

Računalna i eksperimentalna analiza interakcije između DNA i transkripcijskog faktora MntR-a iz *Mycobacterium tuberculosis*

Semenić, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:784793>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lana Semenčić

**Računalna i eksperimentalna analiza
interakcije između DNA i transkripcijskog
faktora MntR-a iz *Mycobacterium tuberculosis***

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta 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 sveučilišne magistre molekularne biologije. Istraživanje je provedeno u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Manganovi metalosenzori* čiji je voditelj prof. dr. sc. Branimir Bertoša (IP-2020-02-3446).



Zahvale

Želim se zahvaliti prof. dr. sc. Branimiru Bertoši za mentorstvo pri izradi ovog diplomskog rada i za svo znanje koje sam stekla na njegovim kolegijima, koji su me i zainteresirali za računalnu kemiju. Također mu zahvaljujem na ukazanom povjerenju i prilici da steknem nove vještine u njegovoj istraživačkoj skupini.

Puno hvala Andreji Hloušek-Kasun, dr. sc., i Katarini Radman, mag. biol. mol. na ugodnom društvu, pristupačnosti i velikoj pomoći pri izradi ovog rada. Andrea mi je iznimno puno pomogla oko računalnog dijela rada i usmjeravanja mojeg istraživanja. Uz Katarinu sam izvodila eksperimentalni dio, a pomagala mi je i pri izvođenju simulacija molekulske dinamike. Zahvaljujem se i Mateju Kožiču, univ. mag. chem., na njegovoj ljubaznosti i tome što mi je bio na raspolaganju kad su se javili tehnički problemi.

Hvala Ivani Leščić Ašler, dr. sc. što mi je pružila priliku da proširim svoj diplomski rad. Zahvaljujući njenom prijedlogu, u rad je uključena i eksperimentalna provjera računalnih simulacija. Također joj se zahvaljujem za pomoć pri optimizaciji eksperimentalnog protokola.

Hvala Zoe Jelić Matošević, mag. biol. mol. što mi je omogućila korištenje svojih podataka iz istraživačkog projekta „Manganovi metalosenzori“. Oni su mi bili nužni za uklapanje kationa u model proteina i parametrizaciju.

Hvala izv. prof. dr. sc. Rosi Karlić i Pauli Štancl, mag. biol. mol. na savjetima vezanima za bioinformatički dio rada.

Za kraj, želim se zahvaliti svojim bližnjima. Svojoj obitelji i Karlu na ljubavi i podršci koju su mi pružili. Svojim kolegama i kolegicama, Alanu, Dori, Gaju, Nikoli i Sari, na prijateljstvu koje mi je uljepšalo studiranje. Ani, na koju se uvijek mogu osloniti, što mi je pravila društvo u NSK-u ovo radno ljeto.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Računalna i eksperimentalna analiza interakcije između DNA i transkripcijskog faktora MntR-a iz *Mycobacterium tuberculosis*

Lana Semenić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

MntR (regulator prijenosa mangana, engl. *manganese transport regulator*) je homodimerni transkripcijski faktor koji kontrolira homeostazu manganovih(II) kationa u bakterijama, među kojima je i ljudski patogen *Mycobacterium tuberculosis*. Vezanjem manganovih(II) kationa MntR iz neaktivnog apo-oblika prelazi u aktivni holo-oblik, koji se može vezati za DNA. Strukture apo- i holo-oblika riješene su kristalografijom X-zraka, ali to nije slučaj za njegov kompleks s DNA. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti vezanje proteina MntR za DNA koristeći multidisciplinarni pristup, koji kombinira molekulska dinamiku, bioinformatiku i eksperimentalne metode. U promotoru gena *mntH* identificiran je novi MntR-vezujući slijed. Iskorišten je za stvaranje *in silico* kompleksa molekulskim uklapanjem (engl. *docking*), tako da se MntR svojim DNA-vezujućim zavojnicama vezao za palindromske sljedove. Provedeno je više simulacija molekulske dinamike kako bi se detektirale nekovalentne interakcije između proteina i DNA te analizirale razlike između apo- i holo-oblika. Oba protomera pokazala su mogućnost stvaranja relativno dugotrajnih vodikovih veza između ostatka Ser46 i dušičnih baza istraživane DNA. Međutim, te vodikove veze uglavnom se nisu pojavljivale istovremeno. Ovo istraživanje predstavlja jedan od početnih koraka prema razumijevanju interakcije između DNA i proteina MntR iz *M. tuberculosis*.

Ključne riječi: manganovi metalosenzori, molekulska dinamika, molekulska uklapanje
(36 stranica, 13 slika, 0 tablica, 62 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Branimir Bertoša
Prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
Prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 5.9.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Computational and experimental analysis of interaction between *Mycobacterium tuberculosis* transcription factor MntR and DNA

Lana Semenić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

MntR (manganese transport regulator) is a homodimeric transcription factor that controls the homeostasis of manganese(II) cations in bacteria, including the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. By binding manganese(II) cations, MntR transitions from an inactive apo-form to an active holo-form, which can bind to DNA. While the crystal structures of its apo- and holo-form have been determined via X-ray crystallography, the structure of the MntR-DNA complex has yet to be explored. This thesis aims to investigate DNA-binding properties of MntR using a multidisciplinary approach that combines molecular dynamics, bioinformatics and experimental methods. A novel MntR-binding motif, identified in the *mntH* promoter region, was used to form an *in silico* complex with MntR through the use of protein-DNA docking, wherein the DNA-binding helices were bound to palindromic sequences. Multiple molecular dynamics simulations were carried out in order to analyze non-covalent protein-DNA interactions and to determine differences between the apo- and holo-forms. Both promoters demonstrated the ability to form relatively long-lasting hydrogen bonds between their respective Ser46 residues and subject DNA. For the majority of the simulation time, however, these bonds were not present concurrently. This paper represents one of the initial steps towards understanding the interaction between MntR from *M. tuberculosis* and DNA.

Keywords: manganese metallosensors, molecular dynamics, molecular docking
(36 pages, 13 figures, 0 tables, 62 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Branimir Bertoša, PhD

Reviewers:

Prof. Branimir Bertoša, PhD
Prof. Ivana Ivančić Baće, PhD
Prof. Martina Šeruga Musić, PhD

Thesis accepted: September 5th, 2024

Sadržaj

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Uvod | 1 |
| 1.1. | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kao uzročnik tuberkuloze | 1 |
| 1.2. | Uloge manganovog(II) kationa i proteina MntR..... | 2 |
| 1.3. | Trodimenzionalna struktura proteina MntR iz <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 3 |
| 1.4. | Vežanje manganovih(II) kationa za MntR | 4 |
| 1.5. | Predviđanje strukture proteina modelom <i>AlphaFold 2</i> | 5 |
| 1.6. | Računalne simulacije biomolekula | 6 |
| 1.7. | Molekulsko uklapanje | 9 |
| 2. | Cilj istraživanja..... | 10 |
| 3. | Materijal i metode..... | 11 |
| 3.1. | Bioinformatičko predviđanje veznih sljedova transkripcijskog faktora | 11 |
| 3.2. | Nativna elektroforeza kompleksa proteina i nukleinske kiseline (EMSA)..... | 11 |
| 3.3. | Priprema trodimenzionalnih modela biomolekula i molekulsko uklapanje..... | 12 |
| 3.4. | Parametrizacija, optimizacija geometrije i molekulska dinamika | 13 |
| 3.5. | Analiza trajektorije i izrada mape elektrostatskog potencijala | 13 |
| 3.6. | Statistička obrada i grafički prikaz podataka | 15 |
| 4. | Rezultati..... | 16 |
| 4.1. | Vezno mjesto proteina MntR ispred gena <i>mntH</i> | 16 |
| 4.2. | Konformacijska analiza proteina MntR | 17 |
| 4.3. | Nekovalentne interakcije između proteina i DNA | 22 |
| 5. | Rasprava | 25 |
| 5.1. | Vežanje transkripcijskog faktora MntR za slijed ispred gena <i>mntH</i> | 25 |
| 5.2. | Nekovalentne interakcije proteina MntR i DNA | 26 |
| 5.3. | Mehanizam alosteričke regulacije proteina..... | 28 |
| 6. | Zaključak | 30 |
| 7. | Literatura | 31 |
| 8. | Životopis | |
| 9. | Prilozi | I |

Kratice

| | |
|----------------|---|
| DtxR | represor toksina difterije (engl. <i>diphtheria toxin repressor</i>) |
| EMSA | nativna elektroforeza kompleksa proteina i nukleinske kiseline (engl. <i>electrophoretic mobility shift assay</i>) |
| FeoA | domena prijenosnika željezovog(II) kationa A (engl. <i>ferrous iron transport protein A domain</i>) |
| HIV | virus ljudske imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>) |
| HTH | zavojnica-okret-zavojnica (engl. <i>helix-turn-helix</i>) |
| IdeR | represor ovisan o željezu (engl. <i>iron-dependent repressor</i>) |
| <i>mntABCD</i> | ABC prijenosnik manganovih(II) kationa (gen) (engl. <i>manganese(II) cation ABC transporter</i>) |
| <i>mntH</i> | bakterijski prijenosnik kationa nalik na NRAMP (gen) (engl. <i>bacterial NRAMP-like transporter</i>) |
| MntR | regulator prijenosa mangana; zastarjeli naziv: SirR (engl. <i>manganese transport regulator</i>) |
| MtsR | Mts represor (engl. <i>Mts repressor</i>) |
| NRAMP | protein makrofaga povezan s prirodnom imunošću (engl. <i>natural resistance-associated macrophage protein</i>) |
| PDB | baza podataka <i>Protein Data Bank</i> |
| RMSD | korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. <i>root mean square deviation</i>) |
| RMSF | korijen srednjeg kvadrata fluktuacije (engl. <i>root mean square fluctuation</i>) |
| SH3 | domena Src homologije 3 (engl. <i>Src homology 3 domain</i>) |
| SirR | represor za regulaciju željeza u stafilokoka; zastarjeli naziv za MntR (engl. <i>staphylococcal iron regulator repressor</i>) |

Mjerne jedinice i konstante

| | |
|-----|---|
| Å | Ångström, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ |
| e | elementarni naboj, $e = 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$ |
| k | Boltzmannova konstanta, $k = 1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ |
| T | termodinamička temperatura |

1. Uvod

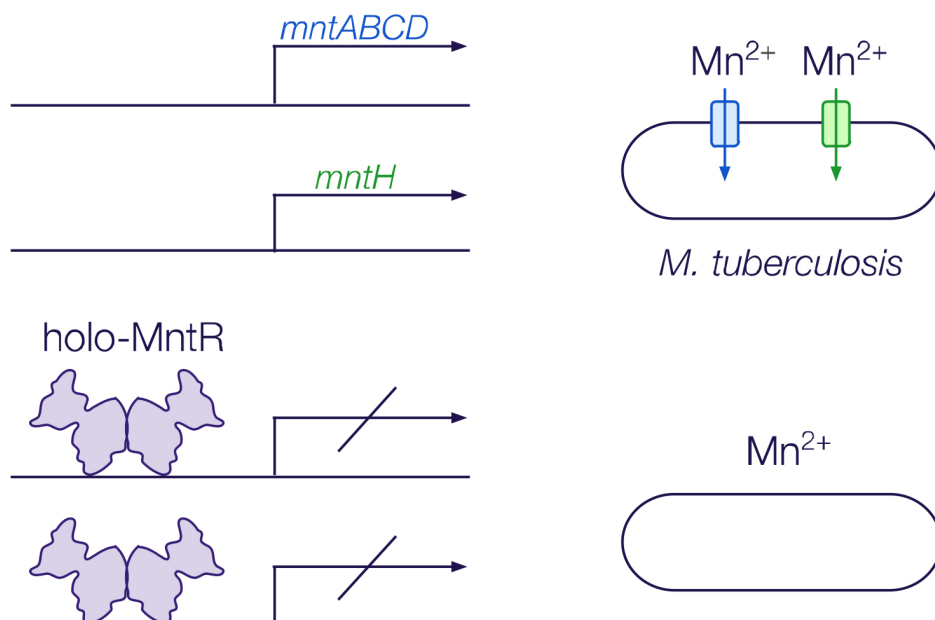
1.1. *Mycobacterium tuberculosis* kao uzročnik tuberkuloze

Mycobacterium tuberculosis (Zopf 1883) je patogena bacilarna bakterija koja uzrokuje tuberkulozu u sisavaca. Kao uzročnika tuberkuloze prvotno ju je opisao Robert Koch još 1882. (Gordon i Parish, 2018). Bakterija se prenosi zrakom, primjerice uslijed kašljanja. Unatoč preventivnim metodama i izlječivosti, tuberkuloza je u 2022. bila drugi najčešći uzrok smrti od jedinstvenog infektivnog uzročnika bolesti, pri čemu je značajan rizični čimbenik siromaštvo (*World Health Organization*, 2023). Jedan od razloga zašto je *M. tuberculosis* toliko uspješan patogen je sposobnost preživljavanja u fagocitima domaćina (Barczak i sur., 2017). Nakon udahnuća infektivnih kapljica, stanice imunosnog sustava, alveolarni makrofagi i dendritičke stanice, fagocitiraju bakterije. Unutar fagocita, bakterije mogu preživjeti i dijeliti se. Druga opcija je da ostanu u latentnoj fazi, što može trajati desetljećima, stvarajući rezervoare latentno inficiranih pojedinaca u hiperendemskim područjima svijeta (Guirado, Schlesinger i Kaplan, 2013).

Izazove u liječenju tuberkuloze predstavljaju istodobna zaraza virusom ljudske imunodeficijencije (HIV, engl. *human immunodeficiency virus*) i višestruka otpornost na lijekove. Ova dva biološka čimbenika zahtijevaju razvoj novih strategija liječenja (*World Health Organization*, 2023), čineći bakteriju važnim predmetom istraživanja. Nutritivna imunost jedan je od obrambenih mehanizama protiv patogena koji postoji u ljudi i drugih sisavaca. Ona predstavlja niz strategija kojima se ograničava dostupnost minerala patogenima. Slično tome, nastoje se razviti lijekovi koji ciljaju proteine uključene u homeostazu metala. Pritom se uglavnom pokušavao ciljati unos željeza, budući da bez njega brojni patogeni ne mogu preživjeti. Jedna od potencijalnih ciljnih molekula bio je IdeR (engl. *iron dependent regulator protein*), transkripcijski faktor koji kontrolira gene uključene u sintezu siderofora (Monfeli i Beeson, 2007). IdeR spada u DtxR/MntR obitelj metalosenzora. Ime je dobila po dva svoja predstavnika, proteinu DtxR (engl. *diphtheria toxin repressor*), koji je je senzor željeza, i proteinu MntR (engl. *manganese transport regulator*), regulatoru prijenosa mangana (Capdevila, Edmonds i Giedroc, 2017). Po uzoru na navedena istraživanja vezana za homeostazu željeza, pojavile su se ideje o ciljanju unosa mangana u *M. tuberculosis*, budući da se on pokazao nužnim za njenu replikaciju (Pandey i sur., 2015; Cong i sur., 2018).

1.2. Uloge manganovog(II) kationa i proteina MntR

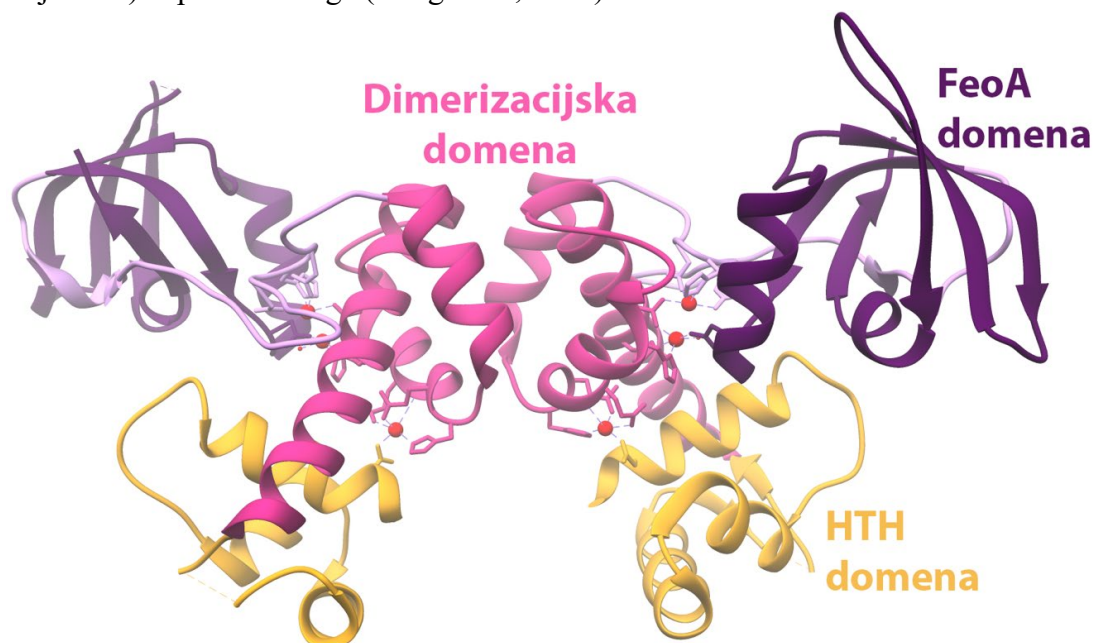
Manganov(II) kation (Mn^{2+}) bakterijama služi kao kofaktor u enzimima i doprinosi zaštiti od oksidativnog stresa (Hood i Skaar, 2012; Bosma i sur., 2021). Pandey i sur. (2015) pokazali su da se *M. tuberculosis* ne može dijeliti unutar makrofaga ako joj nedostaju dva prijenosnika iona Mn^{2+} . Jedan od njih je ABC prijenosnik nazvan MntABCD, a drugi bakterijski prijenosnik kationa nalik na NRAMP (engl. *natural resistance-associated macrophage proteins*), nazvan MntH. Kodiraju ih operon *mntABCD* i gen *mntH*, čiju ekspresiju kontrolira MntR, u starijoj literaturi poznat kao SirR (engl. *staphylococcal iron regulator repressor*). On ima središnju ulogu u održavanju homeostaze iona Mn^{2+} (Chandrangsu, Rensing i Helmann, 2017). U uvjetima niske unutarstanične koncentracije kationa dominira apo-oblik proteina. Kad unutarstanična koncentracija postane visoka, dominira holo-oblik, koji na sebi ima vezane ione Mn^{2+} . On se tada može vezati na određene sljedove u DNA i tako blokirati transkripciju gena zaduženih za unos iona Mn^{2+} (slika 1). Osim operona *mntABCD* i gena *mntH*, postoji niz gena na čiju ekspresiju utječe (Pandey i sur., 2015). Pokazalo se da MntR također veže komponente toksin-antitoksin sustava (Yang i sur., 2014), te njegova prekomjerna ekspresija čini bakteriju otpornijom na različite izvore stresa (Yan i sur., 2017).



Slika 1. MntR kontrolira ekspresiju operona *mntABCD* i gena *mntH*, koji kodiraju za membranske prijenosnike zadužene za unos iona Mn^{2+} . Kad koncentracija iona Mn^{2+} u stanici poraste, kemijska ravnoteža pomakne se od neaktivnog, apo-MntR oblika prema aktivnom, holo-MntR obliku. Djelujući kao transkripcijski represor, holo-MntR blokira ekspresiju spomentih membranskih prijenosnika. Slika ilustrira rezultate Pandey i sur. (2015) te je izrađena za potrebe ovog rada u programu *Photoshop CC* (Adobe, 2019).

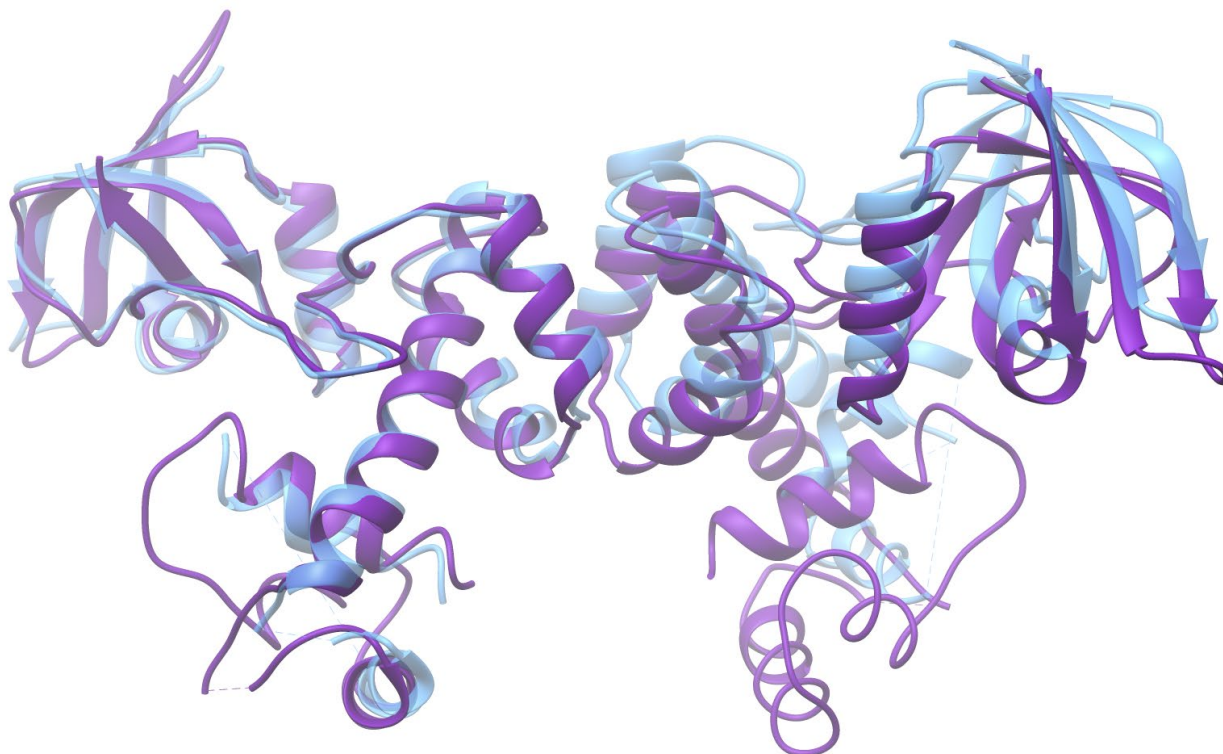
1.3. Trodimenzionalna struktura proteina MntR iz *Mycobacterium tuberculosis*

MntR iz *M. tuberculosis* sastoji se od tri domene: N-terminalne domene s motivom zavojnica-okret-zavojnica (engl. *helix-turn-helix*, HTH), središnje dimerizacijske domene i C-terminalne FeoA (engl. *ferrous iron transport protein A*) domene (slika 2). HTH domena stupa u izravni kontakt s DNA, stoga je poznata i kao DNA-vezujuća domena (Cong i sur., 2018). Alfa-zavojnica je najčešći strukturni element za prepoznavanje dušičnih baza. Motiv HTH čine dvije α -zavojnice povezane kratkim slijedom aminokiselina. Druga od tih zavojnica ulazi u veliki utor DNA, gdje stupa u interakciju s dušičnim bazama i šećerno-fosfatnom okosnicom. Kut pod kojim druga zavojnica ulazi u veliki utor određen je ostatakom domene u kojoj se HTH motiv nalazi (Garvie i Wolberger, 2001). Dimerizacijska domena brojnim hidrofobnim interakcijama osigurava snažno vezanje dva protomera u dimer (Cong i sur., 2018). FeoA domena nekad je bila poznata kao domena nalik na SH3 (engl. *SRC Homology 3 domain*) (Haswell i sur., 2013). Uloga u proteinu MntR još joj nije razjašnjena. Od tri domene sastoji se i IdeR iz iste bakterije, a postoje i MntR proteini u drugim bakterijama kojima FeoA domena nedostaje, kao što je MntR iz bakterije *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835). U proteinu MntR iz *M. tuberculosis* dimerizacijsku domenu i FeoA domenu povezuje velika omča na pozicijama 141-163. Još jedno obilježje tog proteina je nekoliko dodatnih aminokiselinskih ostataka ispred HTH domene (pozicije 1-11) nepoznate uloge (Cong i sur., 2018).



Slika 2. Domene od kojih se sastoji protein MntR iz *M. tuberculosis*. Prikazana je kristalna struktura holo-oblika koju su riješili Cong i sur. (2018). Velika fleksibilna omča koja povezuje dimerizacijsku i FeoA domenu obojana je svjetloružičasto, a ioni Mn^{2+} obojani su crveno. Struktura je vizualizirana pomoću programa *UCSF Chimera* (Pettersen i sur., 2004).

U usporedbi kristalnih struktura apo- i holo-oblika, uočava se da su protomeri u holo-obliku rotirani oko osi okomite na dodirnu površinu dimerizacijskih domena, zbog čega su dvije HTH domene međusobno bliže nego u apo-strukturi (slika 3). Ovo čini konformaciju povoljnijom za vezanje na DNA. Kad se uspoređi monomer apo-oblika s monomerom holo-oblika, RMSD (engl. *root mean square deviation*) vrijednost iznosi svega 0,96 Å, što znači da su vrlo slični (Cong i sur., 2018).



Slika 3. Superpozicija kristalnih struktura apo- (plava) i holo-oblika proteina MntR (ljubičasta). U odnosu na apo-oblik, holo-oblik pokazuje rotaciju desnog protomera koja rezultira približavanjem DNA-vezujućih zavojnica u HTH domenama. Crtkane linije označavaju nedostajuće aminokiselinske ostatke. Strukture su vizualizirane pomoću programa *UCSF Chimera* (Pettersen i sur., 2004).

1.4. Vezanje manganovih(II) kationa za MntR

Regulacija koncentracije iona esencijalna je za preživljavanje organizama, stoga se postavlja pitanje kako se osigurava vezanje odgovarajućeg kationa za njegov pripadni metalosenzor. U slučaju kada su polipeptidi fleksibilni i ne pružaju sterički uvjetovanu selektivnost prema metalima, afinitet za dvovalentne metalne katione dobro opisuje Irving-Williamsov niz, gdje su kationi poredani po smanjenju radijusa, povećanju elektrostatskog efekta i povećanju elektronskog afiniteta, efekta polarizacije ili kovalencije (Mg^{2+} , $Ca^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$). Vidljivo je da kompleksi s ionima Mn^{2+} pokazuju relativno nisku stabilnost.

Međutim, odstupanje od ovog niza nije neobična pojava *in vivo*. Regulirana je koncentracija iona u užoj okolini proteina, a i sami proteini mogu pokazivati selektivnost na temelju konformacije. Iz ovog razloga korisno je istražiti struktura obilježja metal-vezujućih mjesta biofizičkim metodama (Irving i Williams, 1948; da Silva i Williams, 2001; Waldron i Robinson, 2009). Smatra se da je selektivnost proteina MntR prema ionima Mn^{2+} između ostalog određena sastavom i geometrijom metal-vezujućih mjesta, budući da se mjesno-specifičnom mutagenezom može proširiti raspon iona koje veže (Guedon i Helmann, 2003).

MntR može vezati tri kationa. Postoji primarno mjesto vezanja, na koje se veže jedan kation, i sekundarno mjesto vezanja, na koje se vežu dva kationa (označena s A i B), stvarajući binuklearni klaster. Primarno mjesto vezanja nalazi se na kontaktnoj površini između HTH domene i dimerizacijske domene. Koordiniraju ga bočni ogranci Asp16, Glu109, Glu112, His113, karbonilna skupina Glu109 te molekula vode. Sekundarno mjesto nalazi se u brazdi koju stvaraju tri domene. Kationi u sekundarnom mjestu u kristalu udaljeni su oko 3,08 Å, a premošćuje ih molekula vode. Ion Mn^{2+} A koordiniraju bočni ogranci His86, Glu90, His105 i Asp170. Ion Mn^{2+} B koordiniraju bočni ogranci Glu90, Asp133, His135, Asp137 (Cong i sur., 2018). Srodni proteini, kao što su MntR iz *B. subtilis* i IdeR iz *M. tuberculosis*, pokazuju kooperativno vezanje iona Mn^{2+} (Chou i sur., 2004; Golynskiy i sur., 2006). Prema modelu Chou i sur. (2004), vezanje za prvo vezno mjesto uzrokuje dimerizaciju, a vezanje za drugo vezno mjesto potpuno aktivira protein za vezanje na DNA. S obzirom na to da je za članove DtxR/MntR obitelji uobičajeno da vežu samo jedan ili dva kationa, postavlja se pitanje nosi li mogućnost vezanja trećeg kationa neku prednost. Jedna od hipoteza je da je to adaptacija na nutritivnu imunost domaćina, zbog koje je korisno da se proteinu oteža prelazak u potpuno aktivni DNA-vezujući oblik i posljedično blokiranje unosa Mn^{2+} (Cong i sur., 2018).

1.5. Predviđanje strukture proteina modelom *AlphaFold 2*

Cong i sur. (2018) riješili su strukturu proteina MntR iz *M. tuberculosis* primjenom kristalografije X-zraka. Međutim, u dobivenom modelu nedostaju neki aminokiselinski ostatci. Primjerice, prvih je 11 ostataka uklonjeno jer je njihova fleksibilnost ometala kristalizaciju proteina, a nedostaju i neki ostatci u unutrašnjosti lanaca. Model se može nadopuniti aminokiselinskim ostacima pomoću alata kao što je *SWISS-MODEL* (Waterhouse i sur., 2018). Odnedavno je moguće i vrlo pouzdano predviđanje cjelovite trodimenzionalne strukture

proteina isključivo na temelju aminokiselinskog slijeda. Neki raniji pokušaji rješavanja ovog problema oslanjali su se na biofizičke simulacije proteina, a drugi na bioinformatičke metode. Puno uspješnijim pokazao se pristup koji integrira fizikalne i biološke spoznaje o proteinima, kakav koristi *AlphaFold 2* (Jumper i sur., 2021).

AlphaFold 2 temelji se na nadziranom strojnom učenju, gdje se model strojnog učenja prvo trenira tako da pokuša predvidjeti strukture koje su već poznate. Cilj treniranja je učiniti model sposobnim da predviđa nove, dosad neviđene strukture. Konkretno, kod modela *Alphafold 2* radi se o dubokom učenju, vrsti strojnog učenja koja se temelji na tzv. neuronskim mrežama. Najjednostavnija neuronska mreža sastoji se od tri dijela koja se zovu ulazni, skriveni i izlazni sloj (engl. *input, hidden and output layer*). Skrivenih slojeva često ima više i u njima se podaci intenzivno obrađuju. Osim u predviđanju strukture proteina, neuronske mreže uspješne su u još nizu kompleksnih zadataka, primjerice procesiranju slika i jezika. Od baza podataka, *AlphaFold 2* koristi i genetičke i strukturne. Predviđanje koordinata atoma u 3D prostoru temelji se na homologiji ulazne sekvence s drugim proteinima i na već riješenim trodimenzionalnim strukturama. Ovakav pristup imao je veliku korist od rasta baza podataka na koje se oslanja (James i sur., 2013; Kuhlman i Bradley, 2019; Jumper i sur., 2021). Primjerice, baza podataka *Protein Data Bank* (PDB) već je 2018. godine sadržavala preko 144 000 riješenih struktura, što je dvostruko više nego 2010. (wwPDB consortium, 2019). Isti trend uočava se i u drugim znanostima, stoga je u prošlom desetljeću znatno porasla popularnost neuronskih mreža (James i sur., 2013).

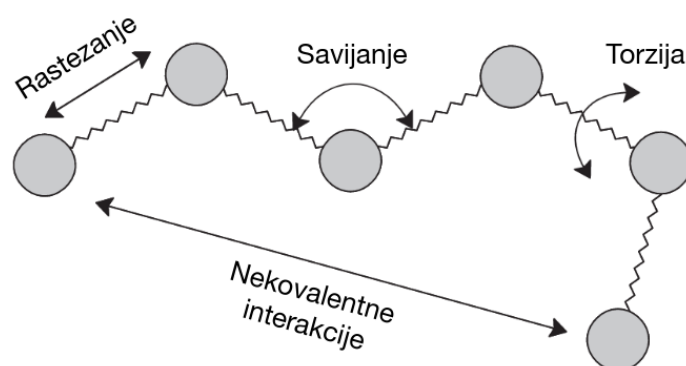
1.6. Računalne simulacije biomolekula

Računalne metode za istraživanje biomolekula mogu se podijeliti na empirijske i kvantno-mehaničke. Empirijske metode temelje se na klasičnoj mehanici, gdje se atomi u molekuli mogu zamisliti kao kuglice, a veze između njih kao opruge. Osnovne jedinice u ovim metodama su atomi, što znači da elektroni nisu uključeni kao zasebne čestice. Kvantno-mehanički model bliži je stvarnosti, ali također podrazumijeva kompleksnije i računalno zahtjevnije izračune. Po potrebi, ove dvije skupine metoda mogu se kombinirati (Jensen, 2017).

U ovom će radu biti korištene empirijske metode, još poznate kao metode polja sila i metode molekulske mehanike. Polje sila čine funkcional i parametri. Funkcional omogućava računanje steričke energije konformacije molekule, a parametri su konstante i ravnotežne

vrijednosti varijabli. Energija polja sila može se zapisati izrazom (1), gdje E_{str} predstavlja funkciju energije za rastezanje veze između dva atoma, E_{bend} za savijanje u ravnini, E_{oop} za savijanje izvan ravnine, E_{tors} za torziju, rotaciju oko veze, E_{vdw} i E_{el} za nekovalentne interakcije između atoma, a E_{cross} predstavlja mješovite članove, koji su posljedica toga da prethodno spomenuti članovi utječu jedni na druge (slika 4). U srži metoda temeljenih na polju sila je činjenica da čak i vrlo različite molekule imaju strukturno slične gradivne jedinice. Primjerice, duljine i vibracije istezanja C-H veza gotovo su iste u svim molekulama. Ovo se svojstvo zove prenosivost (engl. *transferability*). Razlike postaju još i manje ako se uzme u obzir tip atoma, npr. je li riječ o sp^3 -, sp^2 - ili sp -ugljiku. Polja sila sadrže parametre za različite tipove atoma, koji su dobiveni u kalibracijskim studijama. Oni se primjenjuju na istraživani sustav u procesu parametrizacije (Jensen, 2017).

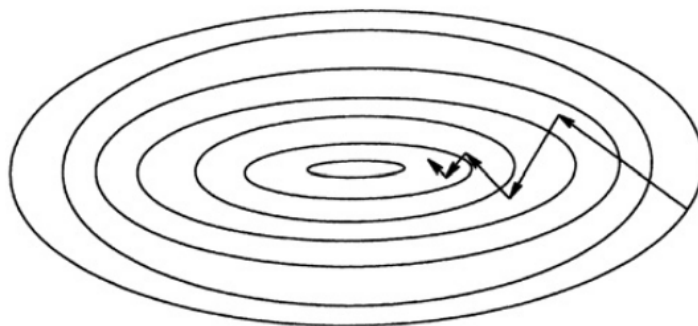
$$E_{FF} = E_{str} + E_{bend} + E_{oop} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross} \quad (1)$$



Slika 4. Shematski prikaz komponenti energije polja sila: rastezanje, savijanje, torzija i nekovalentne interakcije. Preuzeto i prilagođeno prema Jensen (2017), uz dozvolu izdavača. Autorska prava (2017), Wiley.

Važno je napomenuti da energija polja sila nema izravno fizikalno značenje. Osnovna svrha razvoja prvih polja sila bila je da se ona koriste za optimizaciju molekulske geometrije. Kako bi se našla optimalna konformacija, istražuje se konformacijski prostor i uspoređuju se energije pronađenih konformacija. Ovu potragu najlakše je objasniti na primjeru gdje postoji samo jedna dimenzija: dvoatomnoj molekuli kojoj treba odrediti optimalnu duljinu veze. Prvo se odabere neka duljina, a zatim se ona promijeni, npr. skрати za $0,2 \text{ \AA}$. Ako se energija smanji, u sljedećem se koraku nastavi sa skraćivanjem, a u suprotnom se duljina produlji. Ovaj se proces ponavlja određen broj puta. U slučaju više dimenzija, ne pomiče se u smjeru jedne koordinate, već u smjeru najvećeg pada energije s obzirom na sve koordinate. Taj je smjer suprotan smjeru

vektora gradijenta (Cramer, 2004). Optimizacija je općeniti pojam za pronalazak stacionarne točke funkcije, tj. točke gdje je prva derivacija jednaka nuli, što može biti lokalni maksimum ili minimum. U ovom radu tražit će se lokalni minimum i to metodama najstrmijeg spusta i konjugiranih gradijenata. U metodi najstrmijeg spusta provodi se niz evaluacija funkcije gdje se radi linijska pretraga suprotno smjeru vektora gradijenta (slika 5). Kad se funkcija počine povećavati, minimum se može odrediti kao interpolacija između izračunatih točaka. U točki interpolacije ponovno se računa gradijent, koji se koristi za sljedeću pretragu. Smjer pretrage tada je okomit na prethodni. Mana ovog pristupa je da brzina konvergencije pada čim je minimum bliže, tj. prilazi mu brzinom koja se u svakom koraku smanjuje. Glavna uloga mu je brzi pronalazak povoljne početne točke za naprednije algoritme koji slijede. Metoda konjugiranih gradijenata je modifikacija metode najstrmijeg spusta, u kojoj smjerovi uzastopnih koraka nisu okomiti, već konjugirani. Prednost mu je da lakše dolazi do konvergencije nego metoda najstrmijeg spusta (Jensen, 2017).



Slika 5. Shematski prikaz minimizacije metodom najstrmijeg spusta. Preuzeto od Jensen (2017), uz dozvolu izdavača. Autorska prava (2017), Wiley.

Uobičajeno je da simulacije molekulske dinamike započinju uravnoteženjem ili ekvilibracijom. Uravnoteženje čini vremenski period tijekom kojeg se sustav može relaksirati i zauzeti realističniju konfiguraciju od one koja je dobivena samo optimizacijom geometrije. Pritom postoje različiti protokoli. Postoji tzv. *NVT* ansambl, u kojem se broj čestica, volumen i temperatura održavaju konstantnima, dok u *NPT* ansamblu to vrijedi za broj čestica, tlak i temperaturu (Cramer, 2004). Nakon uravnoteženja slijedi produkcijska faza, u kojoj se sustav prati kroz određeni vremenski period. Molekulskom dinamikom simulira se ponašanje stvarnog sustava na određenoj temperaturi. Posljedica temperature je kinetička energija atoma u molekuli, čime ona zauzima niz različitih konformacija u simulacijskom vremenu. Njihov skup naziva se trajektorija simulacije (engl. *trajectory*). Molekulska dinamika temelji se na ergotskoj hipotezi, koja pretpostavlja da je vremenski prosjek stanja jedne čestice ekvivalentan prosjeku

stanja velikog broja čestica u bilo kojoj točki u vremenu. Poželjno je da simulacije budu čim dulje, kako bi se dobila čim bolja predodžba sustava s velikim brojem čestica (Jensen, 2017).

1.7. Molekulsko uklapanje

Osim samog proteina, predmet interesa često je njegov kompleks s drugom molekulom. No, eksperimentalno dobivena struktura kompleksa često nije dostupna. U ovakvim slučajevima može se koristiti molekulsko uklapanje (engl. *docking*). U njemu je cilj pozicionirati jednu molekulu uz drugu na energetski optimalan način. Ako su te molekule protein i DNA, radi se o tzv. protein-DNA molekulskom uklapanju, a uz njega se često koriste protein-protein i protein-ligand uklapanje. Temelj molekulskog uklapanja je funkcija za bodovanje (engl. *scoring function*), koja u obzir uzima nevezne interakcije te se može parametrizirati na temelju eksperimentalnih podataka. Zadatak te funkcije je po energiji rangirati različite poze (engl. *pose*), skupove međumolekulskih translacijskih i rotacijskih varijabli. Smatra se da ne postoji univerzalno točna funkcija za bodovanje, a razvoj novih aktivno je područje istraživanja (Lengauer i Rarey, 1996; Jensen, 2017).

2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je razjasniti strukturna i dinamička obilježja proteina MntR iz *M. tuberculosis* koja omogućuju njegovo vezanje za DNA. U tu svrhu pripremit će tri sustava koja će podvrgnuti simulacijama molekulske dinamike: apo- i holo-MntR te kompleks MntR-DNA. Usporedit će dinamička svojstva proteina u različitim sustavima i analizirati njegove nekovalentne interakcije s DNA, što bi trebalo dati uvid u mehanizam vezanja. DNA iz kompleksa sadržavat će MntR-vezujući slijed ispred gena *mntH*. Prije ovog istraživanja taj slijed nije bio poznat, stoga će ga pronaći primjenom bioinformatičkih i eksperimentalnih metoda. Trodimenzionalnu strukturu kompleksa dobit će *in silico*, metodom molekuskog uklapanja.

3. Materijal i metode

3.1. Bioinformatičko predviđanje veznih sljedova transkripcijskog faktora

Za predviđanje MntR-vezujućeg slijeda u promotoru gena *mntH* koristila sam *FIMO* iz *MEME Suite* skupa bioinformatičkih alata (verzija 5.5.5; Bailey i sur., 2015). Program *FIMO* traži dvije ulazne datoteke: datoteku *meme* formata s matricom frekvencija baza na svakoj poziciji u slijedu (engl. *position frequency matrix*), te *fasta* datoteku genomske regije u kojoj se traži slijed. Matricu frekvencija napravila sam na temelju 37 potencijalnih MntR-vezujućih motiva prema Pandey i sur. (2015), koristeći funkciju *consensusMatrix* iz *R* paketa *Biostrings* (verzija 2.72.0; Pagès i sur., 2024). Motiv sam tražila u promotorskoj sekvenci ispred gena *mntH*, kako su ju definirali Pandey i sur. (2015). Uz pomoć algoritma *blastn* (Altschul i sur., 1997) pronašla sam njezine koordinate u genomu *M. tuberculosis* soja H37Rv (NC_000962.3) iz baze podataka *RefSeq* (Tatusova i sur., 2016), 1031652-1031853, i preuzela slijed nukleotida u *fasta* formatu. Normalizirala sam podatke s obzirom na raspodjelu baza u sljedovima koristeći Markovljev pozadinski model trećeg reda. Pritom sam koristila program *fasta-get-markov*, također jedan od *MEME Suite* alata. Kao ulaznu *fasta* datoteku unijela sam 1378 računalno predviđenih 60-mernih promotorskih sljedova iz *M. tuberculosis* H37Rv preuzetih iz baze podataka *CDBProm* (Martinez i sur., 2024). Za eksperimentalnu provjeru odabrala sam motiv koji je izdvojen kao najbolje vezno mjesto (engl. *best site*) po statističkoj značajnosti. Pomoću funkcije *findPalindromes* iz *R* paketa *Biostrings* tražila sam nesavršene palindrome, s parametrom *max.mismatch=1*.

3.2. Nativna elektroforeza kompleksa proteina i nukleinske kiseline (EMSA)

Otopina izoliranog proteina MntR podrijetlom od bakterije *M. tuberculosis* nabavljena je od Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju Instituta Ruđer Bošković (Zagreb, Hrvatska), a kemijski sintetizirana 30-merna dvolančana DNA od tvrtke *Macrogen Europe* (Amsterdam, Nizozemska). Slijed joj glasi *cacgTTCCCGGGGTCGACGTAGGCGAtggc*, gdje mala slova predstavljaju produžetke, a velika slova potencijalni MntR-vezujući slijed pronađen prema potpoglavlju 3.1.

Za provjeru vezanja proteina MntR za oligonukleotid koristila sam metodu EMSA (engl. *electrophoretic mobility shift assay*). Kao elektrodni pufer (engl. *running buffer*) koristila sam

TB pufer (10,8 g Tris, 5,5 g B(OH)₃, 62,5 mL glicerol, dodan Milli-Q® H₂O do 1250 mL; pH 7,6). Titrirala sam ga klorovodičnom kiselinom (HCl), sterilno filtrirala vakuom pumpom i ekvilibrirala u kadici za elektroforezu na 100 V u trajanju od 45 min. Koristila sam komercijalni gel *Bio-Rad Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel* s gradijentom 4-15%. Pufere s uzorcima (engl. *sample buffer*) pripremila sam kako slijedi: 4 µL 5× pufera za vezanje (0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, 0,5 mg mL⁻¹ BSA, 25% glicerol, 5 mM DTT; pH 7,6), 2 µL MnCl₂ (40 mM), 0,5 µL DNA (100 µM), 10 µL otopine izoliranog proteina te Milli-Q® H₂O dodan da volumen smjese iznosi ukupno 20 µL. Inkubacija je trajala 15 min na temperaturi od 25 °C, nakon čega sam provela elektroforezu pri naponu od 100 V, u trajanju od 1 h. Za nju sam koristila *Bio-Rad™ Mini-PROTEAN® Tetra Cell* aparaturu i uređaj za napajanje *Bio-Rad™ Power-Pac™ Basic Power Supply*. Napravila sam klasičnu izvedbu metode EMSA, gdje se prati pokretljivost nukleinske kiseline. U svrhu bojanja nukleinskih kiselina na gelu, inkubirala sam ga u etidijevom bromidu (EtBr) 15 min. Za vizualizaciju gela koristila sam uređaj *SynGene G:Box EF-E*.

3.3. Priprema trodimenzionalnih modela biomolekula i molekulske uklapanje

Za izradu potpunog modela proteina MntR koristila sam *ColabFold* (verzija 1.5.3; Mirdita i sur., 2022), mrežnu implementaciju modela *AlphaFold 2* (Jumper i sur., 2021). Modelirala sam homodimernu strukturu na temelju slijeda aminokiselinskih ostataka proteina MntR iz *M. tuberculosis* iz baze podataka *UniProt* (pristupni kod: I6Y1Q2). Za daljnji rad odabrala sam strukturu kojoj je dodijeljen najviši rang. Budući da je izlazna datoteka modela *AlphaFold 2* uvijek protein bez liganada, naknadno sam dodala ione Mn²⁺ i aminokiseline koje ih koordiniraju koristeći program *UCFS Chimera* (verzija 1.17.3; Pettersen i sur., 2004). Kao predložak sam koristila strukturu holo-MntR-a s tri iona Mn²⁺ po monomeru koja je prethodno dobivena u sklopu istog projekta.

DNA sljedove iz potpoglavlja 3.2. izgradila sam u programu *Catana* (verzija 1.2.0; Kuťák i sur., 2022), u dvolančanom obliku i B-DNA konformaciji. Radi povoljnijeg smještanja proteina na palindromske sljedove, oligomer sam skratila s jednog kraja i produžila s drugog: TTCCCGGGGTCGACGTAGGCGAtggccg. Protonacija je provedena u programskom paketu *Amber 22*. Za molekulske uklapanje proteina i DNA koristila sam mrežni poslužitelj *pyDockDNA* (Rodríguez-Lumbreras i sur., 2022). Koristila sam funkciju za bodovanje *PyDockDNA (nodesolv)*, tj. funkciju koja ne uključuje desolvaciju. Molekulske uklapanje

provela sam tako da je protein stupao u kontakt samo s nukleotidima prisutnima u slijedu korištenom u metodi EMSA.

3.4. Parametrizacija, optimizacija geometrije i molekulska dinamika

Za simulacije molekulske dinamike koristila sam programski paket *Amber22* (Case i sur., 2022). Za parametrizaciju DNA korištila sam polje sila *OL15*, a za parametrizaciju proteina *ff14SB*. U sva tri sustava (apo-MntR, holo-MntR i MntR-DNA) eksplicitno sam dodala molekule vode s aproksimacijom dipolnog momenta (model *TIP3P*). Za model otapala koristila sam periodične rubne uvjete u kocki brida duljine 20 Å.

Provedena je minimizacija (optimizacija geometrije) u pet koraka za sva tri sustava (apo-MntR, holo-MntR, MntR-DNA). Svaki je ciklus trajao 1000 koraka, od kojih je prvih 200 provedeno metodom najstrmijeg spusta, a preostalih 800 metodom konjugiranih gradijenata. U prvom ciklusu optimizirala sam koordinate molekula otapala i pritom ograničila promjene koordinata proteina ili kompleksa primjenom harmonijskog potencijala s konstantom sile od $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. U drugom ciklusu spomenuto sam ograničenje primijenila na sve atome i ione proteina ili kompleksa osim atoma vodika. U trećem ciklusu primijenila sam isto ograničenje, ali na sve atome okosnica proteina ili kompleksa. Četvrti ciklus bio je isti kao treći, samo što je konstanta sile iznosila $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. U petom ciklusu nisam primijenila nikakva ograničenja.

Nakon minimizacija slijedila su dva uravnoteženja (ekvilibracije). Prvo uravnoteženje (NVT) provela sam pri konstantnom volumenu i temperaturi od 310 K (37 °C) te je trajalo 300 ps. Silom od 32 pN ograničeno je kretanje atoma proteina ili kompleksa. Drugo uravnoteženje (NPT) provela sam pri konstantnom tlaku i temperaturi od 310 K (37 °C) te je trajalo 200 ps, pri čemu nisam primijenila ograničenje kretanja atoma. U oba slučaja koristila sam algoritam Langevinovog termostata. Produkcijaska faza trajala je 200 ns za sve sustave. U njoj je također temperatura bila 310 K (37 °C) i primijenjen je Langevinov termostat.

3.5. Analiza trajektorije i izrada mape elektrostatskog potencijala

Za klaster analizu konformacija proteina MntR u različitim sustavima koristila sam programski paket *GROMACS* (Abraham i sur., 2015). Odabrala sam metodu *gromos*, koja koristi RMSD vrijednost kao kriterij sličnosti. RMSD je mjera prosječnog odstupanja atomskih koordinata

konformacije u odnosu na referentnu, u ovom slučaju početnu strukturu u simulaciji. Analizirala sam svaki deseti isječak (engl. *frame*).

Analize navedene u sljedećem odlomku radila sam pomoću programa *cpptraj* iz programskog paketa *Amber22* (Case i sur., 2022). RMSD vrijednost računala sam za atome proteinske okosnice (C-atom karboksilne skupine, α -C i N-atom iz amino-skupine). RMSF vrijednost (engl. *root mean square fluctuation*) je mjera fluktuacije i slična je RMSD-u, samo što predstavlja vremenski prosjek po aminokiselinskom ostatku. Udaljenost DNA-vezujućih zavojnica (aminokiselinski ostatci 46-58) računala sam kao udaljenost njihovih geometrijskih centara. Preko aminokiselinskih ostataka s kojima počinju i završavaju te zavojnice definirala sam i dihedralni kut (slika P1 u poglavlju *Prilozi*). Otvorenost protomera definirala sam kao kut između dva vektora koja izlaze iz centra mase dimerizacijske domene. Jedan je završavao u centru mase HTH domene, a drugi u centru mase FeoA domene. Vodikove veze tražila sam pomoću funkcije *hbond*. U njoj su vodikove veze definirane po geometrijskim kriterijima: maksimalna dozvoljena udaljenost iznosila je 3 Å, a minimalni dozvoljeni kut 135°. Interakcije π - π između aromatskih aminokiselina i dušičnih baza također sam određivala na temelju geometrijskih kriterija. Promatrala sam Tyr66 u oba protomera i njemu najbliža tri bazna para. Izračunala sam centar mase aromatskih prstena tirozinskog bočnog ogranka i dušičnih baza. Za interakciju naslagivanja (engl. *stacking*), njihova udaljenost trebala je biti maksimalno 5 Å. Zatim sam izračunala vektore normale između prstena. Da dođe do spomenute interakcije, kut između njih trebao bi biti u intervalu od 0° do 45°.

Površinski elektrostatski potencijal proteina holo-MntR računala sam pomoću mrežnih alata *PDB2PQR* i *APBS* (Jurrus i sur., 2018). Koristila sam *AMBER* polje sila i PDB datoteku konformacije koja je dobivena unutar simulacije holo-oblika i korištena za molekulsko uklapanje.

Za vizualizaciju biomolekula koristila sam programe *UCSF Chimera* (verzija 1.17.3; Pettersen i sur., 2004) i *VMD* (verzija 1.9.3; Humphrey, Dalke i Schulten, 1996). Za obradu slika (dodatak teksta i sl.) koristila sam program *Photoshop CC* (Adobe, 2019).

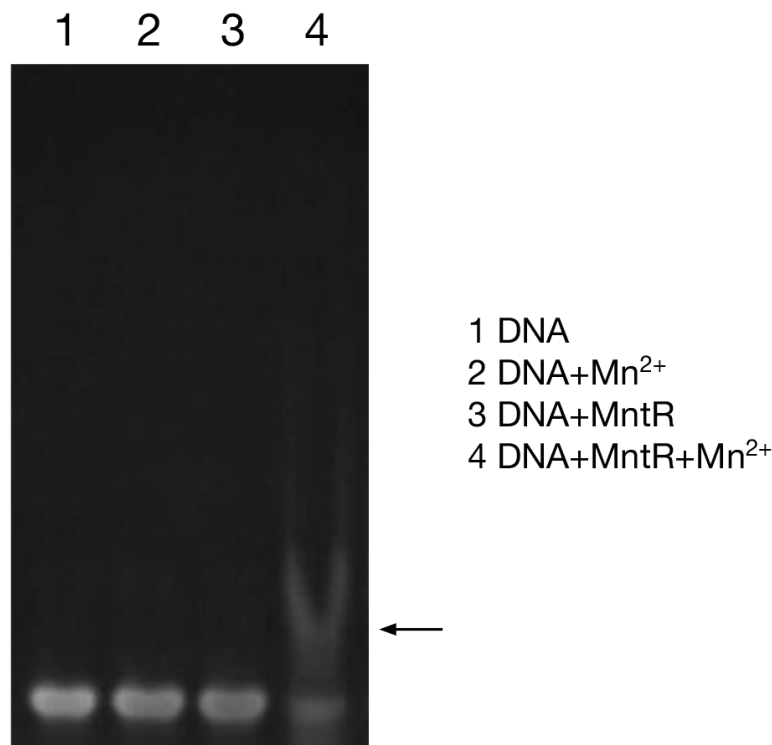
3.6. Statistička obrada i grafički prikaz podataka

Za statističku obradu i grafički prikaz podataka koristila sam programski jezik *R* (verzija 4.3.2; *R* Core Team, 2024) te *R* pakete *ggplot2* (verzija 3.5.0; Wickham, 2016) i *ggpubr* (verzija 0.6.0; Kassambara, 2023).

4. Rezultati

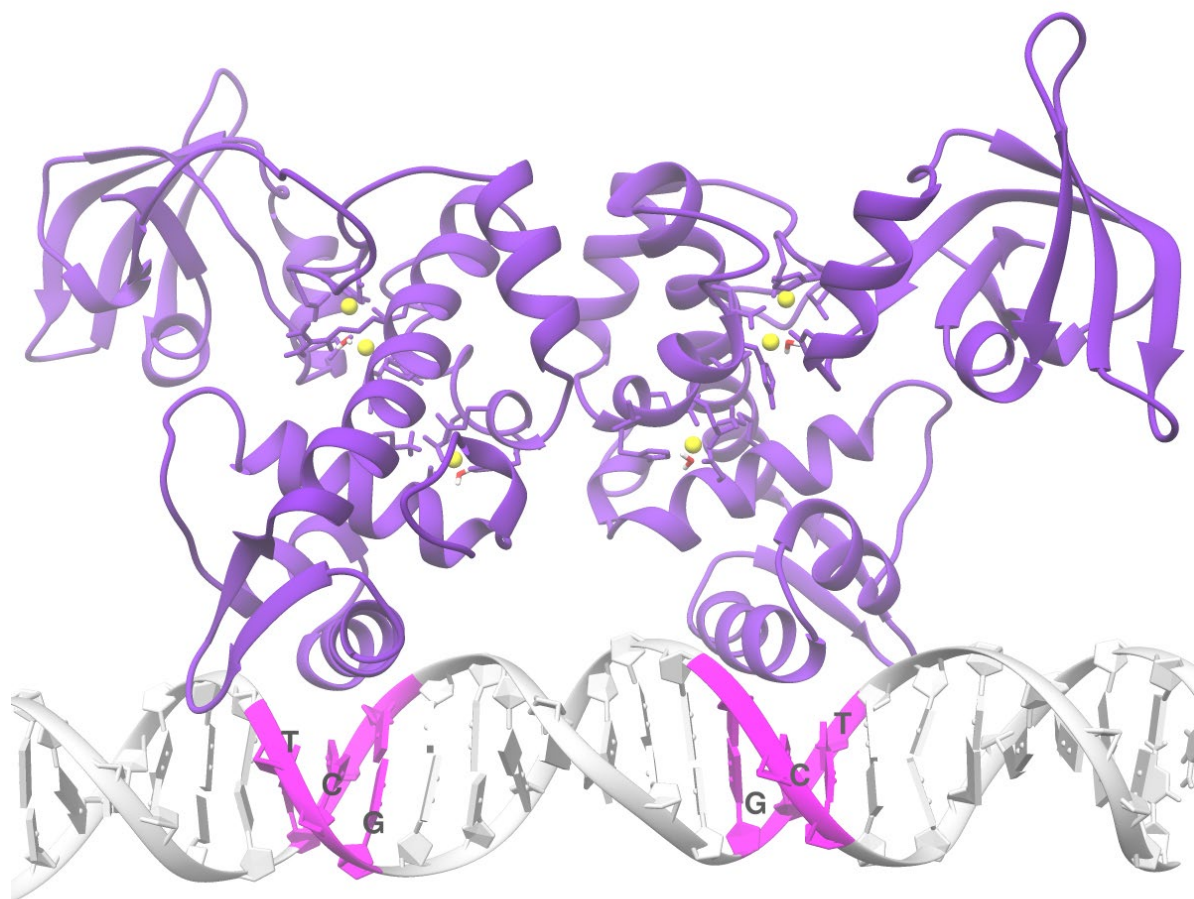
4.1. Vezno mjesto proteina MntR ispred gena *mntH*

Slijed unutar promotora gena *mntH* koji se najbolje poklapa s hipotetskim veznim sljedovima proteina MntR iz literature glasi TTCCCGGGGTCGACGTAGGCGA, a njegove koordinate u genomu *M. tuberculosis* soja H37Rv iznose 1031713-1031734. Slijed sadži više nesavršenih palindroma, a podcrtan je onaj čije su koordinate u modelu DNA optimalne za smještanje proteina MntR. Eksperimentalna provjera metodom EMSA pokazala je da se MntR zaista veže za njega i to isključivo u prisutnosti iona Mn^{2+} . Osim tog slijeda, bioinformatičkom analizom pronađeno je još sličnih u okolini, za koje nije provedena eksperimentalna provjera (tablica P1 u poglavlju *Prilozi*).



Slika 6. Rezultati provjere vezanja proteina MntR za oligonukleotid pronađen bioinformatičkim metodama. Provedena je klasična izvedba metode EMSA, u kojoj se na poliakrilamidnom gelu prati pokretljivost nukleinske kiseline. Strelica pokazuje mjesto na kojem DNA zaostaje, što je znak vezanja za protein.

Molekulskim uklapanjem napravljen je *in silico* kompleks holo-oblika proteina MntR s novootkrivenim veznim slijedom ispred gena *mntH*. DNA-vezujuće zavojnice pritom su pozicionirane u velike utore gdje se nalaze palindromski sljedovi (slika 7).

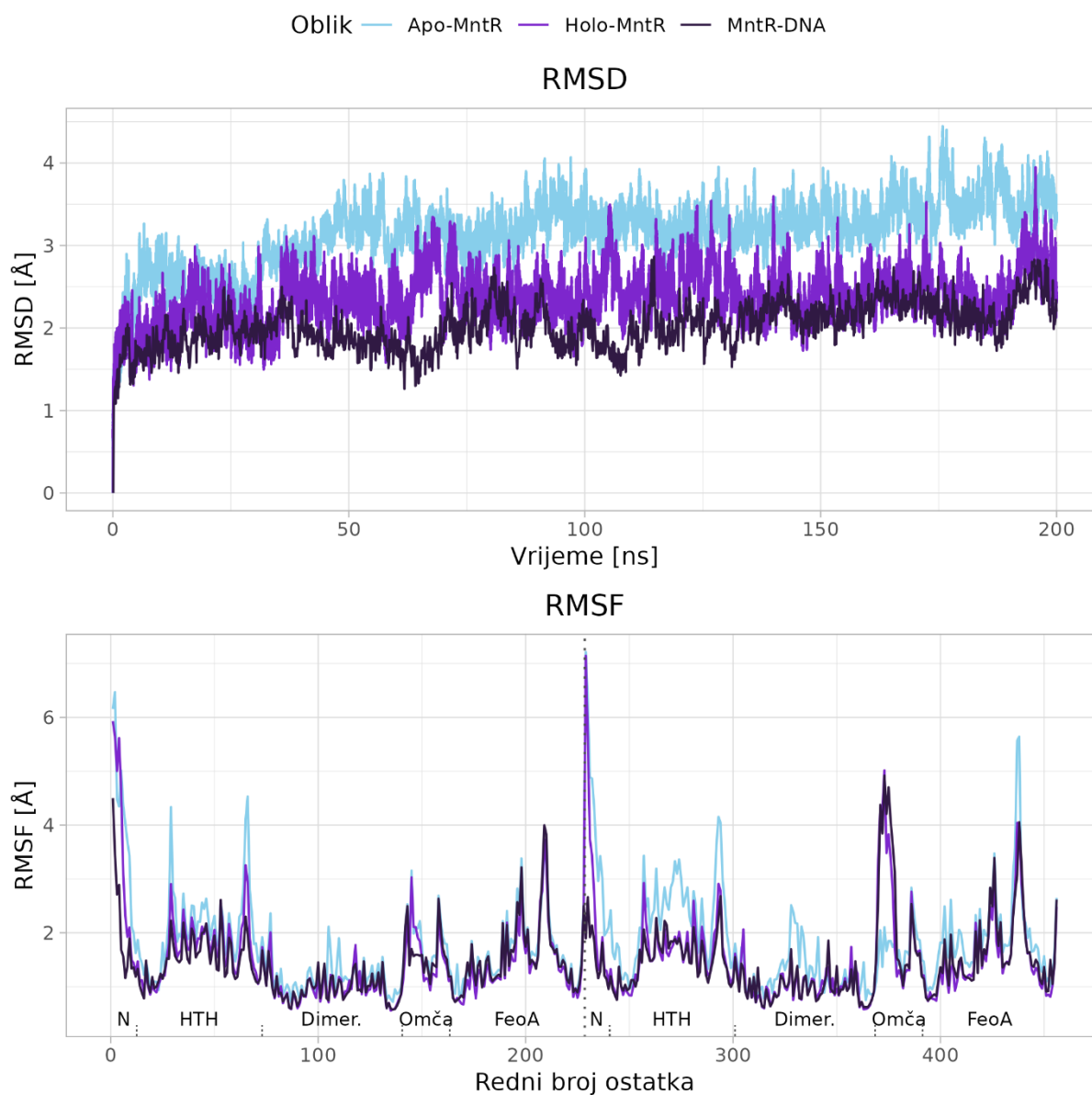


Slika 7. Kompleks proteina MntR s njegovim veznim slijedom ispred gena *mntH* nakon provedenog uravnoteženja. Ovo je bila početna struktura u produkcijskoj fazi koja je slijedila. Palindromski slijedovi označeni su rožom bojom, a baze su označene uz zavojnicu. Struktura je vizualizirana pomoću programa *UCSF Chimera* (Pettersen i sur., 2004).

4.2. Konformacijska analiza proteina MntR

U 200 ns simulacije, RMSD vrijednost iznosila je $3,2 \pm 0,41$ Å za apo-MntR, $2,4 \pm 0,32$ Å za holo-MntR i $2,0 \pm 0,28$ Å za kompleks MntR-DNA (slika 8, gore). RMSD vrijednost sustava apo-MntR relativno je brzo rasla u intervalu 25-50 ns, nakon čega se stabilizirala. U slučaju RMSF vrijednosti, u protomeru 2 uočavale su se veće razlike između apo-oblika i ostalih sustava nego što je bio slučaj u protomeru 1. Dimerizacijska domena pokazivala je najniže RMSF vrijednosti. Najveća razlika između apo- i holo-oblika bila je u omči koja povezuje dimerizacijsku domenu i FeoA domenu. Omča je više fluktuirala u holo-obliku, bez obzira na to je li bio slobodan ili vezan za DNA. Radilo se o aminokiselinskim ostatcima od 142 do 150. Obližnjim ostatcima koji koordiniraju ion Mn^{2+} , Asp133, His135 i Asp137, pridružene su niske RMSF vrijednosti. Najveće RMSF vrijednosti u apo- i holo-obliku postizao je nestrukturirani N-terminalni rep. U

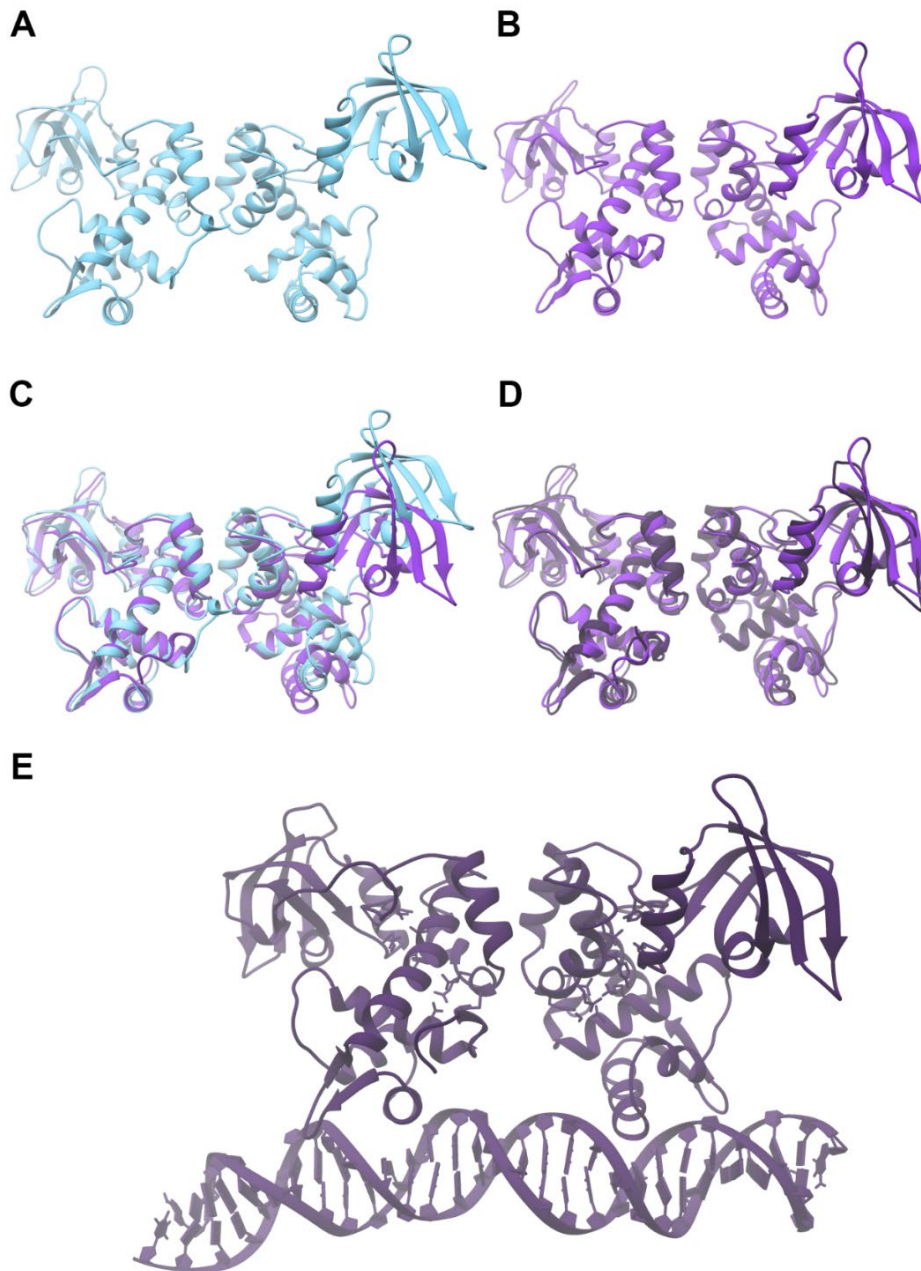
kompleksu, gdje je N-terminalni rep bio pozicioniran relativno blizu DNA, RMSF vrijednosti bile su mu niže.



Slika 8. Grafički prikaz RMSD vrijednosti kroz vrijeme i RMSF vrijednosti po aminokiselinskom ostatku za apo-MntR, holo-MntR i protein iz MntR-DNA kompleksa. Na grafu s RMSF vrijednostima iznad x -osi označeni su dijelovi proteina: N-terminalni rep (N), HTH domena (HTH), dimerizacijska domena ($Dimer.$), omča koja povezuje dimerizacijsku domenu s FeoA domenom ($Omča$) i FeoA domena ($FeoA$). Protomeri su razdvojeni točkanom vertikalnom linijom. Napomena: na ovom se prikazu aminokiselinski ostatci iz oba protomera zajedno numeriraju od 1 do 456. Rezultati su vizualizirani pomoću programskog jezika R (R Core Team, 2024).

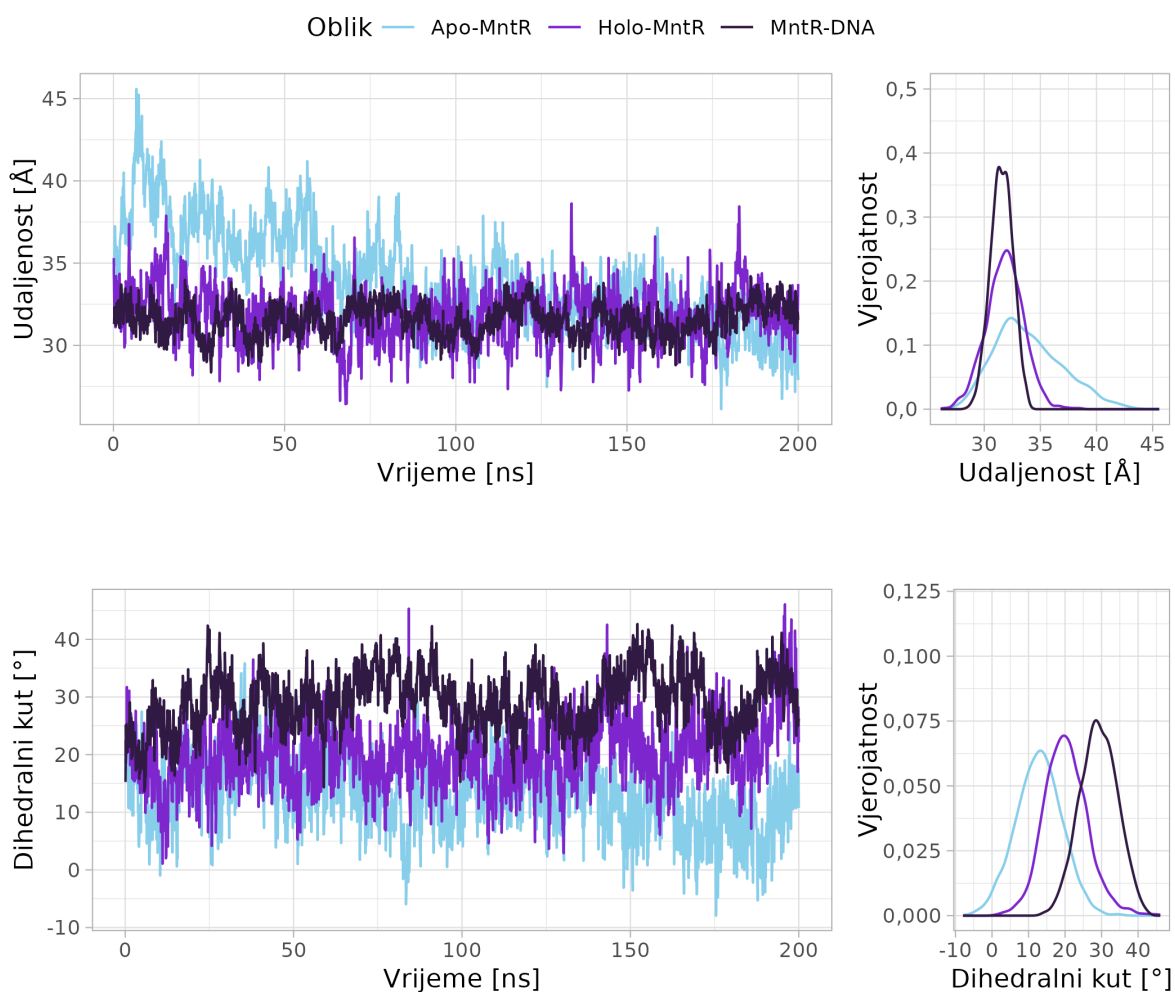
Provedena je klaster analiza konformacija proteina u svim sustavima pomoću algoritma *gromos*. Vizualizirane su konformacije reprezentativne za najnapučenije klustere (slika 9). Reprezentativna konformacija apo-oblika imala je nešto udaljenije DNA-vezujuće zavojnice od

one holo-oblika. Slobodni holo-oblik i holo-oblik iz kompleksa s DNA imali su vrlo slične reprezentativne konformacije. Optimalna granična RMSD vrijednost iznosila je 2,2 Å za apo- i holo-MntR i 2,0 Å za MntR-DNA kompleks. Zatim je uspoređivan broj klastera koje stvara protein u različitim sustavima na istoj graničnoj RMSD vrijednosti (1,8 Å). Apo-MntR stvarao je 99 klastera, slobodni holo-MntR 70, a holo-MntR u kompleksu s DNA 52.



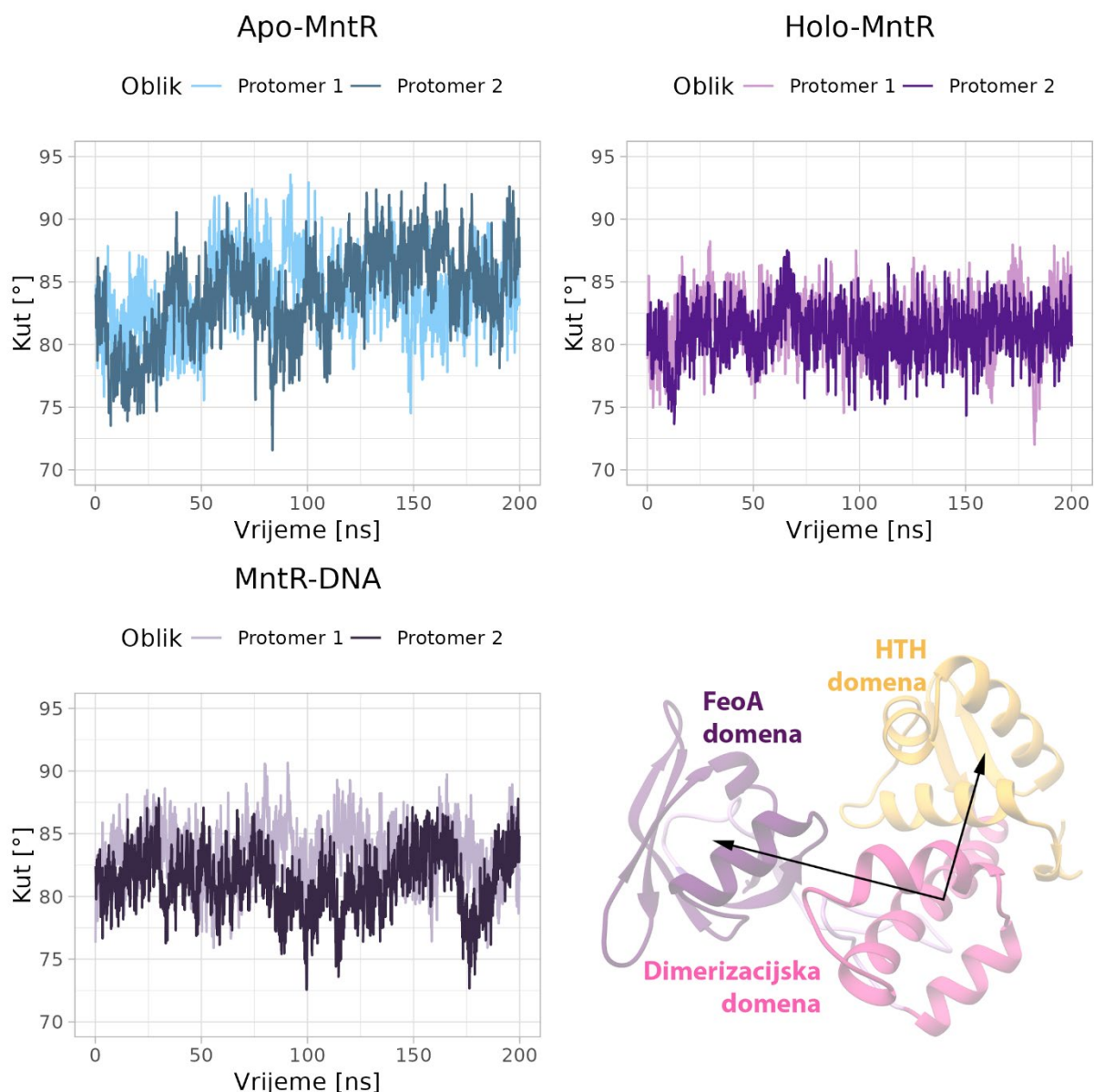
Slika 9. Reprezentativne konformacije proteina MntR u različitim sustavima. (A) Apo-MntR, (B) holo-MntR, (C) apo-MntR i holo-MntR u superpoziciji, (D) MntR iz MntR-DNA kompleksa (tamnoljubičasto) i slobodni holo-MntR u superpoziciji, (E) MntR-DNA kompleks trenutku kad je MntR zauzeo najzastupljeniju konformaciju. Ioni Mn^{2+} nisu prikazani. Strukture su vizualizirane pomoću programa *UCSF Chimera* (Pettersen i sur., 2004).

Geometrijska udaljenost između DNA-vezujućih zavojnica u HTH domeni iznosila je $34\pm 3,0$ Å u apo-obliku, $32\pm 1,7$ Å u holo-obliku i $32\pm 0,97$ Å u MntR-DNA kompleksu (slika 10, gore). U holo-obliku udaljenost je bila prilično stabilna kroz cijelo simulacijsko vrijeme, za razliku od apo-oblika. Kod njega je uočen veliki skok u udaljenosti na samom početku simulacije, čiji je vrhunac iznosio 46 Å, te je udaljenost kroz sljedećih 60 ns bila vidljivo veća nego u holo-obliku. Udaljenost DNA-vezujućih zavojnica u MntR-DNA kompleksu bila je dodatno ograničena u odnosu na slobodni holo-oblik. Na grafu funkcije gustoće vjerojatnosti jedino ona ima bimodalnu raspodjelu udaljenosti, iako se lokalni minimum ne razlikuje puno od lokalnih maksimuma koji ga okružuju. Dihedralni kut između DNA-vezujućih zavojnica, definiran prema slici P1 u poglavlju *Prilozi*, iznosio je $9,8\pm 7,6^\circ$ u apo-obliku, $23\pm 7,7^\circ$ u holo-obliku i $29\pm 5,1^\circ$ u MntR-DNA kompleksu (slika 10, dolje).



Slika 10. Grafički prikaz geometrijske udaljenosti DNA-vezujućih zavojnica (gore) i dihedralnog kuta između njih (dolje) u sustavima apo-MntR, holo-MntR i MntR-DNA. Lijevi grafovi prikazuju udaljenost odnosno kut kroz vrijeme, a desni pripadne funkcije gustoće vjerojatnosti. Rezultati su vizualizirani pomoću programskog jezika *R* (*R* Core Team, 2024).

Kut između domena HTH i FeoA, koji se koristio kao mjera otvorenosti konformacije, iznosio je $84\pm 3,3^\circ$ u apo-obliku, $81\pm 2,2^\circ$ u holo-obliku i $82\pm 2,6^\circ$ u MntR-DNA kompleksu (slika 11). Ovaj kut određuje udaljenosti HTH i FeoA domene, pri čemu veći kut znači veća udaljenost, te je zbog toga udaljenost domena davala gotovo iste trendove (slika P2 u poglavlju *Prilozi*). Udaljenost domena u apo-obliku iznosila je $31\pm 0,97 \text{ \AA}$, u holo-obliku $30\pm 0,72 \text{ \AA}$, a u MntR-DNA kompleksu $30\pm 0,88 \text{ \AA}$.



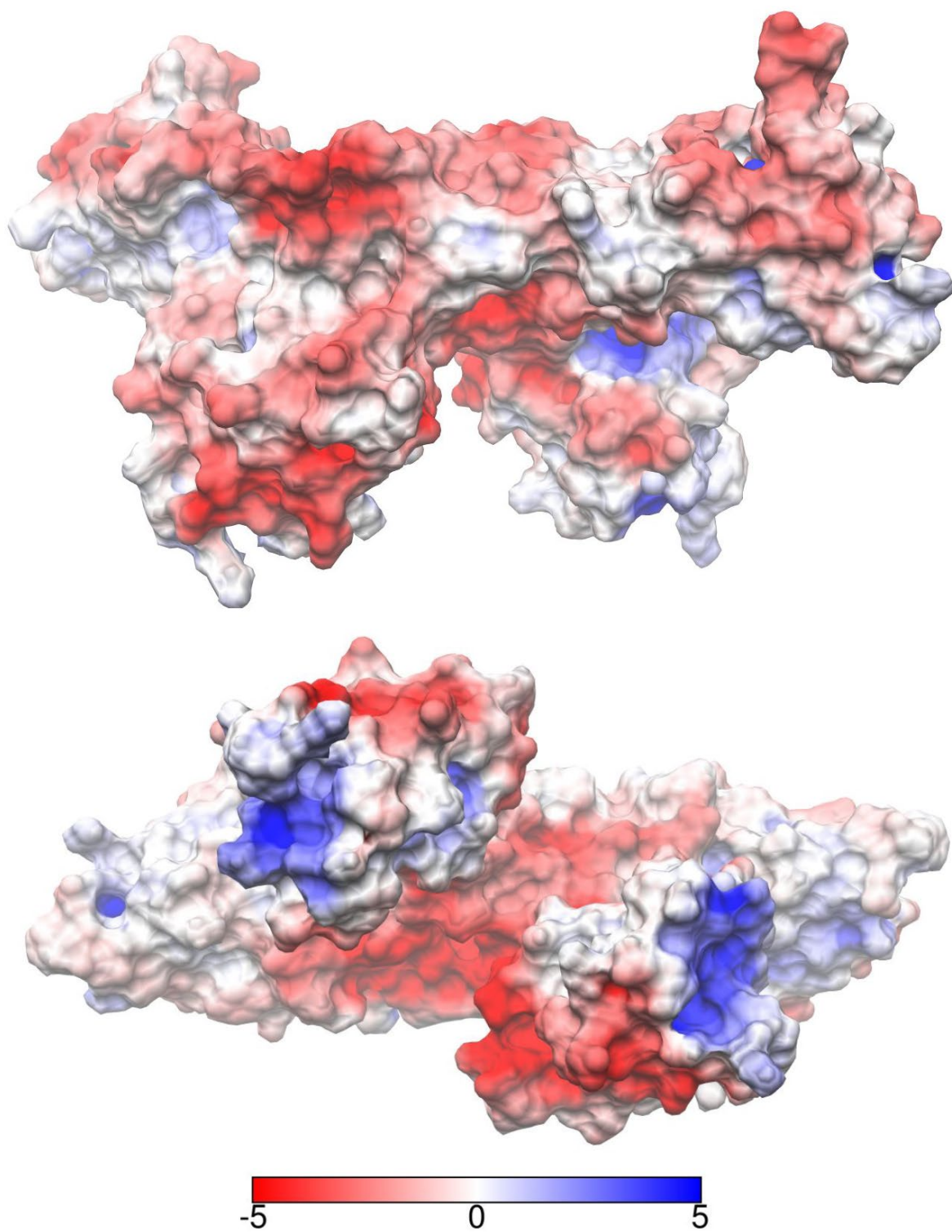
Slika 11. Grafički prikaz kuta između tri domene kroz vrijeme u oba protomera proteina MntR. Dolje desno je skicirano kako je kut računat: definirani su vektori koji izlaze iz centra mase dimerizacijske domene, pri čemu jedan završava u centru mase FeoA domene, a drugi HTH domene. Rezultati su vizualizirani pomoću programskog jezika *R* (*R Core Team, 2024*), a struktura je vizualizirana pomoću programa *UCSF Chimera* (*Pettersen i sur., 2004*).

4.3. Nekovalentne interakcije između proteina i DNA

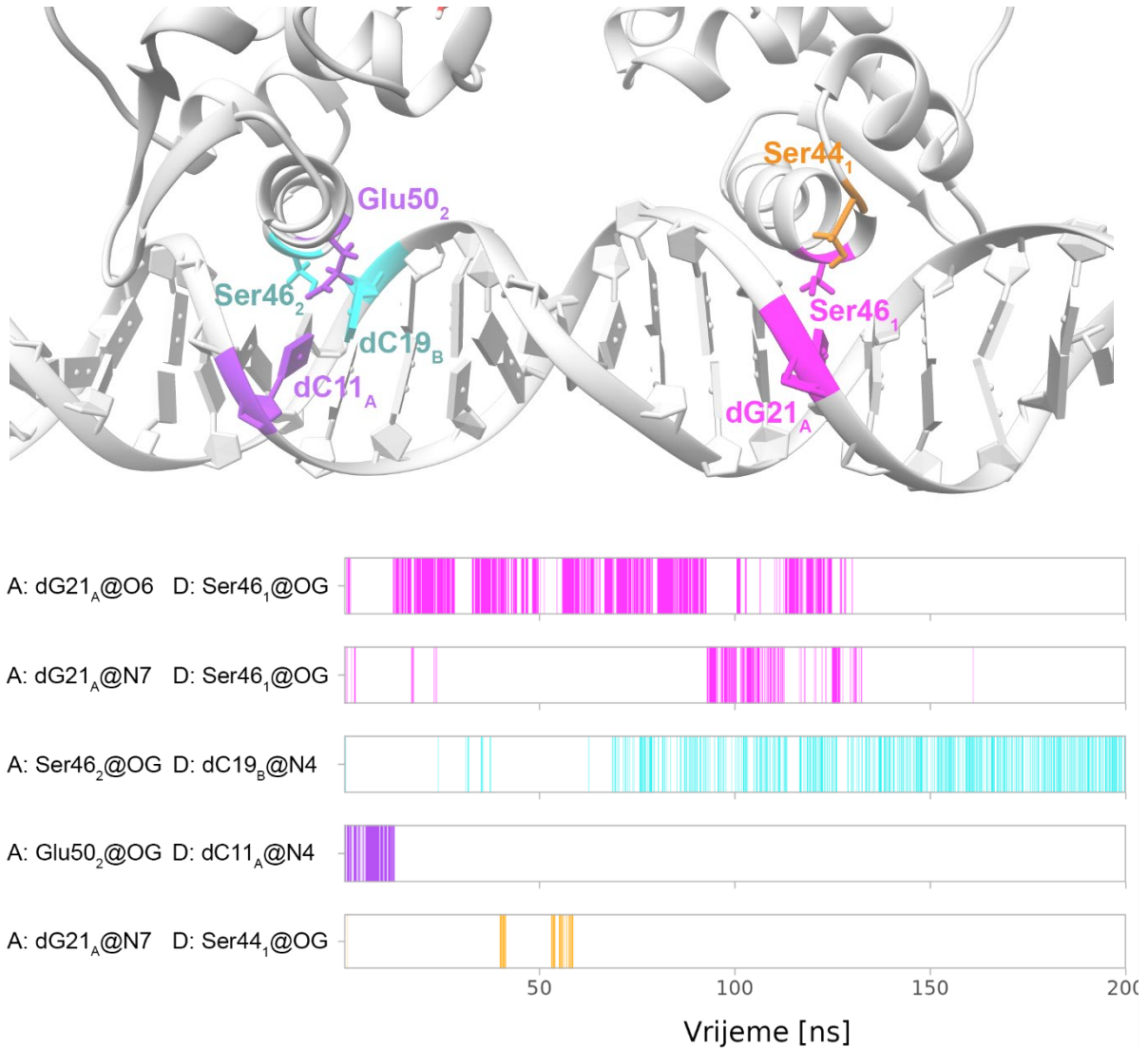
Elektrostatski potencijal površine proteina MntR analiziran je pomoću alata *APBS* (slika 12). Na površini proteina MntR vrijednosti su mu bile pretežno neutralne ili negativne. S druge strane, dio HTH domene koji inače ulazi u kontakt s DNA imao je pretežito pozitivan elektrostatski potencijal. Nakon toga je analiziran aminokiselinski sastav N-terminalnog repa, oko kojeg je uočen negativni potencijal. Njegov slijed glasio je MRADEEPGDLS. Od pet aminokiselinskih ostataka s nabijenim bočnim ograncima, njih su čak četiri bila negativno nabijena.

Četiri aminokiselinska ostatka stvarala su vodikove veze s dušičnim bazama: Ser46 u oba protomera (po protomeru će se označiti kao Ser46₁ i Ser46₂), Glu50 u protomeru 2 i Ser44 u protomeru 1 (slika 13). Hidroksilna skupina ostatka Ser46₁ bila je donor vodikove veze. Akceptor je bio dG21_A (A i B će predstavljati oznake lanaca DNA), u početku njegov O6 atom (ukupno 33% vremena), a zatim se krenuo izmjenjivati s N7 atomom (čini 9,1% vremena). Nasuprot tome, atom kisika iz hidroksilne skupine bočnog ogranka Ser46₂ bio je akceptor vodikove veze, a N4 atom iz nukleotidnog ostatka dC19_B donor. Ta je veza bila prisutna 25% vremena. Preostale dvije vodikove veze nisu bile toliko postojane. Glu50₂ bio je akceptor vodikove veze s dC11_A (5,0% vremena), a Ser44₁ donor vodikove veze s dG21_A (2,4% vremena). Vodikove veze sa Ser46₁ dominirale su prvih 130 ns, nakon čega su potpuno nestale. Kod Ser46₂ uočen je obrnuti trend: na početku nije bilo vodikove veze, a u zadnje dvije trećine simulacije bila je prisutna postojana vodikova veza. Barem jedna od veza s ostacima Ser46 bila je prisutna 53% simulacijskog vremena, a tek 10% tog vremena (5,2% ukupnog simulacijskog) bile su prisutne obje.

Bočni ogranak ostatka Tyr66 iz protomera 1 bio je prilično udaljen od DNA kroz cijelo simulacijsko vrijeme, ali to nije vrijedilo za Tyr66 iz protomera 2. Budući da je tirozin aromatska aminokiselina, provjereno je dolazi li do π - π interakcija s dušičnim bazama, ali nije detektirana niti jedna takva. Najmanja udaljenost centara mase aromatskih prstena Tyr66 i baze iznosila je 7,5 Å.



Slika 12. Mapa elektrostatskog potencijala proteina MntR u holo-obliku (pH=7,0). Izabrana je konformacija koja je dobivena unutar simulacije holo-oblika i korištena za molekulsko uklapanje. Na dnu se nalazi skala koja prikazuje elektrostatski potencijal u kT/e . Struktura je vizualizirana pomoću programa *UCSF Chimera* (Pettersen i sur., 2004).



Slika 13. Prikaz vodikovih veza koje su međusobno stvarali MntR i dušične baze u DNA. Gore je prikazan MntR-DNA kompleks na kojem su bojama označeni parovi ostataka između kojih su detektirane vodikove veze tijekom simulacije (ne nužno u trenutku koji je vizualiziran). Slovo A označava akceptora, a D donora. Dolje je prikazana njihova postojanost kroz vrijeme, gdje bijele linije pokazuju da vodikove veze nije bilo u danom trenutku, a obojane linije suprotno. Parovima ostataka dodijeljene su iste boje kao na gornjoj slici. Napomena: ostatak dG21_A označen je ružičasto, iako je kratko vrijeme stupao u interakciju sa Ser44₁, označenim narančasto. Rezultati su vizualizirani pomoću programskog jezika *R* (*R* Core Team, 2024), a struktura je vizualizirana pomoću programa *UCSF Chimera* (Pettersen i sur., 2004).

5. Rasprava

5.1. Vezanje transkripcijskog faktora MntR za slijed ispred gena *mntH*

Nukleotidni slijed ispred gena *mntH*, TTCCCGGGGTCGACGTAGGCGA (22 bp), identificiran je kao vezno mjesto proteina MntR. Molekularno uklapanje pokazalo je da je razmak između podcrtanih palindromskih sljedova optimalan da DNA-vezujuće zavojnice uđu u kontakt s njima. Zaključak da se MntR veže baš na njih donesen je na temelju činjenice da se srodni proteini također vežu za palindromske sljedove (Lieser i sur., 2003; Marcos-Torres i sur., 2021). Na poliakrilamidnom gelu uočeno je zaostajanje DNA koje potvrđuje vezanje za protein, i to isključivo uz prisutnost iona Mn^{2+} . Ovo je u skladu s rezultatima Pandey i sur. (2015) koji su napravili ovakvu provjeru za čitav promotor. Slijed je bogat GC parovima baza, kao i ostatak genoma *M. tuberculosis* (Cole i sur., 1998). Iz rada Pandey i sur. (2015) nije jasno kojom su metodom autori tražili vezne sekvence, osim što su naveli da je to napravljeno računalno. Postoji mogućnost da je motiv ispred *mntH* dosad ostao nepoznat zbog korištenja neprikladnih bioinformatičkih alata. U nekim starim pokušajima pronalaska veznih mjesta srodnih proteina (Marcela Rodriguez i sur., 1999) koristio se algoritam *BLAST* (Altschul i sur., 1997), ali on nije namijenjen za pronalazak veznih motiva transkripcijskih faktora. Njegov sustav bodovanja sekvenci prikladan je za, primjerice, istraživanje filogenije ili pronalazak genomskih koordinata poznatih sljedova. Alati kao što je *FIMO* (Bailey i sur., 2015), koji je korišten u ovom radu, u obzir uzimaju mogućnost da su neke pozicije u MntR-vezujućim motivima očuvanije od drugih, zbog čega su uspješniji u pronalasku relevantnih, ali naoko manje sličnih sljedova.

U bazi podataka PDB ne postoji eksperimentalno dobivena struktura kompleksa DNA s proteinom MntR iz *M. tuberculosis*, ali postoji struktura kompleksa koji stvara njemu srodan protein, IdeR, također iz *M. tuberculosis* (Wisedchaisri, Holmes i Hol, 2004). Zbog velike sličnosti u građi ovih proteina, kao i uobičajene uloge HTH motiva u transkripcijskim faktorima (Garvie i Wolberger, 2001), očigledno je da se MntR homodimer, baš kao i IdeR homodimer, na DNA veže tako da dvije zavojnice iz HTH domena ulaze u susjedne velike utore (Cong i sur. 2018). Uz to postoje naznake da se MntR veže na više mjesta unutar promotora gena *mntH*. U ovom je radu bioinformatičkom pretragom pronađen cijeli niz potencijalnih veznih sljedova, iako je EMSA provedena samo za jedan. Neki se nalaze u blizini eksperimentalno potvrđenog slijeda. Niti jedan slijed nije se statistički značajno poklapao s ulaznim sljedovima (minimalna

q -vrijednost iznosila je 0,65), ali treba imati na umu da q -vrijednost ne uračunava da je vezanje proteina MntR za promotor gena *mntH* već eksperimentalno potvrđeno, i u ovom radu, i u radu Pandey i sur. (2015). U prethodno spomenutoj kristalnoj strukturi IdeR-DNA kompleksa nalaze se dva homodimera vezana jedan blizu drugog. Smješteni su na suprotnim stranama DNA zavojnice i vezni sljedovi im se preklapaju. Nadalje, u bazi podataka PDB nedavno je objavljena struktura četiri homodimera proteina MntR iz *B. subtilis* vezanih za promotorski slijed gena *mneP* (Shi i sur., 2024). Dobivena je elektronskom mikroskopijom. Tamo su homodimeri vezani nešto drugačije nego u slučaju proteina IdeR: ne nalaze se jedan nasuprot drugom, već se nižu jedan za drugim, stvarajući zavojnicu oko DNA. Do i sur. (2019) istraživali su MtsR iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (Rosenbach 1884), koji ima FeoA domenu, za razliku od proteina MntR iz *B. subtilis*. Rezultati im ukazuju na to da MtsR homodimeri oligomeriziraju na DNA, pri čemu se međusobno vežu preko FeoA domena, što pospješuje aktivnost u regulaciji transkripcije. U ovom diplomskom radu predstavljen je jednostavan model MntR-DNA kompleksa, budući da postoji još mnogo nepoznanica o točnom načinu vezanja. Ako buduća istraživanja ukažu na drugačiji način vezanja, računalni i eksperimentalni pristupi koji su ovdje predstavljeni mogu biti osnova i za istraživanje kompleksnijih sustava. Za početak, moglo bi se provjeriti veže li se MntR za ostale bioinformatički predviđene sljedove.

5.2. Nekovalentne interakcije proteina MntR i DNA

Iako je detektirano da četiri aminokiselinska ostatka stvaraju vodikove veze, samo su se dvije pokazale postojanima u simulacijskom vremenu. Obje su uključivale isti ostatak, Ser46, ali u različitim protomerima. Za vezanje transkripcijskih faktora *in vivo* posebno važnom se smatra njihova specifičnost, sposobnost da razlikuju vlastite ciljne sekvence od njima sličnih. U prokariotskoj stanici (ili eukariotskoj jezgri) ima dovoljno DNA da transkripcijski faktori mogu gotovo uvijek biti vezani za nju, čak i u nedostatku mjesta visokog afiniteta (Stormo i Zhao, 2010). Vodikove veze se zbog svoje ovisnosti o geometriji često nameću kao nositelji te specifičnosti, ali u nekim ih kompleksima nema puno. Primjer toga je IdeR-DNA kompleks. U *M. tuberculosis* uočena je vodikova veza tek s jednim aminokiselinskim ostatkom (Gln43) (Ghosh, Chandra i Vishveshwara, 2015). Ovo je potaknulo istraživanje proteina IdeR iz bakterije *Saccharopolyspora erythraea* (Waksman 1923) u kojem se važnim pokazao mehanizam indirektnog čitanja (engl. *indirect readout*), gdje se protein u vezanju na pravi slijed nukleotida oslanja na oblik zavojnice, a ne na interakcije s dušičnim bazama. To je moguće jer

specifični obrasci parova baza određuju oblik zavojnice. Elektrostatski potencijal malog utora također se pokazao kao svojstvo koje razdvaja IdeR-vezujuće sljedove od ostalih (Marcos-Torres i sur., 2021). MntR možda koristi isti mehanizam, ne samo zbog malog broja postojanih vodikovih veza, nego i zato što ima vrlo sličnu građu kao IdeR.

Simulacije proteina IdeR dovele su do prijedloga dva modela vezanja za DNA. Prvi model kaže da je važno *sidro*, tj. snažno vezana DNA-vezujuća zavojnica koja regulira vezanje druge zavojnice. Drugi model kaže da jedan dimer potiče vezanje drugog dimera (Ghosh, Chandra i Vishveshwara, 2015). Što se tiče prvog modela, opisana asimetrija u vezanju za DNA stvarno se uočava kod različitih proteina iz DtxR/MntR obitelji, uključujući MntR iz *M. tuberculosis*. Vodikove veze u kojima sudjeluju Ser46₁ i Ser46₂ većinu simulacijskog vremena nisu bile prisutne istovremeno, stoga izgleda kao da se protein prvo *sidri* pomoću protomera 1, a zatim pomoću protomera 2. Nadalje, u *in silico* kompleksu DNA i proteina MntR iz *B. subtilis* uočeno je odvajanje proteina od DNA koje je kod jedne zavojnice bilo izraženije. Samo jedna zavojnica stvarala je vodikove veze s DNA, preko Ser177 (69% trajanja simulacije) i Thr143 (50% trajanja simulacije) (Batković, 2023). S obzirom na to da su navedena dva kompleksa dobivena *in silico*, može se postaviti pitanje je li uzrok tome to što protein nije namješten na DNA u idealnoj konformaciji. No, simulacija IdeR-DNA kompleksa temeljena na strukturi dobivenoj kristalografijom X-zraka pokazala je sličan rezultat. Štoviše, na temelju nje je taj model i predložen (Ghosh, Chandra i Vishveshwara, 2015). Moguće je da opisana pojava pomaže kompleksu da njegova stabilnost ostaje optimalna. MntR je vezan za protein, ali ne prečvrsto, što mu omogućava lakšu disocijaciju kao odgovor na smanjenje koncentracije iona Mn²⁺. Što se tiče drugog modela, u budućim istraživanjima bilo bi zanimljivo produjiti MntR-vezujući motiv ispred gena *mntH* i vidjeti mogu li se dva MntR homodimera vezati jedan nasuprot drugog. Zatim bi se mogla promatrati molekulska dinamika kompleksa s dva proteina. Razne nedoumice moglo bi razjasniti eksperimentalno rješavanje strukture MntR-DNA kompleksa.

DNA je polimer s negativno nabijenom šećerno-fosfatnom okosnicom (Nelson, Lehninger i Cox, 2008), stoga ne čudi da DNA-vezujuće dijelove HTH domene karakterizira pozitivni elektrostatski potencijal. Ovo se slaže s literaturnim podacima za srodne proteine, primjerice MntR iz *B. subtilis* (Batković, 2023; Jelić Matošević i sur., 2023) i MntR iz *Halalkalibacterium halodurans* (Nielsen i sur. 1995) (Knez i sur., 2024). Nešto je manje jasna uloga N-terminalnog slijeda. On je bogat negativno nabijenim aminokiselinama, zbog čega se

na prvi pogled čak čini da bi mogao ometati vezanje za DNA. Ipak, u eksperimentima provedenima u sklopu ovog rada nisu uočene poteškoće u vezanju proteina MntR na njegove ciljne sljedove. Osim vezanja na slijed ispred *mntH*, provedena je i provjera vezanja za poznati vezni slijed ispred *mntABCD*, koja je također imala pozitivan rezultat (slika P3 u poglavlju *Prilozi*). Valja napomenuti da je protein eksprimiran u bakteriji *Escherichia coli* (Migula 1895), stoga se ne može isključiti mogućnost da se N-terminalni rep u *M. tuberculosis* posttranslacijski odcjepljuje. Rezultati simulacija proteina MntR ne ukazuju ni na kakvu njegovu funkcionalnu ulogu. RMSF mu je niži u MntR-DNA kompleksu, ali jedini razlog tome najvjerojatnije je odbijanje od šećerno-fosfatne okosnice koje mu ograničava kretanje.

5.3. Mehanizam alosteričke regulacije proteina

Na početku simulacije uočena je velika razlika u udaljenosti DNA-vezujućih zavojnica između apo-MntR i holo-MntR oblika. Ovo je bilo u skladu sa simulacijama proteina ScaR iz *Streptococcus gordonii* (Kilian i sur. 1989) (Radman i sur., 2023). Udaljenost DNA-vezujućih zavojnica holo-ScaR oblika iznosila je 34 ± 2 Å, što su vrijednosti bliske onima koje je kroz simulacijsko vrijeme postizao holo-MntR. Međutim, udaljenost zavojnica u apo-MntR obliku počela je padati i do kraja simulacije prestala se razlikovati od one holo-MntR oblika. Suprotno tome, kod proteina ScaR velika razlika u udaljenosti zadržala se do kraja simulacijskog vremena od 550 ns. Uz to, apo-ScaR dosezao je vrijednosti blizu 60 Å, a apo-MntR imao je maksimum od tek 46 Å. Apo-MntR je velike udaljenosti postizao na samom početku simulacije, prije nego što se stabilizirala RMSD vrijednost. Vjerojatno je bio u procesu konformacijske promjene, ali je naišao na energetska barijeru koju nije mogao prijeći, stoga se vratio u najstabilniju konformaciju koja mu je bila dostupna.

Prije istraživanja Radman i sur. (2023), Jelić Matošević i sur. (2023) proučavali su molekulska dinamiku proteina MntR iz *B. subtilis*. Slično simulacijama iz ovog rada, srednje vrijednosti udaljenosti DNA-vezujućih zavojnica bile su vrlo slične u apo-MntR i holo-MntR obliku. Međutim, treba napomenuti da je u njihovim simulacijama srednja udaljenost bila neobično velika za holo-oblik koji bi se trebao vezati u susjedne velike utore DNA. Predložili su da mehanizam alosteričke regulacije vezanja za DNA nije nalik na sklopku gdje postoje aktivna i neaktivna konformacija, već vezanje iona Mn^{2+} samo smanjuje konformacijski prostor, što favorizira DNA-vezujuće konformere. Smanjenje konformacijskog prostora

potvrdili su klaster analizom gdje je apo-oblik imao veći broj klastera od holo-oblika. Isto je uočeno ovdje, u slučaju proteina MntR iz *M. tuberculosis*. To je u skladu s eksperimentalnim rezultatima Golynskiy i sur. (2007), koji navode da vezanje Mn^{2+} čini MntR iz *B. subtilis* rigidnijim. Uz to, Jelić Matošević i sur. (2023) naveli su da su konformacije dostupne holo-obliku također dostupne apo-obliku, samo što su njihovi klasteri manje napućeni. U ovom istraživanju uočena je slična stvar pri mjerenju udaljenosti i kuteva između sastavnih dijelova proteina. Iako je prilično jasno da apo-oblik ima širi konformacijski prostor, čini se da to nije dovoljno za alosteričku regulaciju. Ghosh, Chandra i Vishveshwara (2015) predstavili su model u kojem vezanje Fe^{2+} na IdeR iz *M. tuberculosis* stabilizira monomerne podjedinice, što potiče dimerizaciju. Prema ovome, stabilizirajući učinak iona Mn^{2+} na MntR možda ima važniju ulogu u dimerizaciji nego u vezanju za DNA. Nakon rezultata Radman i sur. (2023) mnogo je izglednije da su i MntR proteini regulirani mehanizmom sklopke, gdje vezanje iona Mn^{2+} uzrokuje konformacijsku promjenu koja smanjuje udaljenost DNA-vezujućih zavojnica, što im omogućava da uđu u susjedne velike utore. U slučaju proteina MntR iz *M. tuberculosis* i *B. subtilis*, ta konformacijska promjena nije uočena unutar simulacijskog vremena, što ne znači da se ne događa u stvarnosti. Jedno od mogućih rješenja je da se simulacija nastavi tako da se nakratko digne temperatura sustava, što bi omogućilo proteinu da prijeđe energetska barijeru i zauzme svoju realnu konformaciju.

Osim udaljenosti DNA-vezujućih zavojnica, mjeren je i dihedralni kut između njih. Na temelju rezultata za apo- i holo-MntR nema naznaka da taj geometrijski parametar ima ulogu u alosteričkoj regulaciji. Jelić Matošević i sur. (2023) dobili su drugačiji rezultat kod proteina MntR iz *B. subtilis*, gdje su se iznosi dihedralnih kuteva apo- i holo-oblika slabo preklapali. U ovom se radu niti otvorenost konformacije protomera nije pokazala važnom za razlikovanje apo-MntR i holo-MntR dimera. Ghosh, Chandra i Vishveshwara (2015) povezali su vezanje iona Fe^{2+} s približavanjem HTH i FeoA domena u IdeR monomerima. Također, u IdeR-DNA kompleksu, kut između domena bio je stabilniji kad je za IdeR bio vezan Fe^{2+} nego kad je bio uklonjen. S druge strane, razlike između homodimernih sustava proteina MntR bile su vrlo male. Promjene u udaljenosti HTH i FeoA domena detektirane su i u simulacijama proteina MntR iz *M. tuberculosis* iz literature. Na temelju njih identificirana je mreža nekovalentnih interakcija povezana s udaljenošću HTH i FeoA domene (Brajković, 2022).

6. Zaključak

Pronađen je novi MntR-vezujući slijed u promotoru gena *mntH* i provedena je računalna simulacija u kojoj su istražene njegove interakcije s DNA. DNA-vezujuće zavojnice proteina MntR pozicionirane su na njegove palindromske slijedove pomoću molekuskog uklapanja. U ovom radu predstavljen je jednostavan model MntR-DNA kompleksa, gdje je jedan homodimer vezan za kratki slijed. To predstavlja jedan od temeljnih koraka prema razumijevanju vezanja proteina MntR iz *M. tuberculosis* za DNA. Bioinformatička analiza i riješene strukture srodnih proteina pokazuju mogućnost kompleksnijih načina vezanja i multimeriziranja na promotoru ciljnih gena. No, ovakve komplekse teško je simulirati računalno ako ne postoji eksperimentalno dobivena struktura. Tijekom simulacijskog vremena detektirane su dvije postojeane vodikove veze između dušičnih baza u velikom utoru i DNA-vezujućih zavojnica u HTH domeni proteina. Obje su uključivale aminokiselinski ostatak Ser46, ali iz različitih protomera. Primijećeno je da se one uglavnom nisu pojavljivale u isto vrijeme. S obzirom na mali broj postojanih vodikovih veza i aktualna istraživanja srodnog proteina IdeR, ubuće bi se mogla razmotriti mogućnost da MntR svoja vezna mjesta prepoznaje prema obliku DNA zavojnice. Osim MntR-DNA kompleksa, istraženi su slobodni apo- i holo-MntR. U simulacijama apo-oblika proteina uočen je veliki skok u udaljenosti DNA-vezujućih zavojnica na početku simulacije. On je vjerojatno predstavljao početak konformacijske promjene koja nije bila provedena do kraja zbog prevelike energetske barijere. Holo-MntR je tijekom cijelog simulacijskog vremena održavao udaljenost DNA-vezujućih zavojnica povoljnom za njihov ulazak u velike utore. Konformacijska promjena koja mijenja udaljenost tih zavojnica i dalje se čini kao najizgledniji mehanizam alosteričke regulacije, iako je ta udaljenost u simulacijama apo- i holo-oblika uglavnom bila slična.

7. Literatura

1. Abraham, M.J. i sur. (2015) 'GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers', *SoftwareX*, 1, pp. 19–25. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
2. Adobe (2019) *Photoshop CC 2019*.
3. Altschul, S.F. i sur. (1997) 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp. 3389–3402. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
4. Bailey, T.L. i sur. (2015) 'The MEME Suite', *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp. W39–W49. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
5. Barczak, A.K. i sur. (2017) 'Systematic, multiparametric analysis of *Mycobacterium tuberculosis* intracellular infection offers insight into coordinated virulence', *PLOS Pathogens*, 13(5), p. e1006363. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006363>.
6. Batković, M. (2023) *Računalno istraživanje kompleksa DNA i MntR proteina iz bakterije Bacillus subtilis*. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet. Kemijski odsjek. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:725506>.
7. Bosma, E.F. i sur. (2021) 'Regulation and distinct physiological roles of manganese in bacteria', *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6), p. fuab028. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab028>.
8. Brajković, M. (2022) *Simulacije molekulske dinamike proteina MntR iz bakterije Mycobacterium tuberculosis*. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet. Biološki odsjek. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:005298>.
9. Capdevila, D.A., Edmonds, K.A. i Giedroc, D.P. (2017) 'Metallochaperones and metalloregulation in bacteria', *Essays in Biochemistry*. Edited by S.J. Lippard and J.M. Berg, 61(2), pp. 177–200. Dostupno na: <https://doi.org/10.1042/EBC20160076>.
10. Case, D.A. i sur. (2022) 'Amber 22'.
11. Chandrangu, P., Rensing, C. i Helmann, J.D. (2017) 'Metal homeostasis and resistance in bacteria', *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), pp. 338–350. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>.

12. Chou, C.J. i sur. (2004) 'Functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* iron-dependent regulator', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(51), pp. 53554–53561. Dostupno na: <https://doi.org/10.1074/jbc.M407385200>.
13. Cole, S.T. i sur. (1998) 'Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence', *Nature*, 393(6685), pp. 537–544. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/31159>.
14. Cong, X. i sur. (2018) 'Crystal structures of manganese-dependent transcriptional repressor MntR (Rv2788) from *Mycobacterium tuberculosis* in apo and manganese bound forms', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(2), pp. 423–427. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.005>.
15. Cramer, C.J. (2004) *Essentials of computational chemistry: theories and models*. Drugo izdanje. Chichester, West Sussex, England: Wiley.
16. Do, H. i sur. (2019) 'Metal sensing and regulation of adaptive responses to manganese limitation by MtsR is critical for group A streptococcus virulence', *Nucleic Acids Research*, 47(14), pp. 7476–7493. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz524>.
17. Garvie, C.W. i Wolberger, C. (2001) 'Recognition of Specific DNA Sequences', *Molecular Cell*, 8(5), pp. 937–946. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00392-6).
18. Ghosh, S., Chandra, N. i Vishveshwara, S. (2015) 'Mechanism of Iron-Dependent Repressor (IdeR) Activation and DNA Binding: A Molecular Dynamics and Protein Structure Network Study', *PLOS Computational Biology*, 11(12), p. e1004500. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004500>.
19. Golynskiy, M.V. i sur. (2006) 'Metal Binding Studies and EPR Spectroscopy of the Manganese Transport Regulator MntR', *Biochemistry*, 45(51), pp. 15359–15372. Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/bi0607406>.
20. Golynskiy, M. i sur. (2007) 'Conformational studies of the manganese transport regulator (MntR) from *Bacillus subtilis* using deuterium exchange mass spectrometry', *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(5), pp. 699–709. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0216-z>.
21. Gordon, S.V. i Parish, T. (2018) 'Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe', *Microbiology*, 164(4), pp. 437–439. Dostupno na: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000601>.

22. Guedon, E. i Helmann, J.D. (2003) ‘Origins of metal ion selectivity in the DtxR/MntR family of metalloregulators’, *Molecular Microbiology*, 48(2), pp. 495–506. Dostupno na: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03445.x>.
23. Guirado, E., Schlesinger, L.S. i Kaplan, G. (2013) ‘Macrophages in Tuberculosis: Friend or Foe’, *Seminars in immunopathology*, 35(5), pp. 563–583. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0388-2>.
24. Haswell, J.R. i sur. (2013) ‘Characterization of the Functional Domains of the SloR Metalloregulatory Protein in *Streptococcus mutans*’, *Journal of Bacteriology*, 195(1), pp. 126–134. Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/JB.01648-12>.
25. Hood, M.I. i Skaar, E.P. (2012) ‘Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface’, *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), pp. 525–537. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2836>.
26. Humphrey, W., Dalke, A. i Schulten, K. (1996) ‘VMD: visual molecular dynamics’, *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), pp. 33–38, 27–28. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
27. Irving, H. i Williams, R.J.P. (1948) ‘Order of Stability of Metal Complexes’, *Nature*, 162(4123), pp. 746–747. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/162746a0>.
28. James, G. i sur. (2013) *An introduction to statistical learning: with applications in R*. New York: Springer (Springer texts in statistics).
29. Jelić Matošević, Z. i sur. (2023) ‘Structural Dynamics of the *Bacillus subtilis* MntR Transcription Factor Is Locked by Mn²⁺ Binding’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), p. 957. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms24020957>.
30. Jensen, F. (2017) *Introduction to computational chemistry*. Treće izdanje. Chichester, West Sussex Hoboken, NJ Oxford: Wiley.
31. Jumper, J. i sur. (2021) ‘Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold’, *Nature*, 596(7873), pp. 583–589. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
32. Jurrus, E. i sur. (2018) ‘Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite’, *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(1), pp. 112–128. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/pro.3280>.
33. Kassambara, A. (2023) ‘ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots’. Dostupno na: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>.

34. Knez, A.M. i sur. (2024) ‘Allosteric mechanism of MntR transcription factor from alkalophilic bacterium *Halalkalibacterium halodurans*’, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), pp. 1–15. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/07391102.2024.2314265>.
35. Kuhlman, B. i Bradley, P. (2019) ‘Advances in protein structure prediction and design’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), pp. 681–697. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>.
36. Kuřák, D. i sur. (2022) ‘CATANA: an online modelling environment for proteins and nucleic acid nanostructures’, *Nucleic Acids Research*, 50(W1), pp. W152–W158. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac350>.
37. Lengauer, T. i Rarey, M. (1996) ‘Computational methods for biomolecular docking’, *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3), pp. 402–406. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(96\)80061-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(96)80061-3).
38. Lieser, S.A. i sur. (2003) ‘DNA-Binding and Oligomerization Studies of the Manganese(II) Metalloregulatory Protein MntR from *Bacillus subtilis*’, *Biochemistry*, 42(43), pp. 12634–12642. Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/bi0350248>.
39. Marcela Rodriguez, G. i sur. (1999) ‘Identification and characterization of two divergently transcribed iron regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*’, *Tubercle and Lung Disease*, 79(5), pp. 287–298. Dostupno na: <https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0219>.
40. Marcos-Torres, F.J. i sur. (2021) ‘The bacterial iron sensor IdeR recognizes its DNA targets by indirect readout’, *Nucleic Acids Research*, 49(17), pp. 10120–10135. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab711>.
41. Martinez, G.S. i sur. (2024) ‘CDBProm: the Comprehensive Directory of Bacterial Promoters’, *NAR Genomics and Bioinformatics*, 6(1). Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nargab/lqae018>.
42. Mirdita, M. i sur. (2022) ‘ColabFold: making protein folding accessible to all’, *Nature Methods*, 19(6), pp. 679–682. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.
43. Monfeli, R.R. i Beeson, C. (2007) ‘Targeting Iron Acquisition by *Mycobacterium tuberculosis*’, *Infectious Disorders - Drug TargetsDisorders*, 7(3), pp. 213–220. Dostupno na: <https://doi.org/10.2174/187152607782110031>.

44. Nelson, D.L., Lehninger, A.L. i Cox, M.M. (2008) *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
45. Pagès, H. i sur. (2024) 'Biostrings: Efficient manipulation of biological strings'. Dostupno na: <https://bioconductor.org/packages/Biostrings>.
46. Pandey, R. i sur. (2015) 'MntR(Rv2788): a transcriptional regulator that controls manganese homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*', *Molecular Microbiology*, 98(6), pp. 1168–1183. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/mmi.13207>.
47. Pettersen, E.F. i sur. (2004) 'UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis', *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
48. R Core Team (2024) 'R: A Language and Environment for Statistical Computing'. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
49. Radman, K. i sur. (2023) 'Structural and dynamical changes of the *Streptococcus gordonii* metalloregulatory ScaR protein induced by Mn²⁺ ion binding', *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, p. 127572. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127572>.
50. Rodríguez-Lumbreras, L.A. i sur. (2022) 'pyDockDNA: A new web server for energy-based protein-DNA docking and scoring', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, p. 988996. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.988996>.
51. Shi, H. i sur. (2024) 'The structure of 4 MntR homodimers bound to the promoter sequence of mneP'. Protein Data Bank. Dostupno na: <https://doi.org/10.2210/pdb9c4d/pdb>.
52. da Silva, F. i Williams, R.J.P. (2001) *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry Of Life*. Second.
53. Stormo, G.D. i Zhao, Y. (2010) 'Determining the specificity of protein–DNA interactions', *Nature Reviews Genetics*, 11(11), pp. 751–760. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/nrg2845>.
54. Tatusova, T. i sur. (2016) 'NCBI prokaryotic genome annotation pipeline', *Nucleic Acids Research*, 44(14), pp. 6614–6624. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
55. Waldron, K.J. i Robinson, N.J. (2009) 'How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?', *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), pp. 25–35. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2057>.

56. Waterhouse, A. i sur. (2018) ‘SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes’, *Nucleic Acids Research*, 46(Web Server issue), pp. W296–W303. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
57. Wickham, H. (2016) ‘ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis’. Dostupno na: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
58. Wisedchaisri, G., Holmes, R.K. i Hol, W.G.J. (2004) ‘Crystal Structure of an IdeR–DNA Complex Reveals a Conformational Change in Activated IdeR for Base-specific Interactions’, *Journal of Molecular Biology*, 342(4), pp. 1155–1169. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.083>.
59. World Health Organization (2023) *Global tuberculosis report 2023*.
60. wwPDB consortium (2019) ‘Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data’, *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D520–D528. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gky949>.
61. Yan, S. i sur. (2017) ‘Overexpression of Rv2788 increases mycobacterium stresses survival’, *Microbiological Research*, 195, pp. 51–59. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.007>.
62. Yang, M. i sur. (2014) ‘Characterization of the interaction between a SirR family transcriptional factor of *Mycobacterium tuberculosis*, encoded by Rv2788, and a pair of toxin–antitoxin proteins RelJ/K, encoded by Rv3357 and Rv3358’, *The FEBS Journal*, 281(12), pp. 2726–2737. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/febs.12815>.

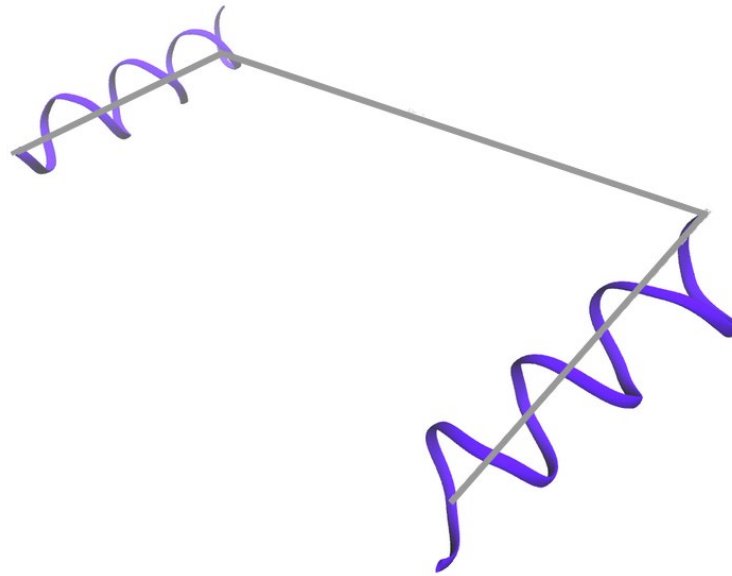
8. Životopis

Rođena sam 2. lipnja 2000. u Zaboku. Završila sam XV. gimnaziju u Zagrebu (2019) te preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (2022). Na istom fakultetu upisala sam i diplomski studij molekularne biologije, modul računalna biologija. Odradila sam stručne prakse na Institutu Ruđer Bošković (2022) te Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (2023, 2024). Tijekom studija sam također sudjelovala u pripremama učenika XV. gimnazije za Državno natjecanje iz biologije te sam volontirala na popularno-znanstvenim manifestacijama *Noć muzeja* i *Dan i noć na PMF-u*.

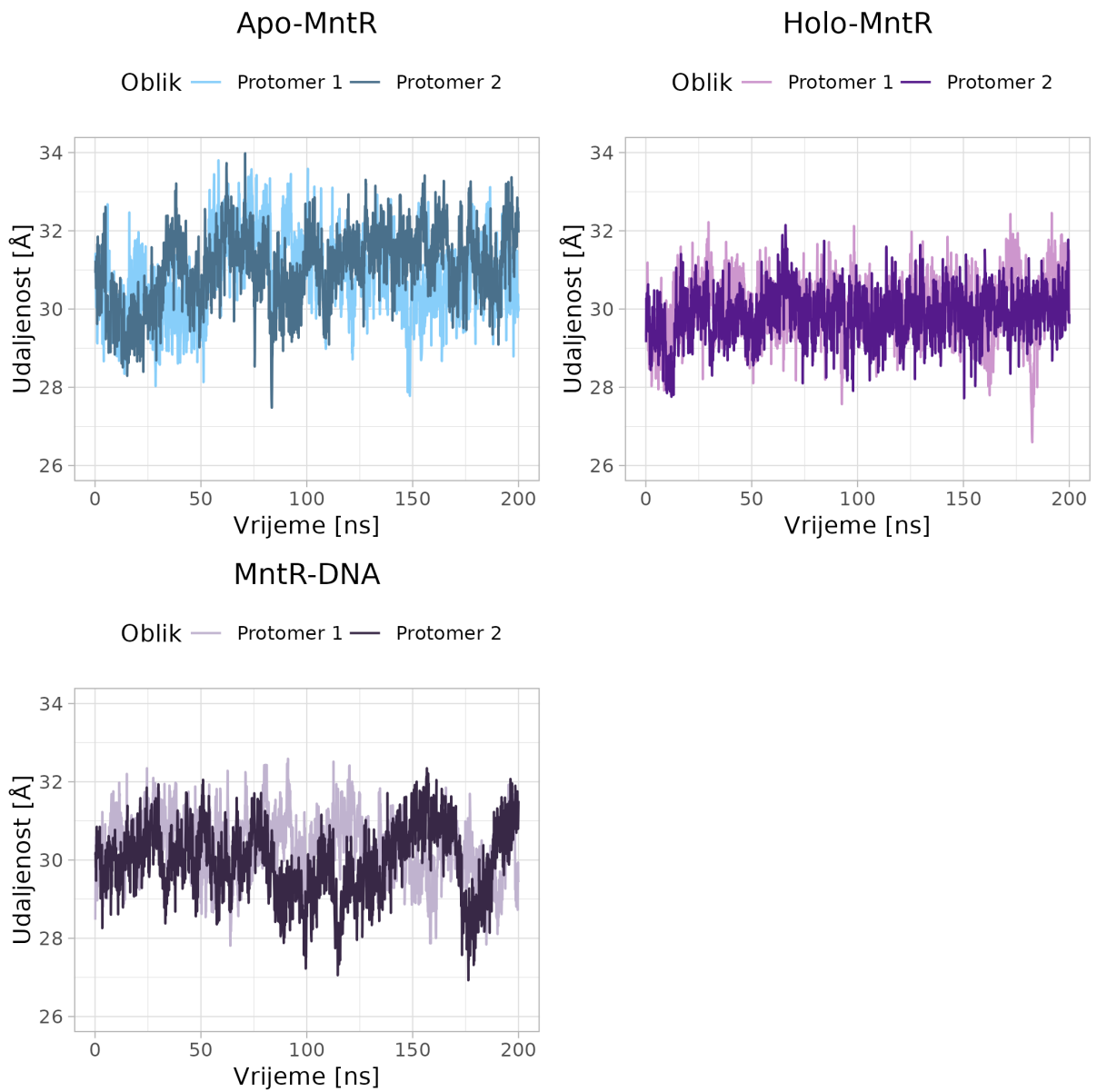
9. Prilozi

Tablica P1. Odabrani potencijalni vezni sljedovi proteina MntR iz *M. tuberculosis* dobiveni alatom *FIMO*. Prikazana su tri sljeda (od njih 10) koji imaju istu *q*-vrijednost kao prvi, za koji je eksperimentalno potvrđeno da se MntR veže na njega.

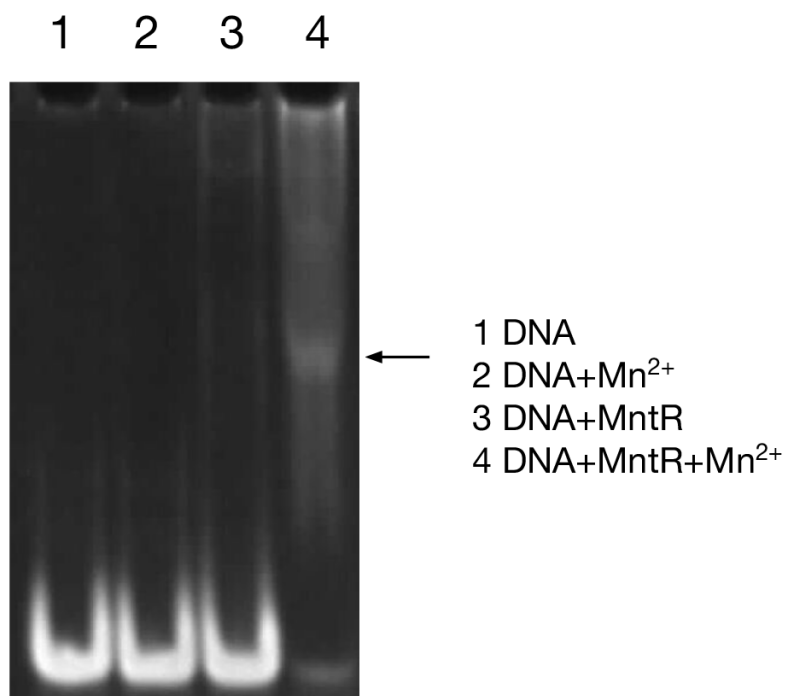
| R. br. | Sljed | Lanac | Početak | Kraj | <i>q</i> -vrijednost |
|--------|-------------------------|-------|---------|---------|----------------------|
| 1 | TTCCCGGGGTCGACGTAGGCGA | + | 1031713 | 1031734 | |
| 2 | TGCTCGGGCCAGCCTTTGTTCGC | - | 1031740 | 1031761 | 0,65 |
| 3 | AACTGGGCGCCGGAGCTGACGT | - | 1031680 | 1031701 | |



Slika P1. Grafički prikaz definicije dihedalnog kuta između DNA-vezujućih zavojnica. Zavojnice su definirane aminokiselinskim ostacima rednih brojeva od 46 do 58. Vizualizacija je dobivena pomoću programa *VMD*.



Slika P2. Udaljenost između FeoA i HTH domena u tri sustava: apo-MntR, holo-MntR i MntR-DNA.



Slika P3. Rezultati provjere vezanja proteina MntR za njegov poznati vezni slijed ispred operona *mntABCD*. Provedena je klasična izvedba metode EMSA, u kojoj se na poliakrilamidnom gelu prati pokretljivost nukleinske kiseline. Strelica pokazuje mjesto na kojem DNA zaostaje, što je znak vezanja za protein.