Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije Halalkalibacterium halodurans

Knez, Ana Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:043353

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Marija Knez

Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*

Diplomski rad

Zagreb, 2023

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Marija Knez

Molecular dynamics simulations of the MntR protein from the bacterium *Halalkalibacterium halodurans*

Master thesis

Zagreb, 2023.

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



Zahvaljujem se mojem mentoru prof. dr. sc. Branimiru Bertoši na ukazanom povjerenju, strpljenju, ugodnoj atmosferi i neizmjernoj podršci pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se Zoe Jelić Matošević na velikoj pomoći prilikom izvedbe praktičnog dijela diplomskog rada, podršci na svakom koraku i, najviše od svega, zahvaljujem se na prijateljstvu.

Zahvaljujem se Katarini Radman i Martini Manenici na ugodnoj atmosferi u timu i korisnim savjetima tijekom analize simulacija.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na potpori i brojnim lijepim uspomenama. Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na svemu što su mi omogućili, bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom cijelog mog života.

Naposljetku, od srca se zahvaljujem Mateju na ljubavi, prijateljstvu, podršci, smijehu i svim našim avanturama. Hvala ti što me činiš sretnom i boljom osobom.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*

Ana Marija Knez

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ioni prijelaznih metala neizostavna su komponenta brojnih staničnih procesa živih organizama. Ipak, prevelika stanična koncentracija metalnih iona može biti toksična za stanicu pa su neophodni osjetljivi mehanizmi regulacije njihove stanične koncentracije. Protein MntR je transkripcijski faktor koji sudjeluje u mehanizmu regulacije stanične koncentracije manganovih(II) iona u bakteriji *Halalkalibacterium halodurans*. U otopini je prisutan kao homodimer koji se vezanjem dva manganova(II) iona aktivira za vezanje na DNA te sprječava transkripciju gena za unos manganovih(II) iona. Simulacijama molekulske dinamike (MD) istražene su razlike u strukturnim i dinamičkim svojstvima proteina MntR u apo (bez vezanih manganovih(II) iona) i holo (s vezanim manganovim(II) ionima) obliku. Analizom MD simulacija identificirane su konformacijske odlike koje holo strukturi olakšavaju vezanje u dva susjedna velika utora molekule DNA. Pronađene su nekovalentne interakcije koje potencijalno imaju važnu ulogu u molekulskom mehanizmu koji dovodi do povećanja afiniteta MntR proteina prema DNA uslijed vezanja manganovih(II) iona. Rezultati simulacija upućuju da prisustvo manganovih(II) iona u veznom mjestu proteina dovodi do zamijene vodikove veze Arg72 i Asp111 s kation–π interakcijom između Arg72 i Trp107 što se reflektira na savijanje α4 – zavojnice i udaljenost između DNA vezujućih domena. Računalni rezultati uspoređeni su s literaturno dostupnim eksperimentalnim podacima.

Ključne riječi: homeostaza mangana, alosterička aktivacija, nekovalentna interakcija, vodikova veza, kation-π interakcija
(59 stranice, 28 slika, 3 tablice, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: 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: 09.2.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Molecular dynamics simulations of the MntR protein from the bacterium *Halalkalibacterium halodurans*

Ana Marija Knez

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Transition metal ions are an indispensable component of numerous cellular processes of living organisms. However, excessive cellular concentration of metal ions can be toxic to the cell, so sensitive mechanisms of regulation of their cellular concentration are necessary. The MntR protein is a transcription factor that participates in the mechanism of regulation of the cellular concentration of manganese(II) ions in the bacterium *Halalkalibacterium halodurans*. In the solution, it is present as a homodimer which, by binding two manganese(II) ions, is activated to bind to DNA and prevents the transcription of genes for the intake of manganese(II) ions. Molecular dynamics (MD) simulations were used to investigate the differences in the structural and dynamic properties of the MntR protein in the apoprotein (without bound manganese(II) ions) and holoprotein (with bound manganese(II) ions) form. The analysis of MD simulations identified conformational features that facilitate the binding of the holoprotein in two adjacent large grooves of the DNA molecule. Non-covalent interactions were found that potentially play an important role in the molecular mechanism that leads to an increase in the affinity of the MntR protein to DNA due to the binding of manganese(II) ions. The simulation results suggest that the presence of manganese(II) ions in the binding site of the protein leads to the replacement of the hydrogen bond between Arg72 and Asp111 with a cation–π interaction between Arg72 and Trp107, which is reflected in the bending of the α4 helix and the distance between the DNA binding domains. The computational results were compared with experimental data available in the literature.

Keywords: manganese homeostasis, allosteric activation, non-covalent interaction, hydrogen bond, cation-π interaction
(59 pages, 28 figures, 3 tables, 50 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: 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: 09.2.2023.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Bakterija *Halalkalibacterium halodurans* 1

1.2. Homeostaza metalnih iona 4

1.2.1. Homeostaza iona željeza 6

1.2.2. Homeostaza iona cinka 8

1.2.3. Homeostaza iona bakra 10

1.2.4. Homeostaza iona mangana 11

1.3. Regulator transporta mangana 13

1.3.1. N-terminalna DNA vezujuća domena 14

1.3.2. Binuklearno vezno mjesto manganovih(II) iona (binuklearni metalni centar) 16

1.3.3. C-terminalna dimerizacijska domena 17

1.4. Računalne simulacije bioloških sustava 19

1.4.1. Polje sila 20

1.4.2. Priprema struktura za računalne simulacije 22

1.4.3. Optimizacija geometrije i simulacije uravnoteženja 23

2. Cilj istraživanja 24

3. Materijali i metode 25

3.1. Priprema sustava za simulacije molekulske dinamike 25

3.2. Identifikacija potencijalnih veznih mjesta transkripcijskog faktora MntR u genomu *Halalkalibacterium halodurans* bioinformatičkim metodama 28

4. Rezultati 30

4.1. Stabilnost sustava i fluktuacije proteinskih regija 30

4.2. Stabilizacija veznog mjesta za manganove(II) ione 32

4.3. Interakcije oko metalnog centra ovisno o prisustvu manganovih(II) iona 34

4.4. Položaj α4 zavojnice i udaljenost DNA vezujućih domena 39

4.5. Elektrostatski potencijal DNA vezujuće domene 45

4.6. Stabilizacija dimerizacijske domene 46

4.7. Analiza veznog mjesta proteina MntR u promotorskim regijama gena *mntA* i operona *mntBC* 47
5. Rasprava 48
5.1. Lom α4 zavojnice 48
5.2. Vezanje molekule DNA 49
5.3. Održavanje integriteta veznog mjesta manganovih(II) iona 50
5.4. Dimerizacijska domena 52
5.5. DNA vezujuća domena 52
6. Zaključak 54
7. Literatura 55

1. UVOD

1.1. Bakterija *Halalkalibacterium halodurans*

Bakterija *Halalkalibacterium halodurans* (Nielsen i sur. 1995, Joshi i sur. 2021) industrijski je značajna alkalofilna bakterija koja je na temelju morfoloških značajki godinama svrstavana u rod *Bacillus*. Stanice bakterije *H. halodurans* imaju oblik štapića, a često se znaju organizirati u lance duljine dvije do šest stanica (Boyer i sur. 1973). Bakterije stvaraju bijele, okrugle kolonije s blago filamentoznim marginama (Nielsen i sur. 1995) te se kreću pomoću bičeva raspoređenima po cijeloj stanici bakterije (Ikura i Horikoshi 1979).). Stvaraju natečene elipsoidne spore koje se nalaze subterminalno na stanici (Nielsen i sur. 1995). Članovi roda *Halalkalibacterium* su aerobni ili fakultativni anaerobi te pokazuju varijabilnost na bojanje po Gramu (Joshi i sur. 2021).

Glavne karakteristike bakterije *H. halodurans* su alkalofilnost i halotolerantnost. Optimalni uvjeti za rast bakterije *H. halodurans* uključuju pH vrijednost između 9 i 10, temperaturu između 30 i 40 °C te koncentraciju NaCl od 2 % (Joshi i sur. 2021). Iako su navedeni uvjeti optimalni, postoji cijeli raspon pH vrijednosti, temperature i koncentracije NaCl pri kojemu je uočen rast bakterije. Za početak, rast bakterije *H. halodurans* uočen je pri rasponu pH vrijednosti između 6 i 11 (Joshi i sur. 2021), ali je rast slabiji pri neutralnijem pH (Ikura i Horikoshi 1979). Istraživanja su pokazala da je moguće potaknuti značajan rast bakterija pri neutralnom pH dodatkom 0,2 M NaCl (Ikura i Horikoshi 1979) ili 5 % NaCl (Boyer i sur. 1973). Bakterija *H. halodurans* također podnosi koncentraciju NaCl do 12 % te raspon temperatura između 15 i 60 ºC (Joshi i sur. 2021).

Lužnata sredina utječe na elektrokemijski potencijal membrane koji je odgovoran za prijenos elektrona i sintezu ATP-a. Naboj na membrani ovisi o ionima vodika te je u normalnim uvjetima okolina kiselija od citoplazme. To znači da se negativan naboj nalazi s citoplazmatske strane membrane, dok je pozitivan naboj lokaliziran s vanjske strane membrane. U lužnatoj okolini dolazi do zamjene potencijala čime unutrašnjost postaje pozitivno nabijena i kiselija od okoline. U takvim uvjetima dolazi do „curenja“ vodika iz stanice čime je sinteza energije manje efikasna. Prijelaz vodika iz stanice u okolinu direktno utječe na pH citoplazme čime ona postaje lužnata i koči normalne fiziološke procese (Krulwich 1995). Ekstremni alkalofili kao što je bakterija *H. halodurans* razvili su prilagodbe na ovakve uvjete, a najvažnija od njih je unos vodikovih iona koji

provodi Na^+ / H^+ antiporter (Krulwich 1995, Ito i sur. 2017). Protein Mrp glavni je antiporter za brojne alkalofilne bakterije, a pokazano je da mutant bakterije *H. halodurans* za *mrp* ne podnosi visoku pH vrijednost okoliša. Drugi Na^+ / H^+ antiporter prepoznat kod alkalofilnih bakterija je NhaC, ali je njegov doprinos manji (Slonczewski i sur. 2009). Aktivnost antiportera represirana je pri neutralnom pH citoplazme što ukazuje na njegovu ulogu u održavanju pH homeostaze citoplazme. Unos iona natrija u stanicu vrši se preko brojnih importera ili difuzijom kada je izvanstanična koncentracija natrija povišena (Krulwich 1995).

Otkriće obligatornih alkalofilnih bakterija pripisuje se Vedderu koji ih je izolirao 1934. godine (Attie i sur. 2014). Zbog nedostatka biokemijskih testova te štapićastog izgleda, sve izolirane bakterije svrstao je u novu vrstu *Bacillus alcalophilus* (Fritze i sur. 1990). Prvo spominjanje riječi „halodurans" za opis vrste *H. halodurans* iskoristili su Boyer i sur. (1973) koji su uočili da se bakterija *Bacillus sp*. NRRL B-3381, izolirana iz kanalizacijskog mulja, razlikuje od poznate vrste *B. alcalophilus* po nekoliko biokemijskih značajki: mogućnost redukcije nitrata u nitrit, korištenje citrata kao izvor energije te mogućnost rasta pri koncentraciji NaCl od 12 %. Zbog navedenih razloga bakteriju su smatrali podvrstom te je prepoznata kao *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* (Boyer i sur. 1973).

Prvi pokušaji određivanja srodnosti alkalofilnih bakterija iz roda *Bacillus* započeli su 1990-ih godina. Uspoređivanjem zastupljenosti GC baza u pojedinim vrstama te na temelju rezultata DNA-DNA hibridizacije s genomom bakterije *B. alcalophilus* predložena je reklasifikacija bakterije *B. alcalophilus* subsp. *halodurans* u zasebnu vrstu (Fritze i sur. 1990). Nekoliko godina kasnije opisana je nova vrsta *Bacillus halodurans* čiji opis odgovara današnjem opisu vrste *H. halodurans*. Uz *B. halodurans* opisano je još osam novih vrsta, koje su zbog svog izgleda svrstane u rod *Bacillus* (Nielsen i sur. 1995). Manjak restrikcija za dodjeljivanje bakterija rodu *Bacillus* učinio je ovaj rod izrazito heterogenim. Kako bi se razriješila heterogenost roda *Bacillus,* napravljena je filogenetska analiza koristeći sekvence više od 1200 proteina. Rezultati filogenetske analize sekvenci odabranih proteina i 16S rRNA sekvenci pokazali su vrlo slične rezultate, na temelju kojih je opisano šest novih rodova. Bakterija *B. halodurans* tako se našla u rodu *Alkalihalobacillus* čiji je glavni predstavnik *A. alcalophilus* (Patel i Gupta 2020). Otkrićem bakterije *A. elongatum* (Joshi i sur. 2021) dovedena je u pitanje monofiletičnost roda *Alkalihalobacillus.* Tim otkrićem potaknute su dodatne filogenetičke analize, analize genoma i morfološke karakterizacije koje su dovele do

reklasifikacije roda *Alkalihalobacillus* u sedam novih rodova. Bakterija *A. halodurans* postala je glavni predstavnik roda *Halalkalibacterium* koji sadrži još samo jednu vrstu. Na temelju spomenutih analiza primijećeno je da nema značajnije razlike između vrsta *A. halodurans* i *A. okuhidensis* zbog čega je *A. okuhidensis* proglašen heterotipskim sinonimom bakterije *H. halodurans* (Joshi i sur. 2021).

Alkalofilne bakterije postale su zanimljive industriji 1970-ih godina zbog otkrića enzima koji funkcioniraju pri visokim pH vrijednostima (Fritze i sur. 1990). Tako je primijećeno da bakterija *Bacillus sp*. C-125, kasnije prepoznata kao *H . halodurans* (Takami i Horikoshi 1999), spontano i inducibilno proizvodi β-galaktozidazu te da je indukcija brža pri pH 10,2 nego pri 7,2 (Ikura i Horikoshi 1979). *H. halodurans* industrijski značaj ima i kao proizvođač ksilanaze A i N, pektinaze, amilaze i proteaze. Optimalni uvjeti za funkciju enzima uključuju pH 9-10 i temperaturu 50-70 ºC (osim ksilanaze N kojoj je aktivnost optimalna pri neutralnom pH) (Takami i Horikoshi 2000). Termostabilne i alkalne ksilanaze koriste se u papirnoj industriji, prehrambenoj industriji, proizvodnji biogoriva, tekstilnoj industriji itd. (Burlacu i sur. 2016).

Interes industrije za bakterijom *H. halodurans* potaknuo je istraživanje njenog genoma te je napravljena genomska mapa duljine 4,25 Mb. Genom je uspoređen s genomom bakterije *B. subtilis* koja je smatrana srodnom vrstom u tom periodu. Iako je sastav GC baza i veličina genoma skoro identični između vrsta, većina proučavanih gena razmještena je na potpuno različitim lokacijama (Takami i Horikoshi 2000).

1.2. Homeostaza metalnih iona

Prijelazni metali, posebice željezo, bakar, mangan i cink, esencijalni su mikronutrijenti u gotovo svim biološkim sustavima. Za razliku od ostalih esencijalnih nutrijenata, stanica ne može sintetizira metalne ione već isključivo ovisi o njihovoj prisutnosti u okolišu (Price i Boyd 2020). Procjenjuje se da između trećine i polovine ukupnih proteina zahtijeva interakciju s metalnim ionom za biološku aktivnost. Osim što služe kao kofaktori brojnim proteinima važnih metaboličkih puteva, njihovo vezanje potiče smatanja proteina te stabilizira njihovu strukturu (Begg 2019). Prema tome, manjak metalnih iona u stanici onemogućava izvršavanje normalnih staničnih funkcija i zaustavlja njihov rast. Višak metalnih iona je također štetan za stanicu jer dovodi do kompetitivnog vezanja pogrešnog metala u vezno mjesto enzima čime se njegova aktivnost inhibira (Imlay 2015). Zbog toga su stanice razvile brojne mehanizme kojima osiguravaju homeostazu metalnih iona (Begg 2019).

Mehanizmi regulacije homeostaze metalnih iona uključuju prikupljanje metalnih iona iz okoliša, njihov transport u stanicu, skladištenje u stanici te njihov transport iz stanice u okoliš (Begg 2019). Navedeni procesi nalaze se pod kontrolom metalo regulatora koji osjećaju koncentraciju metalnih iona te prilagođavaju ekspresiju gena uključenih u njihovu realizaciju. Sposobnost metalo regulatora da selektivno reagiraju na zadani metalni ion ovisi o tri faktora: afinitetu, dostupnosti i alosteriji. Afinitet ovisi o prirodi i geometriji liganda koji veže metalne ione, ali i sposobnosti metalnog iona da veže ligand. Iz Irving-Williams serije ($Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$) koja govori o jakosti vezanja metalnih iona može se uočiti da se bakar i cink jače vežu za ligande nego ostali metali. Zbog toga senzori mangana i željeza obično vežu ione cinka s većim afinitetom nego svojstveni metal. Razlog zašto u stanici ne dolazi do pogrešnog vezanja iona cinka u nesvojstvene proteine, kad je uspostavljena homeostaza, leži u drugoj značajki, a to je njegova dostupnost. Koncentracija iona cinka u stanici održava se na znatno nižoj razini nego iona mangana i željeza čime se omogućava vezanje tih metalnih iona u svojstvene proteine. Treća značajka selektivnosti je alosterija odnosno geometrija vezanja. Iako ioni prijelaznih metala toleriraju slične geometrije vezanja, svaki daje prednost jednoj. Osim toga, metalni ioni razlikuju se u veličini zbog koje ne okupiraju vezno mjesto u potpunosti. Rezultat toga je vezanje pogrešnog metalnog iona, ali ne i aktivacija proteina (Helmann 2014).

Enzimi su izrazito selektivni za pojedine metalne ione. U enzimima koji sudjeluju u redoks reakcijama selektivnost ovisi i o redukcijskom potencijalu koji je različit za svaki metalni ion. Kod enzima koji ne provode redoks reakcije upravo je geometrija vezanja odgovorna za promjenu konformacije i aktivaciju samog enzima. Transporteri na površini stanice nisu toliko specifični kao enzimi u stanici te su često uzrok poremećaja homeostaze. Željezo, bakar, mangan i cink su dvovalentni prijelazni metali bez posebnosti u obliku koji mogu tolerirati slične geometrije vezanja. To je dovoljno da bi se aktivirao određeni transporter i doveo do prekomjernog unosa pojedinog metalnog iona (Imlay 2015). Stanica se prilagodila na ovakav način unosa metalnih iona te su se razvili sustavi za izbacivanje metalnih iona iz stanice (Begg 2019).

Osim što su nužni za održavanje normalnih metaboličkih puteva, ioni prijelaznih metala sudjeluju u interakciji između patogena i domaćina te su odgovorni za virulentnost bakterije. Ograničavanje dostupnosti metalnih iona jedan je od načina kojim se domaćin bori protiv kolonizacije bakterija. Taj mehanizam još se naziva nutritivni imunitet (engl. *nutritional immunity*) (Begg 2019). Brojne studije identificirale su S100 obitelj proteina kao kelatore metalnih iona koji se natječu s bakterijom za metalne ione inhibirajući njihov rast. Prepoznati proteini u sklopu obitelji proteina S100 su kalprotektin, psoriazin i kalgranulin C. Neutrofili otpuštaju kalprotektin kao odgovor na infekciju bakterijom *Staphylococcus aureus* koji limitira dostupnost dvovalentnih iona. Neutrofili također otpuštaju kalgranulin C koji veže ione cinka i bakra. Psoriazin veže ione cinka i sprječava rast bakterija na koži čovjeka. Uz proteine iz obitelji S100 djeluju i laktoferin i transferin koji vežu ione željeza kao i hemopeksin i haptoglobin koji skupljaju hem i hemoglobin smanjujući dostupnost iona željeza (Price i Boyd 2020).

Ioni prijelaznih metala ne obnašaju iste funkcije u stanici. U centralnim metaboličkim procesima najviše sudjeluju ioni željeza, kojeg u uvjetima povećanog oksidacijskog stresa mogu zamijeniti ioni mangana (Helmann 2014). Velika potreba za ionima željeza vjerojatno je rezultat uvjeta života na Zemlji prilikom razvoja prvog oblika života. Anoksičan svijet bio je bogat ionima željeza koji su s lakoćom sudjelovali u redoks reakcijama i reakcijama na površini stanice. S vremenom su se ioni željeza uklopili u enzime omogućivši razvoj biokemijskih procesa i metaboličkih puteva. Uz ione željeza, anoksičan svijet sadržavao je veliku količinu reduciranog sumpora koji je s ionima bakra i drugim metalima stvarao netopive minerale. Razvoj fotosustava II doveo je do generiranja kisika koji se prvo vezao za ione željeza i sumporne molekule, a zatim

se akumulirao u atmosferi. Ioni željeza postali su teško dostupni što stvara veliki problem organizmima danas (Imlay 2015). Neke bakterije kao što su bakterije roda *Lactobacillus* i spiroheta *Borrelia burgdorferi* u potpunosti su zamijenile ione željeza ionima mangana u metabolički važnim putevima (Helmann 2014). Pored njih, patogene bakterije također zahtijevaju prisutnost iona mangana za virulentnost, a neke bakterije poput *Escherichia coli* mogu koristiti ione mangana u nedostatku iona željeza sintetizirajući izozime važnih metaboličkih enzima. Pojava kisika oslobodila je ione bakra koji se danas koriste kao kofaktori nekolicine enzima. S obzirom da se ioni cinka mogu pronaći u aerobnim i anaerobnim organizmima, smatra se da je oduvijek bio dostupan stanicama (Imlay 2015).

1.2.1. Homeostaza iona željeza

Glavni regulator homeostaze iona željeza je protein Fur (engl. *ferric uptake regulator*). Članovi obitelji proteina Fur funkcioniraju kao homodimeri, a svaka podjedinica građena je od N-terminalne DNA vezujuće domene i C-terminalne dimerizacijske domene. Svaka podjedinica sadrži dva vezna mjesta za metalne ione. Vezno mjesto smješteno između dviju podjedinica služi za osjećanje koncentracije iona željeza i aktivaciju regulatora. Vezanje iona željeza uzrokuje konformacijsku promjenu pri čemu se DNA vezujuće domene pomiču u poziciju kompatibilnu za vezanje DNA. Strukturno vezno mjesto veže ion cinka čime pokreće smatanje proteina i dimerizaciju (Price i Boyd 2020).

U stanju povećane koncentracije iona željeza u stanici protein Fur veže ion željeza u aktivno mjesto i zauzima aktivnu konformaciju. Aktivirani protein Fur veže konzerviranu sekvencu DNA, Fur kutiju, unutar promotorske regije ciljanih gena i inhibira njihovu transkripciju. Vezani protein Fur često preklapa mjesto inicijacije transkripcije na poziciji -35 i/ili -10 čime sprječava vezanje RNA polimeraze (Price i Boyd 2020). Geni inhibirani proteinom Fur su sustavi za unos iona željeza u stanicu te sustavi za nabavu željeza iz okoliša (Helmann 2014). Protein Fur može djelovati i kao aktivator transkripcije gena koji potiču skladištenje iona željeza u stanici. Ioni željeza se u stanici nalaze u sklopu raznih enzima i klastera sa sumporom. Klasteri željeza i sumpora služe kao kofaktori brojnim redoks enzimima, ali mogu djelovati i u neredoks reakcijama tako što vežu i aktiviraju supstrat ili stabiliziraju samu strukturu proteina. Samo neki od metabolički važnih

enzima koji koriste ione željeza su NADH dehidrogenaza I, akonitaza, endonukleaza III, superoksid dismutaza, ribonukleotid reduktaza itd. (Imlay 2015).

U stanju smanjene koncentracije iona željeza u stanici protein Fur otpušta ione željeza i deaktivira se što omogućava transkripciju gena za nabavu i unos iona željeza u stanicu (Imlay 2015). Nabava iona željeza iz okoliša vrši se preko siderofora, malih molekula koje otapaju željezo(III) i dostavljaju ga stanici. Jedan od poznatijih siderofora patogenih enterobakterija je enterobaktin, a neke bakterije poput *Salmonella typhimurium* i *Bacillus anthracis* razvile su derivate enterobaktina kojima su izbjegli obrambene mehanizme domaćina. Određene patogene bakterije ne ovise o sideroforima već nabavljaju ione željeza iz drugih izvora. Bakterije iz roda *Neisseria* sadrže visoko afinitetne receptore na površini stanice koji pronalaze laktoferin i transferin, dok bakterija *Staphylococcus aureus* ima razvijen sustav Isd koji uzima ione željeza direktno iz hema (Begg 2019). Ukoliko je okoliš siromašan željezom, bakterija se dalje prilagođava na njegov deficit. Budući da enzimi Krebsovog ciklusa koriste ione željeza, bakterije prelaze na fermentaciju kao osnovni izvor energije. U bakterijama *E. coli* i *B. subtilis* pronađene su male RNA (sRNA) koje u uvjetima niske koncentracije iona željeza blokiraju translaciju enzima koji koriste ione željeza u korist izozima koji o njemu ne ovise. Jedan takav izozim je NADH dehidrogenaza II koja je manje efikasna od NADH dehidrogenaze I, ali ne ovisi o ionima željeza. Sličan mehanizam pronađen je u bakteriji *Coryneabacteria diphteriae* gdje protein RipA represira funkciju proteina koji koriste ione željeza (Imlay 2015).

Neke bakterije, poput *E. coli,* mogu zamijeniti ione željeza manganovim(II) ionima u ključnim metaboličkim putevima. Ioni mangana ne mogu direktno zamijeniti ione željeza u redoks enzimima jer su oni konfigurirani da uravnotežuju redukcijski potencijal željeza. Umjesto toga, stanica proizvodi izozime koje aktiviraju ioni mangana, npr. mangan specifična superoksid dismutaza i ribonukleotid reduktaza. U prisutnosti iona željeza aktivirani protein Fur represira transkripciju gena izozima koji koriste ione mangana što ukazuje da postoji interferencija između sustava za održavanje homeostaze iona mangana i homeostaze iona željeza. Pored toga, aktivan protein Fur inhibira ekspresiju glavnog transportera manganovih iona, MntH (Imlay 2015).

Homeostaza iona željeza izrazito je važna u zaštiti od oksidativnog stresa. Naime, slobodni ioni željeza(II) reagiraju s vodikovim peroksidom u Fentonovoj reakciji pri čemu nastaje željezo(III) i hidroksilni radikal. Hidroksilni radikal izrazito je reaktivan. Iako reagira s većinom

bioloških makromolekula, najveća šteta nastaje u reakciji s DNA gdje stvara mutacije (Imlay 2015). Pored iona željeza, važno je održavati homeostazu vodikova peroksida koji je normalan produkt aerobnog metabolizma prokariota (Virgile i sur. 2018). Vodikov peroksid ima tendenciju izvlačiti ione željeza iz spremišnih klastera željeza i sumpora, ali i proteina koji ga koriste čime se dodatno potiče Fentonova reakcija. Jedan od proteina iz kojeg izvlači ione željeza je Fur što rezultira unosom i povećanjem koncentracije slobodnih iona željeza(II) u stanici koji stupaju u Fentonovu reakciju i dodatno oštećuju stanicu (Imlay 2015).

Mehanizam obrane stanice od oksidativnog stresa uključuje sintezu transkripcijskog faktora OxyR koji osjeća koncentraciju vodikova peroksida i inducira sintezu proteina Fur, kompenzirajući za smanjenu okupaciju metalom (Imlay 2015). Protein OxyR inducira ekspresiju proteina sličnih feritinu, Dps i MrgA, koji vežu i skladište višak iona željeza u stanici (Helmann 2014, Imlay 2015). U bakteriji *S. aureus* nalazi se senzor peroksida PerR koji regulira gene za inducibilnu zaštitu od vodikova peroksida. Protein PerR može vezati ili ione željeza ili ione mangana za aktivaciju nakon koje disocira s DNA. Pod regulacijom proteina PerR nalaze se geni uključeni u metabolizam reaktivnih oblika kisika te geni za regulaciju i skladištenje iona željeza npr. *fur*. Gen *fur* represiran je samo kad je protein PerR vezan za ione mangana jer tako omogućava unos iona željeza u stanicu (Price i Boyd 2020). U tom slučaju PerR funkcionira kao senzor omjera iona željeza i mangana u stanici (Helmann 2014, Price i Boyd 2020).

1.2.2. Homeostaza iona cinka

Glavni regulator homeostaze iona cinka je protein Zur (Price i Boyd 2020), član obitelji proteina Fur (Helmann 2014). Protein Zur također funkcionira kao homodimer te sadrži tri vezna mjesta za ione cinka, dva regulatorna i jedno strukturno. Regulatorna vezna mjesta imaju različiti afinitet za ione cinka što omogućava proteinu Zur da djeluje kao pufer cinka pri maloj koncentraciji, a pri većoj koncentraciji štiti stanicu od pogrešnog vezanja za nesrodne proteine (Price i Boyd 2020). S obzirom da su ioni cinka u prirodi lako dostupni, veći problem za bakterije predstavlja njihov prekomjeran unos u citoplazmu. Unos iona cinka u stanicu odvija se pasivnim putem preko porina i aktivnim putem pomoću protonske ili ATP pumpe. Uz to, ioni cinka ulaze u stanicu preko manganskog transportera MntH koji je slabo specifičan (Imlay 2015).

Kako bi održale adekvatnu koncentraciju iona cinka u stanici, bakterije su razvile brojne prilagodbe. Aktivira se protein Zur koji sprječava transkripciju gena za importere iona cinka čime se smanjuje njihov aktivan unos. Dodatno se potiče sinteza protonskih i ATP ovisnih eksportera iona cinka iz citoplazme u periplazmu. Protein Zur potiče transkripciju proteina ZirT koji je zadužen za akumulaciju iona cinka u periplazmi. Bakterije sadrže dodatne sustave koji reagiraju na povećanu koncentraciju iona cinka izvan stanice. Sustav ZraSR osjeća koncentraciju cinka u okolišu i potiče sintezu periplazmatskog proteina ZraP koji djeluje kao pufer i šaperon. Drugi sustav, BaeSR, aktivira sintezu proteina za eksport iona cinka iz citoplazme u periplazmu i eksport cinkovih kompleksa u okoliš. Većina enzima koji koriste ione cinka za svoju funkciju nalaze se u periplazmi, dok se enzimi koji koriste ione željeza ili ione mangana nalaze u citoplazmi. Bakterije su na taj način stvorile dodatnu zaštitu od pogrešnog vezanja iona cinka u nesrodne proteine (Imlay 2015).

Ioni cinka odgovorni su i za virulenciju brojnih bakterija. Kod bakterije *S. aureus* aktivni proteini Zur i Fur potiču transkripciju gena za sintezu i transport stafilopina. Tijekom infekcije, stafilopini skupljaju razne dvovalentne metalne ione, a time i ione željeza i cinka, iz stanica domaćina (Price i Boyd 2020) čime su u direktnoj kompeticiji s kalprotektinom domaćina (Begg 2019). Kalprotektin potiče bakteriju na gladovanje uzrokovano nedostatkom dvovalentnih metalnih iona (Price i Boyd 2020). U nedostatku iona cinka potiče se sinteza homologa ribosomalnih podjedinica L31 i L36 koji su neovisni o ionima cinka. S obzirom da ioni cinka djeluju kao kofaktori esencijalnim proteinima kao što je RNA polimeraza, u njihovom nedostatku zaustavlja se i rast bakterija (Imlay 2015).

Intoksikacija ionima cinka drugi je mehanizam kojim se stanice domaćina bore protiv patogenih bakterija. Prema Irving-Williams seriji, ioni cinka se uz ione bakra najjače vežu za ligande. Štoviše, u nesvojstvenim proteinima vežu se s većim afinitetom nego njihovi svojstveni metali (Begg 2019). Na taj način ioni cinka ometaju funkciju esencijalnih enzima nužnih za rast i razvoj bakterije. Pored toga, ioni cinka mogu se vezati u aktivno mjesto regulatornih proteina, npr. proteina Fur, čime remete homeostazu drugih metalnih iona. Intoksikacija ionima cinka potiče oksidativni stres u stanici. Ioni cinka vežu se za sumpor unutar klastera sumpora i željeza, oslobađajući ione željeza u stanici. Slobodni ioni željeza zatim ulaze u Fentonovu reakciju oslobađajući hidroksilne radikale. Ranije je spomenuto da vodikov peroksid potiče disocijaciju

iona željeza iz svojstvenih proteina. Kod kroničnog oksidativnog stresa cinkovi ioni ulaze u interakciju s takvim proteinima inhibirajući njihovu funkciju. Jedan od tih proteina je i sam regulator Fur koji ne može obavljati svoju funkciju te se koncentracija iona željeza u stanici dodatno povećava (Imlay 2015). Zabilježeno je da ioni cinka mogu ireverzibilno vezati i inhibirati funkciju izvanstaničnih proteina MntA, SitA i PsaA, čija je uloga sakupljanje iona mangana iz okoliša. Smanjena koncentracija iona mangana u stanici povećava njenu osjetljivost na oksidativni stres zbog nemogućnosti aktivacije izozima (Begg 2019).

1.2.3. Homeostaza iona bakra

Za razliku od ostalih prijelaznih metala, bakrovi(II) ioni aktiviraju samo nekolicinu periplazmatskih i membranskih proteina. To uključuje proteine monoamin oksidazu, superoksid dismutazu, citokrom oksidazu i plastocijanine koji sudjeluju u prijenosu elektrona i reakcijama oksidacije. Jednovalentni bakar izrazito je reaktivan u čemu leži njegova toksičnost. Može sudjelovati kao supstrat u Fentonovoj reakciji generirajući hidroksilni radikal koji stvara oštećenja na DNA, proteinima i lipidima. Pored toga, izrazito čvrsto veže sumpor što dovodi do oksidacije proteinskih tiola, ali i destabilizacije klastera željeza i sumpora. Bakar(I) tako ometa sve metaboličke puteve koji se oslanjaju na klastere željeza i sumpora. Dvovalentni bakar je manje reaktivan, ali se može vezati u vezna mjesta nesvojstvenih proteina onemogućavajući njegovu aktivaciju i funkciju (Imlay 2015, Begg 2019).

Ioni bakra najčešće ulaze u stanicu nespecifičnim unosom preko porina (Begg 2019) ili preko manje specifičnih transportera za unos jedno- i dvovalentnih iona (Imlay 2015). Prilikom ulaska u stanicu dolazi do redukcije bakra(II) u bakar(I) preko tiola male molekulske mase (Price i Boyd 2020) koji onda lakše prolazi kroz citoplazmatsku membranu (Imlay 2015). Kako bi se održala homeostaza iona bakra, razvijeni su sustavi za eksport iona bakra iz citoplazme u periplazmu (Imlay 2015) te iz periplazme u okoliš (Begg 2019). Glavni eksporter kod većine bakterija je CopA, ATP ovisna pumpa koja je pod kontrolom transkripcijskih regulatora (Imlay 2015, Beg 2019). Mnoge bakterije sadrže dodatne sustave za eksport iona bakra npr. sustav CusCFBA. Sustav se sastoji od malog proteina CusF koji veže višak iona bakra u periplazmi i membranskog sustava CusCBA koji ga iznosi iz citoplazme u periplazmu odnosno iz periplazme

u okoliš. Sustav CusCFBA djeluje u paru sa senzorima koncentracije iona bakra, sustavom CusSR, smještenom na citoplazmatskoj membrani (Imlay 2015). Kod nekih bakterija otkriveni su lipoproteini na površini stanice koje vežu slobodan bakar(I) iz okoliša i sprječavaju njihov unos u stanicu (Price i Boyd 2020).

Brojni eksporteri i senzori iona bakra nalaze se pod kontrolom transkripcijskih regulatora, CueR u bakteriji *E. coli* i CsoR u bakterijama *S. aureus* i *M. tuberculosis* (Imlay 2015, Begg 2019, Price i Boyd 2020). Pri većoj koncentraciji transkripcijski regulatori vežu bakrove(II) ione u vezno mjesto i zauzimaju aktivnu formu koja potiče sintezu sustava za eksport iona bakra (Imlay 2015). Aktivirani transkripcijski regulator potiče i sintezu periplazmatskog enzima CueO koji oksidira bakar(I) onemogućavajući njegov ulazak u citoplazmu (Imlay 2015, Begg 2019). Zbog svoje toksičnosti, ioni bakra u citoplazmi nisu slobodni, već su vezani za pufere npr. CopZ (Price i Boyd 2020) ili za slobodne tiole (cistein, glutation) i amine (histidin, poliamin). U periplazmi ioni bakra ne dolaze u doticaj s klasterima željeza i sumpora niti s enzimima koji vežu ione željeza ili mangana što predstavlja idealno mjesto za njegovo skladištenje (Imlay 2015).

1.2.4. Homeostaza iona mangana

Glavni regulator homeostaze mangana je protein MntR (engl. *Manganese transport regulator*) (Lee i sur. 2019) koji djeluje kao inhibitor ekspresije gena za transportere mangana u stanicu (Price i Boyd 2020). Glavni transporter iona mangana je protonska pumpa MntH. Transporter MntH slabo je selektivan za ione mangana zbog čega često propušta ione drugih dvovalentnih kationa, posebice ione cinka, bakra i kadmija. Ioni kadmija slične su veličine kao ioni mangana zbog čega može aktivirati regulator MntR i inhibirati transkripciju gena. Rezultat toga je smanjen unos iona mangana i zaustavljanje vitalnih funkcija stanice (Helmann 2014). Drugi sustav za unos iona mangana koji je također pod kontrolom proteina MntR je ATP ovisna pumpe. Ne postoji jedinstven naziv za pumpu pa se tako može naći pod nazivom MntABCD u bakteriji *B. subtilis* (Helmann 2014, Lee 2019), SitABC u bakteriji *S. typhimurim* itd. (Imlay 2015). U uvjetima visoke koncentracije iona mangana u stanici protein MntR djeluje i kao aktivator transkripcije gena za eksportere iona mangana. Ti transporteri također nemaju jedinstveni naziv te se mogu naći pod

imenima MntX (*Neisseria meningitidis*), MntE (*S. aureus, B. subtilis*) (Helmann 2014) i MntP (*E. coli*) (Imlay 2015).

U uvjetima niske koncentracije iona mangana u stanici, MntR disocira s kontroliranih gena i omogućava transkripciju importera mangana. Uz gen *mntABC* kotranskribira se i mala nekodirajuća RNA, RsaC. Njena uloga je inhibicija translacije superoksid dismutaze A koja kao kofaktor koristi ione mangana. U takvim uvjetima preferira se korištenje superoksid dismutaze M koja veže ione željeza. RsaC također sprječava transkripciju enzima nužnih za sintezu klastera željeza i sumpora. To je još jedan mehanizam kojim bakterija regulira omjer iona željeza i mangana u stanici. Pored toga, RsaC djeluje i na homeostazu iona cinka jer zaustavlja sintezu regulatora Zur te proteina odgovornih za transport iona cinka, ZnuB i ZnuC (Price i Boyd 2020).

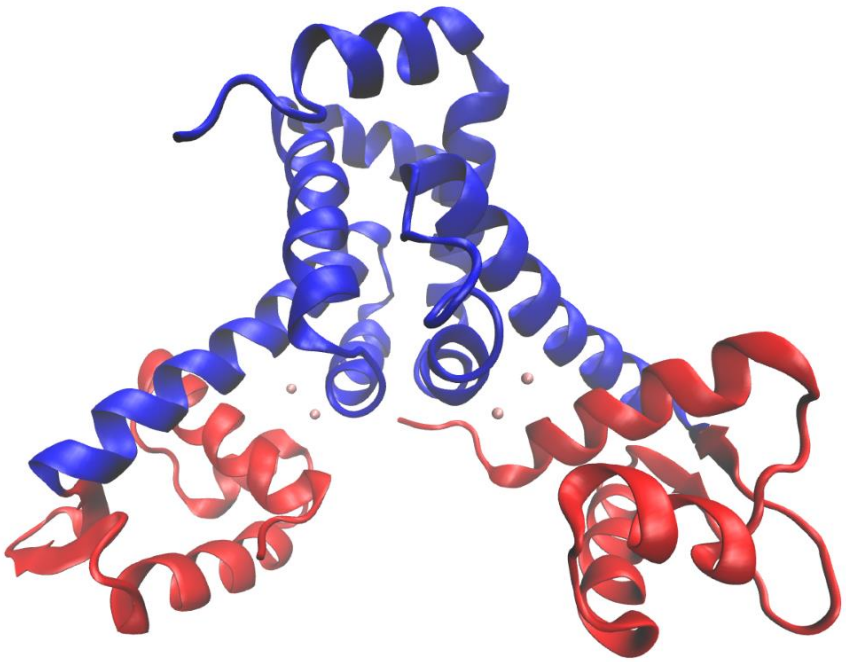
Potreba za manganovim ionima razlikuje se od vrste do vrste. Kao što je prethodno spomenuto, bakterije iz roda *Lactobacillus* te bakterija *Borrelia burgdorferi* u potpunosti su zamijenile željezo manganom (Helmann 2014), dok neke bakterije, kao što je *E. coli*, koriste ione mangana u slučaju oksidativnog stresa (Imlay 2015). Ipak, postoje bakterije kojima su ioni mangana vitalni za život kao što je *B. subtilis* i *S. aureus*. Mangan(II) je kofaktor čak dva enzima glikolitičkog puta bakterije *B. subtilis*, ribonukleotid reduktaze i fosfoglicerat reduktaze. Bakterija *Bacillus japonicum* ione mangana koristi kao kofaktor piruvat kinazi (Helmann 2014), dok su bakteriji *S. aureus* ioni mangana esencijalni za funkciju superoksid dismutaze (Begg 2019).

Kod bakterija koje koriste i ione željeza i ione mangana mehanizmi regulacije homeostaze tih metalnih iona su isprepleteni. Protein PerR, koji je opisan ranije u poglavlju, jedan je od proteina koji regulira omjer tih metalnih iona (Helmann 2014, Price i Boyd 2020). Protein Fur drugi je regulator omjera iona željeza i mangana. Naime, kad u stanici ima dovoljno iona željeza aktivira se protein Fur koji inhibira ekspresiju transportera MntH i SitABC. U bakteriji *E. coli* protein Fur dodatno inhibira ekspresiju superoksid dismutaze ovisne o manganu i ribonukleotid reduktaze ovisne o manganu (Imlay 2015). Istu funkciju ne obnaša u bakterijama *B. subtilis* i *S. aureus* zato što je mangan ovisna superoksid dismutaza dominantna (Begg 2019). U uvjetima manjka iona željeza sintetiziraju se importeri iona mangana i pojedini izozimi koji omogućavaju preživljenje bakterije (Imlay 2015).

1.3. Regulator transporta mangana

Regulator transporta mangana (MntR) je transkripcijski regulator koji kontrolira gene uključene u prijenos manganovih(II) iona kod bakterija. Dio je obitelji proteina DtxR/IdeR čija je uloga održavanje homeostaze metalnih iona. Protein MntR selektivno reagira na koncentraciju većih iona kao što su manganovi(II) ili kadmijevi(II) ioni pri čemu mijenja konformaciju i prelazi u aktivan oblik. Aktivirani protein MntR inhibira transkripciju gena *mntABCD* i *mntH* odgovornih za unos manganovih(II) iona u stanicu, ali i aktivira gene *mneP* i *mneS* zadužene za eksport manganovih(II) iona iz stanice (Lee i sur. 2019). Protein MntR veže se na specifičnu sekvencu (5'-TTTGCCTTAAGGAAAC-3') (Lieser i sur. 2003) poznatiju kao MntR kutija koja je smještena u promotorskoj regiji ciljanih gena. Vezanjem proteina MntR na MntR kutiju onemogućeno je vezanje RNA polimeraze te je zaustavljena transkripcija (Price i Boyd 2020).

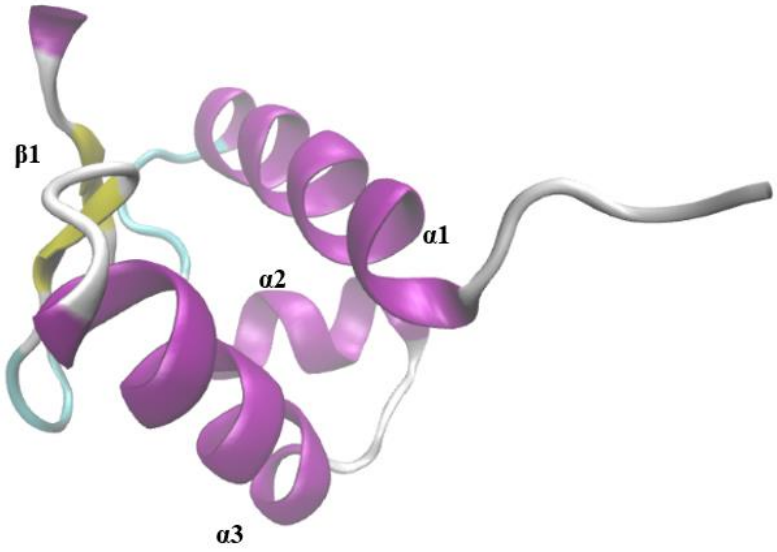
Proteini iz obitelji DtxR/IdeR funkcioniraju kao homodimeri, a svaki monomer građen je od tri domene: N-terminalne DNA vezujuće domene, dimerizacijske domene i C-terminalne SH3 slične domene. Svaki monomer sadrži dva vezna mjesta za ione metala. Primarno vezno mjesto smješteno je između DNA vezujuće i dimerizacijske domene, dok je sekundarno vezno mjesto smješteno između dimerizacijske i SH3 slične domene. Protein MntR iz bakterije *H. halodurans* također funkcionira kao homodimer, ali za razliku od proteina DtxR/IdeR ne sadrži SH3 sličnu domenu na C-kraju niti sekundarno vezno mjesto za ione mangana(II) (Slika 1). Svaki lanac proteina MntR iz bakterije *H. halodurans* sadrži 139 aminokiselina (Lee i sur. 2019).



Slika 1. Domene proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* s vezanim manganovim(II) ionima u primarnom veznom mjestu prikazanim kao kuglice. DNA vezujuća domena prikazana je crvenom, a dimerizacijska domena plavom bojom. Struktura je prikazana u programu VMD.

1.3.1. N-terminalna DNA vezujuća domena

N-terminalna domena proteina MntR iz bakterije *H. halodurans* obuhvaća aminokiseline 1-71 koje stvaraju krilni HTH motiv (engl. *winged helix – turn – helix motif* ili wHTH) (Lee i sur. 2019). Osnovni HTH motiv građen je od tri α zavojnice koje zajedno čine desno zavijeni snop djelomično otvorene konfiguracije (Slika 2). Motiv najčešće zauzima oblik trokuta pri čemu je α3 zavojnica smještena horizontalno i prema van. Upravo je α3 zavojnica zaslužna za prepoznavanje i vezanje molekule DNA što se ostvaruje unutar velikog utora DNA molekule (Aravind i sur. 2005). U interakciju s DNA ulaze pozitivno nabijene aminokiseline. Pretpostavlja se da su za te interakcije kod bakterije *H. halodurans* odgovorne pozitivno nabijene aminokiseline (Lys41, Lys45 i Lys48) unutar α3 zavojnice (Lee i sur. 2019).



Slika 2. Krilni HTH motiv u DNA vezujućoj domeni proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* s označenim sekundarnim strukturama. DNA vezujuća domena prikazana je u programu VMD.

Motiv HTH sadrži dodatne karakteristike koje ga definiraju. Jedna od njih je oštar zavoj između druge i treće α zavojnice koji je netolerantan prema insercijama ili distorzijama. Unutar zavoja može se naći uzorak „shs“ pri čemu slovo „s“ označava malu aminokiselinu, najčešće glicin, a slovo „h“ hidrofobnu aminokiselinu. Unutar druge α zavojnice nalazi se drugi karakterističan uzorak „phs“ gdje slovo „p“ predstavlja aminokiselinu s nabojem, najčešće glutamat. Hidrofobne aminokiseline iz uzoraka „shs“ i „phs“ te još barem dvije hidrofobne aminokiseline unutar motiva HTH stvaraju hidrofobne interakcije kojima stabiliziraju N-terminalnu domenu (Aravind i sur. 2005).

Budući da osnovni motiv HTH sadrži rascjep između prve i treće α zavojnice, evolucijski su se razvile dodatne strukture koje su ga smanjile. Jedna takva struktura je β ukosnica smještena na C-kraju motiva HTH i zajedno s njim čini krilni HTH motiv (Slika 2). Osim što zatvara konfiguraciju motiva HTH i dodatno ga stabilizira, sudjeluje u interakciji s molekulom DNA preko pozitivno nabijenih aminokiselina. Motiv wHTH nalazi se u velikom broju transkripcijskih faktora prokariota, ali i kod nekih eukariotiskih DNA vezujućih domena (Aravind i sur. 2005).

1.3.2. Binuklearno vezno mjesto manganovih(II) iona (binuklearni metalni centar)

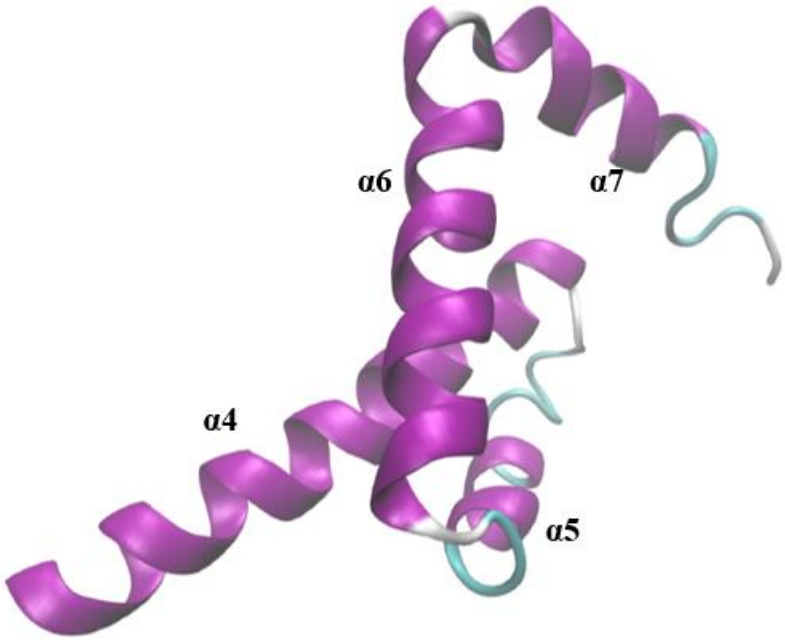
Između N-terminalne i C-terminalne domene proteina MntR iz bakterije *H. halodurans* nalazi se binuklearno vezno mjesto manganovih(II) iona. U vezanju manganovih(II) iona sudjeluje šest aminokiselina. Tri aminokiseline (His77, Glu102 i His103) konzervirane su unutar obitelji proteina IdeR/MntR, dvije aminokiseline (Asp8 i Glu99) konzervirane su unutar obitelji proteina MntR, dok se aminokiselina Glu11 specifično nalazi u proteinu MntR iz bakterija *B. subtilis* i *E. coli* (Lee i sur. 2019).

Ovisno o tome koje aminokiseline koordiniraju drugi manganov(II) ion te o udaljenosti između dva iona, protein može zauzeti AB ili AC konformaciju. U konformaciji AB drugi manganov(II) ion koordiniran je aminokiselina Asp8, Glu11, Glu102 i His103, a udaljenost između manganovih(II) iona iznosi 3,3 Å. Kod AC konformacije drugi manganov(II) ion koordiniran je aminokiselinama Asp8, Glu99, Glu102 i His103, a udaljenost iona iznosi 4,4 Å. Protein MntR iz bakterije *H. halodurans* zauzima AC konformaciju s udaljenosti između manganovih(II) iona od 4,5 Å (Lee i sur. 2019).

Geometrija vezanja metalnih iona u vezno mjesto odgovorna je za specifičnost reakcije na manganove(II) ione. Manji metalni ioni (Fe^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}) mogu se vezati u protein MntR, ali zbog svoje veličine ne okupiraju u potpunosti vezno mjesto. Uz to, veže se samo jedan metalni ion stvarajući mononuklearni kompleks slabe ili nikakve aktivnosti. Mehanizam vezanja manganovih(II) iona još uvijek nije poznat, ali je uočena jedna strukturna razlika između veznog mjesta s dva manganova(II) iona i s jednim magnezijevim ionom. Kada su vezana dva manganova(II) iona aminokiselina His77 stvara vodikovu vezu direktno s Glu81, dok je kod vezanog magnezijevog iona ta vodikova veza ostvarena preko molekule vode. Uz to, kod vezanog magnezijevog iona, His77 dodatno je stabiliziran π-π interakcijom s Tyr57. Pretpostavlja se da su te dvije interakcije odgovorne za prisutnost pogrešnog rotamera His77 koji onemogućava vezanje drugog metalnog iona te da je promjena rotamera His77 inicijator vezanja metalnih iona (Lee i sur. 2019).

1.3.3. C-terminalna dimerizacijska domena

C-terminalna domena proteina MntR iz bakterije *H. halodurans* uključuje aminokiseline 72-139 koje stvaraju četiri α zavojnice (Slika 3). Prva α zavojnica (α4) služi kao spojnica dviju domena, dok ostale imaju funkciju u dimerizaciji. Povezivanje lanaca postiže se hidrofobnim interakcijama u kojima sudjeluju bočni ogranci 14 hidrofobnih aminokiselina (Phe83, Ile87, Gly88, Val89, Gly100, Ile101, Leu105, Ala109, Ile113, Leu116, Tyr119, Phe120, Leu130 i Val133) i vodikovim vezama (Tablica 1) koji zajedno stabiliziraju dimerizacijsku domenu. Dimerizacijska domena ne ovisi značajno o povezanosti manganovih(II) iona (Lee i sur. 2019).



Slika 3. Dimerizacijska domena proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* s označenim sekundarnim strukturama. Dimerizacijska domena prikzana je u programu VMD.

Tablica 1. Vodikove veze unutar C-terminalne dimerizacijske domene proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.*

Prva aminokiselina	Druga aminokiselina
Asp90 N	Asp108 Oδ2
Asp97 Oδ1	Ser106 N
Asp97 Oδ2	Ser106 Oγ
Tyr119 Oη	Tyr119 Oη
Glu122 Oε1	Lys136 Nζ
Asp115 Oδ1	Asn137 Nδ2
Gln118 Oε1	Asn137 Nδ2

Istraživanja napravljena na proteinu MntR iz bakterije *B. subtilis* pokazala su da se α4 zavojnica giba poput šarke sa centralnom točkom između 72. i 75. aminokiseline. Gibanje je prisutno neovisno o manganovim(II) ionima, ali se otklon značajno razlikuje. U strukturi koja nema vezane manganove(II) ione (apo struktura) otklon može iznositi do 36 º, dok u strukturi s vezanim manganovim(II) ionima (holo struktura) iznosi maksimalno 4 º. Razlika u otklonu očitava se u udaljenosti DNA vezujućih domena koja je znatno veća u apo strukturi (3,5 Å) nego u holo strukturi (1,8 Å). Vezanje manganovih(II) iona stabilizira DNA vezujuće domene, smanjuje njihovu pokretljivost prema van i tako omogućava vezanje proteina na DNA. Osim navedenih razlika nema značajnijih strukturnih razlika između apo i holo strukture proteina MntR iz bakterije *B. subtilis* (DeWitt i sur. 2007).

1.4. Računalne simulacije bioloških sustava

Molekulska dinamika (MD) je računalna metoda koja simulira gibanje atoma molekulskog sustava u prostoru kroz određeni vremenski period (Hollingsworth i Dror 2018). Simulacije se sastoje od numeričkih rješenja Newtonovih jednadžba gibanja (Allen 2004) gdje se atomima, uslijed djelovanja sila i kinetičke energije, dodaje ubrzanje koje ih pokreće kroz prostor. Pri tome, gibanje atoma u molekuli nije međusobno neovisno. Rezultat simulacije MD je trajektorija tj. trodimenzionalni film koji opisuje konfiguraciju molekulskog sustava kroz vrijeme. Uvjet za korištenje ove metode je poznavanje početnog položaja atoma u molekuli koji se određuje eksperimentalnim metodama poput kristalografije, krio-elektronske mikroskopije (krio-EM) ili nuklearne magnetske rezonancije (NMR) (Hollingsworth i Dror 2018).

Prve simulacije MD provedene su nad plemenitim plinovima kasnih 1950-ih godina, a 20 godina kasnije simuliran je prvi protein. Posljednje desetljeće metoda MD dobiva na popularnosti te se sve više može naći u istraživačkim radovima iz područja molekularne i strukturne biologije. Svoju popularnost metoda MD stekla je zahvaljujući razvoju računalne tehnologije. Naime, razvoj grafičke procesorske jedinice (GPU) omogućio je lokalno provođenje simulacija MD umjesto na superračunalima. Uz nadogradnju hardvera, razvijali su se i softveri za provedbu simulacija MD. Softveri su postali pouzdaniji, jednostavniji za korištenje od strane nestručnjaka uz bolju tehničku podršku proizvođača. Osim računalnih tehnologija, poboljšale su se i eksperimentalne metode poput kristalografije i krio-EM. To je dovelo do otkrića brojnih novih struktura koje služe kao početna točka simulacija MD (Hollingsworth i Dror 2018). U sadašnjem trenutku, program Alphafold (Jumper i sur. 2021) predstavlja izvrstan izvor početnih struktura za pripremu i provedbu MD simulacija.

Uloga simulacija MD usko je povezana s eksperimentima (Allen 2004). Osnovna upotreba simulacija je proučavanje strukturnih i dinamičkih svojstava bioloških makromolekula. Naime, strukture dobivene kristalografijom i krio-EM statični su prikaz biološke makromolekule pri nefiziološkoj temperaturi. Metodom MD statičnoj strukturi dodaje se medij pri odgovarajućoj temperaturi zbog čega se ona relaksira i dolazi u prirodno stanje gdje se ostvaruju njena dinamička i strukturna svojstva. Osim strukture, određuju se i dinamička svojstva molekula otapala i otopljenih iona soli koji su neophodni za proteinsku funkciju i vezanje liganda. Uloga otapala samo je jedno od molekulskih svojstava koji se mogu proučavati simulacijama MD. Metodom MD

istražuju se važni biološki procesi poput konformacijskih promjena, vezanje liganda, smatanje proteina, prijenos molekula preko membrane itd. (Hollingsworth i Dror 2018). Dobiveni zaključci mogu dodatno interpretirati postojeće rezultate ili poslužiti kao početna točka novim eksperimentima (Allen 2004).

Eksperimentalno određene strukture mogu se dodatno doraditi metodom MD. Simulacijama se mogu ukloniti artefakti nastali kao posljedica kristalizacije, nadopuniti strukture kojima zbog loše rezolucije nedostaju atomi, odrediti ispravna pozicija liganda iz kolekcije mogućih, generirati nekoliko konformacija iz podataka NMR itd. Cilj navedenih postupaka je ispravak nedostatak eksperimentalnih metoda. Na strukturama se osim ispravak mogu vršiti i modifikacije. U modifikacije ubrajaju se mutacije aminokiselina, dodavanje posttranslacijskih skupina, promjena protonacijskog stanja te zamjena, micanje ili dodavanje liganda. Upravo zbog toga je moćan alat u farmaceutskoj industriji gdje se koristi za predviđanje biološki aktivnih spojeva u sintezi lijekova. Simulacije djeluju kao brz i relativno jeftin filter potencijalnih kandidata, a aktivnost najboljih određuje se eksperimentima (Hollingsworth i Dror 2018). Simulacije MD mogu provesti istraživanja čiji se uvjeti teško ili nikako ne mogu replicirati u laboratoriju poput ekstremnih temperatura, tlaka, simulacije u vakuumu i sl. (Allen 2004).

1.4.1. Polje sila

Sile u simulaciji MD računaju se pomoću polja sila molekulske mehanike (Hollingsworth i Dror 2018). Polje sila sastoji se od skupa parametara koji opisuju konformaciju molekule i svojstva atoma u molekuli te matematičkih funkcija koji korištenjem tih parametara računaju potencijalnu energiju molekule ovisno o konformaciji (Guvench i MacKerell 2008). Ukupna potencijalna energija sustava ovisi o doprinosima različitih veznih i neveznih interakcija između atoma:

$$E_{ukupna} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{tors} + E_{oop} + E_{el} + E_{vdw} + \sum E_{cross} \qquad (1)$$

Doprinosi veznih interakcija su potencijali koji nastaju u molekuli zbog istezanja veza (E_{stretch}), promjene valentnih (E_{bend}) i torzijskih kuteva (E_{tors}) te odstupanja atoma planarnog prstena iz ravnine prstena (E_{oop}). Vezne interakcije nisu neovisne jedna o drugoj te se kao posljedica toga javljaju miješani članovi (E_{cross}) koje neka polja sila uzimaju u obzir, a neka ne (van Gustersen i sur. 2006). Vezne interakcije računaju se prema sljedećim formulama:

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

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

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

$$E_{oop} = \frac{k_\xi}{2} \cdot \xi^2 \quad (5)$$

Elektrostatske (E_{el}) i van der Waalsove (E_{vdw}) interakciju su nevezne interakcije čiji je doprinos eksplicitno izražen u jednadžbi (1). Nekovalentne interakcije računaju se samo za atome koji su međusobno udaljeni više od tri veze (van Gustersen i sur. 2006). Vodikove veze koje su najjače nekovalentne interakcije implicitno su uključene kroz elektrostatski i van der Waalsov potencijal (Guvench i MacKerell 2008). Nevezne interakcije računaju se prema formulama:

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

$$E_{vdw} = \frac{A}{r^{12}} - \frac{C}{r^6} \quad (7)$$

Pretpostavka za korištenje polja sila je prenosivost parametara, tj. da se skup parametara definiran na skupu atoma može iskoristiti za opisivanje njima sličnih atoma unutar istog polja sila (Allen 2004, van Gustersen i sur. 2006). Formule (2-7) koriste parametre koji su određeni različitim eksperimentalnim metodama. Parametri veznih interakcija uglavnom su određeni metodama kristalografije i sprektroskopije, dok su parametri neveznih interakcija određeni termodinamičkim podacima, dielektričnim podacima, difuzijskim koeficijentima i kvantno mehaničkim izračunima (van Gustersen i sur. 2006). U modeliranju bioloških makromolekula najčešće se koriste polja sila Amber, CHARMM, GROMOS i OPLS-AA. Navedena polja sila razlikuju se po parametrima koja koriste, pogotovo u računanju neveznih interakcija, ali i u samoj funkciji potencijalne energije. Polje sila CHARMM tako sadrži dodatan član CMAP koji dodatno ispravlja torzijske kutove. Nasuprot njemu, polja sila Amber i OPLS-AA sadrže član manje u odnosu na jednadžbu (1). Ona ne računaju član E_{oop} eksplicitno, već se on izražava u sklopu torzijskog kuta (Guvench i MacKerell 2008). Zbog ovih razloga vrijednosti različitih polja sila nisu usporedive, ali energija različitih konformacija istog polja sila je.

1.4.2. Priprema struktura za računalne simulacije

Prije pokretanja simulacija MD potrebno je pripremiti sustav za simulaciju (Hollingsworth i Dror 2018). Prvi korak u pripremi sustava je kompletiranje trodimenzionalne strukture željene makromolekule. Strukturama dobivenim kristalografijom uglavnom nedostaju koordinate vodikovih atoma, a ponekad i koordinate drugih aminokiselinskih ostataka ili dijelova sekundarnih struktura (Anandakrishnan i sur. 2012). Dijelovi strukture koji nedostaju izgrađuju se programima za homologno modeliranje strukture. Programi koriste evolucijski srodnu strukturu kao predložak za sravnjavanje aminokiselinske sekvence. Nakon sravnjavanja, program izgrađuje modele i procjenjuje njihovu kvalitetu (Waterhouse i sur. 2018). Sljedeći korak u pripremi strukture je protonacija aminokiselina. Mala promjena pH vrijednosti može dovesti do promjene distribucije naboja u makromolekuli, a time i utjecati na njenu strukturu i funkciju (Swails i sur. 2014). Najveći izazov za protonaciju predstavlja aminokiselina histidina. Bočni lanac histidina je imidazolni prsten koji pri neutralnom pH može zauzeti tri različita protonacijska stanja. Pored toga, većina kristalnih struktura nema dovoljno dobru rezoluciju kojom bi se jednoznačno odredio rotamer imidazolnog prstena histidina. Položaji donora i akceptora vodikove veze značajno se razlikuju između rotamere zbog čega histidin može zauzeti šest protonacijskih stanja (Kim i sur. 2013).

Kompletiranim strukturama dodaju se molekule otapala, najčešće voda, i definiraju se rubni uvjeti. Kao što je prethodno spomenuto, molekule otapala i otopljene soli imaju značajan utjecaj na strukturu i funkciju bioloških makromolekula zbog čega ih se mora uključiti u simulaciju MD (Hollingsworth i Dror 2018). Molekule otapala mogu se uključiti implicitno i eksplicitno u simulacije. Implicitni modeli tretiraju molekule otapala kao kontinuum bez strukture s određenim dielektričnim i međufaznim svojstvima (Zhang J. i sur. 2017). Eksplicitni modeli otapala direktno uključuju molekule otapala u računanje potencijalne energije, ali su zbog utroška energije smanjeni stupnjevi slobode gibanja. Iako su eksplicitni modeli računalno skuplji od implicitnih, daju vjerodostojnije rezultate (Onufriev i Case 2019). Kako bi se izbjegao učinak površine kod eksplicitnog modela važno je definirati rubne uvjete. Najčešći se koriste periodični rubni uvjeti gdje se središnji poliedar sa željenom makromolekulom okruži vlastitim replikama sa svih strana. Time se sprječava gubitak molekula otapala i izlaganje makromolekula površini, ali se i uvodi umjetna periodičnost (van Gustersen i sur. 2006).

1.4.3. Optimizacija geometrije i simulacije uravnoteženja

Pripremljene strukture zatim prolaze kroz jedan ili više ciklusa minimizacije energije (optimizacije geometrije) kojima se sustav relaksira u obližnji lokalni minimuma. Cilj ovog postupka je ukloniti izrazito nepovoljne interakcije koje su posljedica eksperimentalnih metoda, a ne stvarne pozicije u nativnoj strukturi (Rydzewski i sur. 2015). Za postupak minimizacije koriste se iterativni algoritmi koji se postepeno približavaju minimumu potencijalne energije. Ovisno o tome koji red derivacije koriste, metode se dijele na nulti, prvi i drugi red. Najčešće se koriste metode prvog stupnja jer su preciznije od metoda nultog reda, ali i računalno jeftinije od metoda drugog reda. Jedna od metoda prvog reda je metoda najstrmijeg spusta (engl. *steepest decent*). Metoda se bazira na pronalaženju točke u prostoru u kojoj funkcija potencijalne energije poprima najnižu vrijednost. Ta pozicija služi kao početna točka sljedeće iteracije, a vektor na kojem se pretražuje prostor je okomit na prethodni. Ova metoda jedna je od robusnijih metoda optimizacije te se često koristi na početku minimizacije. Metoda najstrmijeg spusta nailazi na probleme blizu stvarnog minimuma funkcije te je potrebno upotrijebiti precizniju metodu. Jedna od njih je metoda konjugiranih gradijenata (engl. *conjugate gradient*). Osim podataka o funkciji, metoda konjugiranih gradijenata koristi informacije o gradijentu. Štoviše, u kalkulaciju sljedećeg koraka uključi poziciju i gradijent prethodna dva iteracijska koraka. Samim time je sposobna relativno jednostavno pronaći minimum funkcije i koristi se u kasnijim ciklusima minimizacije (Payne i sur. 1992).

Dobivene strukture nakon minimizacije energije nisu nužno i termodinamički stabilne. Termodinamički stabilne strukture nalaze se na globalnom minimumu plohe slobodne energije i obično predstavljaju nativnu strukturu proteina. Pomoću polja sila, tijekom simulacije, pretražuje se ploha potencijalne energije. Cilj simulacije MD je pretražiti što veću, ako ne i cijelu plohe potencijalne energije kako bi se pronašla termodinamički najstabilnija konformacija, a tako i nativna struktura (Rydzewski i sur. 2015). Kako bi se osigurala numerička stabilnost, vremenski korak u simulaciji MD mora biti kratak, obično nekoliko femtosekundu (10^{-15} s). Budući da se većina biokemijskih procesa od interesa događaju na skali od nanosekunde ili mikrosekunde, tipična simulacija ima preko milijun koraka (Hollingsworth i Dror 2018).

Produkcijskoj fazi simulacije MD prethode simulacije uravnoteženja čija je svrha dovesti sustav na odgovarajuću temperaturu, tlak i volumen. Simulacije uravnoteženje odvijaju se u dva ili

više ciklusa, a započinju NVT ekvilibracijom. Tijekom NVT ekvilibracije volumen simulacijske kutije održava se konstantnim, dok se temperatura povisuje od 0 K do željene definirane temperature. Položaji atoma fiksiraju se harmonijskim potencijalom konstantne sile, a molekule otapala gibaju se slobodno. Nakon NVT ekvilibracije slijedi NPT ekvilibracija koja se odvija pri konstantnom tlaku i temperaturi bez ikakvih restrikcija na koordinate atoma (Braun i sur. 2018). Po završetku simulacija uravnoteženja slijedi produkcijska faza MD.

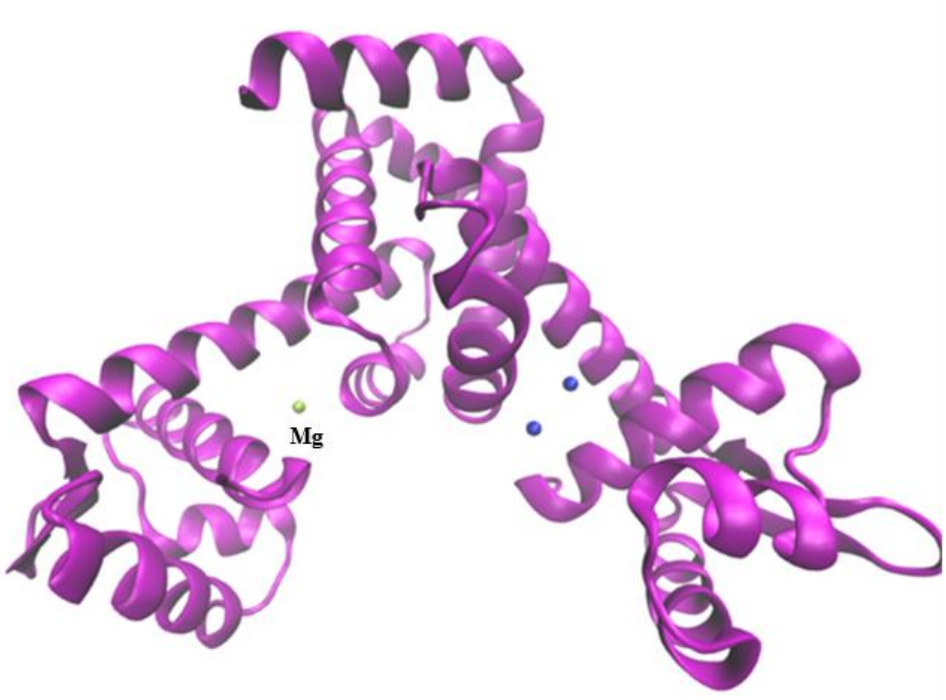
2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je odrediti razlike u strukturnim i dinamičkim svojstvima između apo i holo strukture proteina MntR iz bakterije *H. halodurans* metodom molekulske dinamike. S obzirom da holo struktura veže molekulu DNA, očekuje se da prisustvo manganovih iona uzrokuje promjenu strukturnih i dinamičkih svojstava koji dovode do povećanog afiniteta proteina za vezanje DNA. Pretpostavlja se da će te razlike biti posebno izražene kod DNA vezujućih domena.

3. Materijali i metode

3.1. Priprema sustava za simulacije molekulske dinamike

Iz baze podataka PDB (engl. *Protein Data Base*) (Burman i sur. 2000) preuzela sam strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* u apo (identifikacijski kod u bazi PDB: 6KTA) i holo obliku (identifikacijski kod u bazi PDB: 6KTB). Apo strukturi nedostajale su posljednje dvije aminokiseline koje sam nadodala korištenjem programa MODELLER, dok je holo strukturu bilo potrebno dodatno upotpuniti. U veznom mjestu lanca A holo strukture kristalizirao je magnezijev ion umjesto dva manganova(II) iona (Slika 4). Stoga sam preklopila lanac A s lancem B u programu VMD (engl. *Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey i sur. 1996) i spremila koordinate u zasebnu datoteku te ion magnezija zamijenila ionom mangana(II). Koordinate „novog“ lanca A spojila sam s originalnim koordinatama lanca B i dobila ispravnu holo strukturu. Pomoću programa MODELLER (Yang i sur. 2012) dodala sam aminokiseline koje nedostaju.



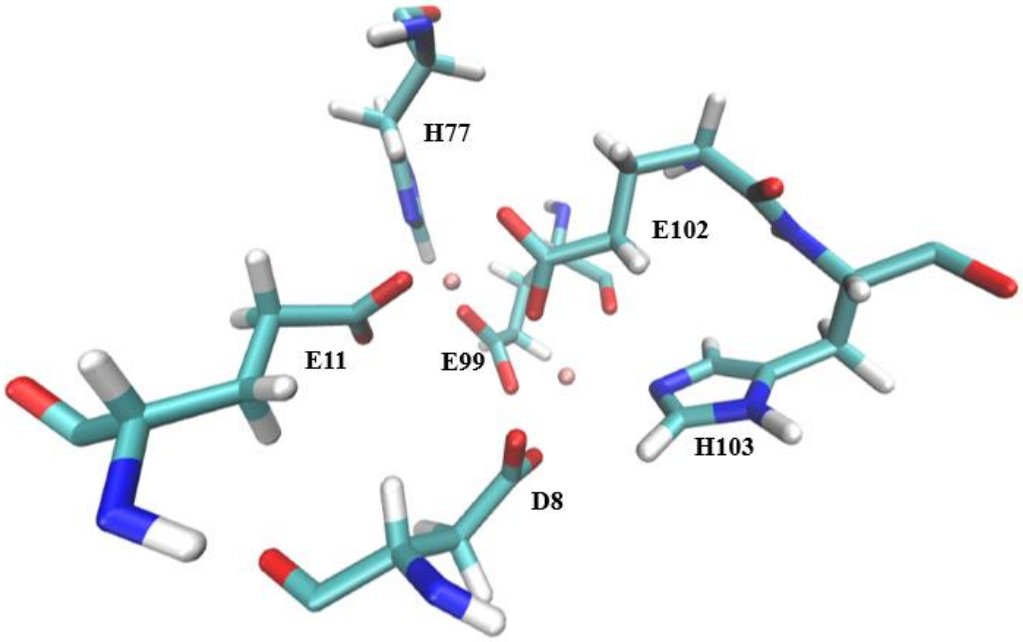
Slika 4. Kristalna struktura proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* koja sadrži kristalizirani magnezijev ion u veznom mjestu za manganove ione. Manganovi(II) ioni prikazani su plavim kuglicama.

Dodavanje atoma vodika provela sam koristeći mrežno dostupan program H++ (Anandakrishnan i sur. 2012). S obzirom na neutralnu pH vrijednost citoplazme bakterije *H. halodurans* (Slonczewski i sur. 2009), atomi vodika dodani su pri pH = 7. Protonacijska stanja histidina nisu se značajnije razlikovala između lanaca (Tablica 2).

Tablica 2. Protonacijska stanja histidina i asparaginske kiseline u apo i holo strukturi proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* dobivenih mrežno dostupnim programom H++.

Program	Aminokiselina	Apo		Holo	
		A	B	A	B
H++	35	HID	HIP	HIE	HIE
	77	HIP	HIP	HIE	HIE
	93	HIP	HIP	HIP	HIP
	97	ASP	ASP	ASP	ASH
	103	HIP	HIP	HID	HID
	104	HIP	HIP	HIE	HIE

Simulacije molekulske dinamike jedne replike apo strukture i dviju replika holo strukture provela sam pomoću programskog paketa *Amber20* (Case i sur. 2020). U sklopu paketa *Amber20* nalazi se alat *tleap* koji sam koristila za parametrizaciju struktura. Upotrijebila sam polje sila *ff14SB* (Maier i sru. 2015) za parametrizaciju proteina te polje sila *gaff* (engl. *general Amber force field*) (Wang i sur. 2004) za parametrizaciju manganovih(II) iona u slučaju simulacija s neveznim parametrima. Za provedbu simulacije holo strukture definirala sam vezne interakcije između manganovih(II) iona i aminokiselina koje ga koordiniraju (Slika 5) korištenjem veznih parametara razvijenih od strane ostalih članova istraživačke grupe (Jelić Matošević i sur. 2023). Strukturama sam dodala eksplicitan model otapala, tj. model molekula vode TIP3P kojima sam ispunila simulacijsku kutiju s dimenzijom simulacijske ćelije 10 Å x 10 Å x 10 Å. Ukupan naboj sustava neutralizirala sam dodavanjem iona natrija. Apo strukturi dodala sam osam iona natrija, a holo strukturi pet iona natrija.



Slika 5. Koordinacijska sfera aminokiselina manganovih(II) iona u veznom mjestu holo strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Manganovi ioni prikazani su kao roza kuglice.

Provela sam pet ciklusa optimizacije geometrije (minimizacije energije) apo i holo strukture proteina MntR iz bakterije *H. halodurans*. Svaki ciklus uključivao je 200 koraka algoritma najstrmijeg spusta (engl. *steepest decent*) i 800 koraka algoritma konjugiranih gradijenata (engl. *conjugate gradients).* U prvom ciklusu optimizirala sam molekule otapala tako što je na protein djelovao harmonijski potencijal s konstantom sile od 100 kcal mol^{-1} $Å^{-1}$. U drugom ciklusu uklonjena je restrikcija na atome vodika dok je na ostatak proteina djelovao isti harmonijski potencijal. U trećem i četvrtom ciklusu harmonijski potencijal djelovao je samo na atome proteinske okosnice, ali je u četvrtom ciklusu smanjen na 50 kcal mol^{-1} $Å^{-1}$. U petom ciklusu uklonjena je restrikcija gibanja za sve atome.

Nakon optimizacije geometrije provela sam tri simulacije uravnoteženja sustava. Prva simulacija uravnoteženja odvijala se pri konstantnom volumenu pri čemu je temperatura linearno rasla od 0 do 310 K tijekom 300 ps. Gibanje atoma u proteinu, iona mangana i molekule vode WT1

koja koordinira ion mangana ograničeno je harmonijskim potencijalom konstante sile 32 kcal mol^{-1} $Å^{-1}$. Druga i treća simulacija uravnoteženja odvijale su se pri konstantnom tlaku (1 bar) i temperaturi (310 K), bez restrikcija gibanja. Vrijeme trajanja druge simulacije uravnoteženja je 200 ps, a treće 500 ps.

Produkcijska faza simulacije MD provedene su pri konstantnom tlaku (1 bar) i temperaturi (310 K) u trajanju od 1,25 μs. Kvalitativnu analizu trajektorija, odnosno vizualizaciju, provela sam programom VMD (engl. *Visual Molecular Dynamics*). Uočene promjene kvantificirala sam koristeći alat *cpptraj* u sklopu programskog paketa *Amber20*. Rezultate kvantitativne analize prikazala sam u programu RStudio pomoću paketa ggplot2. Izračun elektrostatskog potencijala površine provela sam koristeći mrežno dostupan softver APBS - PDB2PQR (Jurrus i sur. 2018).

3.2. Identifikacija potencijalnih veznih mjesta transkripcijskog faktora MntR u genomu *Halalkalibacterium halodurans* bioinformatičkim metodama

U bazi podataka UniProt (The UniProt Consortium 2021) pronašla sam sekvence proteina MntA, MntB i MntC iz bakterije *H. halodurans.* Korištenjem baze podataka *ensemblBacteria* (Howe i sur. 2020) identificirala sam pozicije gena *mntA*, *mntB* i *mntC* unutar genoma. Geni *mntB* i *mntC* nalaze se jedan iza drugoga na lokaciji 1473077-1474707, dok je *mntA* smješten na lokaciji 544053-544955. Korištenjem baze podataka KEGG (Kanehisa i Goto 2000) preuzela sam sekvence promotorske regije gena *mntA* i operona *mntBC*.

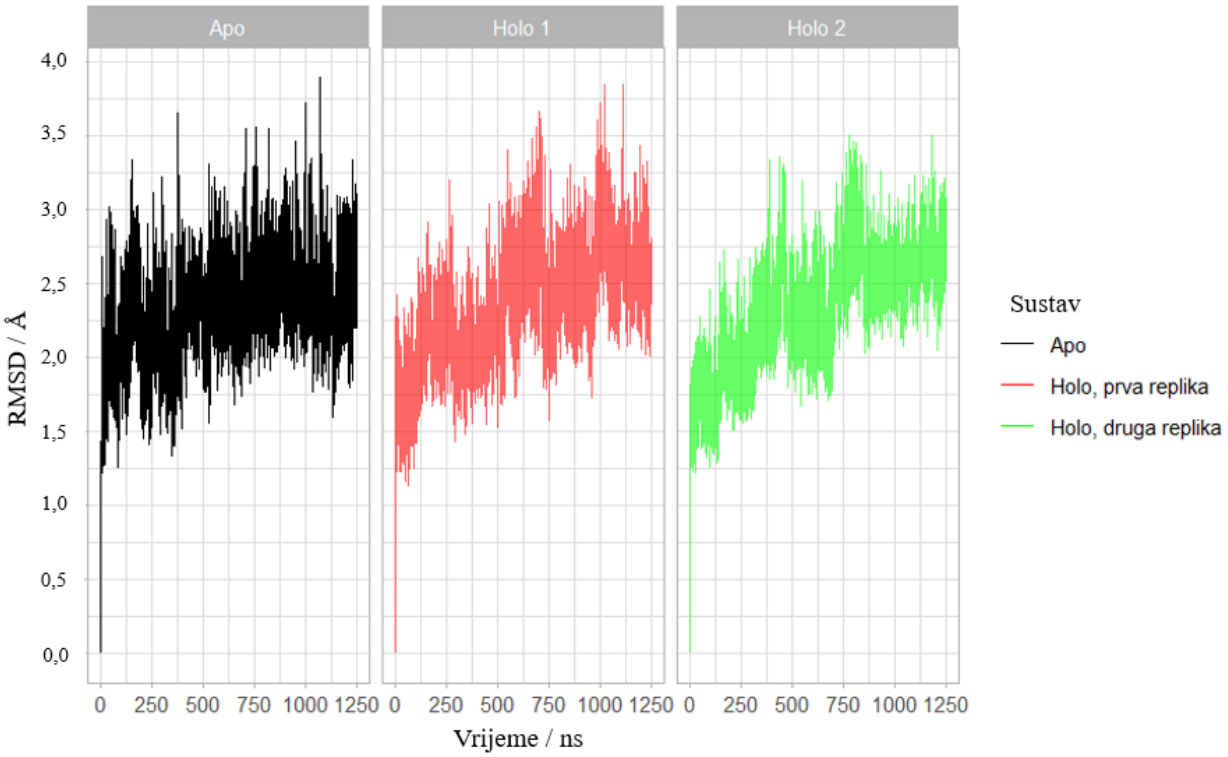
S obzirom da je protein MntR iz bakterije *B. subtilis* najbliži homolog proteinu MntR iz bakterije *H. halodurans* za kojeg je vezno mjesto u genomu poznato, preuzela sam sekvencu promotorske regije operona mntABC iz bakterije *B. subtilis* u kojoj se nalazi vezno mjesto za protein MntR pomoću baze podataka KEGG (Kanehisa i Goto 2000). Točnu sekvencu veznog mjesta proteina MntR iz bakterije *B. subtilis* u promotorskoj regiji operona *mntABC* preuzela sam iz literature (Lieser i sur. 2003). Koristeći mrežno dostupan program EMBOSS (Rice i sur. 2000) i algoritam Smith-Waterman sravnala sam navedene sekvence s promotorskim sekvencama operona *mntBC* i gena *mntA*.

Sekvence promotora gena *mntA* i operona *mntBC* dodatno sam analizirala paketom Biostrings unutar programskog jezika R. Funkcijom *findPalindromes* pretražila sam promotorske sekvence za nesavršene palindrome. Pronađene palindrome usporedila sam s rezultatima dobivenim sravnavanjem sekvenci.

4. Rezultati

4.1. Stabilnost sustava i fluktuacije proteinskih regija

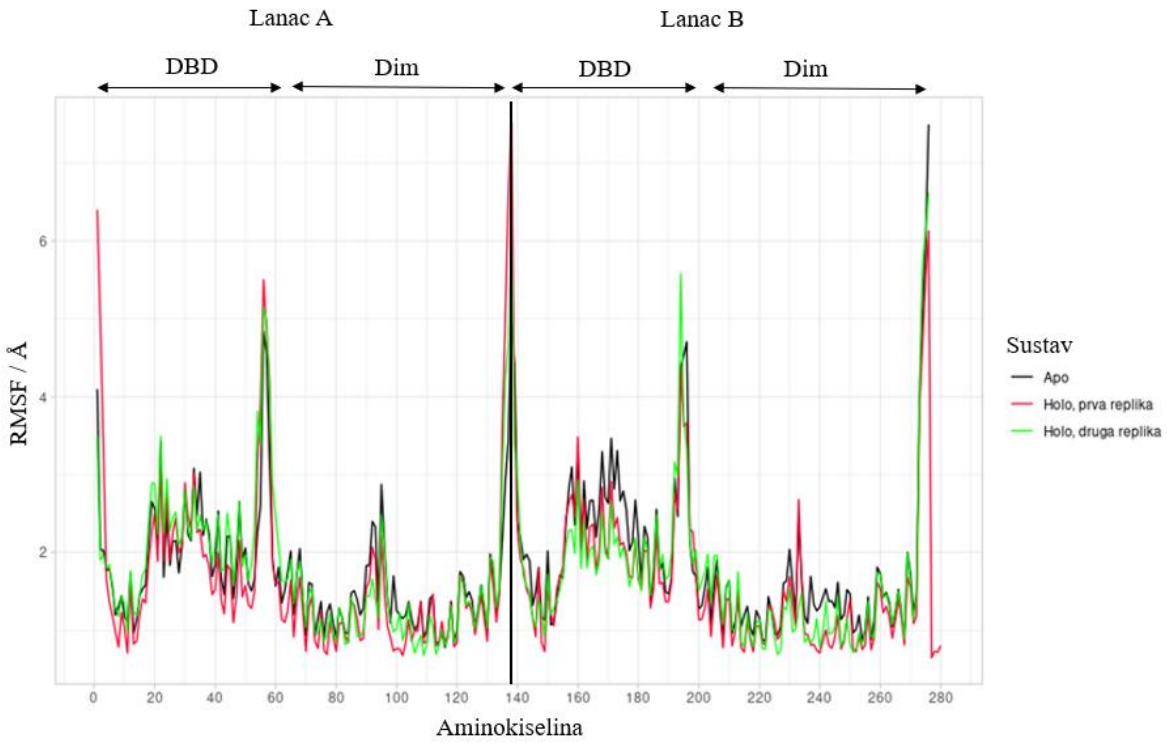
Stabilnost sustava tijekom MD simulacija određena je korijenom srednjeg kvadrata udaljenosti (RMSD) pri čemu je svaka konformacija dobivena tijekom simulacije uspoređena s početnom konformacijom (Slika 6). Vrijednosti RMSD apo strukture ne mijenja se značajno od početka MD simulacije, a struktura je stabilna nakon 500. ns (Slika 6). Obje replike holo strukture znatno su manje stabilne tijekom simulacije MD te se mogu zamijetiti brojni nagli skokovi u RMSD vrijednosti. Druga replika holo strukture stabilizirala se tek nakon 850. ns simulacije, dok je prva replika holo strukture stabilna od 500. ns uz blaga odstupanja oko 750. i 1000. ns (Slika 6).



Slika 6. Grafički prikaz korijena srednjeg kvadrata udaljenosti (RMSD) za atome proteinske okosnice tijekom simulacija molekulske dinamike apo i holo strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*. U slučaju holo strukture prikazane su dvije replike MD simulacije.

Nema značajnih razlika u fluktuaciji aminokiselina između različitih sustava tijekom MD simulacija (Slika 7). Aminokiseline koje najviše fluktuiraju nalaze se na N- i C-krajevima lanaca, a povećana fleksibilnost prisutna je i u DNA vezujućoj domeni između 50. i 60. aminokiseline koje se nalaze unutar β ukosnice motiva wHTH (Slika 7). β ukosnica bogata je lizinima koji sudjeluju u vezanju molekule DNA. Moguće da njihova fleksibilnost olakšava pozicioniranje na DNA.

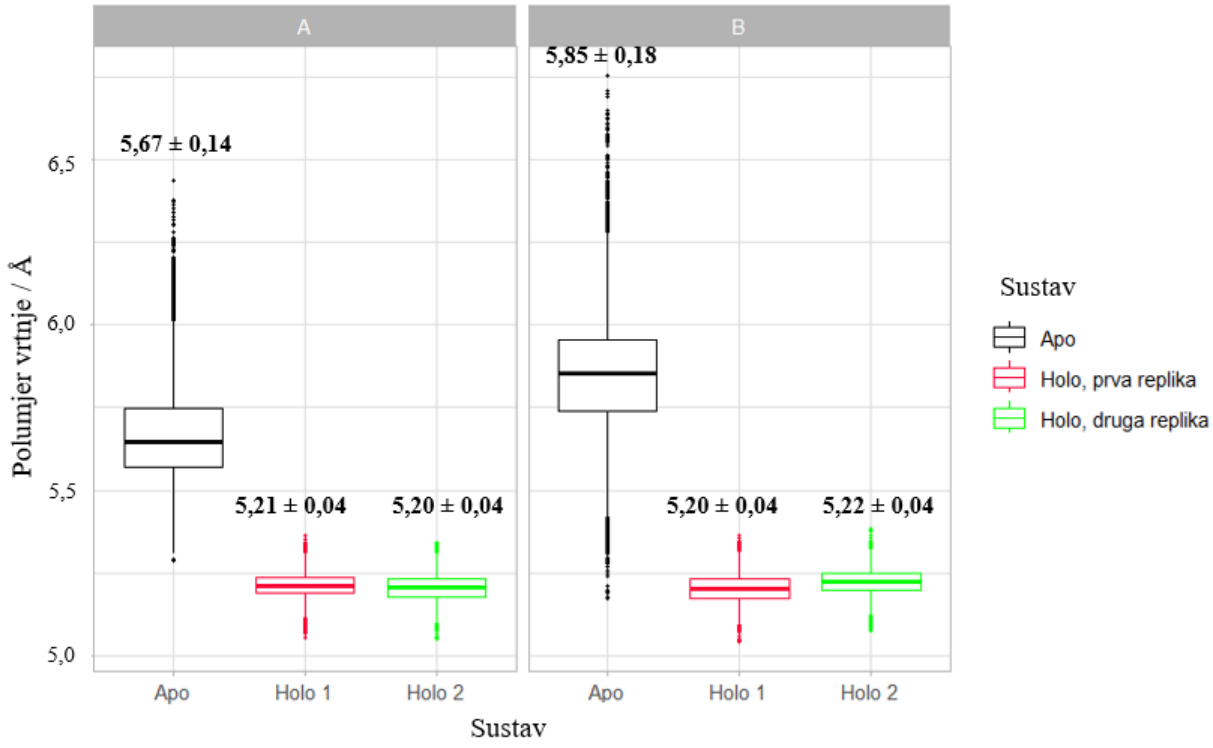
Aminokiseline unutar DNA vezujućih domena općenito fluktuiraju više od aminokiselina unutar dimerizacijskih domena (Slika 7). Razlike u stabilnosti između apo strukture i replika holo strukture pojavljuju se oko 100. odnosno 240. aminokiseline gdje se nalaze čak tri aminokiseline koje koordiniraju manganove(II) ione (Glu99, Glu102 i His103). Primjećuje se razlika u fluktuaciji DNA vezujuće domene u lancu B pri čemu aminokiseline 170-180 više fluktuiraju u apo strukturi nego holo strukturama (Slika 7). Te aminokiseline nalaze se na prijelazu zavojnice α2 u α3.



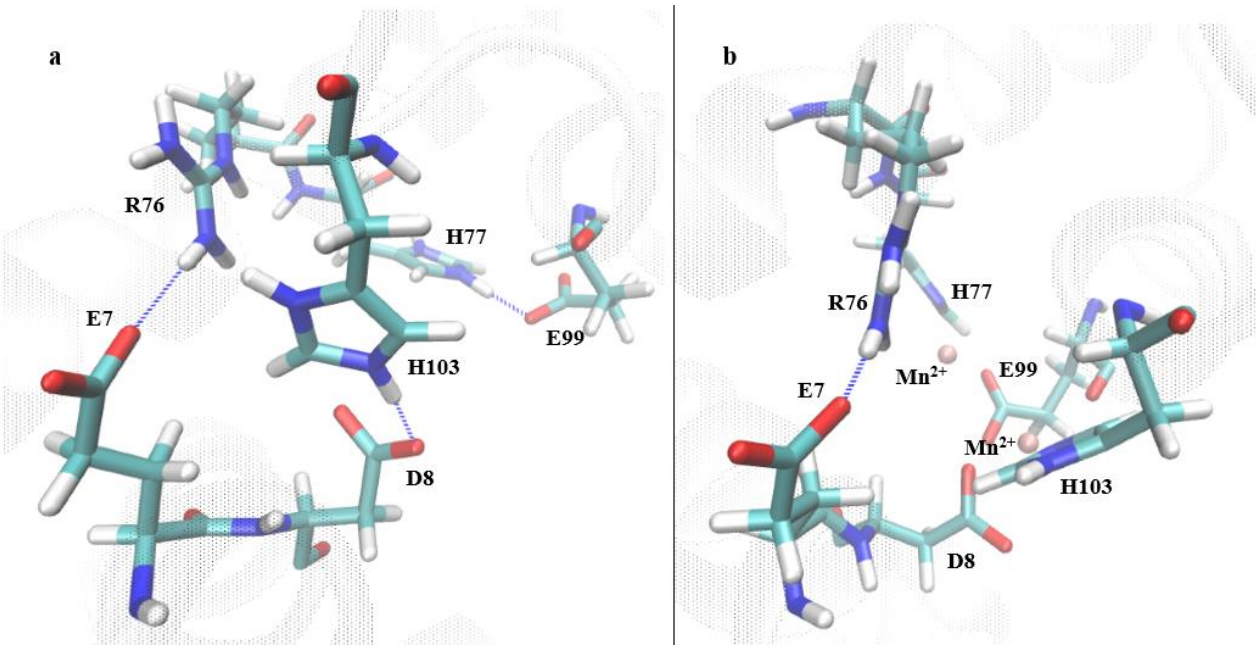
Slika 7. Grafički prikaz fluktuacije aminokiselina tijekom 1,25 μs MD simulacije apo (crno) i holo (zeleno i crveno) strukturama proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Strelicama su označene regije DNA vezujućih omena (DBD) i dimerizacijske domene, a ravnom linijom označen je kraj lanca A i početak lanca B.

4.2. Stabilizacija veznog mjesta za manganove(II) ione

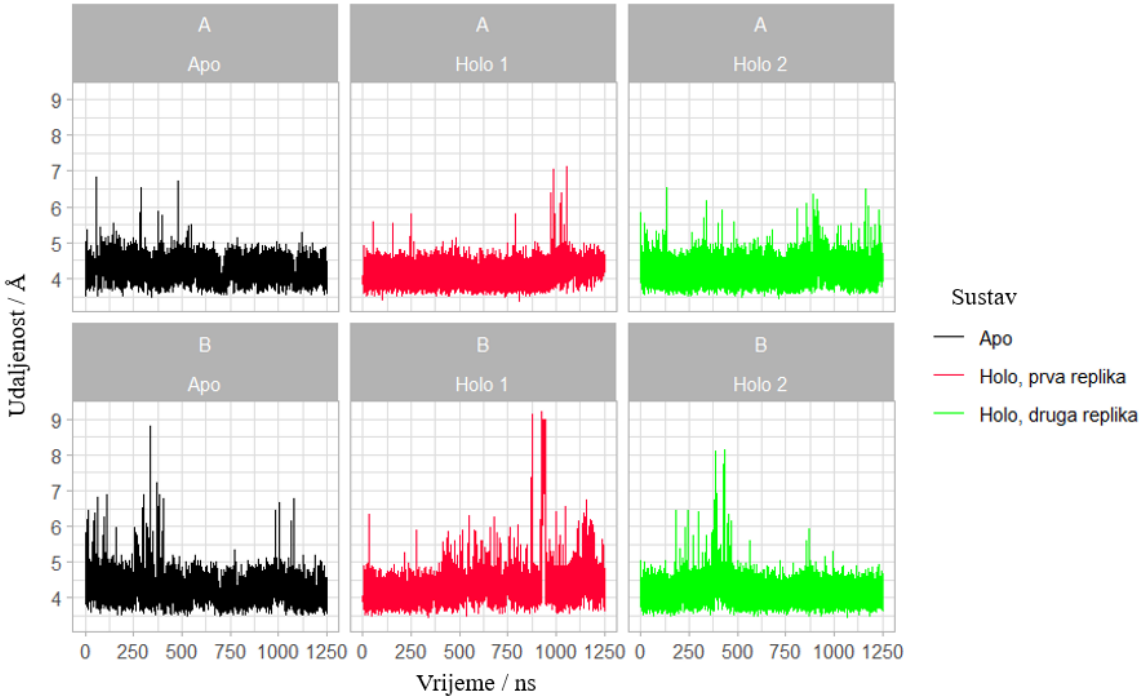
Prisutnost manganovih(II) iona određuje položaj aminokiselina veznog mjesta (Asp8, Glu11, His77, Glu99, Glu102 i His103). U holo strukturi navedene aminokiseline stupaju u interakciju s manganovim(II) ionima što dovodi do pomicanja aminokiselina prema unutrašnjosti i smanjenja volumena metalnog centra (Slika 8). U apo strukturi te aminokiseline međusobno stvaraju vodikove veze (Slika 9a) kojima održavaju povećan volumen metalnog centra (Slika 8). Najzastupljenija vodikova veza stvara se između Asp8 i His103 koji povezuju α1 i α5 zavojnicu (Slika 9a) i prisutna je u 68 % MD simulacije. His77 ulazi u interakciju s dvije aminokiseline, Glu99 i Glu102, ali je vodikova veza s Glu99 zastupljenija (45 % naspram 29 %). U održavanju integriteta veznog mjesta u obje strukture važnu ulogu ima vodikova veza između Glu7 i Arg76 koja je stabilna i u apo i u holo strukturi (Slika 10).



Slika 8. Srednja vrijednost i standardna devijacija polumjera vrtnje aminokiselina koje vežu manganove(II) ione (Asp8, Glu11, His77, Glu99, Glu102 i His103) u lancima A i B proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* tijekom 1,25 μs MD simulacije.



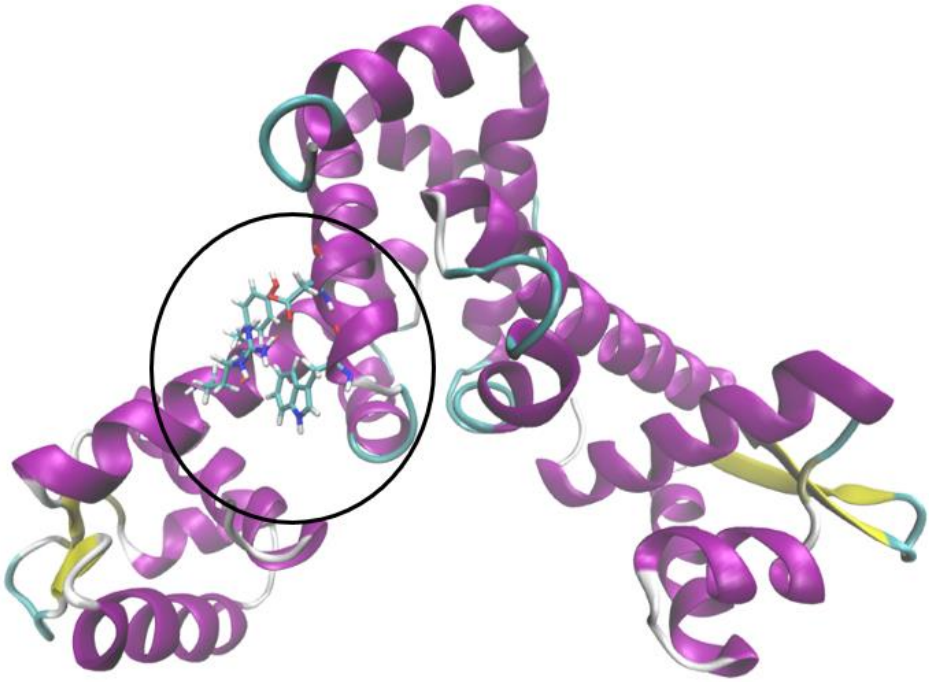
Slika 9. Vodikove veze unutar veznog mjesta za manganove(II) ione u: a) apo strukturi i b) holo strukturi proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.*



Slika 10. Udaljenost atoma Glu7:CD i Arg76:CZ tijekom simulacija molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Crnom bojom označena je apo struktura, a crvenom i zelenom bojom replike holo strukture.

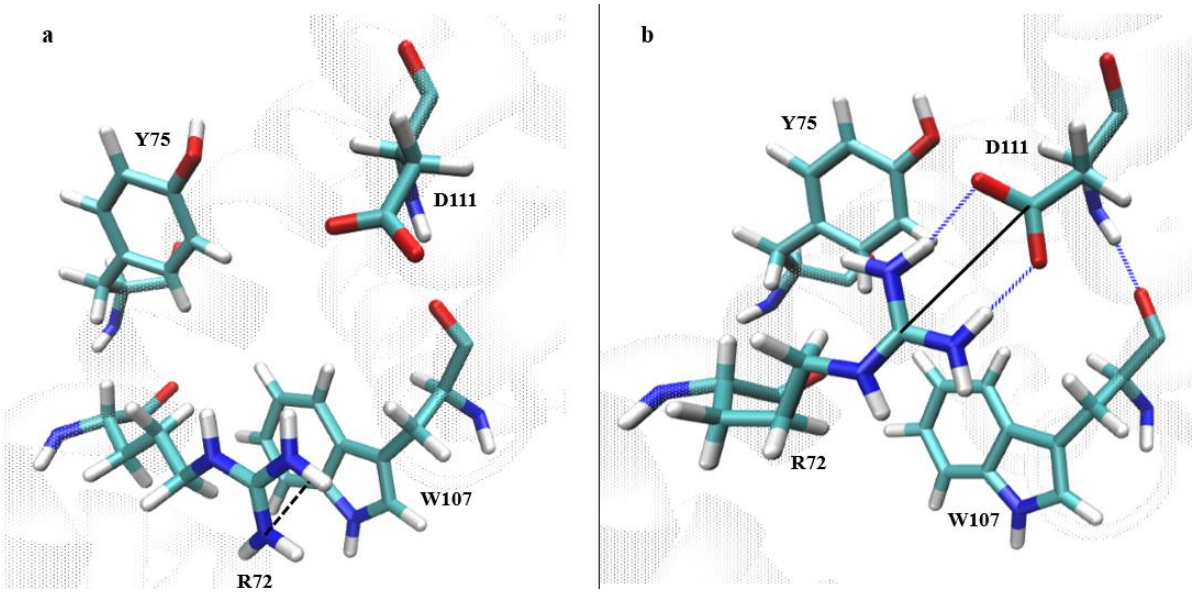
4.3. Interakcije oko metalnog centra ovisno o prisustvu manganovih(II) iona

Oko metalnog centra uočene su nekovalentne interakcije koje doprinose konformaciji pojedine strukture (Slika 11). Nakon postupka minimizacije, u apo strukturi bila je prisutna kation-π interakcija između Arg72 i Trp107 (Slika 12a). Tijekom simulacije apo strukture bočni ogranak aminokiseline Arg72 mijenja orijentaciju prema bočnom ogranku Asp111 s kojim ulazi u interakciju preko vodikovih veza (Slika 12b). Stvaranje vodikove veze (Slika 13) međusobno približava aminokiseline Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 čime se smanjuje volumen veznog mjesta (Slika 14). Prosječna udaljenost atoma Arg72:CZ i Asp111:CG tako iznosi 6,49 ± 2,03 Å, a prosječan polumjer vrtnje aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 iznosi 5,40 ± 0,29 Å (Tablica 3). Uz Arg72, aminokiselina Tyr75 također može stvarati vodikove veze s Asp111 čime dodatno potiče pomicanje α4 zavojnice (Slika 12b).

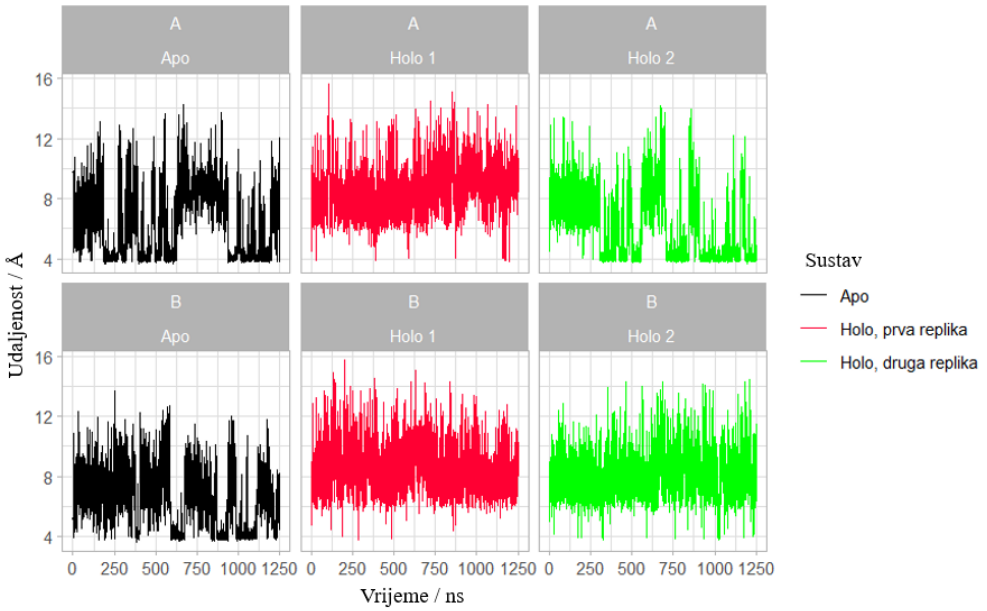


Slika 11. Pozicija aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 koje stvaraju dodatne interakcije oko veznog mjesta za manganove(II) ione u proteinu MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.*

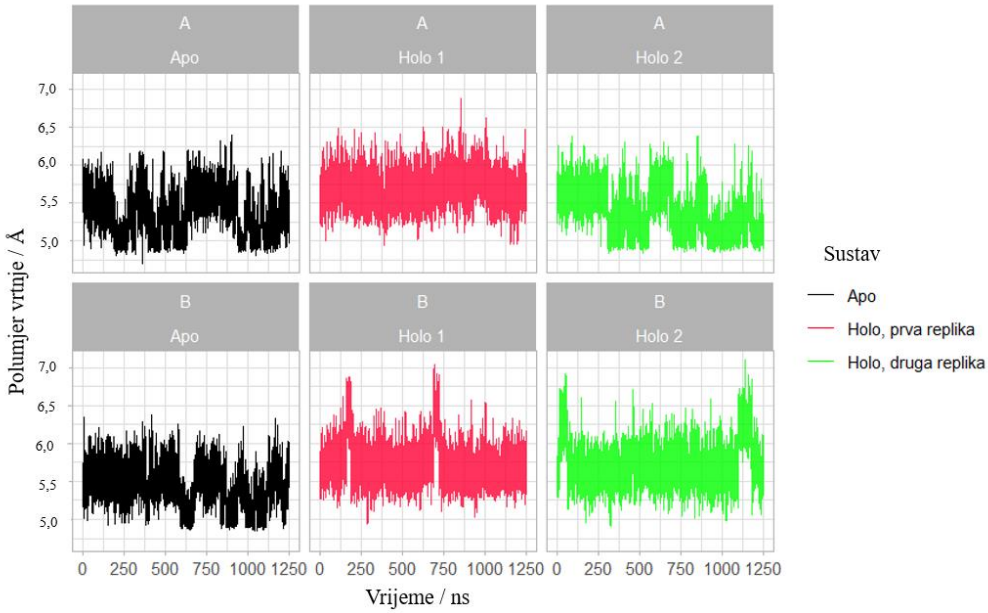
Kation-π interakcija postojana je tijekom skoro cijele simulacije prve replike holo strukture pri čemu prosječna udaljenost atoma Arg72:CZ i Asp111:CG iznosi 8,56 ± 1,5 Å (Tablica 3), a prosječan polumjer vrtnje koji tvore aminokiseline Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 iznosi 5,71 ± 0,24 Å (Tablica 3). U drugoj replici holo strukture lanci se ponašaju asimetrično (Slike 13 i 14). U lancu A pojavljuje se vodikova veza između Arg72 i Asp111, dok je u lancu B stabilna kation-π interakcija. To se očitava i na vrijednostima udaljenosti atoma Arg72:CZ i Asp111:CG te polumjeru vrtnje aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 pri čemu se vrijednosti lanca A poklapaju s vrijednostima apo strukture, a vrijednosti lanca B s vrijednostima prve replike holo strukture (Tablica 3).



Slika 12. Pozicije aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* u: a) početnoj strukturi u kojoj je prisutna kation-π interakcija označena crtkanom linijom na slici, i b) strukturi dobivenoj nakon 1,04 μs simulacije molekulske dinamike u kojoj je kation-π interakcija zamijenjena vodikovim vezama označenim plavim crtkanim linijama na slici. Udaljenost atoma Arg72:CZ i Asp111:CG označena je punom crnom linijom.



Slika 13. Udaljenost atoma Arg72:CZ i Asp111:CG tijekom simulacije proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Crnom bojom prikazana je apo struktura, a crvenom i zelenom bojom prikazane su replike holo strukture.



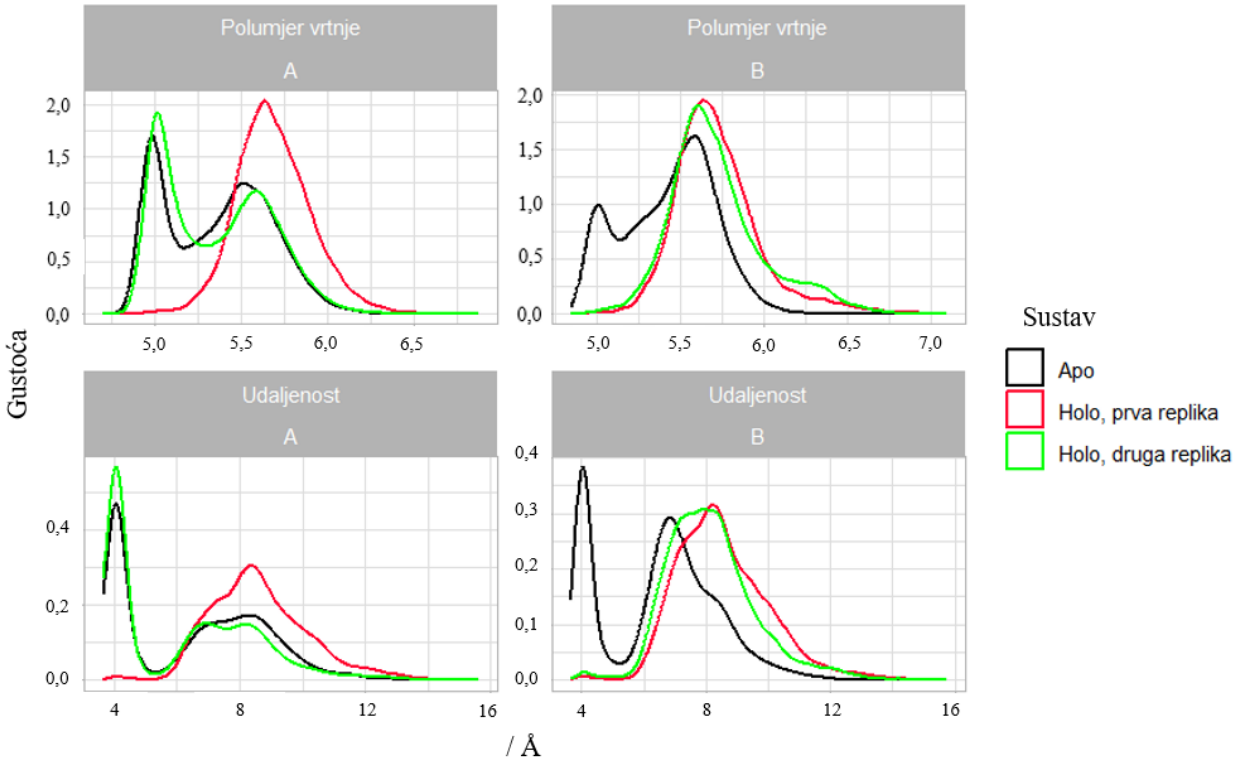
Slika 14. Polumjer vrtnje aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 tijekom simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Crnom bojom prikazana je apo struktura, a crvenom i zelenom prikazane su replike holo strukture.

Tablica 3. Srednja vrijednost i standardna devijacija udaljenosti atoma Arg72:CZ i Asp111:CG te polumjera vrtnje koji tvore aminokiseline Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111

Struktura	**Apo**		**Holo, prva replika**		**Holo druga replika**	
Lanac	A	B	A	B	A	B
Prosječna udaljenost Arg72:CZ i Asp111:CG (Å)	6,48	6,49	8,60	8,53	6,14	8,15
Standardna devijacija udaljenosti Arg72:CZ i Asp111:CG (Å)	2,23	1,83	1,54	1,46	2,23	1,42
Prosječan polumjer vrtnje Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 (Å)	5,36	5,43	5,69	5,72	5,35	5,72
Standardna devijacija polumjera vrtnje Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 (Å)	0,31	0,27	0,22	0,25	0,31	0,28

Iz dijagrama gustoće može se uočiti da postoje dva stanja u kojima se mogu naći aminokiseline Arg72 i Asp111 (Slika 15). Udaljenost atoma Arg72:CZ i Asp111:CG ima izražen oštar vrh na oko 4 Å koji se uočava u lancima apo strukture i lancu A druge replike holo strukture (Slika 15). U lancima prve replike holo strukture i lancu B druge replike holo strukture ne uočava se taj oštar vrh, već se uočava glatki vrh oko 8 Å (Slika 15). Slična distribucija gustoće prati polumjer vrtnje aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111. U lancima apo strukture i lancu A druge replike holo strukture postoje dva karakteristična vrha s vrijednostima oko 5 Å i 5,5 Å (Slika 15). U prvoj replici holo strukture i lancu B druge replike holo strukture ponovno se uočava jedan vrh na 5,7 Å (Slika 15).

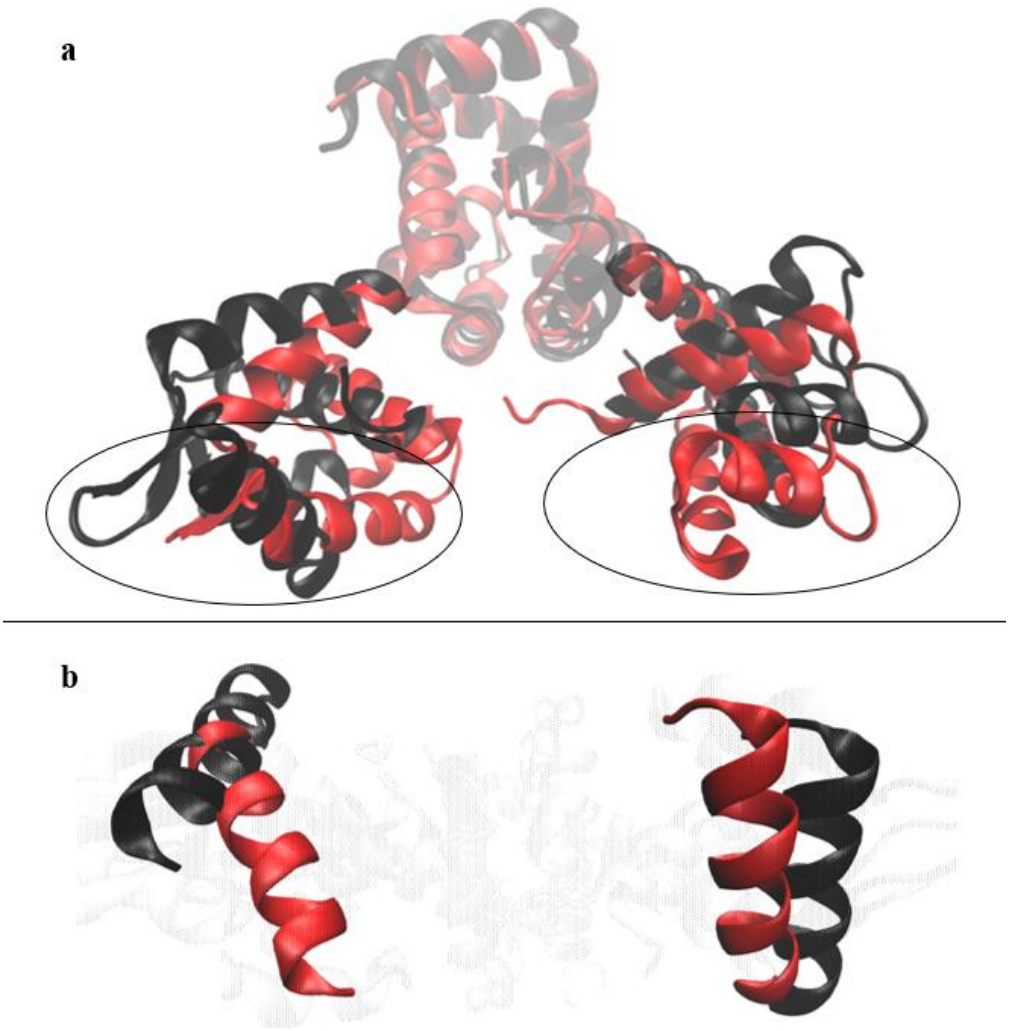
Iz ovoga se može zaključiti da srednje vrijednosti udaljenosti Arg72:CZ i Asp111:CG u apo strukturi koja iznosi 6,49 Å (Tablica 3) nije realan prikaz udaljenosti na kojoj se nalaze ti atomi, već srednja vrijednost dva razdvojena stanja. Isti zaključak vrijedi i za polumjer vrtnje aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111. Za prvu repliku holo strukture srednje vrijednosti se u potpunosti poklapaju s distribucijom vrijednosti i udaljenosti i polumjera vrtnje jer opisuje jedno kontinuirano stanje gdje je prosjek najzastupljeniji (Slika 15).



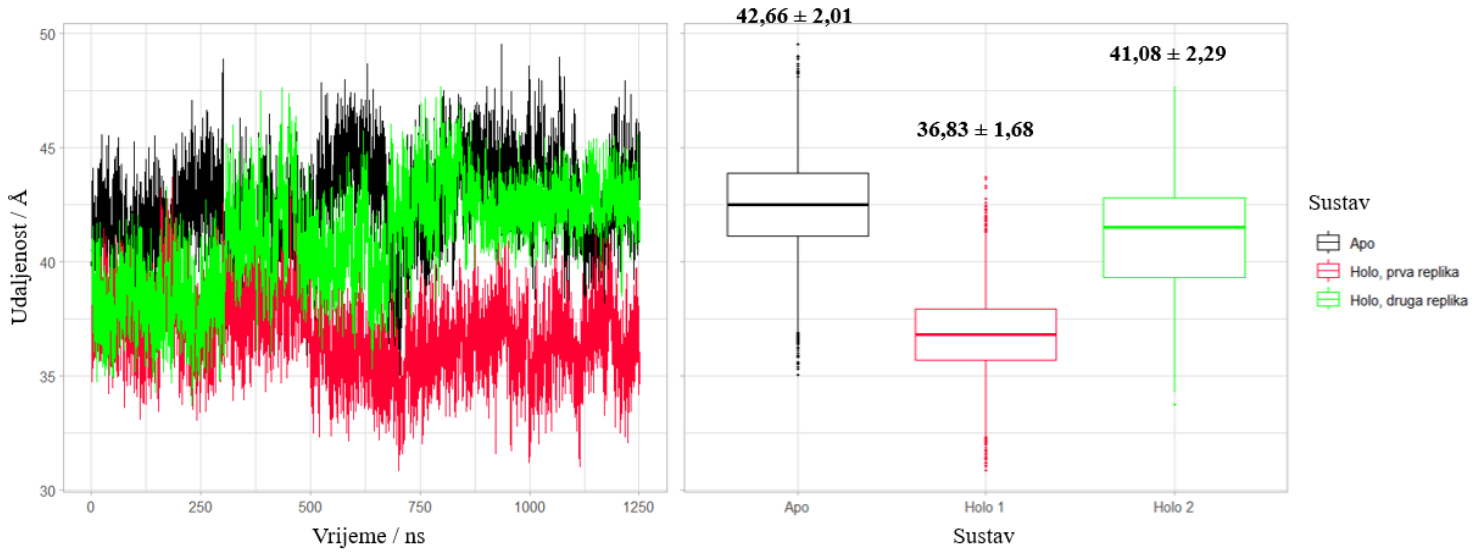
Slika 15. Graf gustoće polumjera vrtnje aminokiselina Arg72, Tyr75, Trp107 i Asp111 i udaljenosti atoma Arg72:CZ i Asp111:CG u proteinu MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Crnom bojom prikazane su vrijednosti za simulaciju apo strukture, dok su dvije replike simulacije holo strukture prikazane crvenom i zelenom bojom.

4.4. Položaj α4 zavojnice i udaljenost DNA vezujućih domena

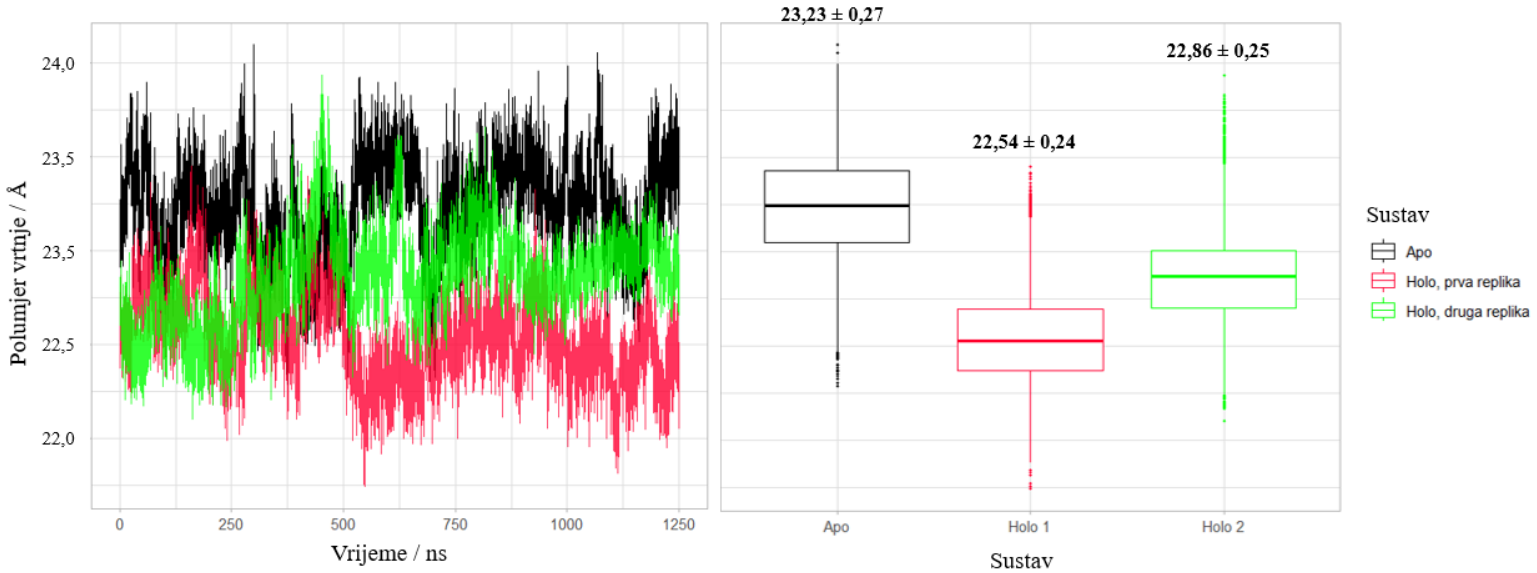
Glavna razlika između apo i holo strukture proteina MntR iz bakterije *H. halodurans* je pozicija α4 zavojnice koja se u apo strukturi lomi (Slika 16a). Posljedica lomljenja α4 zavojnice je odmicanje α3 zavojnica koje vežu molekulu DNA (Slika 17) i povećanje vrijednosti polumjera vrtnje proteina MntR (Slika 18).



Slika 16. Protein MntR s označenom α3 zavojnicom iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* u apo (crno) i holo (crveno) obliku preklopljeni u programu VMD. Prikazane su strukture dobivene nakon 1 μs simulacije molekulske dinamike, a prikazuju: a) cijeli protein i b) položaj α3 zavojnice unutar DNA vezujuće domene koja veže molekulu DNA.



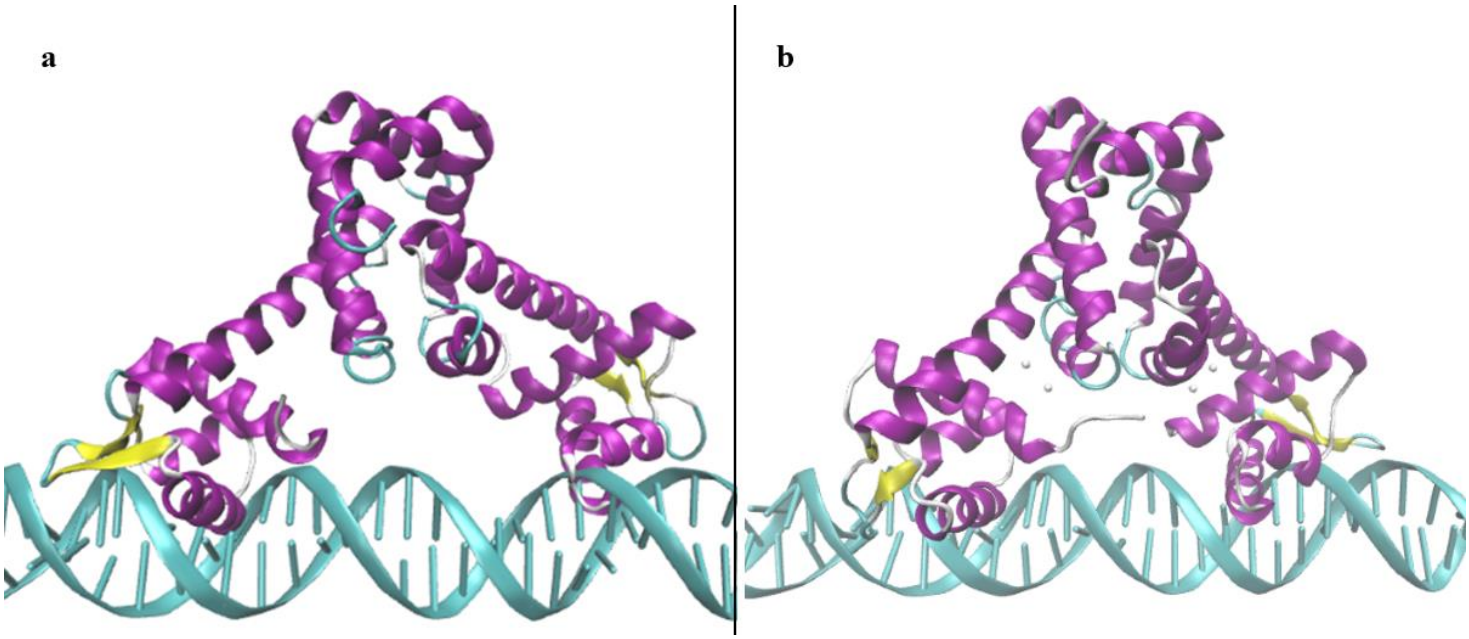
Slika 17. Udaljenost α3 zavojnica unutar DNA vezujućih domena proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* tijekom simulacije molekulske dinamike s izraženim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama. Crnom bojom prikazane su vrijednosti za simulaciju apo strukture, dok su dvije replike simulacije holo strukture prikazane crvenom i zelenom bojom.



Slika 18. Grafički prikaz polumjera vrtnje proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* tijekom simulacije molekulske dinamike s izraženim srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom. Crnom bojom prikazane su vrijednosti za simulaciju apo strukture, dok su dvije replike simulacije holo strukture prikazane crvenom i zelenom bojom.

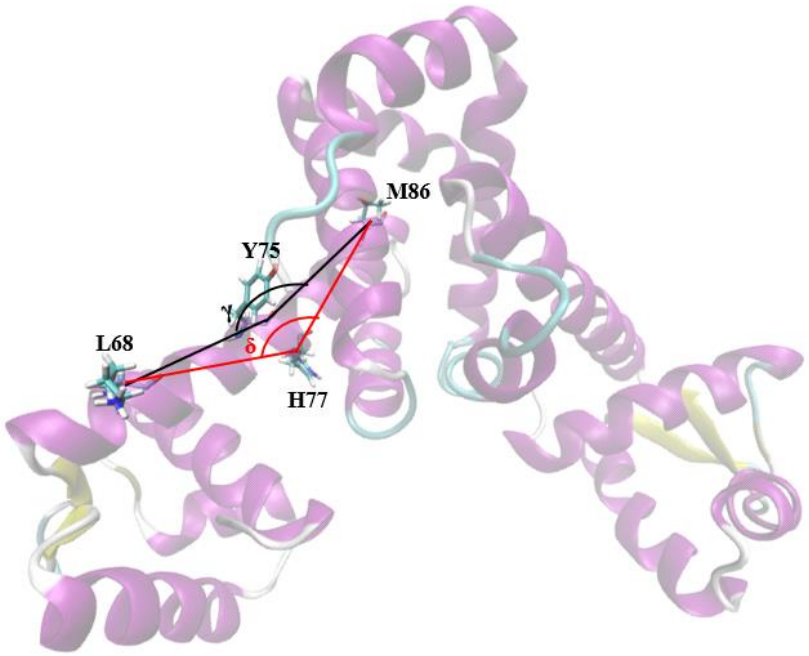
Polumjer vrtnje proteina MntR direktno je povezan s udaljenosti DNA vezujućih domena što se jasno vidi iz grafičkih prikaza tih vrijednosti (Slike 17 i 18). Anomalija se primjećuje kod druge replike holo strukture gdje polumjer vrtnje ne prati promjenu udaljenosti α3 zavojnica nakon 875. ns MD simulacije (Slike 17 i 18).

Udaljenost α3 zavojnica u prvoj replici holo strukture proteina MntR (36,83 ± 1,68 Å) omogućava njeno vezanje u dva susjedna velika utora molekule DNA (Slika 19b). U apo strukturi udaljenost α3 zavojnica je znatno veća (42,66 ± 2,01 Å) zbog čega se apo struktura proteina MntR ne može vezati na molekulu DNA (Slika 19a).



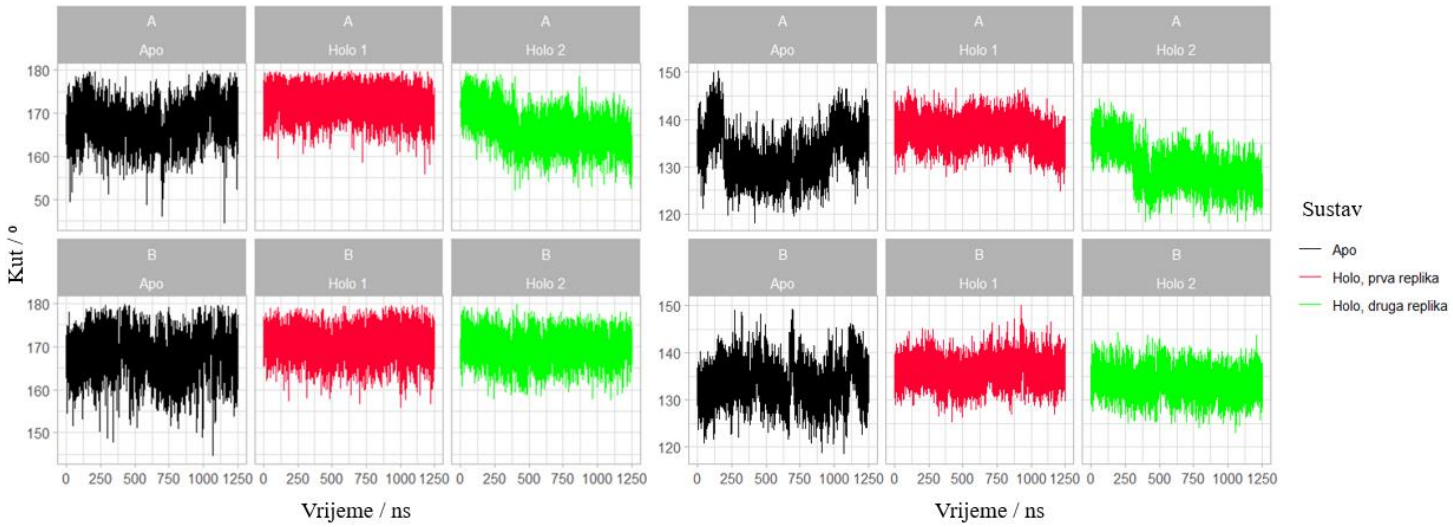
Slika 19. Spojen prikaz proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* i molekule DNA. Lijevo (a) je prikazana apo struktura dobivena nakon 1,25 μs simulacije molekulske dinamike, a desno (b) je prikazana prva replika holo strukture dobivena nakon 1,25 μs simulacije molekulske dinamike. Strukture su spojene u programu VMD.

Mjerenjem kuta γ kojeg zatvaraju Cα atomi aminokiselina Leu68, Tyr75 i Met86 te kuta δ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, His77 i Met86 može se pratiti lomljenje α4 zavojnice (Slika 20).



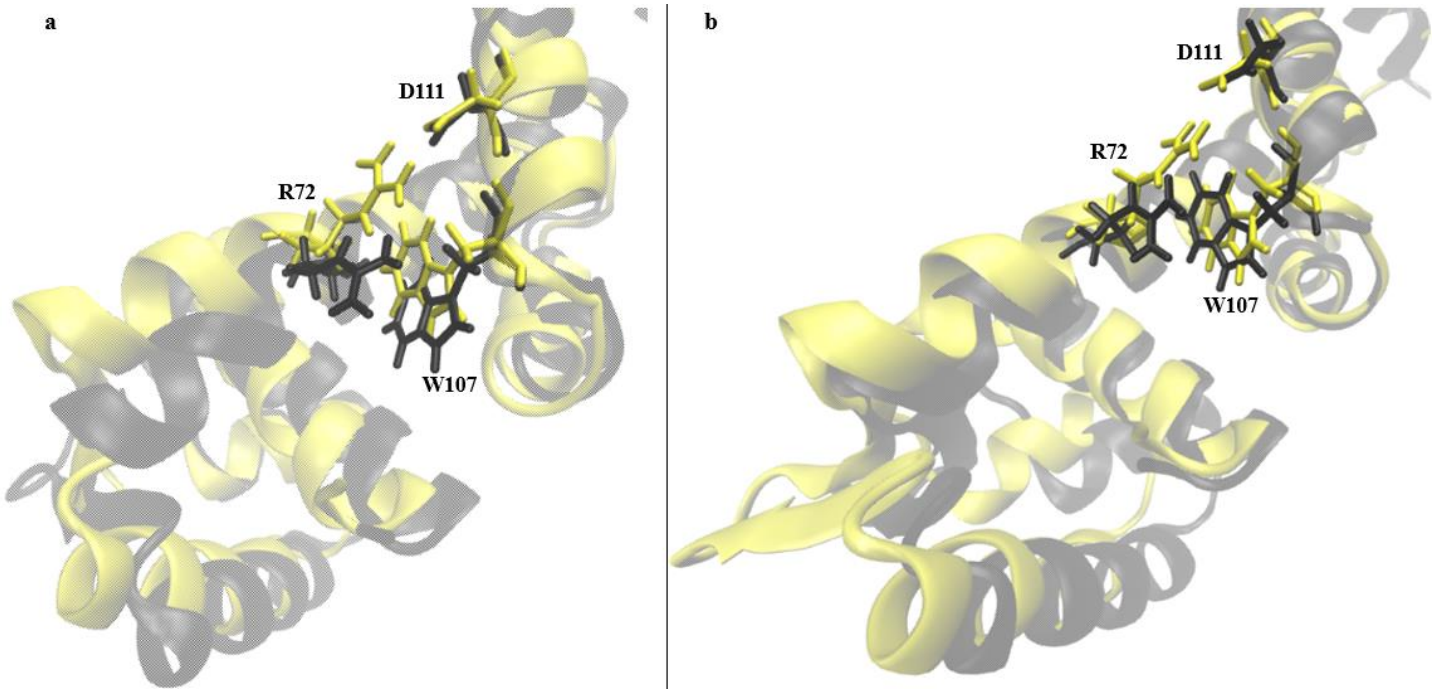
Slika 20. Kut γ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, Tyr75 i Met86 i kut δ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, His77 i Met86 unutar α4 zavojnice proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*. Kut γ označen je punom linijom crne boje, a kut δ punom linijom crvene boje.

U apo strukturi srednja vrijednost kuta γ iznosi 167,84 ± 4,45 º, a kuta δ 133,23 ± 4,42 º (Slika 21). U prvoj replici holo strukture prosječne vrijednosti kutova γ i δ za par su stupnjeva veće nego u apo strukturi (171,47 ± 3,13 º za kut γ i 136,70 ± 2,75 º za kut δ) (Slika 21). U drugoj replici holo strukture to nije slučaj, pa tako kut γ iznosi 168,02 ± 3,61 º, a kut δ 131,98 ± 3,43 º. Nadalje, kutovi γ i δ stabilni su u prvoj replici holo strukture, dok se u apo strukturi i lancu A druge replike holo strukture mogu uočiti nagli skokovi u vrijednostima (Slika 21).



Slika 21. Promjena kuta γ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, Tyr75 i Met86 (lijevo) i promjene kuta δ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, His77 i Met86 (desno) tijekom simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Crnom bojom označena je apo struktura, a crvenom i zelenom bojom označene su replike holo strukture.

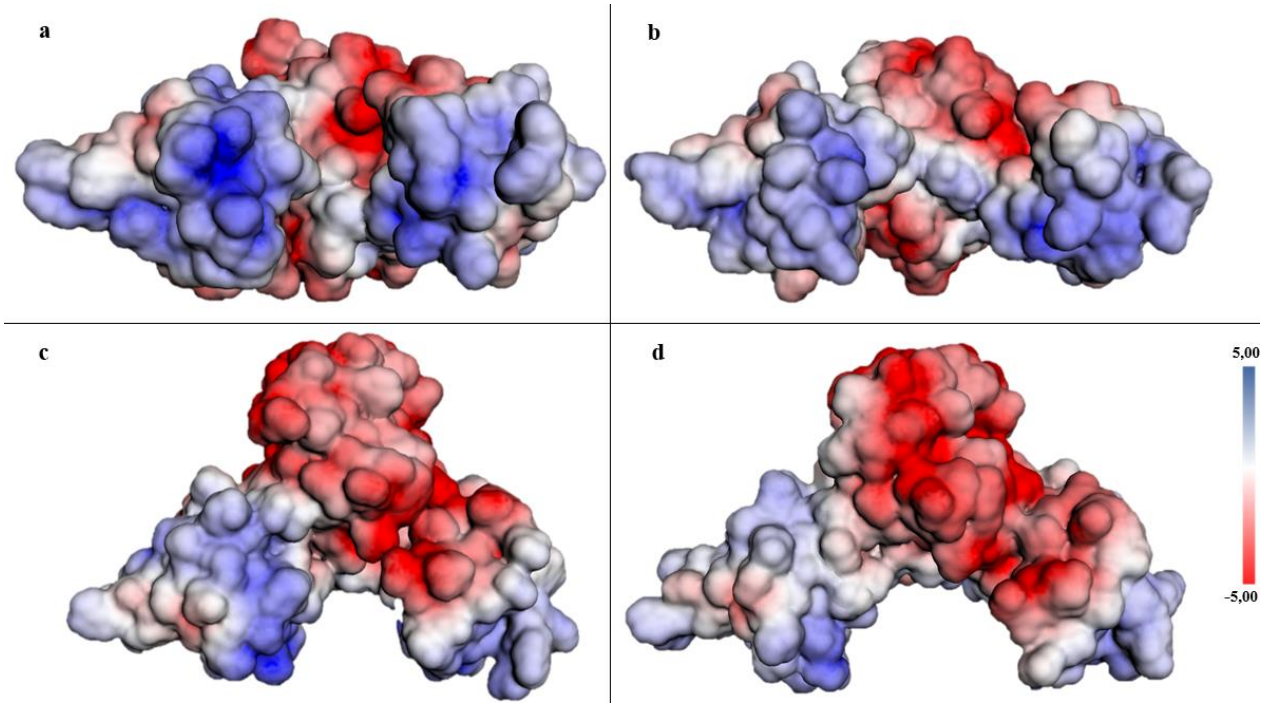
Nagli pad u vrijednosti kuta δ u lancu A apo strukture uočava se nakon 125. ns MD simulacije (Slika 21). Preklapanjem apo struktura dobivenih u 100. i 500. ns simulacije MD uočava se promjena u poziciji Arg72 (Slika 21). U 100. ns simulacije apo strukture Arg72 ostvaruje kation-π interakciju s Trp107, dok je u 500. ns orijentiran prema Asp111 s kojim stvara vodikove veze (Slika 22a). Nagli pad u vrijednosti kuta δ uočava se i u lancu A druge replike holo strukture nakon 250. ns simulacije MD (Slika 22). Preklapanjem druge replike holo strukture dobivene u 100. i 500. ns simulacije MD dobiven je isti rezultat kao i u apo strukturi (Slika 22b). Štoviše, usporedbom kutova γ i δ s udaljenosti atoma Arg72:CZ i Asp111:CG može se zaključiti da su nagle promjene direktna posljedica približavanja aminokiselina Arg72 i Asp111 (Slike P1 i P2 u Prilogu). Iz usporedbe također se može zaključiti da nakon inicijalne promjene kuta δ, vodikova veza između Arg72 i Asp111 ne utječe značajnije na kut δ pa tako i na lom α4 zavojnice (Slike P1 i P2 u Prilogu). To ukazuje da postoje dodatni mehanizmi koji stabiliziraju konformaciju s lomom α4 zavojnice.



Slika 22. Usporedba pozicije aminokiselina Arg72, Trp107 i Asp111 u A lancu proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* dobivenih preklapanjem: a) apo struktura u 100. ns (crno) i 500. ns (žuto) simulacije molekulske dinamike i b) druge replike holo strukture u 100. ns (crno) i 500. ns (žuto) simulacije molekulske dinamike.

4.5. Elektrostatski potencijal DNA vezujuće domene

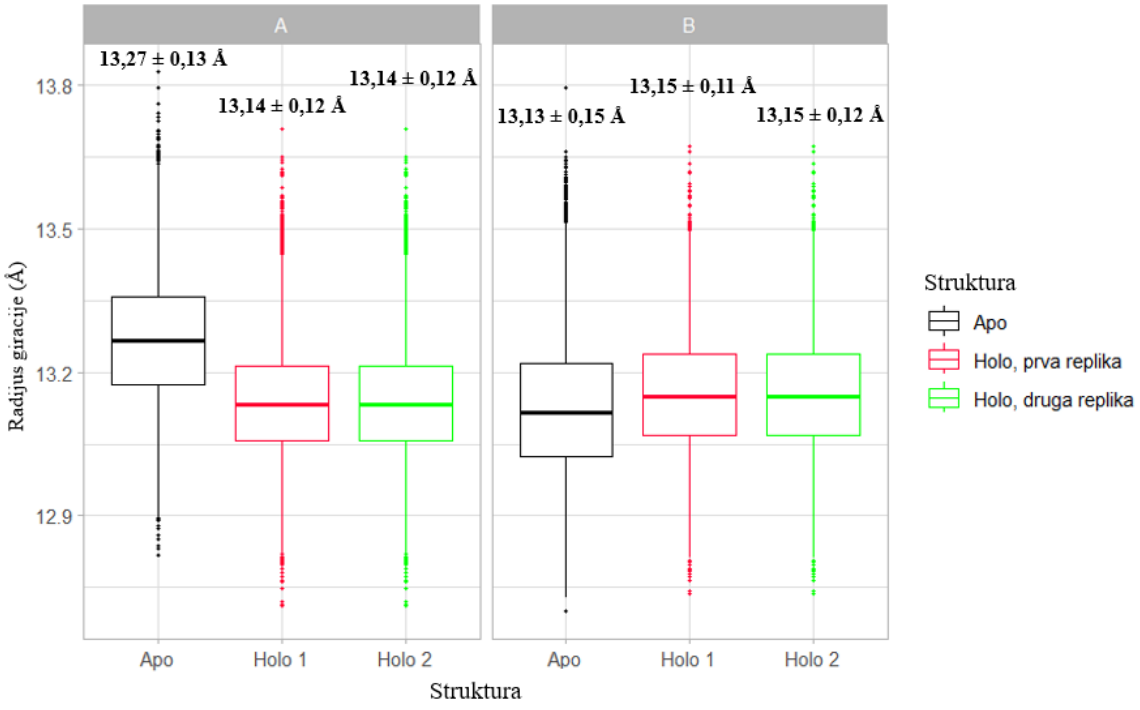
DNA vezujuće domene apo i holo strukture razlikuju se u površinskom naboju (Slika 23). DNA vezujuće domene holo strukture imaju izraženiji pozitivan elektrostatski potencijal lokaliziran na α3 zavojnici wHTH motiva (Slika 23a). Pozitivan elektrostatski potencijal u holo strukturi proteže se duž DNA vezujuće domene prema veznom mjestu manganovih(II) iona (Slika 23c). Iako nema vezane manganove(II) ione, apo struktura također ima pozitivno nabijene DNA vezujuće domene (Slika 23b), ali je taj elektrostaski potencijal manjen izražen nego kod holo strukture. Naboj se na krilnom dijelu wHTH motiva značajno ne razlikuje između struktura.



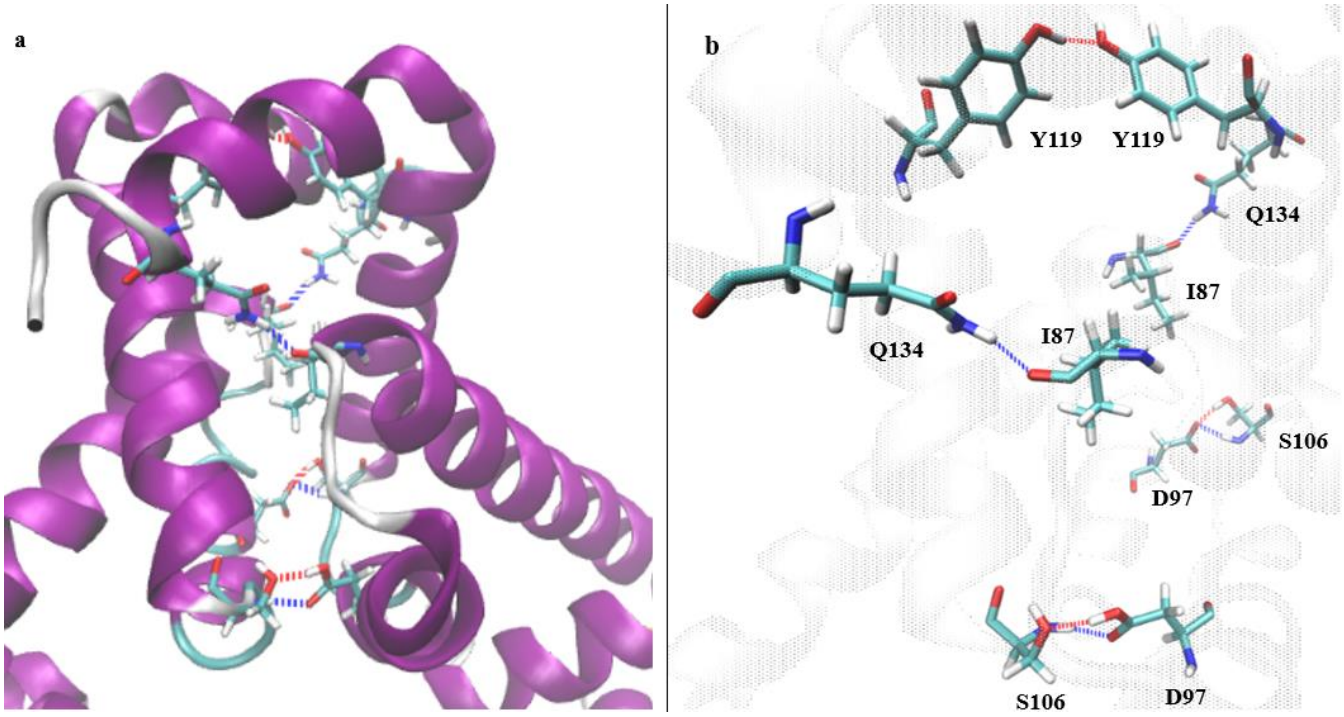
Slika 23. Elektrostatski potencijal površine proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*. Lijevo ((a) i (c)) je prikazana holo struktura, desno ((b) i (d)) je prikazana holo struktura u dvije orijentacije. Na slikama a) i b) su u prvom planu DNA vezujuće domene. Skala elektrostatskog potencijala prikazana je desno s maksimalnom vrijednosti 5,00 kT/e i minimalnom vrijednosti -5,00 kT/e.

4.6. Stabilizacija dimerizacijske domene

Nema značajnih razlika u stabilizaciji dimerizacijske domene između apo i holo strukture proteina MntR (Slika 24). Polumjer vrtnje dimerizacijske domene apo strukture iznosi 13,20 ± 0,14 Å, dok u holo strukturi iznosi 13,15 ± 0,12 Å. U stabilizaciji dimerizacijske domene sudjeluju brojne vodikove interakcije između lanaca. Jedna od njih je vodikova veza između Asp97 jednog lanca i Ser106 drugog lanca koja je zastupljena u 63 % simulacije (Slika 25). Navedene aminokiseline smještene su na α5 zavojnici (Slika 25). Druga vodikova veza koja povezuje α6 zavojnice nastaje između Tyr119 jednog lanca i Tyr119 drugog lanca (Slika 25), a prisutna je u više od 75 % simulacije. Posljednja interakcija koja je podjednako (31,47 %) prisutna u apo i holo strukturama je vodikova veza između Ile87 i Gln134 koja povezuje α4 i α7 zavojnice istih lanaca (Slika 25).



Slika 24. Srednja vrijednost i standardna devijacija polumjera vrtnje dimerizacijske domene apo i holo strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*. Crnom bojom označena je apo struktura, a crvenom i zelenom replike holo strukture.



Slika 25. Najzastupljenije vodikove veze unutar dimerizacijske domene proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans.* Vodikove veze istaknute su isprekidanim plavim i crvenim linijama.

4.7. Analiza veznog mjesta proteina MntR u promotorskim regijama gena *mntA* i operona *mntBC*

Lokalno sravnjenje sekvence promotora gena *mntA* i sekvence poznatog veznog mjesta za protein MntR iz bakterije *B. subtilis* pokazalo je podudaranje na poziciji 237-252 s 87,5 % sličnosti u sekvenci. Funkcijom *findPalindromes* pronađen je nesavršeni palindrom na sličnoj poziciji, 235-252, što bi upućivalo da se radi o traženoj sekvenci (5'-GTTTTGCCTTGGGGAAAC–3').

Lokalno sravnjenje sekvence promotora operona *mntBC* i sekvence poznatog veznog mjesta pokazalo je podudaranje na poziciji 116-130 s 80 % sličnosti u sekvenci. Funkcijom *findPalindromes* pronađen je nesavršeni palindrom na poziciji 111-134 koji uključuje traženu sekvencu (5'-AAAAGTTTACTTAGGGAAACTTTT-3').

5. Rasprava

5.1. Lom α4 zavojnice

Lom α4 – zavojnice događa se između 75. i 77. aminokiseline što se djelomično poklapa s istraživanjima DeWitt i sur. (2007) koji su procijenili da se centar savijanja proteina MntR iz bakterije *B. subtilis* nalazi između 72. i 75. aminokiseline. Čak četiri aminokiseline na potezu između 72. i 77. aminokiseline stupaju u interakcije koje potiču lom α4 zavojnice i otvoreniju konformaciju. Lom α4 zavojnice kvantificiran je preko kutova γ i δ. Kut γ u apo strukturi iznosi 167,84 ± 4,45 º, u prvoj replici holo strukture 171,47 ± 3,13 º, a u drugoj replici 168,02 ± 3,61 º. To je u skladu s istraživanjem napravljenim na proteinu MntR iz bakterije *B. subtilis* u kojem je navedeno da se kut kojeg zatvaraju ugljikovi atomi proteinske okosnice ne razlikuje značajno između apo i holo strukture i iznosi 170.3 ± 4.1 º za apo i 169.5 ± 3.7 º za holo strukturu (Jelić Matošević i sur. 2023).

Ključna interakcija koja potiče lom α4 zavojnice prema van je vodikova veza između Arg72 i Asp111 (Slika P1 u prilogu). Na početku simulacije apo strukture Arg72 orijentiran je prema veznom mjestu za manganove(II) ione (Slika 12a). Tijekom simulacije Arg72 mijenja svoju orijentaciju prema α6 zavojnici i ulazi u interakciju s Asp111 (Slika 12b). Naglo smanjenje vrijednosti kuta δ nakon 125. ns simulacije apo strukture u lancu A popraćeno je naglim smanjenjem udaljenosti atoma Arg72:CZ i Asp111:CG (Slika P1 u prilogu) što ukazuje da je to interakcija koja potiče inicijalni lom α4 zavojnice. Tijekom ostatka simulacije apo strukture vodikova veza između Arg72 i Asp111 ne utječe tako značajno na promjenu kuta δ već su promjene blago izražene (Slika P1 u prilogu). To upućuje na postojanje dodatnih nekovalentnih interakcija koje stabiliziraju konformaciju proteina s lomom α4 zavojnice.

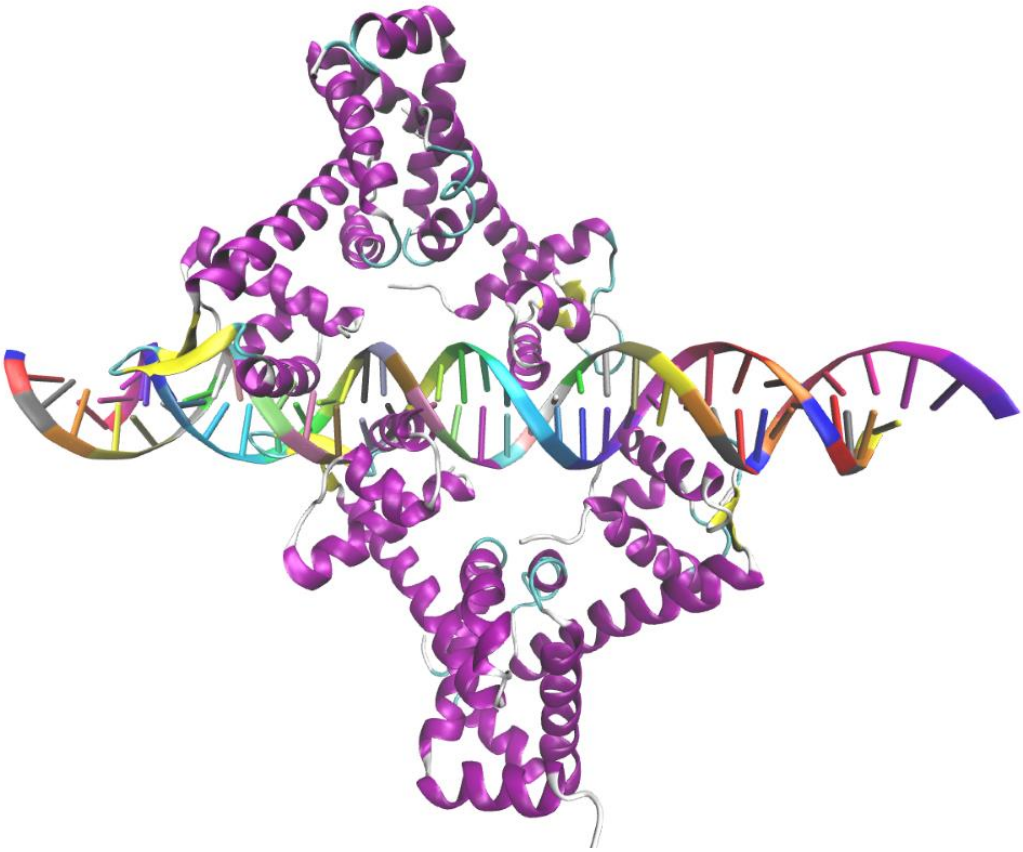
U prvoj replici holo strukture u niti jednom trenutku simulacije Arg72 nije u blizini Asp111, već stvara kation-π interakciju s Trp107 (Slika 12a). U drugoj replici holo strukture u lancu A prisutna je vodikova veza između Arg72 i Asp111 (Slika 13). Reorijentacija Arg72 oko 250. ns simulacije MD druge replike holo strukture dovodi do naglog smanjenja vrijednosti kuta δ (Slika P2 u prilogu). Tijekom ostatka simulacije MD druge replike holo strukture, kut δ je stabilan i ne ovisi značajno o zamjeni vodikove i kation-π veze (Slika P2 u prilogu) što ukazuje na postojanje

dodatnih mehanizama stabilizacije otvorenije konformacije. U lancu B druge replike holo strukture dominantnija je kation-π interakcija zbog čega je taj lanac rigidan poput lanaca prve replike holo strukture (Slika 21). Rezultat asimetričnog ponašanja lanaca druge replike holo strukture je povećan polumjer vrtnje proteina i veća udaljenost α3 zavojnica u odnosu na prvu repliku (Slike 17 i 18).

5.2. Vezanje molekule DNA

Prikaz vezanja proteina MntR na molekulu DNA nije idealan jer se α3 zavojnica ne nalazi u optimalnom položaju za vezanje DNA (Slika 19b). Ovako pripremljeni sustav potrebno je simulirati kako bi se proučio način vezanja. Ipak, iz prikaza se jasno vidi da i prva replika holo strukture koja ima najmanju udaljenost α3 zavojnica (36,83 Å) jedva stane u dva susjedna velika utora (Slika 19b). Iz toga se jasno da zaključiti da je udaljenost DNA vezujućih domena limitirajući faktor u vezanju molekule DNA. Nadalje, to također pokazuje da konformacije dobivene simulacijom apo strukture (Slika 19a), kao ni simulacije uzorkovane tijekom simulacije druge replike holo strukture (Slika P3 u prilogu), nisu pogodne za vezanje na ciljanu sekvencu bez dodatnih konformacijskih promjena uzrokovanih interakcijom s DNA ili nekim drugim faktorom.

Protein MntR član je obitelji proteina DtxR (Lee i sur. 2019) za kojeg je poznata struktura vezanja na molekulu DNA (identifikacijski kod u PDB: 1F5T). Protein DtxR veže se za molekulu DNA preko α3 zavojnica DNA vezujućih domena koje upadaju u dva susjedna velika utora molekule DNA. U isto vrijeme vežu se dva proteina DtxR sa suprotnih strana molekule DNA (Chen i sur. 2000). Prema tome, pretpostavka je da će se i protein MntR iz bakterije *H. halodurans* vezati na sličan način na pretpostavljenu sekvencu gena *mntA* (Slika 26).

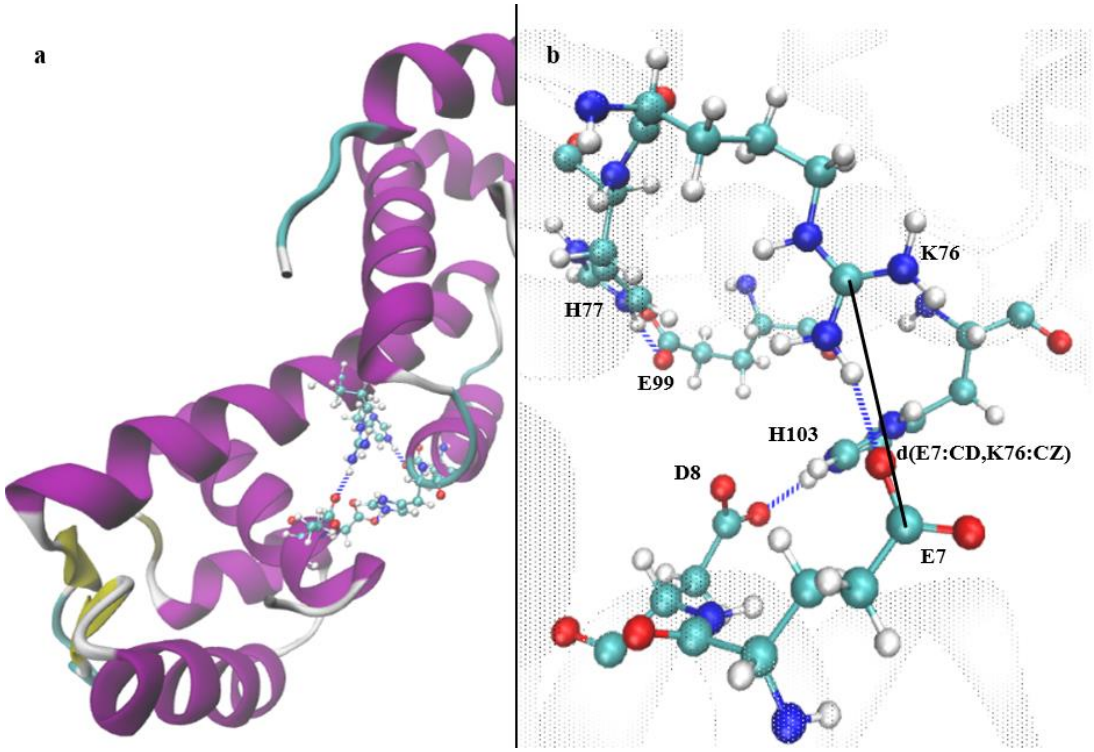


Slika 26. Prikaz vezanja dviju molekula holo strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* s molekulom DNA koja sadrži predviđenu sekvencu vezanja u promotoru gena *mntA*. Prikazane strukture proteina dobivene su nakon 1,25 μs simulacije molekulske dinamike.

5.3. Održavanje integriteta veznog mjesta manganovih(II) iona

Lom α4 zavojnice u apo strukturi povlači sa sobom α1 i α5 zavojnicu čime se održava integritet metalnog centra. Za to su zaslužne tri vodikove veze koje se stvaraju između zavojnica. Jedna od njih stvara se između Glu7 i Arg76 koja povezuje α1 i α4 zavojnicu i održava njihovu udaljenost stabilnom. Udaljenost atoma Glu7:CD i Arg76:CZ stabilna je tijekom cijele simulacije te iznosi 4,31 ± 0,35 Å za apo strukturu odnosno 4,25 ± 0,40 Å za holo strukturu (Slika 10). Ostale

vodikove veze u apo strukturi nastaju između aminokiselina koje u holo strukturi koordiniraju manganove(II) ione. Vodikova veza između His77 i Glu99 povezuje α4 i α5 zavojnice, dok veza između Asp8 i His103 povezuje α1 i α5 zavojnicu (Slika 9). Njihovo djelovanje zauzima oblik trokuta unutar metalnog centra (Slika 27a). Rezultat navedenih vodikovih veza je očuvanje volumena metalnog centra (Slika 8). U holo strukturi aminokiseline Asp8, His77, Glu99 i His103 koordiniraju manganove(II) ione koji povezuju zavojnice umjesto vodikovih veza. Manganovi(II) ioni omogućavaju približavanje aminokiselina prema unutrašnjosti metalnog centra čime se smanjuje njegov polumjer vrtnje (Slika 8). Smanjen polumjer vrtnje metalnog centra moguće potiče stvaranje i stabilizaciju kation-π interakcije približavanjem Arg72 i Trp107.



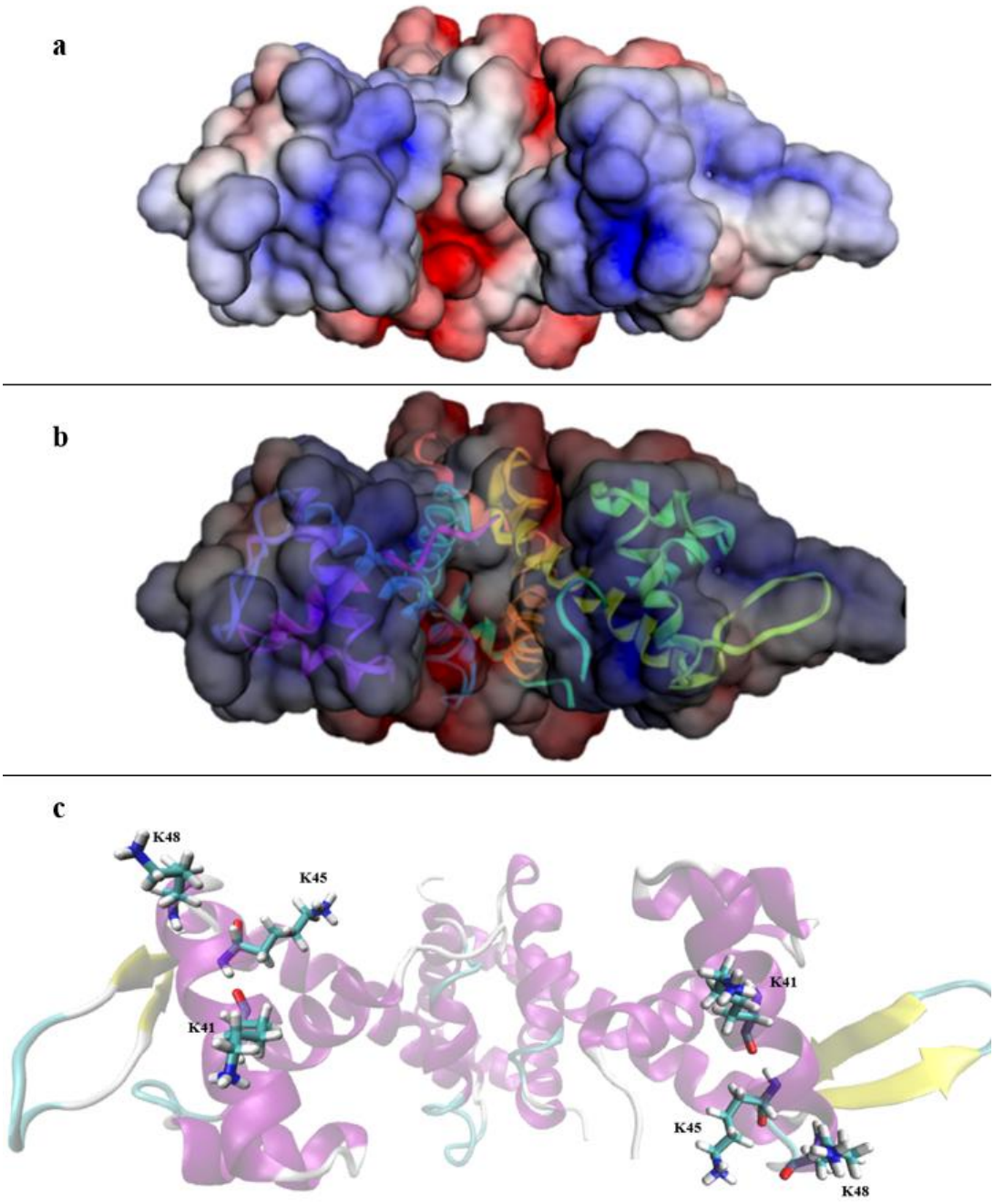
Slika 27. Vodikove veze unutar metalnog centra apo strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* s označenom udaljenosti između atoma Glu7:CD i Arg76:CZ.

5.4. Dimerizacijska domena

Osim α4 zavojnice, nema značajnih razlika u dimerizacijskim domena apo i holo strukture proteina MntR. Lee i sur. (2019) predvidjeli su sedam vodikovih interakcija koje stabiliziraju dimerizacijsku domenu (Tablica 1). Interakcije između Asp97 i Ser106 te Tyr119 i Tyr119 stabilne su tijekom simulacije apo i holo strukture. Dvije navedene interakcije (Asp90 i Asp108, Glu122 i Lys136) nisu prisutne u niti jednoj strukturi. Interakcije između Asp115 i Asn137 pojavljuje se u obje strukture, ali se njena zastupljenost razlikuje. U apo strukturi prisutna je u 10 % simulacije, dok je u holo strukturi prisutna u oko 32 % simulacije. Posljednja interakcija između Gln118 i Asn137 nije prisutna u apo strukturi dok je u holo strukturi prisutna u otprilike 18,5 % simulacije.

5.5. DNA vezujuća domena

DNA vezujuća domena holo strukture ima izraženiji pozitivni elektrostatski potencijal od DNA vezujuće domene apo strukture (Slika 23). Najintenzivniji pozitivan elektrostatski potencijal odgovara poziciji aminokiselina Lys41, Lys45 i Lys48 na α3 zavojnici za koje se pretpostavlja da vežu molekulu DNA (Slika 28) (Lee i sur. 2019). Pozitivan naboj uočava se duž DNA vezujuće domene prema metalnom centru holo strukture (Slika 23c). Ta promjena naboja nastaje zbog vezanja manganovih(II) iona koja potiče orijentaciju negativnog naboja prema metalnom centru, a pozitivnog naboja prema površini te moguće da predstavlja dio alosteričkog mehanizma kojime se povečava afinitet proteina za DNA.



Slika 28. DNA vezujuće domene prve replike holo strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* prikazane nakon 1,25 μs simulacije molekulske dinamike. Prikazani su: (a) elektrostatski potencijal DNA vezujuće domene, (b) pozicija α3 zavojnice unutar DNA vezujuće domene u odnosu na elektrostatski potencijal, (c) aminokiseline Lys41, Ly45 i Lys48 unutar α3 zavojnice koje vežu molekulu DNA .

6. Zaključak

Vezanje manganovih(II) iona u metalni centar proteina MntR doprinosi stabilnosti holo strukture i omogućava međusobno približavanje α3 zavojnica DNA vezujućih domena. Takva konformacija holo strukture može se vezati u dva susjedna velika utora molekule DNA i represirati transkripciju ciljanih gena. Nekovalentna interakcija koja doprinosi kompaktnosti holo strukture je kation-π interakcija između Arg72 i Trp107. Ona je također potaknuta vezanjem manganovih(II) iona čime se smanjuje volumen metalnog centra te olakšava stvaranje i održavanje kation-π interakcije. U apo strukturi volumen metalnog centra je veći što potiče Arg72 da se reorijentira prema Asp111 na α6 zavojnici dimerizacijske domene s kojim stvara vodikove veze. Stvaranje vodikovih veza potiče inicijalni lom α4 zavojnice koja povezuje domene i razdvajanje DNA vezujućih domena.

Lom α4 zavojnice preko vodikovih veza povlači α1 i α5 zavojnicu čime se dodatno odvajaju DNA vezujuće domene. Funkcija povezanosti triju zavojnica je održavanje volumena metalnog centra koji je konstantan neovisno o vezanosti manganovih(II) iona. Polumjer vrtnje metalnog centra apo strukture iznosi 5,76 ± 0,16 Å, a holo strukture 5,21 ± 0,04 Å. U holo strukturi funkciju povezivanja zavojnica provode manganovi(II) ioni, dok se u apo strukturi stvaraju tri stabilne vodikove veze. Vezanje manganovih(II) iona također potiče promjenu elektrostatskog potencijala na površini stanice. Potencijal DNA vezujuće domene holo strukture pozitivniji je od apo strukture. Najizraženiji pozitivan naboj odgovara poziciji aminokiselina Lys41, Lys45 i Lys48 za koje se pretpostavlja da sudjeluju u vezanju negativno nabijene molekule DNA. Stabilizacija dimerizacijske domene ne razlikuje se značajno između struktura.

Bioinformatička analiza promotora gena *mntA* i operona *mntBC* pokazala je da se vezno mjesto za protein MntR nalazi na poziciji 235-252 u promotorskoj regiji gena *mntA* te na poziciji 111-134 u promotorskoj regiji operona *mntBC*.

7. Literatura

Allen, M. P. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins, 23(1), 1-28.

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.

Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M., & Iyer, L. M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. FEMS microbiology reviews, 29(2), 231-262.

Attie, O., Jayaprakash, A., Shah, H., Paulsen, I. T., Morino, M., Takahashi, Y., ... & Krulwich, T. A. (2014). Draft genome sequence of Bacillus alcalophilus AV1934, a classic alkaliphile isolated from human feces in 1934. Genome announcements, 2(6), e01175-14.

Begg, S. L. (2019). The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. Biochemical Society Transactions, 47(1), 77-87.

Boyer, E. W., Ingle, M. B., & Mercer, G. D. (1973). Bacillus alcalophilus subsp. halodurans subsp. nov.: An alkaline-amylase-producing, alkalophilic organism. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 23(3), 238-242.

Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H. B., Mobley, D. L., Monroe, J. I., Prasad, S., & Zuckerman, D. M. Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1. 0]. Living J Comp Mol Sci. 2018; 1 (1): 5957.

Burlacu, A., Cornea, C. P., & Israel-Roming, F. (2016). Microbial xylanase: a review. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, 20, 335-342.

Burman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Dana Bank. Nucleic Acids Research, 28(1), 235-242.

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

Chen, C. S., White, A., Love, J., Murphy, J. R., & Ringe, D. (2000). Methyl groups of thymine bases are important for nucleic acid recognition by DtxR. Biochemistry, 39(34), 10397-10407.

DeWitt, M. A., Kliegman, J. I., Helmann, J. D., Brennan, R. G., Farrens, D. L., & Glasfeld, A. (2007). The conformations of the manganese transport regulator of Bacillus subtilis in its metal-free state. Journal of molecular biology, 365(5), 1257-1265.

Fritze, D., Flossdorf, J., & Claus, D. (1990). Taxonomy of alkaliphilic Bacillus strains. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 40(1), 92-97.

Guvench, O., & MacKerell, A. D. (2008). Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. Molecular modeling of proteins, 63-88.

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.

Howe, K.L., Contreras-Moreira, B., De Silva, N., Maslen, G., Akanni, W., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., … & Flicek, P. (2020). Ensembl Genomes 2020—enabling non-vertebrate genomic research. Nucleic acids research, 48(D1), 689–695.

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual Molecular Dynamics. Journal of molecular graphics, 14(1), 33-38.

Ikura, Y., & Horikoshi, K. (1979). Isolation and some properties of β-galactosidase producing bacteria. Agricultural and Biological Chemistry, 43(1), 85-88

Imlay, J. A. (2015). Trace Metals and Infectious Diseases: Common mechanisms of bacterial metal homeostasis. Cambridge (MA): MIT Press

Ito, M., Morino, M., & Krulwich, T. A. (2017). Mrp antiporters have important roles in diverse bacteria and archaea. Frontiers in microbiology, 8, 2325.

Jelić Matošević, Z., Radman, K., Loubser, J., Crnolatac, I., Piantanida, I., Cukrowski, I., ... & Bertoša, B. (2023). Structural Dynamics of the Bacillus subtilis MntR Transcription Factor Is Locked by Mn2+ Binding. International Journal of Molecular Sciences, 24(2), 957.

Joshi, A., Thite, S., Karodi, P., Joseph, N., & Lodha, T. (2021). Alkalihalobacterium elongatum gen. nov. sp. nov.: An antibiotic-producing bacterium isolated from lonar lake and reclassification of the genus Alkalihalobacillus into seven novel genera. Frontiers in microbiology, 12.

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.

Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., ... & Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. Protein Science, 27(1), 112-128.

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic acids reseach, 28, 27-30.

Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. Nature structural biology, 9(9), 646-652.

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.

Krulwich, T. A. (1995). Alkaliphiles:‘basic’molecular problems of pH tolerance and bioenergetics. Molecular microbiology, 15(3), 403-410.

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.

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.

Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. Journal of chemical theory and computation, 11(8), 3696-3713.

Nielsen, P., Fritze, D., & Priest, F. G. (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic Bacillus strains: proposal for nine new species. Microbiology, 141(7), 1745-1761.

Onufriev, A. V., & Case, D. A. (2019). Generalized Born Implicit Solvent Models for Biomolecules. Annual review of biophysics, 48, 275–296. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115325

Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus Bacillus: Proposal for six new genera of Bacillus species, Peribacillus gen. nov., Cytobacillus gen. nov., Mesobacillus gen. nov., Neobacillus gen. nov., Metabacillus gen. nov. and Alkalihalobacillus gen. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(1), 406-438.

Payne, M. C., Teter, M. P., Allan, D. C., Arias, T. A., & Joannopoulos, A. J. (1992). Iterative minimization techniques for ab initio total-energy calculations: molecular dynamics and conjugate gradients. Reviews of modern physics, 64(4), 1045.

Price, E. E., & Boyd, J. M. (2020). Genetic regulation of metal ion homeostasis in Staphylococcus aureus. Trends in microbiology, 28(10), 821-831.

Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European molecular biology open software suite. Trends in genetics, 16(6), 276-277.

Rydzewski, J., Jakubowski, R., & Nowak, W. (2015). Communication: Entropic measure to prevent energy over-minimization in molecular dynamics simulations. The Journal of Chemical Physics, 143(17), 171103.

Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., & Krulwich, T. A. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. Advances in microbial physiology, 55, 1-317.

Swails, J. M., York, D. M., & Roitberg, A. E. (2014). Constant pH replica exchange molecular dynamics in explicit solvent using discrete protonation states: implementation, testing, and validation. Journal of chemical theory and computation, 10(3), 1341-1352.

Takami, H., & Horikoshi, K. (1999). Reidentification of facultatively alkaliphilic Bacillus sp. C-125 to Bacillus halodurans. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 63(5), 943-945.

Takami, H., & Horikoshi, K. (2000). Analysis of the genome of an alkaliphilic Bacillus strain from an industrial point of view. Extremophiles, 4(2), 99-108.

The UniProt Consortium. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucleic acids research, 49(D1), 480–489,

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.

Virgile, C., Hauk, P., Wu, H. C., Shang, W., Tsao, C. Y., Payne, G. F., & Bentley, W. E. (2018). Engineering bacterial motility towards hydrogen-peroxide. PLoS One, 13(5), e0196999.

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., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic acids research, 46(W1), W296–W303. https://doi.org/10.1093/nar/gky427

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), 269-278.9

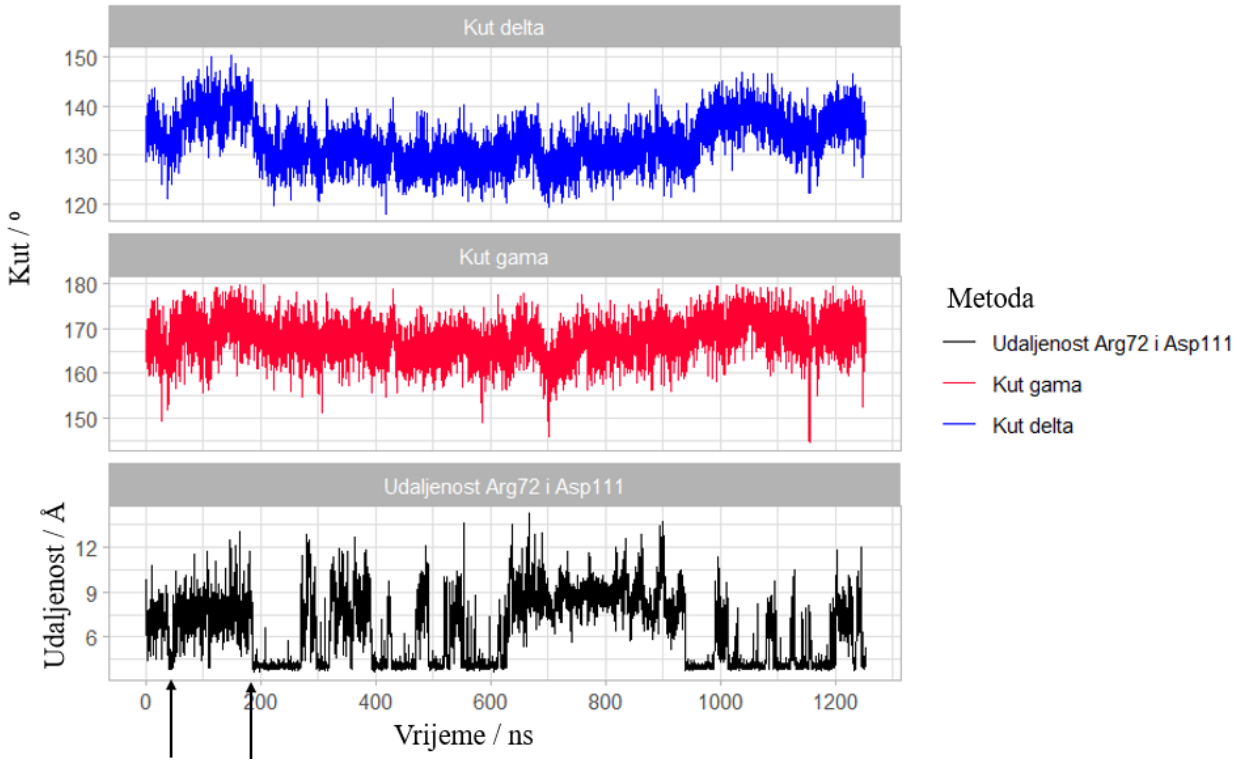
Zhang, J., Zhang, H., Wu, T., Wang, Q., & van der Spoel, D. (2017). Comparison of implicit and explicit solvent models for the calculation of solvation free energy in organic solvents. Journal of chemical theory and computation, 13(3), 1034-1043.

8. Životopis

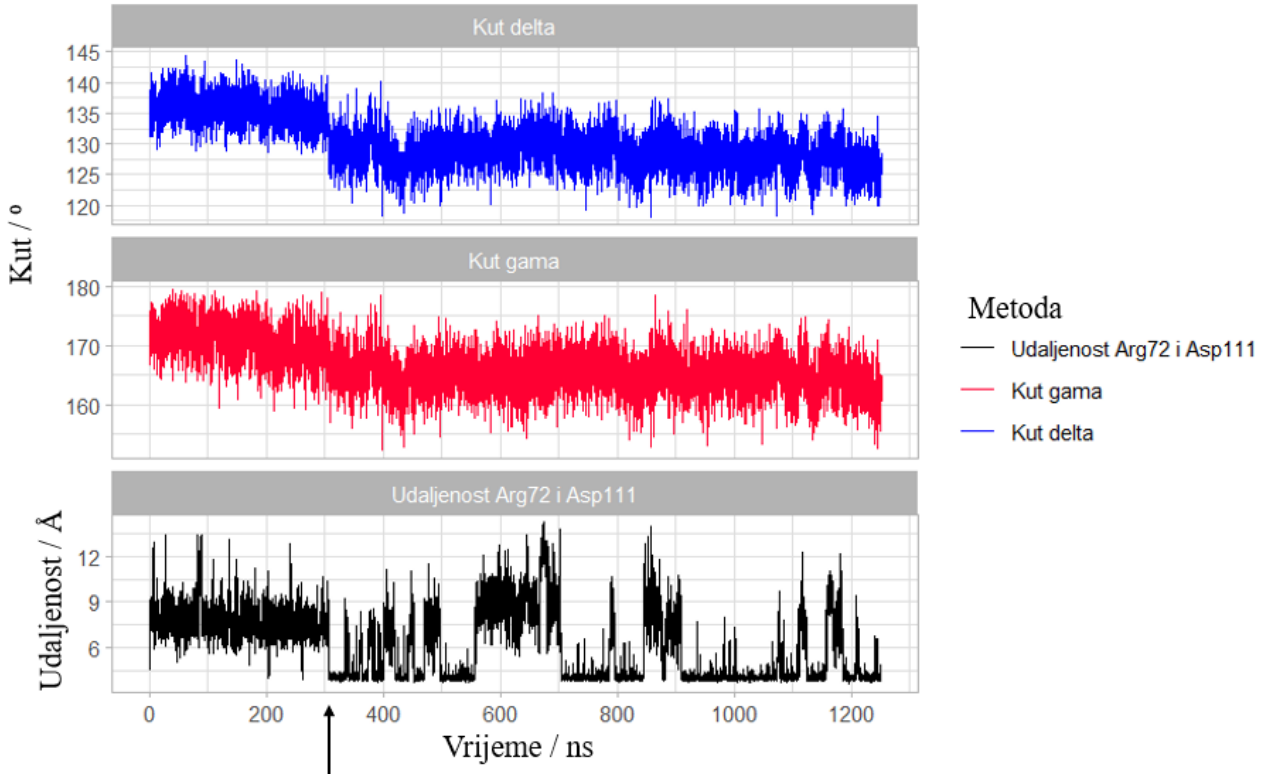
Rođena sam 27.06.1998. godine u Zagrebu. Pohađala sam privatnu osnovnu školu Kreativan razvoj do 2012. godine kada upisujem XV. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom pohađanja matematičkog smjera u gimnaziji razvila sam interes za STEM područja, posebno biologiju. U četvrtom srednje sudjelujem na državnom natjecanju iz biologije na kojem sam ostvarila treće mjesto. Nakon uspješne mature upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2016. godine. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Anđelke Plenković-Moraj završila sam preddiplomski studij radom „Tehnološka primjena algi“ 2019. godine. Završetkom preddiplomskog studija nastavila sam svoje obrazovanje diplomskim studijem molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu s naglaskom na računalnu biologiju. Tijekom studija sudjelovala sam na Erasmus+ stručnoj praksi na Sveučilištu Johanna Wolfganga Goethea u Frankfurtu pod vodstvom prof. dr. sc. Erica Helfricha gdje sam istraživala ciklički peptid Marthiapeptid A. Diplomski studij završavam radom „Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans*“ pod vodstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše.

Od malih nogu bavim se sportom, plivanjem, tenisom, košarkom i odbojkom, a tijekom studija interes mi se pomiče prema plesu i zračnim akrobacijama. U slobodno vrijeme sudjelujem na kvizovima, čitam knjige, gledam filmove i serije, slažem puzzle, slikam i provodim vrijeme s obitelji i prijateljima.

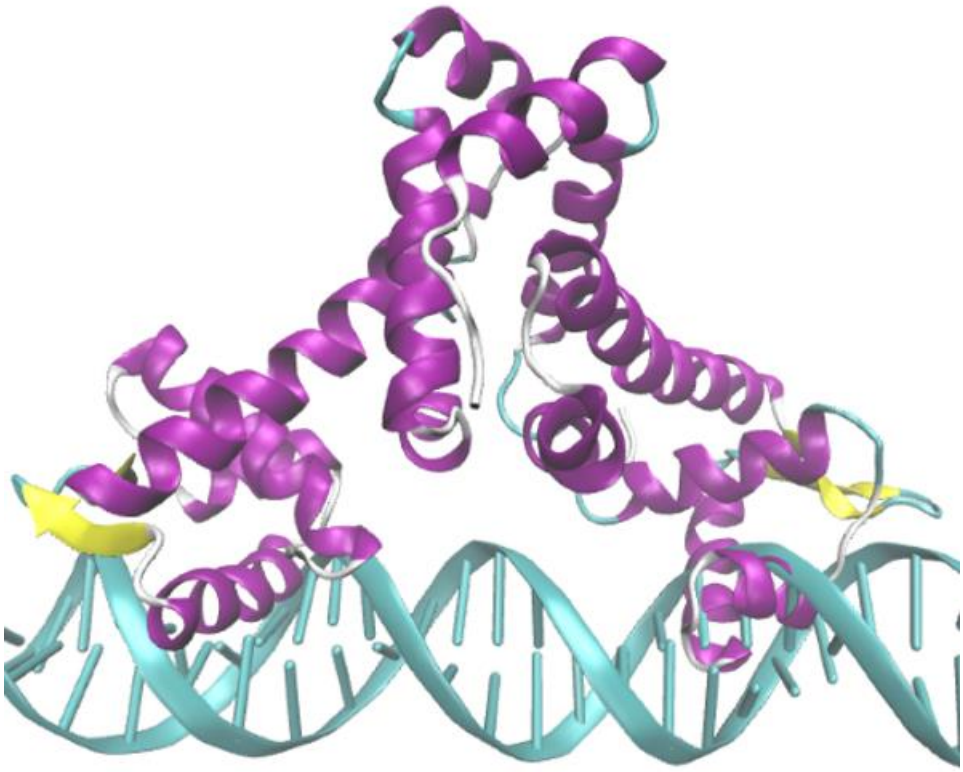
9. Prilozi



Slika P1. Promjena kuta γ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, Tyr75 i Met85, kuta δ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, His77 i Met85 te udaljenosti atoma Arg72:CZ i Asp111:CG tijekom simulacije molekulske dinamike lanca A apo strukture. Plavom bojom označen je kut δ, crvenom bojom kut γ, a crnom bojom udaljenost atoma Arg72:CZ i Asp111:CG. Strelicama su označene nagle promjene primijećene u jednom od kutova i udaljenosti.



Slika P2. Promjena kuta γ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, Tyr75 i Met85, kuta δ kojeg zatvaraju aminokiseline Leu68, His77 i Met85 te udaljenosti atoma Arg72:CZ i Asp111:CG tijekom simulacije molekulske dinamike lanca A druge replike holo strukture. Plavom bojom označen je kut δ, crvenom bojom kut γ, a crnom bojom udaljenost atoma Arg72:CZ i Asp111:CG. Strelicom je označena nagla promjena primijećena u jednom od kutova i udaljenosti.



Slika P3. Spojen prikaz druge replike holo strukture proteina MntR iz bakterije *Halalkalibacterium halodurans* dobivene nakon 1,25 μs simulacije molekulske dinamike i molekule DNA u kojem se jasno prikazuje nemogućnost vezanja proteina MntR u dva susjedna velika utora molekule DNA. Strukture su spojene u programu VMD.