

# Računalno istraživanje kompleksa DNA i MntR proteina iz bakterije *Bacillus subtilis*

---

**Batković, Michaela**

**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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:725506>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Michaela Batković

**Računalno istraživanje kompleksa DNA i  
proteina MntR iz bakterije *Bacillus subtilis***

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2023.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše i neposrednim voditeljstvom Zoe Jelić Matošević, mag. biol. mol. Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske naklade za znanost pod nazivom Manganovi metalosenzori (IP-2020-02-3446).





# Zahvale

G ♥



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Homeostaza iona metala u bakterijama.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Mehanizmi za održavanje homeostaze .....</i>	<i>2</i>
2.1.2. <i>Metaloregulatorni sustavi.....</i>	<i>3</i>
<b>2.2. Bakterija <i>Bacillus subtilis</i> .....</b>	<b>4</b>
2.2.1. <i>Homeostaza iona mangana.....</i>	<i>4</i>
2.2.2. <i>Klasifikacija proteina MntR.....</i>	<i>5</i>
<b>2.3. Struktura proteina MntR iz <i>Bacillus subtilis</i> .....</b>	<b>7</b>
2.3.1. <i>Strukturne domene .....</i>	<i>7</i>
2.3.2. <i>Vezna mjesta A i C .....</i>	<i>8</i>
<b>2.4. Razlika između apo- i holo- forme proteina MntR .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5. Interakcije protein-DNA .....</b>	<b>10</b>
2.5.1. <i>Struktura DNA.....</i>	<i>10</i>
2.5.2. <i>Preduvjeti za vezanje proteina i DNA u kompleks .....</i>	<i>12</i>
2.5.3. <i>Mehanizmi prepoznavanja .....</i>	<i>13</i>
<b>2.6. Simulacije molekulske dinamike biomakromolekula .....</b>	<b>14</b>
2.6.1. <i>Temeljne postavke simulacija molekulske dinamike .....</i>	<i>14</i>
2.6.2. <i>Molekulske interakcije i polje sila.....</i>	<i>15</i>
2.6.3. <i>Periodički rubni uvjeti i simulacijska kutija .....</i>	<i>17</i>
2.6.4. <i>Ergodska hipoteza.....</i>	<i>18</i>
2.6.5. <i>Ograničenja molekulske dinamike .....</i>	<i>19</i>
<b>§ 3. METODOLOGIJA .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. MD simulacija molekule DNA .....</b>	<b>21</b>
3.1.1. <i>Izgradnja i parametrizacija molekule DNA.....</i>	<i>21</i>
3.1.2. <i>Simulacijski protokol.....</i>	<i>22</i>
3.1.3. <i>Analiza trajektorije .....</i>	<i>22</i>
<b>3.2. MD simulacija kompleksa DNA-MntR.....</b>	<b>23</b>
3.2.1. <i>Izgradnja i parametrizacija kompleksa.....</i>	<i>23</i>
3.2.2. <i>Simulacijski protokol.....</i>	<i>24</i>



3.2.3. <i>Analiza trajektorije</i> .....	24
3.3. Usporedba geometrijskih parametara DNA u dvama pripremljenim sustavima .....	25
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
4.1. Raspodjela elektrostatskog naboja u kompleksu DNA-MntR.....	26
4.2. Fluktuacije konsenzusne DNA .....	27
4.3. Usporedba geometrijskih parametara same DNA sekvence i u kompleksu s proteinom MntR .....	32
4.4. Vodikove veze u kompleksu DNA-MntR.....	37
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>38</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>39</b>
<b>§ 7. DODATAK</b> .....	<b>XV</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>XVII</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Računalno istraživanje kompleksa DNA i MntR proteina iz bakterije *Bacillus subtilis*

Michaela Batković

Transkripcijski faktor MntR (engl. *Manganese Transport Regulator*) homodimerni je protein odgovoran za regulaciju homeostaze manganovih iona u bakteriji *Bacillus subtilis*. Kada je u svojoj holo-formi, to jest kada su unutarstanične koncentracije manganovih iona previsoke, transkripcijski faktor MntR se veže na ciljnu DNA i ponaša kao represor. Postoji nekoliko mehanizama kojima se proteini vežu na DNA, međutim, mehanizam vezanja proteina MntR na svoju ciljnu DNA nije razjašnjen. U ovom diplomskom radu provedeno je računalno istraživanje koje za cilj ima doprinjeti razumijevanju interakcija između transkripcijskog faktora MntR i njegove ciljne DNA sekvence. Rezultati simulacija molekulske dinamike (MD) kompleksa DNA-MntR ukazuju da će doći do odvajanja sastavnica kompleksa ukoliko zavojnica  $\alpha 3$  proteina, odgovorna za prepoznavanje palindromskog slijeda ciljne DNA, nije položena u blizini središta palindromskog slijeda TTT/AAA pri čemu će posljedično doći do značajnih fluktuacija molekule DNA. U suprotnom slučaju, dolazi do stvaranja specifičnih vodikovih veza između proteina i DNA, te su te vodikove veze zastupljene većinu trajanja simulacije, pri čemu dodatno dolazi i do otvaranja velikog utora.

(40 stranica, 18 slika, 25 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: homeostaza, metaloregulacija, molekulska dinamika, protein MntR

Mentor: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Neposredni voditelj: Zoe Jelić Matošević, mag. biol. mol.

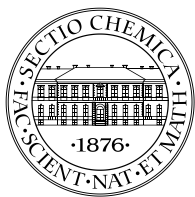
Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
2. izv. prof. dr. sc. Ivan Kodrin
3. doc. dr. sc. Marko Močibob

Zamjena: prof. dr. sc. Davor Kovačević

Datum diplomskog ispita: 27. rujna 2023.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Computational study of DNA in complex with the MntR protein from *Bacillus subtilis*

Michaela Batković

The transcription factor MntR (*Manganese Transport Regulator*) is a homodimeric protein in *Bacillus subtilis* responsible for the regulation of manganese homeostasis. When in its holo-form, that is when the intracellular concentrations of manganese ions are too high, the transcription factor MntR binds on its target DNA and acts as a repressor. There are few binding mechanisms by which proteins bind to DNA. However, the one by which our protein of interest binds to its target DNA is still unknown. In this Diploma Thesis a computational study was carried out with the aim to contribute to the understanding of the interactions between the transcription factor MntR and its target DNA sequence. Molecular dynamics (MD) simulations revealed that the components of the DNA-MntR complex will separate if the recognition helix  $\alpha 3$  of the protein is not placed near the center of the palindrome TTT/AAA which will result in significant fluctuations of the DNA molecule. In the opposite case, during the whole simulation specific hydrogen bonds are formed accompanied with major groove opening.

(40 pages, 18 figures, 25 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: homeostasis, metaloregulation, molecular dynamics, MntR protein

Mentor: Dr. Branimir Bertoša., Full Professor

Assistant mentor: Zoe Jelić Matošević., mag. biol. mol.

Reviewers:

1. Dr. Branimir Bertoša, Full Professor
2. Dr. Ivan Kodrin, Associate Professor
3. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Substitute: Dr. Davor Kovačević, Full Professor

Date of exam: 27<sup>th</sup> September 2023



## § 1. UVOD

Iako su ioni metala, poput manganovih kationa ( $Mn^{2+}$ ), od esencijalne važnosti za bakterijsku stanicu, istovremeno su njihove previsoke stanične koncentracije toksične. Koncentracije iona metala u odgovarajućem fiziološkom rasponu održavaju se pomoću regulacijskih staničnih mehanizama. Kod nepatogene bakterije *Bacillus subtilis*, koja je sastavni dio crijevne flore u ljudi, optimalna koncentracija za život neophodne koncentracije manganovih iona održavana je mehanizmom u kojem središnju ulogu ima protein MntR (engl. *Manganese Transport Regulator*). Transkripcijski faktor MntR homodimerni je protein i ima karakteristične domene očuvane unutar porodice DtxR. Kada su stanične koncentracije manganovih iona veće od optimalnih, u svakom od monomera dolazi do vezanja dvaju iona  $Mn^{2+}$ . U takvoj formi, MntR se ponaša kao transkripcijski represor, veže se na promotorsku regiju ciljnog gena i sprječava transkripciju gena za proteine odgovorne za unos  $Mn^{2+}$  u stanicu. Općenito, vezanja proteina na ciljnu DNA sekvencu odvija se nekim od mehanizama koji uključuju, ili prepoznavanje primarnog slijeda ostvarenjem specifičnih interakcija s bazama nukleotida, ili prepoznavanje strukturnih motiva DNA.<sup>1-3</sup> Kako alosterički mehanizam vezanja transkripcijskog faktora MntR iz bakterije *Bacillus subtilis* na DNA nije razjašnjen<sup>8</sup>, cilj je ovog Diplomskog rada računalno istražiti interakciju između proteina MntR i pripadajuće ciljne DNA. Simulacije molekulske dinamike predstavljaju moćan alat u razumijevanju opaženih fizikalnih (makroskopskih) svojstava na mikroskopskoj razini te je pomoću njih moguće predvidjeti ponašanje sustava u uvjetima koji eksperimentalno nisu dostižni. Stoga će se u svrhu ostvarivanja cilja provesti i analizirati računalne simulacije same ciljne DNA sekvence, kao i njezinog kompleksa s proteinom MntR. Posebna pozornost usmjerit će se na strukturne i dinamičke promjene molekule DNA.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Homeostaza iona metala u bakterijama

#### 2.1.1. Mehanizmi za održavanje homeostaze

Metali se ne mogu dobiti nikakvim sintetskim ili razgradnim procesima te očuvanje njihove homeostaze primarno počiva na regulaciji transporta unutar stanice i iz stanice.<sup>1</sup> Kolika je važnost iona metala u životnom ciklusu bakterija najbolje govori činjenica da će u oba slučaja, bilo da se radi o suvišku ili manjku iona metala, doći do prestanka rasta i naposljetku do smrti stanice. Mehanizmi kojima bakterije održavaju homeostazu iona metala su složeni i ovise o promjenjivim vanjskim staničnim uvjetima. Nedostatak iona metala aktivirat će puteve koji su uključeni u unosu i mobilizaciju iona metala, dok će se efluks (izbacivanje iz stanice) ili skladištenje iona metala aktivirati pri uvjetima njihova suviška.

Kada su dostupne količine iona metala ograničene, uobičajeno dolazi do ekspresije proteina koji sudjeluju u unosu iona metala i tako nadoknađuju njegov nedostatak.<sup>1-3</sup> Alternativni mogući mehanizmi su zamjena enzima ili proteina koji ovise o ionu metala u manjku nekim drugim proteinima koji ne ovise o njegovoj koncentraciji, zatim mobilizacija uskladištenih iona metala te remodeliranje proteoma tako da se zaustavi ekspresija neesencijalnih proteina koji koriste ion metala u manjku omogućujući tako sintezu važnijih proteina za rast.

Ukoliko se bakterija iz medija siromašnog prevede u medij bogat ionima metala od interesa, zbog prisutnosti unosnih sustava u suvišku može doći do trovanja metalom. Šteta prilikom nagle promjene uvjeta smanjuje se citosolnim puferiranjem, odnosno skladištenjem iona metala u proteinima i ekspresijom proteina koji sudjeluju u transportu iona metala iz stanice.

Kada se premaši puferski kapacitet stanice, a gore spomenuti mehanizmi nisu dovoljni za popravljavanje napravljene štete, stanica ulazi u stanje citosolne metalne intoksikacije. Pod tim se podrazumijeva da je došlo do inhibicije ključnih bioloških procesa, kao što je respiracija, ili do vezanja iona metala u suvišku na pogrešni protein što vodi do njegove disfunkcije.<sup>1,2</sup>

### 2.1.2. Metaloregulatorni sustavi

Složeni mehanizmi održavanja homeostaze iona metala odvijaju se uz pomoć metaloregulatornih sustava. Postoje tri tipa metaloregulatora unutar tih sustava: proteini koji direktno vežu ion metala, proteini koji se vežu za kofaktor koji je ovisan o ionu metala te regulacijske regije u mRNA u 5' netranslatiranoj regiji (engl. *riboswitches*) koje vežu, u ovom slučaju, ion metala i tako reguliraju gensku ekspresiju.

Općenito, kao odgovor na vanjske uvjete, bakterijske stanice eksprimiraju neki set proteina. Obično je ta ekspresija kontrolirana transkripcijskim faktorom koji je osjetljiv na koncentraciju odgovarajućeg iona metala čija je homeostaza u središtu zanimanja mehanizma. Takvi proteini osjetljivi na ione metala nazivaju se (direktnim) metaloregulatornim proteinima. U idealnom slučaju, transkripcijski faktori prepoznaju samo jednu ciljnu DNA sekvencu. U praksi, postoji određena fleksibilnost u tom prepoznavanju pa u obzir dolaze i DNA sekvence koje nalikuju na konsenzusnu sekvencu.

Metaloregulatorni proteini su multimerni proteini koji se vežu za DNA uslijed alosteričke promjene kojoj podliježu nakon vezanja iona metala. Pravilna regulacija homeostaze osigurana je vezanjem odgovarajućeg iona metala, istodobno zanemarujući slične ione viših koncentracija koji mu kompetiraju za vezno mjesto. Četiri su kriterija kojima se postiže selektivnost i specifičnost vezanja iona metala. Afinitet vezanja iona metala od interesa određen je svojstvima veznog mjesta, odnosno koordinacijskom geometrijom iona metala. Drugi kriterij koji doprinosi specifičnosti vezanja je dostupnost odgovarajućih iona metala od interesa i kompetirajućih iona metala. Uspješnim vezanjem iona metala dolazi do alosteričke konformacijske promjene kojom metaloregulatorni protein poprima pogodnu konformaciju za vezanje na DNA. Također, na selektivnost utječe unutarstanična koncentracija metaloregulatornog proteina.<sup>1-3</sup>



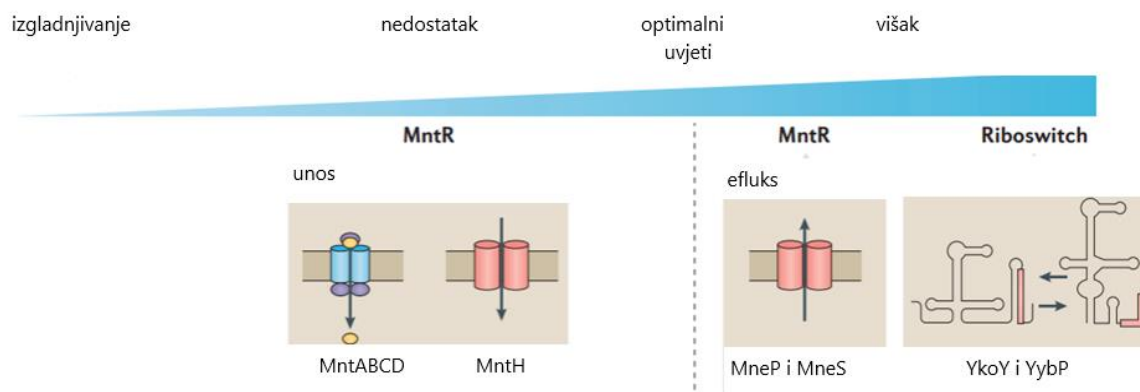
## 2.2. Bakterija *Bacillus subtilis*

Nepatogena bakterija *Bacillus subtilis* je Gram-pozitivna bakterija štapićastog oblika.<sup>4</sup> Kao takva ima citoplazmatsku membranu i deblju staničnu stijenku, bez dodatne vanjske membrane. Njezin genom je sekvenciran i anotiran 1997. godine.<sup>4</sup> Lako se manipulira njenim genomom te služi kao modelni organizam za istraživanje sporulacije. Za kontrolu ekspresije gena koji su uključeni u anaboličkim i kataboličkim procesima koristi povećani raspon regulacijskih mehanizama, a među regulatorima prevladavaju aktivatori i represori transkripcije.

Iako je njezino prirodno stanište tlo, robusne spore koje stvara omogućuju joj da nastani i probavni trakt životinja, odnosno ljudi. Istraživanja suživota *B. subtilis* i crijevne mikroflore otkrila su ulogu ovih bakterija u svojoj vegetativnoj formi kao probiotici i jačanju imunskog sustava.<sup>5</sup>

### 2.2.1. Homeostaza iona mangana

Za rast bakterije *B. subtilis* esencijalno su potrebne optimalne koncentracije iona željeza i iona mangana.<sup>1</sup> Za „nadgledanje“ tih koncentracija odgovorni su metaloregulacijski sustavi koji prate koncentraciju iona metala u stanici i u skladu s tim reguliraju gensku ekspresiju odgovarajućih proteina.<sup>1-3</sup> Većinski udio ukupne koncentracije iona cinka, željeza i mangana u bakterijskoj stanici vezano je na proteine u obliku metalnog kofaktora. Jedan dio od preostale koncentracije metala dostupan je kelirajućim molekulama i u ravnoteži je s ionima metala pri termodinamički definiranoj koncentraciji slobodnih iona metala. Kada koncentracija slobodnih iona metala premaši disocijacijsku konstantu  $K_d$ , stanica odgovara represijom proteina za unos iona metala u stanicu. Ravnotežne koncentracije slobodnih iona metala u stanici se razlikuju u redovima veličina. Ioni željeza i mangana zastupljeni su u relativno visokim koncentracijama, a procjenjuje se da one iznose od  $10^{-6}$  do  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. U uvjetima kada su količine Mn<sup>2+</sup> ograničene, dolazi do ekspresije dvaju unosnih sustava za Mn<sup>2+</sup>. Kada su stanice izložene višku iona mangana, protein MntR (engl. *Manganese Transport Regulator*) aktivira ekspresiju pumpi za efluks Mn<sup>2+</sup>. U jako velikom suvišku, regulacija se odvija vezanjem metala na mRNA. (slika 1.)



Slika 1. Regulacijski sustav za Mn(II) u bakteriji *B. subtilis* pri različitim koncentracijama manganovih iona (preuzeto i preuređeno prema ref.1).

Akumulacija i otpuštanje  $Mn^{2+}$  prvi put su pokazani upravo u bakteriji *B. subtilis*. Godine 1973. izveden je eksperiment u kojem su bakterijske stanice *B. subtilis* iz manganom osiromašenog medija, s prekomjernom ekspresijom unosnih pumpi, prebacivanjem u medij bogat manganovim ionima dovedene u stanje bakterioostaze zbog prevelike akumulacije iona metala. Izbacivanjem viška akumuliranog  $Mn^{2+}$  došlo je do povratka svojstava i rasta. Rezultati sugeriraju da homeostaza iona mangana ovisi o aktivnom sustavu za izbacivanje.<sup>2</sup>

### 2.2.2. Klasifikacija proteina MntR

Protein MntR iz bakterije *Bacillus subtilis* prototip je skupine proteina osjetljivih na koncentracije manganovih iona iz porodice DxtR/IdeR.<sup>6</sup> Do danas svi opisani kompleksi sastavljeni od proteina iz porodice DxtR/IdeR i DNA uključuju dva dimera vezana za ciljnu sekvencu dugu 19 parova baza.<sup>7</sup> Mehanizmi prepoznavanja još nisu u potpunosti razjašnjeni.

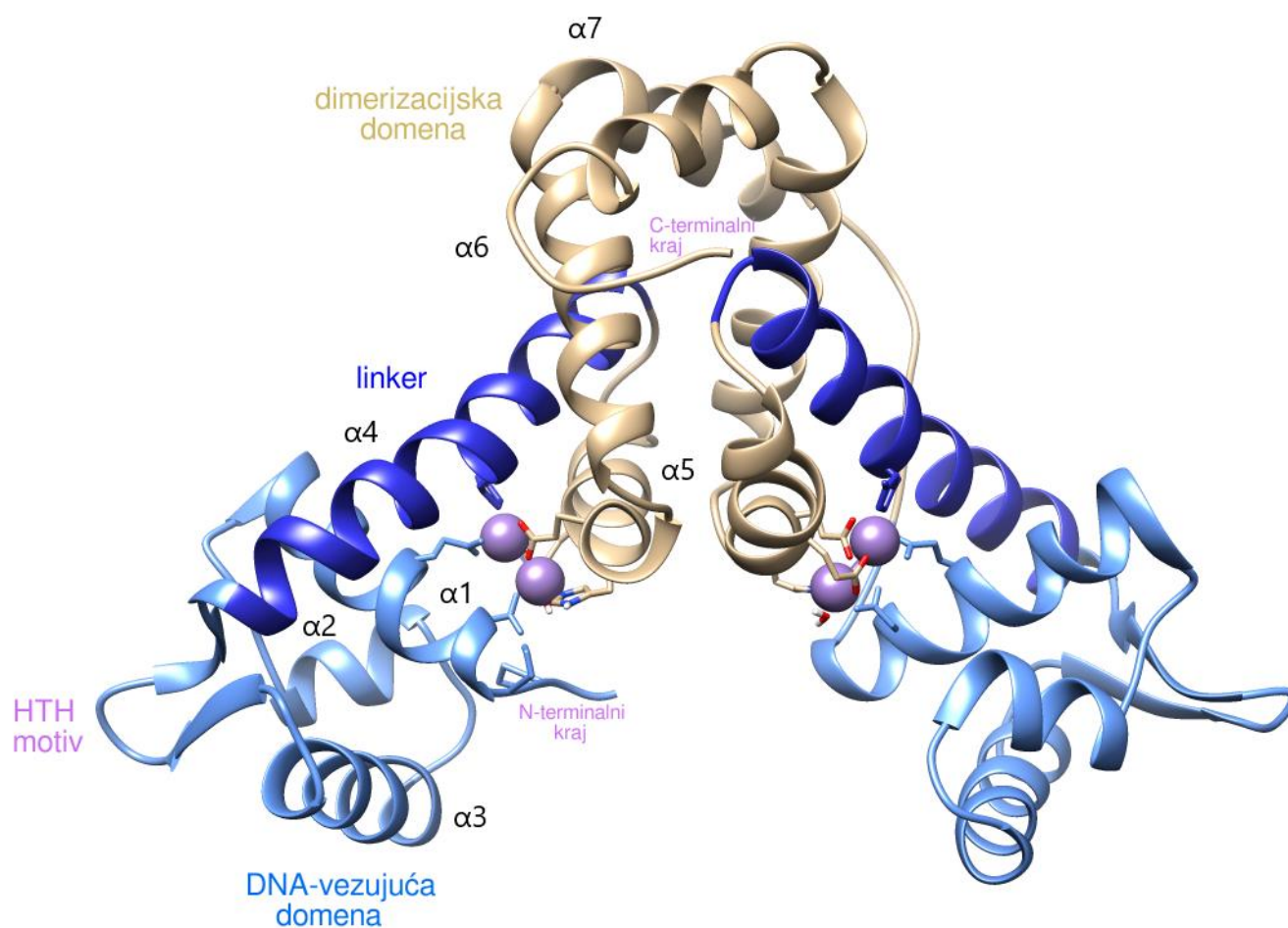
Protein DtxR (engl. *Diphtheria Toxin Repressor*) iz bakterije *Corynebacterium diphtheria* osjetljiv je na koncentraciju iona željeza. Regulira ekspresiju proteina uključenih u održavanje homeostaze iona željeza i ujedno ekspresiju difteričnog toksina. Protein IdeR (engl. *Iron Dependent Repressor*) iz *Mycobacterium tuberculosis* također je središnji regulator homeostaze iona željeza, ali u aktinobakterijama. Transkripcijski faktor MntR od njih se razlikuje i strukturno i funkcionalno te pripadaju različitim skupinama unutar iste porodice.

Kod represora iz porodice DtxR osjetljivih na koncentracije iona željeza razlikuju se tri strukturne domene i postoji velika strukturna sličnost s domenama proteina DtxR iz *C. diphtheria*. Prepoznaju slične strukturne motive DNA zavojnice i vežu se za slične operatore u promotorskim regijama. Represori MntR strukturno su različiti između sebe i nemaju očuvanu SH3 domenu kao što je to slučaj kod DtxR homologa. Operatori za koje se vežu, kao ni regije proteina koje prepoznaju DNA, nisu slični. Za razlike u selektivnostima proteina DtxR/IdeR i MntR prema metalnim ionima odgovornom se smatra njihova struktura. Naime, ekspresijom proteina DtxR iz *C. diphtheria* u bakteriji *Bacillus subtilis* eksperimentalno je pokazano da je, osim na ione željeza, osjetljiv i na ione mangana. Usporedba proteinskih sekvenci MntR i DxtR ukazuje na razliku u barem dvije aminokiseline koje sudjeluju u koordinaciji iona metala, stoga se pretpostavlja da upravo one određuju selektivnosti prema ionu metala.<sup>3</sup>

### 2.3. Struktura proteina MntR iz *Bacillus subtilis*

#### 2.3.1. Strukturne domene

Transkripcijski faktor MntR je homodimerni protein čiji svaki monomer ima 142 aminokiseline (slika 2). Svaka od podjedinica ima dvije domene: DNA-vezujuću na N-terminalnom kraju (aminokiseline 1.-71.) i središnju dimerizacijsku na C-terminalnom kraju (aminokiseline 72.-142.). C-terminalni kraj jednog monomera u interakciji je s C-terminalnim krajem drugog monomera. DNA-vezujuća i dimerizacijska domena povezane su dugačkom linker-zavojnicom (aminokiseline 64.-86.).<sup>8,9</sup>



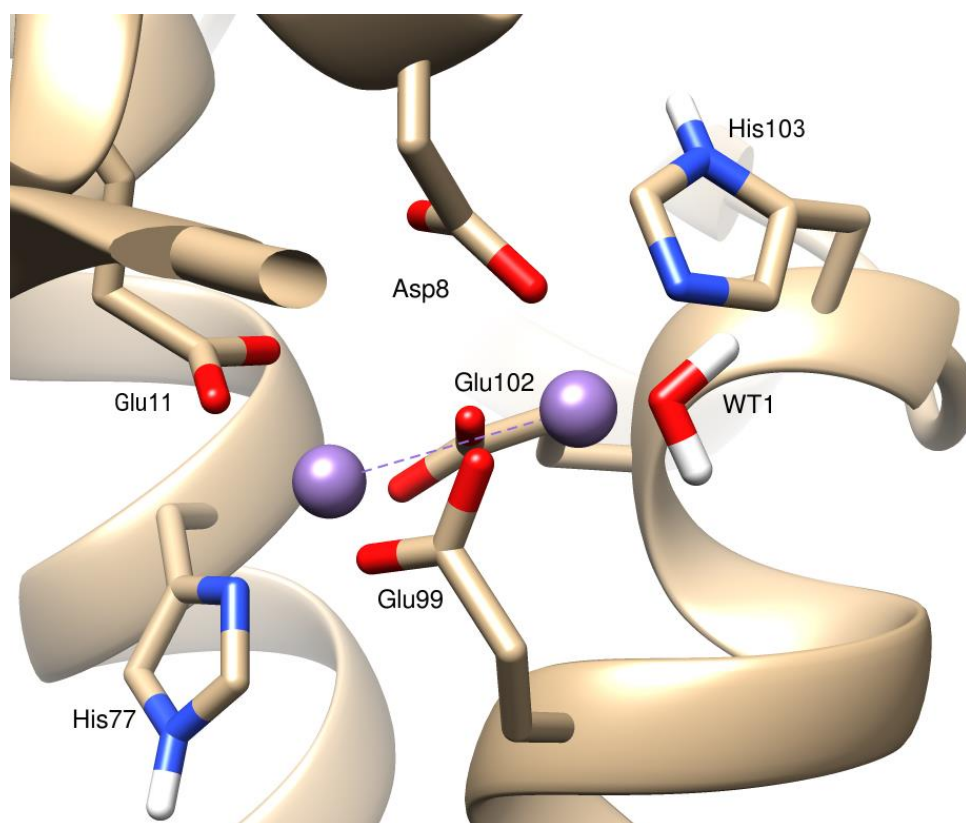
Slika 2. Struktura proteina MntR iz *Bacillus subtilis* u holo-formi; manganovi ioni prikazani su kao ljubičaste kuglice. (izrađeno na temelju reprezentativne strukture dobivene MD simulacijama u ref.8.)

DNA-vezujuću domenu čine tri  $\alpha$ -zavojnice i tri  $\beta$ -ploče. Unutar nje ističe se HTH-motiv (engl. *helix-turn-helix*) koji je dio  $\beta$ -ploče. Njegova uloga je sudjelovanje u interakciji s DNA. Dimerizacijska domena se sastoji od četiri  $\alpha$ -zavojnice i omogućuje kontakt s drugim monomerom. Dimerizacijske domene držane su na okupu hidrofobnim interakcijama, vodikovim vezama i ionskim parovima. Numerirane  $\alpha$ -zavojnice prikazane su na slici 2. Među njima se izdvaja dio zavojnice  $\alpha_4$  (aminokiseline 66.-71.) koji doprinosi fleksibilnosti veznih domena za DNA. Zavojnica  $\alpha_3$  naziva se još zavojnica za prepoznavanje budući da sudjeluje u interakciji s DNA.<sup>8,9</sup>

### 2.3.2. Vezna mjesta A i C

Na prijelazu DNA-vezujuće i dimerizacijske domene proteina MntR formira se binuklearni kompleks s ionima  $Mn^{2+}$ . Koordinacijska geometrija oko iona metala ovisna je o temperaturi kristalizacije. Pri sobnoj temperaturi, geometrija veznih mjesta je oktaedarska s udaljenosti od 4.4 Å između nuklearnih centara, odnosno iona  $Mn^{2+}$ . Vezna mjesta za manganove ione u toj konformaciji nazivaju se veznim mjestima A i C i imaju različite funkcije. Vezno mjesto A okruženo je aminokiselinskim bočnim ograncima His77, Glu11, Glu99 i Glu102 s tim da ion metala ostvaruje bidentatne interakcije s Glu11 i Glu99. Oktaedarska geometrija oko iona metala u veznom mjestu C ostvaruje se interakcijama s bočnim ograncima Asp8, His103, Glu99 i Glu102 te molekulom vode W1. Manganovi ioni premošteni su s karboksilnim skupinama Glu99 i Glu102 stvarajući  $\mu$ -1,3 most (slika 3.). Ponašajući se kao selektivni filter, vezno mjesto A kontrolira okupiranost veznog mjesta C i posljedično afinitet proteina MntR za vezanje na ciljnu DNA. Samo u slučaju kada su vezana po dva iona  $Mn^{2+}$  po monomeru, protein MntR je u svojoj holo-formi i može se vezati za DNA.

U vezno mjesto A mogu se vezati i drugi ioni metala. Ioni koji imaju usporedive radijuse s radijusom iona  $Mn^{2+}$  teoretski bi mogli biti vezani u vezno mjesto A. Međutim, za potpunu aktivaciju proteina potrebno je uspostaviti odgovarajuću koordinacijsku geometriju kako bi aminokiselinski ostatci oko iona metala bili u odgovarajućem položaju i orijentaciji otvarajući tako put za vezanje iona u vezno mjesto C. Uzimajući to u obzir, afinitet MntR za vezanje na DNA opada u formama s vezanim  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  (Irving–William-ov niz). Uz  $Mn^{2+}$ , protein MntR aktiviran je i vezanjem  $Cd^{2+}$ . Sličan afinitet iona  $Cd^{2+}$  ( $d^{10}$ ) za vezna mjesta  $Mn^{2+}$  ( $d^5$ ) objašnjava se njihovim mogućnostima za uspostavljanjem različitih geometrija.<sup>8,9</sup>



Slika 3. Oktaedarska geometrija binuklearnog centra manganovih iona u monomeru proteina MntR iz bakterije *B. subtilis*, manganovi ioni prikazani su kao ljubičaste kuglice. (struktura preuzeta iz ref. 8)

#### 2.4. Razlika između apo- i holo- forme proteina MntR

Konformacije koje zauzimaju MntR s (holo-) i bez vezanog  $Mn^{2+}$  (apo-) strukturno se pretjerano ne razlikuju, ali je njihova zastupljenost različita. Smatra se da vezanjem  $Mn^{2+}$  ne dolazi do prijelaza iz neaktivne u aktivnu formu, nego do redukcije konformacijskog prostora u korist DNA-vezujućih konformera čije su vezne domene za DNA u povoljnom položaju i orijentaciji za vezanje na ciljnu DNA sekvencu. Redukcija konformacijskog prostora za posljedicu ima smanjenje konformacijske entropije apo-dimera. DNA-vezujuće domene fleksibilni su dio proteina MntR i mogu poprimiti brojne orijentacije u odnosu na dimerizacijsku domenu. Njezine fluktuacije su izraženije u apo-formi. Spomenute domene bliže su jedna drugoj u holo- formi, a pretpostavlja se da se na DNA vežu uklapanjem u njezine velike utore. Svrha vezanja iona  $Mn^{2+}$  je organizacija DNA-vezujućih domena tako da su

zavojnice za prepoznavanje sadržane unutar HTH motiva na manjoj relativnoj udaljenosti jedna od druge.<sup>8,10</sup>

## 2.5. Interakcije protein-DNA

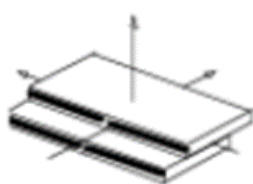
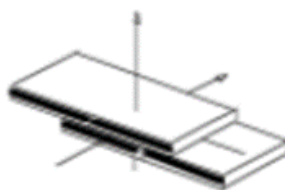
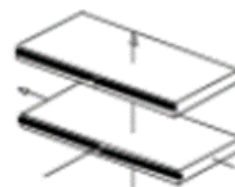
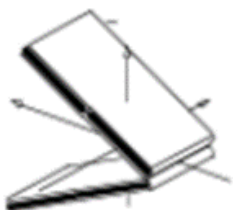
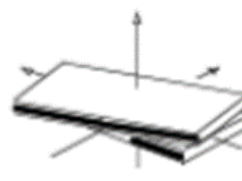
### 2.5.1. Struktura DNA

DNA je polielektrolit s mnoštvom solvacijskih molekula i protuiona koje stabiliziraju i kompenziraju njezin naboj. Proteini pri vezanju u kompleks prepoznaju strukturu ciljne DNA. Sama struktura u direktnoj je vezi s DNA sekvencom. Primarna struktura DNA omogućuje poprimanje određene strukture, a ujedno i određuje fizikalna svojstva. Primjerice, veći udio GC parova doprinosi većoj rigidnosti DNA lanca. Što je veća rigidnost, DNA je manje sklona deformacijama i manji je raspon koformacijskog prostora koji ta DNA zauzima.

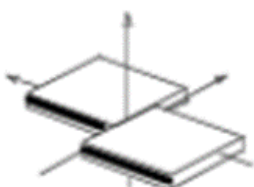
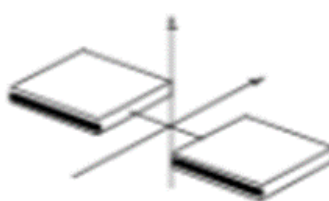
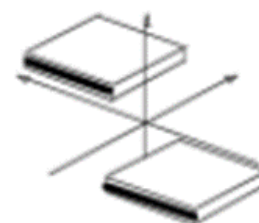
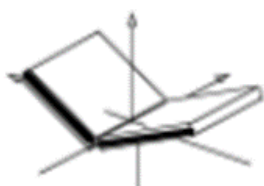
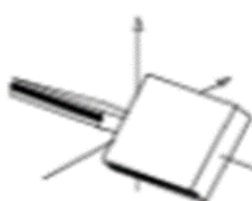
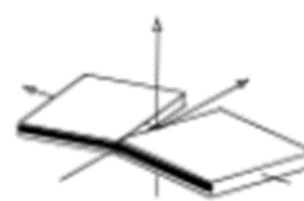
U fiziološkim uvjetima dvolančana DNA uobičajeno poprima B-konformaciju. A-konformaciju (koja se uobičajeno opaža kod RNA) poprima u uvjetima dehidracije i u nekim kompleksima s proteinima. U ekstremnim uvjetima, kao što je visoka ionska jakost medija, DNA bogata GC parovima baza poprima Z-konformaciju.

DNA u B-konformaciji desna je zavojnica s 10-10,5 nukleotida po zavoju. Karakteristični veliki i mali utori, koji se razlikuju kod DNA, u B-konformaciji iste su dubine, a različite širine. Veliki utor dio je DNA zavojnice gdje su okosnice dvaju lanaca udaljenije. Analogno, mali utor dio je zavojnice gdje su okosnice relativno bliske. Svojstva utora uvelike uvjetuje interakciju proteina s DNA. Još jedno od svojstava B-konformacije je da os simetrije prolazi kroz središte prostora koji je definiran dvama DNA lancima i spaja središta parova baza. Relativni položaj i orijentacija parova baza mogu se opisati geometrijskim parametrima prikazanima na slici 4. Ovisno radi li se o relativnom odnosu jednog para baza prema drugome ili nukleotida prema drugom nukleotidu iz istog para baza razlikuju se inter- i intrabazni geometrijski parametri. Također, mogu se definirati parametri obzirom na položaj prema osi zavojnice i oni su prikazani na slici 5. Svaki od parametara opisuje jedan od translacijskih ili rotacijskih stupnjeva slobode za višeatomni sustav.<sup>11</sup>

a)

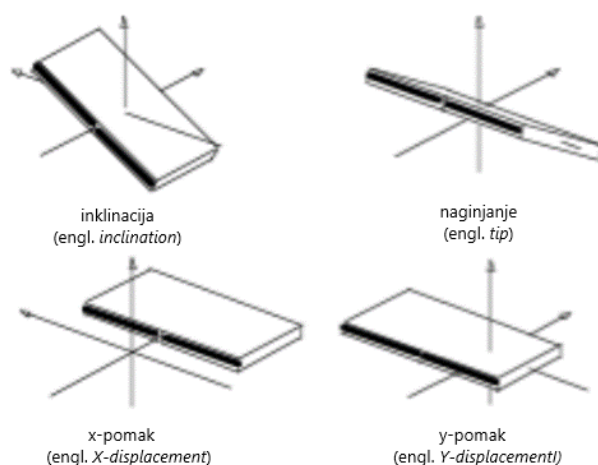
pomak (engl. *shift*)proklizavanje (engl. *slide*)uzdizanje (engl. *rise*)naginjanje (engl. *tilt*)savijanje (engl. *roll*)uvijanje (engl. *twist*)

b)

proklizavanje  
(engl. *shear*)istezanje  
(engl. *stretch*)razmicanje (zig-zag)  
(engl. *stagger*)izvijanje u istom smjeru  
(engl. *buckle*)izvijanje u različitom smjeru  
(engl. *propeller*)otvaranje  
(engl. *opening*)

Slika 4. a) inter- i b) intra- bazni geometrijski parametri DNA; slijeva nadesno prikazane su translacije (gornji red) i rotacije (donji red) oko x-, y- i z-osi. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 12.).





Slika 5. Geometrijski parametri DNA obzirom na položaj prema osi zavojnice, gornji red predstavlja rotacije, a donji red translacije oko x- i y- osi (preuzeto i prilagođeno prema ref.12).

### 2.5.2. Preduvjeti za vezanje proteina i DNA u kompleks

U zatvorenom sustavu konstantnog tlaka i konstantne temperature, kriterij za spontanost procesa je promjena Gibbsove energije  $\Delta G$ . Promjena Gibbsove energije ima entalpijski i entropijski doprinos. Kod promjena koje su entalpijski nepovoljne, mora postojati entropijska kompenzacija da bi se one odvijale, a vrijedi i obrnuto. Uz to, vezanje proteina na DNA mora biti specifično. Vrijednost konstante specifičnog vezanja kompleksa nalazi se u rasponu  $10^{10}$  –  $10^{13}$  L mol<sup>-1</sup>. Afinitet za vezanjem u pravilu je manji od  $10^{12}$  L mol<sup>-1</sup> po veznom mjestu. Naime, u biološkim sustavima reverzibilnost kompleksiranja esencijalna je za održavanje homeostaze.

S entalpijskog stajališta, stvaranju kompleksa pogoduju stvaranje vodikovih veza, van der Waalsovih interakcija i solnih mostova, dok desolvatacija dodirnih površina ima negativan efekt. S druge strane, desolvatacija dodirnih površina ima povoljan entropijski efekt zbog povećanja stupnjeva slobode gibanja molekula otapala uključenih u solvataciju. Ukoliko su aminokiselinski bočni ogranci, baze i funkcionalne skupine položene tako da su u nepovoljnom bliskom kontaktu (engl. *steric clashes*) ili ako dođe do savijanja i distorzije DNA, vezanje proteina i DNA u kompleks također nije entalpijski povoljno. Stvaranjem kompleksa nužno

dolazi do gubitka nekih translacijskih, rotacijskih i vibracijskih stupnjeva slobode što ima negativan efekt na entropijski doprinos.<sup>11</sup>

### 2.5.3. Mehanizmi prepoznavanja

Dva su mehanizma kojim proteini prepoznaju svoje ciljne DNA: čitanje baza (engl. *base readout*) i čitanje strukture (engl. *shape readout*) koje se još može podijeliti na lokalno i globalno čitanje strukture. U praksi, mehanizam prepoznavanja ne mora isključivo biti jedan od spomenutih, nego su moguće i njihove kombinacije. Primjer je čitanje baza s intrinzičnim čitanjem strukture kod restriksijske endonukleaze *EcoRV* iz *E. coli*.

U slučaju čitanja baza odnosno primarnog slijeda, specifičnost vezanja proteina na DNA ostvaruje se direktnim putem kroz interakcije s bazama smještenim u velikom ili malom utoru ili indirektnim ukoliko se interakcija ostvaruje preko posrednih molekula vode koje se mogu smatrati nekovalentnim produžetcima baza. Za razliku od malog utora, kod velikog utora funkcionalne skupine baza sterički su dostupnije proteinu.

Uz primarni slijed, proteini prepoznaju fleksibilnost DNA i strukturne motive izvan veznog mjesta koji također utječu na samu strukturu veznog mjesta. Takav oblik prepoznavanja naziva se čitanje strukture i posebice je važan kod transkripcijskih faktora čija se specifičnost vezanja na različite ciljne DNA temelji na prepoznavanju sličnih strukturnih motiva. Ovisno o tome odstupa li struktura DNA od interesa lokalno ili globalno od B-konformacije razlikuju se lokalno i globalno čitanje strukture. Pod lokalnim odstupanjem podrazumijeva se savijanje, a pod globalnim da DNA od interesa poprima A- ili Z- konformaciju.<sup>11</sup>

Važnost strukture DNA očituje se i u kooperativnosti pri stvaranju kompleksa DNA-protein. Kao što je spomenuto, u kompleksima sastavljenih od konsenzusne DNA i proteina iz porodice DxtR prisutna su po dva dimera proteina. Kod proteina IdeR (engl. *Iron Dependent Repressor*), homologa proteina MntR, vezanjem prvog dimera dolazi do strukturnih promjena DNA zavojnice. IdeR prepoznaje strukturu okosnice ciljne DNA čitanjem strukture uz djelomično ostvarivanje specifičnih interakcija s bazama. Uslijed njegovog vezanja na DNA dolazi do signifikantnog odmaka u širini malog utora. Posljedično, kooperativnim mehanizmom dolazi do vezanja drugog dimera.<sup>13</sup>

## 2.6. Simulacije molekulske dinamike biomakromolekula

### 2.6.1. Temeljne postavke simulacija molekulske dinamike

Simulacija molekulske dinamike (MD) nekog biološkog sustava računalna je simulacija tog sustava na atomskoj razini. Njome se predviđa kako će se svaki od atoma iz danog sustava gibati u vremenu na temelju teorijskog modela kojim su opisane međuatomske i međumolekulske interakcije. Svaki od atoma percipiran je kao zasebna čestica sa svojim nabojem, masom i van der Waalsovom radijusom.

Za dane koordinate početne strukture sustava pomoću Newtonovih jednadžbi gibanja predviđaju se prostorni položaji svakog od atoma kao funkcija vremena. Do rješenja jednadžbe (1) dolazi se numeričkim putem uz poznate početne i rubne uvjete gdje je  $U(r_1, r_2, \dots, r_N)$  potencijalna energija parametarski ovisna o koordinatama atoma koji čine sustav.

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} U(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (1)$$

Iterativnim postupkom koristeći prethodno izračunate sile ažuriraju se položaji i brzine svakog od atoma u sustavu. Rezultat simulacije je trajektorija koja opisuje konfiguraciju sustava na atomskoj razini u svakom trenutku u zadanom vremenskom intervalu. Uvjeti pri kojima se simulacija izvodi su poznati i mogu se kontrolirati. Kako bi se osigurala numerička stabilnost, vremenski koraci u simulaciji moraju biti kratki, obično jedna ili maksimalno dvije femtosekunde ( $10^{-15}$  s). Većina biokemijski zanimljivih procesa odvija se na nano- ( $10^{-9}$ ) ili mikrosekundnoj ( $10^{-6}$ ) vremenskoj skali.

Ova računalna metoda sastoji se od nekoliko koraka. Najprije je potrebno pripremiti i parametrizirati sustav za simulaciju što podrazumijeva odabir odgovarajućeg polja sila, definiranje graničnih vrijednosti za izračun neveznih interakcija, metode za izračun elektrostatskih interakcija, vremenskog koraka simulacije i odabir ansambla. Tako pripremljen sustav se geometrijski optimizira, odnosno minimizira se njegova energija, najčešće u više koraka, postepeno popuštajući ograničenja na gibanja pojedinih skupina atoma. Nadalje, sustav najčešće biva uravnotežen pri *NPT* uvjetima (kanonski ansambl) s ciljem postizanja ravnotežnog stanja. U ovom koraku jedan od bitnijih aspekata je uklanjanje nepovoljnih bliskih kontakata (engl. *steric clashes*). Uravnoteženi sustav pri definiranoj temperaturi i tlaku ulazi u

produkciju fazu u kojoj se sustav propagira kroz definirano vrijeme simulacije. Vrijeme treba biti dovoljno dugo kako bi, s jedne strane, pretpostavka Ergodske hipoteze bila valjana, a s druge strane, kako bi sustav prošao kroz sve moguće konfiguracije faznog prostora. Naposljetku, iz dobivene trajektorije potrebno je izvući informacije o strukturnim i dinamičkim svojstvima od interesa.<sup>14,15</sup>

MD simulacije ne oponašaju eksperiment, nego predstavljaju moćan alat u razumijevanju opaženih fizikalnih (makroskopskih) svojstava na mikroskopskoj razini i u predviđanju očekivanog ponašanja pri uvjetima koji se ne mogu dostignuti eksperimentalno. U okviru biokemijskog zanimanja, simulacije molekulske dinamike daju odgovore na pitanja vezana uz fleksibilnost i mobilnost određenih dijelova biološkog sustava, točnost modeliranog sustava, biomolekularne procese poput vezanja liganda, konformacijske promjene, smatanje proteina ili membranski transport.

### 2.6.2. Molekulske interakcije i polje sila

Kako bi rezultati MD simulacija bili usporedivi s eksperimentom, potrebno je što vjernije opisati međuatomske interakcije. Matematički izraz koji ih opisuje naziva se poljem sila. Poželjno svojstvo tog zapisa je jednostavnost istovremeno opisujući svojstva sustava od interesa na zadovoljavajućoj razini. Sastoji se od više parametarski ovisnih članova koji zajedno definiraju vrijednost potencijalne energije na temelju dane strukture. U literaturi je dostupno mnoštvo zapisa polja sila različitih složenosti, a primjer jednog od jednostavnijih oblika je:

$$\begin{aligned}
 U(\vec{R}) = & \sum_{\text{veze}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{kutevi}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{torzije}} \frac{V_n}{2}(1 + \cos(n\varphi - \delta)) + \sum_{\substack{\text{torzije} \\ \text{izvan} \\ \text{ravnine}}} \frac{k_{imp}}{2}(\omega - \omega_0)^2 + \\
 & + \sum_{\substack{\text{nevezne} \\ \text{interakcije}}} \left( \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right) + \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \quad (2)
 \end{aligned}$$

Prvi član u izrazu (1) odnosi se na doprinos kovalentnih veza potencijalnoj energiji uslijed promjene duljine veze tijekom vibracija relativno prema ravnotežnoj vrijednosti  $b_0$ . Za opis tog

potencijala, u najčešćim slučajevima, korištena je aproksimacija harmoničkog potencijala. Odgovarajuće konstante sile za pojedine veze su  $K_b$ . U složenijim i detaljnijim slučajevima korišten je anharmonički (Morseov) potencijal. Drugi član odnosi se na doprinose uslijed promjene kuteva gdje je kut  $\theta$  definiran trima kovalentno vezanim atomima. Savijanje kuteva i istezanje veza vibracije su visokih frekvencija i nisu od tolikog značaja za proučavanje svojstava od interesa. Torzijski kut  $\varphi$  definiran je četirima kovalentno vezanim atomima, a njegova promjena posljedica je rotacije oko središnje veze. Torzijska gibanja manje su rigidna nego istezanja veza te je ih je potrebno uključiti u opis kako bi se oponašale velike konformacijske promjene uslijed rotacija oko veza te imaju nezanemarljiv doprinos u određivanju lokalne strukture makromolekula i relativnih stabilnosti različitih konformera. Parametri  $V_n$  i  $n$  modeliraju rotacijsku barijeru, odnosno periodičnost, a  $\delta$  predstavlja točku minimuma torzijskog potencijala. Potencijalnoj energiji također doprinose torzijska gibanja izvan ravnine čija je funkcija očuvanje planarnosti u planarnim sustavima koji sadrže posebne skupine atoma, kao što je  $sp^2$  hibridizirani ugljik u aromatskim sustavima. Kut  $\omega$  predstavlja mjeru odmaka od planarnosti. Za sve parove atome koji su udaljeni više od tri kovalentne veze računaju se nekovalentni doprinosi potencijalnoj energiji. Van der Waalove interakcije kratkog su dometa. Računaju se prema izrazu za Lennard-Jonesov potencijal i uključuju i privlačne i odbojne sile među atomima, dok su elektrostatske interakcije dalekog dometa i definirane Coulombovim zakonom, gdje su  $\varepsilon_{ij}$ ,  $R_{\min}$ ,  $r_{ij}$  i  $q_{i/j}$  redom dubina potencijalne jame, položaj minimuma energije, udaljenost između dvaju atoma  $i$  i  $j$  te parcijalni naboji atoma  $i$  te  $j$ . U računima molekulske dinamike domet nekovalentnih interakcija može se kontrolirati graničnom vrijednošću (engl. *cut-off value*).

Raširenost korištenja polja sila za opis potencijalne energije temelji se na pretpostavci da su parametri prenosivi što znači da su parametri isti za isti tip atoma u različitim molekulama. Parametri se određuju na temelju *ab initio* i semi-empirijskih kvantno-mehaničkih računa ili na temelju eksperimentalno dobivenih podataka nekom od metoda kao što su IR i Raman spektroskopija, nuklearna magnetna rezonanca ili elektronska difrakcija. Predstavljen izraz za polje sila u ovom poglavlju pojednostavljeni je izraz za opis međuatomskih interakcija. Dodatne korekcije koje se mogu uvesti podrazumijevaju uvođenje miješanih članova za opis sprezanja intramolekulskih vibracija (istezanje veze, savijanje kuta, torzija) i uključivanje polarizacijskih efekata.<sup>14-16</sup>

### 2.6.3. Periodički rubni uvjeti i simulacijska kutija

Biološki sustav od interesa u procesu pripreme za MD simulacije okružuje se molekulama otapala kako bi bio što vjernija replika stvarnih uvjeta i kako bi se uključili efekti koje otapalo ima na sustav. Problem predstavlja različita okruženja pojedinih skupina molekula otapala. Neke se nalaze u neposrednoj blizini proteina s jedne i ostatka otapala s druge strane, druge su okružene samo svojim replikama, odnosno ostatkom otapala, a dio se nalazi na granici otapala s vakuumom. Kako bi se postigao efekt mase otopine (engl. *bulk solution*) potrebno je uvesti periodičke rubne uvjete (engl. *periodic boundary conditions*).<sup>9</sup> Pripremljeni sustav za simulaciju tvori primitivnu simulacijsku kutiju i okružen je svojim replikama u sve tri dimenzije prostora. Time se izbjegava problem rigidnih granica, ali je uvedena umjetna periodičnost. Eksplicitno se gledaju samo atomi iz primitivne simulacijske ćelije. Kada neki od atoma izađe iz nje, zamijenjen je istim atomom koji u nju ulazi iz jedne od susjednih simulacijskih kutija replika. Time je osiguran konstantan broj atoma u simulacijskoj kutiji tijekom simulacija. Po konvenciji promatraju se samo interakcije između atoma iz primitivne simulacijske kutije i njezinih susjednih replika.

Kao što je ranije spomenuto, računalno najizazovniji doprinos potencijalnoj energiji sustava predstavljaju nevezne interakcije. Granična vrijednost prilikom njihovog računanja uvodi se s ciljem smanjenja računalne opterećenosti, istovremeno težeći minimalnoj pogrešci. Sve molekule izvan granične vrijednosti tretiraju se kao dielektrični kontinuum. Budući da van der Waalove interakcije značajno opadaju s udaljenošću između atoma, obično se kao granična vrijednost postavlja na manje ili jednako polovici duljine najkraćeg brida simulacijske kutije čime se ne uvodi značajna pogreška i osigurava da ne dolazi do interakcija između atoma koji pripadaju kutijama udaljenim više od dvije replike. Nasuprot tome, domet dalekosežnih elektrostatskih interakcija prelazi polovicu duljine najkraćeg brida i zadire u definirani dielektrični kontinuum. Ova gruba aproksimacija, s gledišta elektrostatskih interakcija, riješena je korištenjem Ewaldove sumacije. Metoda se temelji na dodjeljivanju raspodjele naboja suprotnog predznaka svakom od točkastih naboja čime svaki postaje kratkog dometa i može se analizirati u realnom prostoru.<sup>15</sup>

#### 2.6.4. Ergodska hipoteza

Proučavanje veze između dinamike na mikroskopskoj razini i makroskopske termodinamike počiva na temeljima ravnotežne statističke mehanike. Dva opisa istog sustava, jedan vremenski reverzibilan (mikroskopska dinamika), a drugi vremenski ireverzibilan (makroskopska svojstva), doprinijela su razvoju ergodske teorije.

Boltzmann je u svojim radovima iznio hipotezu, poznatu pod imenom ergodska hipoteza, da će sustav, ostavljen sam u dovoljno dugom vremenu, proći kroz sva moguća stanja koja su mu dostupna obzirom na vrijednost ukupne energije. Kasnije je ta tvrdnja korigirana u kvazi-ergodsku hipotezu. Skepticizam oko hipoteze naveo je trojicu znanstvenika (Birkhoff, Koopman i von Neumann) na razvoj teorije koja se ne bi temeljila na ergodskoj hipotezi. Više matematička, nego fizikalna, teorija s ciljem određivanja jednakosti faznih i vremenskih prosjeka koristeći samo dinamička svojstva sustava uz statističke pretpostavke, naziva se ergodska teorija. Ona se ne može dokazati, ali je ispunjena za klasična i kvantna mnoštva čestica. Može se reći da u tom slučaju postoji mehanička definicija makroskopske ravnoteže.

Fizikalni sustav, čije su komponente okarakterizirane svojim količinama gibanja ( $\mathbf{p}$ ) i položajima ( $\mathbf{r}$ ), definira se kao skup fizikalnih stanja. Takav skup naziva se fazni prostor. Fizikalno stanje sustava u nekom trenutku može se zapisati kao funkcija koordinata faznog prostora. Rezultat mjerenja nije egzaktna vrijednost fazne funkcije jer bi za to u nekom trenutku istovremeno morale biti poznate vrijednosti položaja i količine gibanja. Stoga, mjerljivo fizikalno svojstvo ne može biti prosjek prostornih funkcija, nego vremenski prosjek. S druge strane, da bi se odredio vremenski prosjek potrebno je poznavati cijelu trajektoriju što je neizvedivo. Ideja je da se fazni prosjek (prosjek ansambla), koji je računalno manje zahtjevan, poistovjeti s vremenskim prosjekom.

U statističkoj mehanici, raspodjela i gibanje N-komponentnog sustava s makroskopskim svojstvom  $A(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$  povezana je particijskom funkcijom  $Q$ . S eksperimentalnog stajališta, neko mjerljivo svojstvo posljedica je gibanja velikog broja molekula koje zauzimaju veliki broj različitih konformacija. Particijska funkcija, kao i temperaturna ovisnost, sadržane su unutar gustoće vjerojatnosti u izrazu (3).

$$\langle A \rangle_{ansambl} = \iint d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N A(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) \rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) \quad (3)$$

Određivanje particijske funkcije računalno je zahtjevno, no njena se vrijednost može povezati s vremenskim prosjekom ansambla u slučaju da se simulacijom uzorkovalo dovoljan udio faznog prostora.

$$\langle A \rangle_{vrijeme} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(p^N, r^N) dt \approx \frac{1}{M} \sum_{t=1}^M A(p^N, r^N) \quad (4)$$

Ukoliko se računalnom simulacijom generiralo dovoljno struktura koje onda predstavljaju sva moguća mikrostanja u kojima se sustav može naći (fazni prostor), tada se praćenje trajektorije jedne molekule u dovoljno dugom vremenskom intervalu može poistovjetiti s praćenjem sustava s velikim brojem istovrsnih molekula, odnosno vremenske srednje vrijednosti mogu se izjednačiti sa statističkim srednjim vrijednostima. To je ujedno i osnovna pretpostavka ergodske teorije.<sup>15,17,18</sup>

$$\langle A \rangle_{ansambl} = \langle A \rangle_{vrijeme} \quad (5)$$

### 2.6.5. Ograničenja molekulske dinamike

Važno obilježje svakog znanstvenog alata je reproducibilost. S istom težinom treba uzeti u obzir i ograničenja korištenog alata. Jedno od prvih ograničenja molekulske dinamike, a ujedno i primarno ograničenje fizikalne kemije, je točnost opisa molekulskom mehanikom (MM), čak i za manje sustave. Kako je opis pojednostavljen, on predstavlja izvor greške između modeliranog i realnog sustava, čak i u slučaju hipotetski istih uvjeta simulacije i eksperimenta. Svakako treba napomenuti da različiti sustavi, a u nekim slučajevima i različiti dijelovi istog sustava, mogu biti opisani molekulskom mehanikom s drugačijom točnošću, ovisno o raspodjeli energije. Za razliku od *ab initio* molekulske dinamike, molekulska dinamika koja koristi polje sila, pretpostavlja da su atomi vezani elastičnim silama i nema pucanja veza pa samim time nije moguće proučavati kemijske procese. Nadalje, harmonička aproksimacija ne opisuje dovoljno dobro pomake atoma veće od 10% od ravnotežne udaljenosti. Usprkos tome, molekulska dinamika pokazala se u praksi kao dobar alat budući da su pomaci tijekom vibracija lokalizirani oko ravnotežnih vrijednosti.

Molekula u modelu okružena je konačnim brojem molekula otapala i iona pri periodičkim graničnim uvjetima. Solvatacijske kutije su male, kako bi se simulacije ubrzale, a periodičnost



sprječava kontakte između otopljene tvari iz različitih kutija pod pretpostavkom da je veličina kutije dovoljno velika. Ovakvi uvjeti se ne mogu postići u realnom eksperimentu.

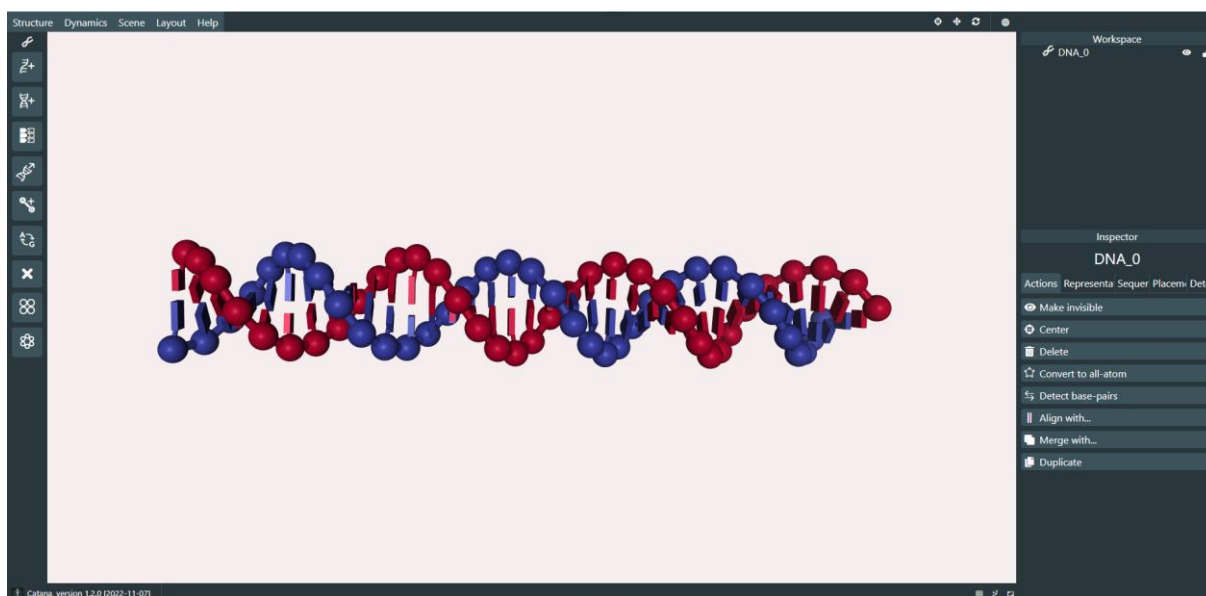
Jednako bitan aspekt simulacije je kvaliteta početne geometrije i ona utječe na njezin ishod. Naime, početnu strukturu upitne kvalitete nije moguće popraviti simulacijom. Vrijeme simulacije nedovoljno je kako bi se prešle barijere za veće konformacijske promjene ili MM opis nije dovoljno robustan kako bi pronašao relevantne strukture. Može se reći da MD simulacije uzorkuju samo lokalne konformacije.<sup>14,15</sup>

## § 3. METODOLOGIJA

### 3.1. MD simulacija molekule DNA

#### 3.1.1. Izgradnja i parametrizacija molekule DNA

Pomoću BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) pretraživača u sklopu genomske baze podataka Ensembl Bacteria pronađena je pozicija nukleotidnog slijeda 5'-TTTCCTTAAGGCAAA-3' unutar genoma bakterije *Bacillus subtilis* omeđenog palindromima koji prepoznaje transkripcijski faktor MntR. Izdvojen je nukleotidni slijed dug 35 nukleotida 5'-CAACAAAGAGTTTCCTTAAGGCAAATTATTTTATC-3' tako da je s obje strane od palindroma prema kraju DNA sekvence deset nukleotida. Na temelju odabrane sekvence izgrađena je dvolančana DNA pomoću mrežno dostupnog računalnog programa za modeliranje bioloških sustava CATANA<sup>19</sup>. (slika 6.)



Slika 6. Radni prozor u programu CATANA<sup>19</sup>

Dobivena početna struktura DNA sekvence pripremljena je za simulaciju molekulske dinamike pomoću alata *tleap* unutar programskog paketa Amber20<sup>20</sup>. Sustav je otopljen u vodi te su dodani odgovarajući protuioni do ispunjenja uvjeta elektroneutralnosti. Korištena su polja sila

*DNA.bsc1* za nukleinske kiseline, odnosno *water.tip3p* za molekule vode. Izlazne datoteke koje se dobiju procedurom u *tleap*-u sadrže topologiju i koordinate parametriziranog sustava, a poslužit će kao ulazne datoteke u simulacijama molekulske dinamike.

### 3.1.2. Simulacijski protokol

Parametrizirani sustav podliježe trima fazama simulacije molekulske dinamike.

U prvoj fazi biva optimizirana geometrija sustava. Kako se radi o relativno velikom sustavu, optimizacija geometrije provedena je u pet ciklusa koji se razlikuju po atomima na koje je primijenjeno ograničenje gibanja te po vrijednosti konstante sile primijenjenog harmoničkog potencijala na spomenute atome. Prvi ciklus uključuje optimizaciju molekula otapala. U drugom ciklusu u sustavu je dopušteno gibanje i atomima vodika, dok je u trećem i četvrtom dopušteno gibanje svih atoma osim atoma okosnice DNA koju čine šećeri i fosfati. U prva tri ciklusa vrijednost konstante sile je  $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ , dok u četvrtom ona iznosi  $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ . U petom ciklusu nema ograničenja na gibanje atoma. Svaki od ciklusa kombinacija je algoritama najstrmijeg spusta (200 koraka) i konjugiranog gradijenta (800 koraka).

Druga faza uključuje simulacije uravnoteženja i izvedena je u tri ciklusa. U prvom ciklusu trajanja 300 ps sustav se postupno zagrijava od 0 K do 310 K istovremeno dopuštajući gibanje jedino molekula otapala. Na ostatak sustava primijenjen je harmonički potencijal s konstantom sile  $32 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ . U drugom i trećem ciklusu dopušteno je gibanje svih atoma pri konstantnom tlaku od 1 bar i konstantnoj temperaturi od 310 K trajanja 200 i 500 ps.

Treća, produkcijska faza simulacijskog protokola izvedena je pri konstantnom tlaku od 1 bar i konstantnoj temperaturi od 310 K u trajanju od 100 ns.

### 3.1.3. Analiza trajektorije

Za analizu trajektorije korišten je program *cpptraj*<sup>21</sup> (verzija V5.1.0.) unutar paketa Amber20. Korijen srednje vrijednosti udaljenosti atoma okosnice (RMSD, engl. *Root-Mean-Square Deviation*) u vremenu izračunan je korištenjem funkcije *rms*, dok je funkcijom *rmsf* analizirana fleksibilnost određenih dijelova sekvence (engl. *Root-Mean-Square Fluctuation*).

Reprezentativna struktura koja će poslužiti za izgradnju kompleksa s transkripcijskim faktorom MntR odabrana je nakon klaster analize (engl. *Cluster Analysis*) provedene u

računalnom programu za simulacije molekulske dinamike GROMACS<sup>22</sup> (verzija 2021.4). Ista je provedena korištenjem funkcije *cluster* uz definiranu metodu *gromos*. Odgovarajuća granična vrijednost odstupanja od centralne strukture (engl. *cutoff*) odabrana je metodom usporedbe (0.275 Å). Grafički prikazi rezultata analiza napravljeni su i programu Python.

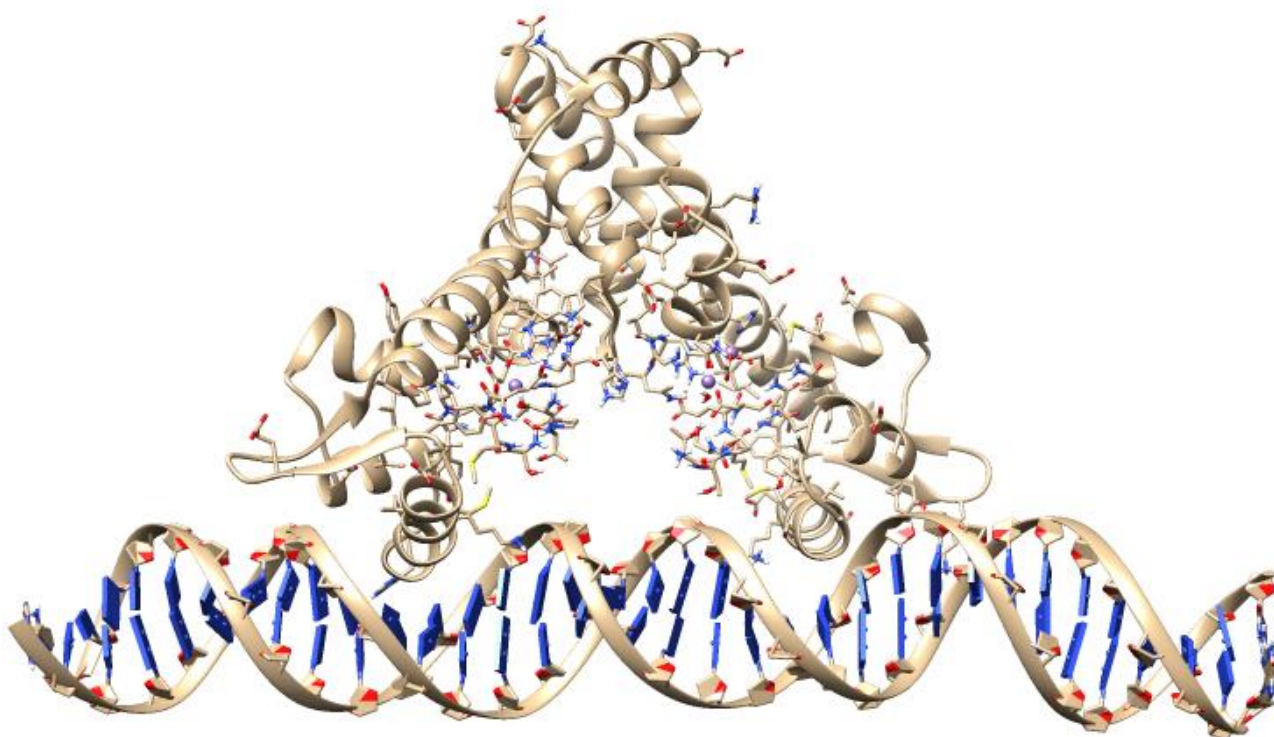
## 3.2. MD simulacija kompleksa DNA-MntR

### 3.2.1. Izgradnja i parametrizacija kompleksa

Kompleks je izgrađen poravnavanjem proteina i DNA sekvence od interesa s koordinatama kristalne strukture kompleksa mutanta DtxR s konsenzusnom veznom sekvencom iz proteinske baze podataka PDB pod identifikacijskim kodom 1F5T. Prije postupka, preuzeta datoteka s koordinatama kristalne strukture izmijenjena je tako da je konsenzusna DNA sekvenca skraćena na duljinu od 35 parova baza, odnosno na duljinu DNA sekvence od interesa. Pri tome je obraćena pažnja da je palindromski slijed skraćene DNA također omeđen s po deset nukleotida prema krajevima sekvence. Koordinate proteinskog dijela su zadržane. U programu VMD<sup>23</sup> (verzija 1.9.3.) pomoću funkcije za poravnavanje (engl. *Align*) u okviru alata za analizu trajektorije (engl. *RMSD Trajectory Tool*) poravnata je ranije dobivena reprezentativna struktura DNA sekvence na skraćenu eksperimentalnu DNA sekvencu. Koordinate dobivene spajanjem translirane reprezentativne strukture DNA i nepomaknutog proteina spremljene su u novu datoteku kao novi hibridni kompleks.

Reprezentativna struktura MntR, dobivena prethodno provedenim MD simulacijama kolega u okviru istog projekta, poravnata je na protein unutar dobivenog hibridnog kompleksa. Za potonje je korišten algoritam MM-Align<sup>24</sup> za poravnavanje proteinskih kompleksa s više lanaca.

Dobiveni kompleks parametriziran je pomoću već spomenutog alata *tleap* uz dodatno definirana polja sila *gaff* za male molekule i *protein.ff14SB* za proteine. Za parametrizaciju iona mangana (II), koordinacijskih voda i nestandardnih aminokiselina korišteni su već pripremljeni parametri u svrhu prijašnjih simulacija u sklopu projekta u kojem je diplomski rad izrađen. Također, kako su po dva manganova (II) iona i jedna kristalna voda koordinirani u svakoj od dviju podjedinica transkripcijskog faktora, njihova interakcija s proteinom opisana je korištenjem komande *bond* unutar *tleap*-a. Uvjet elektroneutralnosti postignut je dodavanjem iona magnezija.



Slika 7. Početna struktura kompleksa DNA i proteina MntR iz bakterije *B. subtilis*. Ioni mangana prikazani su kao ljubičaste kuglice, aminokiseline koje koordiniraju manganove ione, kao i aminokiseline koje bi potencijalno mogle ostvarivati interakcije s DNA (Lys, Ser) prikazane su modelom štapića.

### 3.2.2. Simulacijski protokol

Simulacijski protokol identičan je onom već opisanom u okviru MD simulacije molekule DNA s tim da se ograničenja gibanja u pojedinim ciklusima odnose na kompleks, a ne samo na DNA. Trajanja prvih dviju faza su jednaka kao i u prethodnoj simulaciji, dok je produkcijska faza izvedena u trajanju od 200 ns.

### 3.2.3. Analiza trajektorije

Za analizu trajektorije korišten je već spomenuti program *cpptraj* unutar paketa Amber20 i njegove uobičajene funkcije *rms* i *rmsf*. Za računanje elektrostatskom potencijala korišten je javno dostupan program za računanje elektrostatskog potencijala makromolekula, APBS<sup>25</sup>

(engl. *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*). Također, istražena je prisutnost interakcija u kompleksu te su one važnije vizualno prikazane u ovom radu.

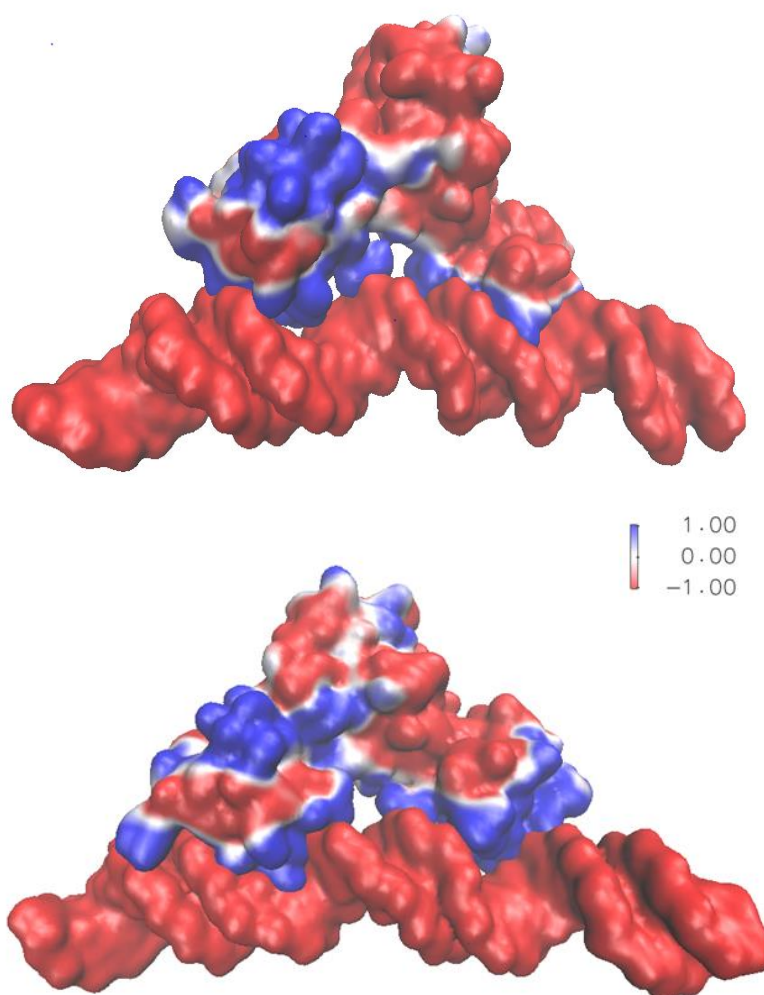
### **3.3. Usporedba geometrijskih parametara DNA u dvama pripremljenim sustavima**

Funkcijom *nastruct* u sklopu potprograma *cpptraj* analizirani su geometrijski parametri molekule DNA. Izlazne datoteke sadrže doprinose pojedinog para baza ili njegovog koraka parametru od interesa u svakoj generiranoj strukturi. Vrijednost pojedinog parametra zavojnice obzirom na središnju os vrijednosti, kao i vrijednosti interbaznih parametara, za svaku od generiranih struktura računana je kao suma doprinosa svakog od koraka para baza. Kod intrabaznih parametara vrijednosti za svaku generiranu strukturu računani su kao srednja vrijednost doprinosa svakog od para baza. Grafički su prikazane raspodjele svakog parametra, a odgovarajući grafovi pogreške za svaki od parova baza ili njegovog koraka u kontekstu pojedinih parametara nalaze se u Dodatku.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Raspodjela elektrostatskog naboja u kompleksu DNA-MntR

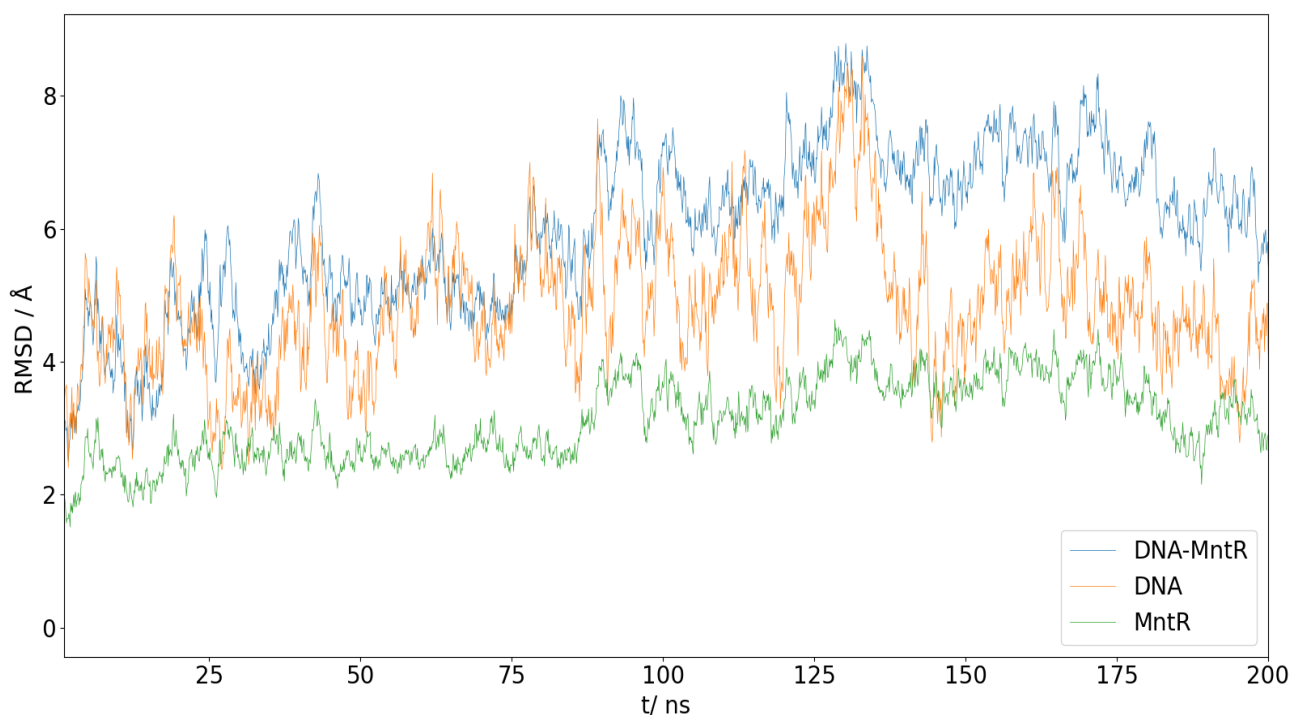
Naboj negativno nabijenog polielektrolita DNA posljedica je prisutnosti ioniziranih fosfatnih skupina na okosnici DNA lanaca koji sudjeluju u stvaranju fosfodiesterskih veza. Interakcija proteina i DNA dijelom se ostvaruje preko elektrostatskih interakcija. DNA-vezujuće domene, preciznije, njezine  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  zavojnice bogate su pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima i omogućuju uspostavljanje bliskog kontakta s DNA zavojnicom (slika 8).



Slika 8. Raspodjela elektrostatskog potencijala na površini kompleksa DNA i *B. subtilis* MntR s prednje (gore) i stražnje (dolje) strane.

## 4.2. Fluktuacije konsenzusne DNA

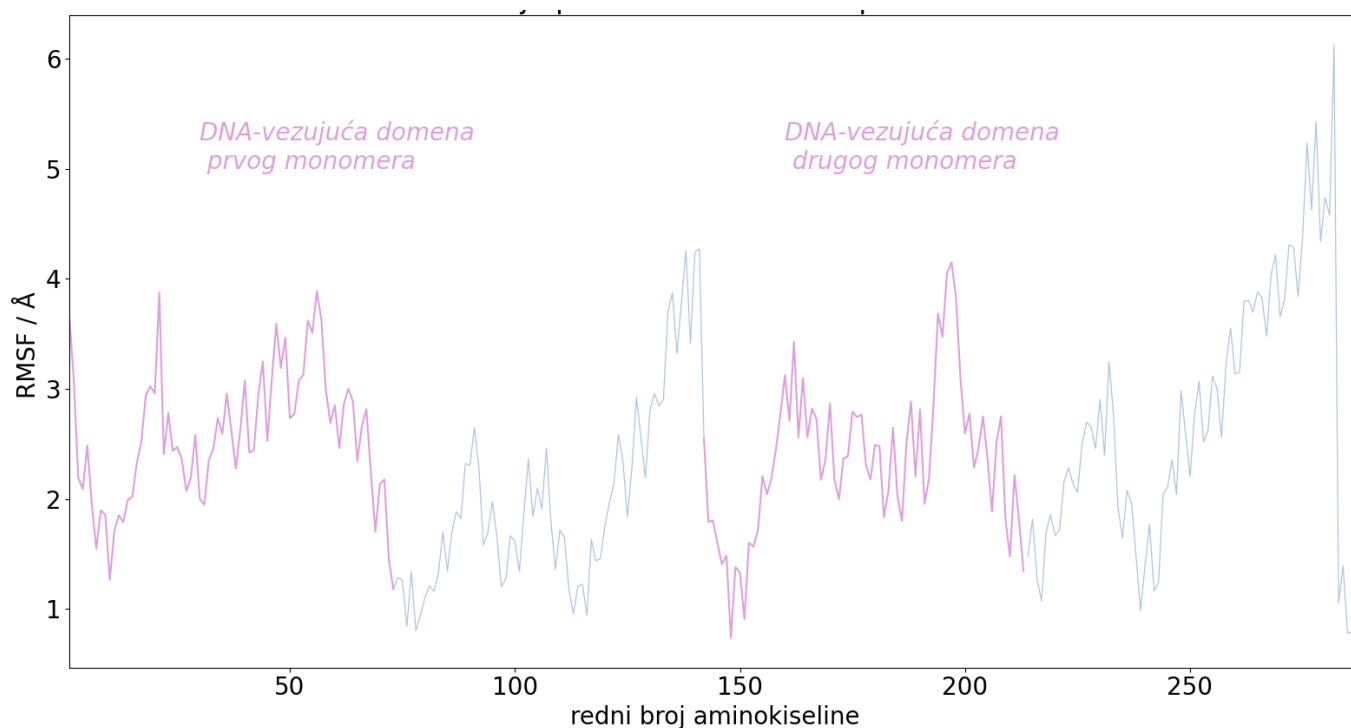
Razlikama između generiranih geometrija u MD simulaciji kompleksa DNA-MntR, u trajanju od 200 ns, u većoj mjeri doprinosi gibanje okosnice molekule DNA, dok gibanja proteinske okosnice, relativno prema njima, nisu toliko izražena (slika 9).



Slika 9. Promjena korijena srednjeg kvadrata udaljenosti atoma okosnice (RMSD) simuliranog kompleksa MntR-DNA.

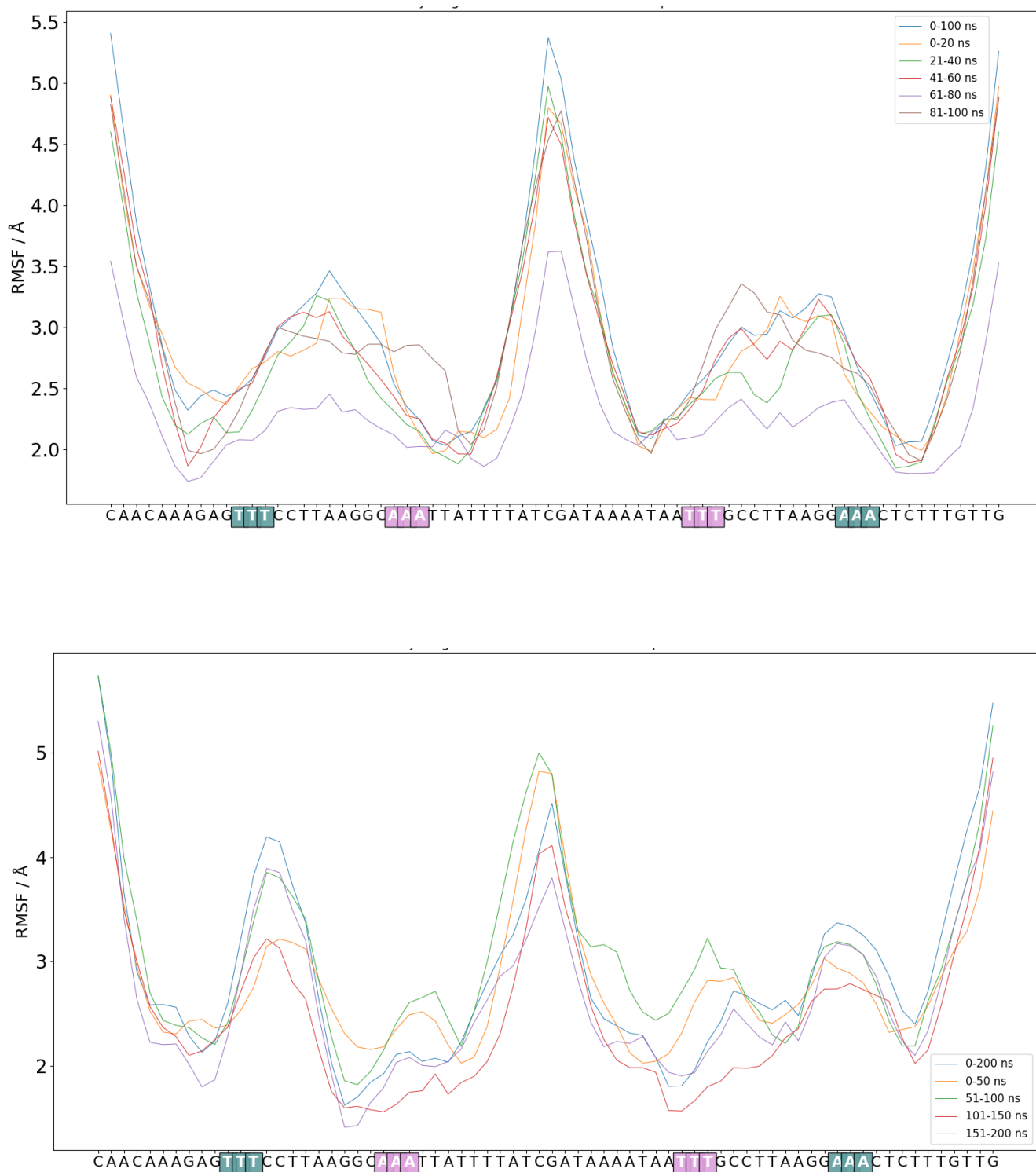
Rigidnost proteina MntR u kompleksu tijekom simulacije može se vidjeti i promatranjem fluktuacija fleksibilnih DNA-vezujućih domena koje su manje relativno prema fluktuacijama dimerizacijskih domena (slika 10).





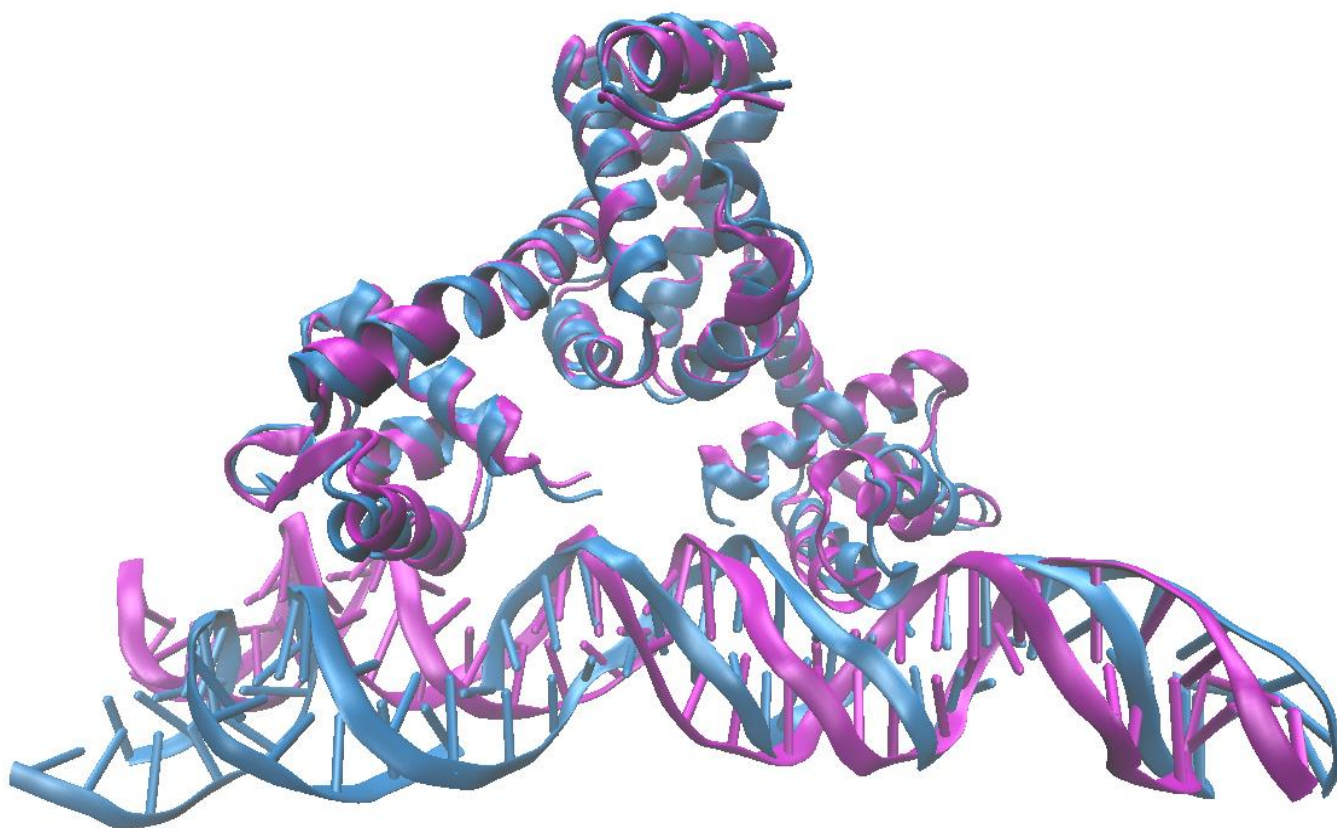
Slika 10. Fluktuacije DNA-vezujućih i dimerizacijskih domena proteina MntR u simuliranom kompleksu s DNA.

Izraženija gibanja opažaju se kod okosnice DNA. U slučaju kada protein nije vezan na DNA, regije koje uključuju palindromske sljedove (TTT/AAA) relativno su rigidne. Kod središnjeg dijela molekule DNA koji čini segment omeđen palindromima od interesa uočava se određena fleksibilnost, dok su krajevi očekivano fleksibilni (slika 11) .

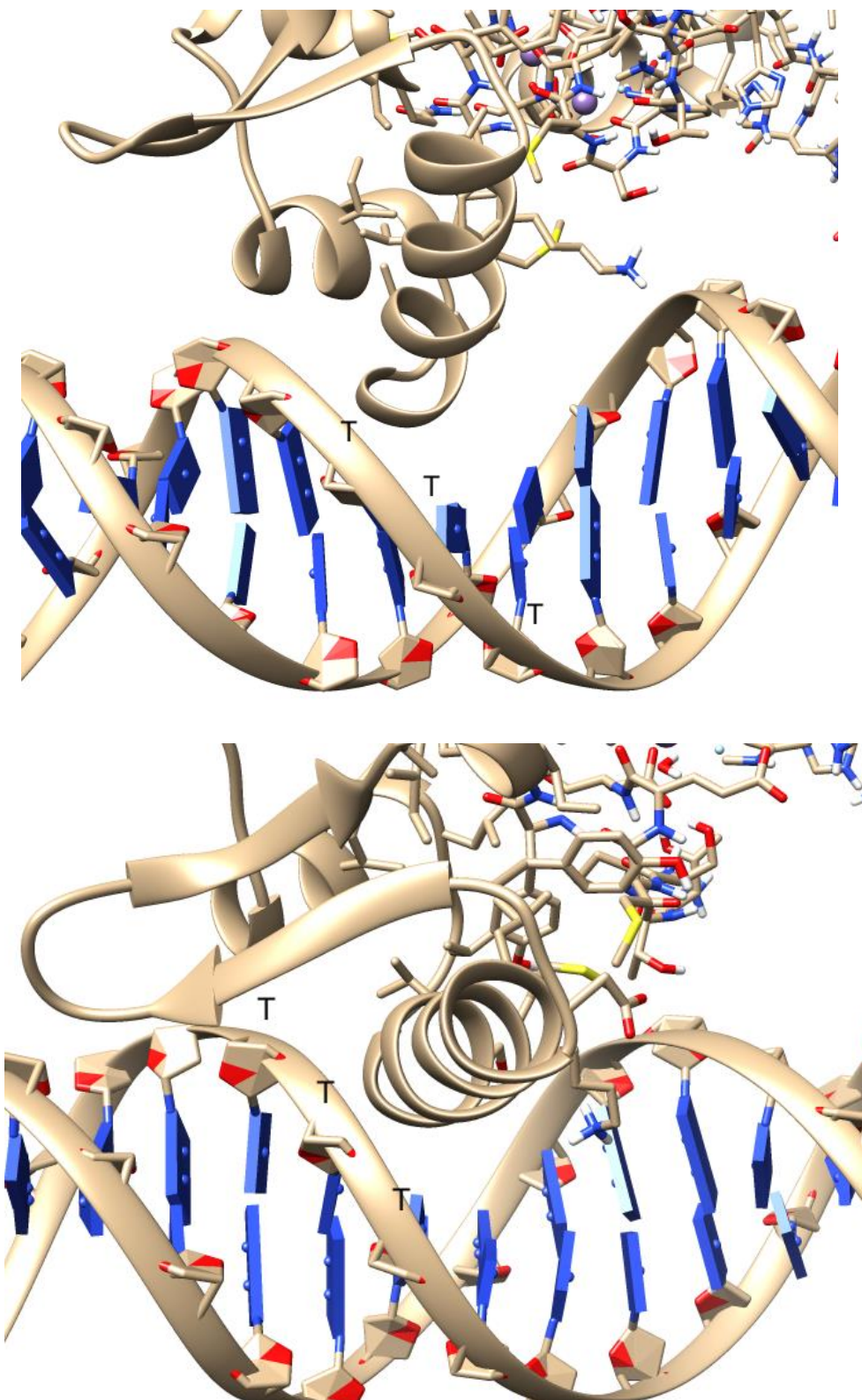


Slika 11. Fluktuacije molekule DNA u vremenu same tijekom 100 ns (gore) i u kompleksu s proteinom MntR iz *B. subtilis* tijekom 200 ns (dolje), palindromski sljedovi istaknuti su bojom.

Nasuprot tome, u kompleksu s transkripcijskim faktorom MntR, fluktuacije, odnosno RMSF vrijednosti, generalno su niže. Međutim, spomenute regije pokazuju vidljivu promjenu u fleksibilnosti. (slika 11.) Uz to, regije koje uključuju palindromske sljedove pokazuju razliku u fleksibilnosti i između sebe, što je i očekivano. Naime, u početnoj strukturi protein nije položen simetrično na DNA sekvencu. Gledano slijeva nadesno, prva zavojnica za prepoznavanje  $\alpha 3$  proteina MntR u blizini krajnje baze palindromskog slijeda TTT označenog tirkiznom bojom na grafovima, dok je druga u blizini središnje baze slijeda TTT označenog rozom bojom. Za razliku od druge, prva regija značajno fluktuirala. Opaženo sugerira da dolazi do značajnih promjena geometrijskih parametara DNA u slučaju kada DNA-vezujuća domena proteina nije položena u blizinu centra palindromskog slijeda. Također, primjetna je razlika u položaju HTH motiva u odnosu na DNA ovisno o položaju zavojnice za prepoznavanje u velikom utoru. Odmak strukture DNA generirane nakon 200 ns MD simulacije od početne strukture prikazan je na slici 12., dok je detaljniji prikaz položaja DNA-vezujućih domena prema velikim utorima prikazan na slici 13.



Slika 12. Preklopljene početna (ljubičasta) i zadnja generirana struktura nakon 200 ns (plava).

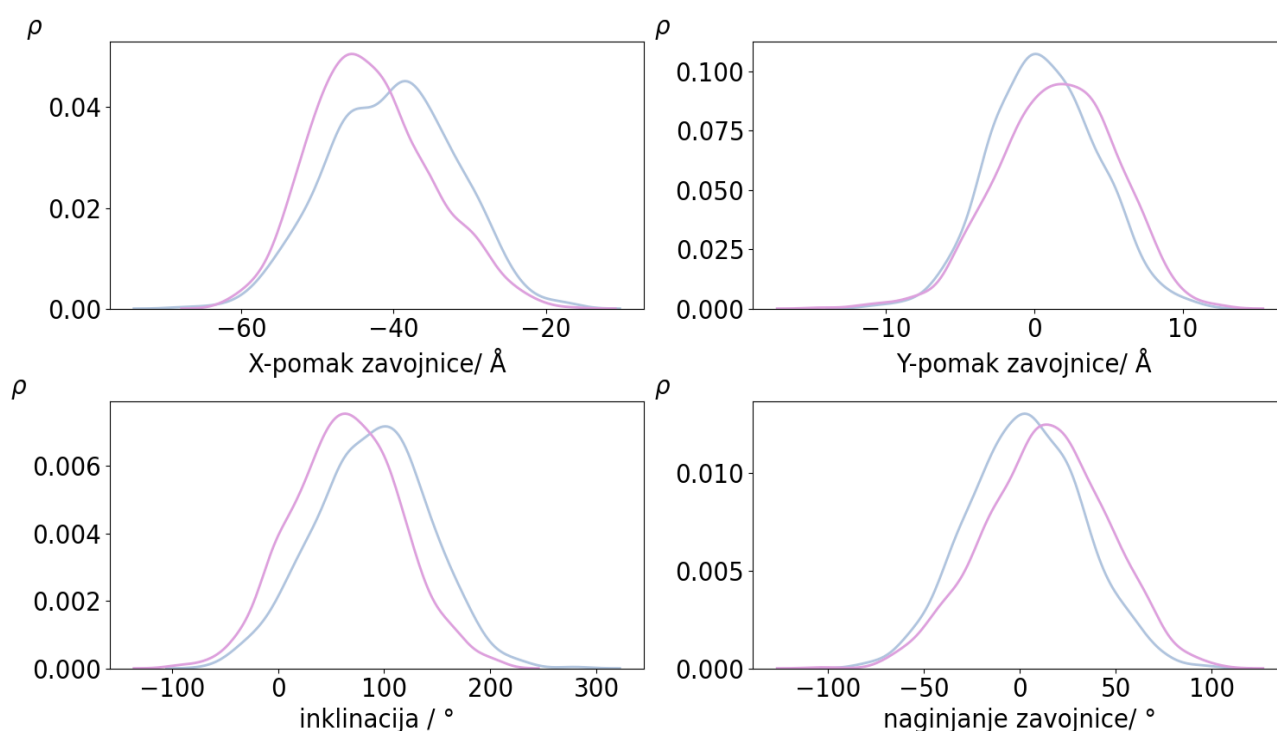


Slika 13. Položaji DNA-vezujućih domena proteina MntR iz *Bacillus subtilis* prema prvom (gore) i drugom (dolje) utoru molekule DNA u početnoj strukturi kompleksa

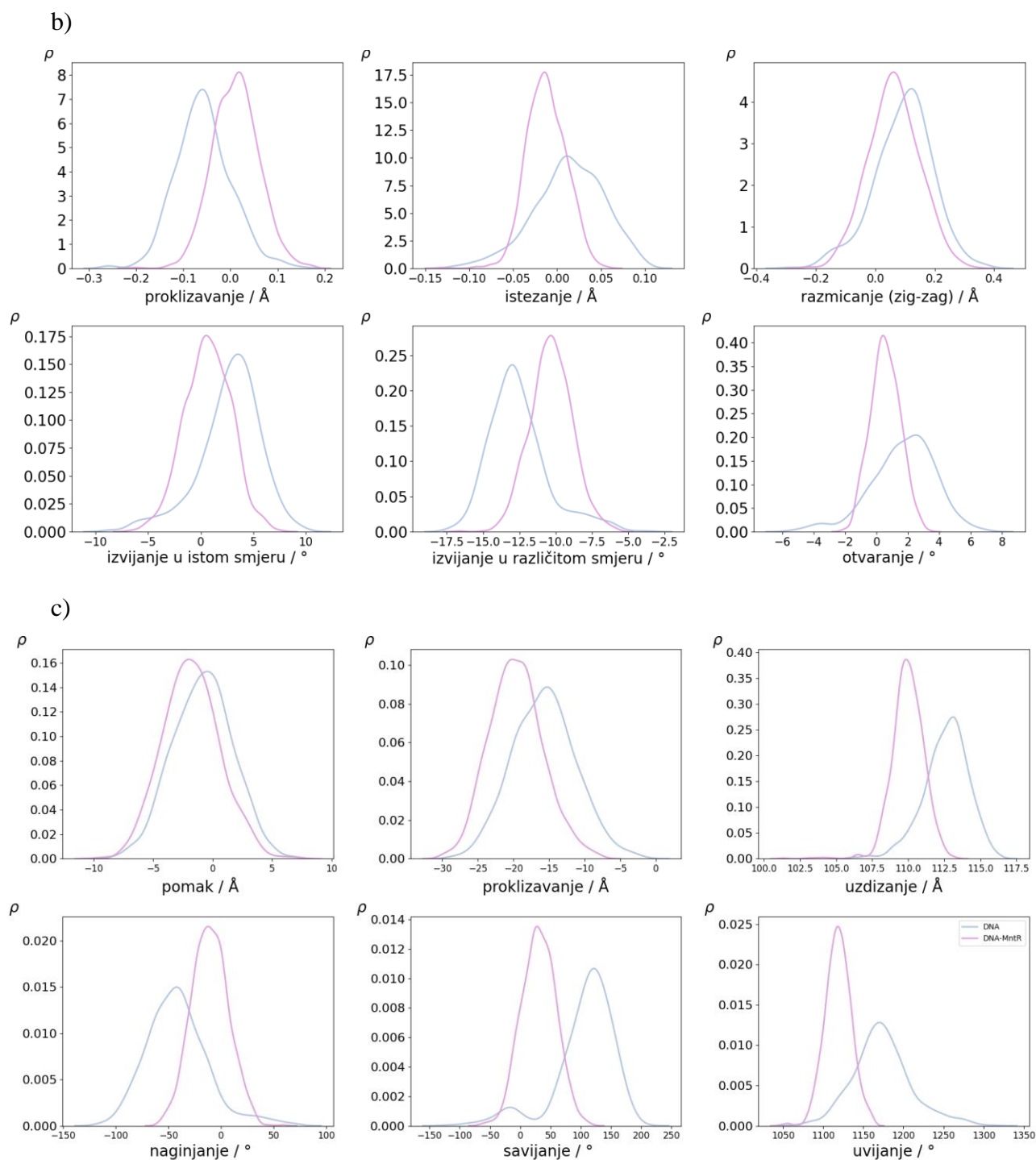
### 4.3. Usporedba geometrijskih parametara same DNA sekvence i u kompleksu s proteinom MntR

Strukturne promjene i fluktuacije DNA imaju značajan doprinos u mehanizmima prepoznavanja. Promotri li se promjena položaja zavojnice prema središnjoj osi, vidljivo je da translacije i rotacije oko y-osi nisu izražene. Međutim, pozitivna inklinacija sa srednjom vrijednosti  $62^\circ$  prema osi zavojnice uz pomak u x-smjeru sa srednjom vrijednosti  $-45 \text{ \AA}$  od osi zavojnice može se povezati s promjenama širine utora DNA. Raspodjele intrabaznih geometrijskih parametara DNA u kompleksu s MntR ne ukazuju na znatnija gibanja (srednje vrijednosti su oko nule). Prisutno je blago izvijanje u različitom smjeru (engl. *propeller*) sa srednjom vrijednosti  $-10^\circ$ . Relativno gledano prema vrijednostima interbaznih parametara za samu DNA, srednje vrijednosti za kompleks pomiču se prema manjim vrijednostima. (slike 14. i 15.)

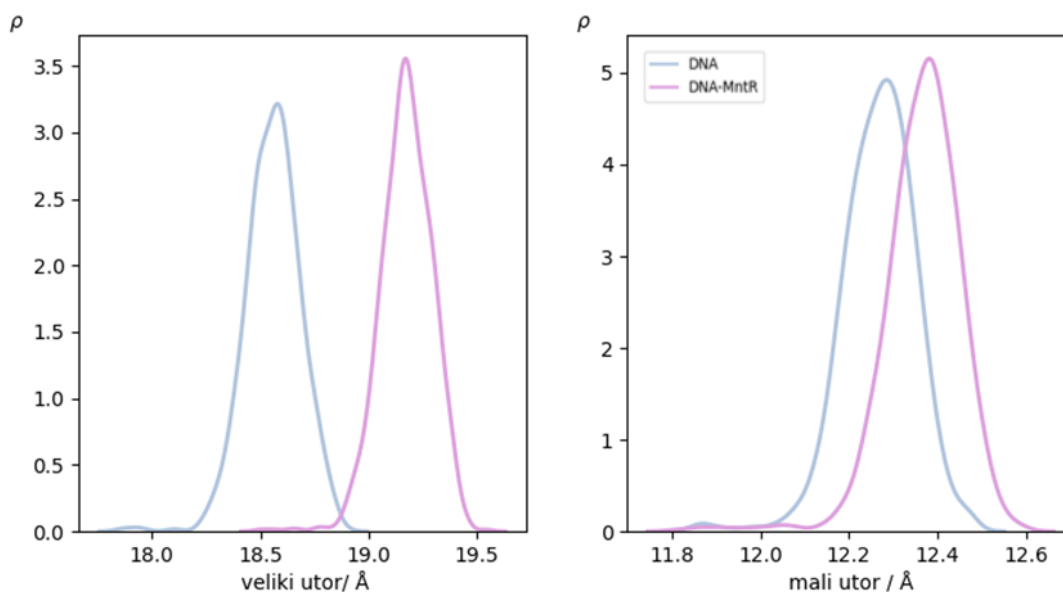
a)







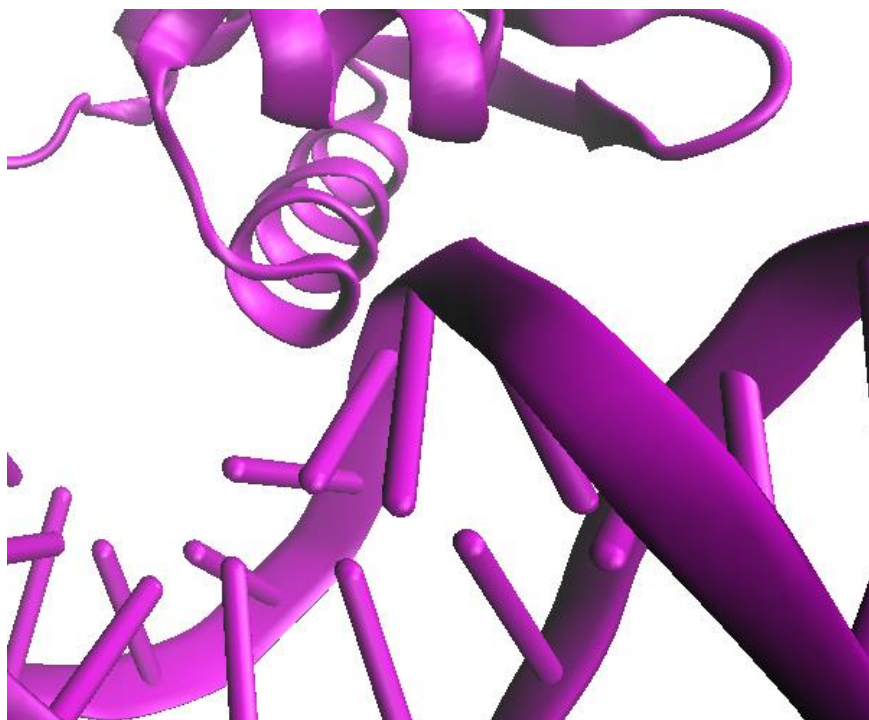
Slika 14. Raspodjele a) geometrijskih parametara obzirom na položaj prema osi zavojnice , b) intra- i c) inter- baznih geometrijskih parametara za DNA sekvencu 5'-CAACAAAGAGTTTCCTTAAGGCAAATTATTTTATC-3' (samu i u kompleksu s *B. subtilis* MntR)



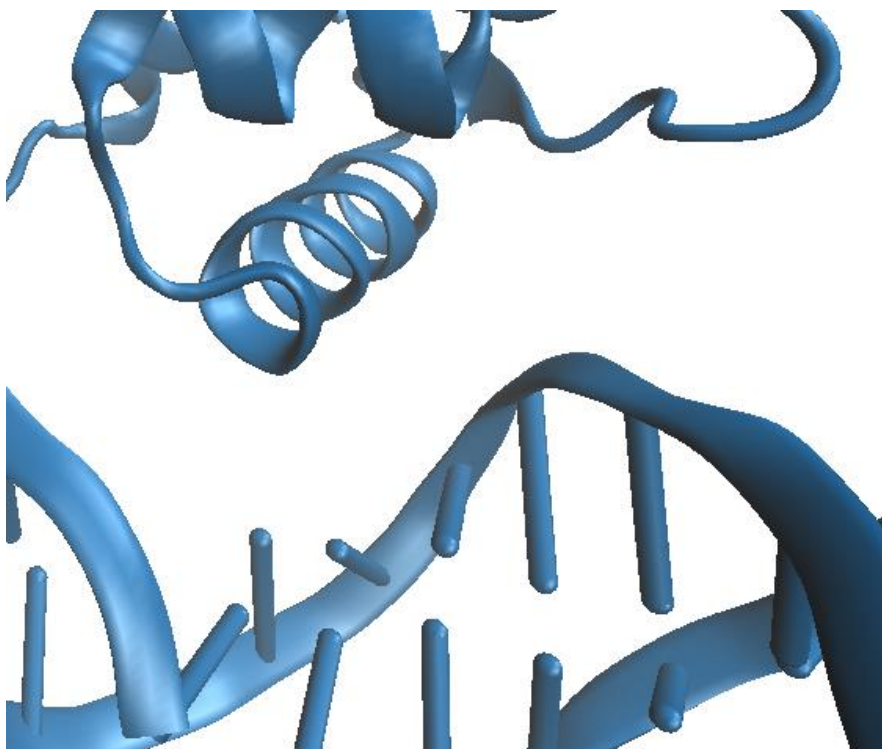
Slika 15. Raspodjele velikog i malog utora za DNA sekvencu 5'-CAACAAAGAGTTTCCTTAAGGCAAATTATTTTATC-3' (samu i u kompleksu s *B. subtilis* MntR)

Srednje vrijednosti velikog i malog utora DNA (19,1 Å i 12,3 Å) u kompleksu s proteinom pomiču se prema većim vrijednostima u usporedbi s onima same DNA. Uz ranije spomenutu inklinaciju i pomak zavojnice u x-smjeru, zaključuje se da vezanjem proteina MntR na ciljnu DNA dolazi do izraženog otvaranja velikog utora i blagog otvaranja malog utora. Promotre li se utori vizualno, vidljivo je da dolazi do odvajanja proteina od DNA sekvence više u slučaju prvog utora, nego drugog. (slike 16. i 17.)

a)



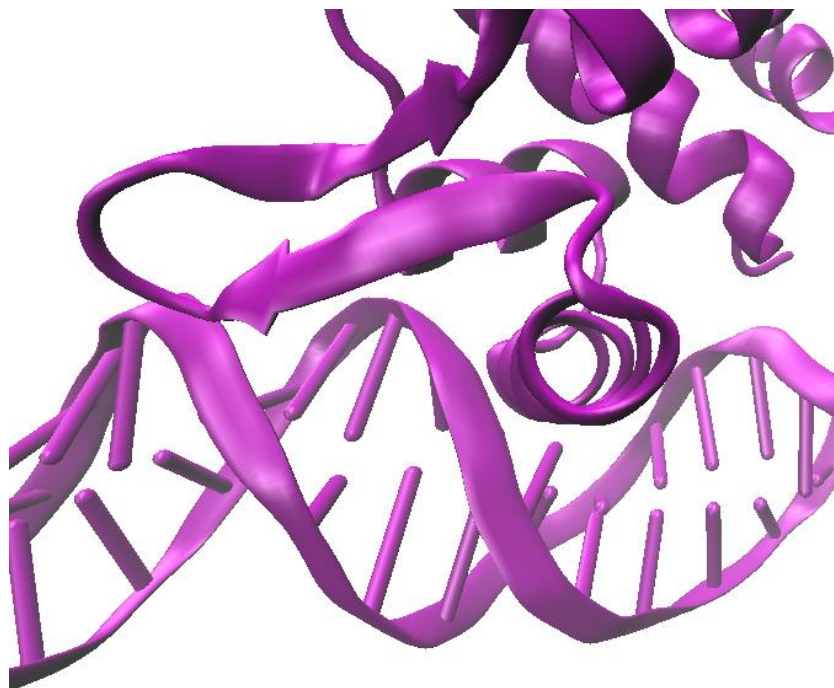
b)



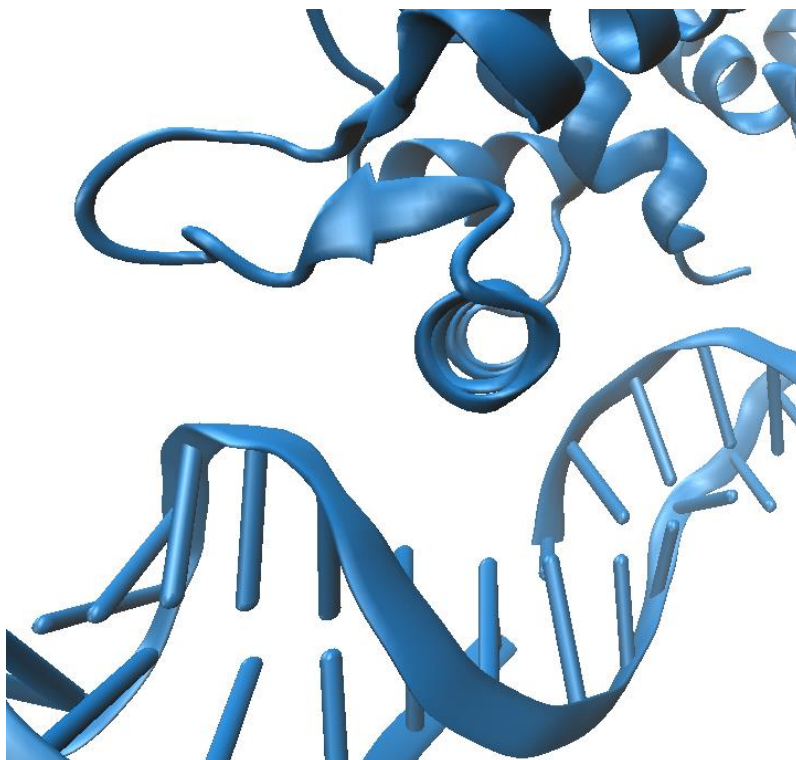
Slika 16. Prvi veliki utor u: a) početnoj i b) zadnjoj generiranoj strukturi dobivenoj nakon 200 ns MD simulacije



a)



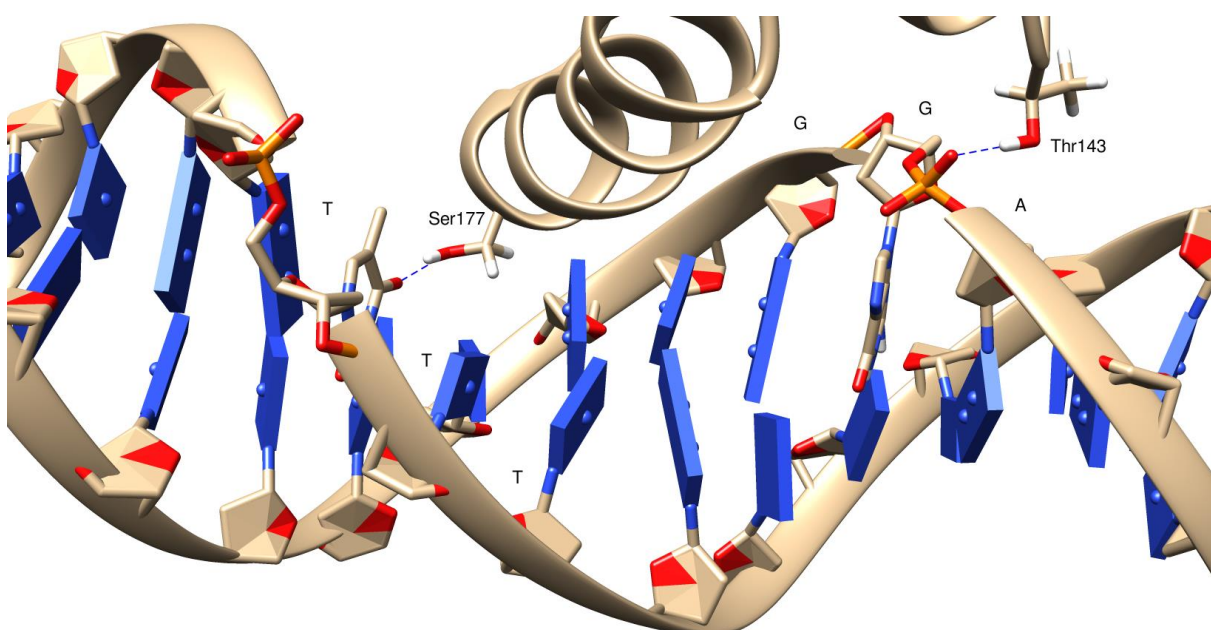
b)



Slika 17. Drugi veliki utor u a) početnoj i b) zadnjoj generiranoj strukturi dobivenoj nakon 200 ns MD simulacije.

#### 4.4. Vodikove veze u kompleksu DNA-MntR

Kako je došlo do odvajanja DNA i proteina u području prvog utora, nisu opažene niti specifične interakcije. U slučaju kada je protein bolje položen u odnosu na veliki utor, izdvajaju se dvije vodikove veze koje doprinose stabilnosti kompleksa u tom dijelu. Vodikova veza koja se javlja između kisikovog atoma pirimidinske baze krajnjeg nukleotida T iz palindromskog slijeda (akceptor) i kisikovog atoma iz bočnog ogranka Ser177 (donor) zastupljena je 69 % vremena simulacije s prosječnom duljinom  $2,8 \pm 0,2$  Å. Druga vodikova veza s manjom zastupljenosti (50%), stvara se između kisikovog atoma purinske baze nukleotida G (akceptor) i kisikovog atoma iz bočnog ogranka Thr143 (donor) s prosječnom duljinom  $2,7 \pm 0,3$  Å. (slika 18.)



Slika 18. Najzastupljenije vodikove veze oko drugog velikog utora tijekom MD simulacije prikazane na zadnjoj generiranoj strukturi dobivene nakon 200 ns

## § 5. ZAKLJUČAK

Sustav izgrađen od asimetrično položenog proteina MntR iz bakterije *Bacillus subtilis* u velike utore ciljane DNA sekvence, koji uključuju palindromske sljedove TTT/AAA, poslužio je kao modelni sustav za računalno istraživanje vezanja proteina MntR na ciljnu DNA sekvencu. Posebna je pozornost obraćena na usporednu evaluaciju strukturnih parametara molekule DNA uslijed vezanja proteina ovisno o položaju zavojnice za prepoznavanje prema velikom utoru.

Analiza simulacija molekulske dinamike same DNA i u kompleksu s transkripcijskim faktorom MntR sugerira da fleksibilnosti izgrađenog kompleksa doprinose fluktuacije molekule DNA, odnosno da dolazi do promjena geometrijskih parametara molekule DNA. Poblje, dolazi do razilaženja u fleksibilnosti pojedinih regija koje obuhvaćaju palindromske sljedove, upravo zbog asimetričnog vezanja proteina u početnoj strukturi. Ukoliko zavojnica za prepoznavanje DNA proteina MntR nije položena u blizini palindromskog slijeda, dolazi do odvajanja proteina od DNA sekvence koja onda slobodnije fluktuirala i doprinosi fleksibilnosti simuliranog kompleksa. U suprotnome, kada je ista zavojnica položena u blizini središta palindromskog slijeda, stabilnosti tog dijela kompleksa doprinose dvije izdvojene vodikove veze T:Ser177 i G:Thr143 te dolazi do blagog otvaranja velikog utora. Ostali geometrijski parametri su stabilni tijekom simulacija i nema značajnih doprinosa (vrijednosti su oko nule).

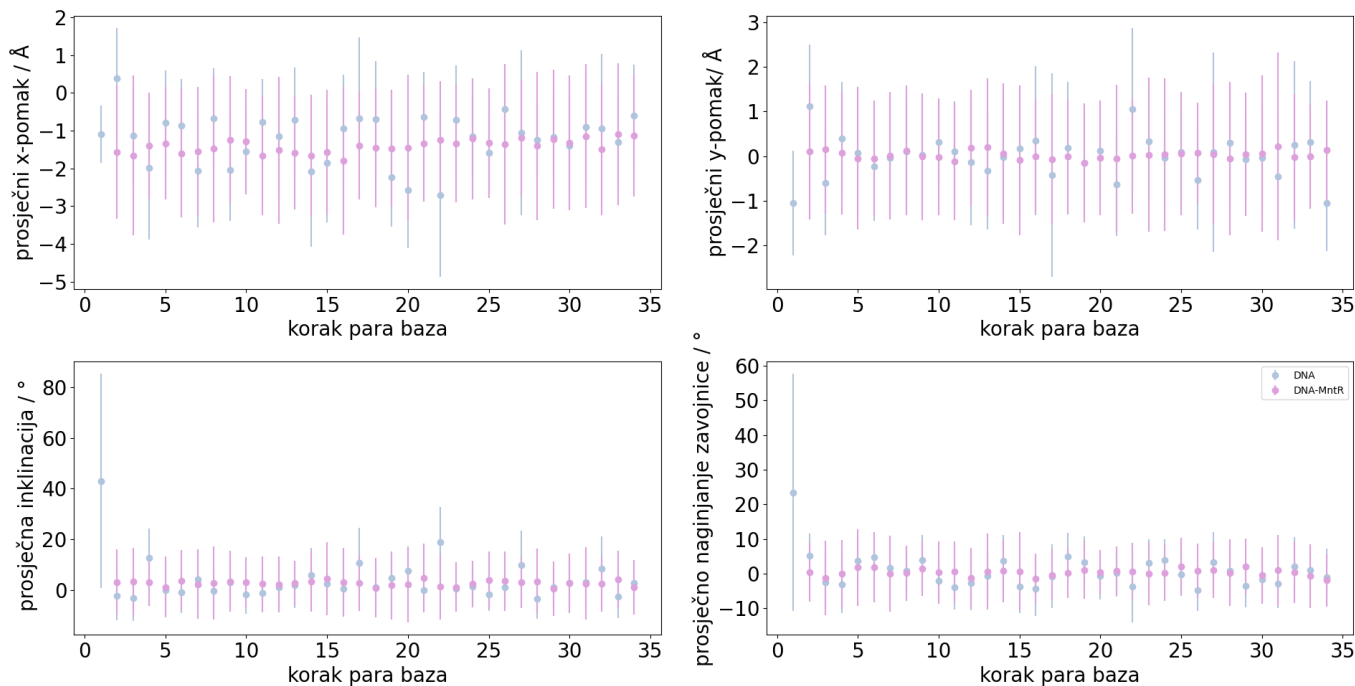
## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. P. Chandrangu, C. Rensing, J. Helmann, Metal homeostasis and resistance in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (2017), 338-350.
2. X. Huang, J- Shin, A. Pinochet-Barros, T. T. Su, J. D. Helmann, *Bacillus subtilis* MntR coordinates the transcriptional regulation of manganese uptake and efflux systems, *Mol. Microbiol.* (2017) **103** (2), 253-268.
3. E. Guedon, J. D. Helmann, Origins of metal ion selectivity in the DtxR/MntR family of metalloregulators, *Mol. Microbiol.* (2003) **48** (2), 495.-506.
4. P. J. Piggot, *Encyclopedia of Microbiology, 3rd Edition*, Elsevier, 2009, 45.-56.
5. H. A. Hong et al, *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract, *Res. Microbiol.* 160 (2009), 134-143
6. J. I. Kliegman, S. L. Gringer, J. D. Helmann, R. G. Brennan, A. Glasfeld, Structural Basis for the Metal-Selective Activation of the Manganese Transport Regulator of *Bacillus subtilis*, *Biochemistry* (2006) **45**, 3493-3505.
7. F. J. Marcos-Torres, D. Maurer, L. Juniar, J. J. Griese, The bacterial iron sensor IdeR recognizes its DNA targets by indirect readout, *Nucleic Acids Res.* (2021) **49** (17), 10120-10135.
8. Z. Jelić Matošević, K. Radman, J. Loubser, I. Crnolatac, I. Piantanida, I. Cukrowski, I. Leščić Ašler, B. Bertoša, Structural Dynamics of the *Bacillus subtilis* MntR Transcription Factor Is Locked by Mn<sup>2+</sup> Binding, *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(2), 957
9. A. M. McGuire, Bonnie J. Cuthbert, Zhen Ma, K. D. Grauer-Gray, M. Brunjes Brophy, K. A. Spear, S. Soonsanga, J. I. Kliegman, S. L. Griner, J. D. Helmann, A. Glasfeld, The Roles of the A and C Sites in the Manganese-Specific Activation of MntR, *Biochemistry* (2013) **52** (4), 701-713
10. M. A. DeWitt, J. I. Kliegman, J. D. Helmann, R. G. Brennan, D. L. Farrens, A. Glasfeld, The Conformations of Manganese Transport Regulator of *Bacillus subtilis* in its Metal-free State, *J. Mol. Biol.* (2007) **365**, 1257-1265.
11. S. Harteis, S. Schneider, Making the Bend: DNA Tertiary Structure and Protein-DNA Interactions, *Int. J. Mol. Sci.* (2014) **15**, 12335-12363.
12. <https://mmb.irbbarcelona.org/NAFlex/help.php?id=helicalParamsTable> (datum pristupa: 26. lipnja 2023.)

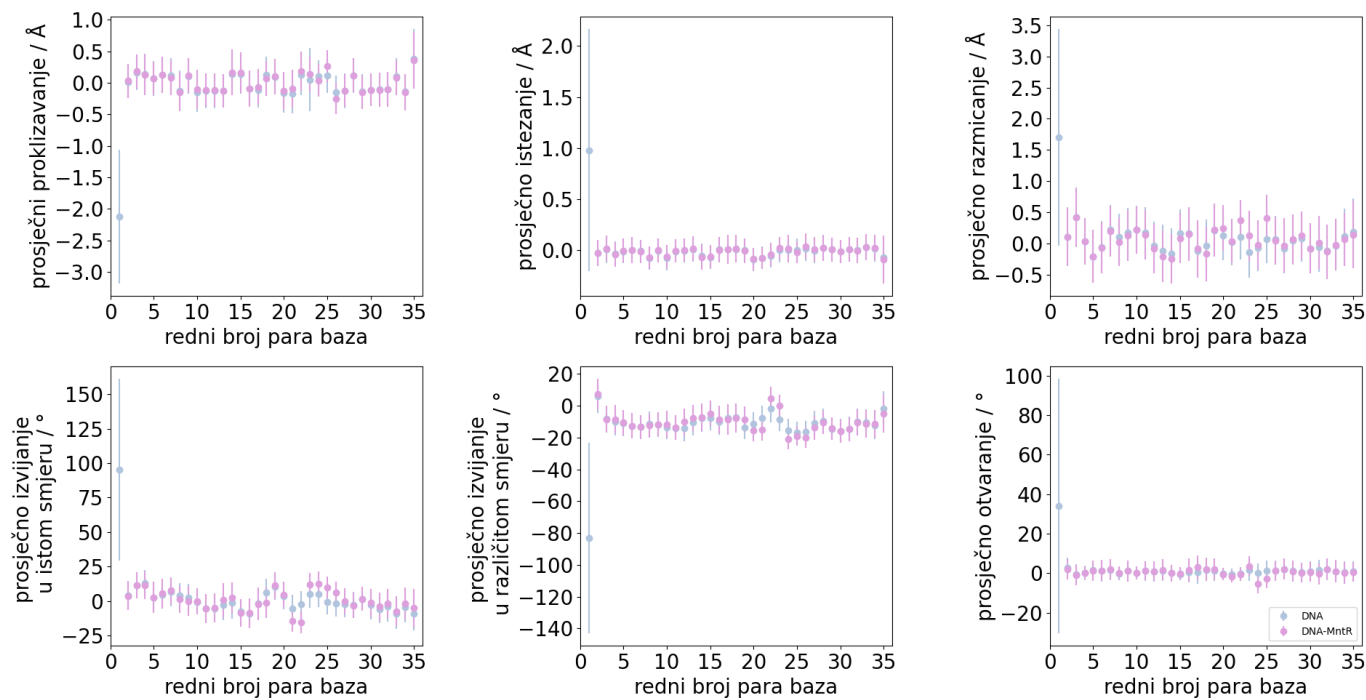
13. F. J. Marcos-Torres, D. Maurer, L. Juniar, J. J. Griese, The bacterial iron sensor IdeR recognizes its DNA targets by indirect readout, *Nucleic Acids Res.* (2021) **49** (17), 10120-10135.
14. S. A. Hollingsworth, R. O. Dror, Molecular Dynamics Simulation for All, *Neuron* **99**, 2018, CellPress, 1129-1143.
15. M. A. González, Force fields and molecular dynamics simulations, *Collection SFN* **12** (2011), 169-200.
16. T. Hansson, C. Oostenbrink, W. F. van Gunsteren, Molecular dynamics simulations, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2002) **12**, 190-196.
17. C. R. de Oliveira, T. Werlang, Ergodic hypothesis in classical statistical mechanics, *Rev. Bras. Ensino Fis.* (2007) **29** (2), 189-201.
18. M. Badino, The foundational role of ergodic theory (2005), Institut Max-Planck
19. D. Kuřák, L. Melo, F. Schroeder, Z. Jelic-Matošević, N. Mutter, B. Bertoša, I. Barišić, CATANA: an online modelling environment for proteins and nucleic acid nanostructures, *Nucleic Acids Res.* **50** (W1) (2022) W152–W158
20. D. A. Case et al. (2020), AMBER 2020, University of California, San Francisco
21. D. R. Roe, T. E. Cheatham III, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data, *J. Chem. Theory Comput.* (2013) **9** (7) 3084-3095.
22. D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, and H.J.C. Berendsen, GROMACS: Fast, Flexible and Free, *J. Comp. Chem.* (2005) **26**, 1701–1718
23. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD – Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics* (1996), **14**(1), 33-38.
24. S. Mukherjee, Y. Zhang, MM-align: a quick algorithm for aligning multiple-chain protein complex structures using iterative dynamic programming, *Nucleic Acids Res.* (2009) **37**, 83
25. E. Jurrus, D. Engel, K. Star *et al*, Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite, *Protein Sci.* (2018) **27**(1), 112-128.

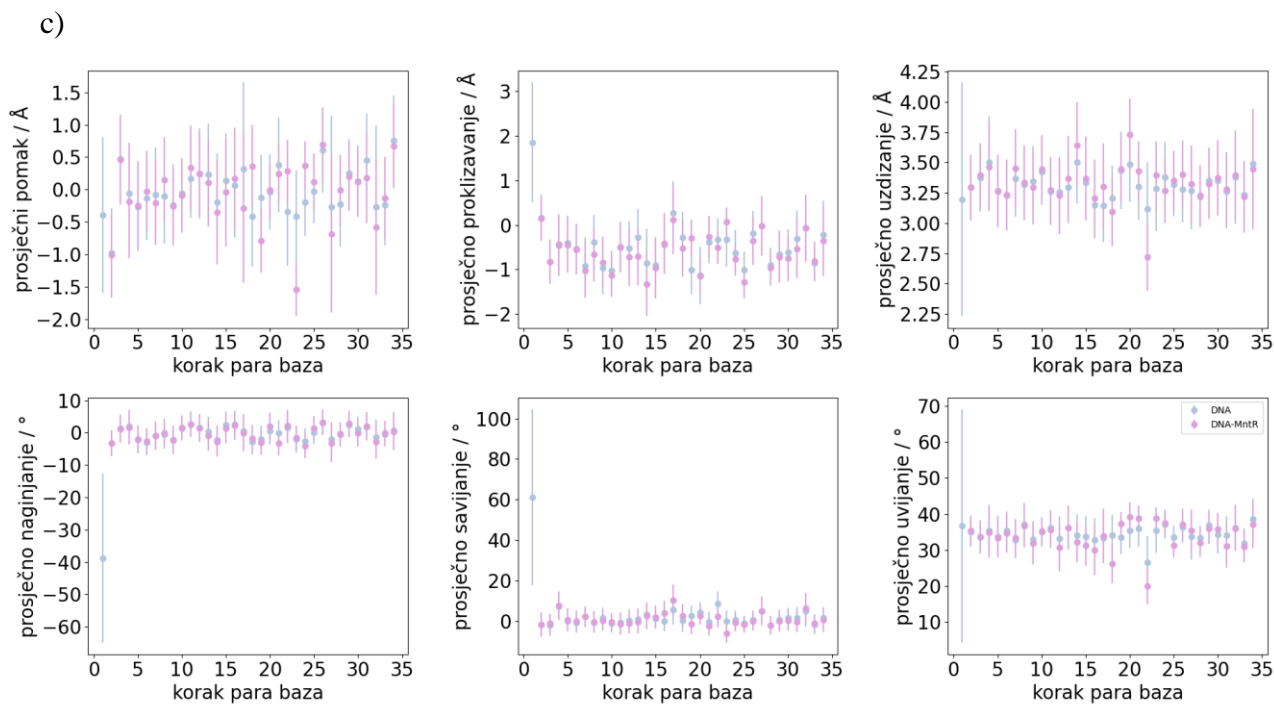
## § 7. DODATAK

a)



b)





Slika D1. Grafovi pogreške geometrijskih parametara a) obzirom na središnju os zavojnice, b) intra- i c) interbaznih, čije su raspodjele prikazane na slici 13.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Michaela Batković

Datum rođenja: 30. srpnja 1997.

Mjesto rođenja: Neumünster, SR Njemačka

### Obrazovanje

2004–2012 Osnovna škola Vladimira Vidrića, Kutina

2012–2016 Srednja škola Tina Ujevića, Kutina

2016–2020 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Zagreb