. Razlike koordinacije iona mangana u veznom mjestu od one u kristalnoj strukturi

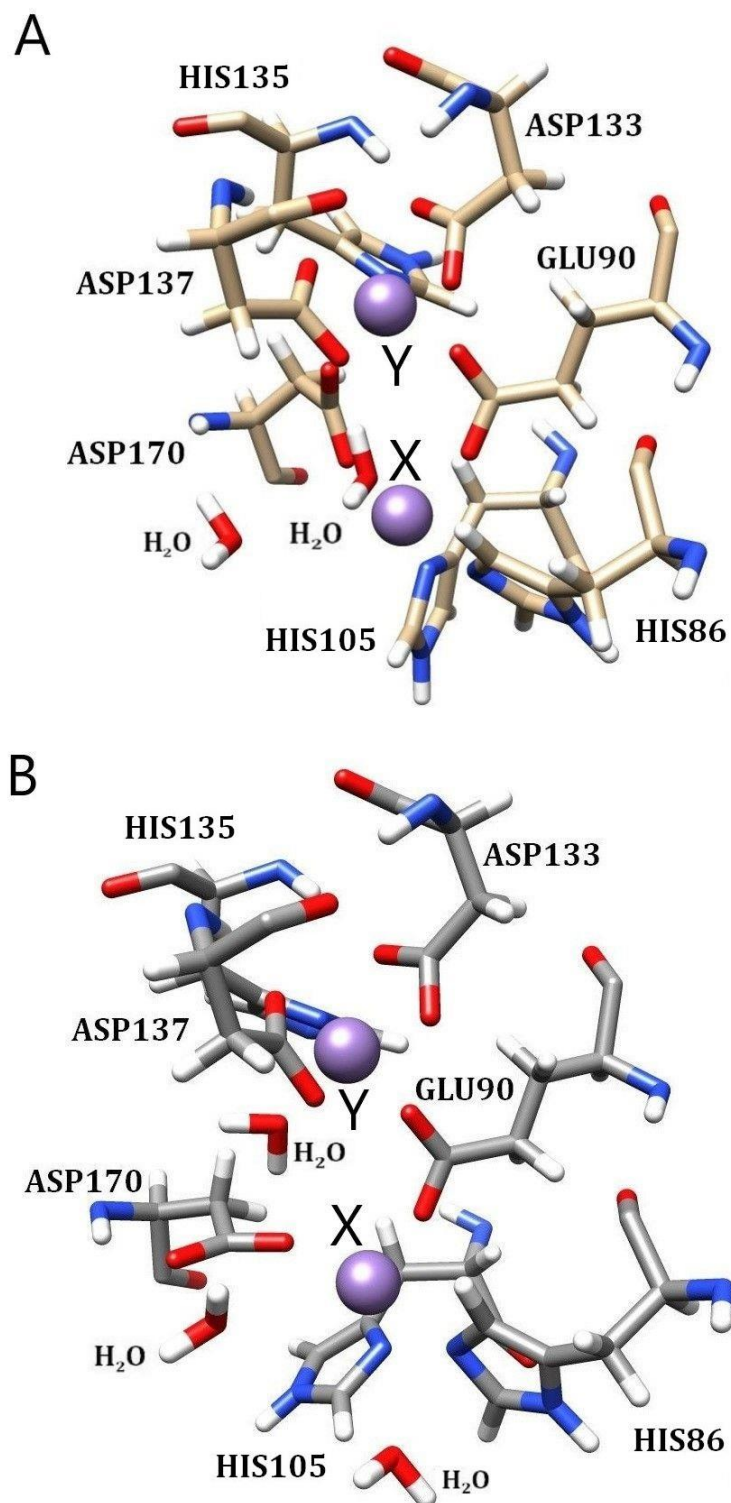
S obzirom da je parametriziran samo neveznim parametrima, koordinacija iona mangana (Mn^{2+}) može se mijenjati tijekom MD simulacija. Uočeno je da se koordinacija najviše mijenja tijekom MD simulacija apo strukture kojoj su *in silico* nadodani ioni mangana u vezno mjesto, ti ioni mangana ponekad čak postaju većinski koordinirani molekulama vode, a ne aminokiselinama proteina MntR. Opaženi rezultat vjerojatno je posljedica neadekvatne početne koordinacije manganova iona u usporedbi s holo strukturom, odnosno kristalnom strukturom.

U binuklearnom metalnom centru, glavna razlika koordinacije iona mangana u simulacijama molekulske dinamike i kristalnoj strukturi jest što Asp170 koordinira jedan ion mangana u kristalnoj strukturi, a oba iona mangana u simulacijama molekulske dinamike (slika 6). Aminokiselina Asp170 s jednim atomom kisika bočnog ogranka koordinira jedan ion mangana, a drugim atomom kisika svog bočnog ogranka koordinira drugi tijekom MD simulacija. Međutim, ovakva razlika zapaža se samo u A lancu, dok B lanac ima istu koordinaciju Asp170 kao i u kristalnoj strukturi. Dakle, zapaža se asimetrija među monomerima, tj. koordinacija se razlikuje među podjedinicama u proteinu. Jedini izuzetak glede asimetrije podjedinica je holo simulacija protonirana programom MolProbity koja nema N-terminalne aminokiseline. U toj simulaciji, obje podjedinice imaju Asp170 koji bočnim ogrankom koordinira oba iona mangana. Ioni mangana u binuklearnom metalnom centru označeni su s X i Y (slika 7A i slika 7B). Aminokiselina Asp170 u lancu A koordinira oba iona mangana (slika 7A) preko svojeg bočnog ogranka. Međutim, Asp170 u lancu B koordinira samo ion mangana X, a molekula vode koordinira ion mangana Y na mjestu atoma kisika bočnog ogranka Asp170 (dakle, molekula vode zamjenjuje atom kisika bočnog ogranka Asp170 koji koordinira ion mangana Y) (slika 7B). Molekule vode koje koordiniraju ion mangana u binuklearnom centru se ne izmjenjuju – ista molekula vode koordinira ion mangana kroz cijelu simulaciju.

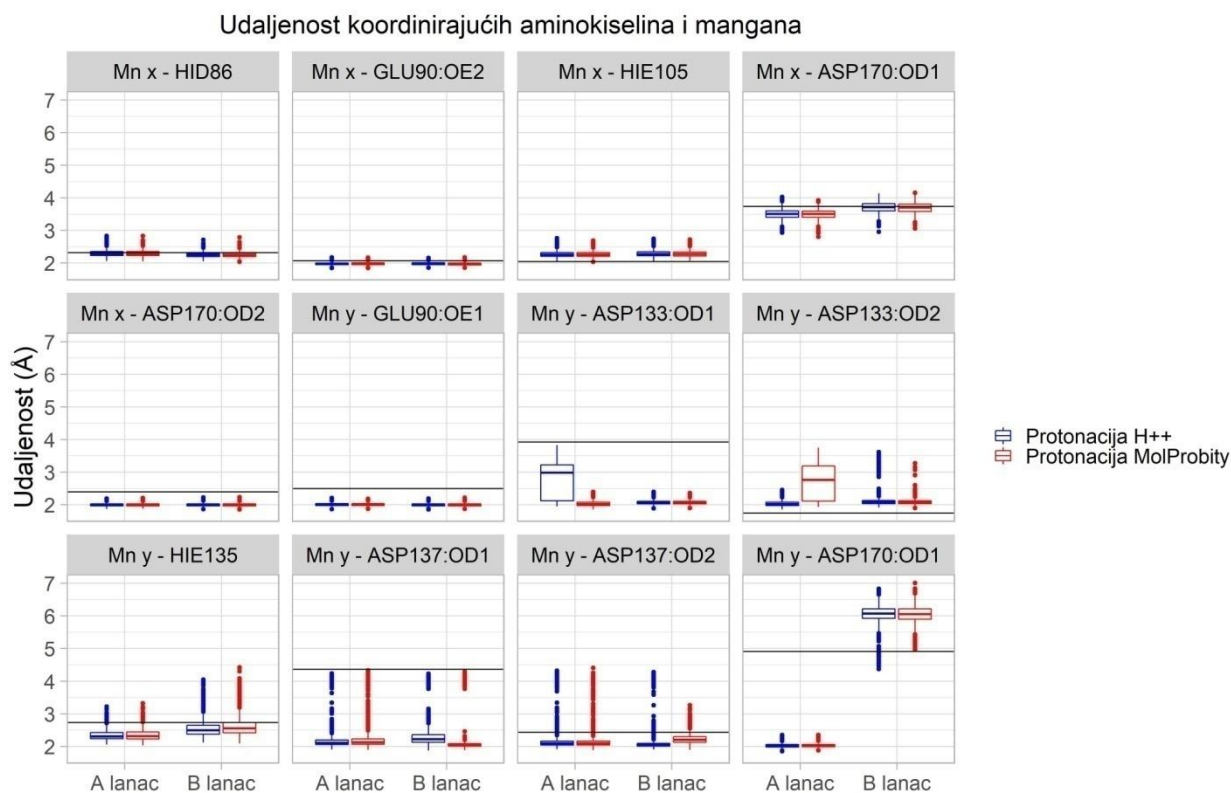
Postoje i druge razlike koordinacije u binuklearnom metalnom centru MD simulacija i kristalne strukture. Sumarno gledajući, najveće odstupanje od udaljenosti koordinacije u kristalnoj strukturi imaju aminokiselinski ogranci aspartata. Na slici 8, prikazane su udaljenosti pojedinih koordinirajućih atoma i iona mangana kojeg koordiniraju. Histidini koji koordiniraju manganov ion ostaju u relativno sličnoj udaljenosti od iona mangana kojeg koordiniraju uspoređujući s kristalnom strukturom (slika 8). Aminokiseline Asp133 i Asp137 koordiniraju ion mangana Y znatno drugačije od kristalne strukture – oba aspartata stvaraju bidentatnu koordinacijsku vezu s ionom mangana (slika 8), dok je u kristalnoj strukturi ta veza monodentatna (slika 6). Međutim, ta koordinacija ne ostaje cijelo vrijeme simulacije bidentatna, nego se izmjenjuju monodentatna i bidentatna koordinacija.



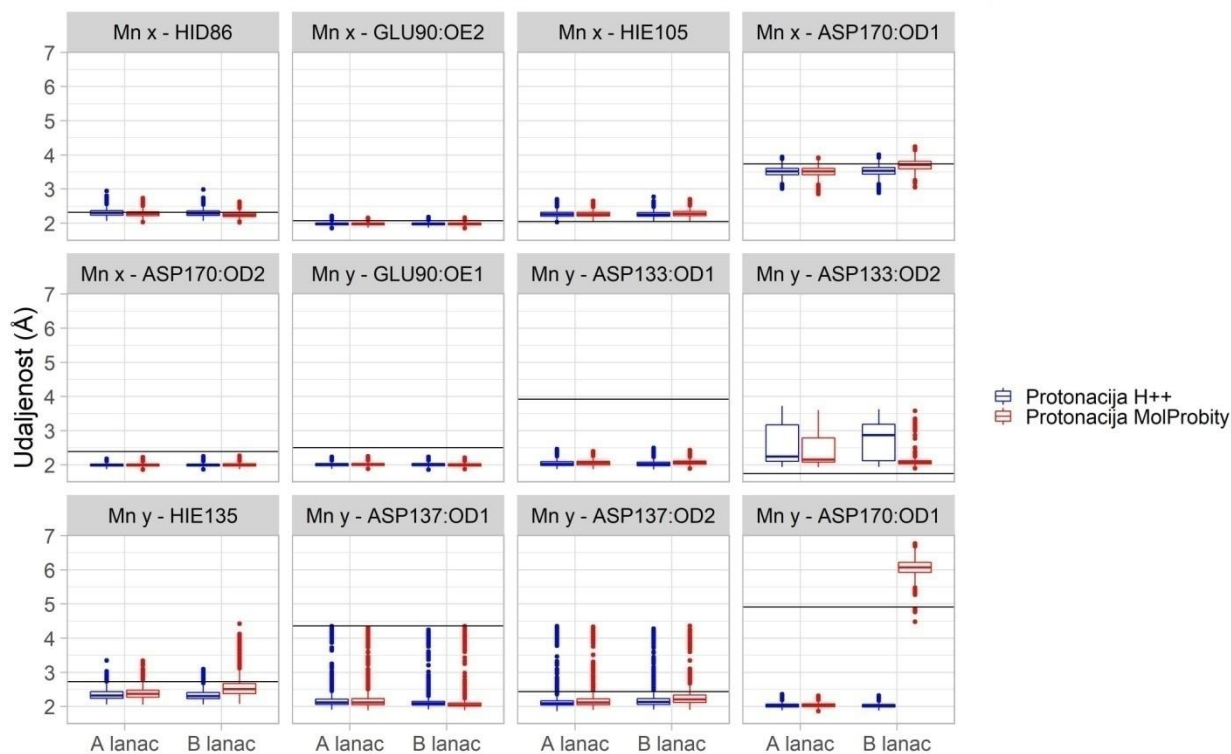
Slika 6. Usporedba koordinacije iona mangana proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* u binuklearnom metalnom centru kristalne strukture (neprotinirane aminokiseline, atomi ugljika obojani sivo) i strukture dobivene MD simulacijom (protonirane aminokiseline, atomi ugljika obojani svijetlo plavo). Ioni mangana prikazani su ljubičastim kuglicama. Istaknut je bočni ogranak Asp170. Koordinirajuće molekule vode nisu prikazane.



Slika 7. Koordinacija manganovih iona binuklearnih centara proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* u MD simulacijama. Prikazana je najčešća koordinacija tijekom simulacije. Ioni mangana prikazani su ljubičastim kuglicama te su imenovani kao ion mangana X (donji) i ion mangana Y (gornji). A) Koordinacija iona mangana u A lancu. B) Koordinacija iona mangana u B lancu.



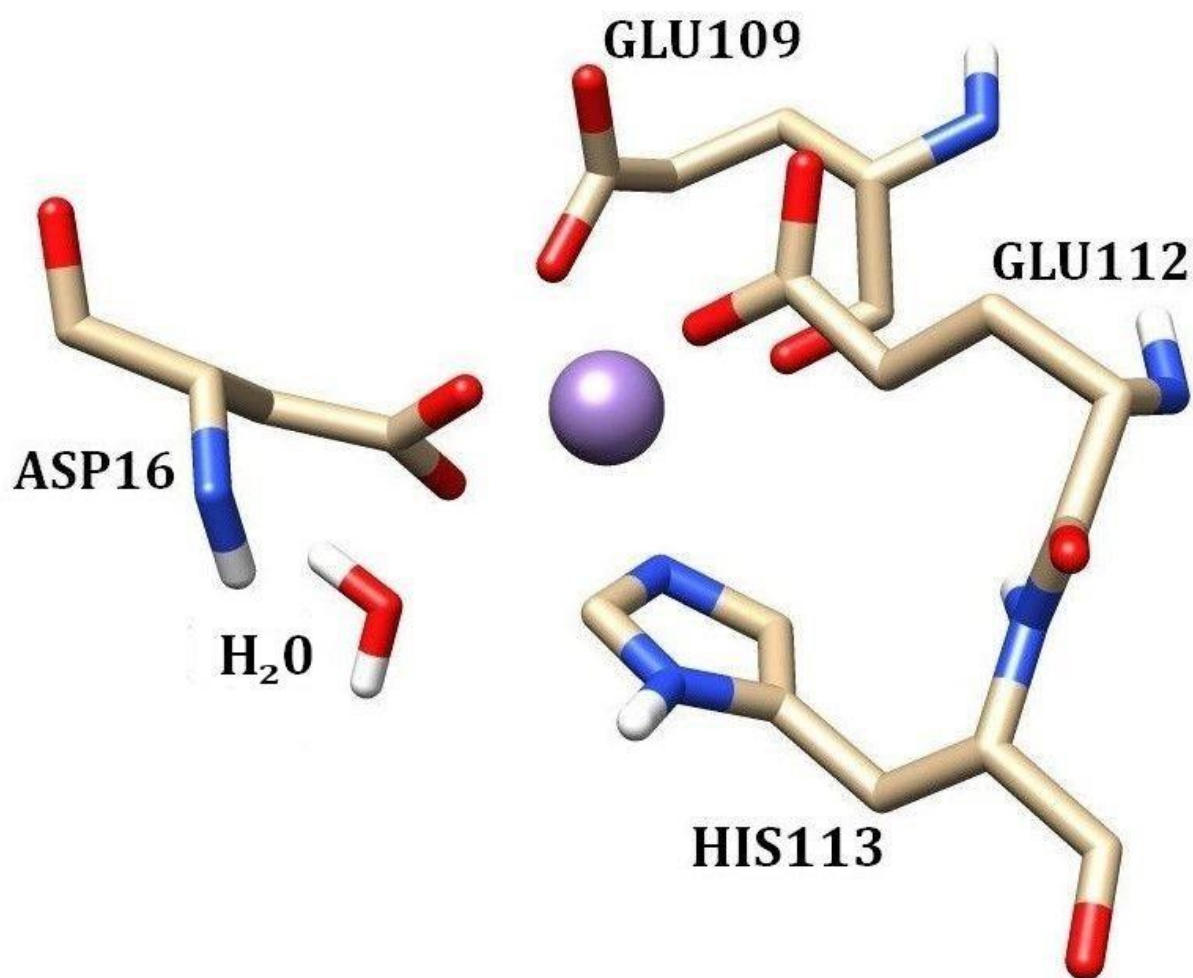
Udaljenost koordinirajućih aminokiselina i mangana (bez N-terminalnih aminokiselina)



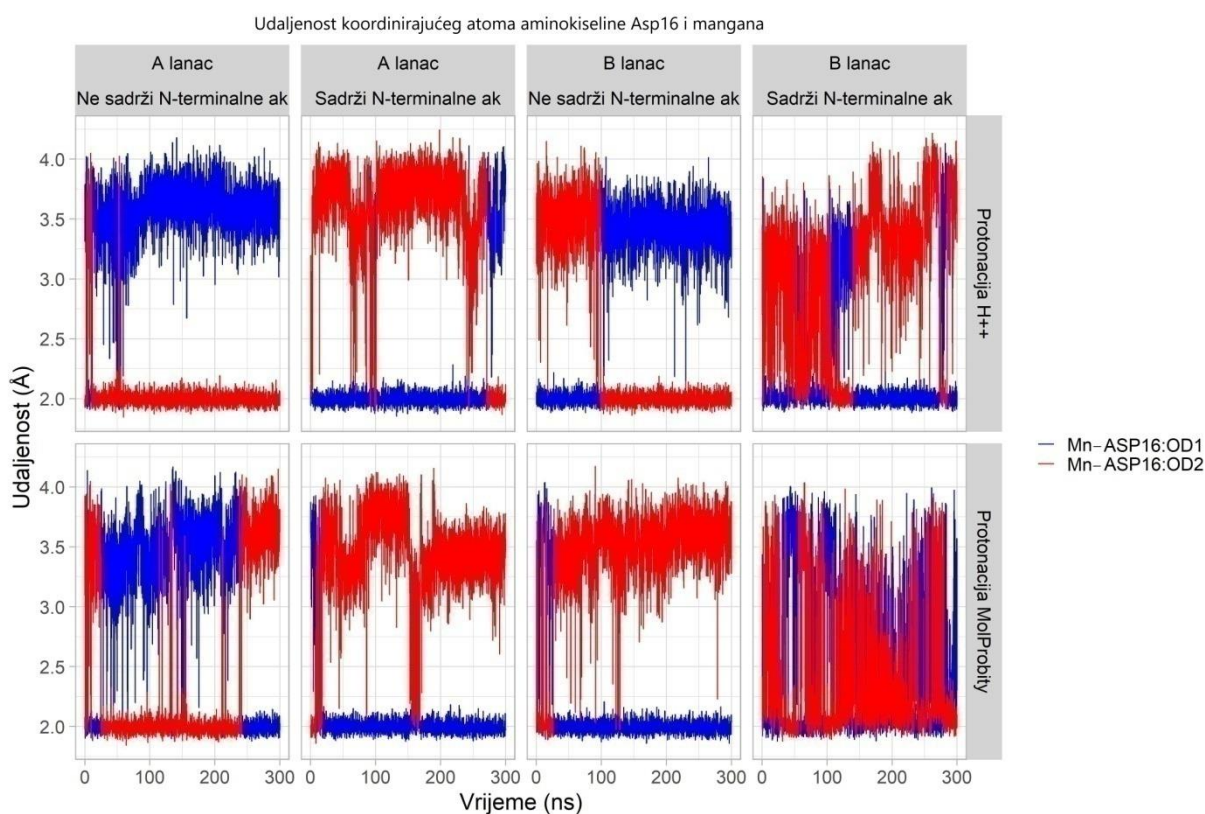
Slika 8. Udaljenost koordinirajućih aminokiselina i iona mangana prikazana kutijastim/pravokutnim dijagramom (engl. *Box and whiskers plot*) tijekom simulacija molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Plavom bojom označene su udaljenosti struktura protoniranih programom H++, a crvenom programom MolProbity. Crna horizontalna linija na grafu predstavlja pripadajuću

udaljenost koordinirajućeg atoma i iona mangana u kristalnoj strukturi. Grafovi su podijeljeni na holo simulaciju koja sadrži N-terminalne aminokiseline i holo simulaciju bez njih. Udaljenost histidina od iona mangana mjerena je tako da se mjerila udaljenost koordinirajućeg atoma dušika od iona mangana. Aminokiseline glutamat i aspartat sadrže dva atoma kisika koja mogu koordinirati ion mangana, stoga su napravljeni grafovi za oba atoma kisika (ti atomi kisika imenovani su kao OD1/OD2 za aspartat i OE1/OE2 za glutamat).

Što se tiče koordinacije iona mangana u mononuklearnom metalnom centru, koordinacija nije znatno drugačija od one u kristalnoj strukturi. Glavna razlika je ta da aminokiselina Asp16 na kratko vrijeme bidentatno koordinira ion mangana svojim bočnim ogrankom (slika 9) te izmjenjuje atome kisika bočnog ogranka kojima koordinira ion mangana. U kristalnoj strukturi, Asp16 koordinira ion mangana isključivo monodentatno. Kod Asp16 izmjenjuje se atom kisik bočnog ogranka koji koordinira manganov ion, ali uglavnom koordinira samo jedan kisikov atom. Samo na kratke periode, koordinacija postaje bidentatna (slika 10). Ostale aminokiseline ostaju približno jednako udaljene od iona mangana kao u kristalnoj strukturi (slika P1 u Prilogu). Molekula vode nije prisutna u kristalnoj strukturi, ali tijekom simulacija molekulske dinamike ona kreće koordinirati ion mangana. Ta molekula vode koordinira ion mangana tijekom cijele simulacije molekulske dinamike.



Slika 9. Koordinacija iona mangana u mononuklearnom metalnom centru tijekom MD simulacija proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Ion mangana prikazan je ljubičastom kuglicom. Aminokiselina Asp16 na kratko vrijeme tijekom MD simulacije koordinira ion mangana bidentatno kao što je prikazano na slici, a u kristalnoj je strukturi monodentatan.



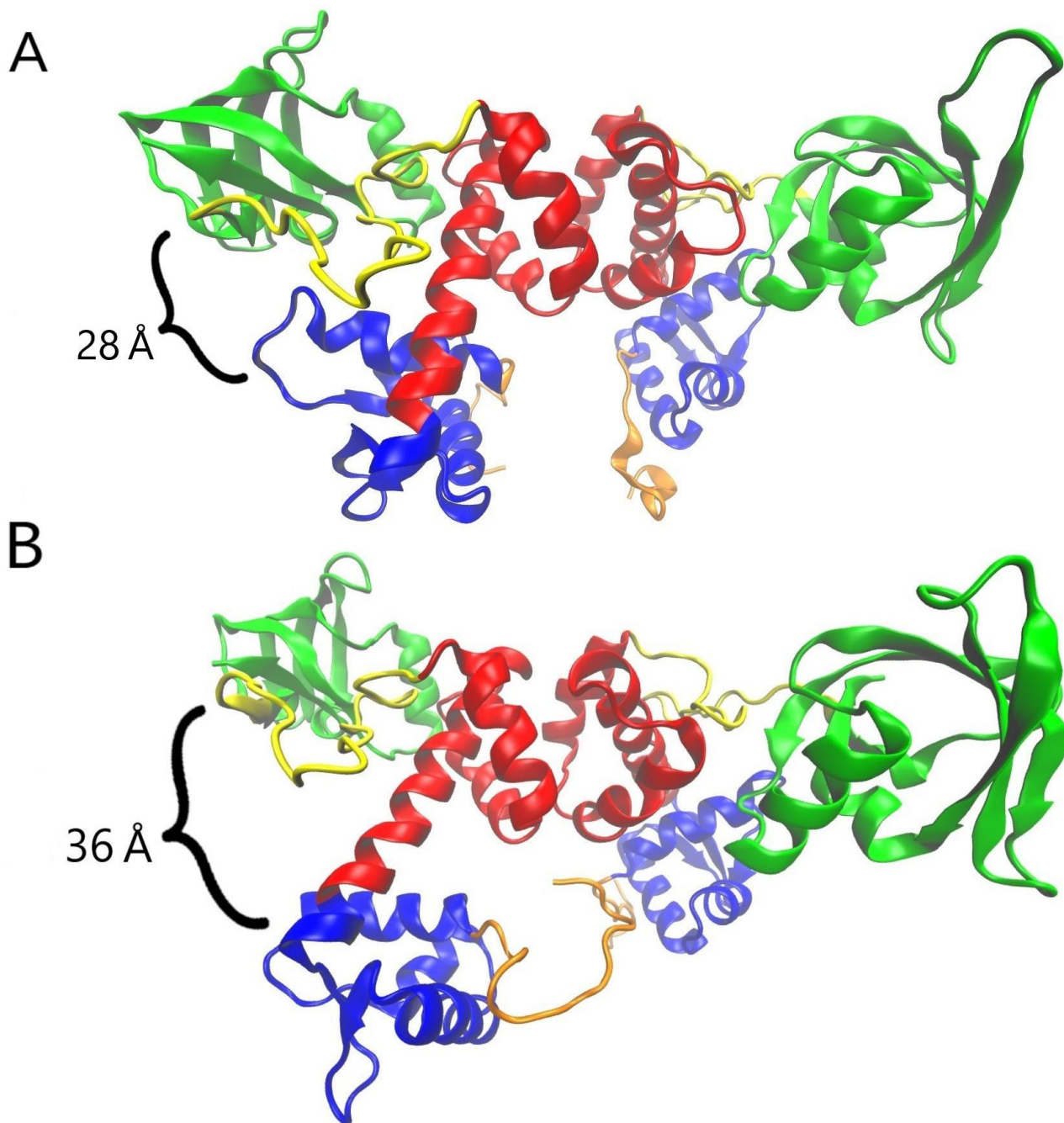
Slika 10. Udaljenost između koordinirajućih atoma kisika bočnog ogranka Asp16 i iona mangana tijekom MD simulacija *M. tuberculosis* proteina MntR. Grafovi su podijeljeni ovisno o lancu, protonaciji i prisutnosti N-terminalnih aminokiselina. Prikazane su udaljenosti svakog od atoma kisika bočnog ogranka aminokiseline Asp16 različitim bojama (atomi kisika imenovani kao OD1/OD2). Grafovi pokazuju kako se izmjenjuju kisikovi atomi bočnog ogranka Asp16 koji koordiniraju ion mangana u mononuklearnom centru.

3.3. Mreža interakcija koja povezuje domene HTH i FeoA

3.3.1. Odvajanje domena u divljem tipu proteina MntR

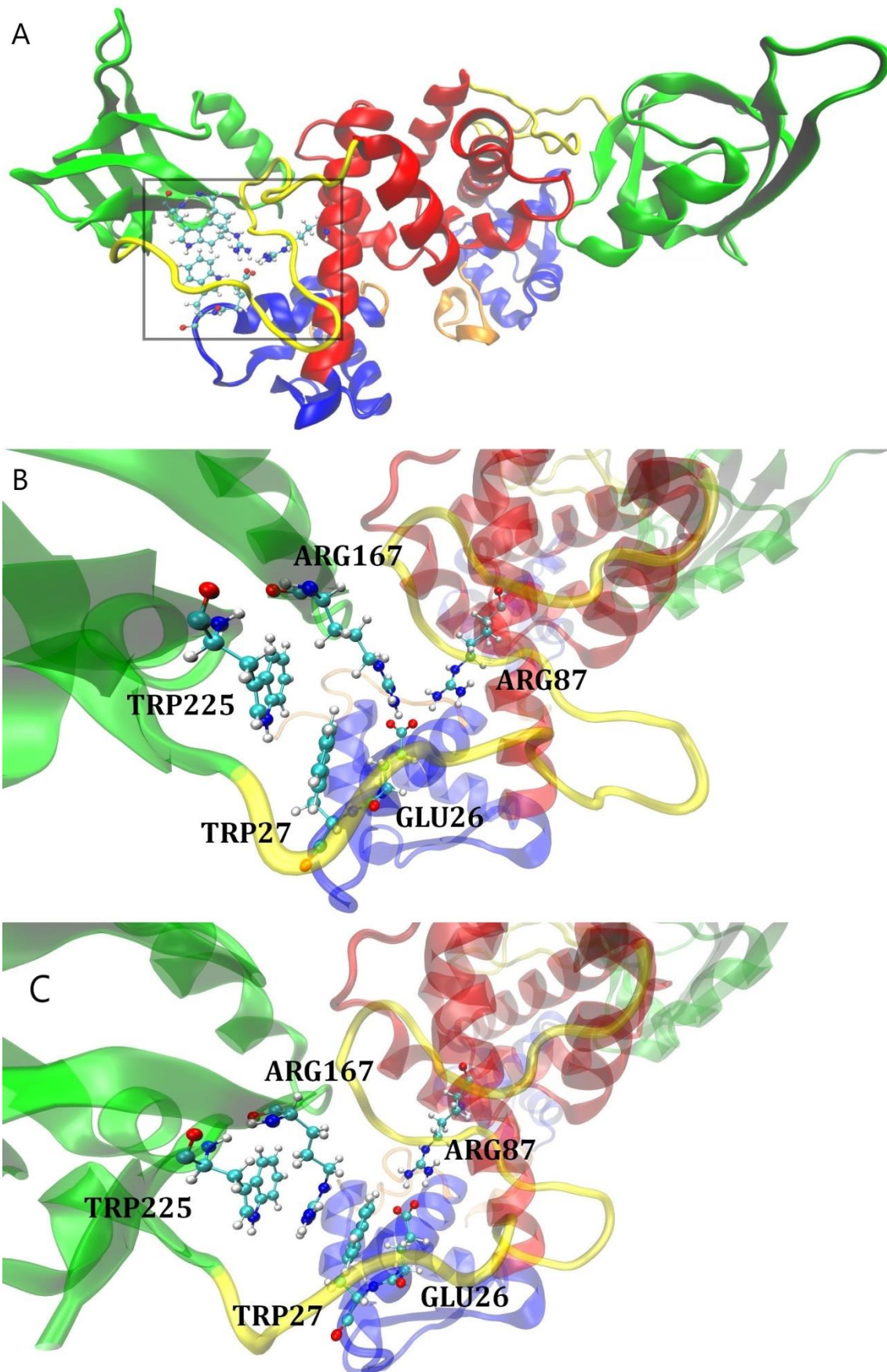
S obzirom da domene HTH i FeoA nisu povezane kovalentnim interakcijama, u nekim MD simulacijama se odmaknu jedna od druge (slika 11A). Prilikom odvajanja domena HTH i FeoA, prva α -zavojnica domene HTH (aminokiseline 14–26) mijenja konformaciju te udaljenost centara mase domena HTH i FeoA postaje veća (slika 11B). Odvajanje domena ne ovisi o strukturi, lancu, prisutnosti N-terminalnih lanaca niti programu korištenim za protonaciju. Štoviše, odvajanje domena HTH i FeoA se doima stohastičkim – nema pravilnosti u kojoj simulaciji i kojoj podjedinici dolazi do odvajanja. Vizualno zapažanje da se domene odvajaju, kvantificirano je tako da se mjerila udaljenost

centra mase tih domena (slika P2 u Prilogu). Česta je pojava da se domene HTH i FeoA odvoje samo u jednom monomeru proteina MntR, a u drugome domene ostaju blizu jedna drugoj kako su u kristalnoj strukturi. Međutim, u apo simulaciji protoniranoj korištenjem programa MolProbity te nadodanim ionima mangana u vezno mjesto i kojoj su uklonjene N-terminalne aminokiseline, u obje podjedinice su se odvojile domene HTH i FeoA (pri kraju simulacije). S druge strane, u nekim simulacijama molekulske dinamike domene ostaju povezane i ne odvajaju se niti u jednom monomeru proteina.



Slika 11. Odnos domena HTH (plavo) i FeoA (zeleno) proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* tijekom simulacija molekulske dinamike. Domene proteina MntR obojane su različitim bojama: narančasto – N-terminalne aminokiseline, plavo – domena HTH, crveno – dimerizacijska domena, žuto – lanac aminokiselina koji povezuje dimerizacijsku i FeoA domenu, zeleno – domena FeoA. A) Primjer simulacije u kojoj se domene nisu odvojile. Radi se o simulaciji holo strukture kojoj nisu uklonjeni N-terminalni lanci te je protonirana programom MolProbity. B) Primjer simulacije u kojoj su se domene HTH i FeoA odvojile. Radi se o apo simulaciji koja sadrži N-terminalne lance i protonirana je korištenjem programa H++.

Potrebno je pronaći ključne interakcije između domena proteina MntR kako bi se objasnilo i podrobnije razumjelo primijećeno odvajanje domena HTH i FeoA. Pronađene su aminokiseline koje tvore mrežu nekovalentnih interakcija povezujući domene HTH i FeoA. Te aminokiseline smještene su između domena HTH, FeoA i dimerizacijske domene (slika 12A). Prilikom odvajanja domena HTH i FeoA, zapaža se pucanje mreže interakcija tih aminokiselina. Radi se o aminokiselinama Glu26 i Trp27 u domeni HTH, Arg87 na dugoj α -zavojnici dimerizacijske domene te Arg167 i Trp225 u domeni FeoA. Postoje dvije stabilne mreže nekovalentnih interakcija koje tvore navedene aminokiseline. U jednoj konformaciji te mreže, aminokiselina Glu26 tvori vodikovu vezu svojom bočnim ogrankom s bočnim ograncima aminokiselina Arg87 i Arg167, a Trp27 i Trp225 su povezani π - π interakcijama (slika 12B). Nadalje, druga konformacija mreže nekovalentnih interakcija sastoji se od vodikove veze Glu26 i Arg87 te π - π interakcije između triju aminokiselina: Trp27, Arg167 i Trp225, s time da je Arg167 između Trp27 i Trp225 (slika 12C). U nekim simulacijama molekulske dinamike, prisutna je samo jedna od navedenih mreža interakcija, a u nekima se one izmjenjuju. Nadalje, u nekim simulacijama mreža interakcija nije stabilna te se aminokiseline odvajaju i tada se odvajaju domena HTH i FeoA. Prilikom odvajanja domena, molekule vode stvaraju vodikove veze s Glu26, Arg87 i Arg167, stoga se dogodi da vodikove veze Glu26-Arg87 i Glu26-Arg167 postaju premošćene molekulama vode. Tijekom nekog vremena, Glu26, Arg87 i Arg167 više ne interagiraju međusobno, nego samo tvore vodikove veze s vodom pa se te aminokiseline međusobno odvoje. U simulacijama sustava u kojima se domena HTH i FeoA ne odvoje, molekule vode ne stvaraju takve interakcije s Glu26, Arg87 i Arg167. Ne vidi se neki očiti razlog zašto molekule vode ne krenu premošćivati te vodikove veze u simulacijama gdje domene ostaju povezane. Mreža interakcija postoji i u kristalnoj strukturi, ali je malo drugačija: Trp27 i Trp225 su u π - π interakciji te Glu26 i Arg87 tvore vodikovu vezu. Međutim, u kristalnoj strukturi je vodikova veza Glu26 i Arg167 premošćena molekulom vode. Ta molekula vode se odmakne tijekom simulacija molekulske dinamike te se aminokiseline reorijentiraju u neku od navedenih mreža interakcija. Spomenuta molekula vode prisutna je samo u holo kristalnoj strukturi. Apo kristalna struktura nije sadržavala aminokiselinu Trp27, nego je ona modelirana *in silico* programom MODELLER.



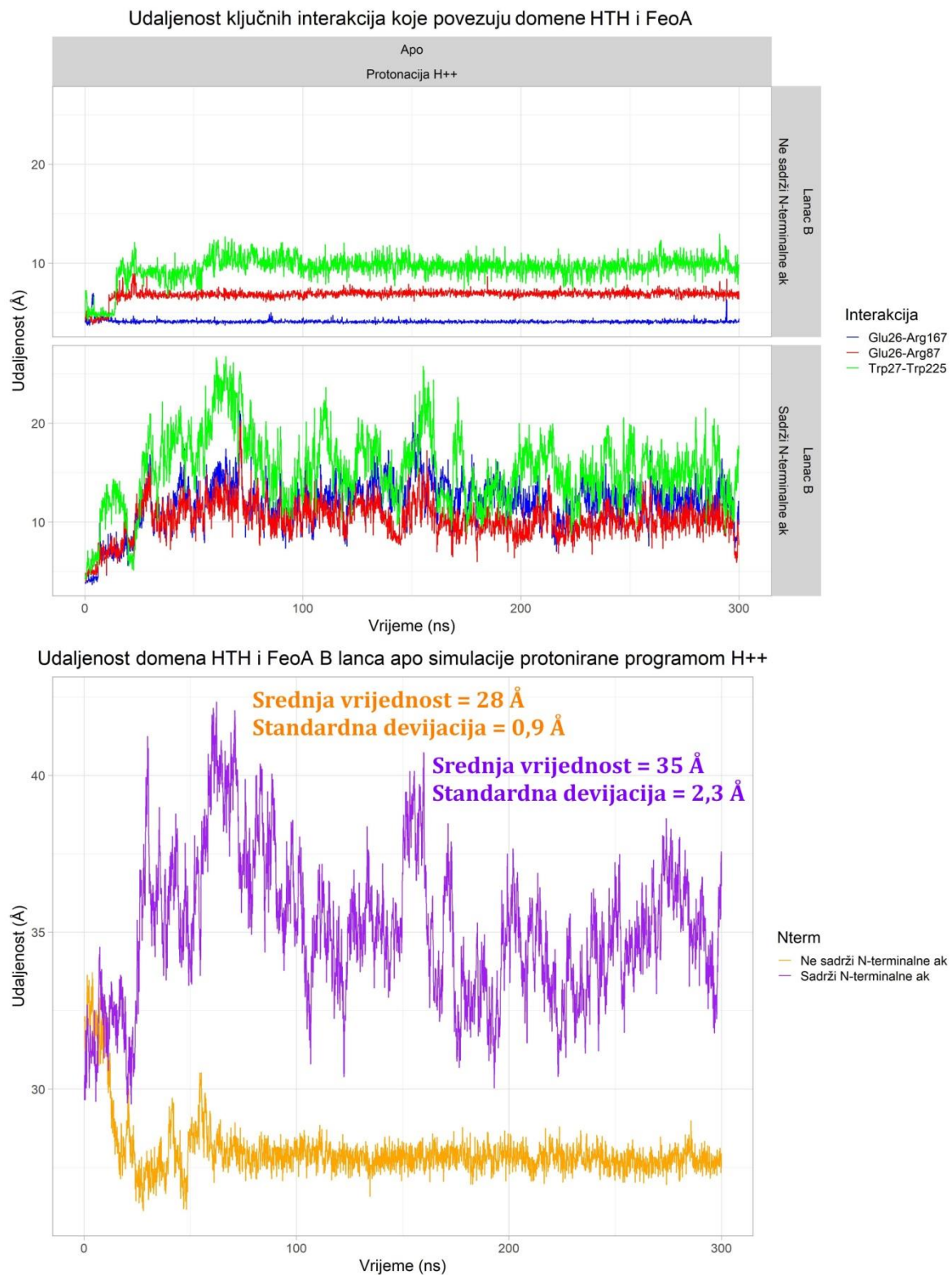
Slika 12. Položaj aminokiselina koje povezuju domene FeoA i HTH. Radi se o aminokiselinama Glu26, Trp27, Arg87, Arg167 i Trp225. Domene proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* obojane

su različitim bojama: narančasto – N-terminalni lanci, plavo – domena HTH, crveno – dimerizacijska domena, žuto – lanac aminokiselina koji povezuje FeoA i dimerizacijsku domenu, zeleno – domena FeoA. A) Ukupna struktura proteina MntR s naznačenim aminokiselinama koje povezuju domene HTH i FeoA. B) Jedna od konformacija mreže aminokiselina poveznica domena HTH i FeoA. U ovoj konformaciji, Glu26 pomoću svog bočnog ogranka tvori vodikovu vezu s bočnim ograncima Arg87 i Arg167, a Trp27 i Trp225 su povezane π - π interakcijama. C) Druga konformacija mreže aminokiselina koje povezuju domene HTH i FeoA. U ovoj konformaciji, Glu26 tvori vodikovu vezu samo s Arg87, a ne s Arg167. Međutim, aminokiseline Trp27, Arg167 i Trp225 su povezane π - π interakcijama.

Izmjerene su duljine svake od interakcija: Glu26-Arg87, Glu26-Arg167 i Trp27-Trp225, za svaku simulaciju (slika P3 u Prilogu). Duljine tih interakcija mogu se usporediti s udaljenosti domena HTH i FeoA (slika P2 u Prilogu). Tom usporedbom zamjećuje se kako svaki put kada je mreža navedenih interakcija očuvana, domene ostaju stabilne i blizu jedna drugoj. Međutim, kada je mreža interakcija prekinuta, dolazi do odvajanja domena. Primjerice, u simulaciji apo strukture simulirane bez N-terminalnih aminokiselina i protoniranoj programom H++, mreža interakcija ostaje očuvana (slika 13). U toj simulaciji, π - π interakcije među triptofanima i vodikove veze između Glu26-Arg87 i Glu26-Arg167 ostaju stabilne kroz cijelu simulaciju molekulske dinamike. Štoviše, na grafu (slika 13) je prikazana udaljenost centra masa domena HTH i FeoA u toj simulaciji gdje domene HTH i FeoA ostaju blizu jedna drugoj. Prosječna udaljenost centra masa domena HTH i FeoA iznosila je $28 \pm 0,9$ Å tijekom simulacije. Navedena udaljenost nije se znatno mijenjala tijekom simulacije molekulske dinamike (udaljenost nije fluktuirala).

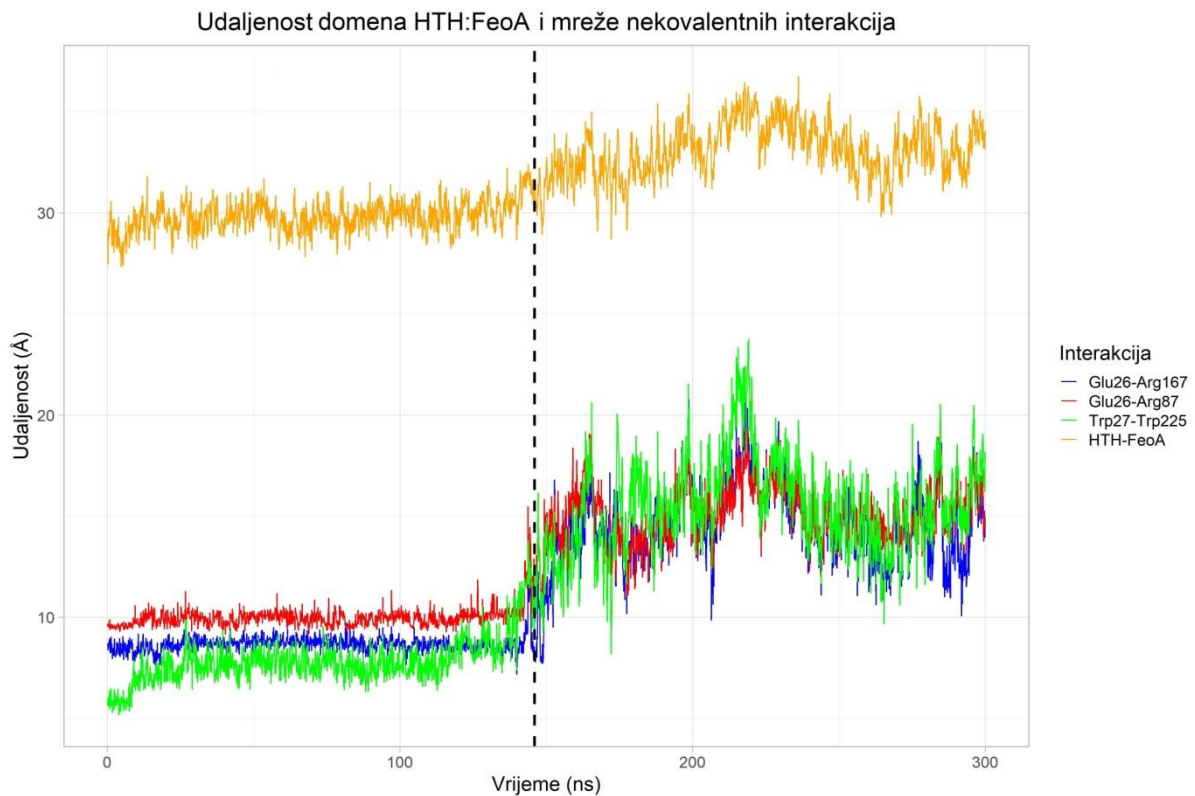
Kao primjer simulacije u kojoj dolazi do odvajanja domena i prekida mreže interakcija, izabrana je simulacija apo strukture s N-terminalnim lancima koja je protonirana programom H++ (slika 13). U navedenoj simulaciji, pucaju vodikove veze Glu26-Arg87 i Glu26-Arg167 te π - π interakcija Trp27-Trp225. Grafovi udaljenosti tih interakcija pokazuju veće fluktuacije u usporedbi sa simulacijom u kojoj domene ostaju povezane (slika 13). Nadalje, graf udaljenosti domene HTH i FeoA pokazuje veće fluktuacije (vidljivo u vrijednosti standardne devijacije) i veću srednju vrijednost udaljenosti centra masa uspoređujući sa simulacijom koja ima očuvanu mrežu interakcija i povezane domene. Srednja vrijednost udaljenosti centra mase domena HTH i FeoA iznosila je $35 \pm 2,3$ Å, što je više od simulacije u kojoj je mreža interakcija očuvana (slika 13). Dakle, u slučaju simulacije koja je imala N-terminalne lance, graf pokazuje kako se prekida mreža interakcija te udaljenost domena HTH i FeoA raste. Međutim, u slučaju simulacije koja nije imala N-terminalne aminokiseline, mreža interakcija ostaje stabilna te se domene ne udaljavaju. Radi se samo o primjeru, odvajanje navedenih domena općenito nije ovisilo o prisutnosti N-terminalnih lanaca. Usporedbom udaljenosti se ne može

jasno razaznati do kojeg događaja dolazi prije – prekid mreže nekovalentnih interakcija ili odvajanje domena HTH i FeoA (slika 14).



Slika 13. Udaljenost ključnih nekovalentnih interakcija između aminokiselina Glu26, Trp27, Arg87, Arg167, Trp225 i udaljenost centra masa domene HTH i domene FeoA tijekom simulacije

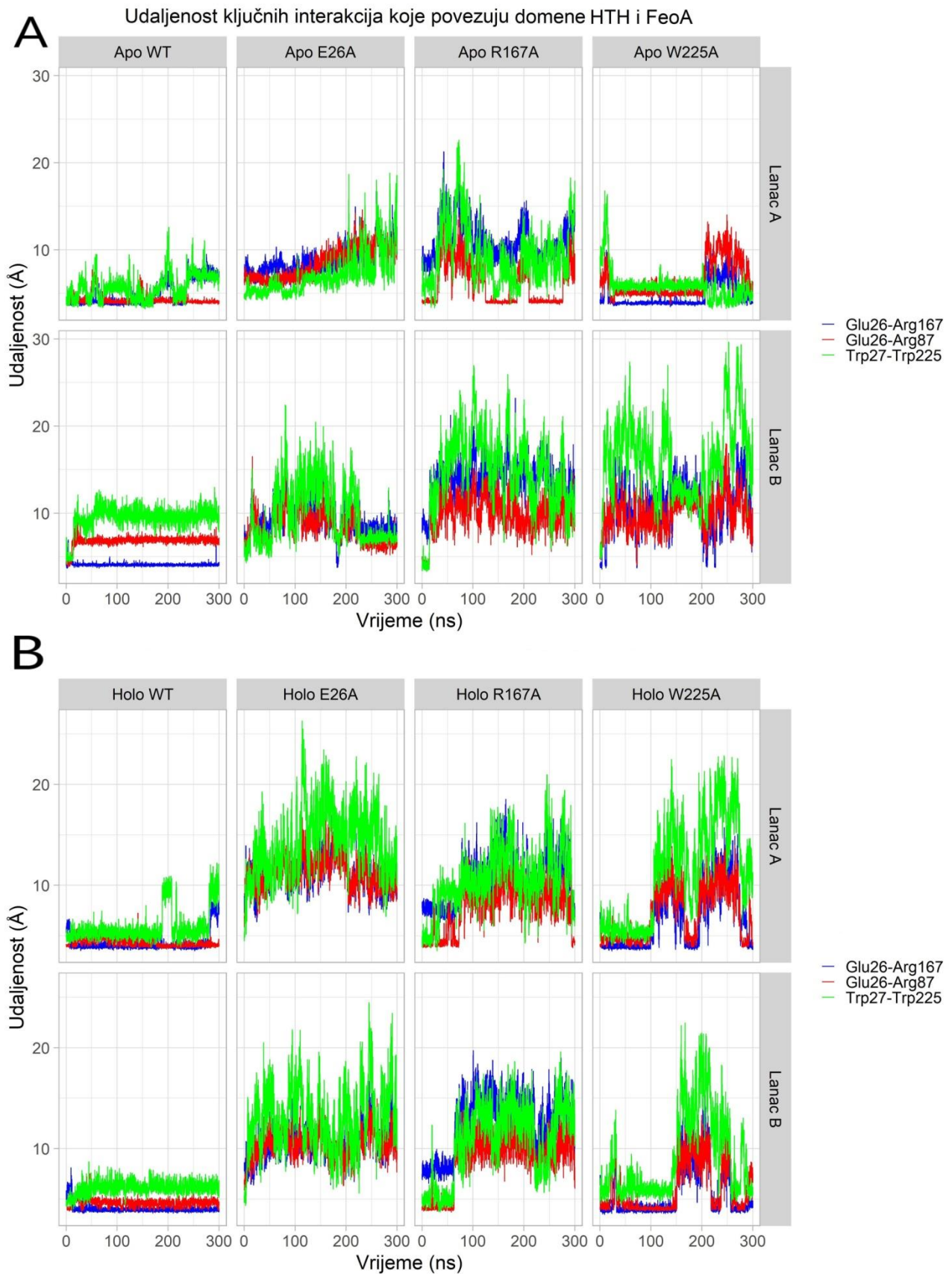
molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Prikazan je primjer simulacije s očuvanom mrežom nekovalentnih interakcija i stabilnom udaljenosti domena (domene ostaju povezane) - radi se o apo simulaciji protoniranoj pomoću programa H++ i koja nije sadržavala N-terminalne aminokiseline. Također je prikazan primjer simulacije u kojoj je pukla mreža interakcija te dolazi do odvajanja (udaljavanja) domene HTH i FeoA - isto se radi o apo simulaciji protoniranoj pomoću programa H++, no ova simulacija je sadržavala N-terminalne lance. U oba primjera je korišten samo B lanac. Na gornjem je grafu prikazana udaljenost interakcija koje povezuju domene HTH i FeoA. Radi se o vodikovoj vezi između Glu26 i Arg87 (crveno) te Glu26 i Arg167 (plavo) te π - π interakciji između Trp27 i Trp225 (zeleno). Donji prikaz sadrži graf udaljenosti centra masa domena HTH i FeoA u MD simulaciji za oba primjera. Na grafu je napisana srednja vrijednost i standardna devijacija udaljenosti centra masa domena HTH i FeoA.



Slika 14. Usporedba udaljenosti centra masa domena HTH i FeoA s udaljenosti svake od ključnih interakcija koje ih povezuju tijekom MD simulacije proteina MntR. Za računanje udaljenosti korišten je A lanac holo strukture s N-terminalnim lancima protoniran programom H++.

3.3.2. Odvajanje domena u mutantima proteina MntR

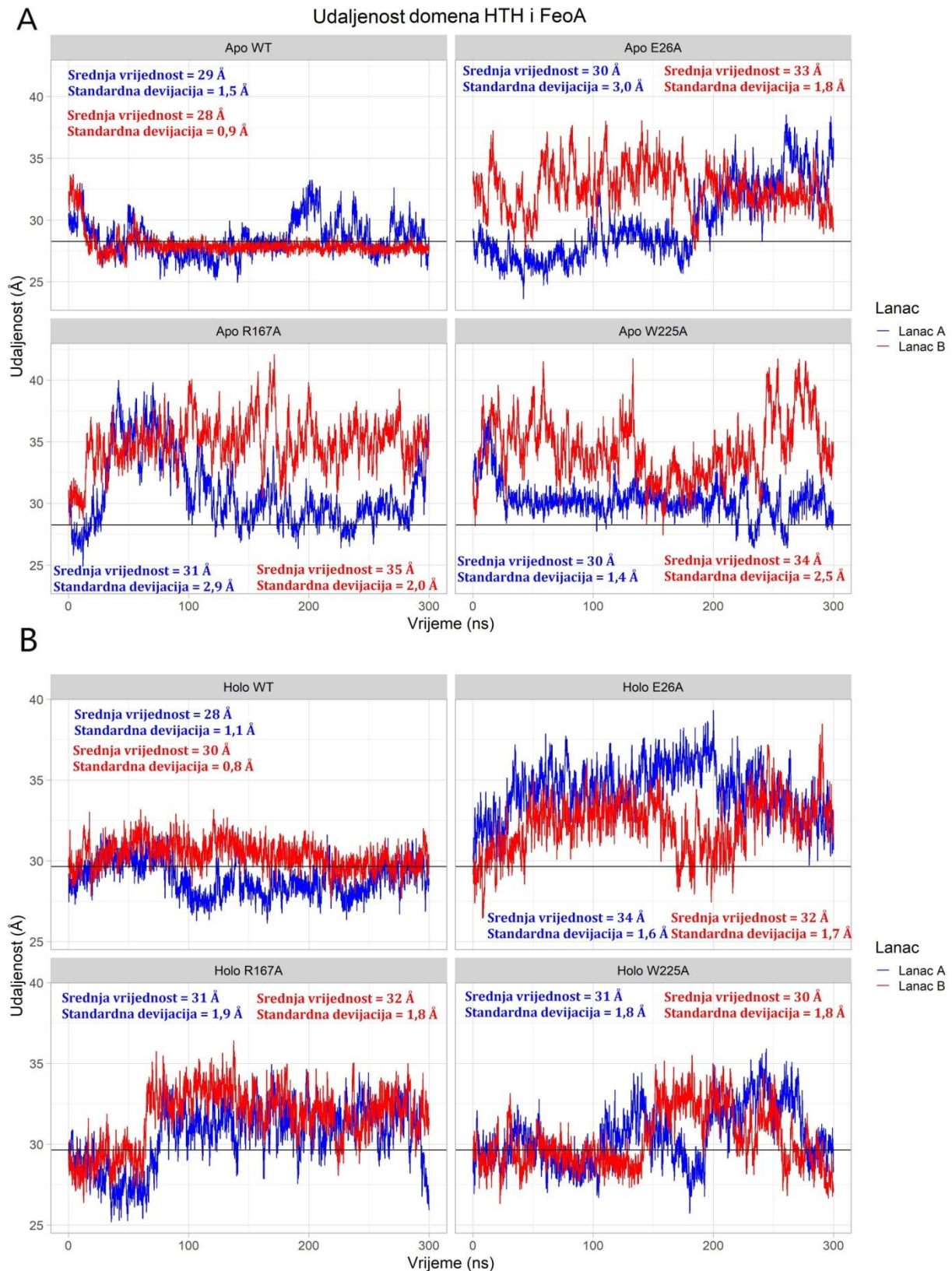
Kako bi se istražilo jesu li interakcije između aminokiselina Glu26, Trp27, Arg87, Arg167 i Trp225 ključne u povezivanju domena HTH i FeoA proteina MntR iz *M. tuberculosis*, napravljeni su *in silico* mutanti Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala. Izabrani su mutanti koji će imati prekinute mreže nekovalentnih interakcija te će se promatrati kako se to reflektira na udaljenost domena HTH i FeoA. Mutacija Glu26Ala prekida vodikove veze Glu26-Arg87 i Glu26-Arg167, a mutacija Arg167Ala prekida samo vodikovu vezu Glu26-Arg167. Mutacija Trp225Ala prekida π - π interakcije Trp27-Trp225 te Trp27-Arg167-Trp225 (ako je mreža interakcija u toj konformaciji, slika 12C). Ujedno alanin, s kojim su supstituirane ciljane aminokiseline, neće stvarati neke dodatne interakcije, nego će samo prekidati navedene mreže interakcija. Napravljeni su mutanti apo i holo struktura protoniranih programom H++ te su svi mutanti simulirani bez N-terminalnih lanaca (kako bi se uklonio njihov eventualni utjecaj). Navedene mutacije nisu imale znatnih razlika u protonaciji u usporedbi s divljim tipom. Izmjerene su udaljenosti interakcija Glu26-Arg87, Glu26-Arg167 i Trp27-Trp225 u simulacijama molekulske dinamike mutanata MntR (slika 15A i slika 15B). U usporedbi s divljim tipom, mutanti proteina MntR imaju puknute mreže interakcija. Simulacije divljeg tipa imaju udaljenosti navedenih interakcija na približno istoj vrijednosti tijekom MD simulacije, no simulacije mutanata pokazuju kako udaljenosti između aminokiselina rastu – pokazujući da je došlo do prekida njihove interakcije. Najizraženiji prekid interakcija u holo simulacijama zamjećuje se u mutaciji Glu26Ala (slika 15B), ali u apo simulaciji ta mutacija nema takav utjecaj (slika 15A). Mutacija Arg167Ala je imala najveći utjecaj na odvajanje aminokiselina u apo simulaciji (slika 15A). Općenito Trp225Ala mutacija ima najmanji utjecaj na odvajanje mreže interakcija.



Slika 15. Udaljenost vodikovih veza Glu26-Arg87 (crveno) i Glu26-Arg167 (plavo) te π - π interakcije Trp27-Trp225 (zeleno) u *in silico* mutantima Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala proteina MntR iz

bakterije *M. tuberculosis* tijekom simulacije molekulske dinamike. Udaljenost interakcije izmjerena je za svaku podjedinicu i za divlji tip. Udaljenost na ovom prikazu mjerena je samo za simulacije bez N-terminalnih lanaca i protoniranih pomoću programa H++. A) Udaljenost interakcija koje povezuju domene HTH i FeoA u apo simulacijama. Korištena je apo simulacija divljeg tipa proteina MntR te pripadajući *in silico* mutanti. B) Udaljenost interakcija koje povezuju domene HTH i FeoA u holo simulacijama. Korištena je holo simulacija divljeg tipa proteina MntR te pripadajući *in silico* mutanti.

Odvajanje domene HTH i FeoA je bilo stohastičko u simulacijama molekulske dinamike divljeg tipa. Međutim, u simulacijama mutanata proteina MntR dolazi do odvajanja domena u svakoj simulaciji i svakoj podjedinici proteina što ukazuje na važnost opažene mreže nekovalentnih interakcija na udaljenost domena HTH i FeoA. Izmjerene su udaljenosti domena HTH i FeoA za apo (slika 16A) simulacije i holo (slika 16B) simulacije. Mutanti su imali veće udaljenosti domena uspoređujući s divljim tipom. Svaka od korištenih mutacija je uzrokovala odvajanje domena HTH i FeoA. U apo simulacijama je najveću udaljenost domena imala simulacija mutanta Arg167Ala (slika 16A). Najveću udaljenost za holo simulacije pokazala je simulacija mutanta Glu26Ala (slika 16B).



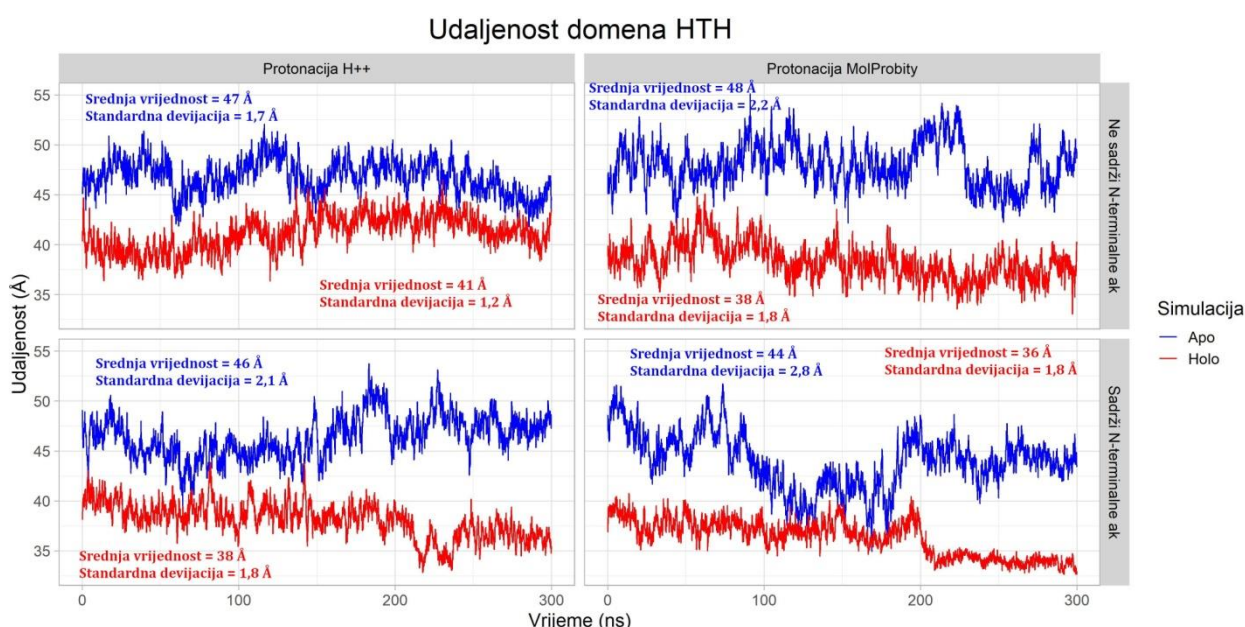
Slika 16. Udaljenost centra masa domena HTH i FeoA proteina MntR iz *M. tuberculosis* tijekom simulacija molekulske dinamike. Računate su udaljenosti domena za divlji tip proteina MntR i mutante: Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala. Prikazane su apo i holo strukture protonirane korištenjem programa H++ i bez N-terminalnih lanaca. Mjerena je udaljenost domena za A lanac

(plavo) i B lanac (crveno). Crna horizontalna linija predstavlja srednju udaljenost centra masa domena HTH i FeoA u simulacijama divljeg tipa. A) Udaljenost centra mase domena HTH i FeoA u apo simulacijama, B) Udaljenost centra mase domena HTH i FeoA u holo simulacijama.

3.4. Udaljenost domena HTH među podjedinicama apo i holo simulacija

3.4.1. Udaljenost domena HTH u divljem tipu proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*

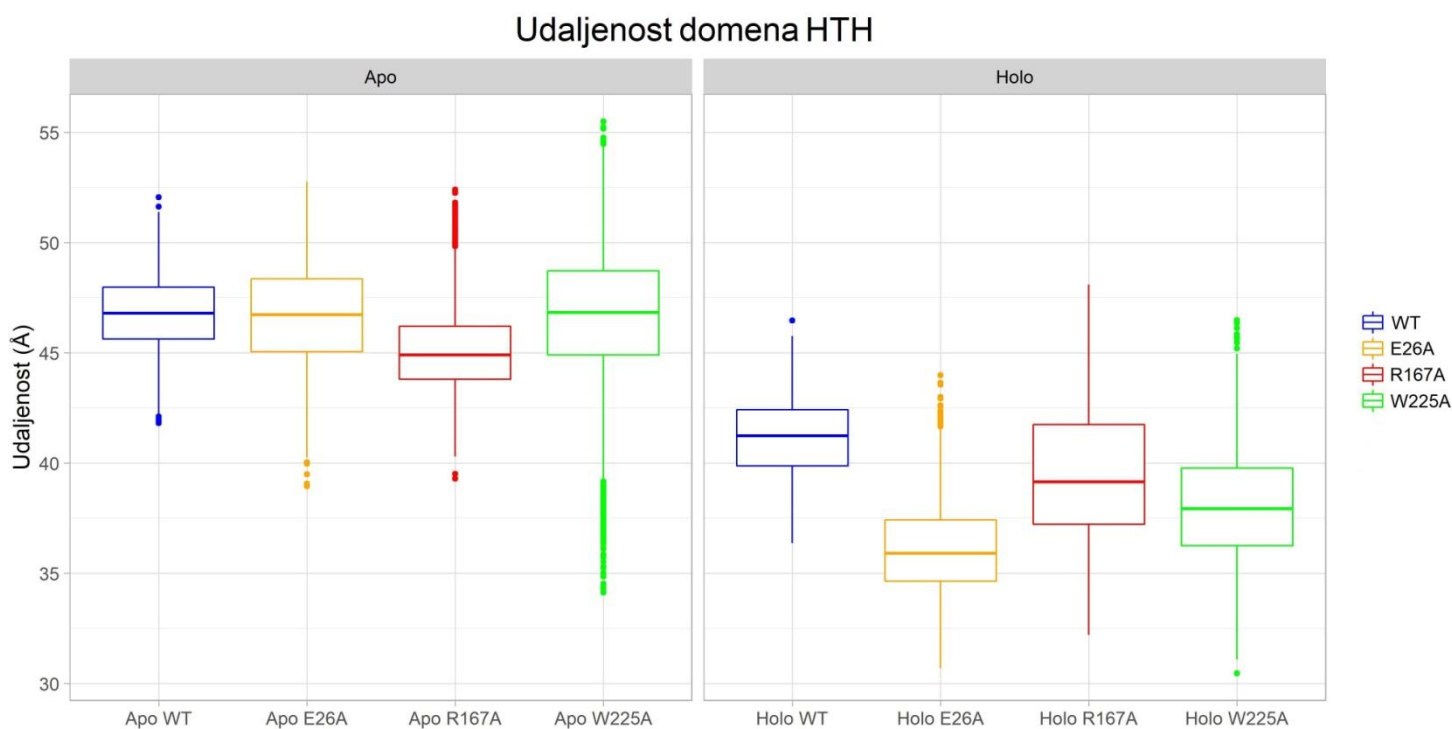
Protein MntR iz bakterije *M. tuberculosis* sadrži N-terminalnu HTH domenu čija je uloga u vezanju proteina za DNA. S obzirom da je protein MntR homodimer, sadrži dvije domene HTH– po jednu po podjedinici. Vezanje manganovih iona omogućava interakciju MntR s DNA, a apo MntR nema mogućnost vezanja DNA. Stoga postoji mogućnost da ioni mangana imaju ulogu u orijentaciji i konformaciji domena HTH u proteinu MntR. Izračunate su udaljenosti domena HTH među monomerima proteina MntR tijekom simulacija molekulske dinamike za apo i holo sustave (slika 17). Simulacije molekulske dinamike ukazuju da su domene HTH međusobno bliže u holo strukturi u usporedbi s apo strukturom, odnosno udaljenije u apo strukturi uspoređujući s holo strukturom, neovisno o protonaciji i prisutnosti N-terminalnih lanaca (slika 17).



Slika 17. Udaljenost centra masa domena HTH u proteinu MntR iz bakterije *M. tuberculosis* u simulacijama molekulske dinamike. Prikazane su samo apo i holo simulacije koje su protonirane korištenjem programa H++ ili MolProbity i prikazane su odvojeno one simulacije koje su imale N-terminalne lance od onih koje nisu. Apo simulacije su prikazane plavom bojom, a holo simulacije crvenom.

3.4.2. Udaljenost domena HTH u *in silico* mutantima proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*

U svrhu istraživanje mreže nekovalentnih interakcija koje povezuju domene HTH i FeoA, pripremljeni su *in silico* mutanti proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* - Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala. Prekidom mreže nekovalentnih interakcija uslijed uvedene mutacije - odvajaju se domene HTH i FeoA pa postoji mogućnost blagog približavanja domena HTH u proteinu MntR. Iz tog je razloga, računata udaljenost domena HTH u navedenim mutantima tijekom simulacije molekulske dinamike (slika 18). U simulacijama apo strukture MntR, mutanti Glu26Ala i Trp225Ala nemaju neke značajne razlike od divljeg tipa apo strukture. Međutim, mutacija Arg167Ala uzrokuje blago približavanje domena HTH u usporedbi s divljim tipom. U simulacijama holo strukture, svi mutanti imaju bliže domene HTH među podjedinicama od divljeg tipa holo proteina MntR. Najveće približavanje domena HTH u mutantima holo strukture uzrokuje mutacija Glu26Ala.



Slika 18. Udaljenost centra mase domena HTH među podjedinicama u divljem tipu i mutantima proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* tijekom MD simulacija. Udaljenost je računata za apo i holo simulacije divljeg tipa (plavo) te mutante Glu26Ala (narančasto), Arg167Ala (crveno) i Trp225Ala (zeleno).

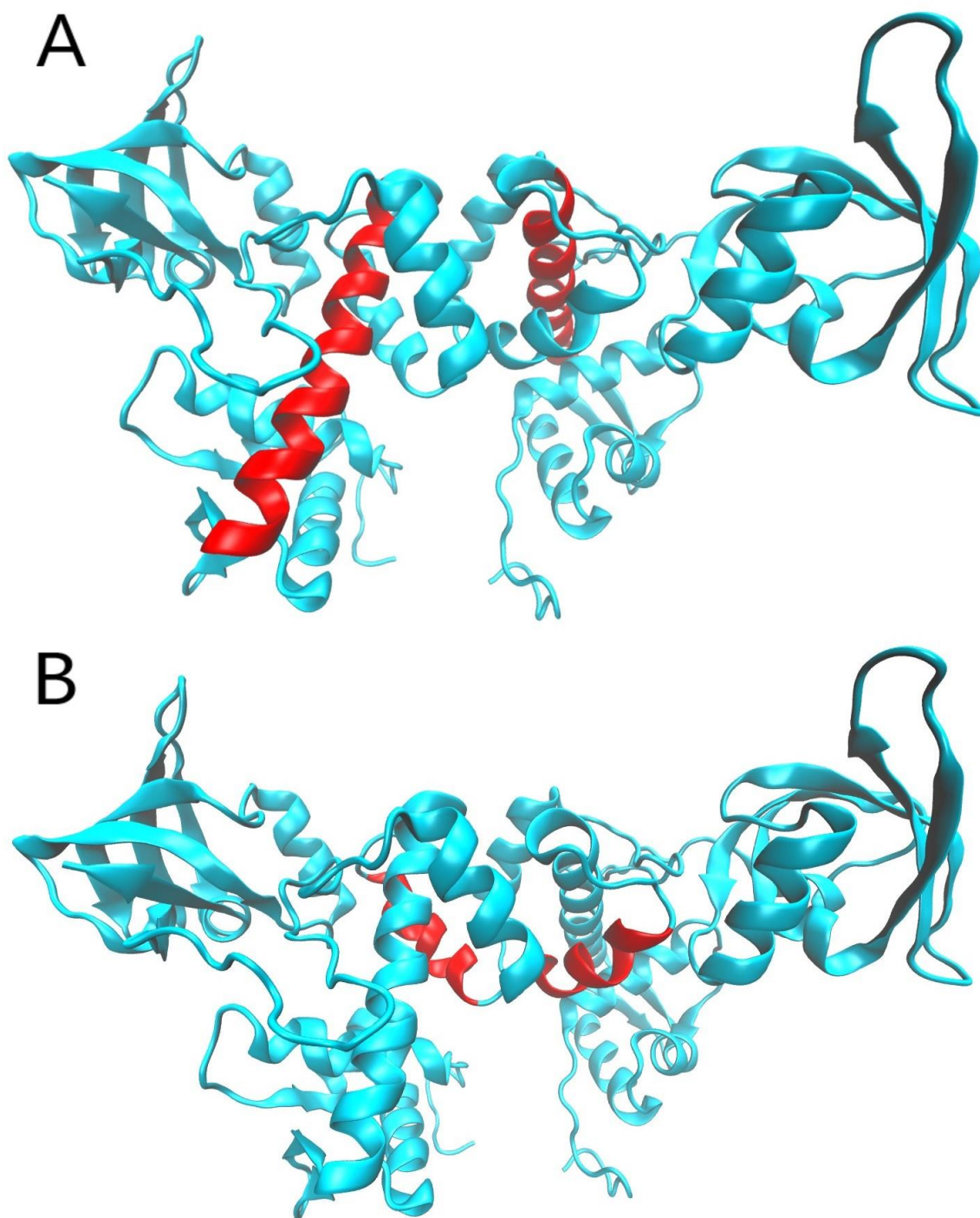
3.5. Fluktuiranje α -zavojnica

Promatranjem fluktuacija α -zavojnice 73-95 aminokiseline (slika 19A) i 103-113 aminokiseline (slika 19B) uočene su određene pravilnosti. Za svaku zavojnicu računane su RMSF vrijednosti od početka simulacije za svih 16 simulacija i sve podjedinice proteina (slika 20A i slika 20B).

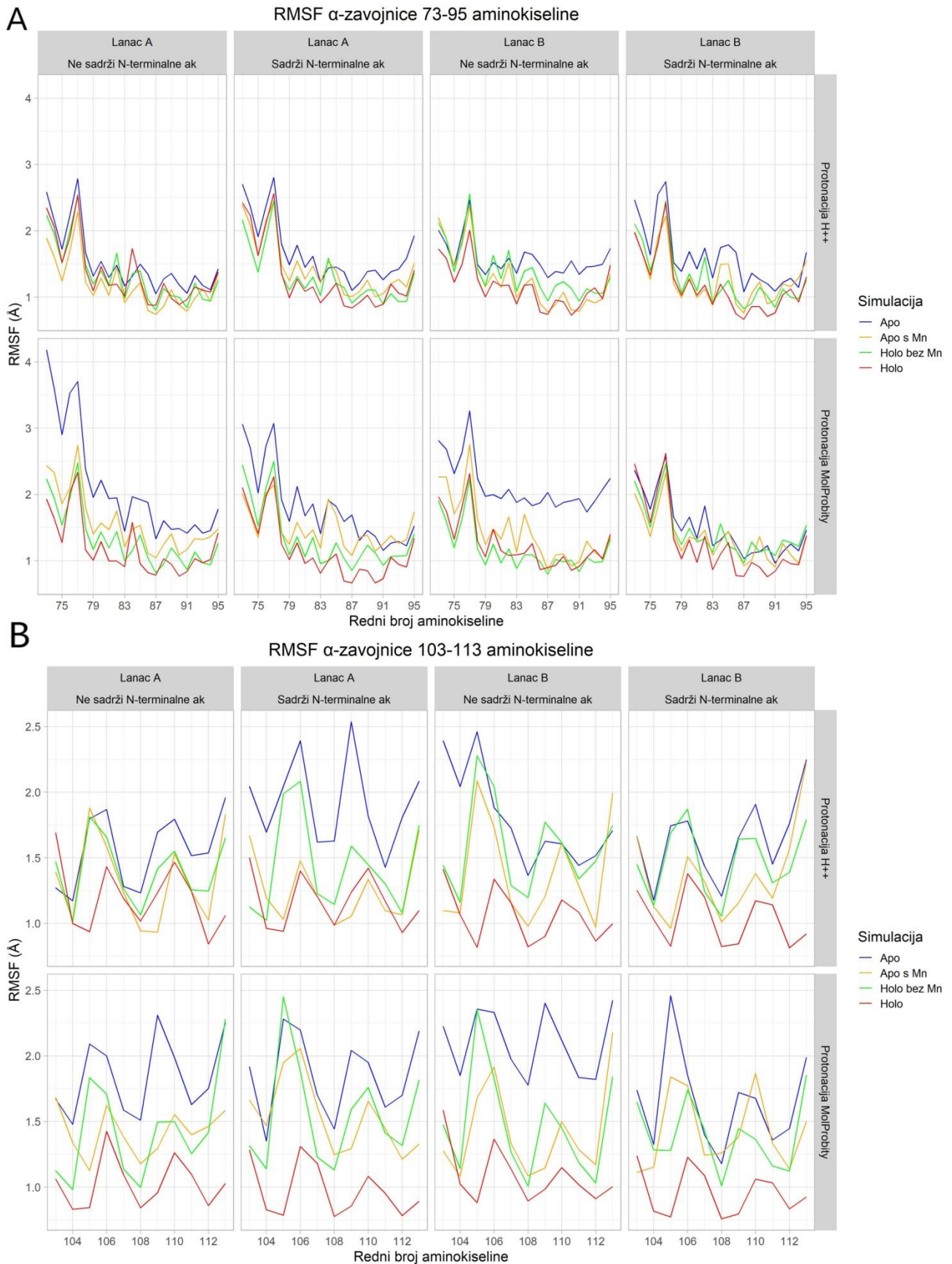
Aminokiseline 73-95 tvore α -zavojnicu koja je dio dimerizacijske domene i najduža je α -zavojnica ovoga proteina. Povezuje ostatak dimerizacijske domene s domenom HTH te sadrži aminokiseline koje koordiniraju manganove ione. U većini slučajeva simulacije apo strukture imaju veće RMSF vrijednosti ove α -zavojnice od holo strukture. Nadalje, simulacije apo strukture s nadodanim ionima mangana ima manju RMSF vrijednost ove α -zavojnice od apo strukture. Simulacija holo strukture bez iona mangana ima veće RMSF vrijednosti ove α -zavojnice od simulacije holo strukture kojoj nisu uklonjeni ioni mangana (slika 20A). Ovaj rezultat je neovisan o prisutnosti N-terminalnih lanaca, protonaciji i monomeru.

Aminokiseline 103-113 tvore α -zavojnicu smještenu u dimerizacijskoj domeni i sudjeluje u povezivanju među monomerima svojim hidrofobnim interakcijama. Štoviše, ta α -zavojnica također sadrži aminokiseline koje koordiniraju ione mangana u holo formi. Promatranjem RMSF vrijednosti ove α -zavojnice, zaključuje se isto kao i kod α -zavojnice 73-95 aminokiseline: MD simulacije (i) apo strukture u svakom slučaju imaju veće RMSF vrijednosti od holo strukture, (ii) apo strukture s nadodanim manganovim ionima imaju manje RMSF vrijednosti od apo strukture, (iii) te MD simulacije holo strukture bez manganovih iona imaju veće RMSF vrijednosti od holo struktura s manganovim ionima (slika 20B). Također, ovaj rezultat je neovisan o prisutnosti N-terminalnih lanaca, protonaciji i monomeru.

Ostale α -zavojnice kao α -zavojnica 14-26 (slika P4 u Prilogu), α -zavojnica 45-59 (slika P5 u Prilogu) te α -zavojnica 173-183 (slika P6 u Prilogu), nisu pokazale ovakav rezultat kao α -zavojnica 73-95 i α -zavojnica 103-113.



Slika 19. Struktura proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* s istaknutim α -zavojnica (obojano crveno) čije fluktuacije pokazuju određene pravilnosti u simulacijama molekulske dinamike. A) α -zavojnica koju tvore aminokiseline 73-95. B) α -zavojnica koju tvore aminokiseline 103-113.



Slika 20. RMSF vrijednosti α -zavojnica čije fluktuacije pokazuju određene pravilnosti. A) RMSF α -zavojnice koju tvore aminokiseline 73-95 proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. B) RMSF α -zavojnice koju tvore aminokiseline 103-113 proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Grafovi su

podijeljeni po sustavima za simulaciju – tako da su apo strukture označene plavom bojom, apo strukture s nadodanim ionima mangana u vezno mjesto označene narančastom bojom, holo strukture kojima su uklonjeni manganovi ioni označene su zelenom bojom te holo strukture su označene crvenom bojom. Navedene su strukture podijeljene na one simulirane bez N-terminalnih lanaca i one koje su simulirane s N-terminalnim lancima. Strukture su također podijeljene na one protonirane programom H++ i programom MolProbity. Iz razloga što je MntR dimer, prikazane su obje podjedinice.

4. Rasprava

4.1. N-terminalni lanci

Simulacije molekulske dinamike moćan su alat za proučavanje strukturnih i dinamičkih svojstava proteina i drugih (bioloških) (MD) makromolekula na molekularnoj razini. Kako bi se istražila ta svojstva proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*, provedene su MD simulacije tog proteina. MntR je homodimer koji ima ulogu regulatora homeostaze manganskih iona u bakteriji *M. tuberculosis* reverznom represijom transkripcije gena za unos Mn^{2+} iona (Pandey i sur. 2015). Jedno od njegovih obilježja jest što sadrži N-terminalne lance duljine 12 aminokiselina koji su jedinstveni za ovaj protein. Ti N-terminalni lanci su usporavali kristalizaciju proteina, zbog čega je kristalna struktura riješena bez tih aminokiselina (Cong i sur. 2018). Nije poznata ni uloga niti struktura N-terminalnih lanaca proteina MntR, ali su provedene MD simulacije s *in silico* modeliranim N-terminalnim lancima kako bi se dobio uvid u njihovu moguću funkciju. Analiza MD simulacija pokazuje da su N-terminalni lanci jako fleksibilni te je njihovo kretanje stohastičko i nepredvidljivo u simulacijama. Ovakav rezultat je u skladu s očekivanjima, s obzirom da dijelovi proteina velike fleksibilnosti ometaju kristalizaciju proteina te se teže detektiraju kristalografijom. Nadalje, MD simulacije pokazuju da su N-terminalni lanci međusobno bliži u holo strukturi proteina od onih u apo strukturi tijekom MD simulacija. Mogući razlog tome je što su i domene HTH (N-terminalne domene) međusobno bliže u holo strukturi od one u apo strukturi neovisno o prisutnosti N-terminalnih lanaca (poglavlje 4.4.). Štoviše, nemogućnost N-terminalnih lanaca da se stabiliziraju s veznim mjestom u simulacijama holo strukture (jer su u veznom mjestu manganski ioni), moguće također doprinosi tome da se N-terminalni lanci približe i stabiliziraju međusobno. Rezultat da N-terminalni lanci stvaraju međusobno interakcije u MD simulacijama s vezanim metalom, pokazan je i kod proteina IdeR iz *M. tuberculosis* (Ghosh i sur. 2015). Moguća uloga tih interakcija u proteinu IdeR je u orijentaciji zavojnica domene HTH čime pospješuje vezanje proteina za molekulu DNA. Stoga, vjerojatno ista ta uloga vrijedi i za N-terminalne lance proteina MntR, unatoč tome što su njegovi N-terminalni lanci duži od onih u proteinu IdeR.

Za N-terminalne lance proteina MntR može se zaključiti kako su jako fleksibilni i kako je njihovo kretanje stohastičko. Međutim, ovaj se zaključak temelji na *in silico* modeliranim N-terminalnim lancima – njihov prirodni izgled u proteinu nije ustanovljen. Kako bi se dobio precizniji rezultat, potrebno je za modeliranje N-terminalnih lanaca koristiti različite programe za *in silico* modeliranje 3D strukture proteina i uspoređivati njihov rezultat. Za predikciju 3D strukture proteina, trenutno su uspješni programi temeljeni na umjetnoj inteligenciji kao što je AlphaFold (Jumper i sur. 2021).

4.2. Koordinacija Mn²⁺ iona

Za represijsku aktivnost proteina MntR potrebni su ioni mangana koji stvaraju koordinacijsku vezu s aminokiselinama veznog mjesta. Uslijed vezanja iona mangana, vjerojatno dolazi do alosteričke promjene u proteinu MntR te on mijenja afinitet za DNA. Promatrala se koordinacija iona mangana u mononuklearnom i binuklearnom metalnom centru tijekom MD simulacija te se uspoređivala s koordinacijom u kristalnoj strukturi. Zamjećuje se da bočni ogranci aspartata koji koordiniraju manganove ione (Asp16, Asp133 i Asp137) izmjenjuju monodentatnu i bidentatnu koordinaciju tijekom MD simulacija. Međutim, aminokiselina Asp170 ne mijenja svoju koordinaciju tijekom MD simulacija. Ta aminokiselina koordinira oba iona mangana u jednoj podjedinici, a u drugoj koordinira samo jedan Mn²⁺ ion – dakle, koordinacija iona mangana se razlikuje među samim podjedinicama proteina. Ostali bočni ogranci koordinirajućih aminokiselina ostaju na sličnoj udaljenosti kao što su u kristalnoj strukturi.

U ovim MD simulacijama, sama koordinacijska veza mangana i koordinirajućih aminokiselina parametrizirana je neveznim parametrima modelirajući Van der Waalove i elektrostatske interakcije za opis te veze. Bilo bi preciznije, vjerodostojnije, ali i kompliciranije modelirati vezu metal-aminokiselina koristeći vezne parametre koji uzimaju u obzir kvantu prirodu koordinacijske veze. Korištenjem veznih parametara, izbjeglo bi se da se koordinacije razlikuju među podjedinicama kao što je ovdje slučaj kod Asp170. Međutim, također bi se onemogućilo izmjenjivanje koordinacije tijekom MD simulacije kao što se događa u slučaju aminokiselina Asp16, Asp133 i Asp137, što ne mora biti nužno realno i poželjno. Najvjerodostojniji opis koordinacije manganovih iona dobio bi se QM/MM simulacijama, no njih je moguće provesti samo na znatno kraćim vremenskim skalama (nekoliko redova veličine kraćim) od onih koje su korištene o ovom radu.

4.3. Mreža interakcija koja povezuje domene HTH i FeoA

MntR iz bakterije *M. tuberculosis* je homodimerni protein koji se može podijeliti na tri domene: N-terminalna HTH (DNA vezujuća) domena, dimerizacijska domena i C-terminalna FeoA domena (Cong i sur. 2018). Simulacijama molekulske dinamike pokazano je da su domene HTH i FeoA povezane mrežom nekovalentnih interakcija u kojoj su ključne aminokiseline Glu26 i Trp27 iz domene HTH, Arg87 iz dimerizacijske domene te Arg167 i Trp225 iz domene FeoA. Te aminokiseline mogu tvoriti dvije mreže nekovalentnih interakcija: jedna se sastoji od vodikovih veza Glu26-Arg87 i Glu26-Arg167 te π - π interakcije Trp27-Trp225, a druga se sastoji od vodikove veze Glu26-Arg87 i π - π interakcije Trp27-Arg167-Trp225. Tijekom nekih MD simulacija dolazi do prekida mreže nekovalentnih interakcija i odvajanja domena HTH i FeoA, ali u nekima se to nije dogodilo. Štoviše, navedeno odvajanje domena u MD simulacijama bilo je stohastičko i nije ovisilo o

protonaciji ili prisutnosti/odsutnosti N-terminalnih aminokiselina. U slučajevima kada ne dolazi do odvajanja domena HTH i FeoA, mreža nekovalentnih interakcija ostaje očuvana, a u slučajevima kada se domene odvoje, tada puca mreža nekovalentnih interakcija. Postavlja se pitanje dolazi li do odvajanja domena HTH i FeoA zbog pucanja mreže nekovalentnih interakcija ili mreža nekovalentnih interakcija puca zbog odvajanja domena HTH i FeoA? Usporedbom udaljenosti svake od nekovalentnih interakcija i udaljenosti domena HTH i FeoA, ne vidi se jasno što je uzrok, a što posljedica pa se tom usporedbom ne može dobiti odgovor na prethodno pitanje.

U svrhu istraživanja uloge stabilnosti mreže nekovalentnih interakcija u održavanju domena HTH i FeoA povezanima, napravljeni su *in silico* mutanti proteina MntR koji su imali prekinutu mrežu nekovalentnih interakcija. Provedene su MD simulacije *in silico* mutanata Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala. Rezultati MD simulacija mutanata proteina MntR pokazuju da navedene mutacije uzrokuju pucanje mreže nekovalentnih interakcija te odvajanje domena HTH i FeoA svake podjedinice proteina u svakoj simulaciji, potvrđujući da je navedena mreža interakcija neophodna za povezanost domena. Dakle, prekidanje mreže nekovalentnih interakcija aminokiselina Glu26, Trp27, Arg87, Arg167 i Trp225 je uzrok primijećenog odvajanja domena HTH i FeoA. Mutacija Glu26Ala ima izražen utjecaj na prekidanje mreže nekovalentnih interakcija jer prekida obje vodikove veze Glu26-Arg87 i Glu26-Arg167. Nadalje, mutacija Trp225Ala prekida samo interakciju između Trp27 i Trp225 ostavljajući vodikove veze neometenima. Međutim, unatoč tome što ta mutacija ne prekida direktno vodikove veze Glu26-Arg87 i Glu26-Arg167, dolazi do pucanja navedenih vodikovih veza tijekom simulacija indicirajući da je π - π interakcija spomenutih triptofana potrebna kako bi mreža nekovalentnih interakcija ostala očuvana. Zato što mutacija Trp225Ala ne prekida direktno navedene vodikove veze one se kasnije u MD simulacijama odvoje u usporedbi s mutantima Glu26Ala i Arg167Ala.

Mreža interakcija koja povezuje domene HTH i FeoA je mogući alosterički mehanizam proteina MntR koji je potrebno detaljnije istražiti računalnim i eksperimentalnim metodama. Rezultatima MD simulacija je potrebna eksperimentalna potvrda. Moguću validaciju (ili invalidaciju) dobivenih rezultata MD simulacija može se razriješiti NMR spektroskopijom jer je to metoda kojom se mogu promatrati dinamička svojstva proteina u otopini. Mutanti Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala imati će prekinute mreže nekovalentnih interakcija te će im se odvojiti domene HTH i FeoA (to je barem rezultat MD simulacija), ali nije jasno što će uzrokovati te mutacije glede funkcije proteina MntR. Kako bi se i istražio utjecaj spomenutih mutacija na funkciju proteina MntR, potrebno je metodama genetičkog inženjerstva konstruirati navedene mutante te im se eksperimentalno može potvrditi utjecaj na ulogu (primjerice ispitati mogu li mutirani proteini vezati DNA).

4.4. Udaljenost domena HTH

N-terminalna HTH domena proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* neophodna je za njegovu funkciju u stanici. Uloga te domene jest vezanje DNA čime MntR represira transkripciju gena za unos manganovih iona. Dok holo struktura proteina ima mogućnost vezanja DNA, apo struktura nema, stoga je očekivano da razlika apo i holo strukture bude vidljiva upravo u domeni HTH. Iz kristalnih struktura apo i holo proteina MntR, zapaža se kako su domene HTH među podjedinicama bliže u holo strukturi uspoređujući s apo strukturom (Cong i sur. 2018). Uzrok tog približavanja jest rotacija monomera duž osi paralelne s dimerizacijskom domenom u holo strukturi (Cong i sur. 2018). Provedene su MD simulacije kako bi se istražio odnos domena HTH među monomerima proteina MntR. Simulacije molekulske dinamike pokazale su da su domene HTH holo strukture međusobno bliže u usporedbi s domenama HTH apo strukture i one ostaju bliže tijekom cijele duljine MD simulacija. Ovaj rezultat zapaža se bez obzira na program koji je korišten za protonaciju početne strukture za simulaciju. Isto tako, prisutnost N-terminalnih lanaca nije imala utjecaj na približavanje domena HTH u holo strukturi. Rezultat da apo simulacije imaju udaljenije domene HTH, odnosno da holo simulacije imaju bliže domene HTH, implicira moguću hipotezu o mehanizmu proteina MntR. Vezanje iona mangana uzrokuje približavanje domena HTH čime ovaj transkripcijski faktor mijenja afinitet za molekulu DNA.

Udaljenost domena HTH računata je i za mutante Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala koji imaju prekinutu mrežu nekovalentnih interakcija te im dolazi do odvajanja domena HTH i FeoA. Ovakvo odvajanje domena moguće rezultira i približavanjem domena HTH pa su se radile usporedbe udaljenosti domena HTH mutanta i divljeg tipa. Rezultati MD simulacija otkrivaju da navedeni mutanti imaju bliže domene HTH uspoređujući s divljim tipom proteina. Međutim, navedene mutacije imaju jači utjecaj na približavanje domena HTH holo strukture nego apo strukture. Simulacije apo strukture divljeg tipa i mutanata imaju vrlo slične udaljenost domena HTH, izuzetak je jedino apo mutant Arg167Ala koji ima domene HTH znatno bliže. Simulacije mutanata holo strukture imaju bliže domene HTH od divljeg tipa. Najveći utjecaj na približavanje domena HTH holo strukture imala je mutacija Glu26Ala. Navedeni rezultati ukazuju da uz prekidanje mreže nekovalentnih interakcija i odvajanje domena HTH i FeoA; mutacije Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala imaju učinak približavanja domena HTH među monomerima proteina MntR. Navedeni je rezultat potrebno eksperimentalno potvrditi. Približavanje domena HTH može imati utjecaj na vezanje proteina na DNA. Dodatnim MD simulacijama proteina MntR sa spomenutim mutacijama može se istražiti mogućnost mutanata u vezanju DNA, a eksperimentom se mogu dodatno potvrditi te simulacije.

4.5. Fluktuiranje α -zavojnica

Fleksibilnost pojedinih aminokiselina tijekom MD simulacije kvantificira se koristeći RMSF vrijednosti – veći RMSF označava veće fluktuacije, a manji RMSF manje. Uočene su pravilnosti u fluktuacijama pojedinih α -zavojnica proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Radi se o dvije α -zavojnice smještene u dimerizacijskoj domeni: jednu tvore aminokiseline 73-95, a drugu aminokiseline 103-113. U svakoj simulaciji, navedene α -zavojnice imaju veće RMSF vrijednosti u simulacijama apo strukture u usporedbi s holo strukturom. To indicira da su te α -zavojnice pokretnije u odsutnosti manganovih iona. Nadalje, dodavanjem iona mangana u vezno mjesto apo strukture uzrokuje smanjenje RMSF vrijednosti aminokiselina tih α -zavojnica, odnosno one postaju manje fleksibilne. Uklanjanje iona mangana iz holo strukture uzrokuje da te α -zavojnice postaju pokretnije tijekom MD simulacija. Ovakav rezultat se nije primijetio kod ostalih α -zavojnica proteina.

Rezultati indiciraju da fleksibilnost α -zavojnica kojih tvore aminokiseline 73-95 i aminokiseline 103-113 ovisi o prisutnosti iona mangana u veznom mjestu proteina MntR. Navedene α -zavojnice manje fluktuiraju u simulacijama struktura koje sadrže ione mangana u veznom mjestu, a više fluktuiraju u odsutnosti Mn^{2+} iona. Mogući uzrok ovisnosti razine fluktuacija o prisutnosti iona mangana u veznom mjestu je to što te α -zavojnice sadržavaju aminokiseline koje koordiniraju ione mangana ili su u blizini aminokiselina koje koordiniraju ione mangana. Među aminokiselinama koje tvore α -zavojnicu 73-95 spadaju aminokiseline His86 i Glu90 koje koordiniraju manganove ione te je ta α -zavojnica u blizini His105 koji također koordinira Mn^{2+} . U blizini His105 je α -zavojnica koju tvore aminokiseline 103-113. Ta α -zavojnica također sadrži aminokiseline koje koordiniraju Mn^{2+} ione, radi se o aminokiselinama Glu109, Glu112 i His113. U simulacijama struktura koje su sadržavala ione mangana, koordinirajuće su aminokiseline fiksirane jer stvaraju koordinacijsku vezu s Mn^{2+} . U simulacijama struktura bez Mn^{2+} iona nema stvaranja koordinacijske veze pa se te aminokiseline mogu slobodnije kretati. Ova fiksacija aminokiselina koje stvaraju koordinacijsku vezu je vjerojatni uzrok opadanja razine fluktuiranja α -zavojnica 73-95 aminokiseline i 103-113 aminokiseline.

5. Zaključak

Rezultati MD (engl. *Molecular Dynamics*) simulacija pokazuju kako je jedna od ključnih razlika apo i holo strukture proteina MntR u tome što holo struktura sadrži međusobno bliže domene HTH (engl. *Helix-Turn-Helix*). Ovaj se rezultat reflektira na *in silico* modelirane N-terminalne lance koji su isto međusobno bliži u MD simulacijama holo strukture. Vežanje manganovih iona mijenja afinitet proteina MntR za DNA, a mjesto vežanja DNA se nalazi u domeni HTH te je stoga očekivano da se razlika apo i holo strukture primijeti u domeni HTH. Približavanje domena HTH i N-terminalnih lanaca prilikom vežanja manganovih iona mogući je mehanizam aktivacije proteina MntR za vežanje na DNA.

Osim približavanja domena HTH, vežanje Mn^{2+} iona uzrokuje smanjenje fleksibilnosti α -zavojnica koje sadrže aminokiseline koje koordiniraju manganove ione. Ovo smanjenje fleksibilnosti primjećuje se kod α -zavojnica kojih tvore aminokiseline 73-95 i 103-113. Razina fluktuiranja tih α -zavojnica još jedna je razlika apo i holo forme proteina.

Tijekom simulacija molekulske dinamike uočene su promjene u koordinacijskoj sferi iona mangana. Razlog promjena je korištenje samo neveznih parametara za opis interakcija između manganova iona i aminokiselina. Najveće razlike u koordinaciji uočene su kod aminokiselinskih ograna aspartata kod kojih se izmjenjuju bidentatna i monodentatna koordinacija.

Analizom MD simulacija otkrivena je mreža nekovalentnih interakcija koje povezuju domene HTH i FeoA. Ona se sastoji od aminokiselina Glu26, Trp27, Arg87, Arg167 i Trp225. Udaljenost domena HTH i FeoA ovisi o stabilnosti nekovalentnih interakcija tih aminokiselina. Prekidanje te mreže interakcija *in silico* uvedenim mutacijama Glu26Ala, Arg167Ala i Trp225Ala uzrokovalo je odvajanje domena HTH i FeoA - dokazujući da je prekid mreže nekovalentnih interakcija uzrok odvajanja domena. Osim odvajanja domena HTH i FeoA, prekid mreže nekovalentnih interakcija uzrokuje i približavanje domena HTH među podjedinicama proteina MntR. Navedeno približavanje domena HTH je značajnije u simulacijama holo strukture te će moguće imati utjecaj na sposobnost proteina da veže DNA. Dodatne simulacije molekulske dinamike uz eksperimentalne metode dat će detaljniju i kompletniju sliku mehanizma proteina MntR.

6. Literatura

Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. V. (2012). H++ 3.0: automating p K prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic acids research*, 40(W1), W537-W541.

Bell, L. C., & Noursadeghi, M. (2018). Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. *Nature Reviews Microbiology*, 16(2), 80-90.

Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2007). The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic acids research*, 35(suppl_1), D301-D303.

Boyd, J., Oza, M. N., & Murphy, J. R. (1990). Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (dtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(15), 5968-5972.

Capdevila, D. A., Edmonds, K. A., & Giedroc, D. P. (2017). Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays in biochemistry*, 61(2), 177-200.

Case, D. A., Belfon, K., Ben-Shalom, I., Brozell, S. R., Cerutti, D., Cheatham, T., ... & Kollman, P. A. (2020). Amber 2020.

Chakaya, J., Khan, M., Ntoumi, F., Aklillu, E., Fatima, R., Mwaba, P., ... & Zumla, A. (2021). Global Tuberculosis Report 2020—Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. *International Journal of Infectious Diseases*. S7-S12.

Chandrangsu, P., Rensing, C., & Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), 338-350.

Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 12-21.

Cong, X., Yuan, Z., Wang, Z., Wei, B., Xu, S., & Wang, J. (2018). Crystal structures of manganese-dependent transcriptional repressor MntR (Rv2788) from *Mycobacterium tuberculosis* in apo and manganese bound forms. *Biochemical and biophysical research communications*, 501(2), 423-427.

- Davidchack, R. L., Handel, R., & Tretyakov, M. V. (2009). Langevin thermostat for rigid body dynamics. *The Journal of chemical physics*, *130*(23), 234101.
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., ... & Richardson, D. C. (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research*, *35*(suppl_2), W375-W383.
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, *5*(1).
- Djoko, K. Y., Cheryl-lynn, Y. O., Walker, M. J., & McEwan, A. G. (2015). The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(31), 18954-18961.
- Do, H., Makthal, N., Chandransu, P., Olsen, R. J., Helmann, J. D., Musser, J. M., & Kumaraswami, M. (2019). Metal sensing and regulation of adaptive responses to manganese limitation by MtsR is critical for group A streptococcus virulence. *Nucleic acids research*, *47*(14), 7476-7493.
- Ghosh, S., Chandra, N., & Vishveshwara, S. (2015). Mechanism of iron-dependent repressor (IdeR) activation and DNA binding: a molecular dynamics and protein structure network study. *PLoS computational biology*, *11*(12), e1004500.
- Guerry, P., & Herrmann, T. (2011). Advances in automated NMR protein structure determination. *Quarterly reviews of biophysics*, *44*(3), 257-309.
- Gupta, R. K., Lucas, S. B., Fielding, K. L., & Lawn, S. D. (2015). Prevalence of tuberculosis in post-mortem studies of HIV-infected adults and children in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis. *AIDS (London, England)*, *29*(15), 1987.
- Helmann, J. D. (2014). Specificity of metal sensing: iron and manganese homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(41), 28112-28120.
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, *99*(6), 1129-1143.

- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(8), 525-537.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, *14*(1), 33-38.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589.
- Juttukonda, L. J., & Skaar, E. P. (2015). Manganese homeostasis and utilization in pathogenic bacteria. *Molecular microbiology*, *97*(2), 216-228.
- Kay, L. E. (2011). NMR studies of protein structure and dynamics. *Journal of magnetic resonance*, *213*(2), 477-491.
- Kehl-Fie, T. E., & Skaar, E. P. (2010). Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current opinion in chemical biology*, *14*(2), 218-224.
- Kim, M. O., Nichols, S. E., Wang, Y., & McCammon, J. A. (2013). Effects of histidine protonation and rotameric states on virtual screening of *M. tuberculosis* RmlC. *Journal of computer-aided molecular design*, *27*(3), 235-246.
- Lang, E. J., Heyes, L. C., Jameson, G. B., & Parker, E. J. (2016). Calculated p K a Variations Expose Dynamic Allosteric Communication Networks. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(6), 2036-2045.
- Lee, M. Y., Lee, D. W., Joo, H. K., Jeong, K. H., & Lee, J. Y. (2019). Structural analysis of the manganese transport regulator MntR from *Bacillus halodurans* in apo and manganese bound forms. *PloS one*, *14*(11), e0224689.
- Li, P., & Merz Jr, K. M. (2014). Taking into account the ion-induced dipole interaction in the nonbonded model of ions. *Journal of chemical theory and computation*, *10*(1), 289-297.
- Lieser, S. A., Davis, T. C., Helmann, J. D., & Cohen, S. M. (2003). DNA-binding and oligomerization studies of the manganese (II) metalloregulatory protein MntR from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, *42*(43), 12634-12642.

- Liu, C., Mao, K., Zhang, M., Sun, Z., Hong, W., Li, C., ... & Chang, Z. (2008). The SH3-like domain switches its interaction partners to modulate the repression activity of mycobacterial iron-dependent transcription regulator in response to metal ion fluctuations. *Journal of Biological Chemistry*, 283(4), 2439-2453.
- Liu, J., & Nussinov, R. (2016). Allostery: an overview of its history, concepts, methods, and applications. *PLoS computational biology*, 12(6), e1004966.
- Liu, X., Tian, W., Cheng, J., Li, D., Liu, T., & Zhang, L. (2020). Microsecond molecular dynamics simulations reveal the allosteric regulatory mechanism of p53 R249S mutation in p53-associated liver cancer. *Computational biology and chemistry*, 84, 107194.
- McGuire, A. M., Cuthbert, B. J., Ma, Z., Grauer-Gray, K. D., Brunjes Brophy, M., Spear, K. A., ... & Glasfeld, A. (2013). Roles of the A and C sites in the manganese-specific activation of MntR. *Biochemistry*, 52(4), 701-713.
- Merchant, A. T., & Spatafora, G. A. (2014). A role for the DtxR family of metalloregulators in gram-positive pathogenesis. *Molecular oral microbiology*, 29(1), 1-10.
- Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), 413-451.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., & Niederweis, M. (2015). Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunological reviews*, 264(1), 249-263.
- Onufriev, A. (2008). Implicit solvent models in molecular dynamics simulations: A brief overview. *Annual Reports in Computational Chemistry*, 4, 125-137.
- Pandey, R., & Rodriguez, G. M. (2014). IdeR is required for iron homeostasis and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 91(1), 98-109.
- Pandey, R., Russo, R., Ghanny, S., Huang, X., Helmann, J., & Rodriguez, G. M. (2015). MntR (Rv2788): a transcriptional regulator that controls manganese homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 98(6), 1168-1183.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.

Pignatello, J. J., Oliveros, E., & MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical reviews in environmental science and technology*, 36(1), 1-84.

Pohl, E., Holmes, R. K., & Hol, W. G. (1999). Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *Journal of molecular biology*, 285(3), 1145-1156.

Russell, D. G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(8), 569-578.

Roe, D. R., & Cheatham III, T. E. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of chemical theory and computation*, 9(7), 3084-3095

Sharma, S. K., Mohan, A., & Kadiravan, T. (2005). HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis & management. *Indian Journal of Medical Research*, 121(4), 550-567.

Spatafora, G., Corbett, J., Cornacchione, L., Daly, W., Galan, D., Wysota, M., ... & Glasfeld, A. (2015). Interactions of the metalloregulatory protein SloR from *Streptococcus mutans* with its metal ion effectors and DNA binding site. *Journal of bacteriology*, 197(22), 3601-3615.

Stoll, K. E., Draper, W. E., Kliegman, J. I., Golynskiy, M. V., Brew-Appiah, R. A., Phillips, R. K., ... & Glasfeld, A. (2009). Characterization and structure of the manganese-responsive transcriptional regulator ScaR. *Biochemistry*, 48(43), 10308-10320..

Sussman, J. L., Lin, D., Jiang, J., Manning, N. O., Prilusky, J., Ritter, O., & Abola, E. E. (1998). Protein Data Bank (PDB): database of three-dimensional structural information of biological macromolecules. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 54(6), 1078-1084.

Tian, C., Kasavajhala, K., Belfon, K. A., Raguetta, L., Huang, H., Miguez, A. N., ... & Simmerling, C. (2019). ff19SB: Amino-acid-specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution. *Journal of chemical theory and computation*, 16(1), 528-552.

Tsukamura, M. (1967). Identification of mycobacteria. *Tubercle*, 48(4), 311-338.

Twigg, P. D., Parthasarathy, G., Guerrero, L., Logan, T. M., & Caspar, D. L. D. (2001). Disordered to ordered folding in the regulation of diphtheria toxin repressor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11259-11264.

Van Gunsteren, W. F., Bakowies, D., Baron, R., Chandrasekhar, I., Christen, M., Daura, X., ... & Yu, H. B. (2006). Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(25), 4064-4092.

Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.

Westbrook, J. D., & Fitzgerald, P. M. (2003). The PDB format, mmCIF formats, and other data formats. *Structural bioinformatics*, 44, 159-179.

Whalen, C., Horsburgh, C. R., Hom, D., Lahart, C., Simberkoff, M., & Ellner, J. (1995). Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 151(1), 129-135.

Wisedchaisri, G., Holmes, R. K., & Hol, W. G. (2004). Crystal structure of an IdeR–DNA complex reveals a conformational change in activated IdeR for base-specific interactions. *Journal of molecular biology*, 342(4), 1155-1169.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2008). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *The FEBS journal*, 275(1), 1-21.

Wylie, G. P., Rangachari, V., Bienkiewicz, E. A., Marin, V., Bhattacharya, N., Love, J. F., ... & Logan, T. M. (2005). Prolylpeptide binding by the prokaryotic SH3-like domain of the diphtheria toxin repressor: a regulatory switch. *Biochemistry*, 44(1), 40-51.

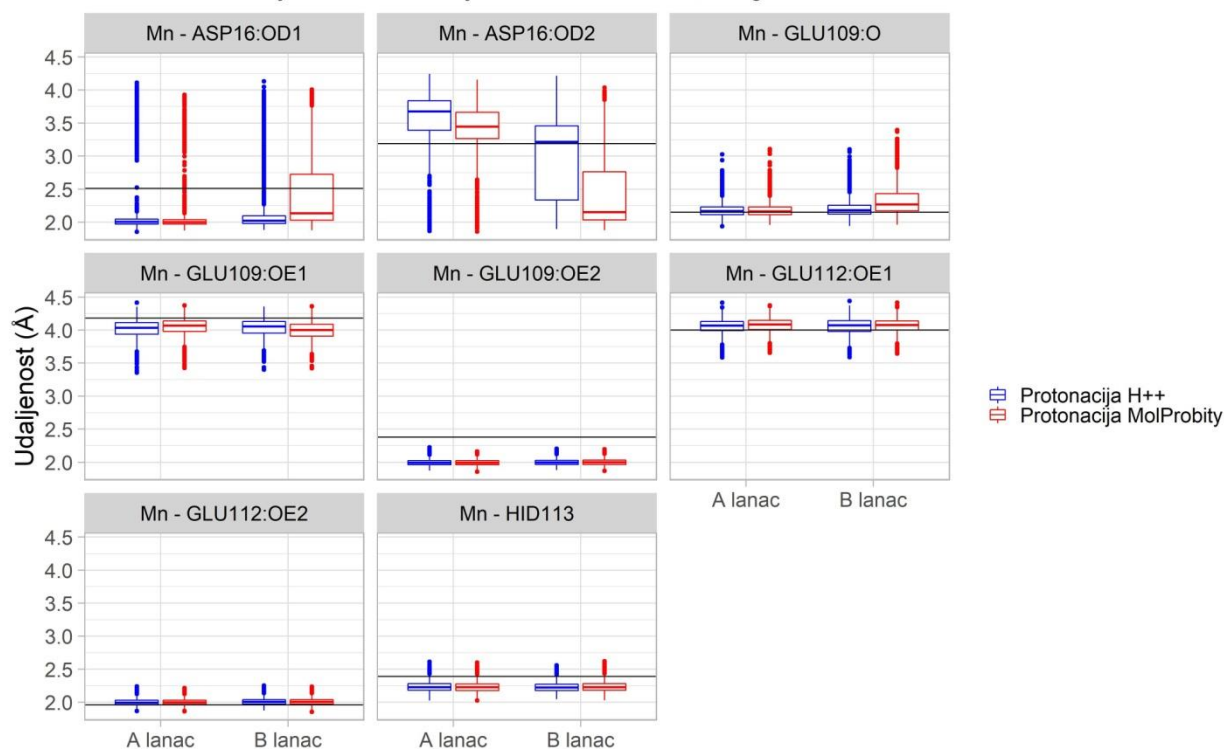
Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C. C., Pettersen, E. F., ... & Ferrin, T. E. (2012). UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. *Journal of structural biology*, *179*(3), 269-278.

Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., & Sun, Z. (1999). Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of bacteriology*, *181*(7), 2044-2049.

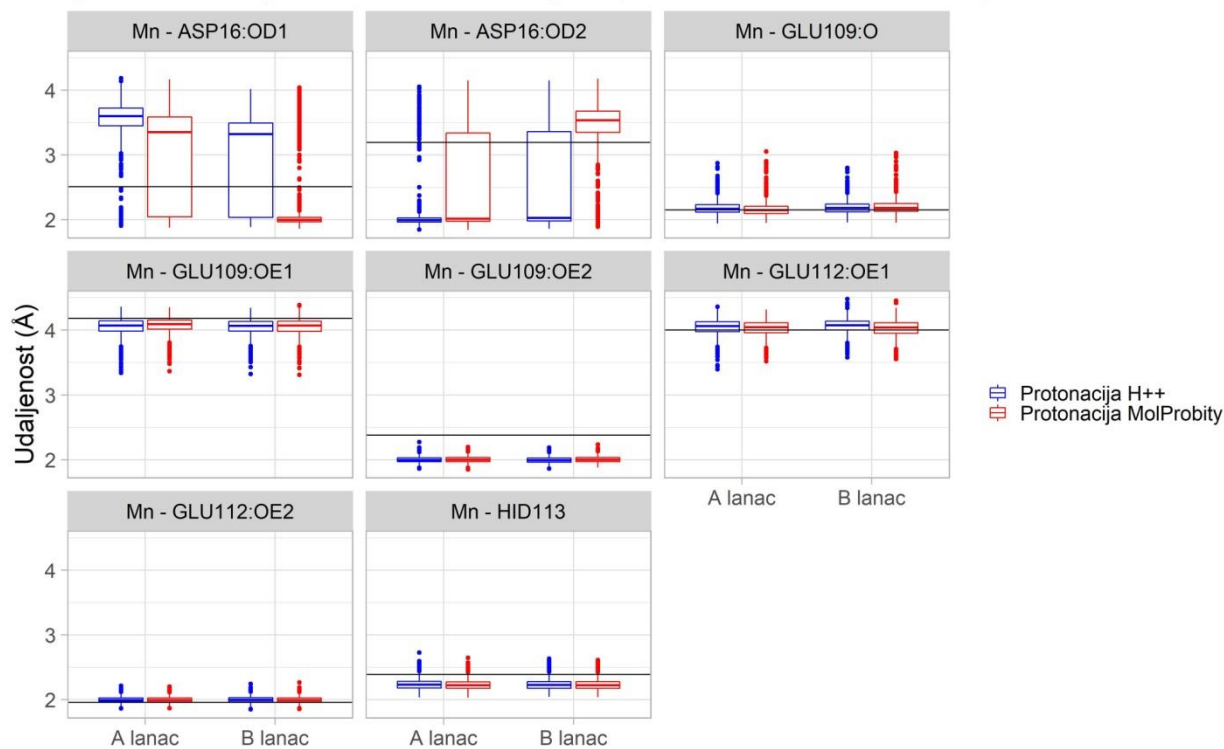
Zondervan, N. A., Van Dam, J. C., Schaap, P. J., Martins dos Santos, V. A., & Suarez-Diez, M. (2018). Regulation of three virulence strategies of *Mycobacterium tuberculosis*: a success story. *International journal of molecular sciences*, *19*(2), 347.

7. Prilozi

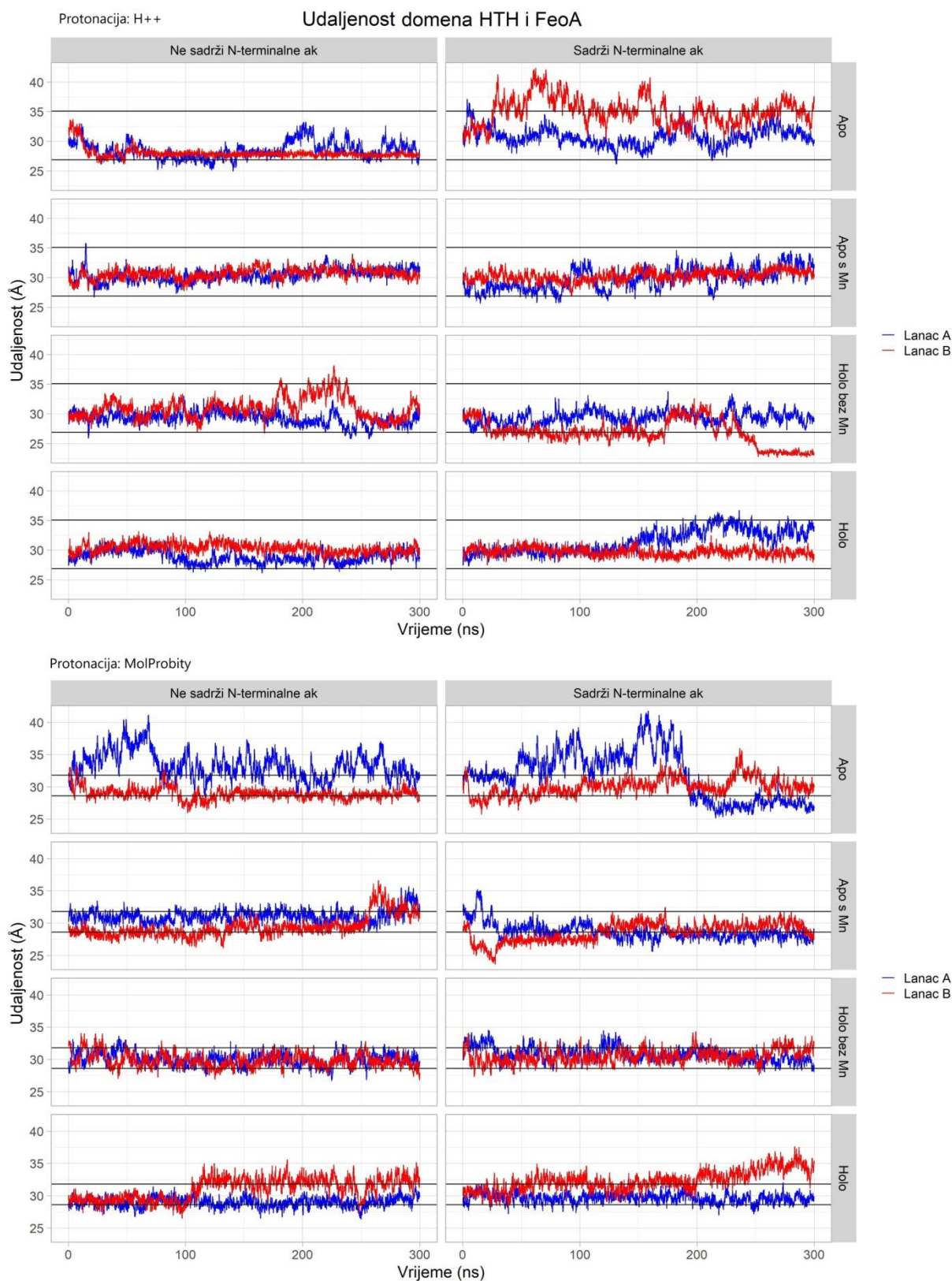
Udaljenost koordinirajućih aminokiselina i mangana



Udaljenost koordinirajućih aminokiselina i mangana (bez N-terminalnih aminokiselina)



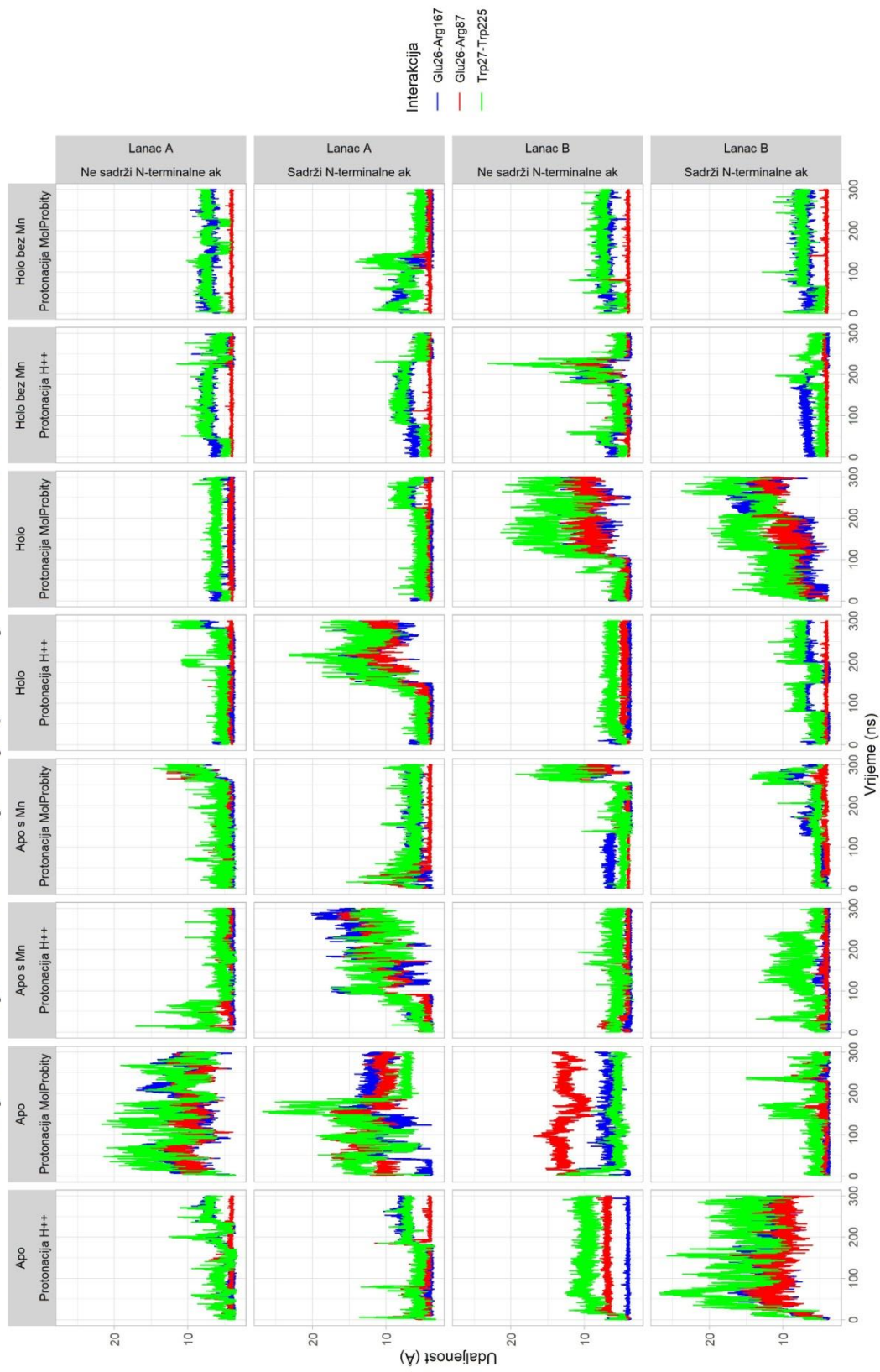
Slika P1. Udaljenost između iona mangana i atoma koordinirajućih aminokiselina u mononuklearnom centru tijekom MD simulacije proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Udaljenosti su prikazane kutijastim/pravokutnim dijagramom (engl. *Box and whiskers plot*). Plavom bojom označene su one udaljenosti simulacija protoniranih H⁺⁺ programom, a crvenom onih protoniranih programom MolProbity. Crna horizontalna linija na ordinati predstavlja udaljenost pojedinog atoma i iona mangana u kristalnoj strukturi. Grafovi su podijeljeni na one napravljene nad simulacijama s N-terminalnim aminokiselinama i onima bez njih. Udaljenost histidina od iona mangana je mjerena tako da se mjerila udaljenost koordinirajućeg atoma dušika od iona mangana. Aminokiseline glutamat i aspartat sadrže dva atoma kisika koja mogu koordinirati ion mangana, stoga su napravljene grafovi za oba atoma kisika.



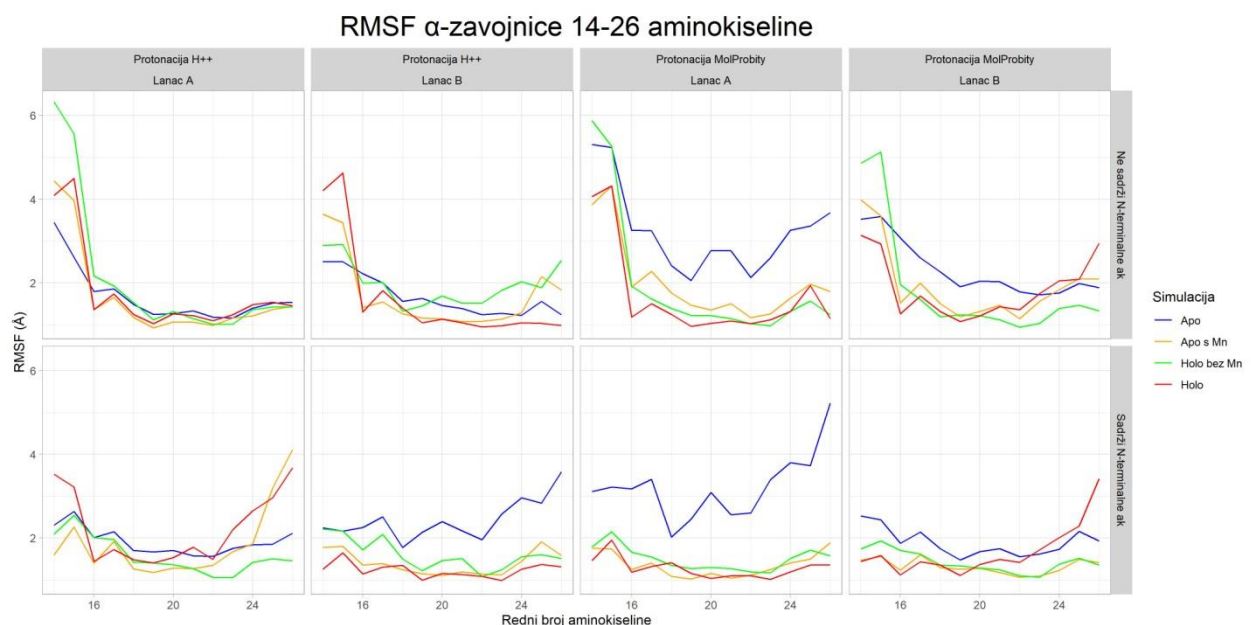
Slika P2. Udaljenost centra mase domena HTH i FeoA tijekom simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Za svaku simulaciju računata je udaljenost domena, a simulacije se razlikuju ovisno o prisutnosti N-terminalnih lanaca, programu za protonaciju te strukturi. Prikaz sadrži dvije slike grafova koje su podijeljene ovisno o programu korištenom za

protonaciju – H⁺⁺ i MolProbity. Grafovi su podjeljeni tako da su vodoravno napisane strukture korištene za simulacije molekulske dinamike: apo, apo s Mn (apo struktura s nadodanim ionima mangana u vezno mjesto), holo i holo bez Mn (holo struktura s uklonjenim ionima mangana). Horizontalno su grafovi podijeljeni na one simulacije koje imaju N-terminalne lance i one koje nemaju. Na samim grafovima su računate udaljenosti centra masa domena za obje podjedinice (crveno i plavo). Crne horizontalne vodoravne linije na svakom grafu predstavljaju najmanju i najveću prosječnu udaljenost centra masa domena HTH i FeoA ovisno o protonaciji. Niža vodoravna linija predstavlja najmanju prosječnu udaljenost centra masa domena HTH i FeoA u simulacijama dane protonacije, a gornja vodoravna linija predstavlja najveću prosječnu udaljenost centra masa domena HTH i FeoA u danoj protonaciji.

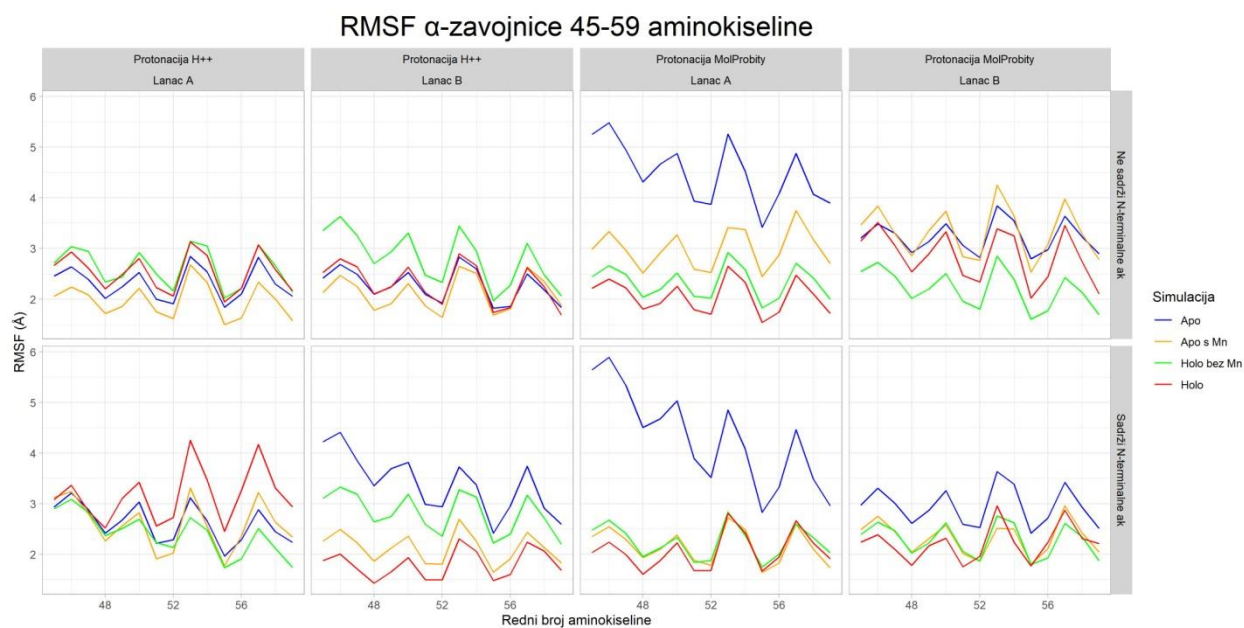
Udaljenost ključnih interakcija koje povezuju domene HTH i FeoA



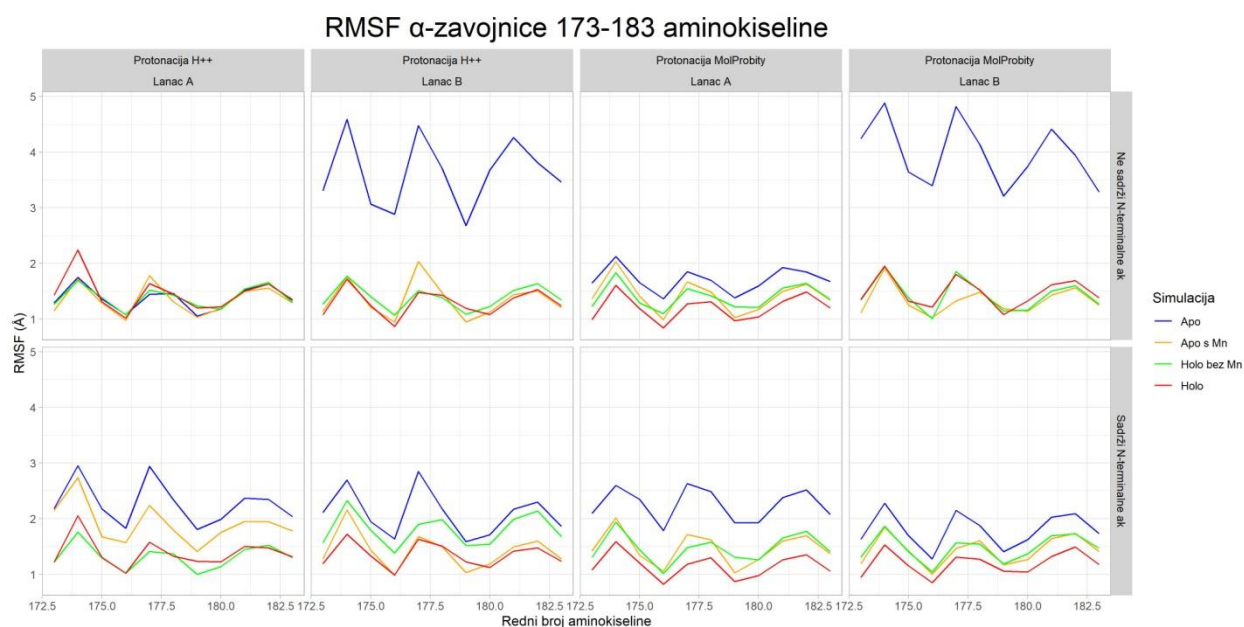
Slika P3. Udaljenost interakcija Glu26-Arg87, Glu26-Arg167 i Trp27-Trp225 tijekom MD simulacija proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis*. Udaljenosti interakcija računane su za svaku MD simulaciju (sveukupno njih 16). Za simulacije molekulske dinamike korištene su četiri strukture: apo, apo s Mn (apo strukturi su nadodani ioni mangana u vezno mjesto), holo bez Mn (holo strukturi su uklonjeni ioni mangana) i holo. Navedene su strukture simulirane s i bez prisutnosti N-terminalnih aminokiselina te su za protonaciju korišteni programi H++ i MolProbity. Udaljenosti interakcija računane su za svaku podjedinicu proteina MntR. Zelenom bojom prikazana je udaljenost π - π interakcija između aminokiselina Trp27 i Trp225 računata udaljenošću centra masa triptofanskih prstena. Plavom bojom prikazana je udaljenost interakcije Glu26 i Arg167, a crvenom bojom udaljenost interakcije Glu26 i Arg87. Udaljenost interakcija navedenih arginina i glutamata računata je udaljenošću vodikove veze među njima.



Slika P4. RMSF α -zavojnice 14-26 aminokiseline proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* tijekom MD simulacije. RMSF je računat za sve pripremljene simulacije i grafovi su raspoređeni po protonaciji i prisutnosti N-terminalnih lanaca. Plavom bojom označene su apo simulacije, narančastom apo simulacije s manganom, zelenom holo simulacije bez mangana, a crvenom holo simulacije. RMSF je računat za obje podjedinice proteina. Ova α -zavojnica nije pokazala pravilnosti kao α -zavojnica 73-95 i α -zavojnica 103-113.



Slika P5. RMSF α -zavojnice 45-59 aminokiseline proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* tijekom MD simulacije. RMSF je računat za sve pripremljene simulacije i grafovi su raspoređeni po protonaciji i prisutnosti N-terminalnih lanaca. Plavom bojom označene su apo simulacije, narančastom apo simulacije s manganom, zelenom holo simulacije bez mangana, a crvenom holo simulacije. RMSF je računat za obje podjedinice proteina. Ova α -zavojnica nije pokazala pravilnosti kao α -zavojnica 73-95 i α -zavojnica 103-113.



Slika P6. RMSF α -zavojnice 173-183 aminokiseline proteina MntR iz bakterije *M. tuberculosis* tijekom MD simulacije. RMSF je računat za sve pripremljene simulacije i grafovi su raspoređeni po protonaciji i prisutnosti N-terminalnih lanaca. Plavom bojom označene su apo simulacije,

narančastom apo simulacije s manganom, zelenom holo simulacije bez mangana, a crvenom holo simulacije. RMSF je računat za obje podjedinice proteina. Ova α -zavojnica nije pokazala pravilnosti kao α -zavojnica 73-95 i α -zavojnica 103-113.

8. Životopis

Rođen sam 01.06.1997. godine u Zagrebu gdje sam završio osnovnu školu Dragutina Domjanića i prirodoslovno-matematički smjer gimnazije Lucijana Vranjanina. Upisao sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i završio ga 2019. godine stekavši zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije. Iste godine upisujem diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija izabrao sam modul računalne biologije. Tijekom preddiplomskog studija sudjelovao sam na laboratorijskoj stručnoj praksi na analizi fenotipskih karakteristika različitih populacija guštera *Podarcis sicula*. U slobodno vrijeme bavim se sviranjem gitare, igranjem šaha i čitanjem filozofije.