

Istraživanje interakcija enzima FNR i ITEP domene proteina TROL simulacijama molekularne dinamike

Kekić, Tadija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:638500>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tadija Kekić

ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA ENZIMA FNR I ITEP DOMENE PROTEINA TROL SIMULACIJAMA
MOLEKULARNE DINAMIKE

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Branimira Bertoše.

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanje zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se svojem mentoru, izv. prof. dr. sc. Branimiru Bertoši, na svim savjetima, potpori i vremenu koje mi je posvetio tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem mu se i na dopuštenoj samostalnosti, zbog koje sam naučio mnogo o donošenju odluka u istraživanju. Prepoznavanjem vrijednosti takvog znanja i iskustva, ponekad stjecanog na teži način, profesor Bertoša mi je omogućio izradu diplomskog rada u punom smislu te riječi.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Maji Matulić i prof. dr. sc. Zlatku Liberu uz koje sam izradio prve znanstvene radove. Vrijeme provedeno radeći u njihovim laboratorijima ubrajam u najljepše trenutke svojeg školovanja.

Zahvaljujem se svim profesorima, docentima i asistentima koji su dio svoje ljubavi prema struci i znanosti prenijeli na mene, kao i onima koji su se trudili izvući maksimum iz svojih studenata.

Zahvaljujem se brojnim kolegama i kolegicama, te prijateljima i rodbini koji su svaki na svoj način bili spremni pomoći: savjetom, skriptom ili podrškom.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Istraživanje interakcija enzima FNR i ITEP domene proteina TROL simulacijama molekularne dinamike

Tadija Kekić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biljna feredoksin NADP⁺ oksidoreduktaza (FNR), kao ključan enzim toka elektrona u fotosintezi, obavlja ulogu prijenosa elektrona s reduciranog feredoksina putem kofaktora FAD na NADP⁺. Vežanje na tilakoidnu membranu, enzim FNR, ostvaruje s pomoću transmembranskih proteina Tic62 i TROL. Dimer enzima FNR veže se na ITEP domenu ovih proteina, a eksperimentalni podaci pokazuju da stabilnost stvorenog proteinskog kompleksa ovisi o pH strome kloroplasta. Cilj ovog rada bio je potvrditi ovisnost stabilnosti proteinskog kompleksa dimera enzima FNR i TROL proteina o pH, te razjasniti molekularnu osnovu takve ovisnosti, korištenjem računalnih simulacija molekularne dinamike. U radu su opisane funkcionalno važne mreže vodikovih veza i van der Waalsovih interakcija, te je utvrđen utjecaj na koji promjena u pH okoline, dovodi do promjena u strukturi i stabilnosti proteinskog kompleksa. Uvođenjem mutacija *in silico* u ITEP domenu proteina TROL, s ciljem destabilizacije prepoznatih nekovalentnih interakcija, provjerena je njihova važnost u ovisnosti stabilnosti proteinskog kompleksa o pH. Rezultati istraživanja temeljeni su na simulacijama molekularne dinamike 46 sustava duljine 30 i 40 ns, te uključuje sustave proteinskog kompleksa dimera enzima FNR i ITEP domenu proteina TROL, te sustave slobodne ITEP domene proteina TROL. Sustavi su simulirani pri različitim pH.

(111 stranica, 75 slika, 2 tablice, 43 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: enzim FNR, protein TROL, ITEP domena, molekularna dinamika, *in silico* mutacije

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

prof. dr. sc. Zlatko Liber

doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Rad prihvaćen: 4. veljače 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

Molecular Dynamics Study of Binding Interactions Between FNR and TROL Protein ITEP domain

Tadija Kekić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Plant type ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase (FNR), as a key enzyme in the electrons flow in photosynthesis, performs the role of electron transfer from the reduced cofactor FAD to ferredoxin, through the NADP⁺. The enzyme FNR accomplishes association with the thylakoid membrane, through binding with the transmembrane proteins Tic62 and TROL. FNR binds the ITEP domain of these proteins in a form of a dimer. Experimental data show that this protein complex stability depends on the pH of the chloroplast stroma. The aim of this thesis was to confirm the pH dependence of the protein complex stability, and to clarify the molecular basis behind such pH dependence, using computational simulations. The goal of simulations was to study how will the change in the pH of the environment lead to the changes in the appearance and dynamics of the protein complex. Functionally important networks of hydrogen bonds and van der Waals interactions between ITEP domain and FNR dimer were identified and described into details. *In silico* mutations of selected amino acids in the ITEP domain of protein TROL were used to destabilise the identified group of non-covalent interactions in order to investigate their importance for structural and dynamical properties of studied systems. All results were based on 30 to 40 ns long molecular dynamics simulations of 46 systems. Simulations include systems of the protein complex, and systems of the isolated ITEP domain of protein TROL. The systems were simulated at a number of different pH.

(111 pages, 75 figures, 2 tables, 43 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: FNR, TROL, ITEP domain, molecular dynamics, *in silico* mutations

Supervisor: dr.sc.Branimir Bertoša, Associate professor

Reviewers: dr. sc. Branimir Bertoša, Associate professor

dr. sc. Zlatko Liber, Full professor

dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Docent

Thesis accepted: February 4th 2016

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Tok elektrona u fotosintezi	1
1.2 Feredoksin NADP ⁺ oksidoreduktaza (FNR).....	4
1.2.1 Katalitička aktivnost i biološka funkcija enzima FNR.....	4
1.2.2 Struktura i klasifikacija enzima FNR.....	5
1.3 Tilakoidni rodanazi-sličan protein (TROL)	8
1.3.1 Klasifikacija i biološka funkcija proteina TROL.....	8
1.3.2 Struktura proteina TROL.....	9
1.4 Simulacije biomakromolekula molekularnom dinamikom.....	11
1.4.1 Polje sila.....	11
1.4.2 Molekularna dinamika.....	11
1.5 Ciljevi istraživanja	13
2. Materijali i metode	15
2.1 Računalne simulacije molekularne dinamike.....	15
2.1.1 Priprema sustava.....	15
2.1.2 Minimizacija, ekvibracija i MD simulacije	18
2.2 Analiza trajektorija.....	19
2.2.1 Srednji korijen kvadrata odstupanja i fluktuacije	19
2.2.2 Radijus giracije i površina dostupna otapalu	20
2.2.3 Određivanje nekovalentnih interakcija	21
2.2.4 Analiza sekundarnih struktura i klaster analiza konformacija	21
3. Rezultati	22
3.1 Pregled dinamike sustava dimera enzima FNR i ITEP domena proteina TROL	22
3.1.1 Uravnoteženost i fluktuacija sustava.....	22
3.1.2 Radijus giracije i površina dostupna otapalu	27
3.2 Nekovalentne interakcije u proteinskom kompleksu	30
3.2.1 Pregled značajnih nekovalentnih interakcija	30
3.2.2 Nekovalentne interakcije izrazito fluktuirajućih regija, ovisne o pH.....	32

3.2.3 Pregled nekovalentnih interakcija uz ITEP domenu proteina TROL.....	40
3.2.4 Nekovalentne interakcije uz ITEP domenu proteina TROL, ovisne o pH.....	45
3.2.5 Nekovalentne interakcije uz ITEP domenu proteina TROL, neovisne o pH.....	59
3.3 Pregled dinamike sustava slobodne ITEP domene proteina TROL	72
3.3.1 Uravnoteženost i fluktuacija sustava.....	72
3.3.2 Radijus giracije i kompaktnosti slobodne ITEP domene.....	75
3.3.3 Klaster analiza sustava i pregled nekovalentnih interakcija.....	76
Rasprava.....	78
Zaključak.....	92
Literatura.....	95
Prilog.....	98
Životopis.....	111

Popis kratica

AK – aminokiselina

ATP – adenosin trifosfat

CET – kružni prijenos elektrona (eng. Cyclic Electron Transfer)

FAD – flavin adenin dinukleotid

Fd – feredoksin

FNR – feredoksin NADP⁺ oksidoreduktaza

FNR-BD – vezno domena za feredoksin NADP⁺ oksidoreduktazu

FQR – feredoksin-plastokinon reduktaza

LET – linearni prijenos elektrona (eng. Linear Electron Transfer)

LHC – kompleks za skupljanje svjetlosti (eng. Light Harvesting Complex)

MD – molekularna dinamika

MMDB ID – identifikacijski kod baze podataka za molekularno modeliranje (eng. Molecular Modeling Database)

NADP⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NDH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat dehidrogenaza

PBC – ponavljajući rubni uvjeti (eng. Periodic Boundary Conditions)

PDB ID – identifikacijski kod proteinske banke podataka (eng. Protein Data Bank Identifier)

PME – eng. Particle Mesh Ewald method

R_g – radijus giracije

RMSD – usrednjeni korijen kvadrata odstupanja (eng. Root-Mean-Square Deviation)

RMSF – usrednjeni korijen kvadrata fluktuacije (eng. Root-Mean-Square Fluctuation)

TROL protein – tilakoidni rodanazi-sličan protein (eng. Thylakoid Rhodanase-like protein)

vdW interakcije – van der Waals-ove interakcije

1. Uvod

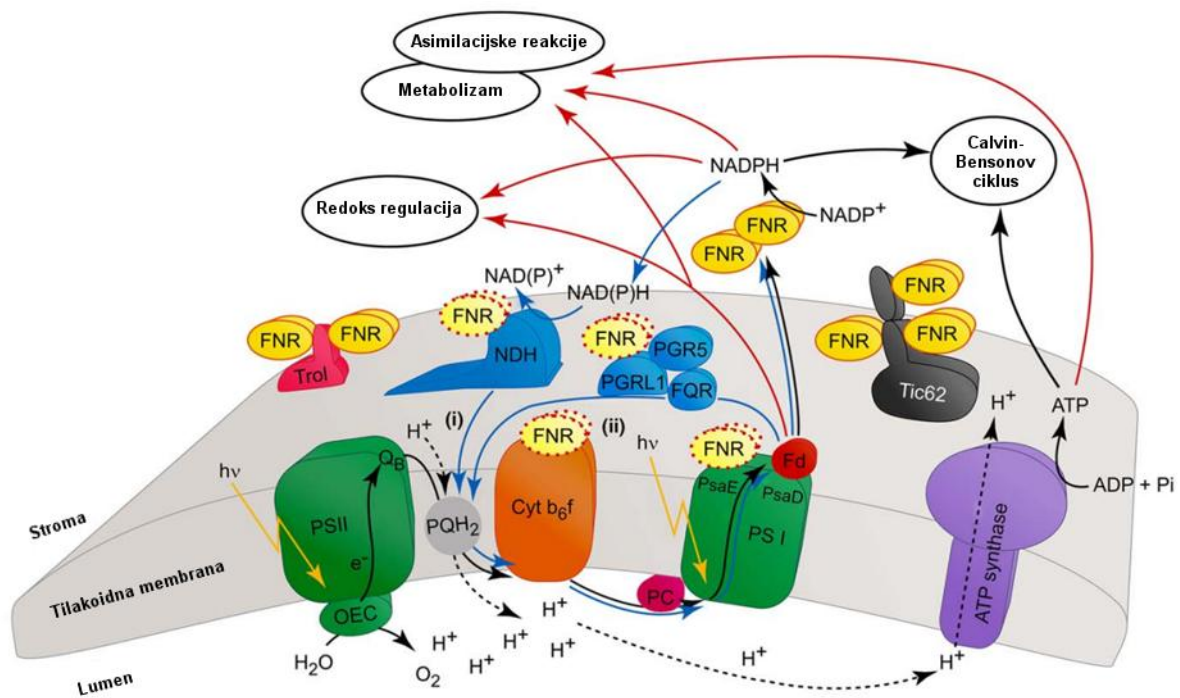
1.1 Tok elektrona u fotosintezi

Fotosintetski sustavi na membrani tilakoida biljnih stanica stvaraju barem dva zasebna toka elektrona kroz proteinske komplekse kojima se, pumpanjem protona u lumen tilakoida, stvara gradijent protona duž tilakoidne membrane što u konačnici omogućuje sintezu ATP-a (Gross i Hanke, 2014; Benz i sur., 2010; Medina i Gómez-Moreno, 2004). Primarna reakcija fotosinteze pod utjecajem svjetlosti temelji se na dva fotokemijska procesa čiju su povezanost u obliku Z-sheme predstavili Hill i Bednall u drugoj polovici 20. stoljeća (Hill i Bendall, 1960). Z-shema je do danas ostala najprihvatljivija shema rada linearnog toka elektrona (LET) (Rochaix, 2011; Grovindjee i sur., 2012).

Linearni tok elektrona (LET) započinje u lumenu tilakoida, točnije u blizini membrane tilakoida gdje se u procesu oksidacije molekula vode elektroni prenose na fotosustav II (PSII) (Twachtmann i sur., 2012; Benz i sur., 2010). Generalno, fotosustavi su transmembranski pigmentni kompleksi građeni od reakcijskog centra i antenskog kompleksa (LHC, eng. light harvesting complexes), a za razliku od fotosustava I (PSI), reakcijski centar PSII će asociirati s pripadajućim LHC samo pri određenim omjerima reduciranog i oksidiranog plastokinona (PQ) (Foyer i sur., 2012; Grovindjee i sur., 2012; Benz i sur., 2009;). Elektroni preneseni na PSII ulaze u reakciju razdvajanja naboja vođenu svjetlom, te nastavljaju svoj tok preko PQ, citokrom b6f kompleksa i plastocianina, prema PSI (Gross i Hanke, 2014). Citokrom b6f kompleks služi kao medijator prijenosa elektrona između dva fotosustava, ali i stvara gradijent protona duž membrane pumpanjem protona u lumen tilakoida (Munekage i sur., 2004). Nakon fotokemijske reakcije na PSI, elektroni se prenose na feredoksin (Fd) koji uz pomoć Feredoksin NADP+ oksidoreduktaze (FNR) oksidira NADP+ u NADPH. Redukcijska sposobnost sadržana u NADPH i kemijska energija sadržana u ATP prvenstveno se koriste u reakcijama asimilacije ugljikovog dioksida (CO₂) u Calvin-Bensonov ciklusu (Mullo, 2011; Benz i sur., 2010). Uz Calvin-Bensonov ciklus ATP, NADPH i reducirani Fd imaju važnu ulogu i u nizu drugih metaboličkih i redoks reakcija u stromi kloroplasta (Lintala i sur., 2014; Foyer i sur., 2012).

Kružni tok elektrona (CET), uključuje samo jedan fotosustav, PS I. CET omogućuje svojevrsno recikliranje elektrona s reduciranog feredoksina i NADPH, koji se prenose preko PQ, do citokroma b6f kompleksa (Twachtmann i sur., 2012; Benz i sur., 2009). CET omogućuje stvaranje gradijenta protona duž membrane tilakoida, što pokreće sintezu ATP-a, bez

akumulacije reduciranih molekula Fd i NADPH (Munekage i sur., 2004; Benz i sur., 2010). Postoje dokazi za barem dva zasebna CET-a, CET ovisan o NAD(P)H dehidrogenazi (NDH) i CET ovisan o feredoksin-plastokinon reduktazi (FQR). Uloga ovih tokova nije u potpunosti razjašnjena, a opisan je tek mali broj njihovih komponenata (Twachtmann i sur., 2012; Mulo, 2011; Benz i sur., 2010). Ipak, eksperimenti pokazuju da utišavanje CET-a vodi u nastanak jakih defekata u pravilnom radu fotosinteze i razvoju biljke (Munekage i sur., 2004).



Slika 1. Shema toka fotosintetske reakcije i interakcije enzima FNR s transmembranskim proteinima tilakoidne membrane kloroplasta. Pune crne strelice označavaju LET, pune plave strelice CET, isprekidane crne strelice označavaju kretanje protona, dok pune crvene strelice označavaju moguće puteve Fd (Benz i sur., 2010).

Kružni i linearni tok elektrona ulaze u kompeticiju za reoksidaciju primarnog akceptora PS I, Fd, koji se kao topljiva molekula može slobodno kretati u stromi kloroplasta (Hald i sur., 2008). Za razliku od mehanizma LET-a u kojemu se Fd veže na FNR, u mehanizmu CET-a, Fd se veže na specifična mjesta stromalne strane citokroma b6f kompleksa. Vezanjem na citokrom b6f kompleks Fd prenosi elektrone na p700 pomoću mehanizma temeljenom na Q ciklusu (Joliot i Joliot, 2006).

Prednost prijenos elektrona s Fd na nizvodni akceptor NADP+, pretpostavlja da je mnogo izglednije vezanje Fd na FNR, od vezanja Fd na stromalnu stranu citokrom b6f kompleksa. Fd će vezati citokrom b6f kompleks, i time započeti CET, no samo ako je FNR potpuno reduciran (Joliot i Joliot, 2006).

U uvjetima tame dolazi do parcijalne inaktivacije Bensonov i Calvinovog ciklusa, čime CET postiže svoju najvišu aktivnost. U uvjetima kontinuiranog intenziteta svjetlosti, LET ostvaruje maksimum aktivnost, dok u tom slučaju aktivnost CET-a raste s intenzitetom svjetlosti dostižući približno 50% udjela u obratu (eng. turnover) PS I pri svjetlosnom zasićenju (Joliot i Joliot, 2006).

U uvjetima svjetlosnog zasićenja, kada apsorbirana svjetlosna energija prekorači kapacitet sustava, višak fotona i elektrona može oštetiti fotosintetske komplekse (Gross i Hanke, 2014). Kako bi se sustav zaštitio, razvijen je brzo-aktivirajući ne-fotokemijski proces utišavanje (eng. quenching) kojeg nazivamo ΔpH ovisno utišavanje. U procesu utišavanja višak apsorbirane svjetlosne energije se rasipa u obliku topline. Uz ovaj, razvijeno je još nekoliko fotozaštitnih mehanizama poput plastidnih antioksidativnih enzima, mehanizma popravka peroksidacije lipida i oštećenja PS II (Foyer i sur., 2012; Rochaix, 2011; Szabó i sur., 2005). S druge strane, u uvjetima slabijeg intenziteta svjetlosti, fotosintetski sustav se pokušava prilagoditi na način povećavanja efikasnosti fotosinteze. Sposobnost fotosintetskog sustava za brzu adaptaciju na promjenu ne uključuje samo intenzitet svjetlosti, već i kvalitetu svjetlosti, razinu CO₂, temperaturu i dostupnosti nutrijenata, a pokazana je snažna korelacija između adaptacije na izmjenu uvjeta i redoks stanja ukupnog PQ (eng. PQ pool) (Rochaix, 2011; Dumit i sur., 2010).

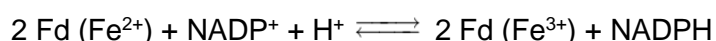
Adaptivnost fotosintetskih sustava moguće je objasniti i na razini ekspresije gena. Ekspresiju gena pod utjecajem promjene redoks stanja fotosintetskog sustava iniciraju nositelji elektrona generalno nazvani redoks senzori. Ovi proteini, redukcijским i oksidacijskim procesima aktiviraju DNA vezujuće elemente generalno nazvane regulatori redoks odgovora (eng. redox response regulator). Vežanjem na DNA regulatori redoks odgovora mogu direktno kontrolirati ekspresiju gena (Allen, 1993). Redoks regulacija ekspresije gena je razlog evolucijske očuvanosti dijela fotosintetskih gena u kloroplastu. Takva evolucijska očuvanost omogućuje brzu sintezu važnih proteina, čime se sprječava da promjene u redoks stanju lanca prijenosa elektrona poremete efikasnost fotosinteze ili oštete proteinske komplekse u sustavu (Foyer i sur., 2012; Rochaix, 2011).

Kompleksnost regulatorne mreže ekspresije fotosintetskih gena potkrepljuje i činjenica da mnogi proteinski kompleksi koji sudjeluju u fotosintezi imaju dualno genetičko podrijetlo. Velik broj njihovih podjedinica, pigmenata i redoks kofaktora sintetizirano je koordiniranom ekspresijom jezgrenih i kloroplastnih gena. Translacija ovih gena događa se na kloroplastnim ili citoplazmatskim ribosomima, no do sastavljanja funkcionalnog kompleksa dolazi tek kada su svi potrebni elementi prenesu u predodređeni kloroplastni odjeljak (Rochaix, 2011).

1.2 Feredoksin NADP⁺ oksidoreduktaza (FNR)

1.2.1 Katalitička aktivnost i biološka funkcija enzima FNR

Feredoksin NADP⁺ oksidoreduktaza (FNR) je obitelj monomernih flavoenzima čiju prostetičku skupinu čini jedna molekula nekovalentno vezanog flavin adenin dinukleotida (FAD) (Mulo, 2011; Jurić i sur., 2009). U zadnjem koraku LET-a, FNR katalizira povratnu reakciju prijenosa elektrona između Fd, FAD i NADP(H) u reakciji:



Postojanje FNR-a potvrđeno je u velikom broju organizama uključujući plastide i mitohondrije viših biljaka, apikoplaste intracelularnih parazita, fototrofične i heterotrofične bakterije, te cijanobakterije (Dumit i sur., 2010; Karplus i Faber, 2004; Carrillo i Ceccarelli, 2003). U kloroplastima i cijanobakterijama FNR osigurava NADPH potreban za fotosintetsku asimilaciju CO₂, prenošenjem elektrona jedno-elektronskog nositelja Fd, na dvo-elektronskog nositelja NADP⁺ korištenjem redoks kofaktora FAD. Flavin FAD-a može poprimiti ukupno tri redoks forme, što uključuje formu oksidiranog kvinona (FAD), formu semikvinona reduciranog jednim elektronom (FADH[•]), te potpuno reduciranu formu kvinola (FADH₂) (Dumit i sur., 2010; Mediavilla i sur., 2010; Ceccarelli i sur., 2004). Za postizanje potpuno reducirane forme FAD-a potrebna je oksidacija dvije molekule Fd. Nakon prijenosa elektrona s prvog Fd na FAD, dolazi do disocijacije Fd, čime se otvara mjesto za pristup drugog reduciranog Fd koji dovodi FAD do kvinolne forme (Dumit i sur., 2010). Tek nakon nastanka FADH₂ moguć je prijenos vodika na NADP⁺ mehanizmom koji uključuje stvaranje ternarnog kompleksa, u kojemu NADP⁺ ima ulogu vodećeg supstrata (Dumit i sur., 2010; Ceccarelli i sur., 2004). Slobodni NADP⁺ započinje proces redukcije stvaranjem nestabilnih interakcija s 2'-P-AMP područjem FAD-a. Slabo, neproduktivno vezanje, pokreće strukturne promjene u proksimalnoj regiji enzima što u konačnici dovodi do čvrstog i stabilnog vezanja NADP⁺ (Dumit i sur., 2010; Karplus i Faber, 2004; Hermoso i sur., 2002; Završni korak mehanizma uključuje pomicanje C terminalnog tirozina FNR-a, što je esencijalno za katalitičku aktivnost enzima. Pomicanje tirozina dovodi do približavanja nikotinamida flavinu čime se omogućuje prijenos vodika i dobivanje NADPH (Karplus i Faber, 2004). U ne-fotosintetskim plazmidima viših biljaka, FNR sudjeluje u metabolizmu dušika i sumpora tako da katalizira reakciju u smjeru redukcije Fd (Benz i sur., 2010). Usmjeravanje elektrona u alternativne redoks reakcije potvrđena je i u fotosintetskim plazmidima, pri suboptimalnim uvjetima, poput niske temperature (Mulo, 2011).

Tijekom zadnja tri desetljeća otkriveno je da FNR interagira s nekoliko tilakoidnih proteina i proteinskih kompleksa. U NDH-ovisnom CET-u, FNR ulazi u interakciju s NADPH dehidrogenazom i citokromom b6f kompleksom, dok u FQR-ovisnom CET-u ulazi u interakciju s proteinom PGRL1 (Benz i sur., 2010). Vezanjem za stromalnu stranu tilakoidne membrane pomoću integralnih proteina TROL, Tic62, PsaE i PsaD, enzim postiže optimalan smještaj u blizini mjesta redukcije Fd (Lintala i sur., 2014; Benz i sur., 2010; Jurić i sur., 2009; Joliot i Joliot, 2006). Karakteristična orijentacija vezanja za integralne proteine tilakoidne membrane, u kojemu je katalitička domena na suprotnoj strani od vezne domene, omogućuje FNR-u neometanu katalitičku aktivnost u proteinskom kompleksu (Alte i sur., 2010).

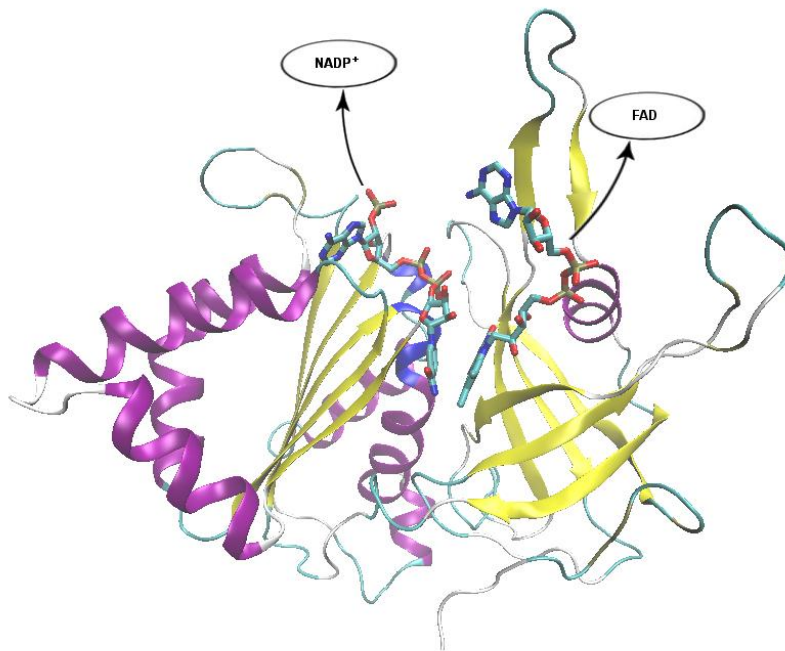
Uz ulogu u lancu prijenosa elektrona, eksperimenti overekspresije FNR-a u transgeničnim biljkama ukazuju na mogućnost da ovaj enzim sudjeluje u suzbijanju reaktivnih kisikovih specija (ROS) čime povećava toleranciju na oksidativni stres (Jurić i sur., 2009; Rodriguez i sur., 2007). Takvi rezultati su potvrđeni i u eksperimentima anti-sense represije FNR-a u kojemu su mutirane biljke izrazito podložne foto-oksidativnim ozljedama (Mulo, 2011; Mediavilla i sur., 2010; Palatnik i sur., 2003). Nadalje, eksperimenti rađeni na TROL-deficijentnim biljkama ukazuju da samo FNR otopljen u stromi kloroplasta ima antioksidativnu ulogu (Jurić i sur., 2009).

1.2.2 Struktura i klasifikacija enzima FNR

Kloroplastni FNR je hidrofilan protein molekularne mase približno 35 kDa. Usporedbom primarne sekvence proteina između različitih biljnih vrsta utvrđena je sličnost između 40% i 97%, dok su posebno očuvane regije koje su uključene u mjesta vezanja FAD i NADP⁺ (Mulo, 2011). Trodimenzijska struktura FNR-a je opisana za velik broj vrsta uključujući *Zea Mays*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Anabaena*, dok su rezolucije tih struktura između 2 i 1,7 Å. (Ceccarelli i sur., 2004). Topologija kloroplastnog FNR-a je evolucijski izrazito očuvana. U svim proučavanim vrstama FNR je sastavljen od dvije distinktivne strukturne domene ili modula, spojenih petljom kod koje je utvrđen viši stupanj varijabilnosti. N terminalna domena od približno 150 aminokiselina prvenstveno sudjeluje u vezanju FAD-a, dok je C terminalna domena od približno 150 aminokiselina prvenstveno zadužena za vezanje NADP⁺ (Mulo, 2011; Ceccarelli i sur., 2004). FAD vezujuća domena prostire se duž velike središnje pukotine, a čine ju struktura β-bačve sastavljene od šest antiparalelnih β-lanaca iznad kojih se nalazi α-zavojnica te duga petlja. Aromatski bočni ogranci tirozina 96 i 314 omogućuju FAD veznoj domeni stvaranje paralelnih π – π interakcija s izoaloksaznim sustavom prstena u flavinu, čime dolazi do snažnog i stabilnog vezanja FAD-a za FNR. Unatoč tome, uvođenje mutacija na ova mjesta utječe na aktivnost tek nekih proteina iz proteinske obitelji FNR (Tejero i sur., 2005).

Konkavno oblikovano područje površine FAD vezne domene omogućuje pristajanje Fd u neposrednoj blizini flavinskog centra i direktan prijenos elektrona s redoks centra Fd (Ceccarelli i sur., 2004). Vezanje Fd i FNR postiže se stvaranjem interakcija između kiselih aminokiselina Fd i bazičnih aminokiseline FNR-a, van der Waalsovima i hidrofobnim interakcijama, kao i vodikovim vezama (Mulo, 2011).

Domenu koja veže NADP⁺ čini struktura od pet β -ploča okruženih sa 6 α -zavojnica, a ovu domenu dodatno možemo podijeliti na dvije poddomene (slika 2). N-terminalna poddomena sudjeluje u stabilizaciji vezanja Fd, dok C-terminalna poddomena ima ulogu u vezanju NADP⁺. Pri normalnim dnevnim uvjetima, C-terminalna poddomena pokazuje pojačanu fleksibilnost što omogućuje lakše i stabilnije pristajanje NADP⁺. Reagiranjem na vanjske uvjete jačanjem ili slabljenjem stabilnosti vezanja NADP⁺, FNR može modulirati svoju aktivnost, a time i efikasnost linearnog toka elektrona (Mulo, 2011, Ceccarelli i sur., 2004; Hermoso i sur., 2002).

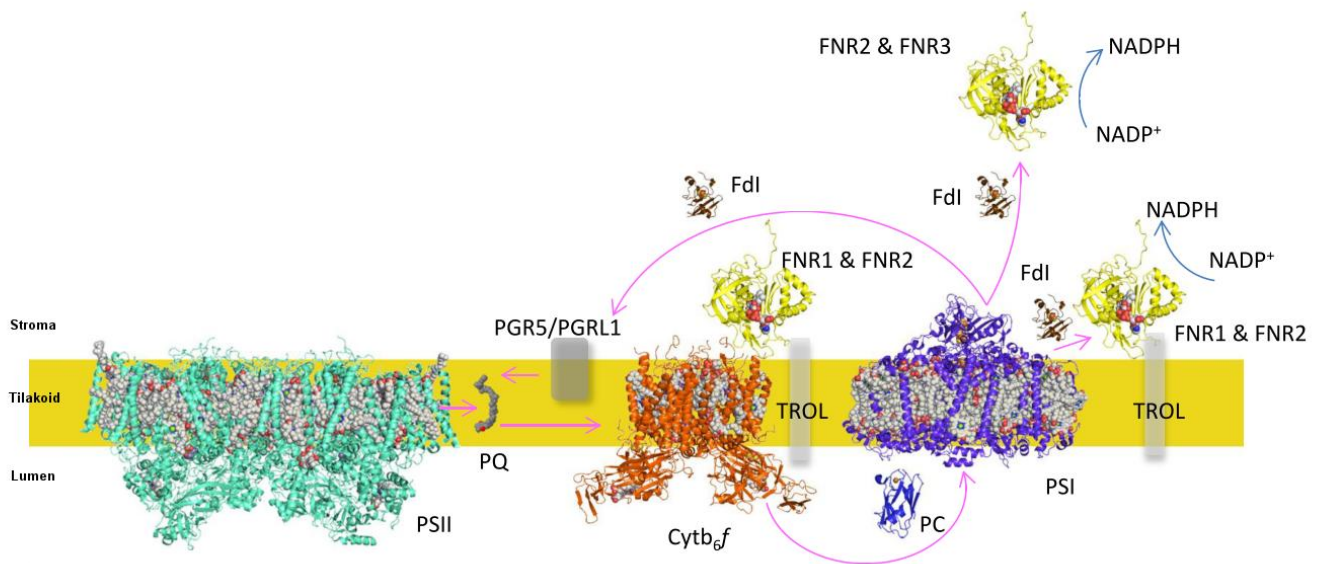


Slika 2. Tercijalna struktura enzima FNR u procesu prijenosa vodika na NADP⁺ u *Anabaena sp.* Na slici su označene α -zavojnice u ljubičastoj boji i β -ploče u žutoj boji (Tejero i sur., 2005).

U višim biljkama pronalazimo izoforme proteina FNR, čiji geni dolaze u većem broju kopija u genomu. *A. thaliana* posjeduje dva gena At5g66190 i At1g20020, koji kodiraju za dvije izoforme fotosintetskog FNR-a, FNR1 i FNR2, čiji transkripti dijele 82% primarne sekvence.

68% od ukupnog kloroplastnog transkripta FNR pripada FNR1 mRNA, dok svega jednu trećinu zastupaju transkripti FNR2 (Lintala i sur., 2014; Goss i Hanke, 2014; Mulo, 2011). Oba gena su predominantno eksprimirani u listovima, dok je mnogo manja količina mRNA primijećena u ostatku biljke. U stanicama korijena mRNA ovih izoformi FNR-a nije primijećena. Stanice korijena viših biljaka eksprimiraju ne-fotosintetski FNR koji katalizira reakciju u smjeru redukcije Fd (Goss i Hanke, 2014; Mulo 2011).

Fotosintetska izoforma FNR1 je kiselijska od izoforme FNR2, a obje izoforme su posttranslacijski dorađene. Inaktivacija jedne izoforme neće rezultirati pojačanom ekspresijom druge izoforme ni na razini transkripcije ni translacije. Takva inaktivacija će rezultirati smanjenom ekspresijom cijelog fotosintetskog sustava, no niti jedna izoforma ne pokazuje ekskluzivnu pripadnost linearnom ili cikličkom toku elektrona u fotosintezi (Mulo, 2011). Detaljnom analizom afinitetnih svojstava različitih izoforma FNR-a i FNR-vezujućih proteina u vrsti *A. thaliana* utvrđeno je zajedničko svojstvo svih izoforma FNR-a da pri kiselim uvjetima stvaraju snažnije interakcije s veznim domenama istraženih proteina (Lintala, 2014). U vrsti *Z. mays* utvrđeno je postojanje čak tri izoforme fotosintetskog FNR-a. Generalno se smatra da veći broj izoforma nekog enzima omogućuje bolju adaptaciju na uvjete specifične za okruženje u kojemu djeluje, no točna uloga treće izoforme do danas nije razjašnjena (slika 3).



Slika 3. Put Fd i enzima FNR u linearnom i cikličkom toku elektrona u vrsti *Z. mays*. Proteini i proteinski kompleksi poznate strukture su prikazani, a sivim pravokutnicima su označeni proteini i proteinski kompleksi čija struktura još nije istražena (Goss i Hanke, 2014).

1.3 Tilakoidni rodanazi-sličan protein (TROL)

1.3.1 Klasifikacija i biološka funkcija proteina TROL

Tilakoidni rodanazi-sličan protein (TROL) je transmembranski protein membrane tilakoida i unutrašnje membrane kloroplasta. Veći dio proteina TROL čini rodanazna domena koja je važna i evolucijski očuvana u sve tri domene života na zemlji. Generalno, rodanazna domena najčešće katalizira prijenos atoma sumpora s tiosulfata na cijanid, no utvrđeno je da može sudjelovati i u regulaciji niza unutarstaničnih procesa, poput senescencije lista ili imunološkog odgovora biljke (Jurić i sur., 2009).

C-terminalni kraj proteina TROL završava s FNR vezujućom domenom, nazvanom ITEP domena. Sličnu domenu ima i protein Tic62 koji također obavlja ulogu FNR vezujućeg proteina. Ipak, dinamika i regulacija vezanja FNR se razlikuje između ovih proteina. Eksperimenti *in vivo* upućuju na to da TROL snažnije veže FNR u usporedbi s Tic62, pogotovo pri nižim pH. Zanimljivo je da tretiranje biljaka sa svjetlom visokog intenziteta rezultira bržom disocijacijom FNR-a s kompleksa TROL-FNR, nego s kompleksa Tic62-FNR (Benz i sur., 2009; Jurić i sur., 2009). U eksperimentima *in vivo* inaktivacije proteina TROL u *A. thaliana* utvrđen je defektan i ne-efikasan LET, slab rast i razvoj biljke, morfološka abnormalnost kloroplasta i nepotpuno razvijene tilakoidne strukture. Biljni mutant protein TROL dobiven knockout metodom, pokušava kompenzirati slabu proizvodnju NADPH pojačanom ekspresijom maličog enzima koji je sposoban stvarati NADPH u alternativnom metaboličkom putu. U ovim mutantima je primijećena i jača ekspresija gena vezanih uz stanični stres, što ne čudi s obzirom na to da protein TROL, preko FNR-a, indirektno sudjeluje u odgovoru na oksidativni stres (Mulo, 2011).

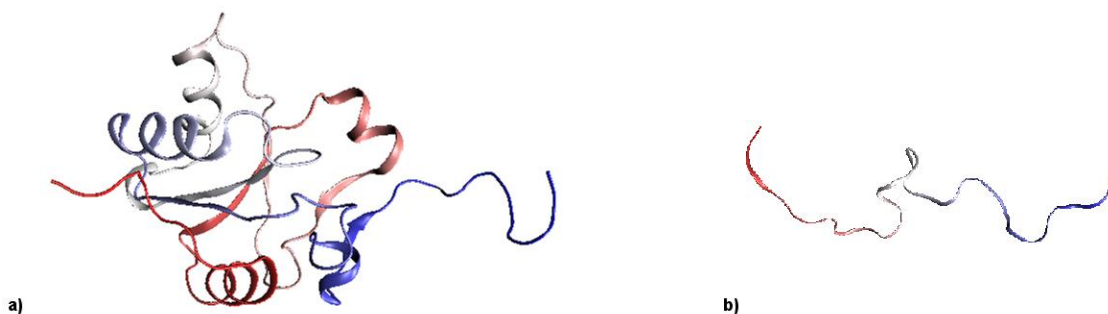
Pod normalnim dnevnim uvjetima u kojima aktivna fotosinteza zahtijeva prisutnost enzima FNR-a, stroma kloroplasta će biti lužnatija zbog stalnog pumpanja protona u lumen tilakoida, što dovodi do disocijacije FNR-a s proteina TROL. U normalnim noćnim uvjetima, kada je aktivnost fotosinteze smanjena ili u potpunosti prestaje, stroma kloroplasta postaje kiseliya, čime afinitet FNR-a za vezujuće domene proteina TROL raste. Vezanjem za protein TROL, FNR se pohranjuje u uvjetima mraka, te ponovno disocira kada je to potrebno (Lintala, 2014).

Eksperimenti plave-nativne poliakrilamid gel elektroforeze (BN-PAGE), pokazuju da je TROL najzastupljeniji u 3 proteinska kompleksa, veličine od 110, 120 i 420 kDa. Dva manja proteinska kompleksa upućuju na postojanje još nepoznatih, malih liganada koji ne sudjeluju nužno u interakciji s FNR-om. Takvi ligandi vjerojatno sudjeluju u interakciji s rodanaznom domenom za koju se pretpostavlja da se nalazi u unutrašnjosti tilakoida. Proteinski kompleks

veliĉine 420 kDa predstavlja interakciju proteina TROL i neke podjedinice citokrom b6f kompleksa ili fotosustava I i II (Jurić i sur., 2009). Proteini TROL i FNR stvaraju kompleks veliĉine 190 kDa ĉime se potvrđuje da ova dva proteina nisu ekskluzivni partneri (Benz i sur., 2010; Jurić i sur., 2009). Ipak, za razliku od većine drugih FNR vezanih proteina, biljni mutanti TROL proteina dobiveni knockout metodom pokazuju znaĉajno slabljenje vezanja FNR-a na tilakoidnu membranu kloroplasta. Takvi mutanti pokazuju veći udio FNR kao slobodnog otopljenog proteina strome (Benz i sur., 2010). Uloga proteina TROL je time vaŹnija Źto je dokazano da FNR otopljen u stromi kloroplasta ima znatno slabiju efikasnost katalize redukcije NADP⁺ (Forti i Bracale, 1984).

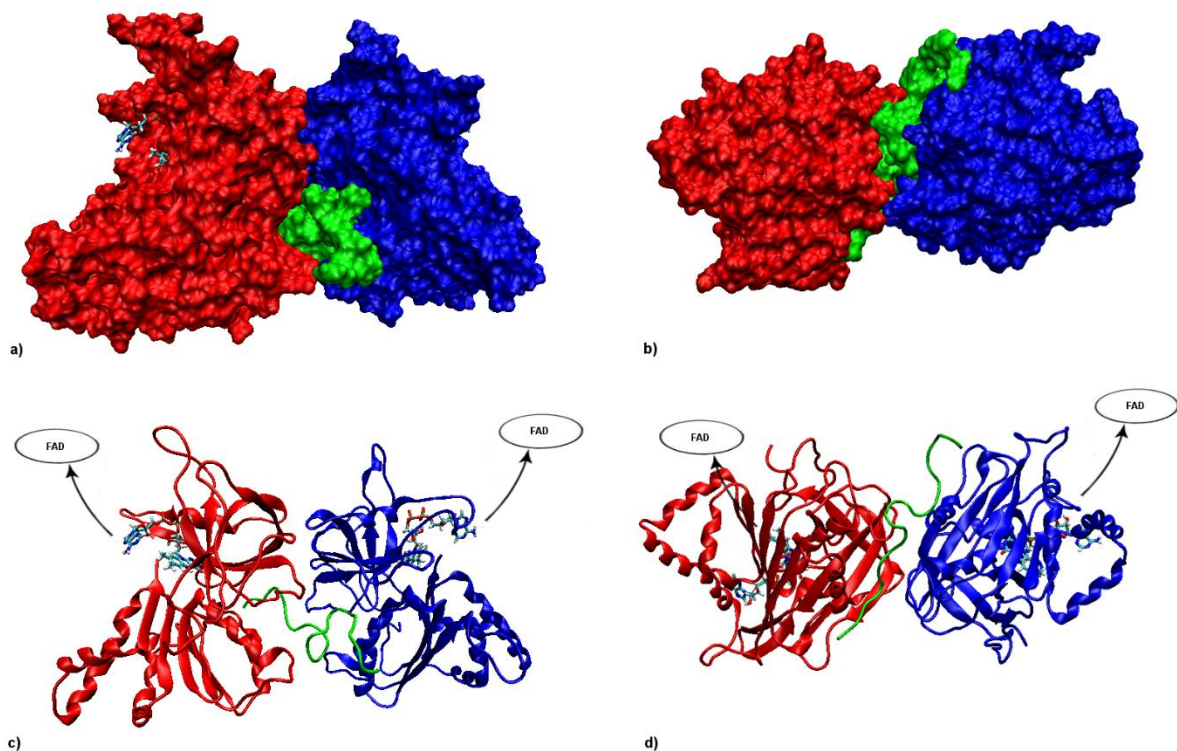
1.3.2 Struktura proteina TROL

Protein TROL, veliĉine 66 kDa, sastavljen je od dvije transmembranske zavojnice i središnje rodanazne domene (slika 4a). Analizom rodanazne domene protein TROL utvrđeno je da je strukturno vrlo sliĉna katalitiĉkoj podjedinici enzima Cdc25 fosfataze Źto je uzrokovano bliskom evolucijskom povezanošću. Usporedbom strukture rodanazne domene TROL proteina i drugih rodanazi-sliĉnih proteina ustanovljene su znaĉajne razlike koje dovode u pitanje funkcionalnost ove domene proteina TROL. U svojem radu, Benz i suradnici (2010), iznose tezu o utjecaju koji imaju izmijenjene aminokiseline aktivnog centra rodanazne domene, te zakljuĉuju da rodanazna domena vjerojatno nije funkcionalna. Jurić i suradnici (2009), iznose tezu da je rodanazna domena funkcionalna, te da ima ulogu u redoks regulaciji vezanja FNR. Moguće direktno vezanje plastokinona za rodanaznu domenu moglo bi objasniti potrebu izmjene aminokiselina u aktivnom mjestu. Na aktivnosti rodanazne domene upućuju i rezultati eksperimentalne inaktivacije proteina TROL u vrsti *A. thaliana* koja rezultira modulacijom ekspresije ĉak 237 gena podrijetlom iz jezgre (Benz i sur., 2010; Jurić i sur., 2009; Koshiba i sur., 2005).



Slika 4. a) NMR Struktura rodanazi-nalik domene proteina TROL, b) ITEP domena TROL proteina u vrijeme vezanja s dimerom enzima FNR. Promjena boje, od crvene prema plavoj, prati redoslijed aminokiselina u primarnoj strukturi (Koshiba i sur., 2005).

N-terminalni kraj proteina TROL sadži signalne sekvence koje omogućuju prijenos proteina u kloroplast i tilakoidnu membranu. Protein je pronađen u potpuno procesiranoj formi samo na tilakoidnoj membrani kloroplasta, dok unutrašnju membranu kloroplasta veže neprocesirani oblik proteina, veličine 70 kDa (Mulo, 2011; Benz i sur., 2010). ITEP domena proteina TROL čini evolucijski očuvana, serin/prolin bogata regija koja je sposobna stvoriti snažne nekovalentne interakcije s dimerom enzima FNR (slika 4b). Ostvarivanjem ovih interakcija nastaje proteinski kompleks veličine oko 190 kDa (slika 5). Znatno veći proteinski kompleks nastaje interakcijom Tic62-FNR, što ne čudi s obzirom na to da Tic62 ima četiri FNR vezujuća motiva, dok TROL ima samo jedan (Lintala i sur., 2014; Benz i sur., 2010; Jurić i sur., 2009). Ispred domene ITEP nalazi se regija PEPE bogata Pro-Val-Pro ponavljanjima. Smatra se da PEPE regija doprinose fleksibilnosti C terminalnog kraja proteina (Jurić i sur., 2009).



Slika 5. NMR Struktura dvije molekule enzima FNR, obojene crveno i plavo, vezane za ITEP domenu proteina TROL. Na slikama vidimo karakterističnu orijentaciju enzima, “leđa o leđa”, koja omogućuje pristup prostetičkoj skupini FAD, odnosno katalitičku aktivnost oba enzima. Slike a) i b) prikazuju aproksimaciju površine molekula odnosno volumen koji zauzimaju. Slike c) i d) prikazuju aproksimaciju sekundarnih struktura molekula i njihovu okosnicu. Slike su napravljene pomoću programa VMD (Humphre i sur., 1996).

1.4 Simulacije biomakromolekula molekularnom dinamikom

1.4.1 Polje sila

Polja sila razlikujemo po funkcionalu i skupu parametara. U skupu parametara opisane su vezne interakcije poput istezanja veza, promjene valentnih i torzijskih kuteva, i nevezne interakcije. Vrlo je važno da su takvi parametri prenosivi, odnosno da mogu opisivati slične sustave. Skup parametara, a time i polja sila razlikujemo po broju i vrsti atoma za koje sadrže parametre. Na temelju opsežnosti, primjenjivosti i kvalitete parametara, polja sila možemo podijeliti na generalna i specijalizirana. Primjer polja sila koja se često koriste u simulacijama biopolimera su AMBER, GROMOS, CHARMM i OPLS. Funkcionalom polja sila računamo potencijalnu energiju sustava koja ovisi o konformaciji molekule, kao i o veznim i ne veznim interakcijama. Funkcionalni se razlikuju između polja sila, a jednostavan primjer funkcionala opisan je formulom :

$$V(r) = \sum k_b(b - b_0)^2 + \sum k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum k_\phi [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] + \sum k_\psi(\psi - \psi_0)^2 + \sum 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum \frac{q_i q_j}{\varepsilon_D r_{ij}}$$

Prema navedenom primjeru, potencijalna energija makromolekularnog sustava $V(r)$, računa se redom iz izraza za energiju istezanja kovalentnih veza, energiju savijanja valentnih kuteva, promjene torzijskih kuteva, van der Waalsove i elektrostatske interakcije. Ploha potencijalne energije takvog sustava je hiperploha u višedimenzionalnom. Pretraživanjem plohe možemo pronaći minimume, odnosno energetski stabilne konformacije - konfomere. Pored globalnog minimuma, važni su i mnogi lokalni minimumi.

1.4.2 Molekularna dinamika

Molekularna dinamika predstavlja *in silico* tehniku kojom korisnik može predvidjeti gibanja čestica, atoma i molekula, unutar definiranog sustava. Izračun takvog gibanja, koje predstavlja promjenu položaja atoma i molekula u jedinici vremena, temelji se na klasičnoj Newtonovoj mehanici, točnije na rješavanju jednadžbi gibanja za sustav čestica. Temperaturu u molekularnoj dinamici uvodimo kao promjenjiv ili konstantan parametar zbog kojeg čestice sustava dobivaju određenu kinetičku energiju prema formuli:

$$E_k = \frac{3}{2} N k_B T$$

gdje je N broj čestica u sustavu, k_B Boltzmannova konstanta, a T temperatura.

Sile koje djeluju na svaku pojedinu česticu, uzrokovane interakcijom elemenata sustava, računaju se deriviranjem funkcije potencijalne energije sustava, dok se ubrzanje čestica računa na temelju Newtonovog drugog zakona gibanja po sljedećoj formuli:

$$a_i = \frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

Formula opisuje ubrzanje čestice i , mase m_i , duž koordinate x_i . Sila F_i koja djeluje na česticu ovisi o položaju svih drugih čestica u sustavu što čini izračun potencijalne energije izrazito složenim. Nužno je korištenje numeričke integracije uz odabir malog vremenskog koraka pri kojemu se koristi aproksimacija da je sila koja djeluje na svaku česticu sustava konstantna. Upravo iz tog razloga uzimaju se što manji vremenski koraci, čime simulacija postaje realnija, no izračuni postaju računalno vrlo zahtjevan. Izračun energije interakcija u sustavu vrši se s pomoću polja sila, a s obzirom da se izračun vrši u odabranim vremenskim koracima, konačno rješenje sustava predstavlja koordinate svih čestica u sustavu kao funkcije vremena.

Energetska minimizacija važan je pretkorak izračunu molekularne dinamike čija je svrha odvesti sustav iz početnog stanja u stanje najbližeg lokalnog minimuma energije. Najbliži lokalni minimum ne znači nužno geometrijski najbliži minimum, već onaj minimum do kojeg možemo doći spuštanjem niz najstrmiji lokalni gradijent plohe potencijalne energije sustava. Ovim procesom opuštaju se nepovoljne interakcije u sustavu što sustav čini stabilnijim. Nakon koraka minimizacije, obično slijedi ekvilibracija sustava tijekom koje se ujednačavaju i stabiliziraju različiti parametri sustava poput tlaka, temperature, gustoće otapala i sli.

Problem rubova sustava, odnosno graničnih uvjeta, tijekom simulacije može se riješiti na više načina. Često se koristi tehnika periodičnih rubnih uvjeta (eng. periodic boundary conditions, PBC). PBC stvara virtualne kopije sustava koje su translahirane na granice s originalnim sustavom, čime originalni sustav efektivno gubi svoje granice i postaje serija replikata.

Za razliku od klasičnih eksperimenata, *in vivo* i *in vitro*, simulacije molekularne dinamike nam omogućuju uvid u mikroskopsko stanje sustava što olakšava interpretaciju rezultata klasičnih eksperimenata koji u pravilu opisuju makroskopsko stanje sustava. Molekularna dinamika omogućuje istraživaču izvođenje *in silico* eksperimenata, što naročito pomaže ako su eksperimenti preskupi, preopasni ili tehnološki neizvedivi u uvjetima *in vivo* ili *in vitro*. Simulacije molekularne dinamike pomažu i u izradi klasičnih eksperimenata, npr. selekcijom najzanimljivijih mutacija, čime se značajno štedi vrijeme i novac, a vjerojatnost uspjeha istraživanja raste.

1.5 Ciljevi istraživanja

Eksperimentalni podaci dobiveni istraživanjem vezanja enzima FNR na protein TROL pokazuju da u uvjetima slabe bazičnosti strome kloroplasta pod utjecajem fotosintetske aktivnosti i pumpanja protona u lumen tilakoida, FNR disocira s ITEP domene proteina TROL kako bi mogao efikasno obavljati svoju ulogu u lancu prijenosa elektrona. U uvjetima tame, kada je fotosintetska aktivnost gotovo ili u potpunosti zaustavljena, pH strome kloroplasta se mijenja iz slabo bazične prema slabo kiseloj, a vjerojatnost detekcije dimera FNR vezanog na ITEP domenu proteina TROL značajno raste. Benz i sur. zaključuju da je izmjena pH strome kloroplasta glavni regulator sposobnosti proteina TROL da stvara proteinski kompleks s dimerom FNR. Protein TROL bi tako obavljao ulogu skladištenja FNR-a u vrijeme kada njegova aktivnost nije potrebna, te ulogu lokaliziranog otpuštanja FNR-a u blizini fotosustava I kada je to potrebno (Benz i sur., 2010). Jurić i sur. iznose tezu da rodanazikalik domena može igrati važnu ulogu u redoks regulaciji vezanja dimera FNR na protein TROL, odnosno da pH okoline nije izravan regulator ovog vezanja (Jurić i sur., 2009). Usporedbom afiniteta vezanja između enzima FNR i FNR vezujućih proteina utvrđeno je generalno jače vezanje pri nižim pH. Za razliku od proteina TROL, protein Tic62 ne pokazuje slabljenje afiniteta za FNR pri višem pH. (Lintala i sur., 2014; Benz i sur., 2010; Jurić i sur., 2009).

Moguća posljedica promjene pH strome kloroplasta bila bi izmjena strukture i stabilnosti nekovalentnih interakcija između dimera enzima FNR i ITEP domene pod utjecajem razlike u protonacijskim stanjima aminokiselina u proteinskom kompleksu. Takva promjena u stabilnosti i dinamici interakcija mogla bi utjecati na ukupnu stabilnost proteinskog kompleksa. Kako bi to provjerili, simulacijama molekularne dinamike, simulirali smo sustave dimera enzima FNR i ITEP domene proteina TROL, kao i sustave dimera FNR i FNR vezne domene (FNR-BD) proteina Tic62, pri različitim pH. S obzirom na to da ne očekujemo slabljenje interakcija između dimera enzima FNR i FNR-BD proteina Tic62, te sustave možemo koristiti kao negativnu kontrolu pri višim pH.

Nakon analize nekovalentnih interakcija u sustavu s divljim tipom proteina TROL, uvesti ćemo *in silico* mutacije u ITEP domenu, te pratiti promjenu u jačini i dinamici nekovalentnih interakcija u proteinskom kompleksu. Uvedene mutacije će biti odabrane na temelju rezultata analize sustava s divljim tipom proteina proteina TROL, a s ciljem destabilizacije ili inaktivacije područja nekovalentnih interakcija koje imaju najveći potencijal da sudjeluju u pH regulaciji vezanja dimera enzima FNR na protein TROL. Na temelju rezultata molekularne dinamike izgrađenih mutanata pokušati ćemo prepoznati važnost pojedinih amino kiselina u interakcijama između dimera enzima FNR i proteina TROL ovisnim o pH.

Za točniju interpretaciju rezultata istraživanja *in vivo*, napravit ćemo i simulacije molekularne dinamike sustava slobodne ITEP domene divljeg i mutiranih tipova proteina TROL, kao i slobodne FNR-BD proteina Tic62, pri nekoliko različitih pH. Rezultati analize ovih sustava trebali bi omogućiti detaljnu analizu rezultata eksperimenata *in vivo*.

2. Materijali i metode

2.1 Računalne simulacije molekularne dinamike

2.1.1 Priprema sustava

Nekovalentne interakcije ITEP domene TROL proteina i dimera enzima FNR proučavane su *in silico* za 46 različitih sustava s pomoću simulacija molekularne dinamike u trajanju od 30 do 40 ns svaka (tablica 1). Simulacije su dijelom rađene na računalnom klasteru CRO-NGI Sveučilišnog računskog centra (SRCE), a dijelom na računalima Zavoda za fizikalnu kemiju, Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

S obzirom na veličinu, napravljene sustave možemo podijeliti na veće, koji sadrži dimer enzima FNR vezan na ITEP domenu (slika 6), i na manje koji sadrže slobodnu ITEP domenu (slika 7). Sustavi su rađeni pri nekoliko pH. Sustavi slobodne ITEP domene rađeni su pri pH=6 i 7, dok su sustavi dimera enzima FNR vezanog na ITEP domenu rađeni pri pH=6, 7 i 8. Uz ove sustave napravljene su i simulacije molekularne dinamike za sustave koji sadrže FNR-BD proteina Tic62. FNR-BD proteina Tic62 korištena je u procesu kristalizacije dimera enzima FNR u rendgenskoj strukturnoj analizi. Kristalna struktura proteinskog kompleksa (MMDB ID: 85773, PDB ID: 3MHP), kojeg čini kokristalizirani dimer enzima FNR i FNR-BD proteina Tic62, predstavlja osnovu za izradu sustava dimera enzima FNR s ITEP domenom TROL proteina, kao i sustava slobodne ITEP domene (Alte i sur., 2010). Zbog specifičnog, izduženog izgleda, a s ciljem znatnog smanjenja potrošnje računalnih resursa, uklonili smo prvih 9 aminokiselina s N-terminalnog kraja enzima FNR. Polarne vodike dodali smo s pomoću programa WHAT IF (Vriend, 1990), a nepolarne vodike s pomoću programa tleap iz programskog paketa Amber 12 (Case i sur., 2012). ITEP domena TROL proteina izgrađena je s pomoću programa Maestro, a početna konformacija je temeljena na konformaciji FNR-BD proteina Tic62 u kokristalizaciji s dimerom enzima FNR. Pravilna protonacija aminokiselina, ovisno o željenom pH sustava, također je napravljena pomoću programa Maestro (Schrödinger, 2015).

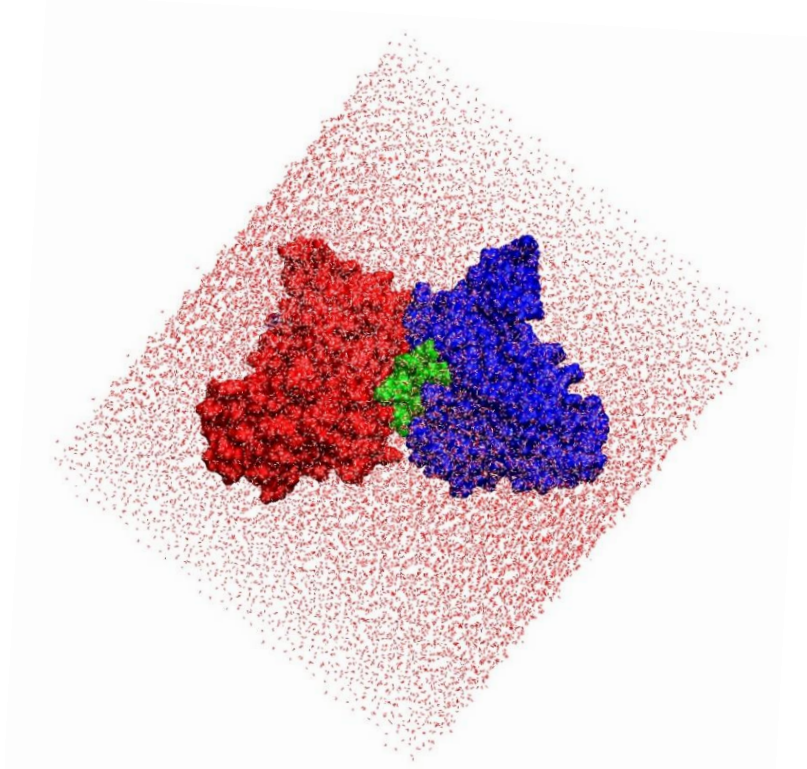
Proteinski kompleksi i slobodni peptidi smješteni su u središte sustava u obliku kvadra, koji je ispunjen molekulama vode modela TIP3P (Jorgensen i sur., 1983). Dimenzije manjih sustava su približno 70 / 70 / 70 Å, dok su dimenzije većih približno 100 / 100 / 100 Å. Parametrizacija proteina je izvršena s pomoću polja sila Amber ff99SB (Hornak i sur., 2006). Paramteri korišteni za FAD dobiveni su semiempirijskim računima (Antony i sur., 2000). Ukupan naboj sustava neutraliziran je ionima natrija ili klora. Granice sustava tretirane su periodičnim rubnim uvjetima. Podjedinice proteinskog kompleksa označene su rednim

brojevima duž primarne sekvence, kako slijedi: monomer A enzima FNR (1. – 296. ak.); ITEP domena TROL proteina (297. – 323. ak.); monomer B enzima FNR (324. – 619. ak.); prva molekula FAD (620. ak.); druga molekula FAD (621. ak.).

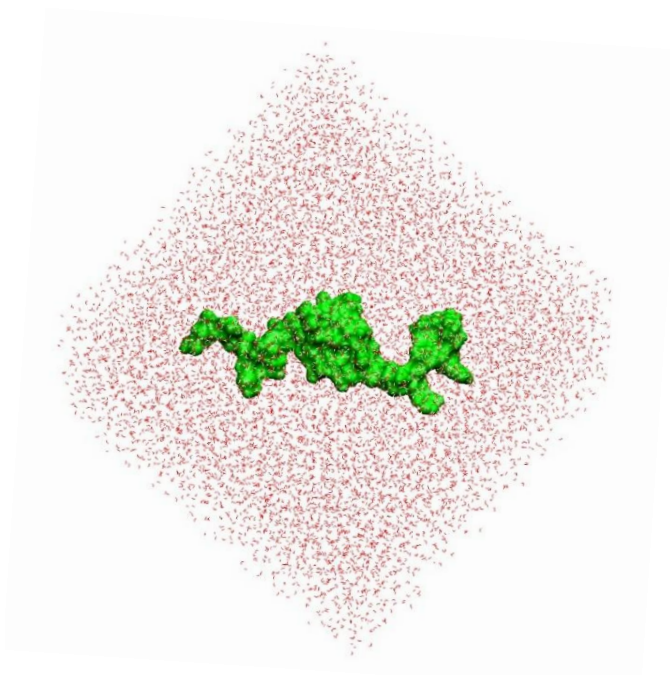
Nakon analize simulacija sustava koji sadrže ITEP domenu divljeg tipa TROL proteina, određene su najsnažnije nekovalentne interakcije u proteinskom kompleksu te je predloženo 11 mutacija aminokiselina ITEP domene TROL proteina koje bi mogle utjecati na stabilnost i dinamiku tih interakcija. Odabrane mutacije (tablica 1) uvedene su in silico, s pomoću programa Maestro.

Tablica 1. Sažeti prikaz sustava izrađenih simulacijama molekularne dinamike.

PROTEINI U SUSTAVU	PH	UVEDENA MUTACIJA	TRAJANJE SIMULACIJE
DIMER ENZIMA FNR + TIC62 FNR-BD	6 / 7 / 8	DIVLJI TIP	30 / 30 / 30 ns
DIMER ENZIMA FNR + ITEP	6 / 7 / 8	DIVLJI TIP	30 / 30 / 30 ns
DIMER ENZIMA FNR + ITEP	6 / 7 / 8	Asp311 u Lys, Lys313 u Asp	30 / 30 / 40 ns
DIMER ENZIMA FNR + ITEP	6 / 7 / 8	Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly	30 / 30 / 40 ns
DIMER ENZIMA FNR + ITEP	6 / 7 / 8	Lys313 u Gln	30 / 30 / 40 ns
DIMER ENZIMA FNR + ITEP	6 / 7 / 8	Ser316 u Thr, Ser 317 u Thr	30 / 30 / 40 ns
DIMER ENZIMA FNR + ITEP	6 / 7 / 8	Met319 u Gly	30 / 30 / 40 ns
DIMER ENZIMA FNR + ITEP	6 / 7 / 8	Met319 u Ser	30 / 30 / 40 ns
TIC62 FNR-BD	6 / 7	DIVLJI TIP	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	DIVLJI TIP	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Asp311 u Lys, Lys313 u Asp	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Lys313 u Gln	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Pro310 u Arg	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Pro310 u Lys, Asp311 u Lys	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Pro314 u Gly	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Pro315 u Gly	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Ser316 u Thr, Ser 317 u Thr	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Pro318 u Gly	30 / 30 ns
ITEP	6 / 7	Met319 u Ser	30 / 30 ns



Slika 6. Vizualizacija sustava koji sadrži proteinski kompleks dimera enzima FNR s ITEP domenom divljeg tipa proteina TROL, simuliranog pri pH=6. Proteinski kompleks okružen je molekulama vode tipa TIP3P. Sustav sadrži 98839 atoma, od kojih 9845 čini 619 aminokiselina, 170 čini prostetičku skupinu FAD, a ostalih 88824 čini vodu i ione. U crvenoj i plavoj boji prikazane su površine molekula enzima FNR, dok je u zelenoj boji označena površina ITEP domene. Slika je napravljena u programu VMD.



Slika 7. Vizualizacija sustava koji sadrži ITEP domenu divljeg tipa proteina TROL okruženu molekulama vode tipa TIP3P, simuliranog pri pH=6. Sustav sadrži 33453 atoma, od kojih 417 čini 27 aminokiselina, a ostalih 33036 čini vodu i ione. U zelenoj boji označena je površina ITEP domene. Slika je napravljena u programu VMD.

2.1.2 Minimizacija, ekvilibracija i MD simulacije

Geometrijska optimizacija struktura (energetska minimizacija) sustava koji sadrže proteinske komplekse provedena je u četiri faze po 1000 koraka, a rađena je pomoću programa Sander, sadržanog u programskom paketu Amber 12 (Case i sur., 2012). Prva faza ove minimizacije, omogućuje slobodno gibanje i postizanje optimalnog razmještaj molekula i atoma otapala, dok je gibanje svih atoma u proteinskom kompleksu ograničeno primjenom potencijala od $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. U drugoj fazi minimizacije ograničenje gibanja vrijedi samo za teške atome proteinskog kompleksa, što se postiže primjenom potencijala od $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. U ovoj fazi, molekule vode, ioni i vodici proteinskog kompleksa, mogu se slobodno gibati i postići optimalni položaj. Treća faza minimizacije ograničava gibanje samo atomima proteinske okosnice primjenom potencijala od $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. U četvrtoj fazi minimizacije svi atomi sustava mogu se slobodno gibati.

Energetska minimizacija sustava slobodnog peptida izvršena je s pomoću algoritma najstrmijeg spusta (eng. steepest descent), korištenjem programskog paketa Gromacs 4.6.2 (Berendsen i sur., 1995). Minimizacija sustava trajala je najviše 3000 koraka, a zaustavljena je ranije ukoliko bi sila na svaki atom sustava bila manja od $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Inicijalna veličina koraka iznosila je $0,1 \text{ \AA}$. Elektrostatske interakcije dugog dometa računane su Particle Mesh Ewald metodom (PME), dok je granična vrijednost interakcija kratkog dometa određena na 12 \AA .

Nakon postizanja lokalnog minimuma potencijalne energije sustavi su ekvilibrirani (uravnoteženi) korištenjem programa iz programskih paketa Amber 12 i Gromacs 4.6.2. Ekvilibracija sustava proteinskih kompleksa, rađena s pomoću programskog paketa Amber 12, podijeljena je u dvije faze. Prva faza uravnoteženja traje 300 ps , a provedena je u uvjetima konstantnog volumena, s postupnim porastom temperature od 0 do 300 K . Tijekom trajanja prve faze primijenjena su vezna ograničenja (eng. constraints) na sve teške atome u proteinskom kompleksu. Druga faza uravnoteženja traje 200 ps , a provedena je u uvjetima konstantne temperature od 300 K i konstantnog tlaka od 1 atm .

Ekvilibracija sustava slobodnog peptida provedena je s pomoću programskog paketa Gromacs 4.6.2. Ekvilibracija je izvršena u dvije faze duž kojih je primijenjeno vezno ograničenje atoma peptida, koristeći algoritam LINCS. Vremenski korak obje faze iznosi 1 fs . Prva faza, kanonski ansambl (NVT), traje 100 ps , te su u njoj temperatura, volumen i množina čestica konstantni. Elektrostatske interakcije dugog dometa računane su PME metodom, dok je granična vrijednost interakcija kratkog dometa određena na 12 \AA . Temperatura sustava je kontrolirana korištenjem modificiranog Berendsenovog termostata koristeći ponavljano

skaliranje brzina (V-rescale), gdje su atomi peptida i otapala tretirani zasebno (Berendsen, 1995).

Druga faza, izotermalni – izobarični ansambl (NPT), traje 100 ps, te su u njoj temperatura, tlak i množina čestica konstantni. Elektrostatske interakcije dugog dometa računane su PME metodom, uz graničnu vrijednost interakcija kratkog dometa od 12 Å. Korištena je shema Verlet odsječka (eng. Verlet cut-off scheme). Temperatura sustava je kontrolirana korištenjem algoritma V-rescale, a atomi peptida i otapala su tretirani zasebno. Tlačno vezanje izvršeno je pomoću Parrinello – Rahman barostata (Parrinello i Rahman, 1981).

Nakon dovršenja ekvilibracije napravljena je produkcijska faza simulacija molekularne dinamike. Trajektorije svih sustava su produljene do 30 ns koristeći programski paket Gromacs 4.6.2. Vremenski korak tijekom simulacije je iznosio 1 fs. Temperatura i tlak sustava bili su konstantni (300 K, 1 atm). Nisu uvedena nikakva ograničenja na položaje atoma. Elektrostatske interakcije dugog dometa računane su PME metodom, uz graničnu vrijednost interakcija kratkog dometa od 12 Å. Korištena je shema Verlet odsječka. Temperaturno vezanje izvršeno je korištenjem algoritma V-rescale, a atomi peptida i otapala tretirani su zasebno. Tlačno vezanje izvršeno je s pomoću Parrinello – Rahman barostata (Parrinello i Rahman, 1981).

2.2 Analiza trajektorija

Analiza trajektorija izvršena je s programima iz programskog paketa Gromacs 4.6.2 i programom za vizualizaciju, VMD (Humphrey i sur.,1996).

2.2.1 Srednji korijen kvadrata odstupanja i fluktuacije

Srednjim korijenom kvadrata odstupanja (eng. root mean-square deviation, *RMSD*) praćena je promjena struktura, proteinskog kompleksa i peptida, u vremenu. S obzirom na to da se konformacija molekule mijenja duž trajektorije, metoda uspoređuje promjene mjesta atoma u svakom trenutku s referentnom, početnom konformacijom. Referentna i trenutna konformacija zapisane su u obliku dva skupa n vektora, v_n i w_n , gdje svaki skup ima tri komponente koje predstavljaju prostorne koordinate atoma. *RMSD* računamo prema formuli:

$$RMSD(v, w) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_i - w_i\|^2}$$

$$RMSD(v, w) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_{ix} - w_{ix}\|^2 + \|v_{iy} - w_{iy}\|^2 + \|v_{iz} - w_{iz}\|^2}$$

Srednjim korijenom kvadrata fluktuacije (eng. root mean-square fluctuation, *RMSF*) praćeno je odstupanje aminokiselina, proteinskog kompleksa i peptida, od svojeg referentnog položaja. Dok je s pomoću *RMSD*-a određena srednja vrijednost odstupanja u trenutku, izračunom *RMSF* određena je srednja vrijednost svake aminokiseline unutar izabranog vremenskog intervala. *RMSF* računamo prema formuli:

$$MSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T [x_i(t_j) - \tilde{x}_i]^2}$$

Gdje T predstavlja vremenski interval, x_i položaj čestice u nekom trenutku, a \tilde{x}_i referentni položaj čestice. Prije računa *RMSD* i *RMSF*, strukture se savijaju s referentnom strukturom.

Analizu *RMSD* koristili smo za procjenu relativnog uravnoteženja sustava u nekom vremenskom intervalu. Interval trajektorije prije postizanja relativno stabilne konformacije nije analiziran daljnjim metodama zbog mogućnosti krive interpretacije rezultata. Provjerom postojanja konvergencije vrijednosti *RMSD*, odredili smo je li potrebno trajektorije sustava dodatno produljivati.

Analiza *RMSF* korištena je za istraživanje fleksibilnosti pojedinih regija molekula u sustavu, te za utvrđivanje stabilnosti sekundarnih struktura, odnosno dinamika izmjene konformacija duž proteinskog kompleksa ili slobodnog peptida.

2.2.2 Radijus giracije i površina dostupna otapalu

Određivanje radijusa giracije makromolekula (R_g) vršeno je mjerenjem udaljenosti centra mase makromolekule od njenih krajeva, prema formuli :

$$R_g = \left(\frac{\sum_i |r_i|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^2$$

Gdje m_i predstavlja masu atoma i , a r_i udaljenost atoma i od centra mase makromolekule. Radijus giracije koristili smo kao indikator kompaktnosti struktura, promjena afiniteta između elemenata proteinskog kompleksa, te kako bismo pratili procesa smatanja peptida.

Računanjem površine dostupne otapalu (eng. Solvent Accessible Surface Area, SASA), određena je površina makromolekula koja dolazi u kontakt s molekulama vode. Algoritam ove metode računa površinu mjerenjem duljine puta zamišljene kuglice, malog radijusa, koja se kotrlja po površini atoma. Zamišljena kuglica tretira se kao molekula otapala, uzimajući u obzir van der Waalove interakcije. Površina dostupna otapalu nam je dala indicaciju o slobodnoj energiji proteinskog kompleksa i peptida.

2.2.3 Određivanje nekovalentnih interakcija

Tijekom simulacije analizirane su nekovalentne interakcije (elektrostatske interakcije, vodikove veze i vdW interakcije). Sve interakcije između aminokiselina koje su prisutne kraće od 50 % trajanja uravnoteženog dijela trajektorija bile su odbačene. Posebna pažnja dana je stabilnim vodikovim vezama između ITEP domene TROL proteina i dimera enzima FNR, zbog njihovog snažnog utjecaja na specifičnost, afinitet i regulaciju vezanja u proteinskom kompleksu. Rezultat analize je složena mreža nekovalentnih interakcija proteina u sustavima.

Geometrijski kriteriji za definiciju vodikove veze između aminokiselina određeni su na udaljenost do 3 Å između atoma donora i akceptora vodika, te nagibom do 120° između atoma donora – vodika – atoma akceptora. Geometrijski kriteriji za definiciju vodikove veze između molekule vode i aminokiseline određeni su na udaljenost od 2,7 Å između atoma donora i akceptora vodika, te nagibom do 110° između atoma donora – vodika – atoma akceptora. Geometrijski kriteriji za definiciju vdW interakcija određeni su na udaljenost do 4,5 Å između atoma hidrofobnih aminokiselina.

2.2.4 Analiza sekundarnih struktura i klaster analiza konformacija

Promjene u sekundarnoj strukturi proteinskog kompleksa i peptida promatrane su duž trajektorije. Korišteni algoritam prepoznaje uzorke (eng. patterns) vodikovih veza i geometrije makromolekule kako bi odredio strukture α – zavojnice, β – ploče, 3/10 zavojnice, π zavojnice, okreta i nasumičnog savijanja, a rezultati analize prikazani su 2D grafom promjene sekundarne strukture / aminokiselini u vremenu.

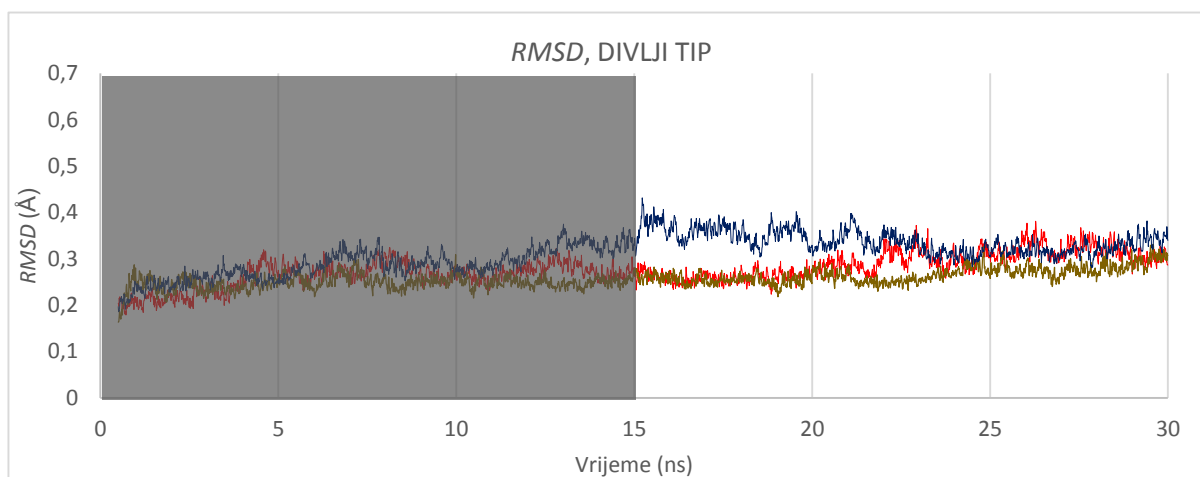
Klaster analiza konformacija provedena je kako bi se odredila sličnost konformacije makromolekula duž trajektorije. Udaljenost između konformacija određena je algoritmom temeljenim na zasebnoj analizi *RMSD* svake postojeće strukture. Temeljem odsječka *RMSD* i mogućeg broja susjeda, u kružnom procesu, određuju se strukture s najvećim brojem sličnih struktura te se označuju kao reprezentativne strukture svojih klastera (Daura i sur., 1999). Rezultati analize prikazuju reprezentativne strukture svakog klastera, te vremenski udio klastera u simulaciji.

3. Rezultati

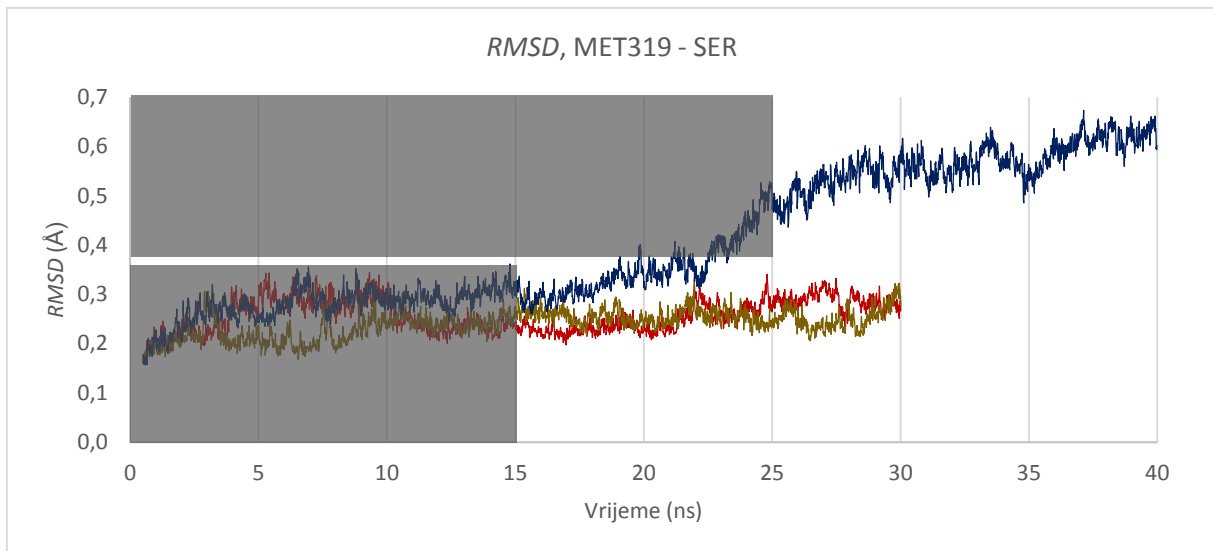
3.1 Pregled dinamike sustava dimera enzima FNR i ITEP domena proteina TROL

3.1.1 Uravnoteženost i fluktuacija sustava

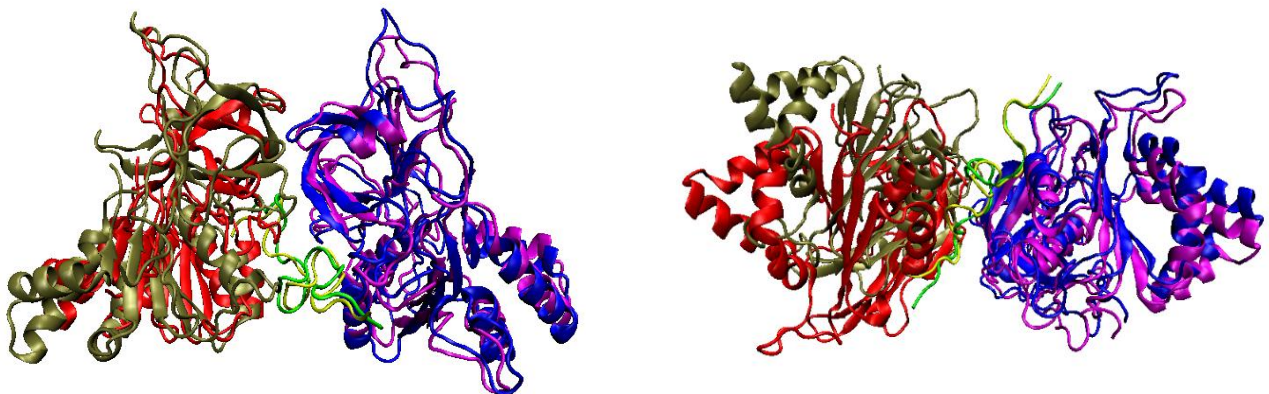
Grafovi promjene *RMSD* vrijednosti proteinske okosnice tijekom 30 ns MD simulacija pokazuju da su se svi simulirani sustavi kompleksa dimera enzima FNR s ITEP domenom divljeg tipa proteina TROL uravnotežili tijekom simulacija te nije došlo do većih konformacijskih promjena (slika 8). Promjene *RMSD* vrijednosti proteinske okosnice veće su pri simuliranju sustava na pH=8, nego tijekom simulacija pri pH=6 i pH=7. Najniža srednja vrijednost *RMSD* zabilježena je u sustavu pri pH=6 s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr te iznosi 2,3 Å. Najviša srednja vrijednost *RMSD* pripada sustavu pri pH=8 s uvedenom mutacijom Met319 u Ser, te iznosi 4,0 Å. Visoke vrijednosti *RMSD* i njihov dulji interval rasta u ovom sustavu, ukazuju na značajne strukturne promjene koje su potvrđene i vizualizacijom, pomoću koje je utvrđen značajan pomak FNR monomera A (slike 9 i 10). S obzirom na uočene konformacijske promjene kod većine sustava simuliranih pri pH=8, simulacije tih sustava su produljene do 40 ns što je ocijenjeno kao dovoljno dugo vrijeme simuliranja za stabilizaciju sustava nakon uočenih konformacijskih promjena. Za detaljnu analizu korišteno je završnih 15 ns svih trajektorija. Detaljni rezultati analize *RMSD* prikazani su u prilogu I.



Slika 8. Vrijednosti *RMSD* proteinske okosnice tijekom MD simulacije sustava kompleksa dimera FNR proteina i ITEP domene divljeg tipa proteina TROL. Sivo područje označava interval koji nije korišten u daljnjoj analizi. Crvenom bojom je prikazana vrijednost *RMSD* sustava pri pH=6, smeđom sustava pri pH=7, a plavom sustava pri pH=8. Kao referentna struktura za izračun vrijednosti *RMSD* tijekom simulacije korištena je struktura dobivena nakon 0,5 ns simulacije, odnosno nakon perioda simulacije uravnoteženja.

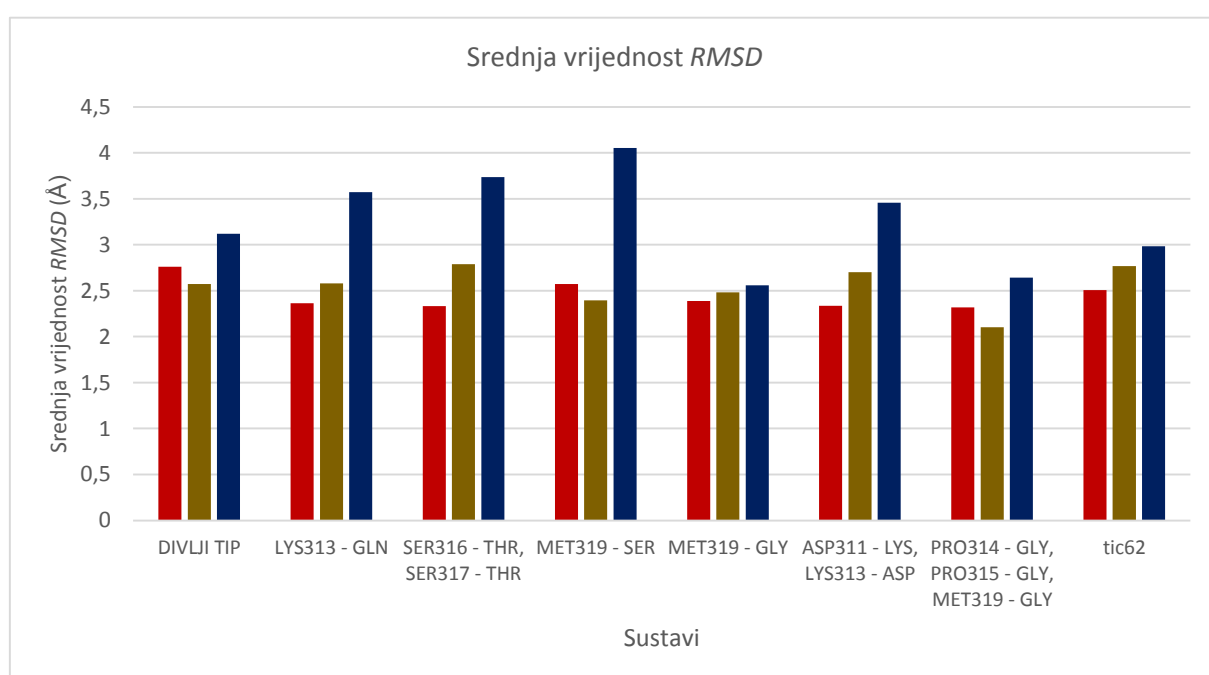


Slika 9. Vrijednosti *RMSD* proteinske okosnice tijekom MD simulacije sustava kompleksa dimera FNR proteina i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom, Met319 u Ser. Sivo područje označava interval trajektorije koji nije korišten u daljnjoj analizi. Vrijednosti su označeni bojama ovisno o pH sustava iz kojeg potječu. Crvenom bojom je prikazana vrijednost *RMSD* sustava pri pH=6, smeđom sustava pri pH=7, a plavom sustava pri pH=8. Kao referentna struktura za izračun vrijednosti *RMSD* tijekom simulacije korištena je struktura dobivena nakon 0,5 ns simulacije, odnosno nakon perioda simulacije uravnoteženja.



Slika 10. Vizualizacija kompleksa dimera FNR proteina i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom, Met319 u Ser pri pH=8. Sustavi u trenutku oko 15. i 30. ns sravnjeni su i prikazani iz dva smjera. Sustavi su sravnjeni prema ITEP domeni proteina TROL. Elementi proteinskog kompleksa označeni su različitim bojama kako slijedi: struktura dobivena nakon 15 ns MD simulacije crvenom (FNR monomer A), plavom (FNR monomer B) i zelenom (ITEP domena proteina TROL) bojom, a struktura dobivena nakon 30 ns MD simulacije zlatnom (FNR monomer A), rozom (FNR monomer B) i žutom (ITEP domena proteina TROL) bojom.

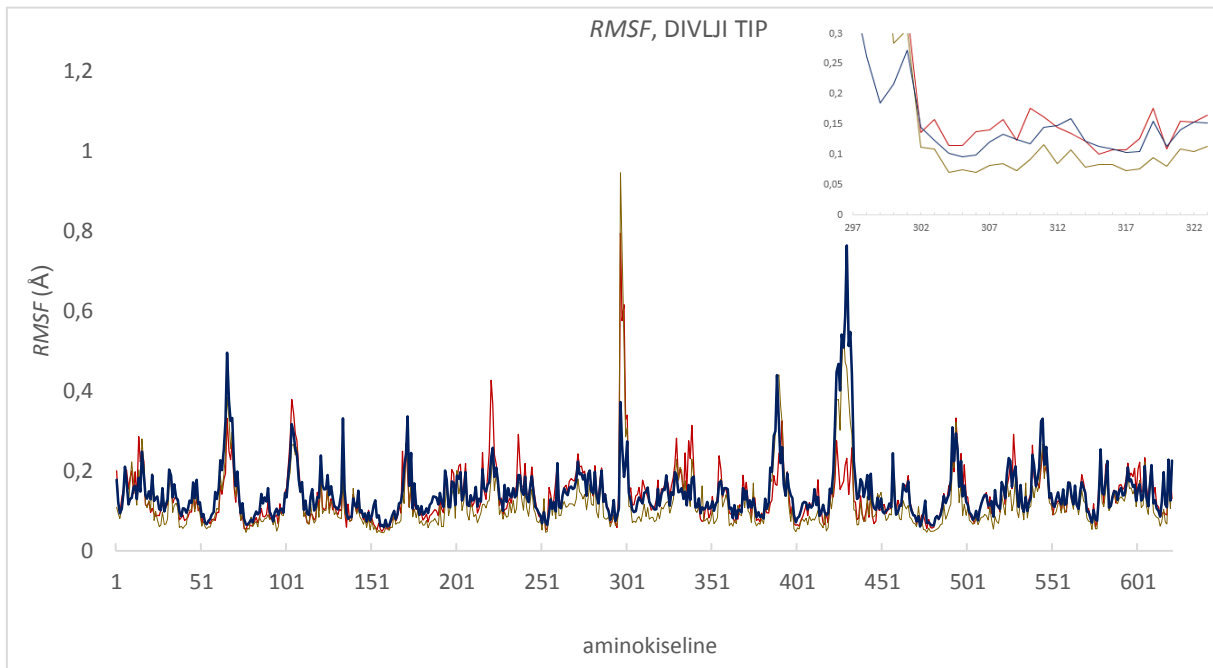
Analiza *RMSD* svih sustava proteinskog kompleksa pokazuje veće promjene konformacije tijekom MD simulacije pri pH=8 u odnosu na MD simulacije pri pH=6 i pH=7, što je posebno izraženo u sustavima s uvedenim mutacijama. U sustavima s uvedenim mutacijama pri pH=6 uočene su najniže, a u sustavima s uvedenim mutacijama pri pH=8 najviše vrijednosti *RMSD*. Isti trend uočen je i pri usporedbi sa sustavima divljeg tipa proteina TROL. Srednje vrijednosti *RMSD* sustava s uvedenim mutacijama pri pH=7, u usporedbi sa sustavom divljeg tipa proteina TROL, pokazuju oscilacije u oba smjera. U sustavima s uvedenim mutacijama Lys313 u Gly; Ser316 u Thr, Ser317 u Thr i Met319 u Gly, vrijednosti *RMSD* je najniža pri pH=6, dok je u ostalim sustavima vrijednost *RMSD* najniža pri pH=7 (slika 11).



Slika 11. Srednje vrijednosti *RMSD* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa. Vrijednosti su označene bojom ovisno o pH sustava tijekom simulacije. Crvenom bojom su prikazane srednje vrijednosti *RMSD* sustava pri pH=6, smeđom sustava pri pH=7, a plavom sustava pri pH=8.

Analizom fluktuacije, odnosno analizom *RMSF*, uočene su regije duljine 20 do 30 aminokiselina, koje pokazuju visoke vrijednosti fluktuacija. Ove regije uključuju aminokiseline između 55. i 75., 95. i 111., 297. i 302., 381. i 401., te 417. i 441 (slika 12). Uz iznimku početnih aminokiselina ITEP domene (297. – 302. ak.), navedene regije predstavljaju petlje koje se nalaze na vanjskoj strani FNR dimera, a uključene su u FAD vezujuću domenu. Vrijednosti fluktuacija ovih regija u većoj ili manjoj mjeri pokazuju ovisnost o pH, koja je, u sustavu s divljim tipom TROL proteina, posebno izražena u regiji između 421. i 440. aminokiseline. Ovisnost o pH vrijednosti fluktuacije aminokiselina u ostalim spomenutim regijama puno je izraženija u sustavima s uvedenim mutacijama. Unatoč tome, u gotovo svim simuliranim sustavima,

fluktucija aminokiselina ovih regija monomera A enzima FNR, bilježi niže vrijednosti od fluktucija istih aminokiselina monomera B. Vizualnom usporedbom reprezentativne strukture najnapućenijeg klastera svih sustava utvrđeno je da nižu fluktuciju ovih regija uzrokuje iznenađujuće stabilna sekundarna struktura, koja nije primijećena i u monomeru B enzima FNR. Navedene regije monomera B ostvaruju strukturu petlje, s relativno nestabilnim interakcijama unutar nje, dok iste regije monomera A ostvaruju strukturu β ploče sa stabilnim interakcijama. Detaljan opis nekovalentnih interakcija ovih regija sadržan je u poglavlju 3.

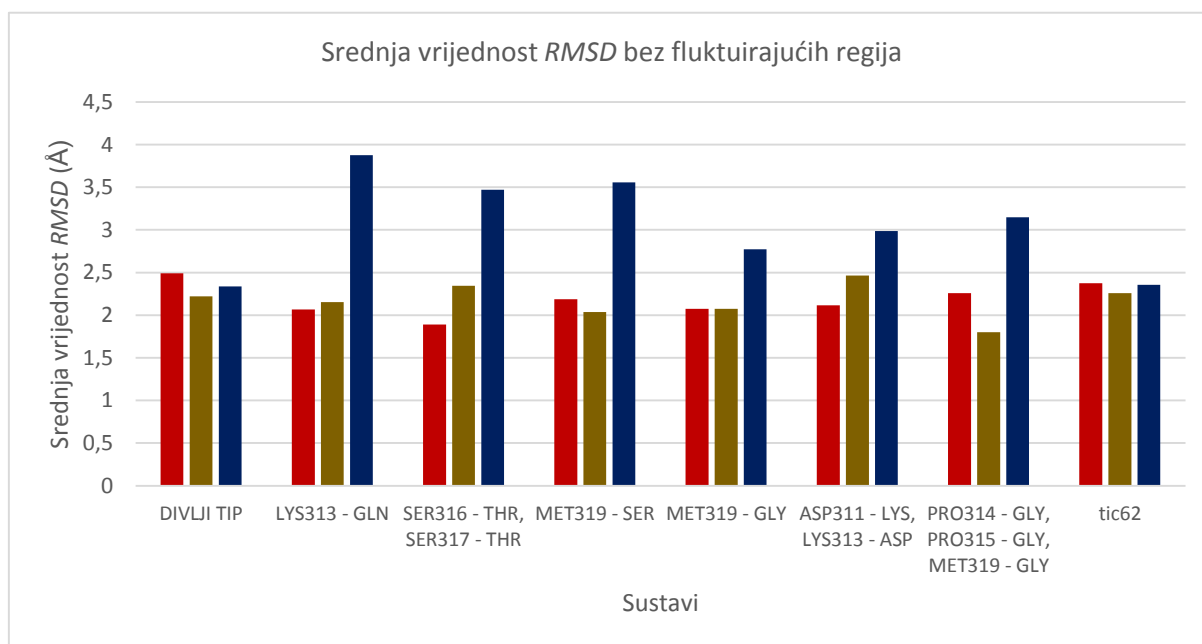


Slika 12. Vrijednosti *RMSF* sustava kompleksa dimera FNR proteina i ITP domene divljeg tipa proteina TROL. Crvenom bojom prikazane su vrijednosti sustava simuliranog pri pH=6, smeđom pri pH=7, a plavom pri pH=8. Monomer A enzima FNR uključuje vrijednosti fluktucija aminokiselina od 1. - 296., ITP domena TROL proteina vrijednosti od 297. – 323., a monomer B enzima FNR vrijednosti od 324. – 619. Zadnje vrijednosti fluktucija pripadaju prvoj i drugoj FAD molekuli, rednih brojeva 620. i 621. U gornjem desnom kutu nalazi se uvećani prikaz vrijednosti grafa za ITP domenu proteina TROL.

U sustavima s uvedenom mutacijom Met319 u Gly, primijećeno je znatno proširenje regija fluktucija aminokiselina ovisnih o pH. Najviše vrijednosti fluktucija aminokiselina opažene su u sustavima s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, dok su najniže vrijednosti opažene u sustavu s uvedenom mutacijom Lys313 u Gln. Vrijednosti fluktucija svih aminokiselina u pravilu su najviše u sustavima simuliranim pri pH=8, dok su vrijednosti fluktucija sustava simuliranim pri pH=6 i pH=7 nešto niža. To je posebno izraženo kod vrijednosti fluktucija aminokiselina u regijama s iznimno visokim vrijednostima koje su najviše u sustavima simuliranim pri pH=8, a najniže u sustavima simuliranim pri pH=6. Detaljni rezultati *RMSF* analize prikazani su u prilogu III.

S obzirom na to da visoko fluktuirajuće regije FAD vezujuće domene ne ulaze u direktnu interakciju s ITEP domenom proteina TROL, ponovljenom analizom *RMSD* uz eliminaciju ovih regija, utvrđen je njihov utjecaj na ukupnu stabilnost sustava, ali i utjecaj koji uvođenje mutacija ima na stabilnost proteinskog kompleksa.

Analizom *RMSD* uz eliminaciju regija visoko fluktuirajućih aminokiselina postižu se nešto niže vrijednosti *RMSD* svih sustava (slika 13). Vrijednosti su podjednako snižene u svim sustavima, a eliminacija regija u pravilu ne utječe na relativni omjer vrijednost *RMSD* između sustava simuliranim pri različitim pH. Iznimke su opažene za sustav s divljim tipom proteina TROL pri pH=8 koji bilježi snažan pad vrijednosti, te sustave s uvedenom mutacijom Met319 u Gly kod kojih dolazi do značajne korekcije vrijednosti za sustave pri pH=6 i pH=7 dok vrijednosti za sustav pri pH=8 pokazuju blagi rast. Rezultati ove analize pokazuju da regije snažnih fluktuacija imaju relativno slab utjecaj na stabilnost sustava, te da su razlike u stabilnost proteinskog kompleksa mnogo snažnije određene uvedenim mutacijama u ITEP domenu proteina TROL. Detaljni rezultati analize *RMSD* prikazani su u prilogu II.

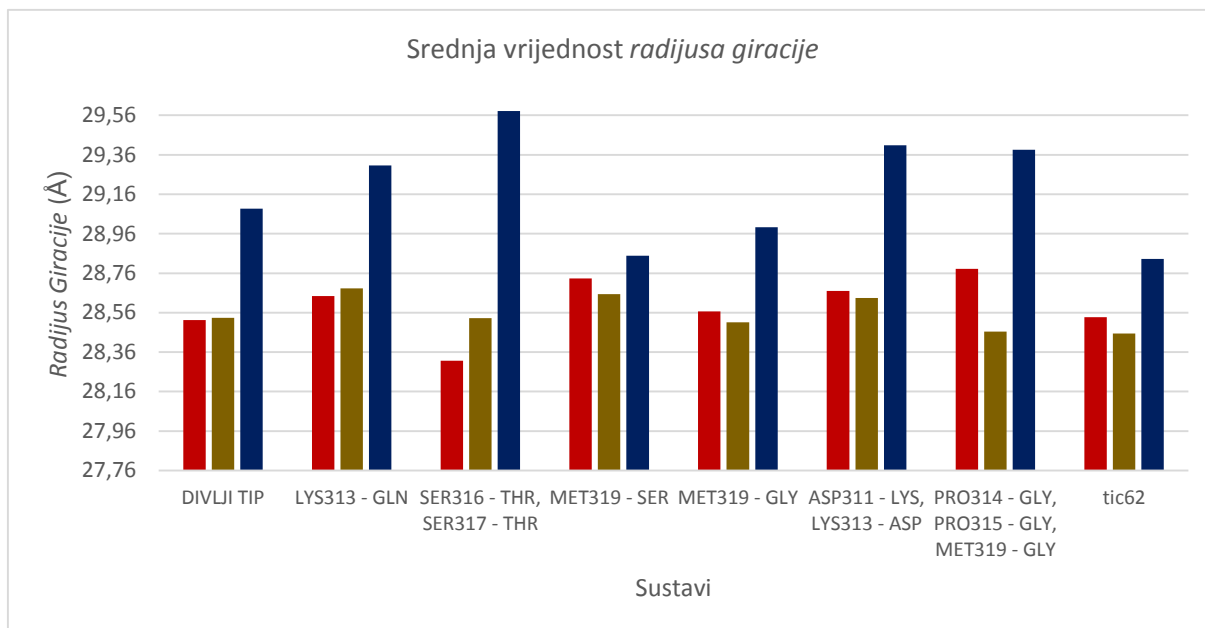


Slika 13. Srednje vrijednosti *RMSD* uz eliminaciju regija s visokim vrijednostima fluktuacije aminokiselina dobivenih analizom *RMSF* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

3.1.2 Radijus giracije i površina dostupna otapalu

Mjerenjem radijusa giracije proteinskog kompleksa tijekom simulacije procijenjena je kompaktnost dimera enzima FNR tijekom MD simulacije različitih sustava, te utjecaj koji promjena u interakciji između ITEP domene i ITEP vezne domene enzima FNR, uzrokovana uvođenjem mutacijama, ima na kompaktnost kompleksa. Vrijednosti radijusa giracije najniže su u sustavima simuliranim pri pH=6, s najnižom vrijednosti od 28,3 Å, a najviše su u sustavima pri pH=8 s najvišom vrijednosti od 29,6 Å. Iznenadujuće, oba ekstrema zabilježena su u sustavima s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr. Vrijednosti radijusa giracije proteinskog kompleksa svih sustava, sažeto su prikazane na slici 14, te se jasno vidi porast radijusa giracije u svim sustavima simuliranim pri pH=8 uz iznimku sustava s uvedenim mutacijama Met319 u Ser i Met319 u Gly, koji bilježe pad ovih vrijednosti. Kod sustava simuliranim pri pH=6 primijećen je blagi rast radijusa giracije tijekom simulacije, uz iznimku sustava s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr koji bilježi snažan pad. Sustavi simulirani pri pH=7 pokazuju relativno blago odstupanje od početne vrijednosti u oba smjera. Razlike u radijusu giracije između sustava simuliranim pri pH=6 i pH=7 najizraženije su u sustavima s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr i Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly, gdje u prvom slučaju proteinski kompleks ima niži radijus giracije pri pH=6, dok je u drugom slučaju radijus giracije niži pri pH=7. Ostali sustavi imaju zanemarive razlike u srednjoj vrijednosti radijusa giracije između pH=6 i pH=7.

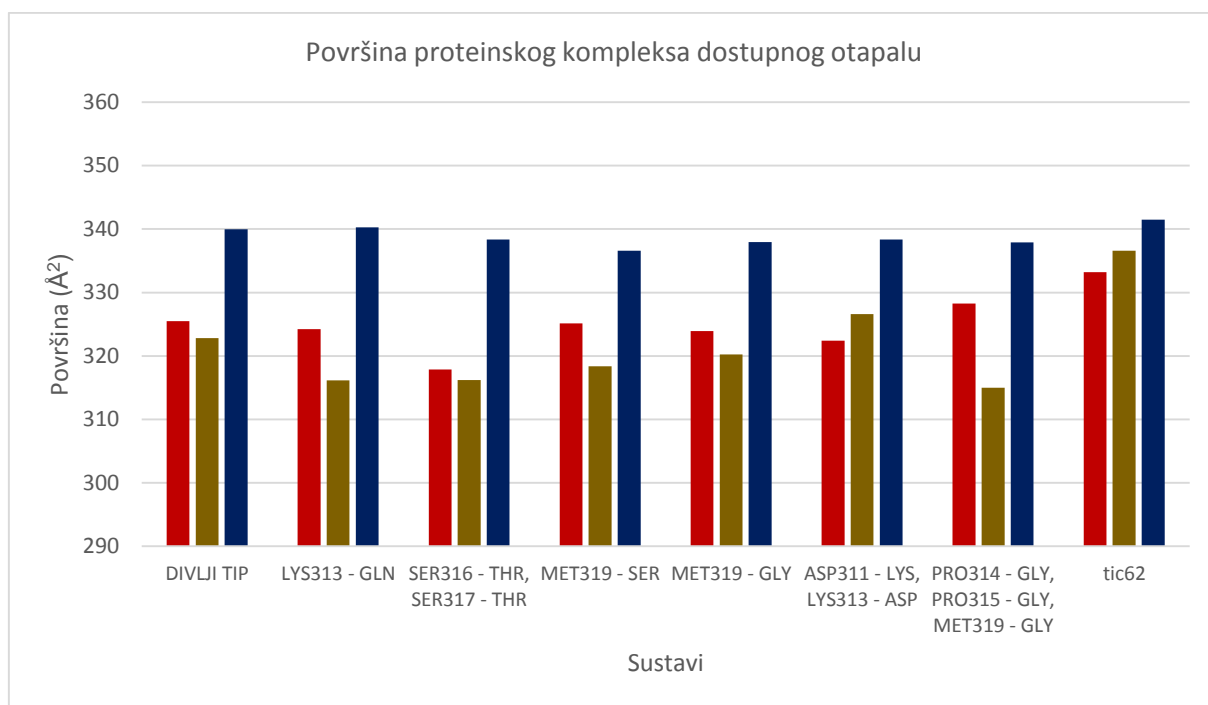
Opažene promjene potvrđuju rezultate dobivene analizom *RMSD* uz iznimku sustava divljeg tipa proteina TROL simuliranog pri pH=8 i sustava s uvedenom mutacijom Met319 u Ser u protein TROL simuliranog pri pH=8. Sustav divljeg tipa proteina TROL simuliran pri pH=8 pokazuje znatno više vrijednosti radijusa giracije od očekivanih što ukazuje da sustav nije kompaktan. Sustav s uvedenom mutacijom Met319 u Ser simuliran pri pH=8 pokazuje najmanje vrijednosti radijusa giracije od svih sustava simuliranih pri ovom pH, što je iznenadujuće s obzirom na vrlo kasno uravnoteženje ovog sustava. Detaljni rezultati mjerenja radijusa giracije prikazani su u prilogu IV.



Slika 14. Srednje vrijednosti *radijusa giracije* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH pri kojem je simuliran sustav. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

Uz mjerenje *radijusa giracije* napravljen je i izračun površine proteinskog kompleksa dostupne otapalu s pomoću kojega možemo procijeniti kvalitetu pristajanja ITEP veznih domena enzima FNR na ITEP domenu proteina TROL. Naime, porast površine proteinskog kompleksa koja je dostupna otapalu ukazuje na slabljenje nekovalentnih interakcija, prvenstveno vdW interakcija, između podjedinica proteinskog kompleksu, što može destabilizirati proteinski kompleks.

Vrijednosti površine proteinskog kompleksa dostupne otapalu najviše su u sustavima simuliranim pri pH=8, s najvišom vrijednosti od 341,5 Å², dok su najniže u sustavima simuliranim pri pH=7, s najnižom vrijednosti od 315,0 Å². Sažete vrijednosti površine proteinskog kompleksa dostupnog otapalu prikazane su na slici 15, gdje se jasno vidi očekivana pH osjetljivost vrijednosti svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa s ITEP domenom proteina TROL. Zanimljiv je izostanak pH osjetljivosti u sustavima dimera enzima FNR s FNR vezujućom domenom proteina Tic62, kao i činjenica da su izmjerene vrijednosti površine dostupne otapalu ovog proteinskog kompleksa više od vrijednosti proteinskog kompleksa s ITEP domenom divljeg tipa proteina TROL u sustavima simuliranim pri sva tri pH. Vrijednosti između ova dva proteinska kompleksa najviše se razlikuju u sustavima simuliranim pri pH=6 i pH=7.



Slika 15. Srednje vrijednosti površine proteinskog kompleksa dostupne otapalu. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH pri kojem je simuliran sustav. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

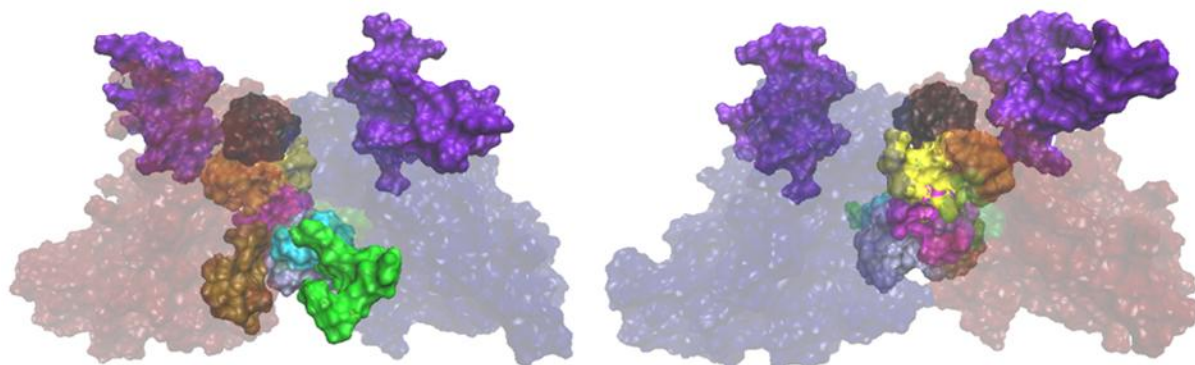
3.2 Nekovalentne interakcije u proteinskom kompleksu

3.2.1 Pregled značajnih nekovalentnih interakcija

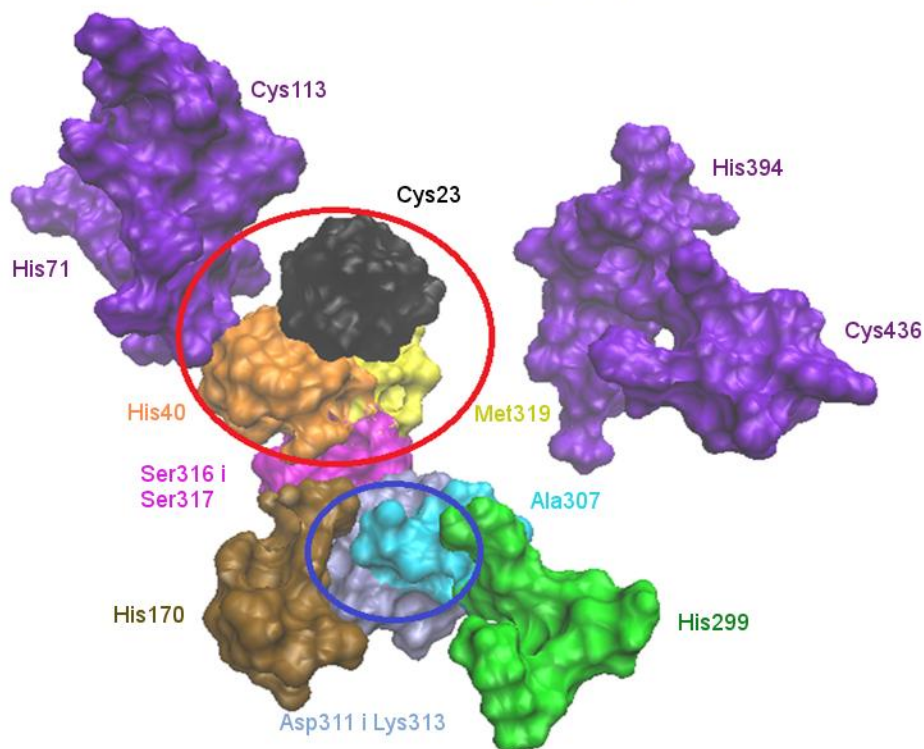
Detaljnijom analizom simuliranih sustava izdvojeno je 10 regija u strukturi proteinskog kompleksa, koje su karakteristične po izraženoj fleksibilnosti ili snažnim i stabilnim nekovalentnim interakcijama, te mrežama vodikovih veza ovisnim o pH. U većini izdvojenih regija predstavljeni rezultati opisuju interakcije između ITEP domene proteina TROL i dimera enzima FNR, uz iznimku dvije regije s visokim vrijednostima fluktuacije aminokiselina u području FAD vezujuće domene monomera A i B enzima FNR. Regije visokih vrijednosti fluktuacije pokazuju ovisnost o pH samo u monomeru B enzima FNR, gdje sekundarnu strukturu ovih regija čine više ili manje fleksibilne petlje. Iste regije monomera A enzima FNR zaprimaju strukturu stabilnih β ploča. Visoke vrijednosti fluktuacija aminokiselina ovih regija prvenstveno su uzrokovane izduženim izgledom i perifernom lokacijom u proteinskom kompleksu, kao i relativno malim brojem nekovalentnih interakcija s drugim regijama u blizini.

Mreže vodikovih veza, ovisne o pH pri kojem je sustav simuliran, stvaraju se uz aminokiseline Cys23, His40, His71, Cys113, His170, His299, Asp311, Lys313, Ser316, Ser317, Cys346, His394 i Cys436 (slika 16). Regije strukturno važnih hidrofobnih interakcija nastaje uz aminokiseline Tyr306, Tyr309, Pro314, Pro315, Ser316, Ser317 i Met 319. „Velikom hidrofobnim džepom” nazvali smo regiju bogatu izrazito stabilnim vdW interakcijama tijekom simulacija, koja se nalazi na dodirnom području između monomera FNR, a čijoj stabilnosti pridonose i aminokiseline ITEP domene. Ova regija se prostire između aminokiseline Met319, Cys23 i Cys346. „Malim hidrofobnim džepom” nazvali smo regiju izrazio stabilnih vdW interakcija, koje se stvaraju unutar karakteristične petlje ITEP domene proteina TROL, a tvore ju aminokiseline Pro305, Tyr306, Tyr309 i Leu312 (slika 16). Sekundarna struktura ove regije zadržana je neovisno o prisutnosti dimera enzima FNR, uz iznimku nekoliko sustava sa slobodnom ITEP domenom, u kojima uvedene mutacije uzrokuju destabilizaciju vdW interakcija u njoj. U sustavima s proteinskim kompleksom, „mali hidrofobni džep” širi mrežu nekovalentnih interakcija u smjeru „velikog hidrofobnog džepa”. Mreže vodikovih veza, ovisne o pH, oko aminokiselina Asp311, Lys313 i Ala307, nalaze se na suprotnoj strani ove petlje ITEP domene, u području relativno slabih vdW interakcija.

Sve navedene regije, posebno su obrađene u rezultatima istraživanja, a s ciljem preglednosti, zajednički su prikazane na slici 16. Detaljni rezultati analize započinju s nekovalentnim interakcijama fluktuirajućih regija FAD vezujuće domene monomera B enzima FNR ovisnim o pH.



a)



b)

Slika 16. a) Vizualizacija proteinskog kompleksa dimera FNR s ITEP domenom divljeg tipa TROL proteina simuliranog pri pH=6 s prikazanim položajem regija od interesa. Regije su aproksimirane na sve atome u udaljenosti do 5 Å od odabranih aminokiselina. Vizualizacija predstavlja reprezentativnu strukturu, najnapućenijeg klastera, dobivenog klaster analizom trajektorije. Sustav je prikazan s prednje i stražnje strane; **b)** Posebno obrađene regije označene različitim bojama; zelena regija uključuje izrazito dinamično područje na početku ITEP domene na čiju stabilnost utječu interakcije ovisne o pH koje se stvaraju oko ak. His299; tirkizna regija uključuje ak. Ala307; ledeno plava regija uključuje mrežu vodikovih veza ovisnu o pH oko ak. Asp311 i Lys313; smeđa regija uključuje mrežu vodikovih veza ovisnu o pH oko aminokiselina His 170; roza regija uključuje nekovalentne interakcije oko aminokiselina Ser316 i Ser317; narančasta regija uključuje mrežu vodikovih veza ovisnu o pH oko aminokiseline His40; žuta regija uključuje strukturno važne vdW interakcije oko aminokiseline Met319; crna regija uključuje mrežu vodikovih veza ovisnu o pH oko aminokiseline Cys23; Ljubičaste regije uključuju mrežu vodikovih veza ovisnu o pH oko aminokiselina Cys113, His71, Cys436 i His394, ove regije specifične su po izraženoj fleksibilnosti. Crvenim krugom označen je „veliki hidrofobni džep”. Plavim krugom označen je „mali hidrofobni džep”.

3.2.2 Nekovalentne interakcije izrazito fluktuirajućih regija, ovisne o pH

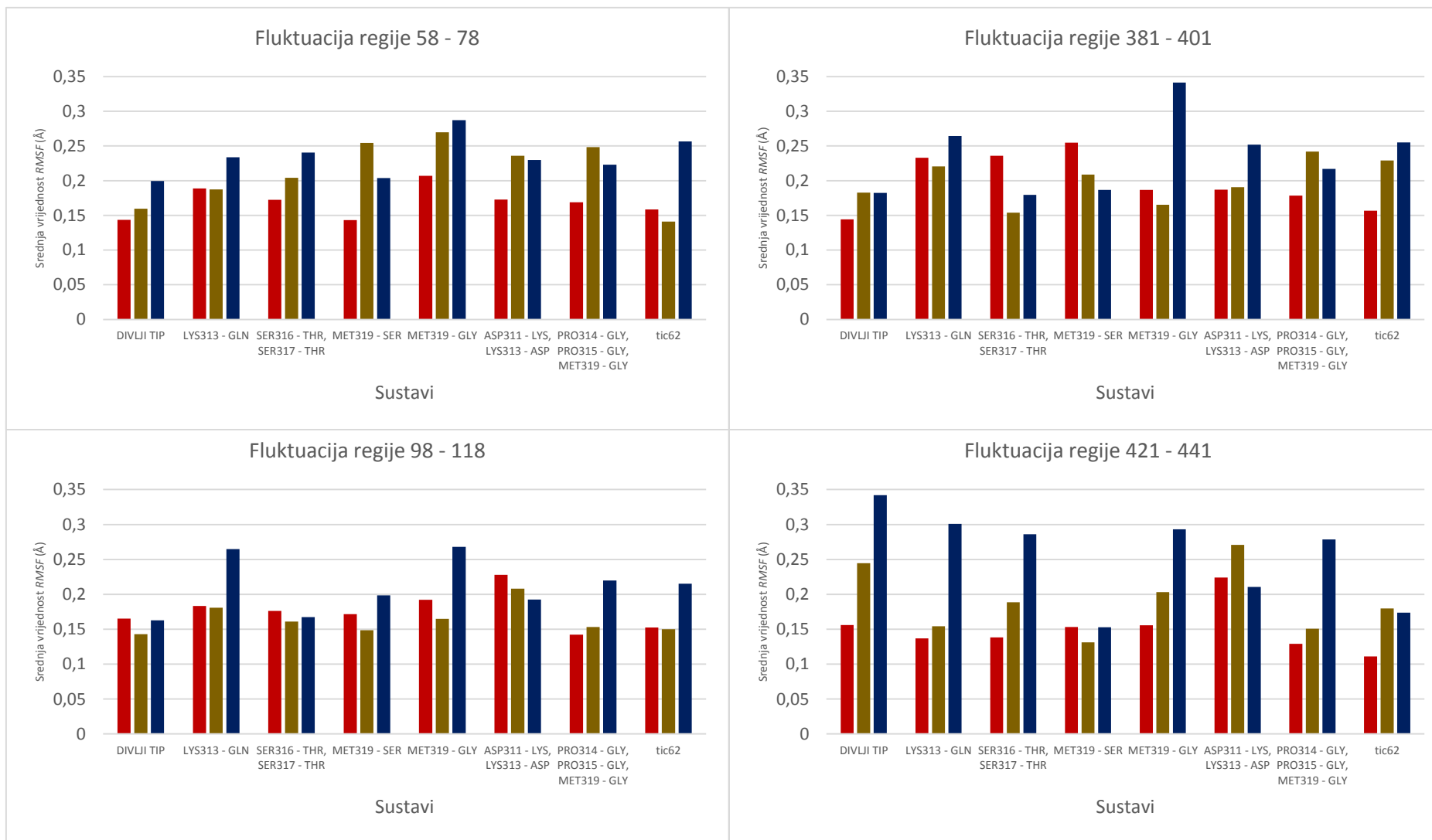
Regije proteinskog kompleksa s najizraženijim razlikama u fleksibilnosti, ovisnoj o pH, prepoznate su analizom *RMSF*, te su istražene vizualnom analizom s ciljem utvrđivanja značajnih razlika u nekovalentnim interakcijama između simuliranih sustava. Zapažena je razlika u ovisnosti fleksibilnosti dijela FAD vezujuće domene između monomera A i B o pH. Također, primijećeno je da uvođenje mutacija u ITEP domenu proteina TROL može uzrokovati promjene u pH osjetljivosti ovih regija.

Napravljena je usporedba dvije regije FAD vezujuće domene, između monomera enzima FNR, što uključuje: regiju ak. 58 – 78 i regiju ak. 98 – 118 monomera A, te regiju ak. 381 – 401 i regiju ak. 421 – 441 monomera B. Fleksibilnost ovisna o pH, povezana je s promjenama protonacijskog stanja aminokiselina cisteina (Cys113, Cys118 /Cys421, Cys441) i histidina (His71 / His394) u svim simuliranim sustavima. Promjena protonacijskog stanja navedenih aminokiselina dovodi do promjene mreže vodikovih veza unutar i između promatranih regija (slika 18 i slika 19).

U sustavima s divljim tipom proteina TROL, sekundarna struktura ovih regija mnogo je stabilnija u monomeru A, zbog čega razlika u mreži vodikovih veza između sustava s različitim pH neće uzrokovati značajnu promjenu u vrijednostima fluktuacije ovih regija. Uvođenjem mutacija u ITEP domenu proteina TROL može dovesti do pH osjetljivosti fluktuacije ovih regija monomera A, što je zabilježeno u sustavima s uvedenim mutacijama: Lys313 u Gln; Met319 u Gly; Pro314 u Gly, Pro315 u Gly i Met319 u Gly.

Za razliku od monomera A, FAD vezujuća domena monomera B pokazuje razliku u fluktuaciji ovisnoj o pH u gotovo svim simuliranim sustavima. Najizraženije razlike zabilježene su u sustavima s divljim tipom proteina TROL, dok je potpuni gubitak pH osjetljivosti zabilježen u sustavima s uvedenim mutacijama Met319 u Ser.

Srednje vrijednosti mjerenja *RMSF* navedenih regija, svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa, prikazani su na slici 17.

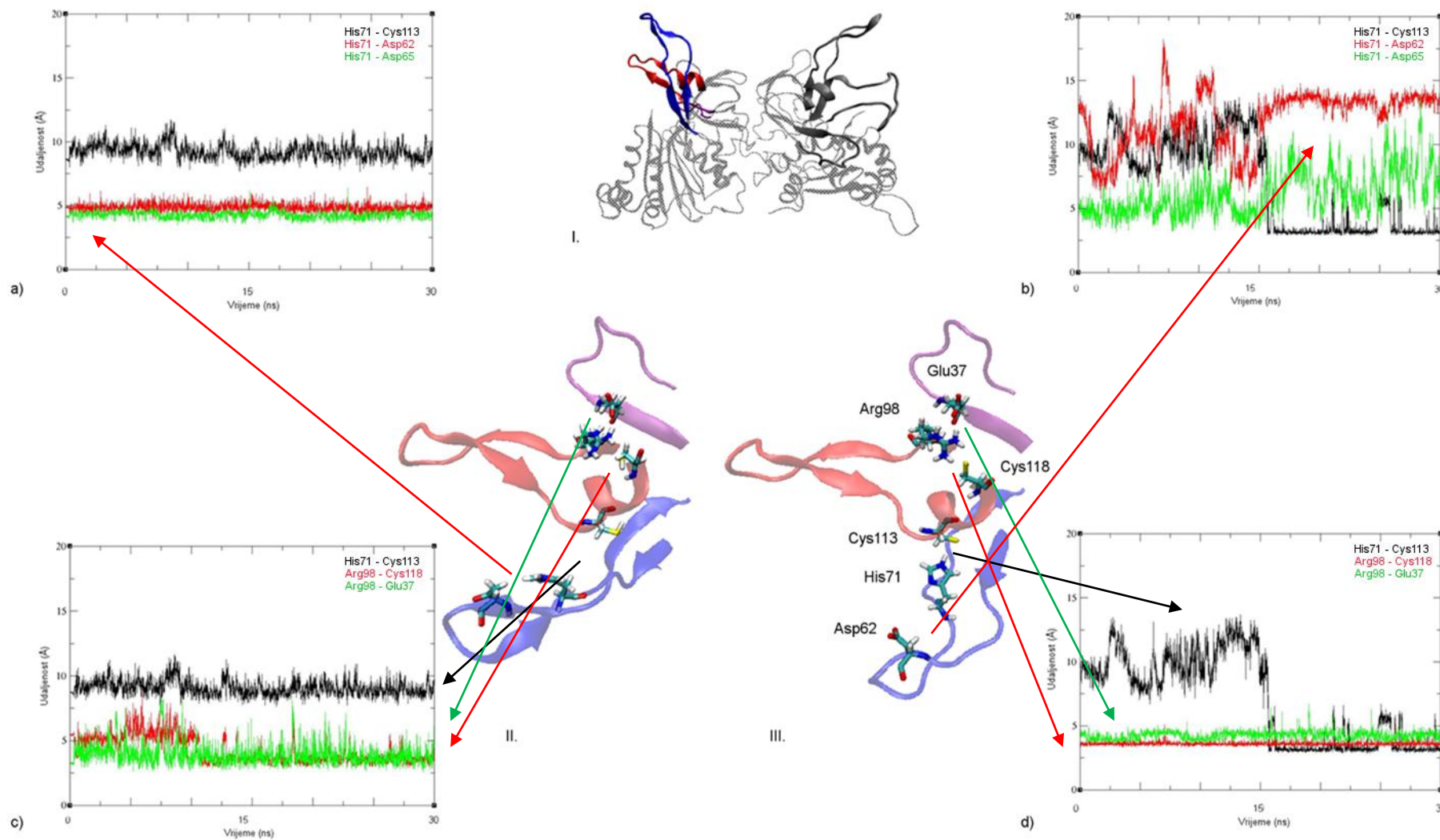


Slika 17. Srednje vrijednosti mjerenja *RMSF* najfleksibilnijih regija proteinskog kompleksa. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH pri kojem je simuliran sustav. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8. Regije 58 – 78 i 98 – 118 monomera A istovjetne su regijama 381 – 401 i 421 – 441 monomera B.

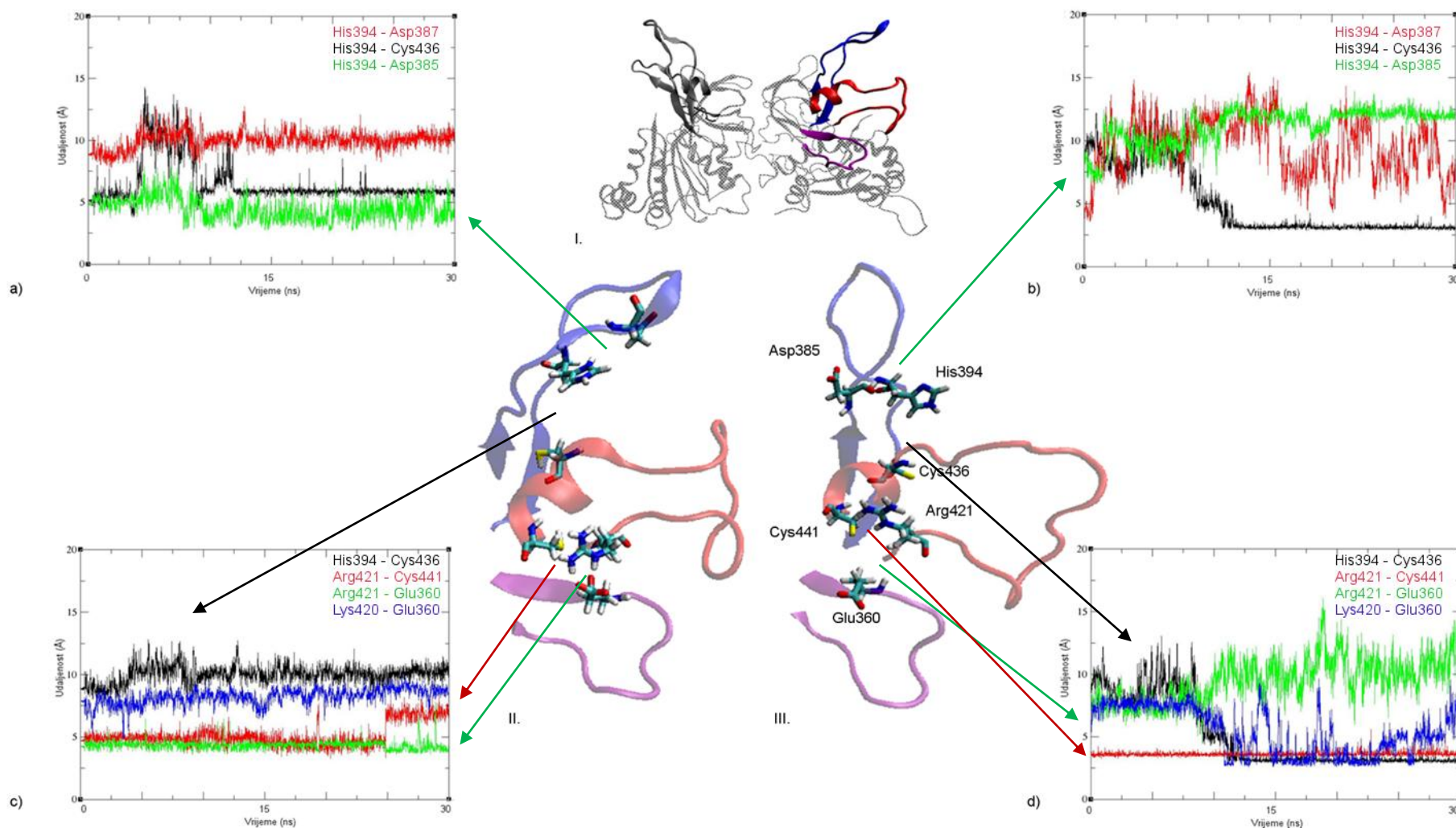
U istovjetnim regijama između ak. 58 – 78 i ak. 381 - 401, ovisno o pH sustava, histidin (His71 / His394) zauzima položaj u središtu petlje, uz petlju ili izvan nje. U sustavima pri pH=6, kada je dvostruko protoniran, histidin će ostvarivati nekovalentne interakcije s aspartatima (Asp62, Asp65/ Asp385, Asp388) što dovodi do stabilizacije petlje. Ako je jednostruko protoniran, histidin se ne uspijeva stabilizirati u središtu petlje, već odlazi na njen rub gdje stvara relativno stabilnu vodikovu vezu s okosnicom petlje. U sustavima pri pH=8, jednostruko protonirani histidin stvara snažnu vodikovu vezu s cisteinom (Cys113 / Cys421), što ga dodatno odmiče od središta petlje i dovodi do njene destabilizacije u gotovo svim simuliranim sustavima.

Uspostava stabilne vodikove veze između histidina (His71 / His394) i cisteina (Cys113 / Cys421), zabilježena je u svim sustavima simuliranim pri pH=8, no njen utjecaj na sekundarnu strukturu FAD vezujuće domene nije vidljiv u monomeru A enzima FNR, što je prikazano na slici 18. U monomeru B, stvaranje ove veze, dovodi do promjene koje onemogućuju nastanak niza nekovalentnih interakcija između aminokiselina u petlji 421 – 441, te uzrokuje njenu destabilizaciju što je prikazano na slici 19.

Na stabilnost petlje 421 – 441 utječe i stvaranje vodikove veze između deprotoniranog Cys441 i Arg421. Kako bi Arg421 došao u položaj povoljan za stvaranje vodikove veze s Cys441 potrebno je prethodno destabilizirati snažnu vodikovu vezu koju održava s Glu360, a koja ga smješta s vanjske strane petlje, nedaleko od Cys441. U takvom položaj Arg421 zauzima orijentaciju koja olakšava stvaranje vodikovih veza između aminokiselina u petlji, što cijelu petlju čini kompaktnijom i stabilnijom. Relativno mala promjena orijentacije, uz stvaranje vodikove veze s Cys441, dovode do širenja petlje, te snažno utječe na generalnu fleksibilnost FAD vezujuće domene.

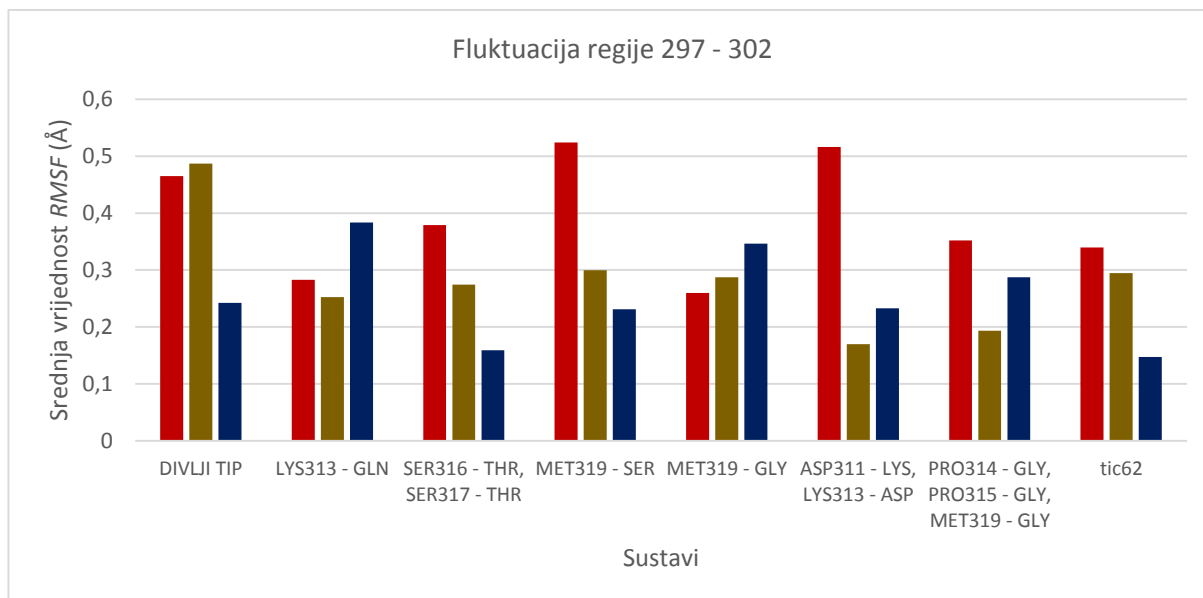


Slika 18. Usporedba izrazito fleksibilne regije FAD vezujuće domene monomera A enzima FNR u sustavu s divljim tipom proteina TROL pri pH=6 (II.) i pH=8(III.). Označene su petlje 33 – 43 (rozo); 58 – 78 (plavo); 98 – 118 (crveno). Položaj regija u proteinskom kompleksu označen je na slici I. Grafovi označavaju izračun udaljenosti između odabranih aminokiselina pri pH 6(lijevo) i pH=8 (desno). Grafovi a i b pokazuju udaljenosti između ak. His71 – Cys113 (crno), His71 – Asp62 (crveno), His71 – Asp65 (zeleno). Grafovi c i d pokazuju udaljenost između ak His71 – Cys113 (crno), Arg98 – Cys118 (crveno) i Arg98 – Glu37 (zeleno).



Slika 18. Usporedba izrazito fleksibilne regije FAD vezujuće domene monomera B enzima FNR u sustavu s divljim tipom proteina TROL pri pH=6 (II.) i pH=8(III.). Označene su petlje 354 – 364 (rozo); 381 – 401 (plavo); 421 – 441 (crveno). Položaj regija u proteinskom kompleksu označen je na slici I. Grafovi označavaju izračun udaljenosti između odabranih aminokiselina pri pH 6(lijevo) i pH=8(desno). Grafovi a i b pokazuju udaljenosti između ak. His394 – Cys436 (crveno/crno), His394 – Asp387 (crno/crveno), His394 – Asp385 (zeleno). Grafovi c i d pokazuju udaljenost između ak His394 – Cys436 (crno), Arg421 – Cys441 (crveno), Arg421 – Glu360 (zeleno), Lys420 – Glu360 (plavo).

Analizom *RMSF* prepoznata je fluktuacija aminokiselinana na početku ITEP domene proteina TROL ovisna o pH (slika 20). S obzirom na to da je ova domena odvojena od ostatka proteina, ne iznenađuje pojačana fluktuacija njenih aminokiselina, te je rezultate analize nekovalentnih interakcija ovog kraja ITEP domene potrebno tumačiti s dodatnim oprezom.

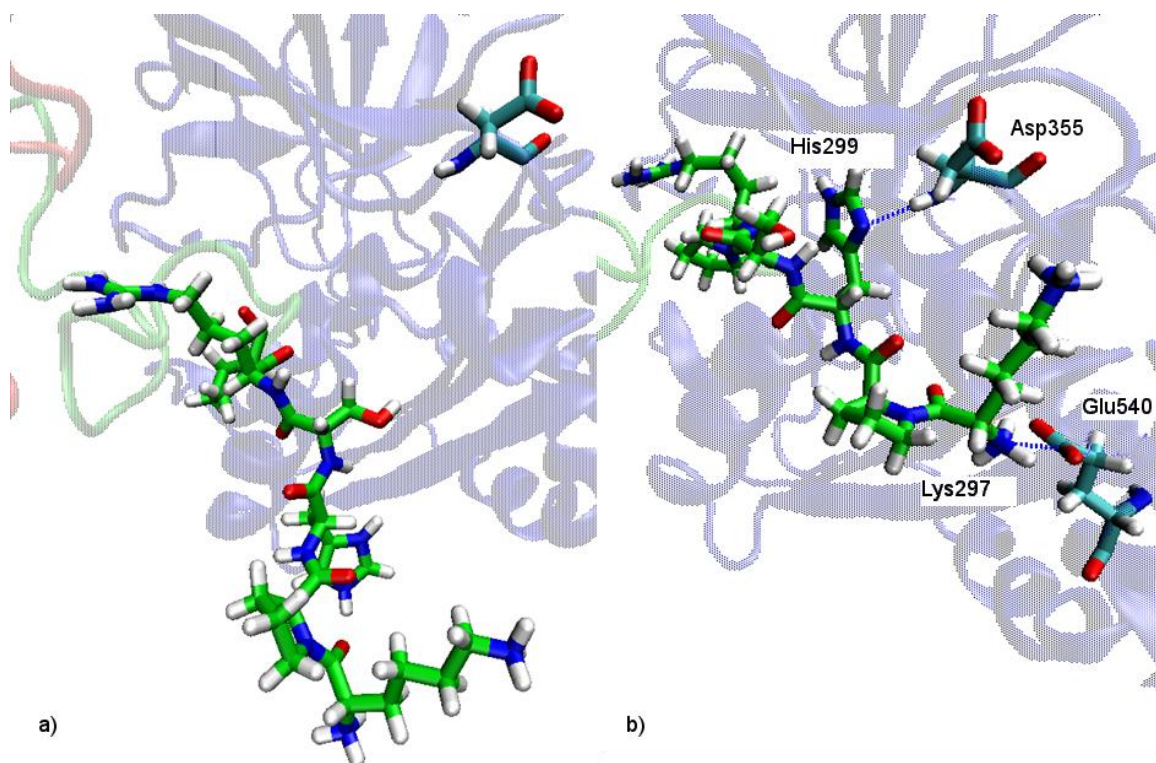


Slika 20. Srednje vrijednosti analize *RMSF* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa za regiju 297. – 302. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

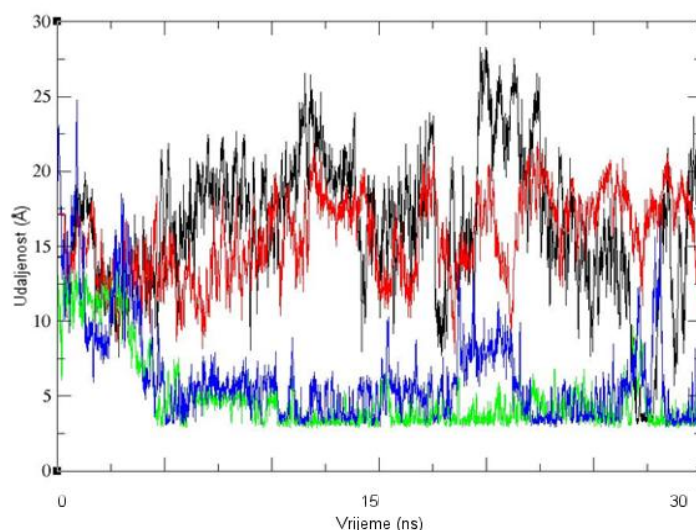
Detaljnijom analizom sustava s ITEP domenom divljeg tipa proteina TROL, utvrđeno je da stabilnost ove regije prvenstveno ovisi o vodikovoj vezi koju će jednostruko protonirani His299 stvoriti s aminokiselinom Asp355 (slika 21). Takva snažna i stabilna vodikova veza omogućuje uspostavu nove vodikove veze između Lys297 i Glu540 što rezultira trajnim približavanjem početnog dijela ITEP domene monomeru B enzima FNR. U kraćim periodima duž trajektorije svih sustava primijećeno je približavanje ovog kraja ITEP domene monomeru A enzima FNR. Tako ostvarene nekovalentne interakcije nisu dovoljno jake za uspješnu stabilizaciju ITEP domene, stoga je svako približavanje ovom monomeru relativno kratko i dinamično. Grafovi udaljenosti odabranih aminokiselina prikazani su na slici 21.

Uvođenje mutacija u ITEP domenu može utjecati na fluktuacije aminokiselina ove regije ovisnih o pH, a takve promjene primijećene su u sustavima pri pH=6 s uvedenim mutacijama Lys313 u Gln i Met319 u Gly. Zbog promjena u vezanju ITEP domene uzrokovanih uvođenjem mutacija, dolazi do pomaka početnog dijela domene na mjesto gdje His299 može stvarati alternativne vodikove veze pri pH=6. Zanimljivo je da u sustavima s istim mutacijama pri pH=8 vodikove veze s His297 nisu zabilježene, stoga je i dalje stabilnost regije ovisna o pH, no na suprotan način od sustava s ITEP domenom divljeg tipa proteina TROL. U sustavu s

uvedenom mutacijom Lys313 u Gln simuliranom pri pH=6 snažna vodikova veza stvara se između His299 i Glu521. Ova veza olakšava stvaranje vodikove veze između Lys297 i Glu525 što zajednički stabilizira regiju. U sustavu s uvedenom mutacijom Met319 u Gly simuliranom pri pH=6, uz snažne vodikove veze koje ostvaruju His299 i Glu518, te Lys297 i Glu521, stabilizaciji regije pridonose i vodikove veze između Ser300 i Glu518. Zanimljivo je da u ostalim sustavima simuliranim pri pH=6 nisu primijećene stabilne vodikove veze u ovom dijelu ITEP domene. Stoga ne iznenađuje da sa svoje četiri stabilne vodikove veze, sustav s uvedenom mutacijom Met319 u Gly, bilježi najniže vrijednosti fluktuacije aminokiselina u ovoj regiji. Zanimljivo je da sustavi s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, pokazuje izrazitu razliku u stabilnosti ove regije, pa pri pH=6 bilježe najviše, a pri pH=8 najniže vrijednosti fluktuacija aminokiselina na ovom dijelu ITEP domene. Razliku u vrijednostima fluktuacije prati i razlika u broju stabilnih vodikovih veza, pa je tako u sustavu simuliranom pri pH=6 primijećena samo jedna stabilna vodikova veza, ona između Arg301 i Asp355, dok je u sustavu simuliranom pri pH=8 zabilježeno čak pet vodikovih veza. Od spomenutih pet vodikovih veza četiri nastaju između Lys297 i okolnih aminokiselina Asp356, Ser511, Ser512 i Glu540, a jednu stvaraju His297 i Asp355. Rezultati mjerenja udaljenosti između ovih parova aminokiselina prikazani su na slici 22.



Slika 21. Stvaranje nekovalentnih interakcija ovisnih o pH, na početku ITP domene. Vodikova veza između His299 i Asp355 omogućuje uspostavu vodikove veze između Lys297 i Glu540 čime se cijela regija stabilizira uz monomer B enzima FNR. Vizualizacija predstavlja reprezentativnu strukturu, najnapučenijeg klastera, dobivenu klaster analizom trajektorije sustava divljeg tipa proteina TROL simuliranim pri pH=6 i pH=8; **a)** Sustav simuliran pri pH=6. Početak ITP domene ne uspostavlja stabilne nekovalentne interakcije; **b)** Sustav simuliran pri pH=8. Početak ITP domene stvara dvije stabilne vodikove veze.

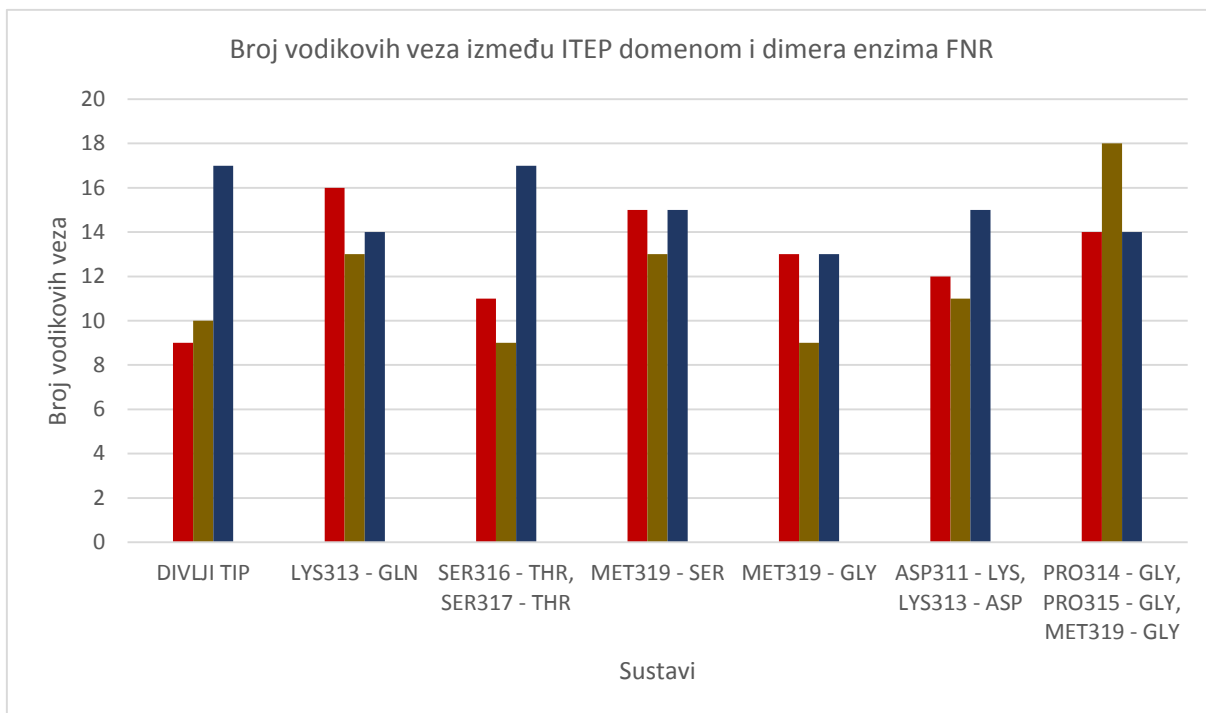


Slika 22. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITP domene proteina TROL. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: His299 – Asp355 (pH=6 – crno, pH=8 - zeleno); Lys297 – Glu540 (pH=6 – crveno, pH=8 – plavo). Mjerenja su izvršena u sustavu ITP domene divljeg tipa proteina TROL simuliranim pri pH=6 i pH=8.

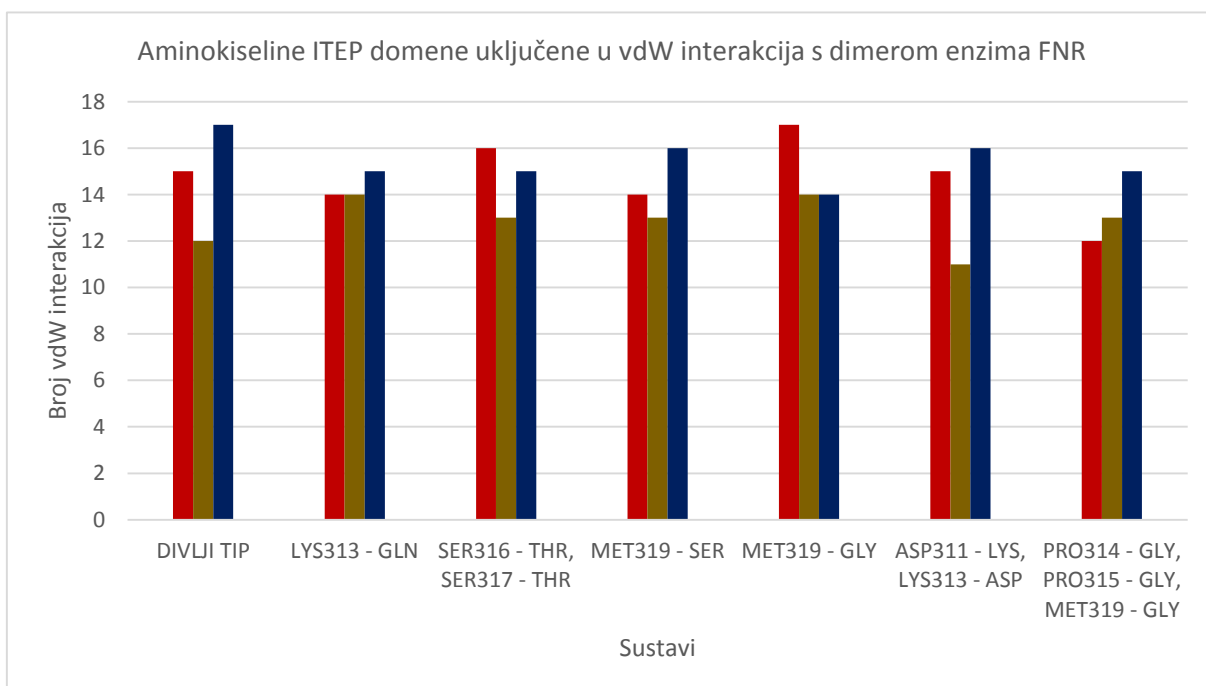
3.2.3 Pregled nekovalentnih interakcija uz ITEP domenu proteina TROL

Analiza nekovalentnih interakcija između ITEP domene proteina TROL i dimera enzima FNR temelji se na određivanju mreža vodikovih veza u koje su uključene pojedine aminokiseline ITEP domene, te određivanje područja stabilnih van der Waalsovih interakcija koje utječu na stabilnost proteinskog kompleksa (slika 23 i slika 24). Rezultati dobiveni sustavnim mjerenjem udaljenosti između aminokiselina ITEP domene i okolnih aminokiselina dimera enzima FNR svih simuliranih sustava otkrivaju mreže vodikovih veza i područja vdW interakcija čija dinamika ne utječe samo na ponašanje obližnjih, dodirnih, područja, već se njihov utjecaj širi sve do najudaljenijih dijelova proteinskog kompleksa. Takva opažanja potvrđuju i rezultati mjerenja utjecaja kojega uvođenje mutacija ima na *RMSF* vrijednosti sustava. Proteinski kompleks pokazuje sposobnost adaptacije na uvođenje mutacija s ciljem destabilizacije mreža vodikovih veza ovisnih o pH, tako da se izgubljene interakcije često kompenziraju stvaranjem novih interakcija, zbog čega značajniji utjecaj na generalnu stabilnost proteinskog kompleksa izostaje. Izrazite promjene u stabilnosti proteinskog kompleksa primijećene su prvenstveno u sustavima s uvedenim mutacijama koje ciljaju područja stabilnih vdW interakcija, kao što je slučaj u sustavima s uvedenim mutacijama Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly, u sustavima s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, te u sustavima s uvedenim mutacijama Met319 u Ser. Iako ove mutacije ne utječu direktno na mreže vodikovih veza ovisne o pH, značajna destabilizacija sustava je primijećena samo pri pH=8.

Uz iznimku aminokiseline His 299, koja se nalazi na početku ITEP domene proteina TROL, sve ostale aminokiseline čije se protonacijsko stanje mijenja u intervalu između pH=6 i pH=8, pripadaju dimeru enzima FNR. U većini slučajeva ove aminokiseline u suradnji s okolnim aminokiselinama dimera enzima FNR uspostavljaju mreže vodikovih veza ovisne o pH koje sežu do ITEP domene proteina TROL. Zbog toga, sposobnost stvaranja interakcija ovisnih o pH, između aminokiselina enzima FNR i aminokiselina ITEP domene proteina TROL, ponajviše ovisi o dinamici interakcija aminokiselina unutar enzima FNR. Opisano ponašanja primijećeno je u mreži vodikovih veza ovisnoj o pH koja nastaje oko His170 u sustavima s divljim tipom proteina TROL, a čija dinamika određuje položaj Lys169, koji je sposoban stvoriti interakcije s aminokiselinom Ala307 ITEP domene proteina TROL. Drugi slučaj ovog ponašanja je mreža vodikovih veza ovisna o pH koja nastaje oko His493 u sustavima s divljim tipom proteina TROL, a čija protoniranost i orijentacija određuje položaj Glu491, koji je sposoban stvoriti snažnu vodikovu vezu s aminokiselinom Lys313 ITEP domene proteina TROL.



Slika 23. Broj stabilnih vodikovih veza između aminokiselina ITEP domene protein TROL i dimera enzima FNR u svim sustavima proteinskog kompleksa. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.



Slika 24. Broj aminokiselina ITEP domene proteina TROL uključenih u vdW interakcije s dimerom enzima FNR u svim sustavima proteinskog kompleksa. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

Gotovo su svi histidini i cisteini dimera FNR proteina u proteinskom kompleksu relativno udaljeni od ITEP domene proteina TROL. S obzirom na to da histidini i cisteini promjenom svoje protonacije, u pH području 6 – 8, dovode do promjene u mrežama vodikovih veza kroz proteinski kompleks, iznimno su važan faktor u pH osjetljivosti. Zbog relativno velike udaljenosti ovih aminokiselina od ITEP domene, vrlo je teško oslabiti pH osjetljivost, mreža vodikovih veza, uvođenjem mutacija u ITEP domenu. Mreže vodikovih veza pokazuju i visoku adaptivnost s ciljem očuvanja stabilnosti proteinskog kompleksa, što znatno otežava pokušaje destabilizacije ciljanih regija, uvođenjem mutacija u ITEP domenu. Takva destabilizacija moguća je samo u specifičnim slučajevima koji će biti objašnjeni u daljnjem tekstu, a koji su prepoznati proučavanjem dinamike interakcija ovisnih o pH između podjedinica ovog proteinskog kompleksa u sustavima s ITEP domene divljeg tipa proteina TROL. Iznimka prepoznatog fenomena je snažna i stabilna vodikova veza, ovisna o pH, koju His40 monomera A, enzima FNR stvara direktno s Pro318 ITEP domene proteina TROL u svim simuliranim sustavima pri pH6. Unatoč tome, destabilizacija ove veze uvođenjem mutacija u Pro318 nije nužno moguća, zato što je veza ostvarena s atomom kisika u proteinskoj okosnici ITEP domene, a kojeg uvođenje mutacije neće promijeniti.

U tablici 2. sažeto su prikazani rezultati analize nekovalentnih interakcija uz ITEP domenu. Nevalentne interakcije između dimera enzima FNR s ITEP domenom proteina TROL pokazuju najveću stabilnost u dva intervala, Leu303 – Pro310 i Ser316 – Gln322. Većina interakcija ovih područja ostvaruju se samo s jednim od monomera enzima FNR, uz iznimku interakcija u blizini aminokiseline Met319. Regija oko Met319 u većini simuliranih sustava pokazuje izrazitu stabilnost, prvenstveno uzrokovanu velikim brojem vdW interakcijama između monomera enzima FNR. Čak i u slučajevima najveće destabilizacije proteinskog kompleksa, primijećene u sustavu s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr ovo područje, koje spada pod „veliki hidrofobni džep” ne pokazuje znakove destabilizacije. Aminokiseline His i Cys, jedine čija se protoniranost mijenja između simuliranih sustava, nalaze se na rubovima ovog područja, no efekt koji njihova protoniranost ima na stabilnost vdW interakcija ovog područja nije značajna. Od sustava s ITEP domenom, najizraženiji utjecaj koji, mreže vodikovih veza ovisne o pH, imaju na stabilnost „velikog hidrofobnog džepa” prepoznat je u sustavima divljeg tipa proteina TROL, gdje razlika u protonaciji Cys23 između sustava s različitim pH, uzrokuje relativno snažno odmicanje regije Leu120 – Glu125 od „velikog hidrofobnog džepa”. Ovo odmicanje zasigurno smanjuje jačinu vdW interakcija u „velikom hidrofobnom džepu”, no samo po sebi, ne uzrokuje značajnu destabilizaciju proteinskog kompleksa. Iznenadujuće, generalno najsnažnija destabilizacija „velikog hidrofobnog džepa” zabilježena je u sustavu s FNR vezujućom domenom proteina Tic62, simuliranim pri pH=8, gdje dolazi do gubitka približno 80% svih vdW interakcija u regiji.

Stabilnost proteinskog kompleksa u ovom slučaju ipak nije osjetno narušena, što potvrđuje mjerenje radijusa giracije, kao i analiza nekovalentnih interakcija, koja pokazuje sličan broj vodikovih veza i vdW interakcija s FNR veznom domenom u sva tri sustava. Značajna razlika u mreži vodikovih veza uz Cys23 primijećena je i u ovom slučaju.

Tablica 2. Sažeti prikaz rezultata analize nekovalentnih interakcija uz ITEP domenu proteina TROL. Sustavi su označeni bojama ovisno o pH. Crvena boja označava sustave pri pH=6, smeđa sustave pri pH=7, a plava sustave pri pH=8. Svaki broj u tablici, veći od nule, označava jednu mrežu vodikovih veza, dok iznos broja označava broj direktnih vodikovih veza stvorenih s aminokiselinom ITEP domene; crveni brojevi označavaju mutacije. Svaka žuto obojena kućica označava vdW interakcije s aminokiselinama dimera enzima FNR. Na kraju tablice prikazan je ukupan broj vodikovih veza i vdW interakcija za svaki sustav.

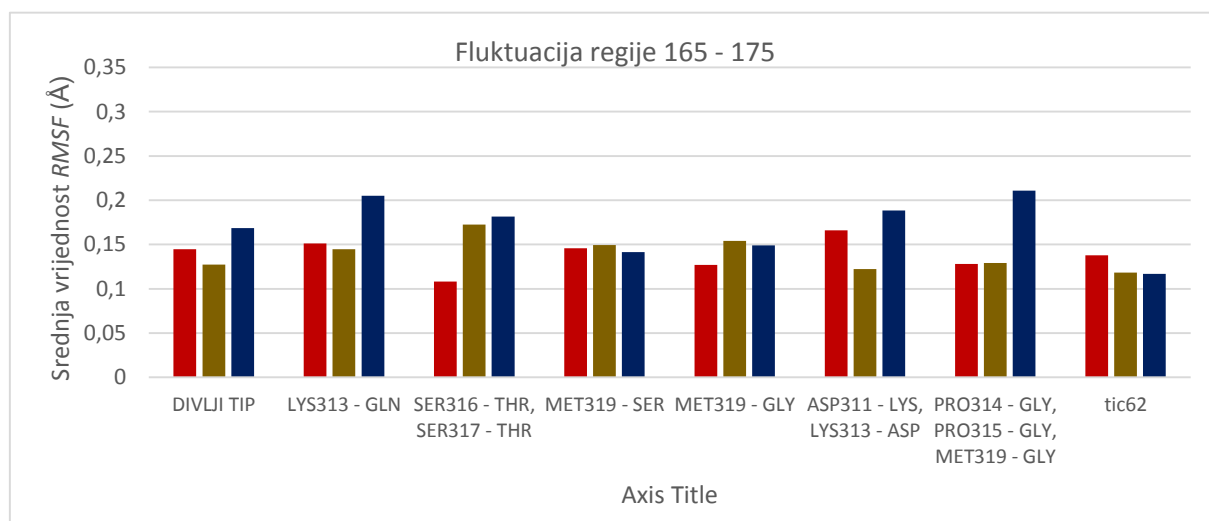
SUSTAV / AMINOKISELINA	Lys297	Pro298	His299	Ser300	Arg301	Pro302	Leu303	Ser304	Pro305	Tyr306	Ala307	Ser308	Tyr309	Pro310	Asp311	Leu312	Lys313	Pro314	Pro315	Ser316	Ser317	Pro318	Met319	Pro320	Ser321	Gln322	Pro323	UKUPNO	UKUPNO	
pH6 DIVLJI TIP	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	9	15	
pH6 Lys313-Gln	1	0	1	0	0	0	1	2	0	1	0	1	0	0	2	0	2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	16	14	
pH6 Ser316-Thr, Ser317-Thr	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	11	16
pH6 Met319-Gly	1	0	1	2	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	1	0	15	14	
pH6 Met319-Ser	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	13	17	
pH6 Pro314_315_Met319-Gly	0	0	0	0	0	0	1	3	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	1	1	14	12	
pH6 Asp311-Lys, Lys313-Asp	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	12	15	
pH6 TIC62	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0			7	12	
pH7 DIVLJI TIP	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	10	12	
pH7 Lys313-Gln	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	13	14	
pH7 Ser316-Thr, Ser317-HR	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	9	13
pH7 Met319-Gly	0	0	0	0	1	0	2	2	0	1	0	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	13	13	
pH7 Met319-Ser	0	0	0	0	1	0	2	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	9	14	
pH7 Pro314_315_Met319-Gly	0	0	0	0	1	0	1	3	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	11	11
pH7 Asp311-Lys, Lys313-Asp	3	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	18	13	
pH7 TIC62	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	2	0	1	0	1	2	1	0	0	1	1	0			15	12	
pH8 DIVLJI TIP	1	0	1	0	0	0	2	2	0	2	1	0	0	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	17	17	
pH8 Lys313-Gln	1	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	14	15	
pH8 Ser316-Thr, Ser317-Thr	2	2	1	0	0	0	1	3	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	17	15	
pH8 Met319-Gly	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2	1	1	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	15	16	
pH8 Met319-Ser	2	0	1	0	1	0	1	3	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	13	14	
pH8 Pro314_315_Met319-Gly	1	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	2	1	0	15	15	
pH8 Asp311-Lys, Lys313-Asp	3	0	1	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	14	16	
pH8 TIC62	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0			11	14	

3.2.4 Nekovalentne interakcije uz ITEP domenu proteina TROL, ovisne o pH

Nekovalentne, interakcije uz ITEP domenu proteina TROL ovisne o pH, uključuju mreže vodikovih veza i obližnjih vdW interakcije koje su, u ovom poglavlju, predstavljene kroz 4 zasebne grupe. Grupe nekovalentnih interakcija ovisnih o pH okružuju aminokiseline His299, Ala307 i Pro310, Asp311 i Lys313, te Ser308 i Pro318. Iako su navede aminokiseline prostorno bliske, svaka grupa interakcija obuhvaća specifičan dio ITEP vezne domene enzima FNR. S obzirom na to da je grupa His299 opisana u prethodnom poglavlju, ovdje neće biti spominjana.

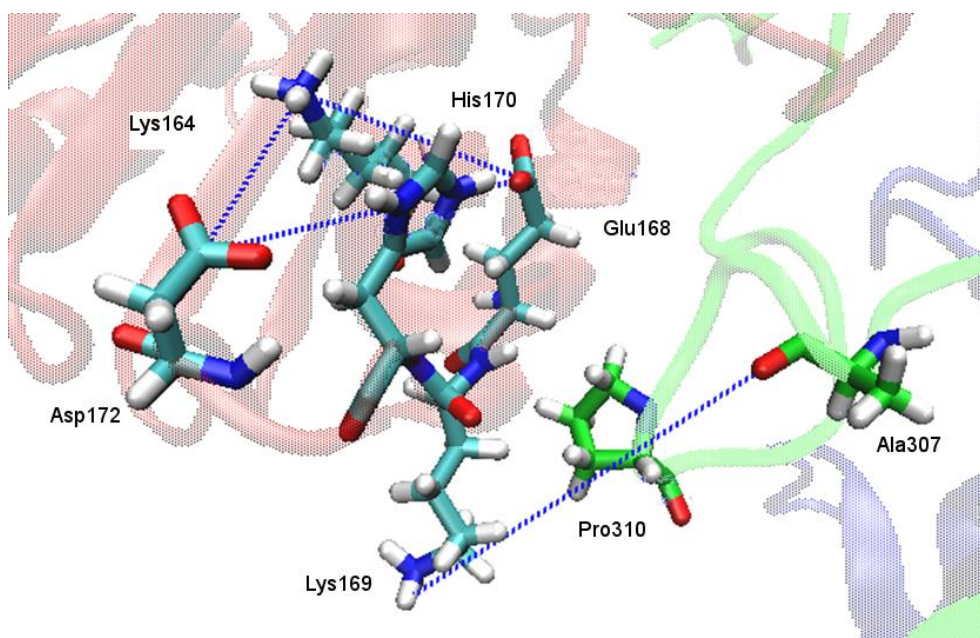
Prva grupa interakcija uključuje dvije aminokiseline ITEP domene, Ala307 i Pro310. Uz njih, grupa se sastoji od nekoliko aminokiselina Monomer A enzima FNR, redom: Lys164, Glu168, Lys169, His170 i Asp172. Središnja aminokiselina ove mreže vodikovih veza ovisne o pH je His170, dok Lys169 ulazi u direktan kontakt s ITEP domenom, te unatoč svojoj blizini većem broju aminokiselina ITEP domene, stvara relativno stabilnu vodikovu vezu samo s Ala307.

U sustavu ITEP domene divljeg tipa TROL proteina, simuliranom pri pH=6, dvostruko protonirani His170 stvara snažnu vodikovu vezu s Glu168 i manje stabilnu vodikovu vezu s Asp172 (slika 29). Lys164 pomaže održati pravilnu orijentaciju Glu168 i Asp172, čime se dodatno osigurava relativno stabilna orijentacija His170. Stabilnost ove petlje potvrđuju i vrijednosti mjerenja *RMSF* aminokiselina regije (slika 25). Vrijednosti su slične u svim sustavima, uz iznimku sustava s uvedenom mutacijom Lys313 u Gln, simuliranom pri pH=8, kod kojeg je primijećen snažan rast vrijednosti fluktuacije aminokiselina u petlji. Primijećena je i značajno sniženje vrijednosti fluktuacije u sustavu s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, simuliranom pri pH=6.

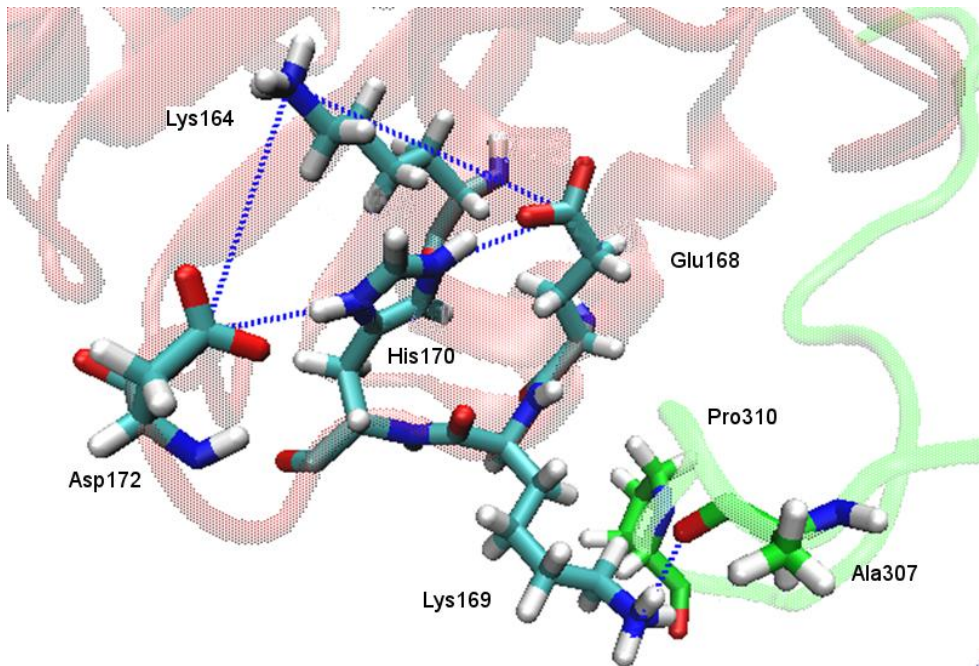


Slika 25. Srednje vrijednosti analize *RMSF* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa za regiju 165. – 175. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

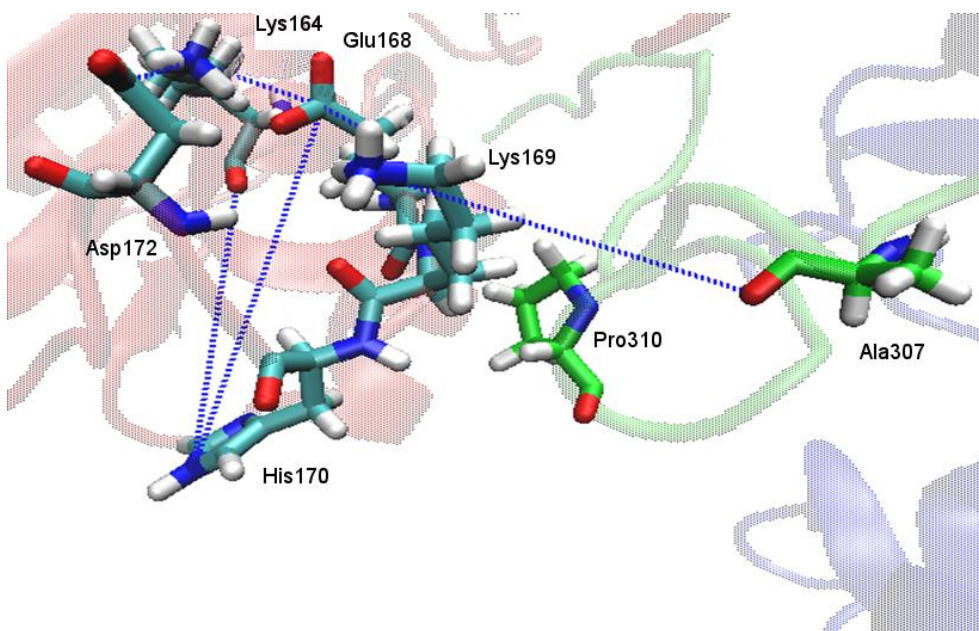
Kao aminokiselina regije, najbliža ITEP domeni, Lys169 ostvaruje vdW interakcije s Pro310 koji ju blago usmjerava prema Ala307 (slika 26). Nakon određenog perioda stabilizacije, Lys169 i Ala307 stvaraju vodikovu vezu (slika 27). Period stabilizacije je potreban zbog utjecaja koji promjene u položaju His170 i Asp172 imaju na položaj lizina. Naime, promjena orijentacije koju His170 zauzima prema Asp172 uzrokuje promjene u okosnici petlje monomera A enzima FNR na kojoj se veći dio grupe nalazi. Takve promjene direktno određuje orijentaciju koju zauzima Lys169 što se najbolje vidi u sustavu s ITEP domenom divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=8 (slika 28). U ovom sustavu, u zadnjih 5 ns simulacije, dolazi do značajne promjene položaja His170, koji iz središnje pozicije u grupi prelazi na suprotnu stranu okosnice petlje. Zbog takve promjene, dolazi do trenutnog udaljavanja Lys169 od ITEP domene. Udaljeni Lys169 stvara snažnu vodikovu vezu s Glu168 te ostaje takvoj poziciji sve do završetka simulacije. Grafovi udaljenosti između odabranih parova aminokiselina prikazani su na slikama 29 i 30.



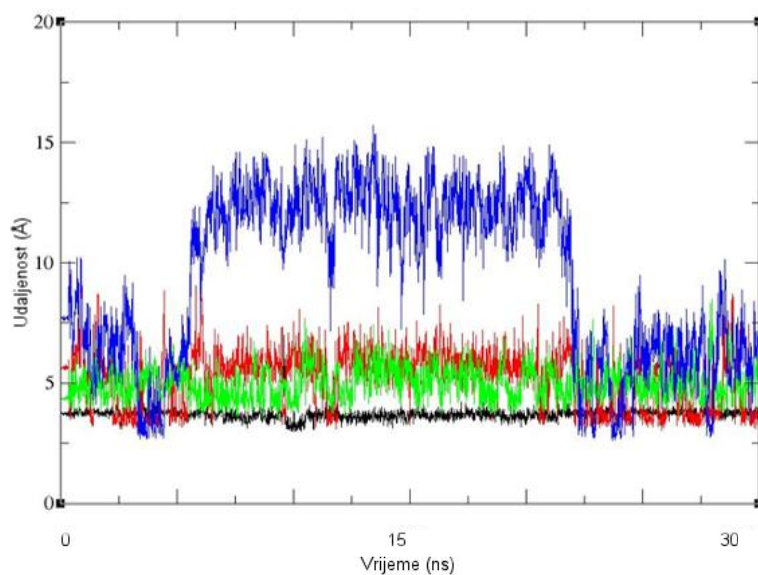
Slika 26. Nekovalentne, interakcije u grupi Ala307, ovisne o pH. Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITEP domene divljeg tipa proteina TROL, simuliran pri pH=6. Orijentacija koju His170 zauzima prema Asp172 uzrokuje promjene u okosnici petlje monomera A enzima FNR, što utječe na stabilnost vodikove veze između Lys169 i Ala307. Lys169 ostvaruje vdW interakcija s Pro310 te započinje usmjeravanje prema Ala307. Asp172 se ne nalazi na povoljnoj udaljenosti za interakciju s His170.



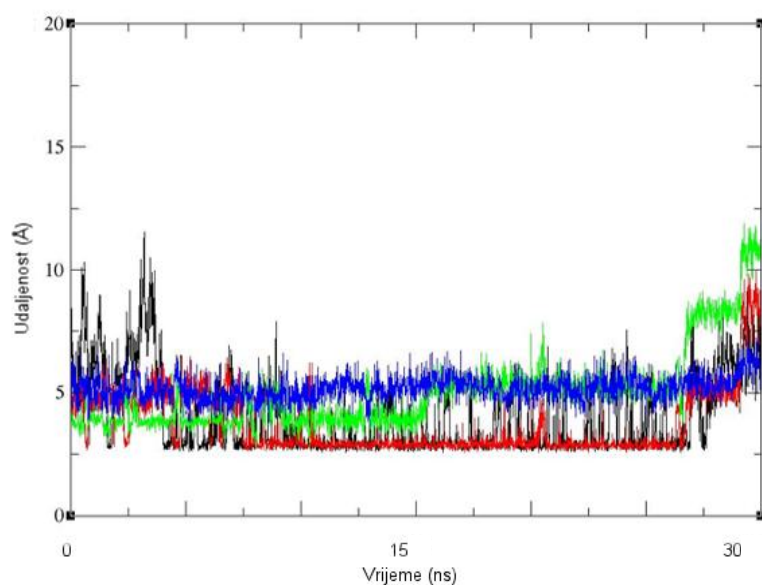
Slika 27. Nekovalentne, interakcije u grupi Ala307, ovisne o pH. Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITEP domene divljeg tipa proteina TROL, simuliran pri pH=6. U prikazanom trenutku Asp172 se nalazi u povoljnom položaju s obzirom na His170, te Lys169 stvara vodikovu vezu s Ala307. VdW interakcije s Pro310 su i dalje prisutne.



Slika 28. Nekovalentne, interakcije u grupi Ala307, ovisne o pH. Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITEP domene divljeg tipa proteina TROL, simuliran pri pH=8. U zadnjih 5 ns MD simulacije, jednostruko protonirani His170 izlazi iz središnje pozicije, te odlazi na vanjsku stranu petlje. Ova promjena uzrokuje trenutno odmicanje Lys169 od ITEP domene, te nastanak nove, snažne vodikove veze između Lys169 i Glu168. U isto vrijeme snažne vodikove veze Glu168 i Asp172 ostvaruju i s Lys164.



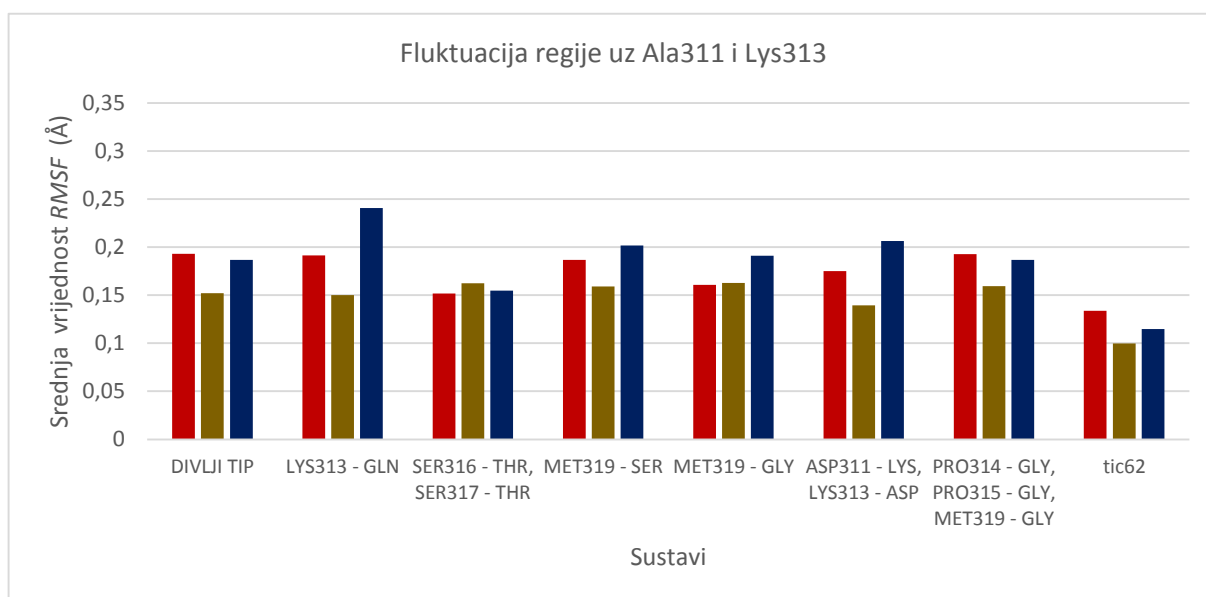
Slika 29. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene proteina TROL, simuliranog pri pH=6. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: His170 – Glu168 (crno); Pro310 – Lys169 (zeleno); His170 – Asp172 (crveno); Ala307 – Lys169 (plavo).



Slika 30. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene proteina TROL, simuliranog pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: His170 – Glu168 (crveno); Pro310 – Lys169 (plavo); His170 – Asp172 (crveno); Ala307 – Lys169 (zeleno).

Iduća grupa interakcija uključuje aminokiseline ITEP domene Asp311 i Lys313, te aminokiseline monomera B enzima FNR, redom: Phe490, Glu491, His493 i Lys522. Ključna aminokiselina za ove mreže vodikovih veza ovisnih o pH je His493, dok Phe490, Glu491 i Lys522 ulaze u direktan kontakt s ITEP domenom.

Rezultati mjerenja *RMSF* ove regije pokazuju najveću razliku između sustava s uvedenim mutacijama Lys313 u Gln, dok je slična, ali nešto manja razlika primijećena u sustavima s uvedenim mutacijama Asp311 u Lys, Lys313 u Asp (slika 31). Takvi rezultati ne iznenađuju s obzirom na to da su mutirane aminokiseline direktno uključene u ovu grupu interakcija. Zanimljivo je da sustavi FNR vezujuće domene proteina Tic62 pokazuju znatno niže vrijednosti fluktuacije u aminokiselinama ove regije u usporedbi s ITEP domenom proteina TROL. Zbog razlike u primarnoj sekvenci između FNR vezujuće domene Tic62 i ITEP domene proteina TROL, dolazi do stvaranja alternativnih nekovalentnih interakcija s dimerom enzima FNR. Uz iznimku visoko fluktuirajućih regija FAD vezujuće domene, cijeli proteinski kompleks pokazuje veću stabilnost u sustavima s FNR vezujućom domenom proteina Tic62.



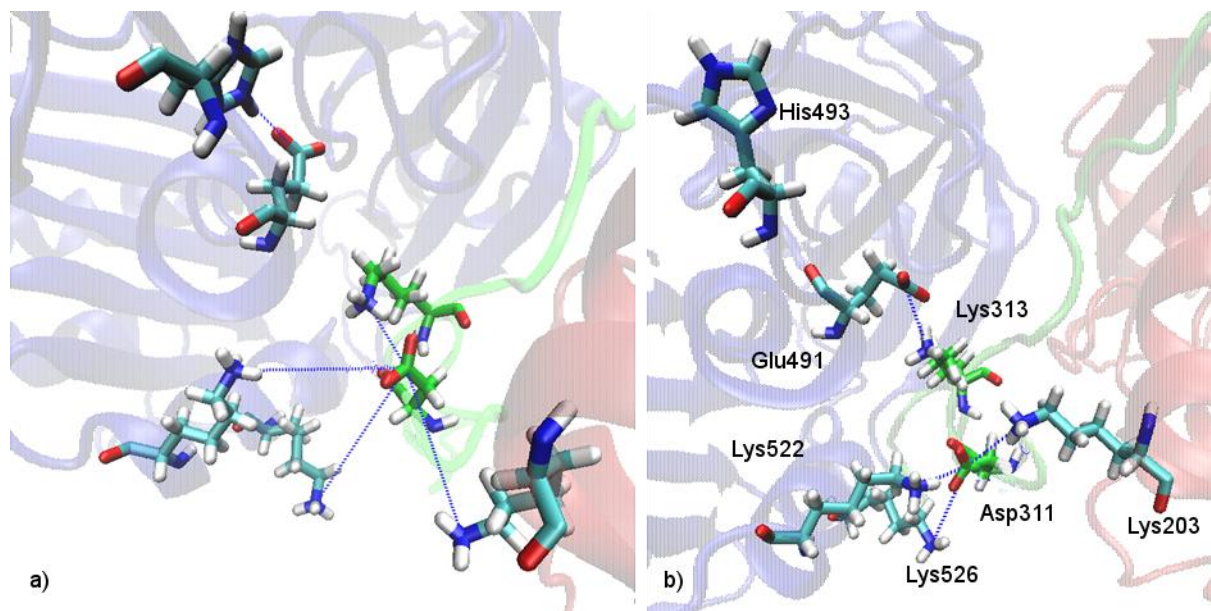
Slika 31. Srednje vrijednosti analize *RMSF* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa za regiju uz Ala311 i Lys313. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

Primijećena su dva distinktna stanja mreža vodikovih veza u ovoj grupi interakcija, a njihova stabilnost potvrđena je i relativno niskim varijacijama u vrijednostima analize *RMSF* različitih sustava. Naime, uočena promjena u konformaciji regije pri različitim pH, uzrokovana je nastankom dvije različite mreže stabilnih vodikovih veza, od kojih niti jedna ne dopušta značajnu fluktuaciju aminokiselina u svojoj blizini. Unatoč niskoj fluktuaciji regije, ova grupa interakcija pokazuje utjecaj na udaljenost monomera B enzima FNR od ITEP domene, a time i na stabilnost proteinskog kompleksa.

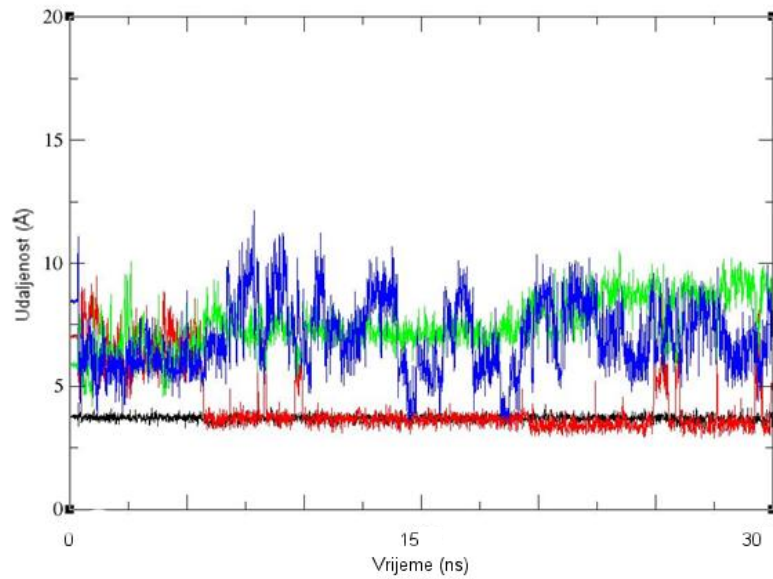
U prvom stanju mreže vodikovih veza, karakterističnom za sustave pri pH=6, Asp311 i Lys313 međusobno stvaraju stabilnu vodikovu vezu, dok u drugom stanju, u sustavima pri pH=7 i pH=8, obje aminokiseline stvaraju stabilne vodikove veze s dimerom enzima FNR.

U sustavu ITEP domene divljeg tipa proteina TROL pri pH=6, dvostruko protonirani His493 stvara snažnu i stabilnu vodikovu vezu s Glu491. Takva veza udaljava Glu491 od ITEP domene te on nije sposoban vezati Lys313. U isto vrijeme, Lys313 ne uspijeva ostvariti stabilnu vodikovu vezu s drugim aminokiselinama dimera enzima FNR, te se okreće prema Asp311 s kojim stvara stabilnu i snažnu vodikovu vezu. Tako vezan, Asp311 ne ulazi u interakciju s dimerom enzima FNR. Iako ne ostvaruje vodikove veze, orijentacija Lys313 vezanog za Asp311 omogućuje mu stvaranje vdW interakcija s monomerom B enzima FNR (slika 32).

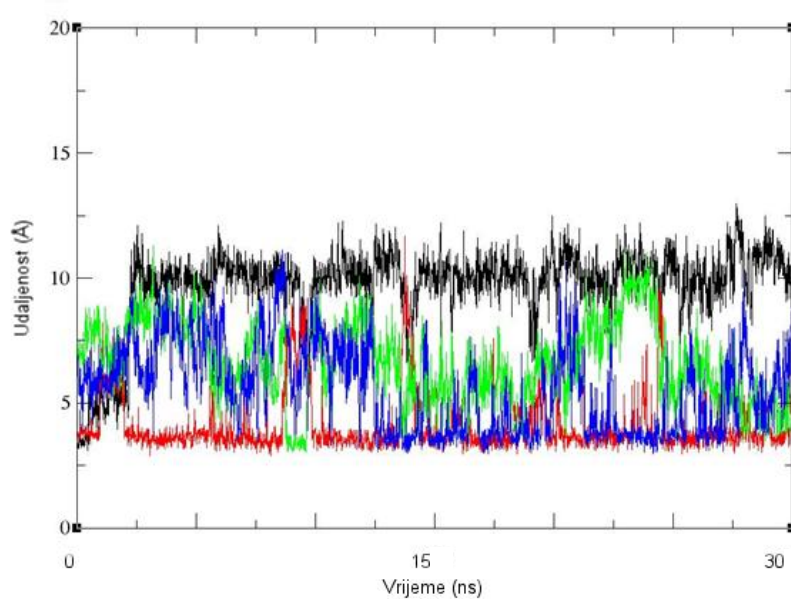
U sustavima ITEP domene divljeg tipa proteina TROL pri pH=7 i pH=8, jednostruko protonirani His493 ne ulazi u interakciju s Glu491, koji se pomiče prema ITEP domeni. Glu491, uz pomoć Phe490 stvara snažnu i stabilnu vodikovu vezu s Lys313. Uspostava takve vodikove veze oslobađa Asp311 koji naizmjenice stvara vodikove veze s obližnjim lizinima oba monomera enzima FNR, uključujući Lys522, Lys526 i Lys203 (slika 32). Grafovi udaljenosti između aminokiselina Asp311 i Lys522, Lys526 i Lys203, te Lys313 u Glu491 u sustavima pri pH=6 i 8 prikazani su na slikama 33 i 34.



Slika 32. Dva stanja mreže vodikovih veza uz Asp311 i Lys313. Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITEP domene divljeg tipa proteina TROL. **a)** Sustav simuliran pri pH=6. Održava se stabilna vodikova veza između Asp311 i Lys313. **b)** Sustav simuliran pri pH=8. Asp311 i Lys313 vezani su s dimerom FNR.



Slika 33. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene proteina TROL, simuliranom pri pH=6. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: His493 – Glu491 (crno); Asp311 – Lys313 (crveno); Lys522 – Asp311 (plavo); Glu491 – Lys313 (zeleno).

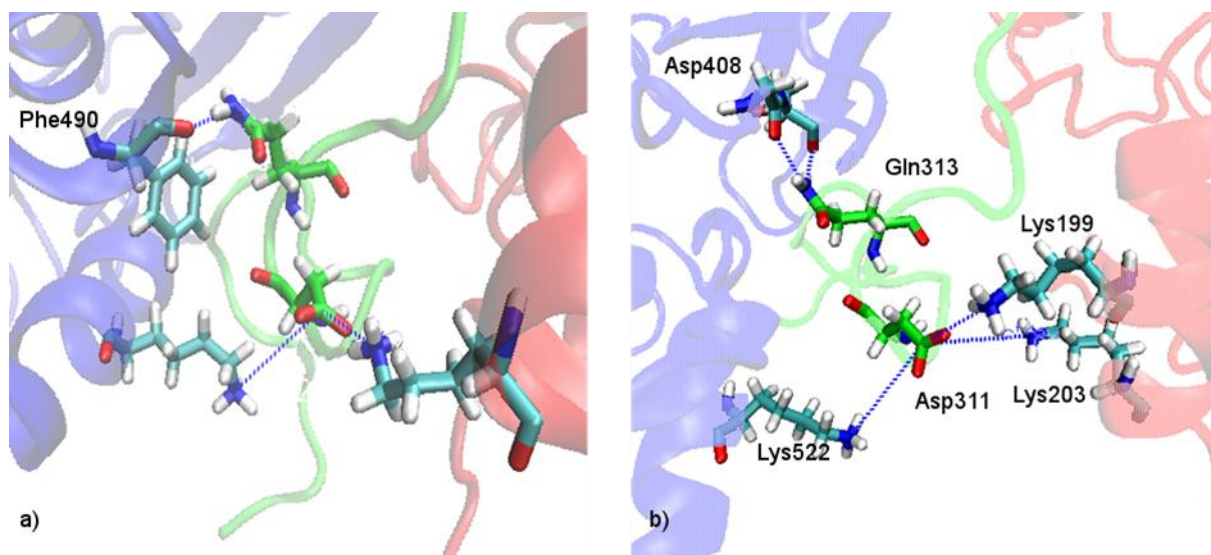


Slika 34. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene proteina TROL, simuliranom pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: His493 – Glu491 (crno); Glu491 – Lys313 (crveno); Lys522 – Asp311 (plavo); Asp311 – Lys313 (zeleno).

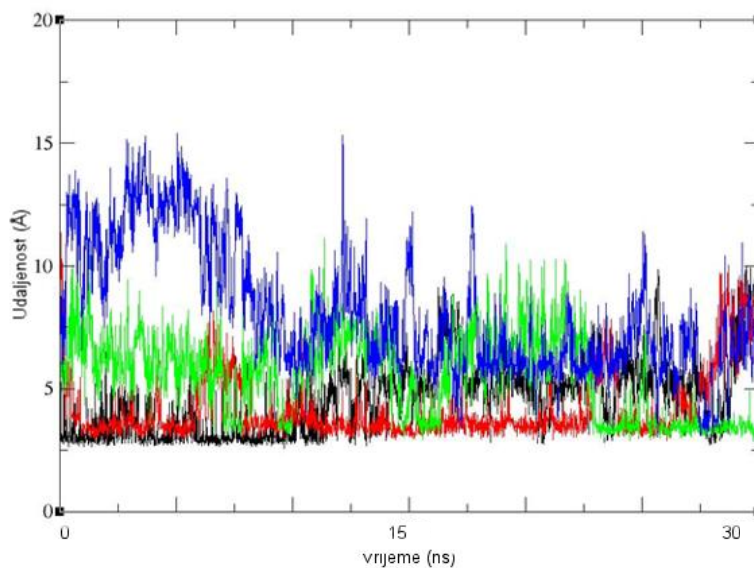
S ciljem destabilizacije ove grupe interakcija ovisnih o pH, napravljeni su sustavi s uvedenim mutacijama u ITEP domenu: Lys313 u Gln, te Asp311 u Lys, Lys313 u Asp. Obje mutacije uzrokuju značajnu promjenu u nekovalentnim interakcijama između ITEP domene i dimera enzima FNR.

U sustavu s uvedenom mutacijom Lys313 u Gln, simuliranom pri pH=6, nije moguća uspostava vodikove veze koju Asp311 divljeg tipa ostvaruje s Lys313. U ovom sustavu, Gln313 u interakciji s monomerom B enzima FNR, stvara relativno nestabilnu, naizmjeničnu vodikovu veze s aminokiselinama Phe490 i Glu519. U isto vrijeme Asp311 stvara naizmjenične, vodikove veze s Lys522 i Lys203. vdW interakcije koje Lys313 proteinskog kompleksa s divljim tipom proteina TROL ostvaruje s okolnim aminokiselinama dimera enzima FNR pri pH=6 u ovom sustavu nisu moguće (slika 35).

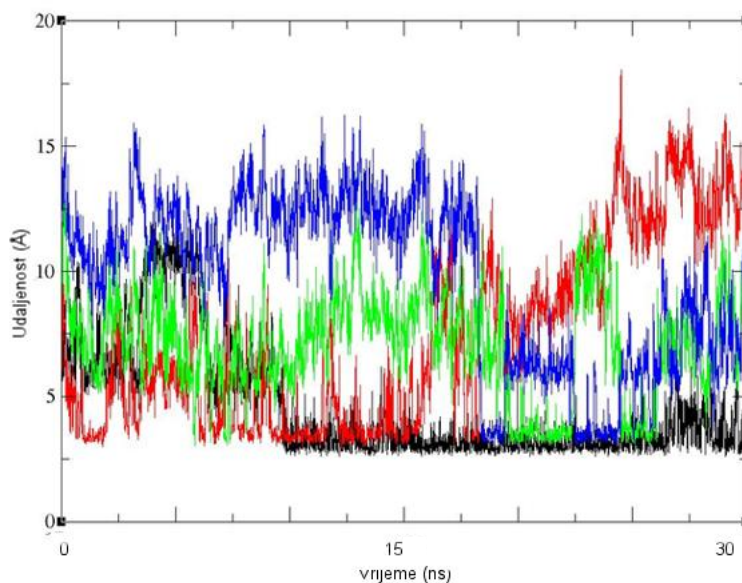
U sustavima s uvedenom mutacijom Lys313 u Gln, simuliranim pri pH=7 i pH=8, nakon relativno duge stabilizacije, od 20 ns, Gln313 uspijeva stvoriti stabilnu vodikovu vezu s Gly407 i Asp408, dok Asp311 stvara kratkotrajne vodikove veze s Lys199, Lys203 i Lys522. Ovi rezultati potvrđuju da uvođenje mutacije Lys313 u Gln, umanjuje utjecaj ove mreže vodikovih veza ovisne o pH na stabilnost proteinskog kompleksa. Uvođenjem takve mutacije ova grupa interakcija pri sva tri pH ostaje u stanju mreža vodikovih veza sličnim onima u sustavima divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=7 i 8 (slika 35). Grafovi udaljenosti između aminokiselina Asp311 i Lys522, te Gln313 i Phe490 u sustavima simuliranim pri pH=6 i pH=8 prikazani su na slikama 36 i 37.



Slika 35. Mreža vodikovih veza uz Asp311 i Gln313. Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Lys313 u Gln. **a)** Sustav pri pH=6. Nestabilne vodikove veze Asp311 naizmjenično stvara s Lys522 i Lys203, dok Gln313 stvara stabilnu vodikovu vezu s Phe490. **b)** Sustav pri pH=8. Nestabilne vodikove veze Asp311 naizmjenično stvara s Lys522, Lys203 i Lys199, dok Gln313 stvara stabilnu vodikovu vezu s Asp408.

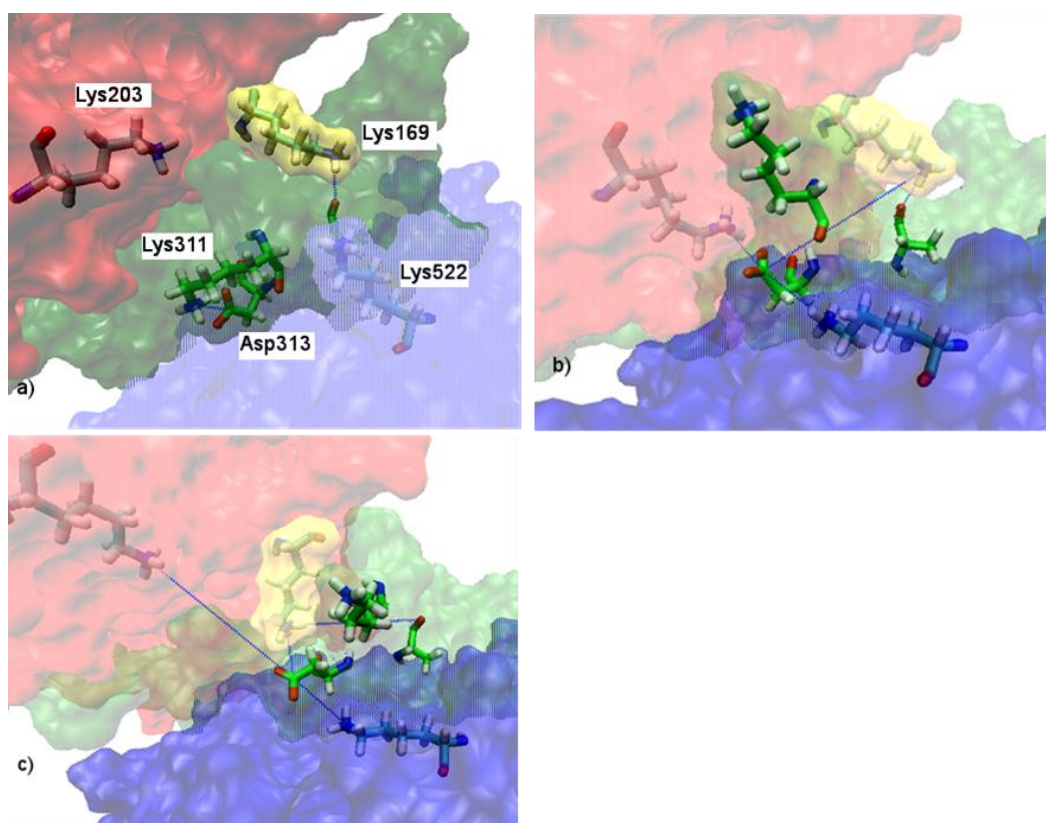


Slika 36. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Lys313 u Gln, pri pH=6. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Gln313 – Phe490 (crveno); Asp311 – Lys522 (crno); Asp311 – Lys203 (zeleno); Asp311 – Gln313 (plavo).

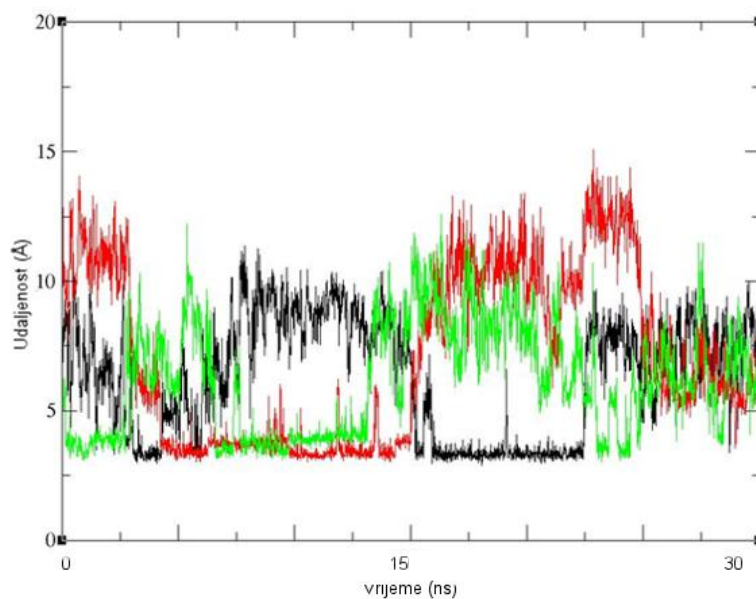


Slika 37. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Lys313 u Gln, pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Gln313 – Asp408 (crno); Asp311 – Lys522 (crveno); Asp311 – Lys203 (zeleno); Asp311 – Lys199 (plavo).

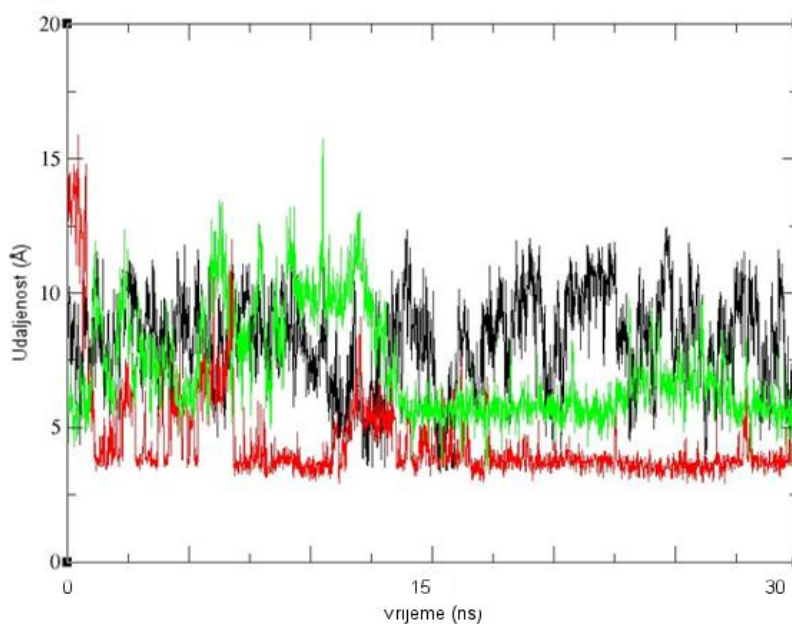
U sustavu s uvedenim mutacijama Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, simuliranom pri pH=6, dolazi do stvaranja stabilne vodikove veze između aspartata i lizina. Takva veza nije primijećena u sustavima simuliranim pri pH=7 i pH=8, u kojima Lys311 ne ostvaruje stabilnu vodikovu vezu niti s jednom aminokiselinom u proteinskom kompleksu, dok Asp313 stvara vodikovu vezu s Lys203, Lys522 i Lys169. Posebno iznenađuje vodikova veza s Lys169, koja nastaje oko 20 ns trajektorije sustava, simuliranom pri pH=8 (slika 38). Nastanak ove vodikove veze zahtjeva značajnu strukturnu promjenu monomera A enzima FNR, koja započinje destabilizacijom vodikove veze između Ala307 i Lys169, te dolaska lizina do Asp313. Pri tome se stvara niz vdW interakcija koje lizin ostvaruje sa susjednim aminokiselinama. Grafovi udaljenosti između aminokiselina Lys311 i Asp313 u sustavima simuliranim pri pH=6 i pH=8 prikazani su na slikama 39 i 40. Značajna strukturna promjena, koja nastaje pri pomaku Lys169, uzrokuje promjene interakcija duž ITEP domene. Primijećeno je da pomak Lys169, s jedne na drugu stranu „malog hidrofobnog džepa” slijedi i odmicanje, relativno udaljenog Met319 od „velikog hidrofobnog džepa”. Met319, odlazi na suprotnu stranu ITEP domene što je zabilježeno samo u sustavu s ovom mutacijom



Slika 38. Prikazani su sustavi proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, simulirani pri pH=6 i pH=8. Uvedena mutacija uzrokuje snažno pomicanje Lys169 od Pro307 te nastanak veze između Lys169 i Asp311. **a)** Sustav simuliran pri pH=6 gdje Asp311 i Lys313 ostvaruju stabilnu vodikovu vezu; **b)** Sustav simuliran pri pH=8 prije prelaska Lys169 iz osnovne pozicije; **c)** Isti sustav nakon prelaska Lys169.



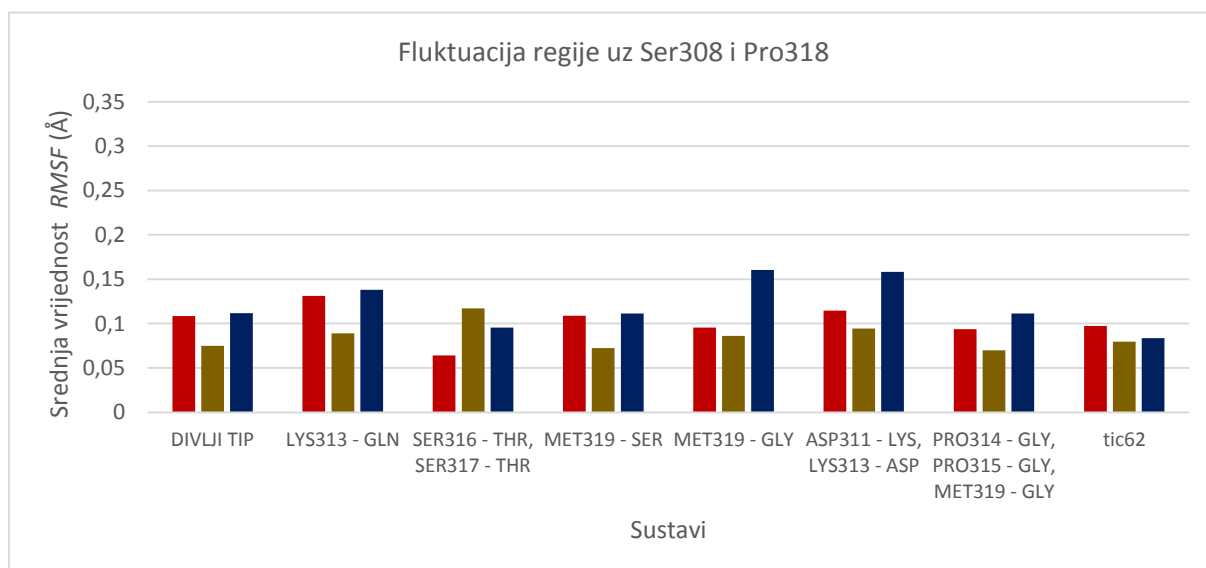
Slika 39. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, pri pH=6. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Lys311 – Asp313 (crno); Asp313 – Lys203 (crveno); Asp311 – Lys522 (zeleno).



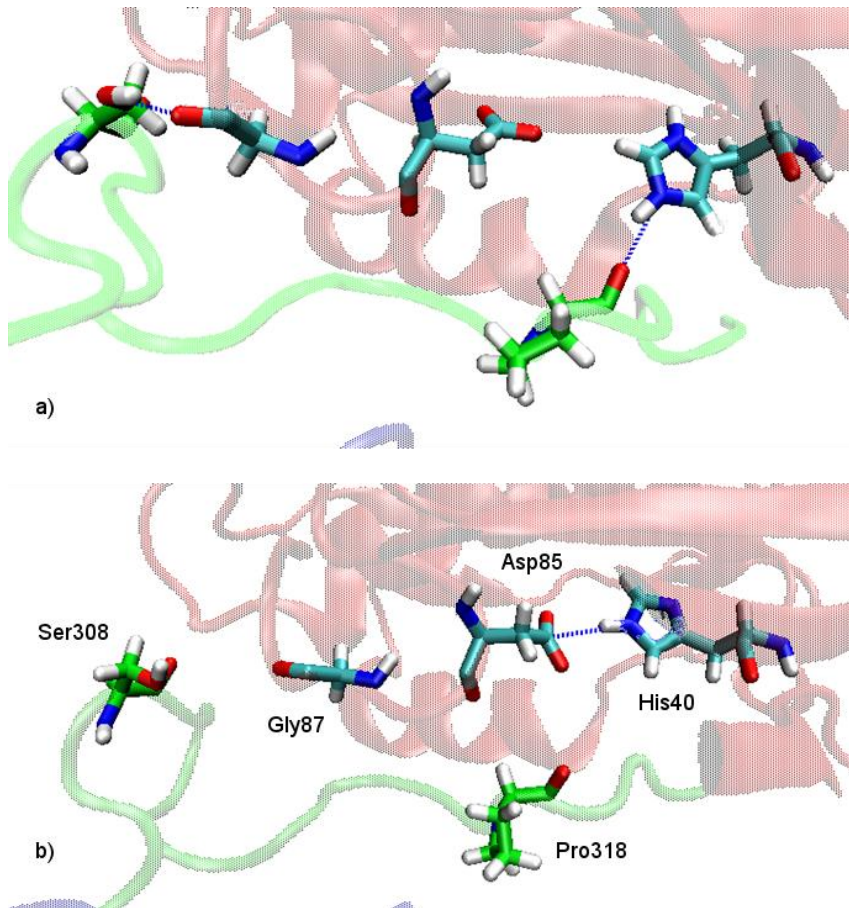
Slika 40. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Lys311 – Asp313 (crno); Asp313 – Lys169 (crveno); Asp311 – Lys522 (zeleno).

Treća grupa nekovalentnih interakcija ovisnih o pH, uključuje aminokiseline Ser308 i Pro318, ITEP domene proteina TROL, te aminokiseline His40, Asp85 i Gly87, monomera A enzima FNR. Središnju aminokiselinu mreže vodikovih veza ovisne o pH čini His40. Rezultati mjerenja *RMSF* regije uz Ser308 i Pro318 pokazuju da je ovo područje izrazito stabilno u svim simuliranim sustavima, a takve rezultate potvrđuje i vizualizacija regije, pomoću koje je utvrđeno kako vodikova veza između Pro318 i His40 ostaje sačuvana u svim sustavima s uvedenim mutacijama pri pH=6 (slika 41). Na očuvanost ove vodikove veze kroz sustave zasigurno utječe i blizina „velikog hidrofobnog džepa”, kao izrazito stabilno dodirno područje elemenata proteinskog kompleksa. Zanimljivo je da His40 ne sudjeluje u vezanju FNR vezne domene proteina Tic62.

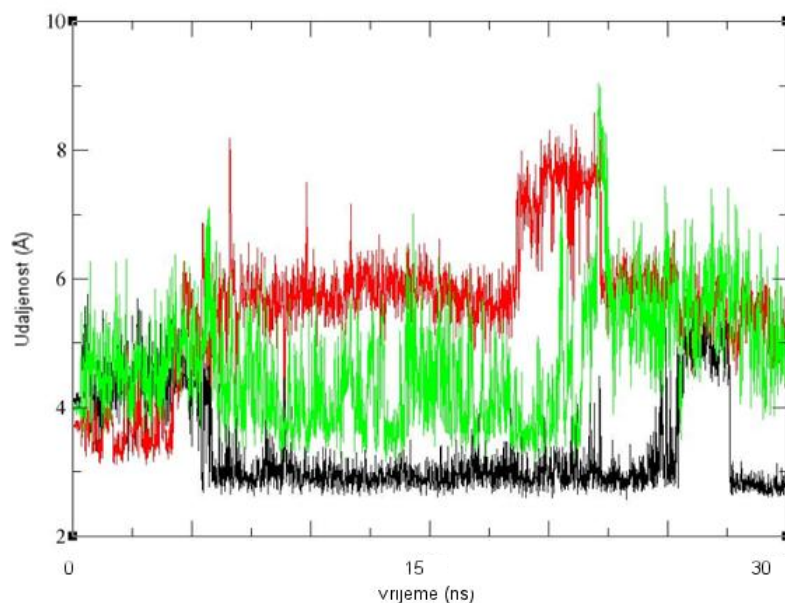
U sustavu ITEP domene divljeg tipa proteina TROL pri pH=6, dvostruko protonirani His40 stvara snažnu i stabilnu vodikovu vezu s Pro318. Orijentacija koju His40 zaprima u ovoj interakciji uzrokuje destabilizaciju vodikove veze koju je prethodno održavao s Asp85. Nevezani Asp85 omogućuje približavanje petlje 83 - 90 aminokiselini Ser308, s kojom član petlja, Gly87, može stvoriti relativno stabilnu vodikovu vezu. U sustavu ITEP domene divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=7 i pH=8, jednostruko protonirani His 40 održava stabilnu i snažnu vodikovu vezu s Asp85 (slika 43 i slika 44). Tako vezani aspartat onemogućuje pomicanje petlje 83 - 90 bliže Ser308, te ne dolazi do stvaranja vodikove veze između serina i glicina. Na ovaj način, orijentacija koju His40 zauzima ovisno o pH, direktno utječe na stabilnost barem dvije vodikove veze, kao i većeg broja vdW interakcija u ovoj regiji (Slika 42).



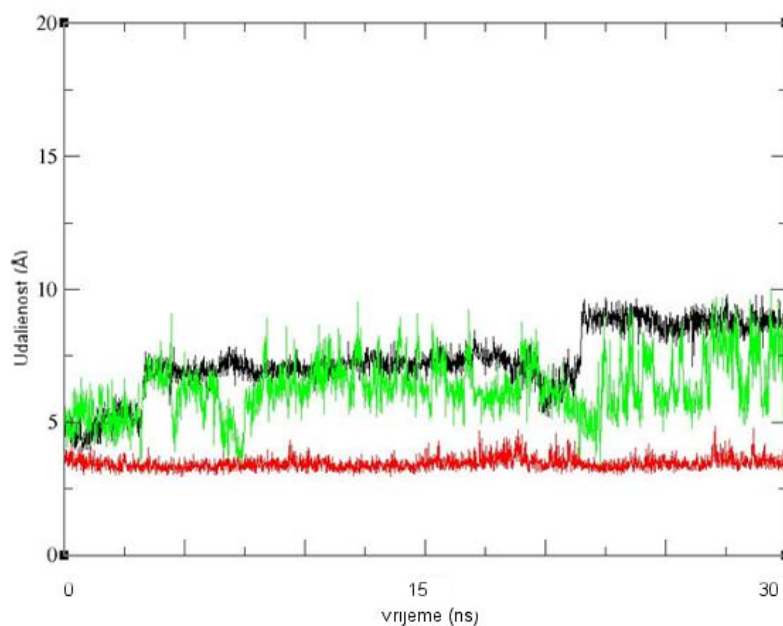
Slika 41. Srednje vrijednosti analize *RMSF* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa proteina TROL, za regiju uz Ser308 i Pro318. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.



Slika 42. Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITEP domene divljeg tipa proteina TROL. Mreža vodikovih veza, ovisna o pH, uz aminokiseline Pro318 i Ser308 ITEP domene. **a)** Sustav pri pH=6. His40 stvara stabilnu vodikovu vezu s Pro318 i omogućuje Asp85 i Gly87 pomicanje bliže Ser308; **b)** Sustav pri pH=8. His40 stvara stabilnu vodikovu vezu s Asp85 što udaljava Gly87 od ITEP domene.



Slika 43. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene proteina TROL, simuliranom pri pH=6. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Pro318 – His40 (crno); His40 – Asp85 (crveno); Gly87 – Ser308 (zeleno).



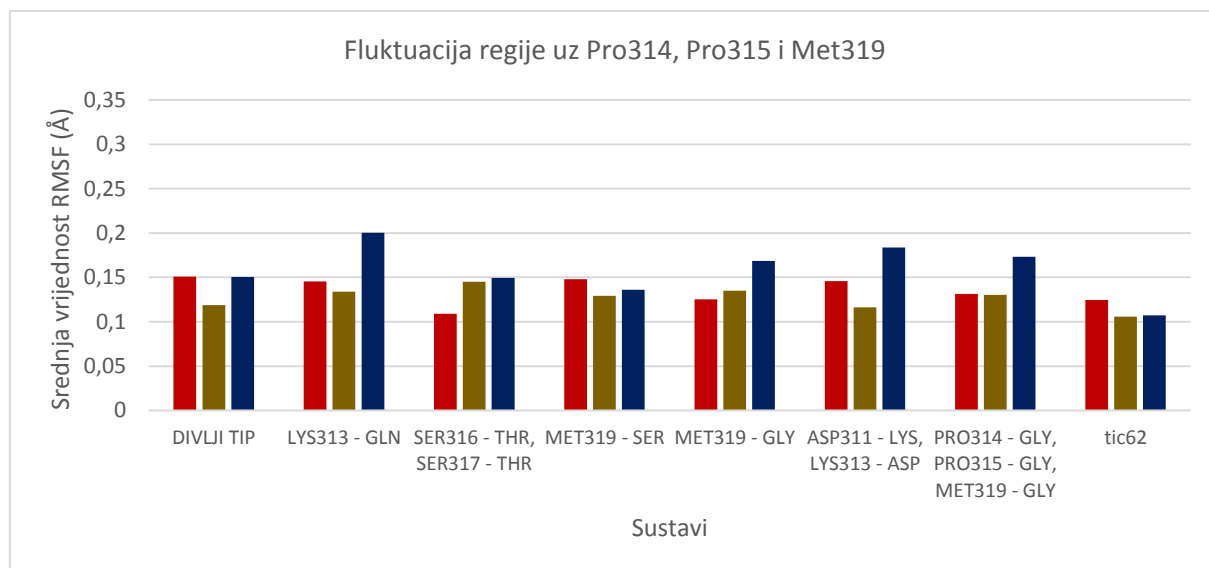
Slika 44. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene proteina TROL, simuliranom pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Pro318 – His40 (crno); His40 – Asp85 (crveno); Gly87 – Ser308 (zeleno).

3.2.5 Nekovalentne interakcije uz ITEP domenu proteina TROL, neovisne o pH

Nekovalentne interakcije uz ITEP domenu proteina TROL, neovisne o pH, uključuju mreže vodikovih veza i vdW interakcija koje su predstavljene kroz tri zasebne grupe, a čine strukturno važne interakcije za stabilnost proteinskog kompleksa. Središnje aminokiseline ovih grupa su: Pro314 i Pro315, Ser316 i Ser317, te Met319.

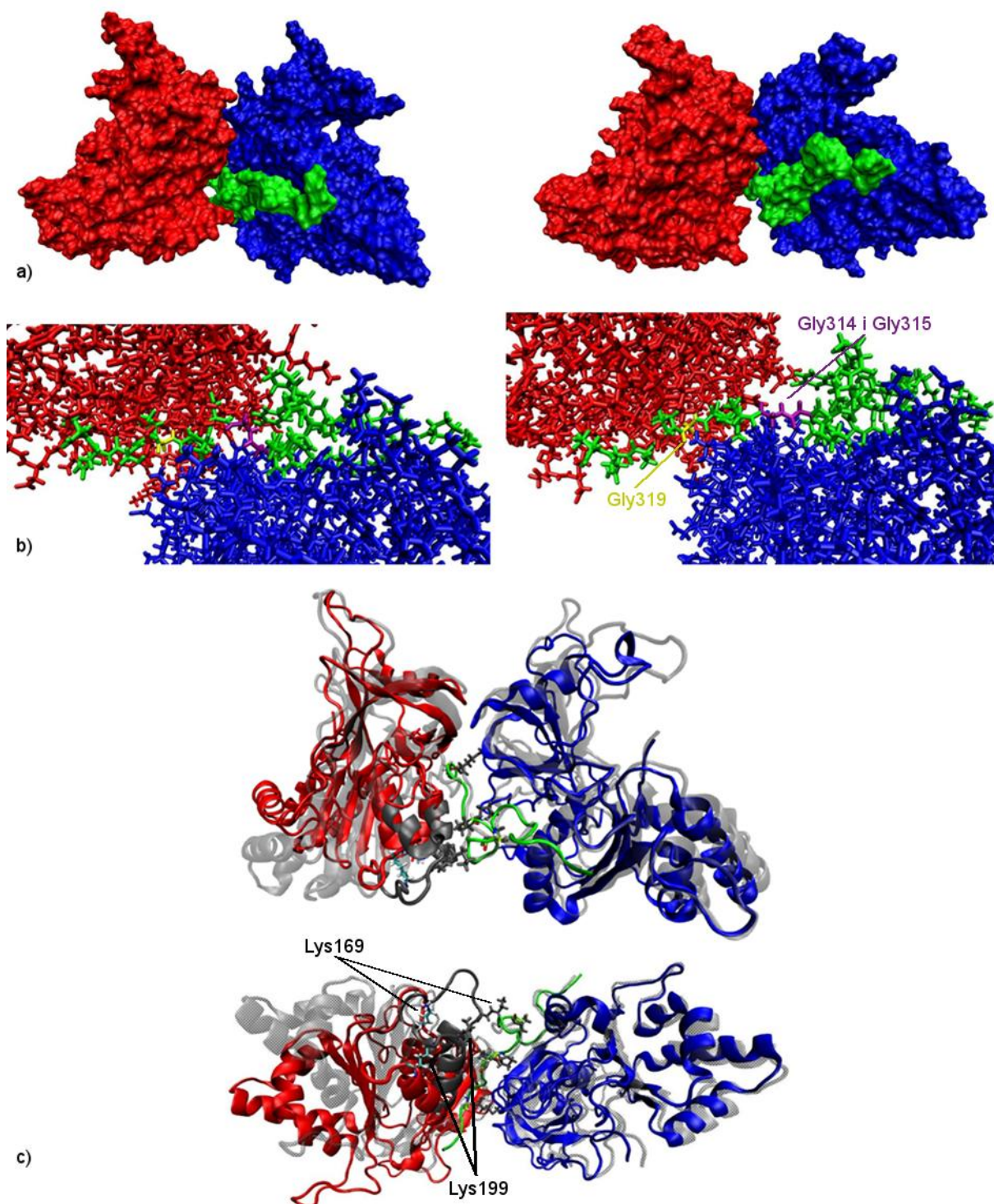
Za razliku od interakcija ovisnih o pH, koje u pravilu čine mreže vodikovih veza regulirane protonacijskim stanjem His i Cys, interakcije neovisne o pH, opisane u ovom poglavlju, podjednako se temelje na stabilnosti vodikovih veza i vdW interakcija. Indirektan utjecaj pH na ove interakcije nije zanemariv, a najizraženije promjene u strukturi i stabilnosti proteinskog kompleksa, uzrokovane mutiranjem središnjih aminokiselina ovih grupa, zabilježene su u sustavima pri pH=8.

Prva grupa interakcija uključuje aminokiseline ITEP domene, Pro314 i Pro315. U većini simuliranih sustava ove aminokiseline ostvaruju samo vdW interakcije. Ipak, ostvarene interakcije su vrlo stabilne, što potvrđuju rezultati analize *RMSF* (slika 45), a pridonosi im niz okolnih aminokiselina uključujući: Phe167, Lys199, Lys203, Asp308, Lys323, Phe409. Također, ovim interakcijama pridonose i druge aminokiseline ITEP domene, uz posebnu važnost Tyr306 i Tyr309.

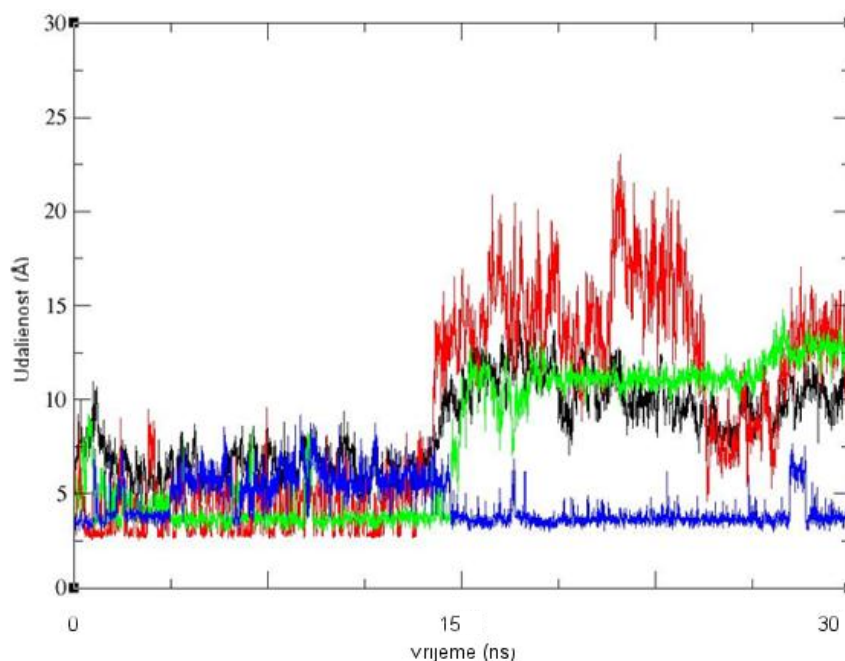


Slika 45. Srednje vrijednosti analize *RMSF* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa za regiju uz Pro314, Pro315 i Met319. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

S ciljem analize utjecaja ove grupe nekovalentnih interakcija na stabilnost proteinskog kompleksa, te procjenu važnosti vdW interakcija u njoj, simulirani su sustavi ITEP domene proteina TROL s uvedenim mutacijama Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly. Mutirane aminokiseline izgubile su sposobnosti stvaranja vdW interakcija s okolnim aminokiselinama, što u slučaju Gly314 i Gly315 uzrokuje snažne i trajne fluktuacije središnjeg dijela ITEP domene. Takve fluktuacije, dovode do destabilizacije većeg broja nekovalentnih interakcija, što dovodi do odmicanja monomera A enzima FNR od ITEP domene. Površina proteinskog kompleksa i strukturne promjene do kojih dolazi tijekom trajanja simulacije prikazane su na slici 46. Vidljivo je da gubitak vdW interakcija u središnjem dijelu ITEP domene pretvara relativno gustu i kompaktnu strukturu u raširenu strukturu čiju stabilnost održavaju uglavnom nekovalentne interakcije u „velikom hidrofobnom džepu”. Nije primijećeno da mutacija Met319 u Gly značajno utječe na fluktuaciju okolnih aminokiselina u ovim sustavima. Značajne strukturne promjene proteinskog kompleksa započinju udaljavanjem Lys169 i Lys199 od ITEP domene, što je uzrokovano gubitkom sposobnosti stvaranja vdW interakcija Lys169 – Gly314 i Lys199 – Gly315. Udaljavanje ovih aminokiselina rezultira udaljavanjem regija 164 – 174 i 196 – 208 od ITEP domene. Pomicanje ovih regija ima snažan utjecaj na destabilizaciju mreže vodikovih veza ovisne o pH između His170, Lys169, Pro310 i Ala307 (slika 47).



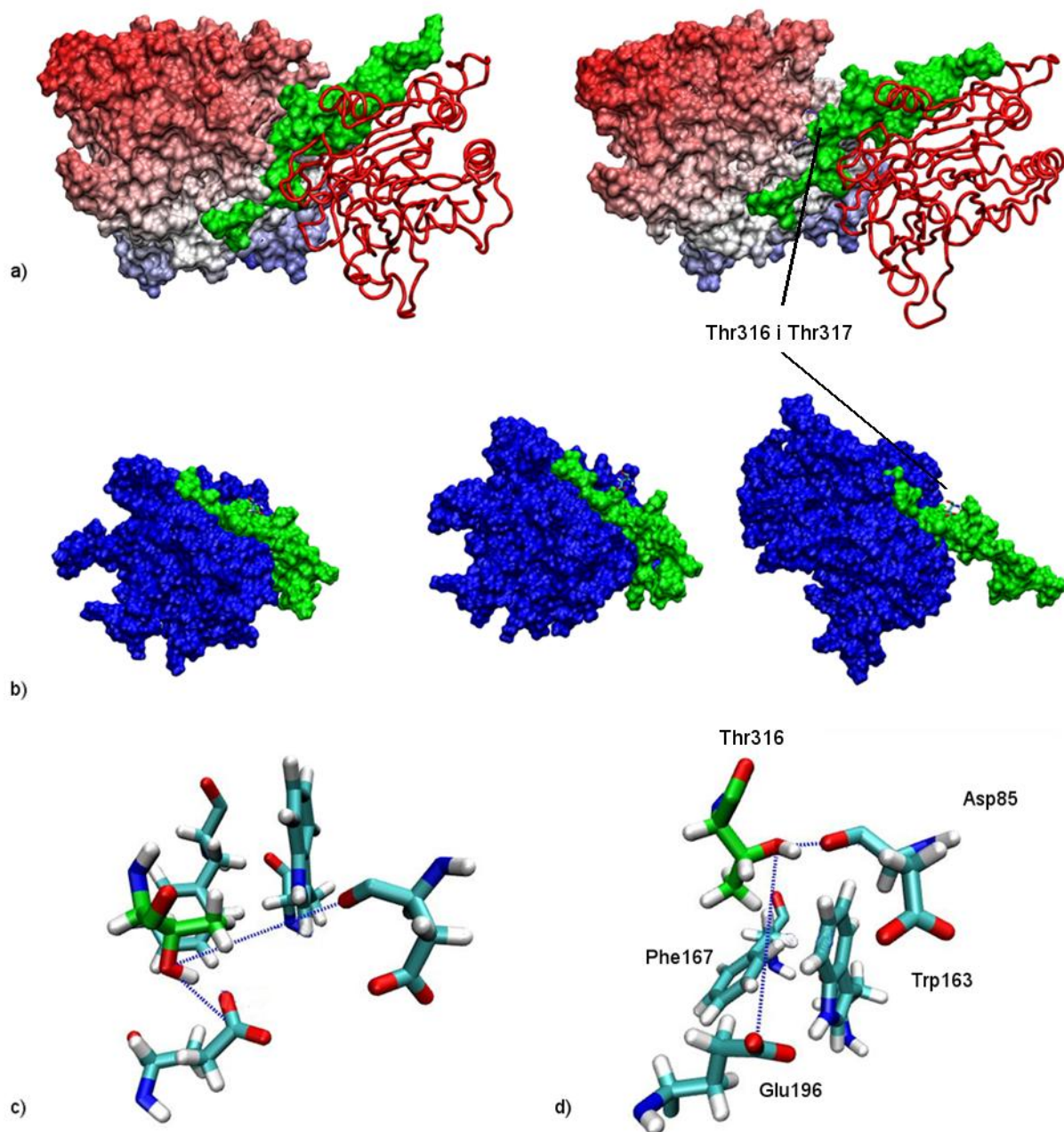
Slika 46. a) Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly. Površina proteinskog kompleksa prije i nakon destabilizacije uzrokovane gubitkom vdW interakcija zbog uvođenja mutacija; **b)** Odvajanje „malog hidrofobnog džepa” od monomera A enzima FNR. **c)** Svrnjenje sekundarnih struktura sustava prije i nakon destabilizacije. Udaljavanje regije 164 – 174 i 196 – 208 vodi do destabilizacije mreže vodikovih veza uz Pro307 i Lys169.



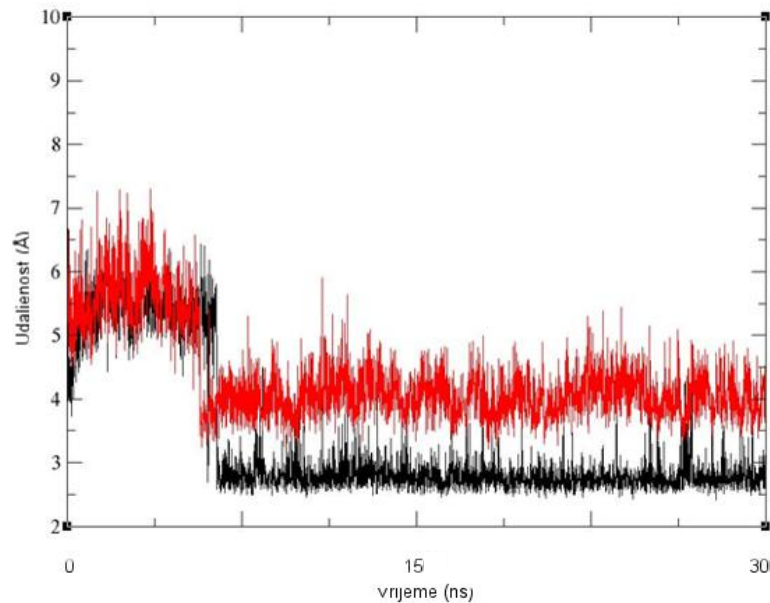
Slika 47. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly, simuliranom pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Lys169 – Gly314 (crno); Lys199 – Gly315 (crveno); Pro310 – Lys169 (zeleno); Gly319 – Lys413 (plavo).

Iduća grupa nekovalentnih, pH neovisnih interakcija uključuje aminokiseline ITEP domene, Ser316 i Ser317, koje stvaraju relativno stabilne vodikove veze s aminokiselinama Glu196 i Asp411. Primijećen je neizravan utjecaj pH na stabilnost ovih interakcija, pa je tako vodikova veza Ser316 – Glu196 stabilnija u sustavu divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=6, dok je vodikova veza Ser317 – Asp411 stabilnija u sustavu divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=8.

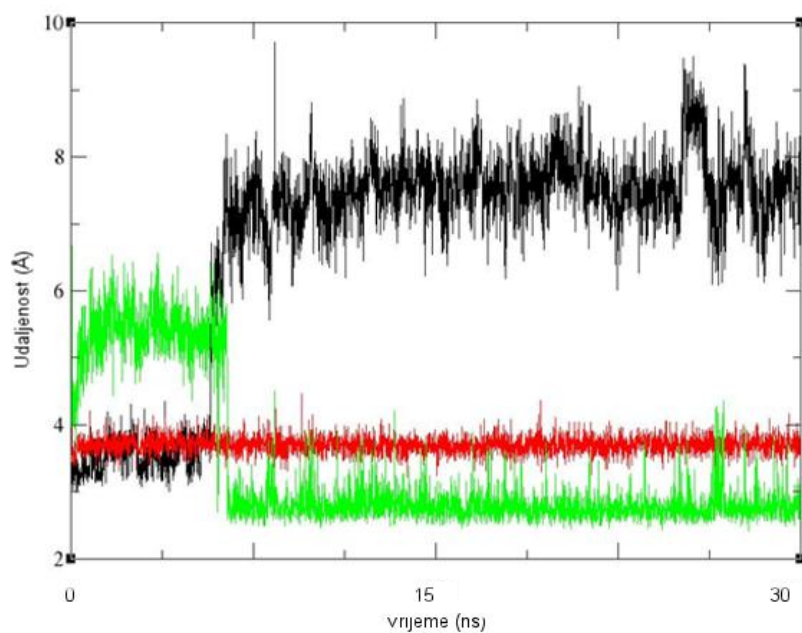
Uvođenjem mutacije Ser316 u Thr i Ser317 u Thr pručavan je utjecaj ove grupe aminokiselina na stabilnost proteinskog kompleksa. Mutirane aminokiseline zadržale su sposobnost ostvarivanja vodikovih veza, ali im je znatno porasla sposobnost ostvarivanja vdW interakcija. U sustavima simuliranim pri pH=8, uvedene mutacije dovode do znatne strukturne promjene u proteinskom kompleksu, a uzrok takve promjene utvrđen je vizualnom analizom (slika 48). Naime, nakon 10 ns stabilizacije, aminokiselina Thr316, pod utjecajem vdW interakcija koje ostvaruje s aminokiselinama Trp163 i Phe167, zauzima orijentaciju koja joj omogućuje uspostavu snažne i stabilne vodikove veze s aminokiselinom Asp85 (slika 50). Takva promjena, uzrokuje pomicanje monomera A enzima FNR, i destabilizaciju većeg broja nekovalentnih interakcija u proteinskom kompleksu. Thr317 održava stabilnu vezu s aminokiselinom Asp411 što pridonosi stabilizaciji ITEP domene uz monomer A enzima FNR. Slična promjena nije primijećena u sustavima simuliranim pri nižim pH, gdje mutirane aminokiseline ne uspijevaju stvoriti stabilne vodikove veze s dimerom enzima FNR (slika 49).



Slika 48. a) Površina monomera B enzima FNR s ITEP domenom proteina TROL dobivena klaster analizom sustava ITEP domene s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, simuliranim pri pH=6 i pH=8. Monomer A enzima FNR prikazan je pojednostavljeno radi preglednosti značajnih strukturnih promjena koju uvođenje ovih mutacija uzrokuje; **b)** Površina monomera B enzima FNR s ITEP domenom proteina TROL istog sustava, simuliranom pri pH=6, pH=7 i pH=8. Vidljivo je značajno odmicanja monomera B enzima FNR od ITEP domene proteina TROL; **c)** Relativan položaj aminokiselina Ser316, Asp85, Glu196, Phe167 i Trp163, u sustavima simuliranim pri pH=6 i pH=8.

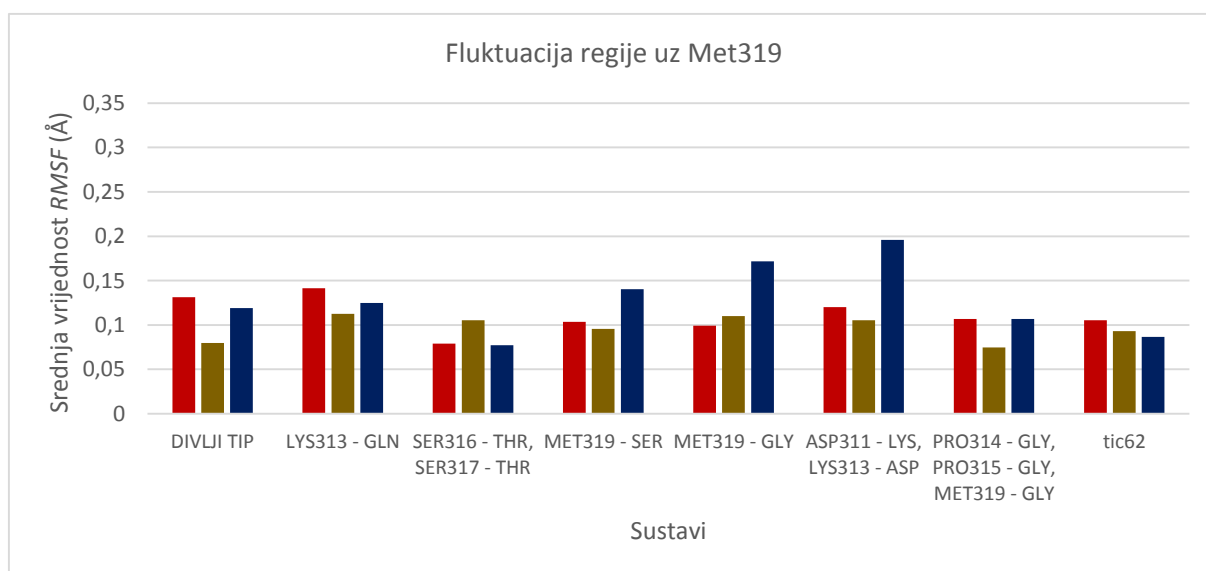


Slika 49. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, simuliranom pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Thr316 – Trp163 (crveno); Thr316 – Asp85 (crno). Prikazan je utjecaj preraspodijele vdW interakcija na nastanak nove vodikove veze.



Slika 50. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, simuliranom pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Thr317 – Asp411 (crveno); Thr316 – Glu196 (crno); Thr316 – Asp85 (zeleno).

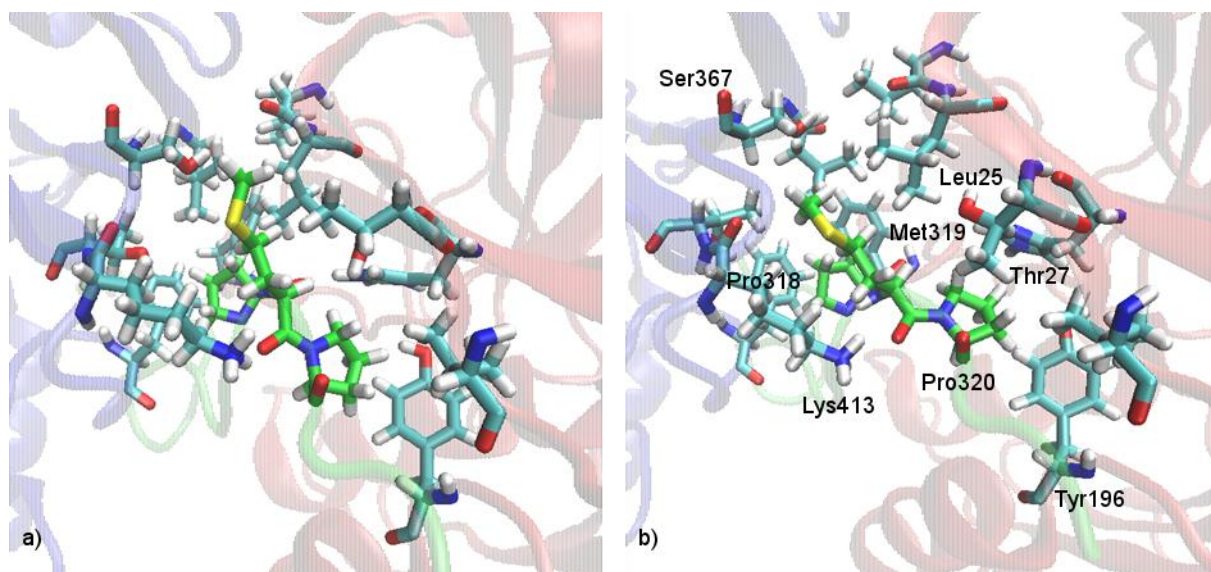
Posljednja grupa nekovalentnih, pH neovisnih, interakcija uključuje Met319 i okolne aminokiseline koje se nalaze uz sam kraj proteina TROL. Ove aminokiseline sudjeluju u izgradnji najstabilnijeg dijela „velikog hidrofobnog džepa”, u kojemu nije utvrđena značajna destabilizacija u niti jednom od simuliranih sustava, što potvrđuju i vrlo niske vrijednosti dobivene RMSF analizom ove regije (slika 51). Vizualizacijom reprezentativne strukture najnapućenijeg klastera sustava s divljim tipom proteina TROL otkrivene su najstabilnije vdW interakcije u kojima sudjeluje Met319 i aminokiselina: Leu25 i Thr27 A monomera enzima FNR, te Leu347, Ser367 i Glu369 monomera B enzima FNR. Također u vdW interakcijama sudjeluju i susjedne aminokiseline ITEP domene, Pro318 i Pro320. Vrijednosti fluktuacija aminokiselina ove regije, relativno su niske, no porast vrijednosti je primijećen u sustavima s uvedenim mutacijama: Met319 u Ser; Met319 u Gly, te Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, simuliranim pri pH=8 (slika 52). Generalno, stabilnost nekovalentnih interakcije u ovom dijelu „velikog hidrofobnog džepa” ne pokazuje značajnu ovisnost o pH.



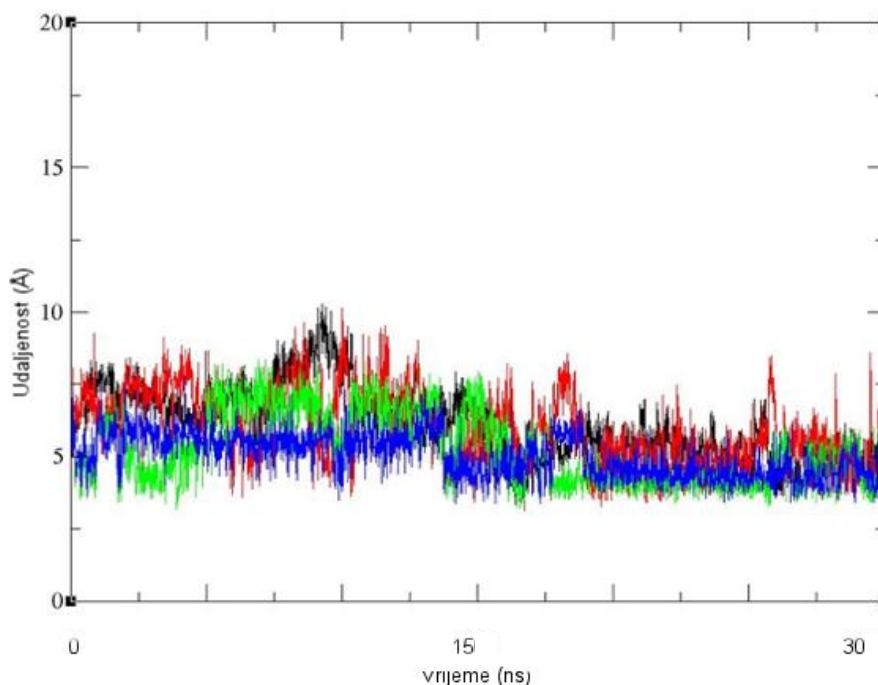
Slika 51. Srednje vrijednosti analize *RMSF* svih simuliranih sustava proteinskog kompleksa za regiju uz Met319. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

Primijećena je razlika u orijentaciji Met319 između sustava. U sustavu ITEP domene divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=6, Met319 usmjeren je prema „velikom hidrofobnom džepu”, dok u sustavu, simuliranom pri pH=8, dolazi do njegovog blagog, ali trajnog pomicanja prema rubu hidrofobnog područja (slika 52). Promjena orijentacije izraženija je u sustavu ITEP domene proteina TROL s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, simuliranom pri pH=6. Promjenu orijentacije Met319 ne prati značajna promjena u stabilnosti vdW interakcija „velikog hidrofobnog džepa”, čija je destabilizacija, uzrokovana promjenom položaja metionina, kratkotrajna i zanemariva (slika 53). Čak i nakon pomicanja Met319 na suprotnu stranu ITEP domene, u sustavu s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys,

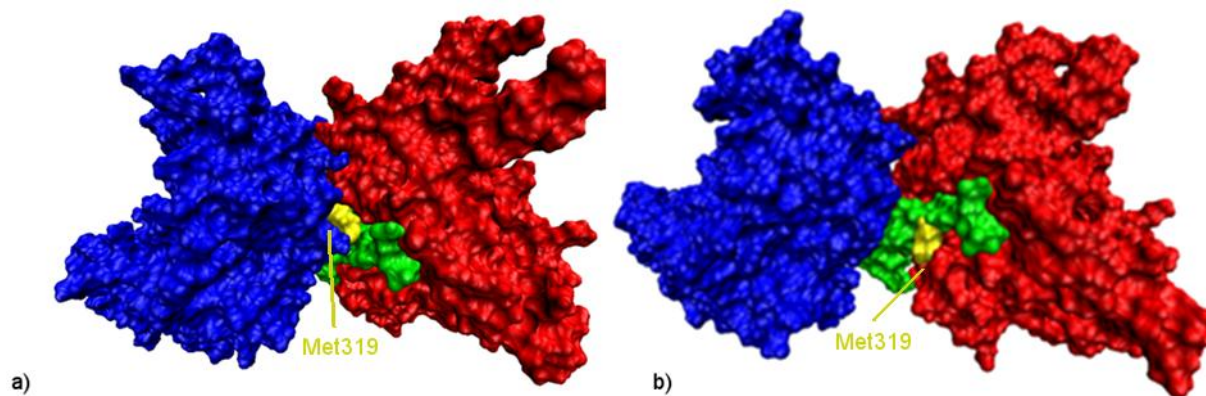
Lys313 u Asp, simuliranom pri pH=8, ostale aminokiseline „velikog hidrofobnog džepa” uspijevaju kompenzirati gubitak vdW interakcija s Met319 te održati dva monomera enzima FNR spojenima (slika 54 i slika 55).



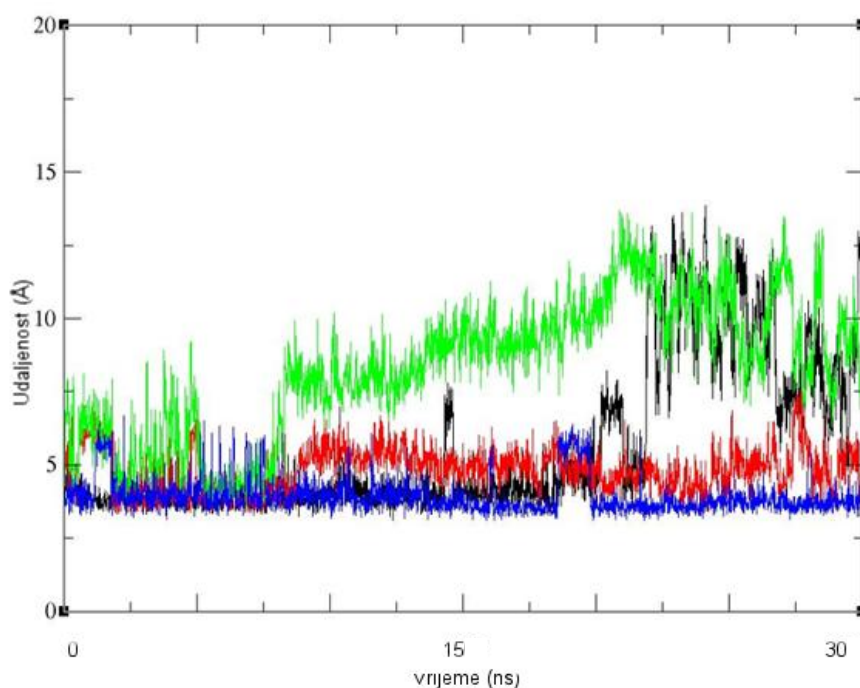
Slika 52. Blage promjene u orijentaciji Met319 sustava ITEP domene divljeg tipa proteina TROL pri pH=6 i 8. **a)** Sustav pri pH=6, gdje je Met319 usmjeren prema „velikom hidrofobnom džepu”; **b)** Sustav pri pH=8, gdje se Met319 nalazi na vanjskom rubu „velikog hidrofobnog džepa”.



Slika 53. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene proteina TROL, simuliranom pri pH=6 i pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Met319 – Leu25 (pH=6 – crveno, pH=8 - plavo); Met319 – Lys413 (pH=6 – crno, pH=8 - zeleno).

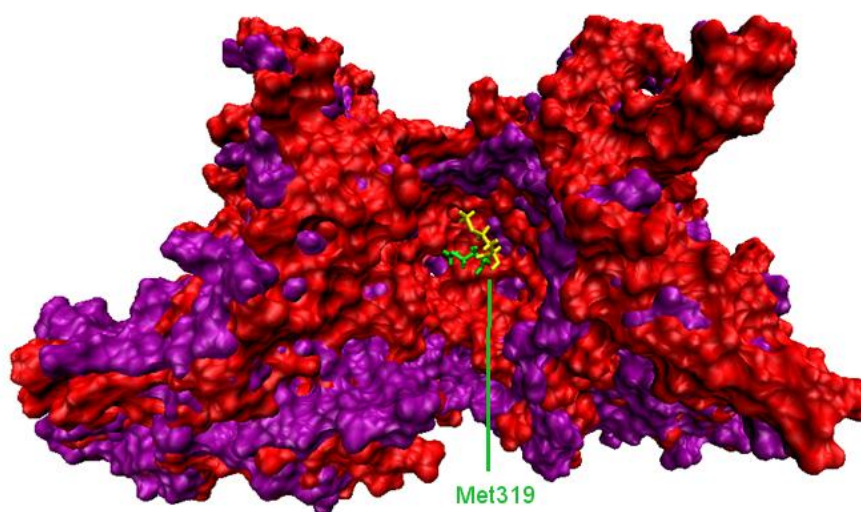


Slika 54. Izrazite promjene orijentacije Met319 u sustavu proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, simuliranom pri pH=8. **a)** Orijentacija Met 319 pri početku simulacije; **b)** Orijentacija Met319 pri kraju simulacije; Met319 označen je žutom bojom.



Slika 55. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, simuliranom pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Met319 – Leu25 (zeleno); Met319 – Lys413 (crno); Pro318 – Leu25 (crveno); Pro320 – Thr27 (plavo). Izrazita promjena orijentacije Met319 nije značajno utjecala na stabilnost vdW interakcija u „velikom hidrofobnom džepu”.

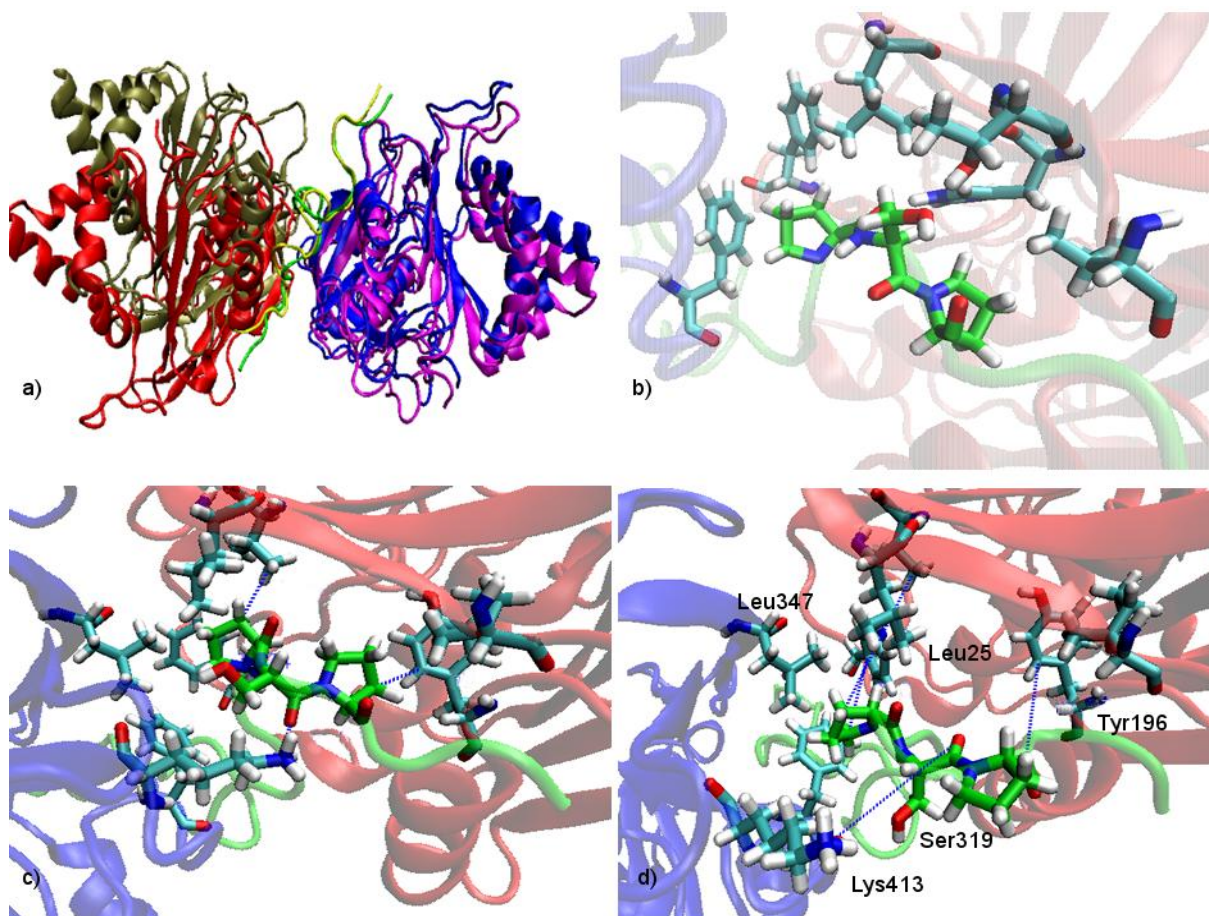
Vizualnom analizom savršenih središnjih struktura najzastupljenijih klastera svih sustava, po regiji ITEP domene 300 – 323 procijenjena je povezanost promjena nagiba dimera enzima FNR duž centralne osi ITEP domene s promjenom orijentacije aminokiseline Met319. Unatoč slučajevima u kojima su primjećene promjene nagiba dimera enzima FNR uz promjenu orijentacije Met319, nije utvrđena čvrsta povezanost ovih fenomena. Iz primjera sustava divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=6, savršenog sa sustavom proteina TROL s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, prikazanog na slici 56, vidljivo je kako snažna promjena orijentacije Met319 neće dovesti do promjene nagiba dimera enzima FNR nad centralnom osi ITEP domene.



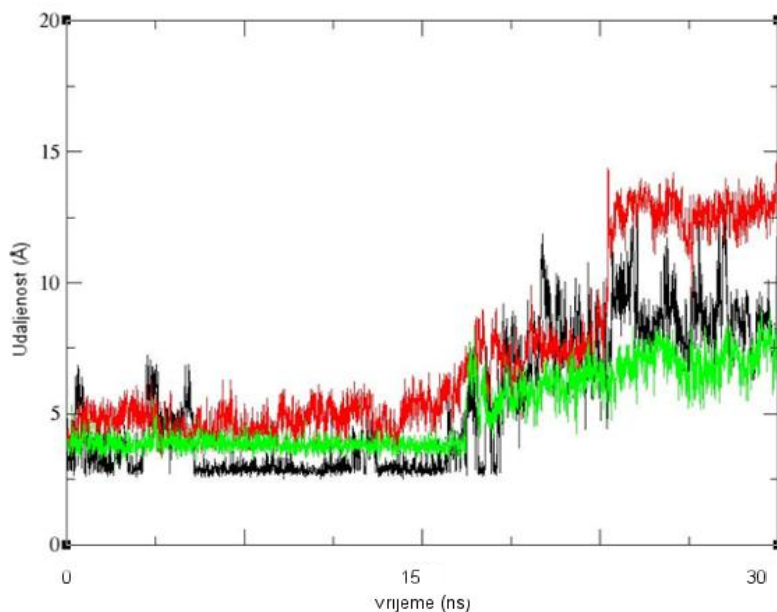
Slika 56. Procjena utjecaja orijentacije Met319 na nagib dimera enzima FNR duž centralne osi ITEP domene pokazuje da orijentacija Met319 značajno ne utječe na nagib dimera enzima FNR. Prikazano je savršenje sustava ITEP domene divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH=6 i sustava s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, simuliranom pri pH=6. Zbog veće preglednosti nisu prikazane aminokiseline u radijusu od 10 Å od Met319.

Kako bi dodatno provjerali utjecaj Met319 na stabilnost „velikog hidrofobnog džepa” napravljeni su sustavi s uvedenim mutacijama Met319 u Gly; Met319 u Ser, te Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly.

Uvođenjem mutacije Met319 u Ser u ITEP domenu proteina TROL dolazi do preraspodjele vdW interakcija u regiji, što je uzrokovano odmicanjem kraja ITEP domene od „velikog hidrofobnog džepa” (slika 57). Naime, nesposobnost ostvarivanja vdW interakcija između Ser319 i Lys413 uzrokuje destabilizaciju vodikove veze koju Lys413 stvara s okosnicom ITEP domene. Odmicanje Lys413 prati i odmicanje Pro318 i Pro320 od susjednih, hidrofobnih, aminokiselina, te kraj ITEP domene ubrzo zauzima relativno stabilan, alternativni položaj (slika 58). Promjena položaja utječe i na ostatak proteinskog kompleksa, no rezultati mjerenja radijusa giracije, prikazanih u poglavlju 3.1.2, ne ukazuju na njegovu generalnu promjenu u stabilnosti.



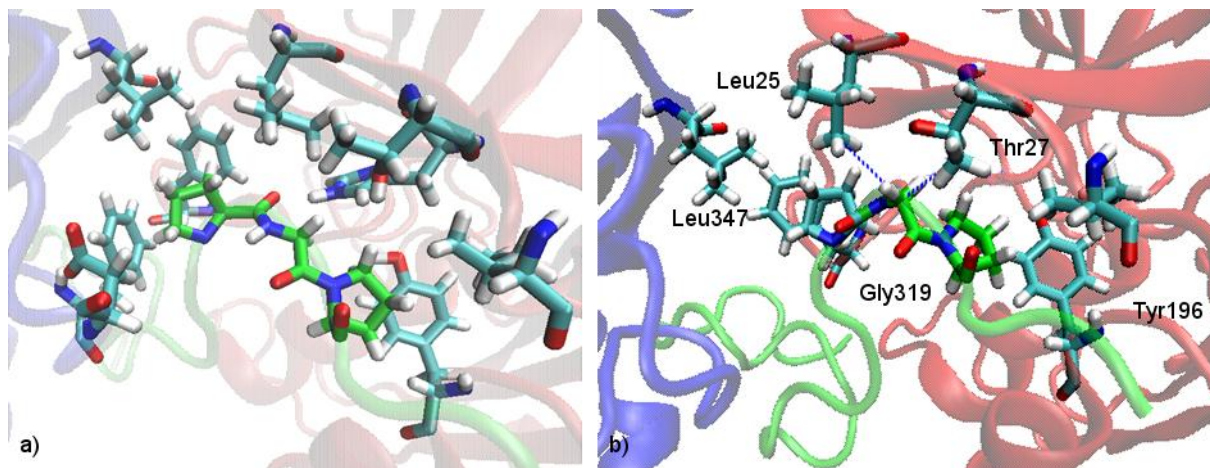
Slika 57. Destabilizacija dijela „velikog hidrofobnog džepa” uzrokovano uvođenjem mutacije Met319 u Ser. **a)** Svrnjenje struktura prije i nakon velike strukturne promjene u trajektoriji; **b)** Sustav simuliran pri pH=6; **c)** Sustav simuliran pri pH=8 prije strukturne promjene; **d)** Sustav simuliran pri pH=8 nakon strukturne promjene.



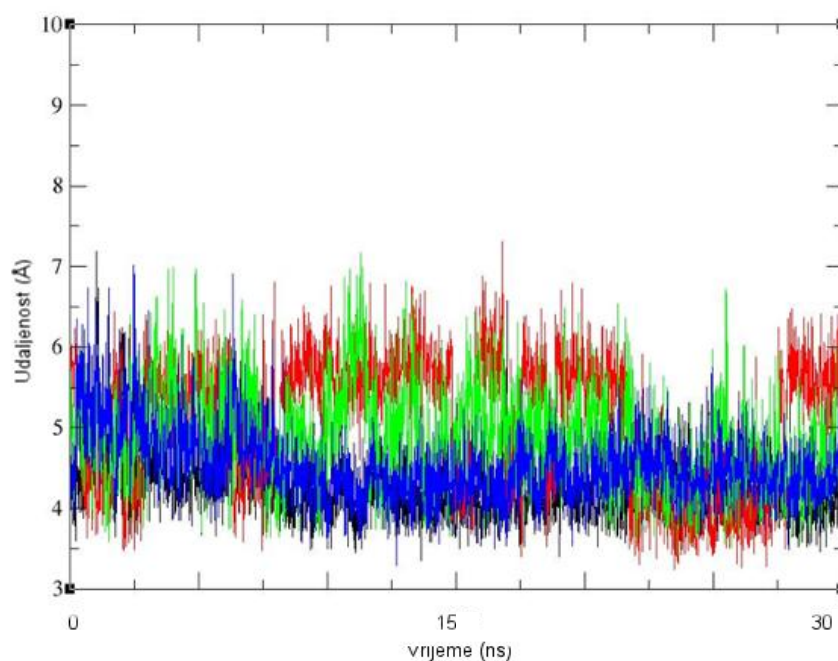
Slika 58. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Met319 u Ser, simuliranom pri pH=8. Vrijednosti parova označene su bojama kako slijedi: Lys413 – Ser319 (crvena); Pro320 – Tyr196 (zelena); Pro318 – Leu25 (crna).

Mutiranje Met319 u Gly, ITEP domene proteina TROL, prati osjetni porast vrijednosti fluktuacija aminokiselina u regiji, u sustavu simuliranom pri pH=8. Razlog ove fluktuacije je znatno niža sposobnost uspostavljanja vdW interakcija, koju glicin ima u usporedbi s metioninom, dok i sama priroda uvođenja *in silico* mutanata, zahtjeva duže vrijeme uravnoteženja okoline, prilikom zamijene jedne velike aminokiseline malom.

Vizualnom analizom i mjerenjem udaljenosti aminokiselina od interesa, nisu primijećene izraženije strukturne promjene tijekom simulacije, a utjecaj pH na regiju, prvenstveno se temelji na stvaranju snažne i stabilne vodikove veze između His40 i Pro318, pri pH=6, što je opisano u poglavlju 3.2.4.. S obzirom na to da vodikova veza nije moguća pri pH=7 i 8, u takvim sustavima dolazi do blagog porasta nestabilnosti regije. Ipak, blizina His40 u sustavu pri pH=6 onemogućuje približavanje okolnih, hidrofobnih aminokiselina, Gly319. Takvo približavanje mnogo je lakše u sustavima pri pH=7 i 8, gdje Gly319 uspijeva ostvariti relativno stabilne vdW interakcije, čime se utjecaj gubitka vodikove veze, na stabilnost sustava, dodatno umanjuje. Vizualizacija ove regije, reprezentativne strukture najnapućenijeg klastera sustava s uvedenom mutacijom Met319 u Gly, simuliranih pri pH=6 i 8, prikazani su na slici 59. Rezultati mjerenja udaljenosti između aminokiselina koje stvaraju vdW interakciju s Gly319 prikazani su na slici 60.



Slika 59. Sustavi ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Met319 – Gly pri pH=6 i pH=8. Gly319 slabo, ali trajno sudjeluje u vdW interakcijama „velikog hidrofobnog džepa”. Unatoč gubitku Met319, nije primijećena veća nestabilnost u regiji; **a)** Sustav simuliran pri pH=6; **b)** Sustav simuliran pri pH=8.



Slika 60. Udaljenost između parova aminokiselina kroz MD simulaciju sustava proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Met319 u Gly, simuliranih pri pH=6 i pH=8. Vrijednosti parova označene su bojom kako slijedi: Gly319 – Leu25 (pH=6 – crvena, pH=8 – zelena); Gly319 – Thr27 (pH=6 – crna, pH=8 – plava).

3.3 Pregled dinamike sustava slobodne ITEP domene proteina TROL

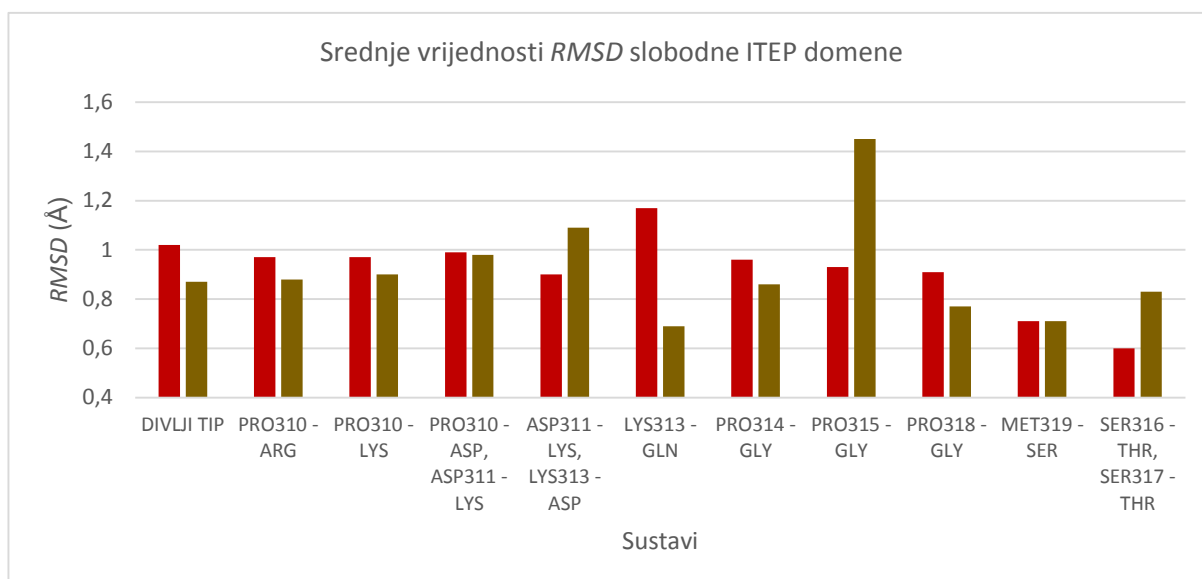
3.3.1 Uravnoteženost i fluktuacija sustava

Sustavi slobodne ITEP domene proteina TROL pokazuju očekivanu fleksibilnost i promjenjivost strukture tijekom MD simulacije, koja je prvenstveno uzrokovana relativno malom duljinom simuliranog peptida, te relativno izduženim izgledom početne konformacije koja je temeljena na FNR veznoj domeni proteina Tic62 u proteinskom kompleksu s dimerom enzima FNR, zbog čega je rezultate dobivene analizom ovih sustava potrebno tumačiti s oprezom.

Na visoku fleksibilnost i promjenjivost strukture peptida, primijećenu u većini simuliranih sustava, utječe i slijed aminokiselina ITEP domene divljeg tipa proteina TROL koji onemogućuje nastanak vrlo stabilne sekundarne strukture poput α – zavojnice ili β – lanca. Iznimku ovom zapažanju čine slobodne ITEP domene pojedinih sustava s uvedenim mutacijama, uključujući: Lys313 u Gln pri pH=6, Asp311 u Lys, Lys313 u Asp pri pH=7, Met319 u Ser pri pH=7, Pro315 u Gly pri pH=6 i 7, Pro310 u Asp, te Asp311 u Lys pri pH=6. Vrijednosti *RMSD* navedenih sustava dostižu uravnoteženje do sredine simulacije (Prilog V).

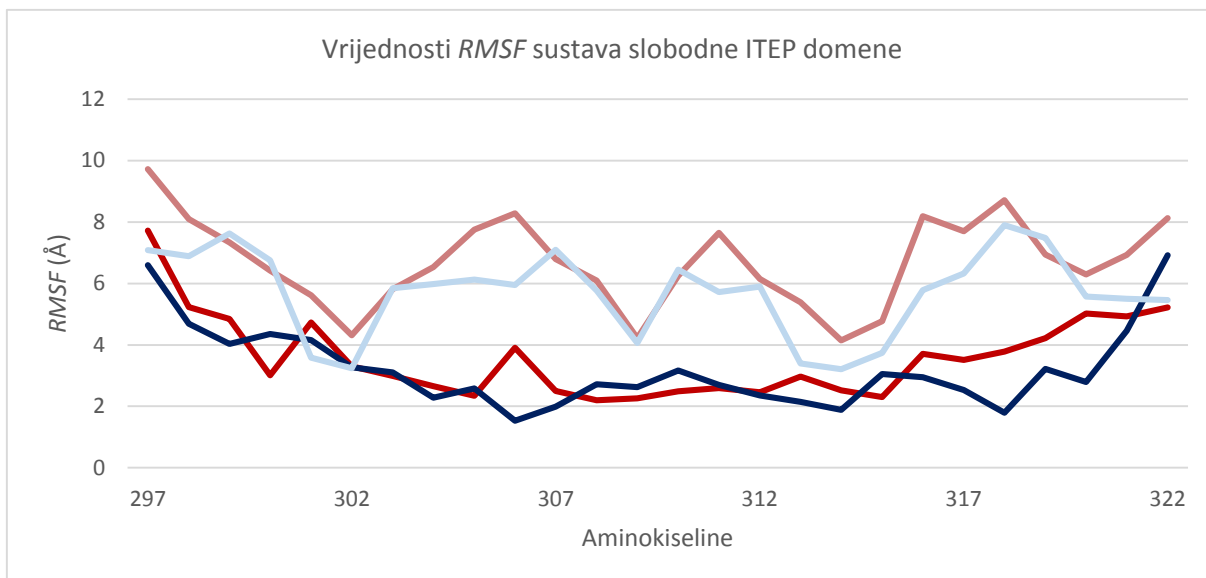
S obzirom na specifičan, izduženi izgled kao i kratku duljinu ITEP domene, visoke srednje vrijednosti *RMSD* pojedinih sustava ne ukazuju na destabilizaciju strukture već na značajnu strukturnu promjenu kroz koju ITEP domena prolazi do uravnoteženja. U sustavu s uvedenom mutacijom Met319 u Ser, u kojemu će ITEP domena postići stabilnu konformaciju, primijećeno je da stabilizacija nije zahtijevala značajne strukturne promjene, zbog čega je srednja vrijednost *RMSD* sustava u zadnjih 15 ns trajektorije relativno niska. Suprotno tome, u sustavu s uvedenom mutacijom Pro315 u Gly, gdje peptid također postiže stabilnu konformaciju, primijećena je vrlo visoka srednja vrijednosti *RMSD* u zadnjih 15 ns, što upućuje na vrlo velike strukturne promjene s obzirom na početnu strukturu ITEP domene.

Najniža srednja vrijednost *RMSD* (0,92 Å) tijekom zadnjih 15 ns simulacije, uočena je kod sustava s mutacijom Lys313 u Gln, simuliranom pri pH=7, dok je najviša srednja vrijednost (1,45 Å) uočena u sustavu s mutacijom Pro315 u Gly, simuliranom pri pH=7. Srednje vrijednosti mjerenja *RMSD* završnih 15 ns odabranih sustava slobodne ITEP domene prikazani su na slici 61. Detaljni rezultati *RMSD* analize sadržani su u prilogu V.

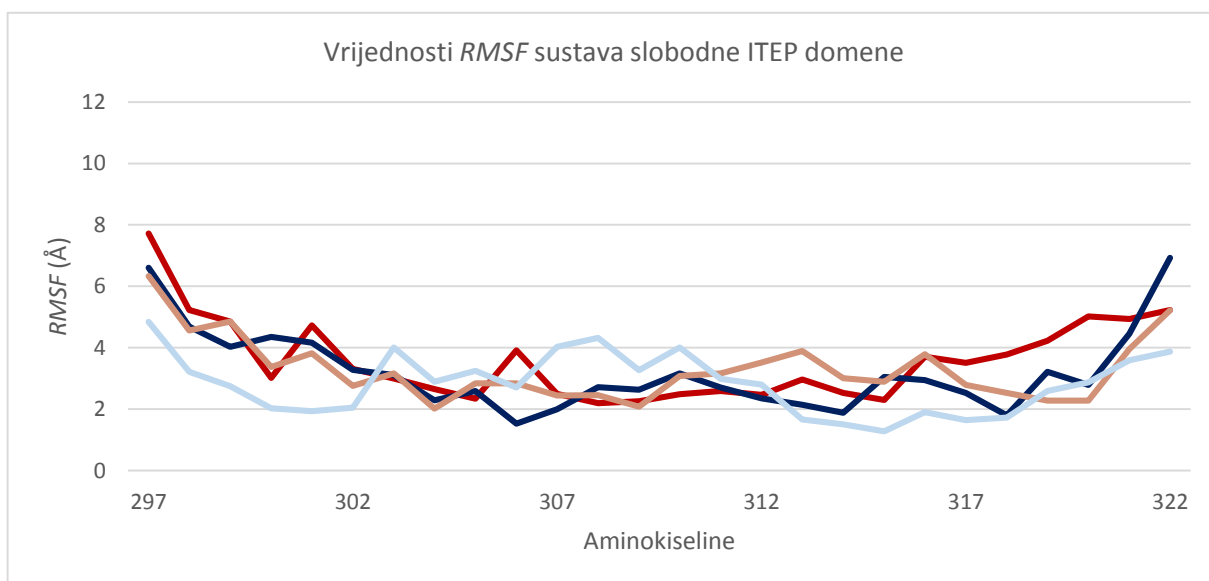


Slika 61. Srednje vrijednosti *RMSD* odabranih sustava slobodne ITEP domene. Vrijednosti su označene bojom ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava simuliranih pri pH=6, a smeđa sustava simuliranih pri pH=7.

Analizom *RMSF* primijećeno je da aminokiseline slobodne ITEP domene gotovo svih sustava, pokazuju očekivani pad vrijednosti fluktuacije od krajeva prema sredini peptida, uz najviše fluktuacije prve i zadnje aminokiselina čije su vrijednosti *RMSF* u intervalu od 6 do 10 Å. Primijećena je povezanost između uravnoteženja sustava i nižih vrijednosti fluktuacija aminokiselina sredine ITEP domene, što ne čudi s obzirom na to da „mali hidrofobni džep” koji se nalazi u ovoj regiji čini jezgru stabilnosti peptida gotovo svih sustava koji pokazuju relativno male konformacijske promjene. Snažan porast vrijednosti fluktuacija aminokiselina „malog hidrofobnog džepa” primijećen je samo kod vrlo nestabilnih sustava i sustava u kojima velika konformacijska promjena, uzrokuje ostvarivanje snažnih nekovalentnih interakcija između početka i kraja ITEP domene. Takve konformacijske promjene, praćene uravnoteženjem sustava, aminokiselinama „malog hidrofobnog džepa” onemogućuju zauzimanje optimalne orijentacije, što rezultira porastom njihovih vrijednosti fluktuacije. Snažan porast vrijednosti fluktuacija središnjeg dijela ITEP domene, u odnosu na istu regiju sustava divljeg tipa, opažen je analizom *RMSF* sustava slobodne ITEP domene s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys, Lys313 u Asp što je prikazano na slici 62. Na slici 63 prikazane su vrijednosti fluktuacija aminokiselina divljeg tipa i peptida s uvedenom mutacijom Pro315 u Gly. Sustav s uvedenom mutacijom Pro315 u Gly postiže uravnoteženje u prvih 5 ns trajektorije, te svojom stabilnom konformacijom u potpunosti mijenja izgled „malog hidrofobnog džepa”. Unatoč tome, u ovim sustavima, aminokiseline „malog hidrofobnog džepa” uspijevaju ostvariti nekovalentne interakcije s alternativnim aminokiselinama ITEP domene, te ne bilježe značajnu promjenu u vrijednostima fluktuacije. Detaljni rezultati analize *RMSF* sadržani su u prilogu VI.



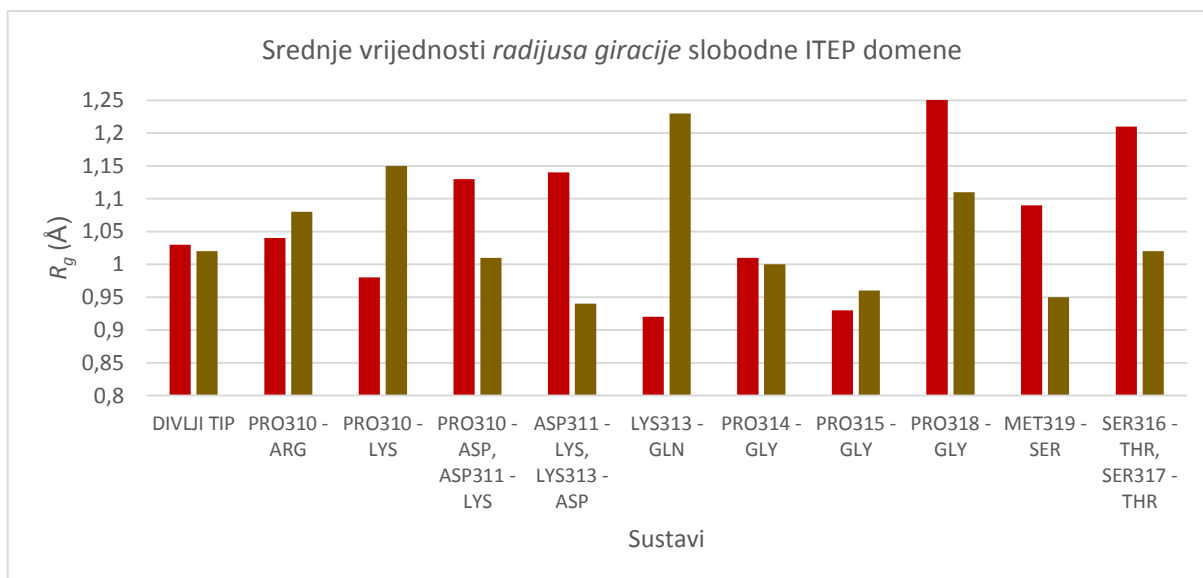
Slika 62. Vrijednosti *RMSF* sustava slobodne ITEP domene. Vrijednosti su označene bojom kako slijedi: sustav ITEP domene divljeg tipa proteina TROL (pH=6 - tamno crveno, pH=7 – tamno plavo), sustav ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Asp311 – Lys, Lys313 – Asp (pH=6 – rozo, pH=8 – svjetlo plavo).



Slika 63. Vrijednosti *RMSF* sustava slobodne ITEP domene. Vrijednosti su označene bojom kako slijedi: sustav ITEP domene divljeg tipa proteina TROL (pH=6 - tamno crveno, pH=7 – tamno plavo), sustav ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Pro315 - Gly (pH=6 – rozo, pH=8 – svjetlo plavo).

3.3.2 Radijus giracije i kompaktnosti slobodne ITEP domene

Mjerenjem radijusa giracije slobodne ITEP domene procijenjena je promjena kompaktnosti peptida duž trajektorije. Na slici 64 prikazane su srednje vrijednosti dobivene analizom zadnjih 15 ns odabranih sustava. Gotovo svi sustavi s uvedenim mutacijama pokazuju promjenu u vrijednostima radijusa giracije. Najveće razlike, s obzirom na radijus giracije sustava ITEP domene divljeg tipa proteina TROL, primijećene su u sustavima s uvedenim mutacijama Lys313 u Gln i Pro318 u Gly. S obzirom na visoke vrijednosti, ne iznenađuje što konformacije peptida ovih sustava zadržavaju izduženi izgled duž cijele trajektorije. Takva konformacija, uz očuvanost „malog hidrofobnog džepa” nalikuje početnim strukturama temeljenim na konformaciji FNR vezujuće domene enzima FNR. Sustavi s uvedenim mutacijama Pro310 u Arg i Pro314 u Gly pokazuju najveću sličnost vrijednosti radijusa giracije sa sustavima divljeg tipa, a sličnost u razvoju sustava potvrđuje i *RMSD* analiza, gdje sustavi ovih mutanata vrijednosti najbližije sustavima divljeg tipa. Vizualizacijom sustava s uvedenom mutacijom Pro310 u Arg potvrđena je i konformacijska sličnost sa sustavima divljeg tipa. Iznenađujuće, ista sličnost nije utvrđena u sustavima s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly, gdje je zabilježena stabilizacija konformacije uz snažnu promjenu izgleda „malog hidrofobnog džepa”. Detaljni rezultati mjerenja *radijusa giracije* sadržani su u prilogu VII.



Slika 64. Srednje vrijednosti *radijusa giracije* odabranih sustava proteinskog kompleksa. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH sustava iz kojih potječu. Crvena boja označava vrijednosti sustava simuliranih pri pH=6, a smeđa sustava simuliranih pri pH=7.

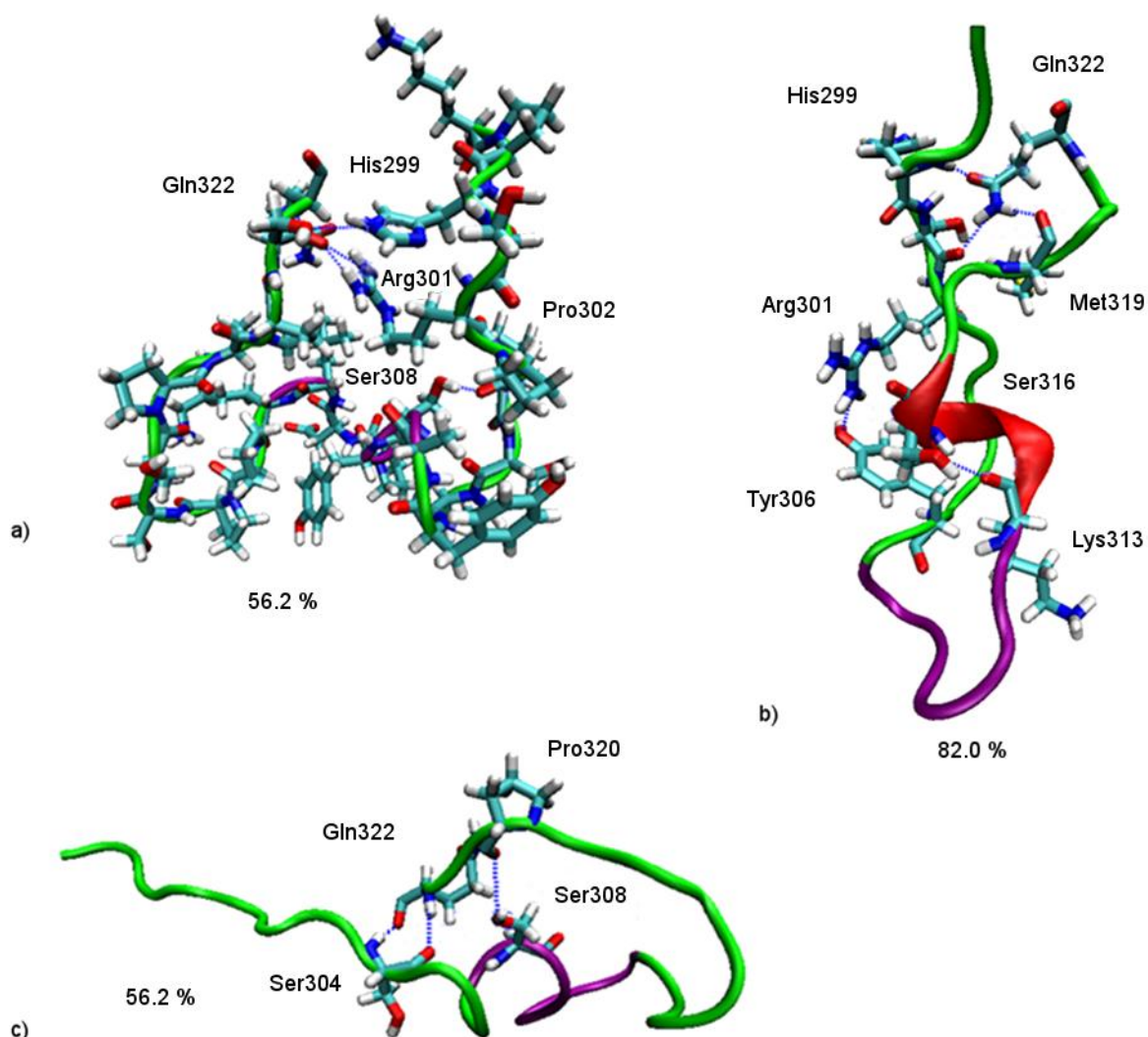
3.3.3 Klaster analiza sustava i pregled nekovalentnih interakcija

Vizualizacijom reprezentativne strukture najnapućenijeg klastera svih simuliranih sustava, utvrđene su tri karakteristične konformacije koje omogućuju stabilizaciju slobodne ITEP domene. Klaster analizom primijećena je i relativna stabilnost strukture koju zauzimaju aminokiseline u području „malog hidrofobnog džepa”, što potvrđuju i rezultati *RMSF* analize slobodne ITEP domene. Potpuni gubitak strukture „malog hidrofobnog džepa” primijećen je u sustavima s uvedenim mutacijama: Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, Pro314 u Gly, te Pro315 u Gly. Uz iznimku sustava s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly gubitak „malog hidrofobnog džepa” uzrokuje uspostava niza nekovalentnih interakcija između prve i druge polovice ITEP domene, čime se postiže vrlo stabilnu konformaciju u obliku slova “U”. U sustavima s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly, uspostavom nekovalentnih interakcija između sredine i kraja ITEP domene, uz veću fleksibilnost uzrokovanu zamjenom prolina za glicin postiže se stabilna konformacija peptida. Ostali sustavi koji dosežu uravnoteženje *RMSD* vrijednosti i vrijednosti radijusa giracije, zauzimaju konformaciju petlje kraja ITEP domene, što uz očuvanost „malog hidrofobnog džepa” čini veći dio njihove strukture relativno stabilnom. Vizualizacijom reprezentativne strukture najnapućenijih klastera dobivenih klaster analizom, prepoznate su dvije najstabilnije konformacije koje će ITEP domene ovih sustava zauzeti. Prva konformacija (slika 65c), s relativno nestabilnim početkom ITEP domene, zauzima strukturu u obliku slova “J”, te je primijećena u sustavima s uvedenim mutacijama Pro310 u Lys i Asp311 u Lys, te sustavima s uvedenim mutacijama Ser316 u Thr, Ser317 u Thr. Druga konformacija (slika 65a), primijećena u sustavima Pro310 u Arg, Pro318 u Gly i Met319 u Ser, zadržava izgled „malog hidrofobnog džepa”, uz ostvarivanje relativno nestabilnih, ali nezanemarivih, interakcije između početka i kraja ITEP domene. Izgled takve konformacije podsjeća na slovo “W”.

Sustavi simulirani pri pH=6 i pH=7 pokazuju generalnu sličnost konformacija peptida, što ne čudi s obzirom na to da se razlikuju samo u protonaciji His299. Utjecaj protoniranosti histidina primijećen je samo u sustavima koji ostvaruju izrazito snažne nekovalentne interakcije između početka i kraja ITEP domene, no i u takvim sustavima do uspostave ove interakcije dolazi relativno kasno u simulaciji. Konformacija peptida ovih sustava mnogo je jače određena uspostavljanjem alternativnih nekovalentnih interakcija u blizini „malog hidrofobnog džepa” pod utjecajem uvedenih mutacija.

Reprezentativne strukture najnapućenijih klastera odabranih sustava dobivenih klaster analizom prikazani su na slici 65. Prikazane konformacije peptida nalikuju slovima “U”, “J” i “W”, te su uz njih prikazani i postoci vremenske zastupljenosti struktura u simulaciji. Na slici su

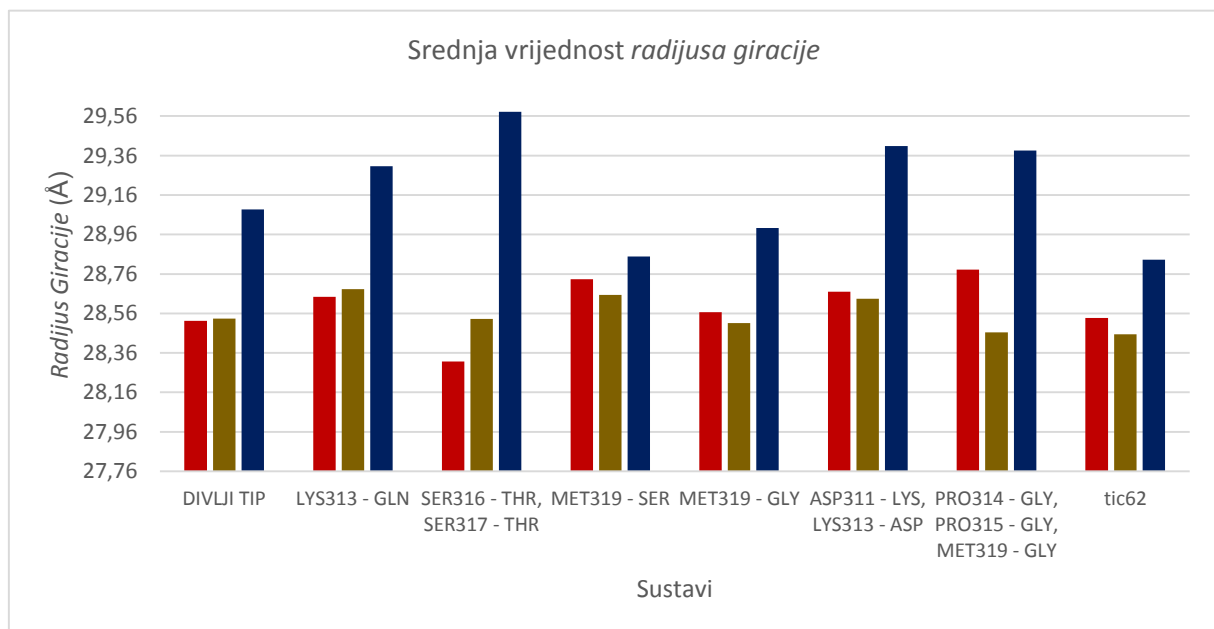
također prikazane i stabilne nekovalentne interakcije koje nastaju unutar ovih struktura. Ostali rezultati klaster analize slobodne ITEP domene prikazani su u prilogu VIII.



Slika 65. Reprezentativne strukture najnapučenijih klastera sustava dobivenih klaster analizom. Ispod struktura nalazi se postotak vremenske zastupljenosti struktura u simulacijama. **a)** Sustav s uvedenom mutacijom Met319 u Ser pri pH=7. Izgled strukture omogućuju interakcije koje His299 i Arg301 stvaraju s Gln322. Primijećen je i nastanak vodikove veze između Pro302 i Ser308; **b)** Sustav s uvedenom mutacijom Pro315 u Gly pri pH=7. Izgled strukture omogućuju vodikove veze koje His299 i Ser300 stvaraju s Gln322 i Met319, te vodikove veze stvorene između Tyr306 i Lys313; **c)** Sustav s uvedenom mutacijom Pro310 u Lys, Asp311 u Lys pri pH=6. Izgled strukture određuju vodikove veze koje Ser304 uspostavlja s Gln322, te Ser308 s Pro320.

Rasprava

Stabilnost proteinskog kompleksa, utvrđena temeljem rezultata mjerenja *RMSD*, *RMSF*, radijusa giracije i površine proteinskog kompleksa dostupne otapalu, pokazuje generalno smanjenje u sustavima simuliranim pri pH 8. S obzirom na uvođenje mutacija, kao i na činjenicu da početna struktura, korištena u svim simulacijama, najbolje opisuje samo jedan od sustava pri različitim pH, visoke vrijednosti *RMSD* zabilježene u sustavima simuliranim pri pH 8 samostalno ne moraju biti indikator nestabilnost proteinskog kompleksa, već mogu biti rezultat, snažne i stabilne, strukturne promjene tijekom simulacija. Eliminacijom regija visokih vrijednosti fluktuacija aminokiselina, udaljenih od ITEP domene, a utvrđenih analizom *RMSF* svih sustava, potvrđeno je da uvođenje mutacija u ITEP domenu zaista uzrokuje visoke vrijednosti *RMSD*, te u mnogim simuliranim sustavima dovodi do snažnih strukturnih promjena. Dodatnu potvrdu ovog zaključka dali su i rezultati mjerenja radijusa giracije proteinskog kompleksa i površine proteinskog kompleksa dostupnog otapalu, koji bez iznimke pokazuju najviše vrijednosti pri pH 8 (slika 66). S obzirom da je stabilnost vezanja podjedinica proteinskog kompleksa, obrnuto proporcionalna vrijednostima ovih analiza, na temelju rezultata simulacija može se zaključiti da stabilnost proteinskog kompleksa opada s porastom pH sustava.



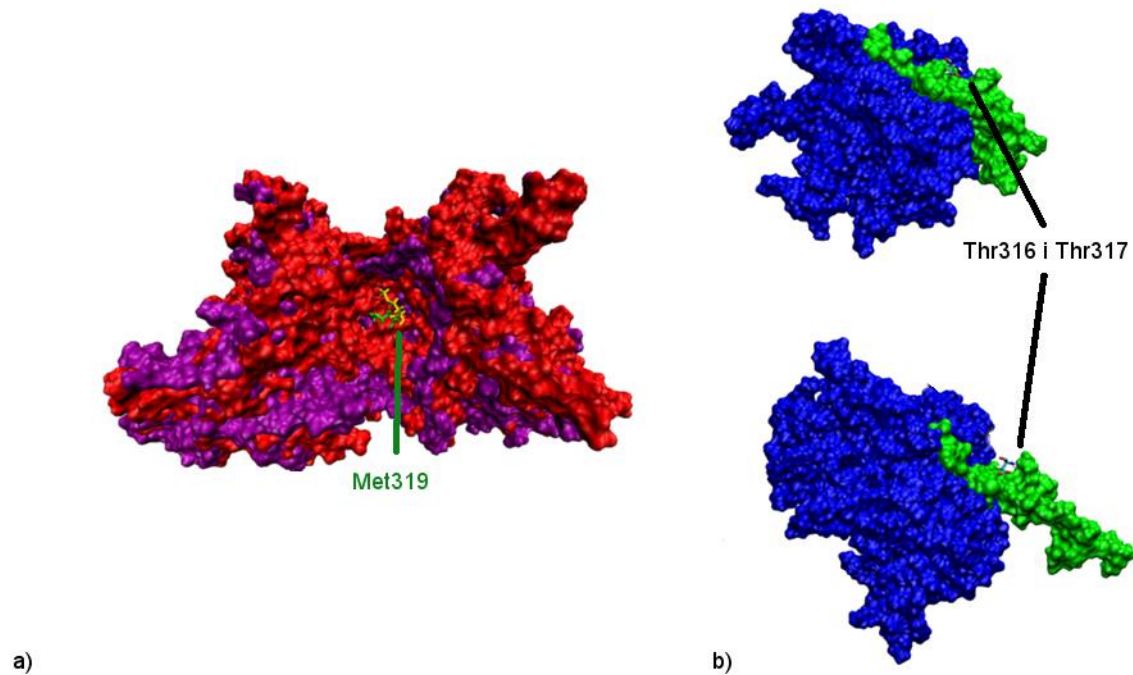
Slika 66. Srednje vrijednosti *radijusa giracije* simuliranih sustava proteinskog kompleksa pokazuje snažan porast vrijednosti u gotovo svim sustavima simuliranim pri pH=8. Vrijednosti su označene bojama ovisno o pH pri kojem je simuliran sustav. Crvena boja označava vrijednosti sustava pri pH=6, smeđa sustava pri pH=7, a plava sustava pri pH=8.

Izrazito visoke oscilacije vrijednosti radijusa giracije i površine proteinskog kompleksa dostupne otapalu, zabilježene su u sustavima s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, dok su najniže oscilacije zabilježene su u sustavu Met319 u Ser. Uvedeni Ser319 prvenstveno sudjeluje u vdW interakcijama, vodikova veza koju ostvaruje s Lys413 ne pokazuje ovisnost o pH, a utjecaj koji ima na najbližu mrežu vodikovih veza ovisnu o pH, onu uz Pro318 i His40, je zanemariv. Stoga se kao izgledno objašnjenje ujednačavanja vrijednosti sustava nameće stabilizacija „velikog hidrofobnog džepa” uzrokovana istiskivanjem Ser319 iz središnjeg položaja u džepu prema alternativnom mjestu vezanja. To objašnjenje potvrđuje i opaženo smanjenje razlike vrijednosti između sustava s uvedenom mutacijom Met319 u Gly. Da odmicanje Ser319 ili Gly319 od „velikog hidrofobnog džepa” neće negativno utjecati na stabilnost proteinskog kompleksa potvrđuje i mjerenje udaljenosti između aminokiselina koje sudjeluju u vdW interakcijama ove regije, a koje ne bilježe destabilizaciju.

Izostanak veće destabilizacije „velikog hidrofobnog džepa” u sustavima s uvedenim mutacijama povezana je i s niskom specifičnošću vdW interakcija, a stabilnost takvih interakcija održana je u svim simuliranim sustavima s ITEP domenom proteina TROL. Zanimljivo je da interakcijska regija „velikog hidrofobnog džepa”, koja uključuje najveći dio dodirnog područja između monomera enzima FNR, svoju najnižu stabilnost pokazuje u sustavu s FNR veznom domenom proteina Tic62, simuliranom pri pH 8. U ovom sustavu dolazi do destabilizacije i gubitka gotovo svih vdW interakcija, između monomera enzima FNR, u većem dijelu regije. Do destabilizacije vdW interakcija dolazi na području „velikog hidrofobnog džepa” najviše udaljenom od FNR vezne domene proteina Tic62, no primijećena destabilizacija, samostalno ne uzrokuje veću nestabilnost proteinskog kompleksa, što je potvrđeno *RMSD* analizom, mjerenjem radijusa giracije, te mjerenjem površine proteinskog kompleksa dostupnog otapalu.

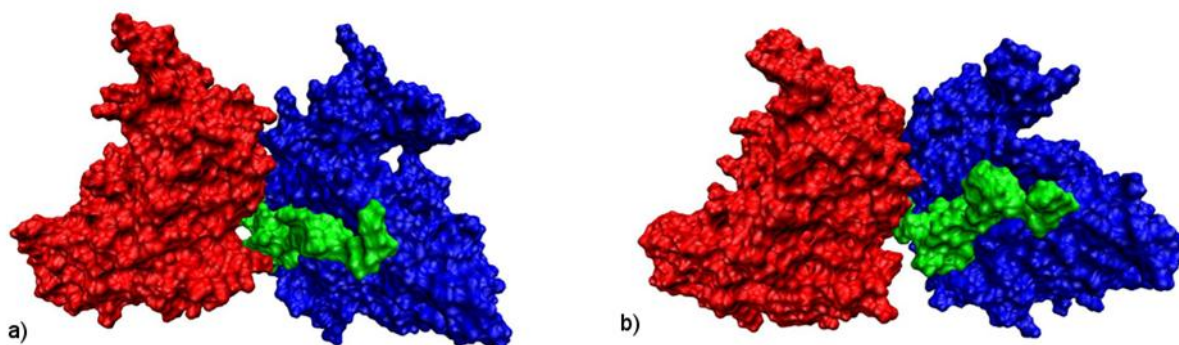
Svi pokušaji destabilizacije „velikog hidrofobnog džepa”, mutiranjem Met319, bili su neuspješni. Vrlo je vjerojatno da Met319 utječe na stabilnost proteinskog kompleksa, no uloga koju vrši u središtu „velikog hidrofobnog džepa” nije razjašnjena. Zbog orijentacije okomite na ITEP domenu, te izdužene konformacije kojom Met319 ulazi u središte regije najstabilnijih nekovalentnih interakcija između podjedinica proteinskog kompleksa, provjerena je mogućnost njegove uloge u svojevrsnom “sidrenju” dimera enzima pod određenim nagibom duž centralne osi ITEP domene. Mjerenjem odnosa između promjene orijentacije Met319 i promjene nagiba dimera FNR duž centralne osi ITEP domene, vizualnom analizom struktura dobivenih sravnjenjem proteinskog kompleksa odabranih sustava, nije utvrđena takva ovisnost (slika 67a). S obzirom na to da ni potpuno udaljavanje Met319 od središta „velikog hidrofobnog džepa”, ne pokazuje utjecaj na stabilnost njegovih vdW interakcija, iznenađuje snažan utjecaj, koji relativno male promijene postignute uvođenjem mutacije Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, imaju na stabilnost proteinskog kompleksa (slika 67b). vdW interakcije koje Thr316 uspostavlja

s Trp163 i Phe167 „velikog hidrofobnog džepa” omogućuju mu stvaranje vodikove veze sa Asp85 zbog čega monomer B enzima FNR gubi nešto više od polovice svih nekovalentnih interakcija s ITEP domenom, u sustavu simuliranom pri pH 8. Navedene aminokiseline u sustavima divljeg tipa, uspostavljaju relativno nestabilne vodikove veze čija stabilnost ne pokazuje značajni utjecaj u stabilnosti proteinskog kompleksa. Iako zanimljiva, detaljna pozadina strukturnih promjena primijećenih u sustavima s ovom mutacijom nije razjašnjena.



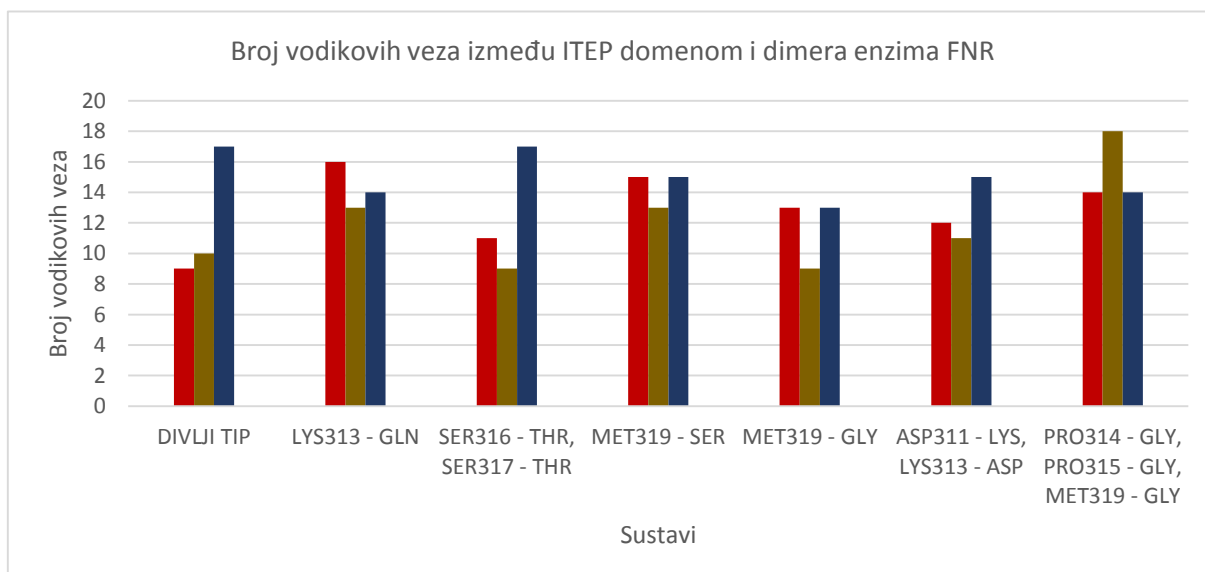
Slika 67. a) Orijentacija Met319 ne pokazuje utjecaj na nagib dimera enzima FNR duž centralne osi ITEP domene; **b)** Vizualizacija sustava proteinskog kompleksa s uvedenom mutacijom Ser316 u Thr, Ser317 u Thr, u ITEP domenu proteina TROL. Gornja slika prikazuje sustav simuliran pri pH=6, a donja sustav simuliran pri pH=8. Na slici nije prikazan monomer A enzima FNR.

U sustavima koji pokazuju najveću stabilnost, primijećeno je povezivanje malog i velikog hidrofobnog džepa u jedno, stabilno, interakcijsko područje čije aminokiseline nemaju velike fluktuacije tijekom MD simulacije. Uvođenje mutacije Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly, dovodi do snažnih fluktuacija aminokiselina u središnjem dijelu ITEP domene. Također, slabljenje vdW interakcija, uvođenjem mutacija, uzrokuje značajno odvajanje monomera A enzima FNR uz destabilizaciju svih mreža vodikovih veza ovisnih o pH, sa suprotne strane ITEP domene (slika 68). Zanimljivo, udaljavanje monomera A zabilježeno je samo u sustavu pri pH 8. Takvi rezultat ukazuju na ulogu vdW interakcija duž cijele ITEP domene u stabilnosti i disocijaciji proteinskog kompleksa ovisnoj o pH.



Slika 68. Prikazan je sustav proteinskog kompleksa i ITEP domene proteina TROL s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly, simuliran pri pH=8. Površina proteinskog kompleksa prije (slika a) i nakon (slika b) destabilizacije uzrokovane gubitkom vdW interakcija zbog uvođenja mutacija

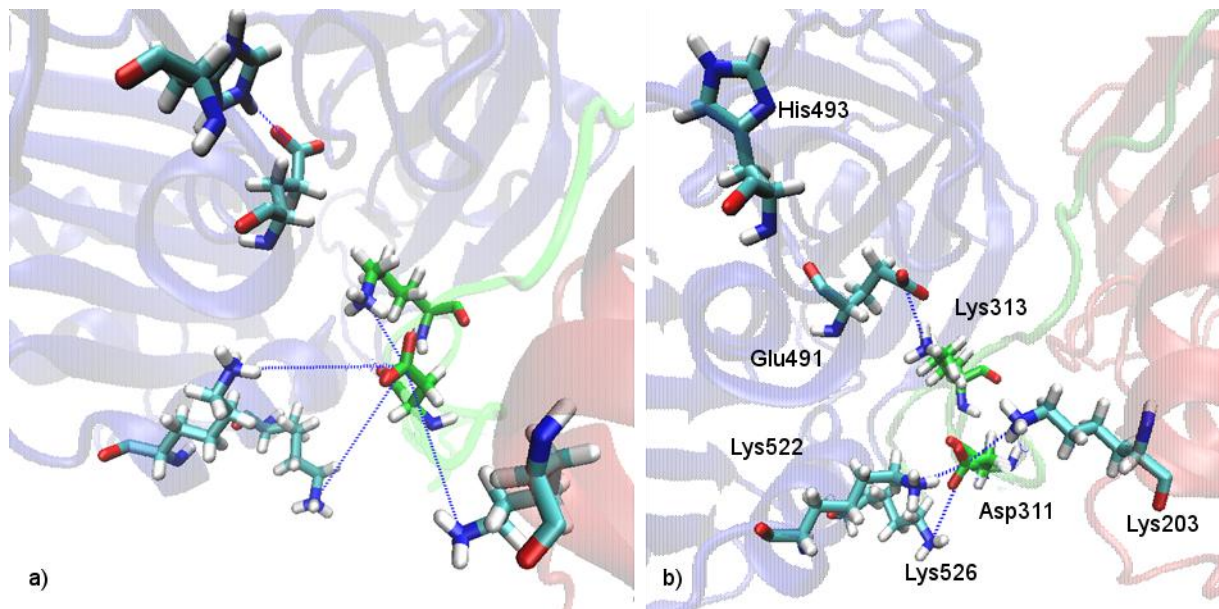
Nemogućnost uzrokovanja destabilizacije vdW interakcija uvođenjem mutacija direktno u „veliki hidrofobni džep”, upućuje na postojanje mehanizma disocijacije udaljenog od ove regije proteinskog kompleksa. Takav mehanizam mogao bi uključivati mreže vodikovih veza ovisne o pH, sa suprotne strane ITEP domene, ali i područja proteina TROL koja nisu obuhvaćena u simuliranim sustavima. Potporu ovom zaključku daje primijećena razlika u broju vodikovih veza stvorenih između ITEP domene divljeg tipa proteina TROL i dimera enzima FNR, između sustava simuliranim pri pH 6 i pH 8 (slika 69). Naime, u sustavu divljeg tipa, simuliranom pri pH 6, utvrđeno je 9 stabilnih vodikovih veza s dimerom enzima FNR, od kojih se većina nalaze na istoj strani ITEP domene kao i „veliki hidrofobni džep”. U sustavu simuliranom pri pH 8, dolazi do destabilizacije dijela ovih vodikovih veza, no uspostavljaju se nove, snažne i stabilne, nekovalentne interakcije sa suprotne strane ITEP domene, što ukupan broj vodikovih veza podiže na 17.



Slika 69. Broj stabilnih vodikovih veza između aminokiselina ITEP domene protein TROL i dimera enzima FNR pokazuje neočekivani porast vrijednosti u sustavu divljeg tipa simuliranom pri pH=8 (plavo).

Da uspostava vodikovih veza, na jednom kraju proteinskog kompleksa, može dovesti do destabilizacije drugog kraja, potvrđuju i detaljne analize mreža vodikovih veza ovisnih o pH.

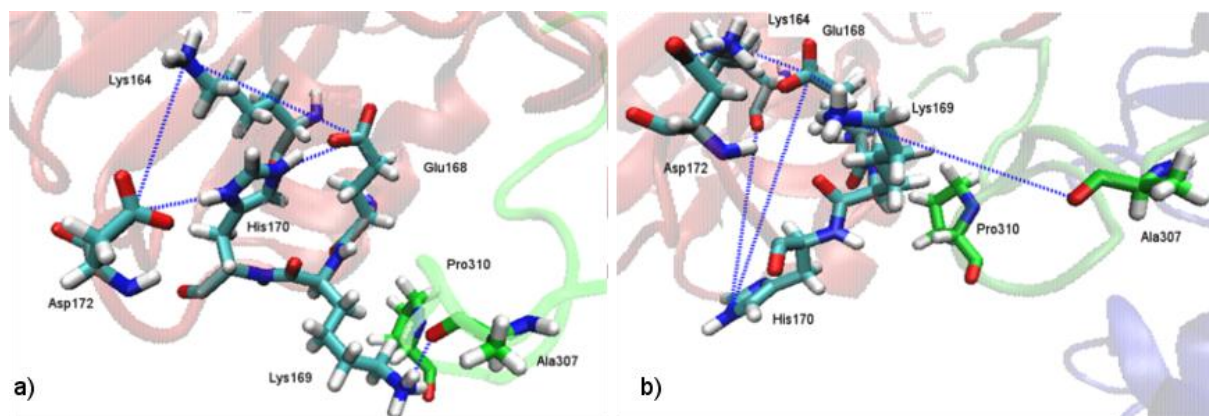
Mreža vodikovih veza, u regiji Asp311 i Lys 313, koja se nalazi na strani ITEP domene suprotne „velikom hidrofobnom džepu”, mogući je sudionik takvog razdvajanja proteinskog kompleksa. Karakteristična, stabilna stanja ovih vodikovih veza, koje povezuju ITEP domenu s dimerom enzima FNR pri pH 8, te uzrokuju destabilizaciju istih veza, uz nastanak vodikovih veza između aminokiselina ITEP domene pri pH 6 i 7, govore u prilog njihovoj regulativnoj ulozi. Biološku ulogu ove mreže vodikovih veza pretpostavljaju vrlo niske *RMSF* vrijednosti njenih aminokiselina, koje pokazuju stabilnost međusobnih orijentacija. Takva stabilnost potvrđena je i vizualnom analizom, te je utvrđeno postojanje svojevrsnog prekidača (eng. switch), temeljenog na protonacijskom stanju histidina 493 (slika 70).



Slika 70. Dva distinktna stanja mreže vodikovih veza uz Asp311 i Lys313, koja ovise o protoniranosti His493. **a)** Prikaz sustava divljeg tipa simuliranog pri pH=6. Uspostava vodikove veze između Asp311 i Lys313, ITEP domene, onemogućuje interakcije s dimerom enzima FNR; **b)** Sustav simuliran pri pH=8.

Uvođenjem mutacija Lys313 u Gln, te Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, uspješno je onesposobljena ovisnost o pH ove mreže vodikovih veza,. Uvedene mutacije zadržavaju pripadajuću mrežu vodikovih veza u jednom od dva stanja kroz sustave simulirane pri različitim pH. Mutacija Lys313 u Gln omogućuje vezanje ITEP domene i dimera enzima FNR, dok mutacija Asp311 u Lys, Lys313 u Asp održava vodikove veze u stanju u kojemu se one uspostavljaju samo između aminokiselina ITEP domene, čime se destabilizira nekovalentne interakcije u ovoj regiji proteinskog kompleksa. Stoga iznenađuju rezultati mjerenja radijusa giracije između sustava s navedenim mutacijama, simuliranim pri različitim pH. Naime, blokiranjem pH osjetljivosti ove mreže vodikovih veza, očekivala se izjednačavanje vrijednosti radijusa giracije, koje nije utvrđeno.

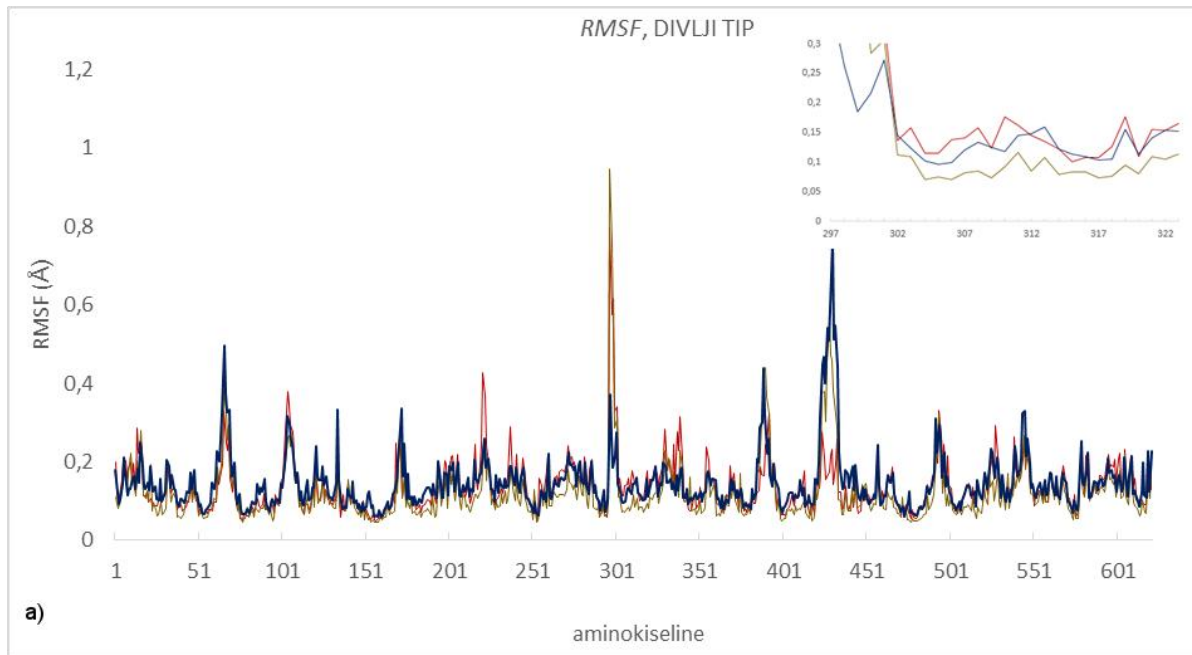
Stvaranje vodikove veze između Lys169 i Ala307, te vdW interakcije koje Lys169 uspostavlja s Pro310 najstabilnije su u sustavima simuliranim pri pH=8. Indikacija funkcionalne važnosti ovih interakcija leži u činjenici da većina uvedenih mutacija uzrokuje njihovu destabilizaciju. Takva relativna osjetljivost na uvođenje mutacija ukazuje na sudjelovanje u fino ugođenom mehanizmu, koji, s obzirom na to da se radi o veznoj domeni, vrlo vjerojatno određuje kvalitetu vezanja i sposobnost disocijacije dimera enzima FNR. Snažna promjena orijentacije His170, središnje aminokiseline ove regije, koja je zabilježena pri kraju simulacije sustava divljeg tipa proteina TROL, simuliranog pri pH=8, otvara mnoga pitanja o prirodi detekcije promjene pH u ovom enzimu. S obzirom da orijentaciju Lys169 direktno određuje orijentacija His170, pomicanje histidina na vanjsku stranu petlje uzrokuje odvajanje Lys169 od ITEP domene (slika 71). Takva promjena, uzrokovana je gubitkom jedne od vodikovih veza koju je His170 sposoban stvoriti u strogo definiranom okruženju Asp172, Glu168 i Lys164, samo pri pH 6. S obzirom da su dio vezne domene enzima FNR, tako strogo određene mreže vodikovih veza ovisne o pH, ne smiju biti zanemarene prilikom otkrivanja mehanizma raspada proteinskog kompleksa.



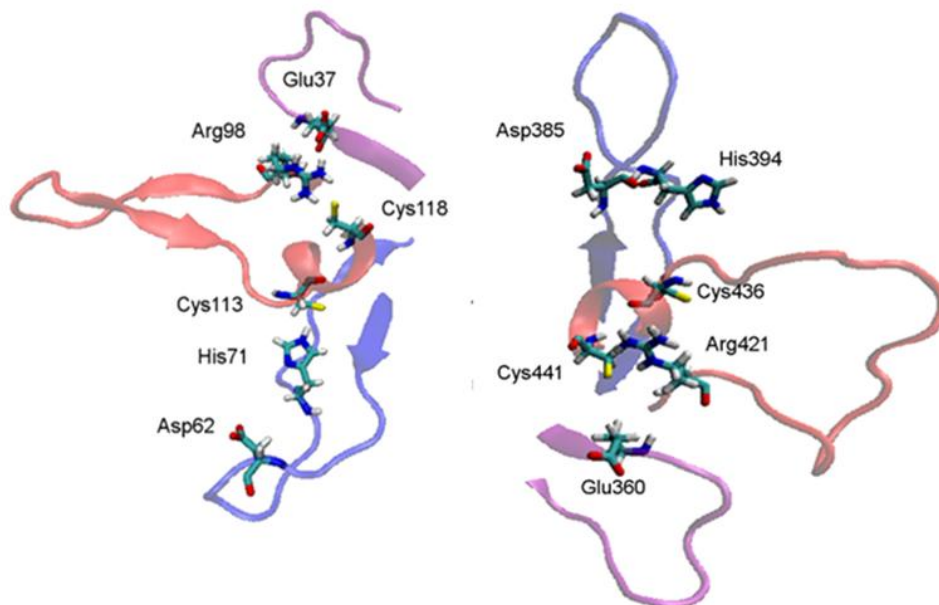
Slika 71. Utjecaj orijentacije His170 na izgled regije uz Ala307 i Pro310; **a)** Sustav proteinskog kompleksa i divljeg tipa ITEP domene, simuliran pri pH=6 u kojemu je His170 stabilno smješten u središtu petlje; **b)** Sustav divljeg tipa simuliran pri pH=8. U zadnjih 5 ns MD simulacije, His170 odlazi izvan petlje što uzrokuje trenutačno odmicanje Lys169 od ITEP domene proteina TROL i njegovu stabilizaciju u središtu petlje.

Primijećena je snažna fluktuacija, ovisna o pH, FAD vezujuće domene monomera B, te mnogo slabija fluktuacija iste regije monomera A (slika 72). Iako udaljene od ITEP domene, FAD vezujuće domene se nalaze dovoljno blizu „velikog hidrofobnog džepa“ da promjenama u vlastitoj strukturi mogu utjecati na vdW interakcije između podjedinica proteinskog kompleksa. Uvođenje mutacija u ITEP domenu proteina TROL, povećava i smanjuje pH osjetljivost ove domene u oba monomera. S obzirom na to da uvođenje već jedne mutacije u ITEP domenu može dovesti do promijene pH osjetljivost fluktuacije FAD vezne domene,

moguće je da redosljed vezanja monomera enzima FNR na protein TROL ima utjecaj na stupanj biološke aktivnosti koju pojedini monomer može postići u ovom proteinskom kompleksu. Naime, znatno viša fleksibilnost FAD vezne domene monomera B, koji se veže na sam kraj proteina TROL, mogla bi omogućiti lakšu uspostavu optimalne orijentacije između NADP, FAD, te olakšati vezanje Fd. Pritom je potrebno imati na umu da primijećene razlike u fleksibilnosti FAD vezne domene mogu predstavljati i artefakt računalnih metoda.



a)

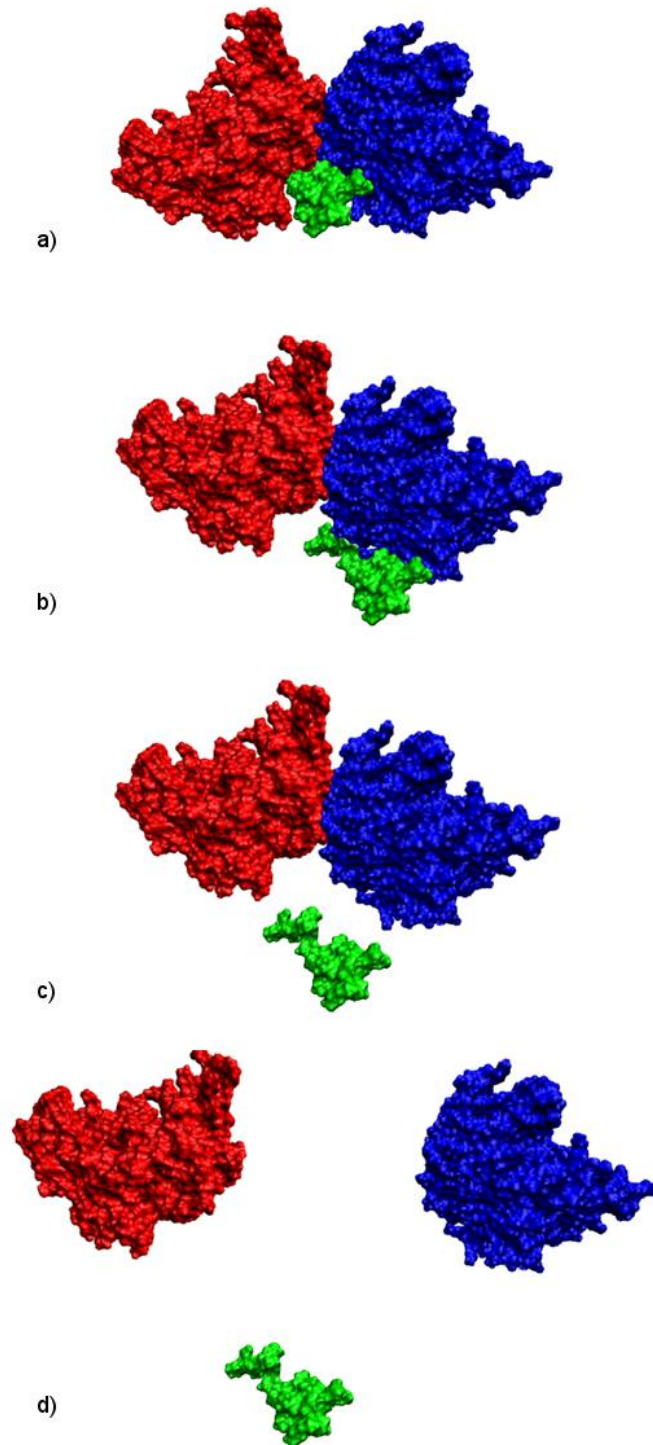


b)

Slika 72. a) Vrijednost *RMSF* sustava kompleksa dimera proteina FNR i ITEP domene divljeg tipa proteina TROL. Crvenom bojom su prikazane srednje vrijednosti *RMSD* sustava pri pH=6, smeđom sustava pri pH=7, a plavom sustava pri pH=8. Fleksibilnost regija 420 – 440, monomera B, pokazuje snažnu ovisnost o pH koja nije uočena u istoj regiji monomera A (100 -120). **b)** Vizualizacija visoko fluktuirajućih regija monomera A i B.

Temeljem rezultata detaljne analize dinamike nekovalentnih interakcija između podjedinica proteinskog kompleksa, predložena su dva načina na koji bi moglo doći do disocijacije dimera enzima FNR od ITEP domene proteina TROL, ovisne o pH sustava. Predloženi načini disocijacije nazvani su: “uparena disocijacija”, te “disocijacija polugom”.

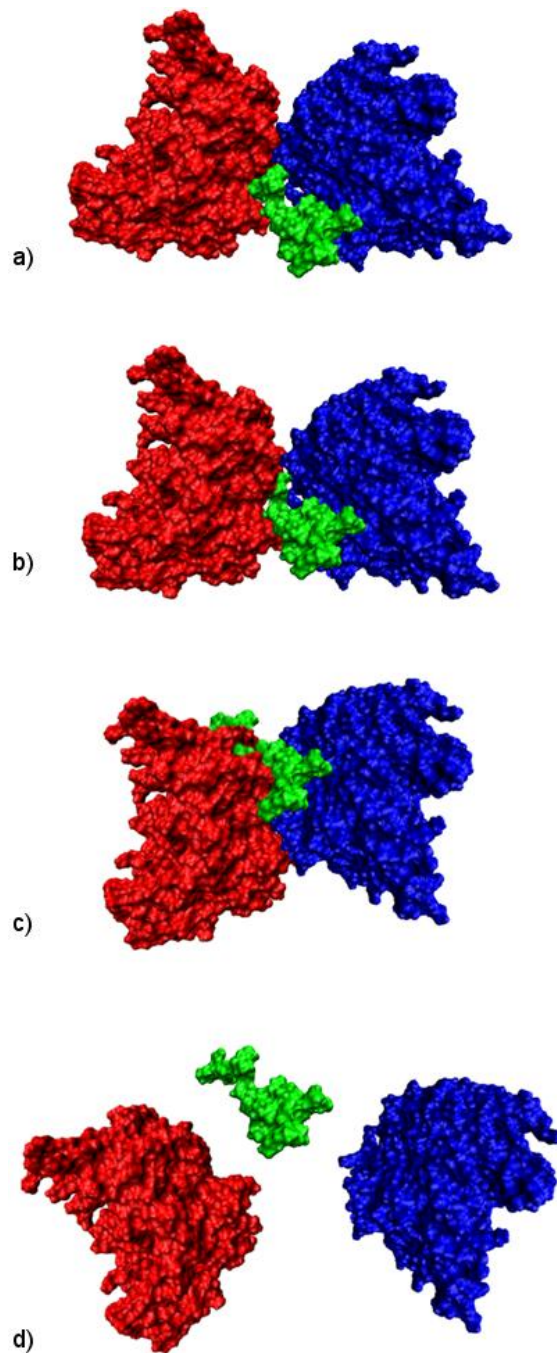
Prema modelu “uparene disocijacije”, prikazanom na slici 73, disocijacija proteinskog kompleksa započinje serijom destabilizacija vodikovih veza sa strane ITEP domene suprotne onoj „velikog hidrofobnog džepa”. Destabilizaciju vodikovih veza prati i destabilizacija obližnjih vdW interakcija te se efekt širi prema „velikom hidrofobnom džepu”. Destabilizaciju podupire uspostava novih vdW interakcija koji udaljavaju „veliki hidrofobni džep” od ITEP domene. Takav način disocijacije ne isključuje zadržavanje interakcija između ITEP domene i monomera B enzima FNR, ali pretpostavlja da nakon potpunog gubitka nekovalentnih interakcija s monomerom A, interakcije s monomerom B neće biti dovoljne da zadrže dimer enzima FNR vezan za protein TROL. Nakon odvajanja dimera enzima FNR od ITEP domene, zbog izostanka strukturno važnih interakcija s „malim hidrofobnim džepom”, dolazi do raspada dimera. Potpora ovom modelu je zabilježena očuvanost „velikog hidrofobnog džepa” u gotovo svim sustavima, kao i destabilizacija pojedinih vodikovih veza sa suprotne strane ITEP domene, uz snažno udaljavanje A monomera enzima FNR primijećeno u sustavima s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly. Model “uparene disocijacije” podupire i jačanje stabilnosti proteinskog kompleksa proteina Tic62 i dimera enzima FNR. Naime, značajna destabilizacija „velikog hidrofobnog džepa” primijećena u sustavu proteina Tic62, simuliranom pri pH=8, onemogućila bi ovaj način disocijacije proteinskog kompleksa, što se poklapa sa dosadašnjim rezultatima mjerenja ovisnosti vezanja proteina Tic62 i proteina TROL o pH. Ipak, nekoliko mreže vodikovih veza ovisnih o pH, ne podupire ovaj model, zbog čega je predložen i model “disocijacije polugom”.



Slika 73. Mogući raspad proteinskog kompleksa “uparenom disocijacijom”. U predloženom modelu snažne vdW interakcije „velikog hidrofobnog džepa” prestaju postojati tek nakon što je dimer enzima FNR disocirao s ITEP domene proteina TROL. Slika prikazuje glavne korake ovog modela raspada: **a)** struktura proteinskog kompleksa pred raspad; **b)** odvajanje A monomera enzima FNR od ITEP domene temeljem destabilizacije mreža vodikovih veza ovisnih o pH; **c)** odvajanje B monomera enzima FNR od ITEP domene; **d)** potpuni raspad proteinskog kompleksa.

Model "disocijacije polugom", prikazan na slici 74, započinje uspostavom vodikovih veza sa strane ITEP domene suprotne „velikom hidrofobnom džepu”. Nastanak ovih veza prati i uspostava vdW interakcija uz „mali hidrofobni džep” na takav način da dolazi do destabilizacije vdW interakcija „velikog hidrofobnog džepa”. Njegov raspad prati i destabilizacija obližnjih vodikovih veza te u konačnici dolazi do potpunog odvajanja dimera enzima FNR. Monomeri enzima FNR još uvijek su povezani s ITEP domenom, no bez međusobne povezanosti, ove interakcije nisu dovoljno snažne da ih održe vezanim s ITEP domenom zbog čega dolazi do njihove disocijacije. Potporu takvom načinu raspada proteinskog kompleksa nalazimo u sustavima simuliranim pri pH 8, u kojima prestaju postojati snažne vodikove veze između aminokiseline Ser308 i Pro318, ITEP domene, i aminokiselina monomera A enzima FNR. Na važnost ove mreže vodikovih veza ukazuje i činjenica da niti jedna od uvedenih mutacija nije imala utjecaj na njenu pH osjetljivost, kao ni na stabilnost orijentacije njenih aminokiselina pri različitim pH. Model "disocijacije polugom" podupire i nastanak većeg broja vodikovih veza ovisnih o pH, sa strane ITEP domene suprotne „velikom hidrofobnom džepu”, što je primjećeno u sustavima divljeg tipa proteina TROL, simuliranom pri pH 8. Novonastale vodikove veze, koje uključuju aminokiseline Asp307, Tyr306, Asp311, Pro313, te Ser317, nije lako objasniti po modelu "uparene disocijacije", u kojemu se očekuje destabilizacija nekovalentnih interakcija s te strane ITEP domene.

Potporu modelu "disocijacije polugom" daje i mjerenje radijusa giracije u sustavima simuliranim pri različitim pH, u kojima uvođenje mutacije uzrokuje stabilizaciju „velikog hidrofobnog džepa”. Naime, ukoliko zbog jačine vdW interakcija ne može doći do destabilizacije „velikog hidrofobnog džepa”, po ovom modelu, disocijacija proteinskog kompleksa izgubiti će svoju pH osjetljivost u intervalu između pH 6 i pH 8. Takav gubitak pH osjetljivosti doveo bi do uravnoteženja vrijednosti radijusa giracije, što je u ovom istraživanju i potvrđeno.



Slika 74. Mogući raspad proteinskog kompleksa po modelu “disocijacije polugom”. U predloženom modelu, mreže vodikovih veza ovisne o pH nastaju na strani ITEP domene suprotne onoj „velikog hidrofobnog džepa” te destabiliziraju vdW interakcije unutar njega. Stvorene vodikove veze nisu dovoljno snažne da zadrže monomere enzima FNR vezane za ITEP domenu, te oni disociraju čime završava proces raspada proteinskog kompleksa. Slika prikazuje glavne korake u predloženom modelu raspada: **a)** struktura proteinskog kompleksa pred raspad; **b)** započinje formacija mreža vodikovih veza ovisnih o pH; **c)** temeljem poluge, nove vodikove veze uzrokuju destabilizaciju „velikog hidrofobnog džepa”; **d)** potpuni raspad proteinskog kompleksa.

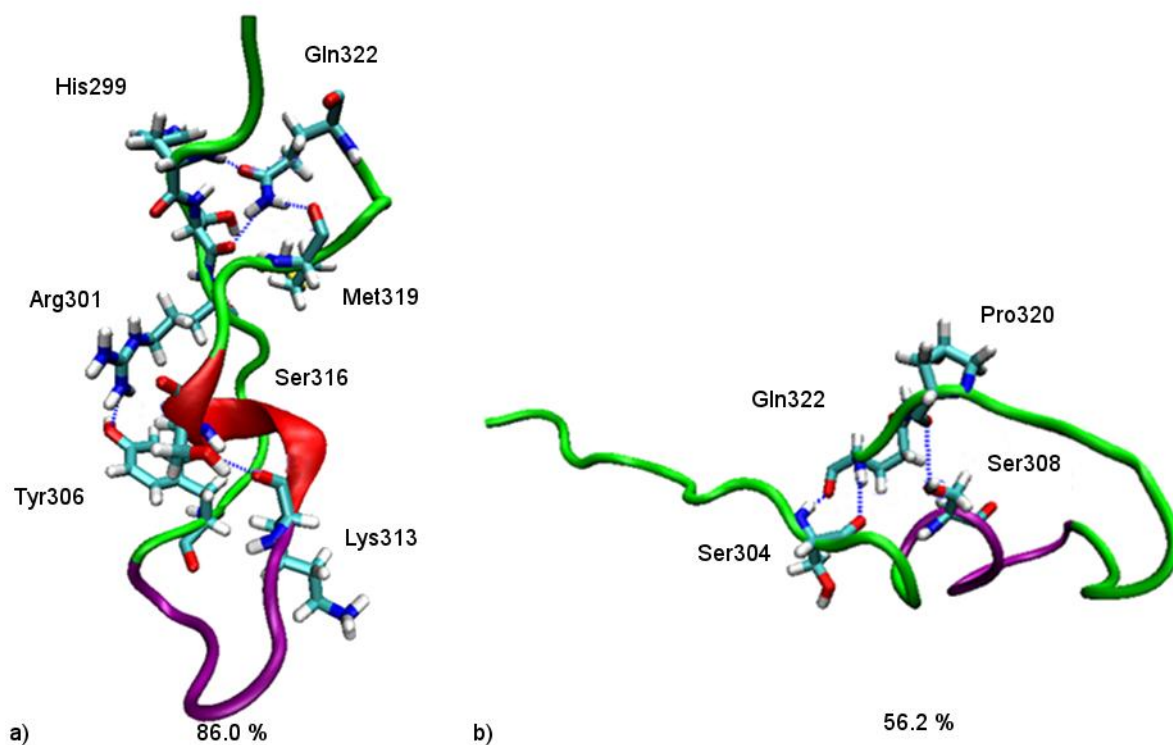
Predstavljeni rezultati dobiveni analizom računalnih simulacija trebaju eksperimentalnu potvrdu u vidu eksperimenata *in vivo* i *in vitro*.

Eksperiment *In vivo* mogao bi se temeljiti na uvođenju istovjetnih mutacija u neku od modelnih vrsta korištenih u biljnim istraživanjima, te na utvrđivanju stabilnosti proteinskog kompleksa. S obzirom na nemogućnost precizne procijene pH bioloških sustava, eksperimentalnu potvrdu disocijacije proteinskog kompleksa ovisne o pH moguće je dobiti kinetičkom analizom ili specifičnom kromatografijom s izmjenom pH. Strukturnu važnost malog hidrofobnog džepa u stabilnosti proteinskog kompleksa dodatno bi se mogla potvrditi uvođenjem mutacija u protein TROL s ciljem promjena sekundarne strukture ovog dijela ITEP domene. Takvu promjenu, na temelju rezultata analize simuliranih sustava, postiglo bi mutiranje Tyr306 i Try309 koje predstavljaju središnje aminokiseline malog hidrofobnog džepa. Također bi bilo zanimljivo provjeriti utjecaj mutiranja aminokiseline ITEP domene koje ostvaruju pH neovisne vodikove veze s dimerom enzima FNR. Vodikove veze, primijećene u gotovo svim sustavima, stvaraju se s aminokiselinama Leu303, Ser304 i Gln322, te se nalaze izvan regija malog i velikog hidrofobnog džepa. Postignuto zadržavanje pojedinih stanja mreže vodikovih veza uz Asp311 i Lys313 u širem rasponu pH, omogućuje nam relativno jednostavnu, eksperimentalnu provjeru, predloženog modela "disocijacije polugom". Naime, u sustavima *in vivo*, nakon uveđenja mutacije Lys313 u Gln, očekuje se nemogućnost raspada proteinskog kompleksa, dok se u sustavima s uvedenom mutacijom Asp311 u Lys, Lys313 u Asp, očekuje nemogućnost održavanja stabilnosti proteinskog kompleksa. Prema modelu "disocijacije polugom" uvođenje mutacije Lys313 u Gln, onemogućuje inicijaciju raspada proteinskog kompleksa, zbog održavanja nekoliko vodikovih veza s dimerom enzima FNR pri pH 8. Vodikove veze koje ostvaruju aminokiseline u ovoj regiji proteinskog kompleksa s divljim tipom proteina TROL prisutne su samo u sustavima simuliranim pri pH 6 ili niti ne postoje. Prema istom modelu, uvođenje mutacija Asp311 u Lys i Lys313 u Asp, zbog gubitka vodikovih veza između ovih aminokiselina i dimera enzima FNR, drži proteinski kompleks u stanju inicijacije raspada. Nastanak proteinskog kompleksa bi i dalje bio moguć, no njegova stabilnost bila bi kratkotrajna. Prema tome, potvrdu ovog modela raspada dao bi snažan pad vrijednosti jačine vezanja između podjedinica proteinskog kompleksa u eksperimentima *in vivo* s navedenom mutacijom.

Svi simulirani sustavi ITEP domene proteina TROL i dimera enzima FNR pretpostavljaju stvaranje proteinskog kompleksa, što nije nužno slučaj u eksperimentima *in vivo*. Uzrok tomu je mogućnosti da neke od mutacija ITEP domene proteina TROL, korištenih u ovom radu, dovode do promijene u raspodjeli konformacija peptida ITEP domene, što povećava zastupljenost konformacija koje otežavaju, ili čak onemogućuju vezanje enzima FNR. Kako bi procijenili da li ITEP domena s uvedenim mutacijama omogućuje vezanje enzima

FNR, izrađeni su sustavi slobodne ITEP domene. Sustavi divljeg tipa slobodne ITEP domene, kao i veći dio sustava slobodne ITEP domene s uvedenim mutacijama, pokazuje očekivanu fleksibilnost konformacije, uz iznimku „malog hidrofobnog džepa” koji zadržava svoju sekundarnu strukturu, te predstavlja potencijalno inicijalno mjesto vezanja enzima FNR za protein TROL. U pojedinim sustavima utvrđene su stabilne konformacije koje se održavaju duž cijele simulacije, te neke od njih pokazuju gubitak strukture „malog hidrofobnog džepa” što bi moglo uzrokovati nemogućnosti vezanja enzima FNR za protein TROL.

Primjer takve strukture je utvrđen u sustavima s uvedenom mutacijom Pro315 u Gly, u kojoj peptid vrlo rano zauzima konformaciju nalik slovu “U”, te se takva konformacija uz manje fluktuacije održava do samog kraja trajektorije (slika 76a). Druga stabilna konformacija primijećena je u sustavima slobodne ITEP domene s uvedenom mutacijom Pro310 u Lys, Asp311 u Lys u kojoj dolazi do formacije svojevrsne petlje na kraju peptida (slika 76b). Iako sekundarna struktura „malog hidrofobnog džepa” ostaje zadržana u ovom sustavu, moguće je da formacija petlje maskira ili otežava vezanje enzima FNR za ITEP domenu.



Slika 75. a) Stabilna konformacija slobodne ITEP domene s uvedenim mutacijom Pro315 u Gly, pri pH=7; b) Stabilna konformacija slobodne ITEP domene s uvedenom mutacijom Pro310 u Lys i Asp311 u Lys, pri pH=6. Ispod slika su prikazani postoci vremena simulacije koje peptidi provode u prikazanim konformacijama.

Treća stabilna konformacija slobodne ITEP domene primijećena je u sustavu s uvedenom mutacijom Met319 u Ser, gdje dolazi do stabilizacije početka i kraja peptida uz očuvanje strukture „malog hidrofobnog džepa”. S obzirom na to da nije primijećeno maskiranje džepa, a interakcije između početka i kraja ITEP domene nisu vrlo stabilne, ne očekuje se značajno smanjenje sposobnosti vezanja enzima FNR za ITEP domenu proteina TROL.

Početna konformacija slobodne ITEP domene temeljena je na konformaciji ITEP domene u proteinskom kompleksu, pa treba imati na umu mogućnost da stabilna struktura „malog hidrofobnog džepa” nastaje kao rezultat vezanja dimera enzima FNR. Kako bi dobili potvrdu sposobnosti ITEP domene da samostalno zauzme konformaciju koja sadrži „mali hidrofobni džep” mogao bi se simulirati sustav slobodne ITEP domene u kojemu se prethodno destabilizirala struktura džepa. Takvu destabilizaciju moguće je postići korištenjem povratnih mutacija, na način da prvo uvedemo mutaciju koja destabilizira sustav, te nakon destabilizacije vratimo mutirane aminokiseline u divlji tip.

Zaključak

Analiza MD simulacija, napravljena mjerenjem *RMSD*, *RMSF*, *Rg*, te površine proteinskog kompleksa dostupne otapalu, ukazuje na generalno smanjenje stabilnosti strukture proteinskog kompleksa u sustavima simuliranim pri pH=8. Takvi rezultati su u skladu s dosad napravljenim eksperimentima *in vivo*.

Utvrđena je ovisnost o pH mreže vodikovih veza u regiji Ser308 i Pro318. U sustavima simuliranim pri pH=6 primijećena je uspostava vodikovih veza između ovih aminokiselina i dimera enzima FNR, što stabilizira proteinski kompleks. Iste vodikove veze, zbog promjene u orijentaciji His40, što prati udaljavanje ove regije monomera A enzima FNR od ITEP domene, nisu moguće pri pH=7 i pH=8. U svim simuliranim sustavima s uvedenim mutacijama u ITEP domenu, ova mreža vodikovih veza ne gubi svoju ovisnost o pH, što ne iznenađuje s obzirom na to da se veći dio mreže nalazi unutar enzima FNR, a sve interakcije s ITEP domenom uspostavljene su s atomima proteinske okosnice, na koje uvođenje mutacija direktno ne utječe.

Otkrivena je ovisnost o pH mreže vodikovih veza u regiji Ala307, u kojoj orijentacija koju zauzima His170 snažno određuje sposobnost ostvarivanja vodikovih veza i vdW interakcija između Lys169, Ala307 i Pro310. Utjecaj His170 na izgled regije i stabilnost nekovalentnih interakcija između podjedinica proteinskog kompleksa, najjasnije je prikazan u sustavima divljeg tipa simuliranim pri pH=8. U ovim sustavima zabilježen je izlazak His170 iz središta petlje, što prati destabilizaciju većine interakcija u regiji, te udaljavanje od ITEP domene proteina TROL. Takvo udaljavanje moglo bi utjecati na stabilnost proteinskog kompleksa.

Prepoznata je ovisnost o pH mreže vodikovih veza u regiji Asp311 i Lys313. Primijećena su dva stabilna stanja koju ova mreže zauzima. U sustavima simuliranim pri pH=6 dolazi do specifične destabilizacije interakcija između ITEP domene i dimera enzima FNR u ovoj regiji, pod kontrolom orijentacije His493, koja je određena njegovom protoniranošću. U sustavima simuliranim pri pH=7 i pH=8, promjena orijentacije His493 dovodi do ostvarivanja većeg broja vodikovih veza i vdW interakcija između ITEP domene i dimera enzima FNR u ovoj regiji, što uzrokuje stabilizaciju proteinskog kompleksa na strani ITEP domene suprotnoj od one „velikog hidrofobnog džepa”. Uvođenjem mutacija u aminokiseline regije, uspješno je blokirana ovisnost o pH ove mreže vodikovih veza. Proteinski kompleksi različitih mutanata blokirani su u oba stabilna stanja mreže, što će omogućiti jednostavnu eksperimentalnu provjeru jednog od mehanizama odvajanja predloženog u ovom istraživanju.

Napravljena je analiza ovisnosti o pH mreže vodikovih veza u regiji His299, koja uzrokuje stabilizaciju ITEP domene uz monomer B enzima FNR u sustavu divljeg tipa proteina TROL, simuliranim pri pH=8. Potvrđeno je da jednostuko protonirani His299 uspostavlja vodikovu vezu s jednom od nekoliko aminokiselina monomera B enzima FNR. Uspostava takve vodikove veze olakšava i vezanje aminokiseline Lys 297, koja se nalazi na samom početku ITEP domene, što dovodi do stabilizacije cijele regije. Regija ne pokazuje stabilnost u sustavima divljeg tipa simuliranim pri nižim pH, no uvođenje mutacija u ITEP domenu može uzrokovati pomicanje ovog kraja peptida na alternativna mjesta vezanja čime se gubi ovisnost o pH mreže vodikovih veza. Stabilizacija na alternativnim mjestima mogla bi biti i posljedica visoke fleksibilnosti ove regije, koja je uzrokovana neprirodnim uklanjanjem ostatka proteina TROL, te čini artefakt MD simulacije.

Utvrđena je ovisnost o pH mreže vodikovih veza u regiji Cys436, Cys346 i His394, gdje orijentacija većeg broja aminokiselina, određenih protonacijskim stanjem cisteina i histidina, regulira fleksibilnost FAD vezujuće domene. Regulacija fleksibilnosti nije primijećena u istoj regiji drugog monomera enzima FNR, što je posljedica uspostave mnogo stabilnije sekundarne strukture između aminokiselina.

Primijećena je snažna promjena u orijentaciji podjedinica proteinskog kompleksa, koju uzrokuje uvođenje mutacije Ser316 u Thr, Ser317 u Thr u ITEP domenu proteina TROL. Pomicanje Thr316 na alternativno mjesto vezanja, potaknuto je promjenom u sposobnosti ostvarivanja vdW interakcija između aminokiselina serin i treonin. Takva zapažanja ukazuju na utjecaj koje vdW interakcije izvan „malog i velikog hidrofobnog džepa“ imaju na stabilnost proteinskog kompleksa.

Na strukturnu važnost vdW interakcija izvan „malog i velikog hidrofobnog džepa“ ukazuju i sustavi s uvedenom mutacijom Pro314 u Gly, Pro315 u Gly, Met319 u Gly, u kojima dolazi do snažnih promjena u položaju monomera A enzima FNR u proteinskom kompleksu temeljem destabilizacije nekovalentnih interakcija uz aminokiseline Gly314 i Gly315.

Uvođenjem mutacija u aminokiselinu Met319, ITEP domene, nije utvrđena destabilizacija „velikog hidrofobnog džepa“. Sustavi s uvedenim mutacijama Met319 u Gly i Met319 u Ser pokazuju značajan gubitak osjetljivosti stabilnosti proteinskog kompleksa na pH sustava, što je uzrokovano približavanjem aminokiselina dimera enzima FNR koje sudjeluju u ovim vdW interakcijama. Praćenjem orijentacije Met319 i nagiba dimera enzima FNR duž osi ITEP domene nije zabilježena stroga povezanost ovih konformacijskih promjena. Iako uloga Met319 u raspadu proteinskog kompleksa nije objašnjena, zbog središnje pozicije koju zauzima u „velikom hidrofobnom džepu“ i potvrđenog gubitka pH osjetljivost sustava u kojima je ova aminokiselina mutirana, postojanje takve uloge ne može se odbaciti.

Temeljem rezultata svih analiza predložena su dva moguća načina raspada proteinskog kompleksa pod utjecajem promjene u pH sustava. Predloženi su modeli „uparene disocijacije“ i „disocijacije polugom“. Potvrdu predstavljenih modela *in vivo*, moguće je dobiti uvođenjem ciljanih mutacija i praćenjem razlike u snazi vezanja dimera enzima FNR za ITEP domenu proteina TROL prije i nakon uvođenja mutacija.

Zbog utvrđene razlike između fleksibilnosti FAD vezujuće domene između monomera A i B, te utjecaja nekih od uvedenih mutacija na njenu fleksibilnost, ne možemo odbaciti mogućnost raspada proteinskog kompleksa iniciranog vezanjem ferredoksina na enzim FNR. Potvrdu takvog zaključaka, dalo bi eksperimentalno mjerenje efikasnosti linearnog toka elektrona (LET) u fotosintezi, prije i nakon uvođenja mutacija u ITEP domenu enzima FNR, za koje je utvrđeno da blokiraju ovisnost FAD vezujuće domene monomera B enzima FNR o pH.

Simulacijama slobodne ITEP domene utvrđena je visoka fleksibilnost strukture peptida, uz iznimku zadržavanja sekundarne strukture „malog hidrofobnog džepa“. Snažna stabilizacija strukture zabilježena je u sustavima s pojedinim mutacijama, u kojima ITEP domena poprima konformaciju nalik slovima „U“, „J“ ili „W“. Neki od sustava s uvedenom mutacijom pokazuju potpuni ili djelomičan gubitak sekundarne strukture „malog hidrofobnog džepa“ ili maskiranje ovog područja što može uzrokovati nemogućnost vezanja enzima FNR za protein TROL.

Literatura

- Allen, J.F. 1993 Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *Journal of theoretical biology*, **165**, 609–631.
- Alte, F. et al. 2010 Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 19260–5.
- Batie, C.J., Kamins, H. 1984 Electron Transfer by Ferredoxin : NADP + Reductase. *The Journal of biological chemistry*, **19**, 11976–11985.
- Benz, J.P. et al. 2010 A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends in plant science*, **15**, 608–13.
- Benz, J.P. et al. 2009 Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. *The Plant cell*, **21**, 3965–83.
- Berendsen, H. et al. 1995 Gromacs: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm*, **91**, 43–56.
- Brandt, M.E., Vickerys, E. 1993 Charge Pair Interactions Stabilizing Ferredoxin-Ferredoxin Reductase Complexes. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 17126–17130.
- Bussi, G. et al. 2007 Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, **126**, 014101.
- Carrillo, N., Ceccarelli, E., 2003 Open questions in ferredoxin-NADP+ reductase catalytic mechanism. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 1900–1915.
- Casas-Delucchi, C.S., Cardoso, M.C. Epigenetic control of DNA replication dynamics in mammals. *Nucleus (Austin, Tex.)*. *Nucleus*, **2**, 370–82.
- Case, D. et al. 2012 AMBER 12. University of California, San Francisco.
- Ceccarelli, E. et al. 2004 Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochimica et biophysica acta*, **1698**, 155–65.
- Dumit, V.I. et al. 2010. Mechanistic Insights into Ferredoxin-NADP(H) Reductase Catalysis Involving the Conserved Glutamate in the Active Site. *Journal of Molecular Biology*, **397**, 814–825.
- Forti, G., Bracale, M., 1984 Ferredoxin—ferredoxin NADP reductase interaction. *FEBS Letters*, **166**, 81–84.
- Foyer, C.H. et al., 2012 Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 1637–1661.
- Goss, T. & Hanke, G., 2014 The End of the Line: Can Ferredoxin and Ferredoxin NADP(H) Oxidoreductase Determine the Fate of Photosynthetic Electrons?. *Current Protein & Peptide Science*, **15**, 385–393.

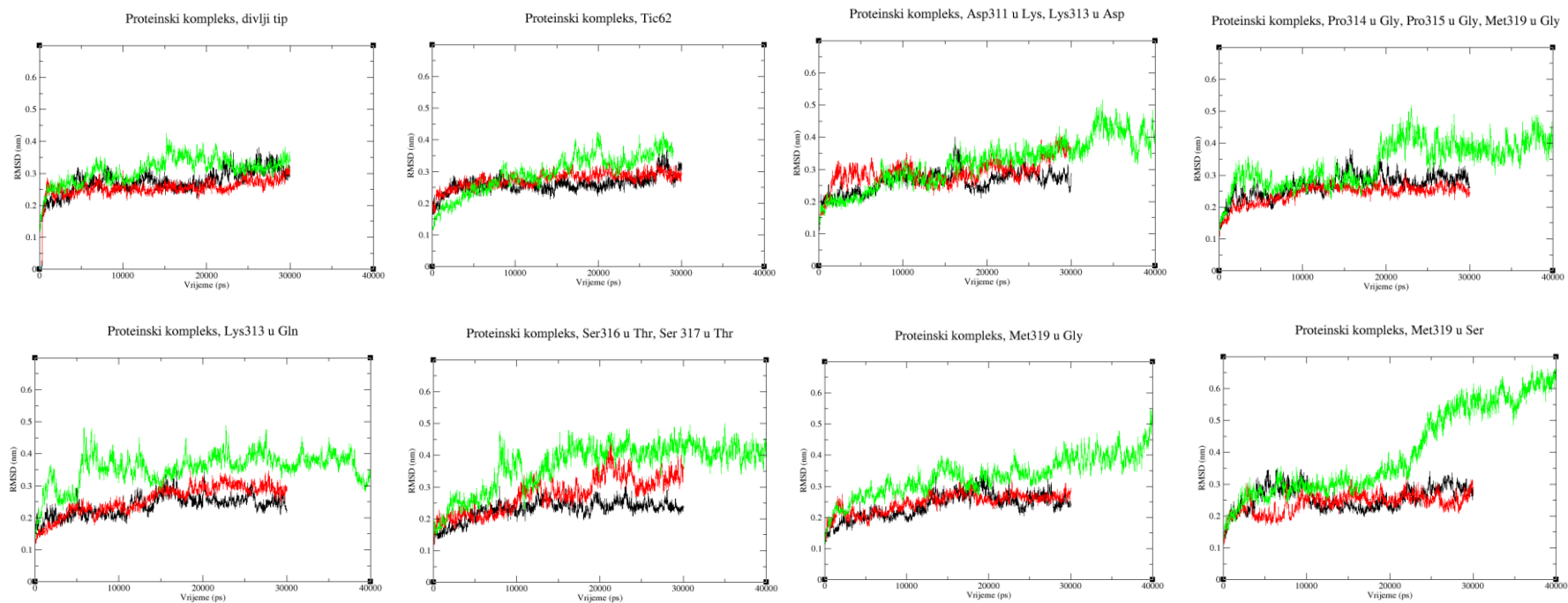
- Govindjee, Björn, L., Nickelsen, K., 2012 Evolution of the Z-Scheme of electron transport in oxygenic photosynthesis. *Photosynthesis: Research for Food, Fuel and Future—15th International Conference on Photosynthesis*, 835–841.
- Grigorian, M. et al. 2013 The proteoglycan Trol controls the architecture of the extracellular matrix and balances proliferation and differentiation of blood progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *Developmental biology*, **384**, 301–12.
- Hald, S. et al., 2008 Competition between linear and cyclic electron flow in plants deficient in Photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1777**, 1173–1183.
- Herguedas, B., Hermoso, J.A., Medina, M., 2009 Protein Motifs Involved in Coenzyme Interaction and Enzymatic Efficiency in. *Biochemistry*, **48**, 3109–3119.
- Hermoso, J. a et al., 2002 Mechanism of coenzyme recognition and binding revealed by crystal structure analysis of ferredoxin-NADP⁺ reductase complexed with NADP⁺. *Journal of molecular biology*, **319**, 1133–42.
- Joliot, P., Joliot, A., 2006. Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochimica et biophysica acta*, **1757**, 362–368.
- Jurić, S.S. et al. 2009 Tethering of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **60**, 783–94.
- Kamins, H. 1984 Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreductase. *The Journal of biological chemistry*, **259**, 8832–8839.
- Karplus, P.A., Faber, H.R. 2004 Structural Aspects of Plant Ferredoxin : NADP(+) Oxidoreductases. *Photosynthesis research*, **81**, 303–15.
- Koshiba, S. et al. 2005 Solution structure of the rhodanese homology domain. *Protein Science*, **14**, 224–230.
- Kurusu, G. et al. 2001 Structure of the electron transfer complex between plant type ferredoxin and ferredoxin dependent assimilatory enzymes. *Protein, nucleic acid, enzyme*, **46**, 1661–1667.
- Lintala, M. et al. 2014 Arabidopsis tic62 trol mutant lacking thylakoid-bound ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase shows distinct metabolic phenotype. *Molecular plant*, **7**, 45–57.
- Mediavilla, M.G. et al. 2010 Heterologous ferredoxin reductase and flavodoxin protect Cos-7 cells from oxidative stress. *PloS one*, **5**, e13501.
- Medina, M., Gómez-Moreno, C. 2004 Interaction of Ferredoxin-NADP(+) Reductase with its Substrates: Optimal Interaction for Efficient Electron Transfer. *Photosynthesis research*, **79**, 113–31.
- Mulo, P. 2011 Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase (FNR): structure, function and location. *Biochimica et biophysica acta*, **1807**, 927–34.
- Munekage, Y. et al. 2004 Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, **429**, 579–582.

- Nosé S. 1984 A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics*, **52**, 255–268.
- Nosé S., Klein ML. 1983 Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Molecular Physics*, **50**, 1055–1076.
- Palatnik, J.F. et al. 2003 Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP(H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage. *Plant Journal*, **35**, 332–341.
- Parrinello, M., Rahman, A. 1981 Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, **52**, 7182-
- Pe, I. 2005 C-Terminal Tyrosine of Ferredoxin - NADP + Reductase in Hydride Transfer Processes with $\text{NAD (P)}^+ / \text{H}^+$. *Biochemistry*, 13477–13490.
- Rochaix, J.D. 2011 Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1807**, 878–886.
- Rodriguez, R.E. et al. 2007 Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxin-NADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress. *Plant physiology*, **143**, 639–649.
- Schrödinger. 2015 Maestro, version 10.4. *Schrödinger Release*, 2015–4
- Szabó, I., Bergantino, E. & Giacometti, G.M. 2005 Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO reports*, **6**, 629–634.
- Twachtmann, M. et al. 2012 N-terminal structure of maize ferredoxin:NADP+ reductase determines recruitment into different thylakoid membrane complexes. *The Plant cell*, **24**, 2979–91.
- Yee, B.C. et al. 1991 Ferredoxin and Ferredoxin-NADP Reductase from Photosynthetic and Nonphotosynthetic Tissues of Tomato. *Plant Physiology*, **96**, 1207 – 1213.

Prilog

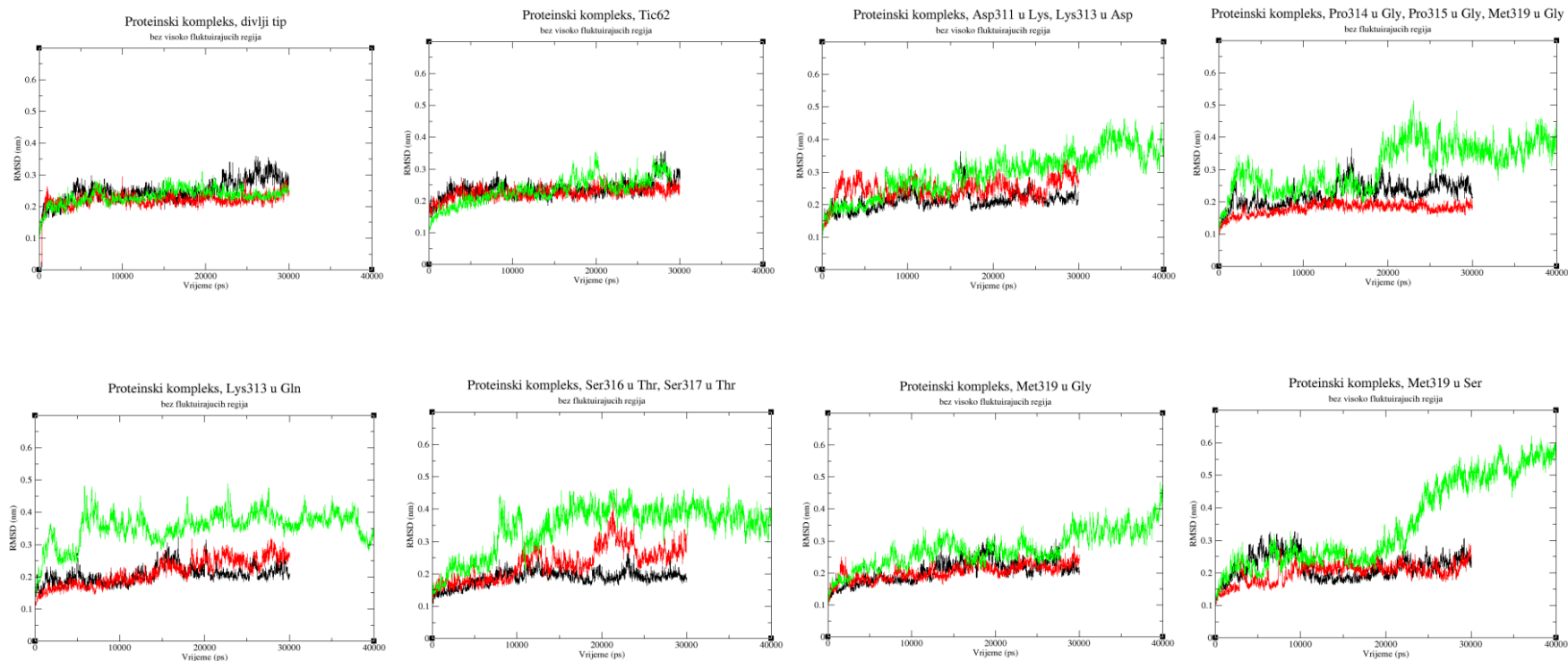
- Prilog I** **Detaljni rezultati analize *RMSD* proteinskog kompleksa**
- Prilog II** **Detaljni rezultati analize *RMSD* proteinskog kompleksa bez visoko fluktuirajućih regija**
- Prilog III** **Detaljni rezultati analize *RMSF* MD simulacija sustava proteinskog kompleksa**
- Prilog IV** **Detaljni rezultati mjerenja *radijusa giracije* proteinskog kompleksa**
- Prilog V** **Detaljni rezultati analize *RMSD* slobodne ITEP domene**
- Prilog VI** **Detaljni rezultati analize *RMSF* slobodne ITEP domene**
- Prilog VII** **Detaljni rezultati mjerenja *radijusa giracije* slobodne ITEP domene**
- Prilog VIII** **Reprezentativne strukture najnapućenijih klastera sustava slobodne ITEP domene**

Prilog I Detaljni rezultati analize *RMSD* proteinskog kompleksa



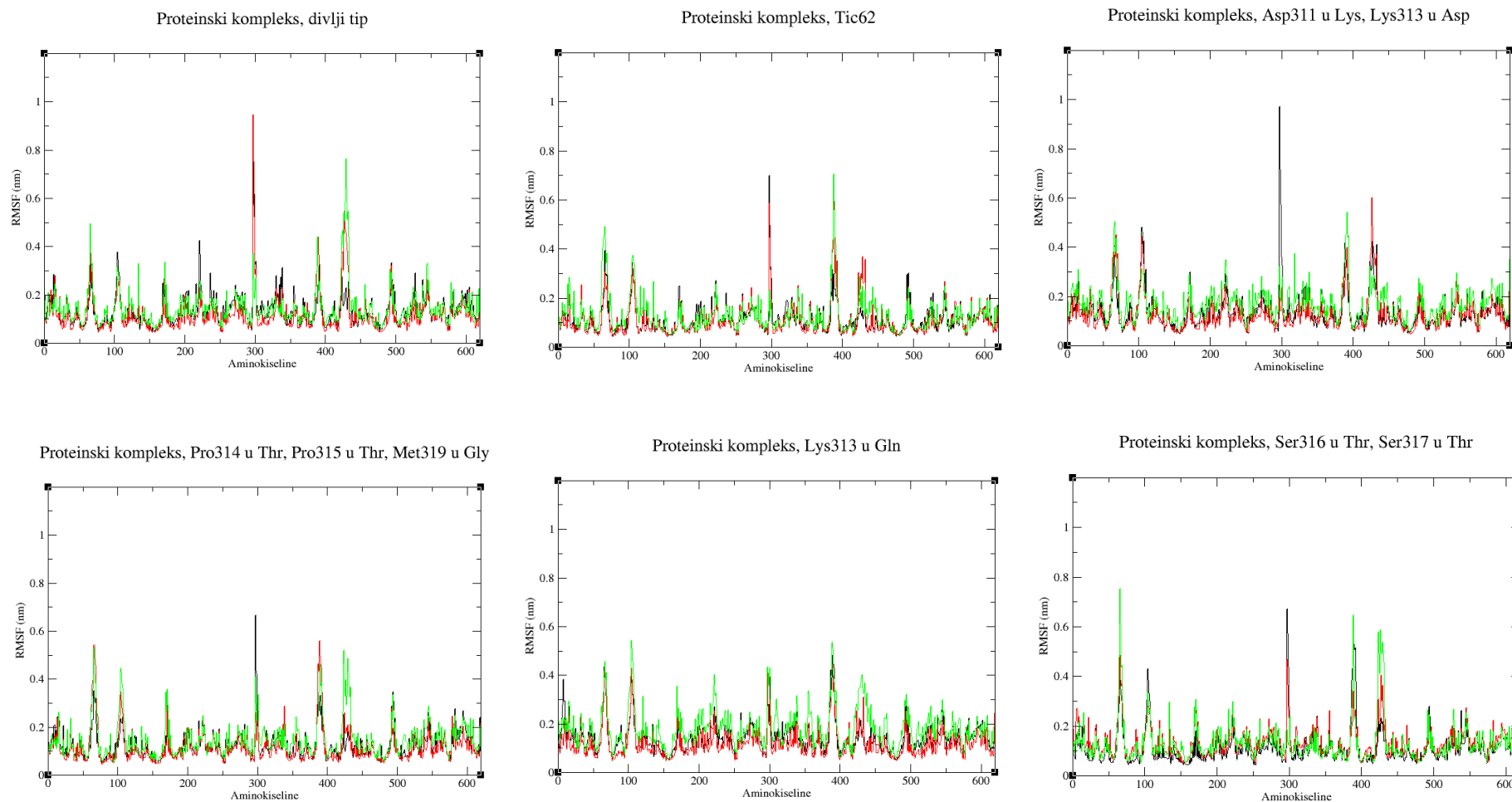
Slika P1. Grafovi prikazuju vrijednosti *RMSD* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, crvenom su označene vrijednosti pri pH=7, a zelenom vrijednosti pri pH=8.

Prilog II Detaljni rezultati analize *RMSD* proteinskog kompleksa bez visoko fluktuirajućih regija



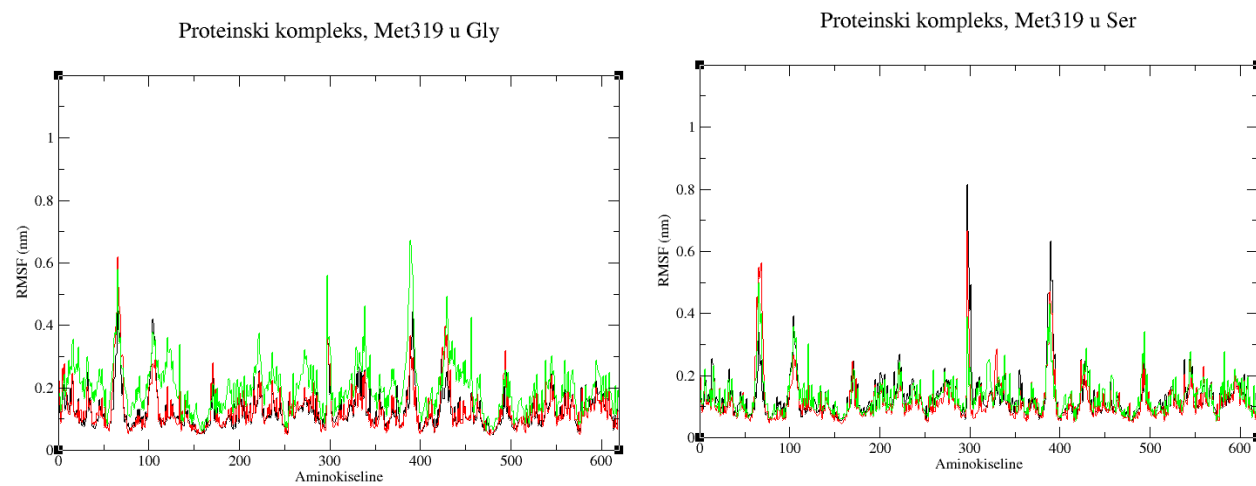
Slika P2. Grafovi prikazuju vrijednosti *RMSD* za sustave simulirane pri različitim pH. Mjerenja ne uzimaju u obzir visoko fluktuirajuće regije proteinskog kompleksa. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, crvenom su označene vrijednosti pri pH=7, a zelenom vrijednosti pri pH=8.

Prilog III Detaljni rezultati analize *RMSF* MD simulacija sustava proteinskog kompleksa



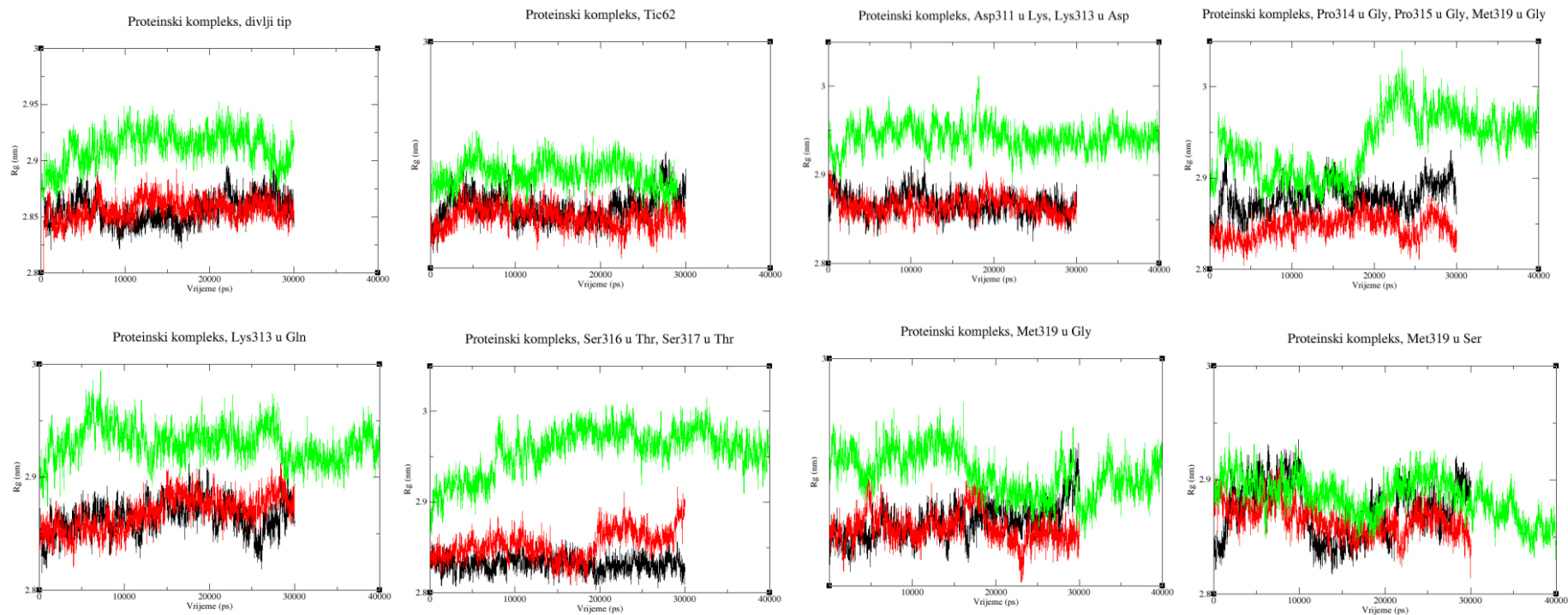
Slika P3. Grafovi prikazuju vrijednosti *RMSF* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, crvenom su označene vrijednosti pri pH=7, a zelenom vrijednosti pri pH=8.

Detaljni rezultati analize *RMSF* MD simulacija sustava proteinskog kompleksa



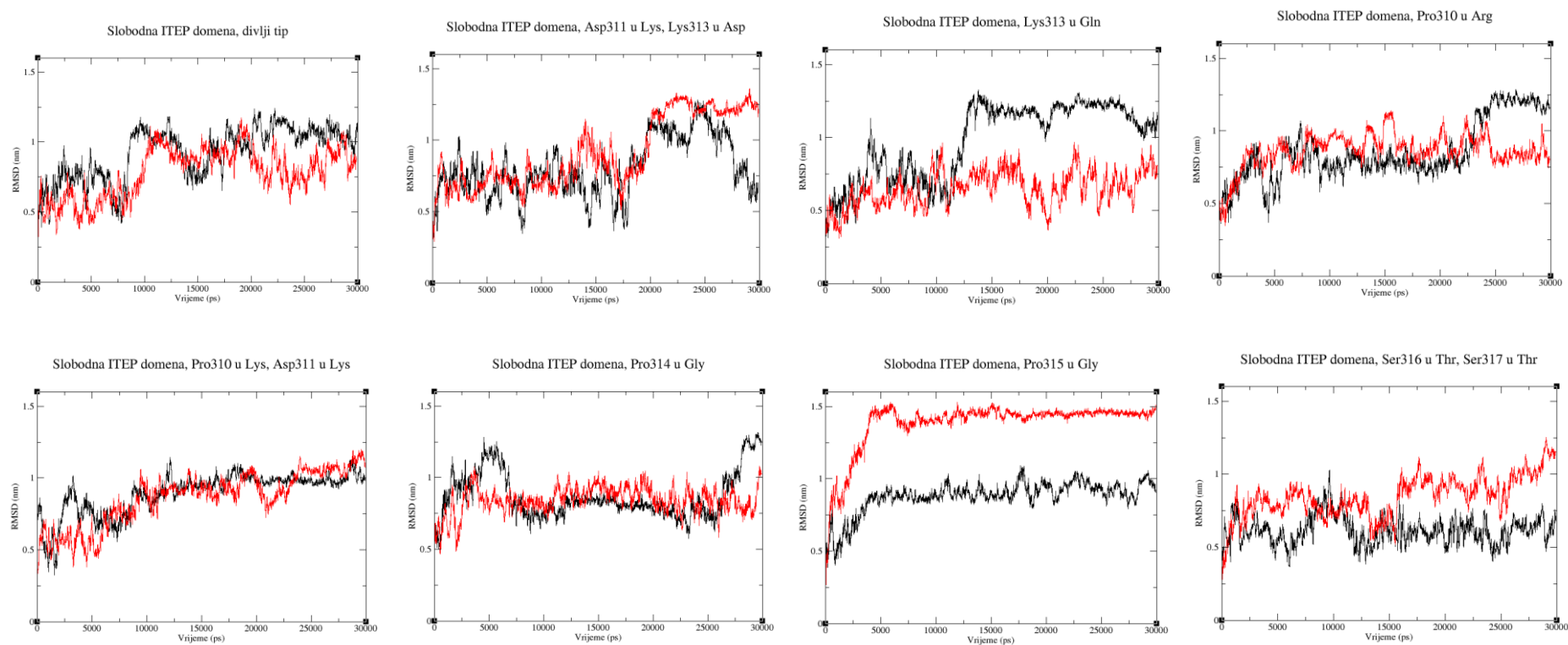
Slika P4. Grafovi prikazuju vrijednosti *RMSF* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, crvenom su označene vrijednosti pri pH=7, a zelenom vrijednosti pri pH=8.

Prilog IV Detaljni rezultati mjerenja *radijusa giracije* proteinskog kompleksa



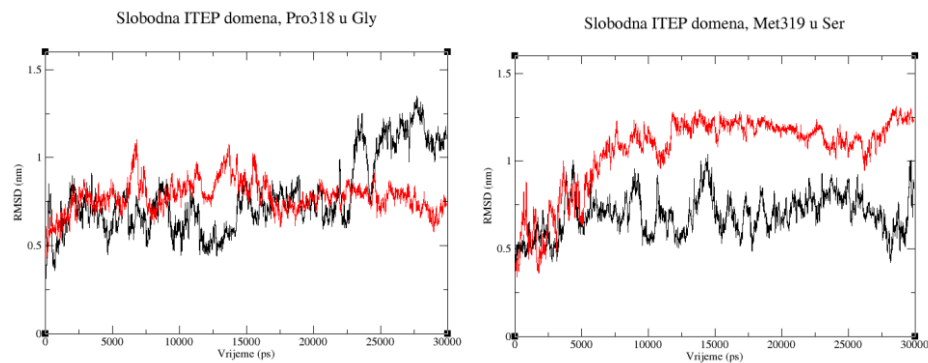
Slika P5. Grafovi prikazuju vrijednosti *radijusa giracije* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, crvenom su označene vrijednosti pri pH=7, a zelenom vrijednosti pri pH=8.

Prilog V Detaljni rezultati analize *RMSD* slobodne ITEP domene



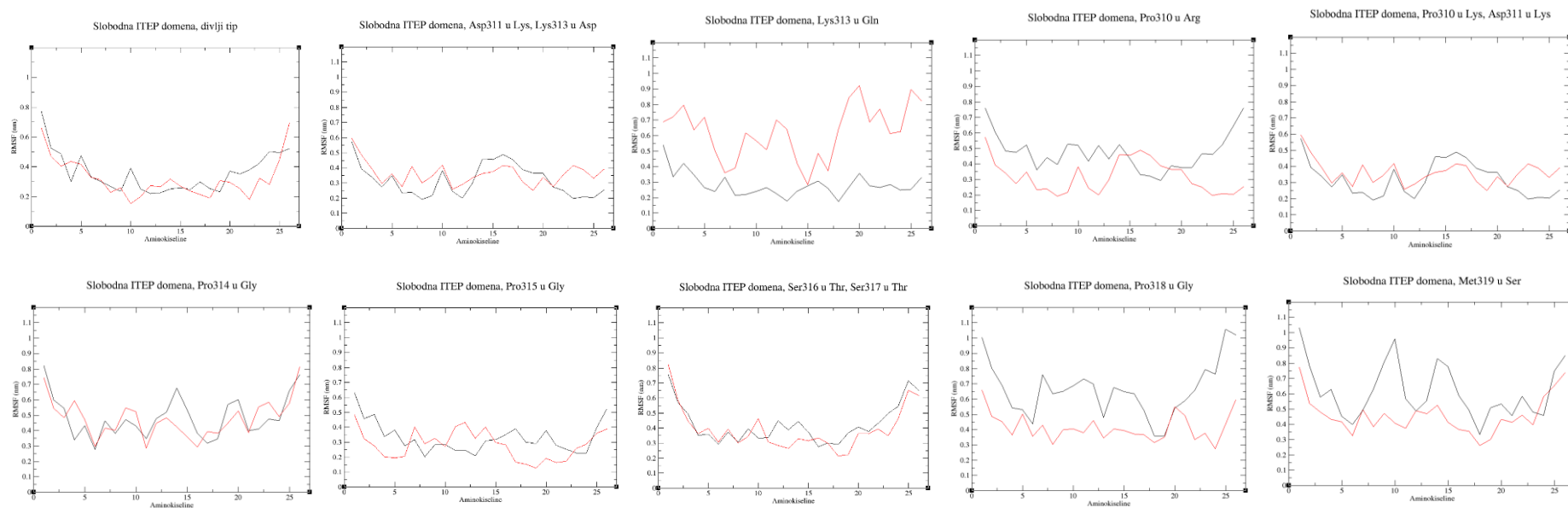
Slika P6. Grafovi prikazuju vrijednosti *RMSD* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, a crvenom vrijednosti pri pH=7.

Detaljni rezultati analize *RMSD* slobodne ITEP domene



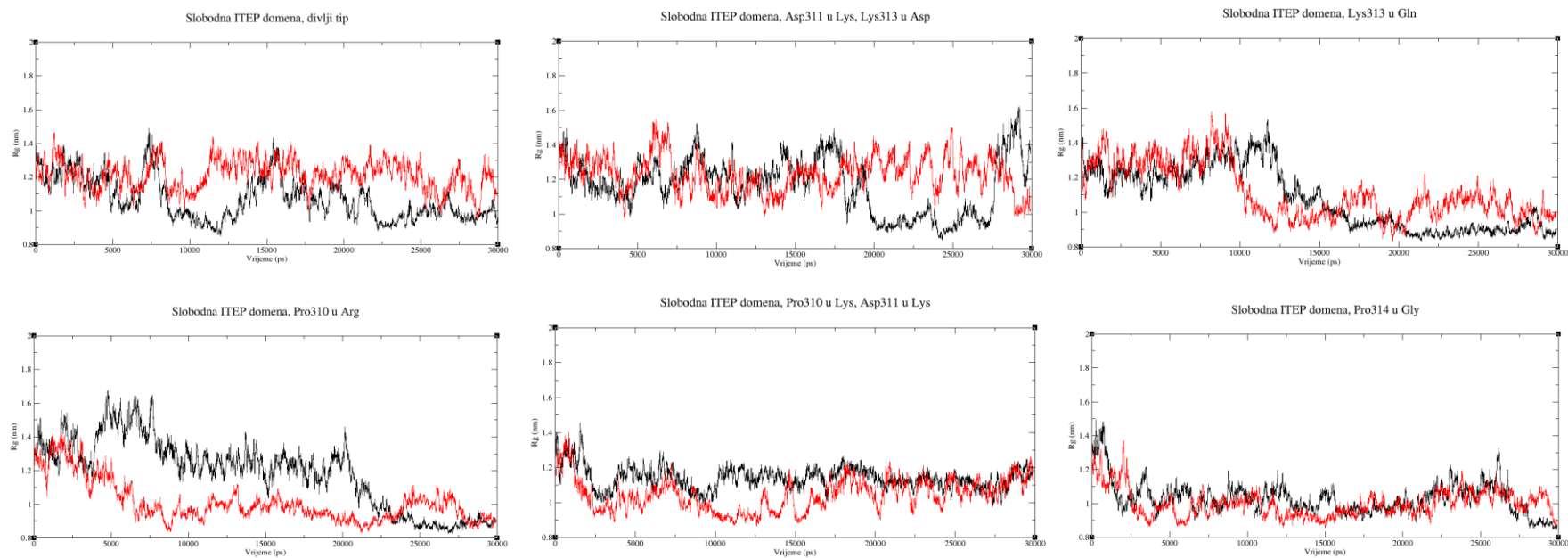
Slika P7. Grafovi prikazuju vrijednosti *RMSD* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, a crvenom vrijednosti pri pH=7.

Prilog VI Detaljni rezultati analize *RMSF* slobodne ITEP domene



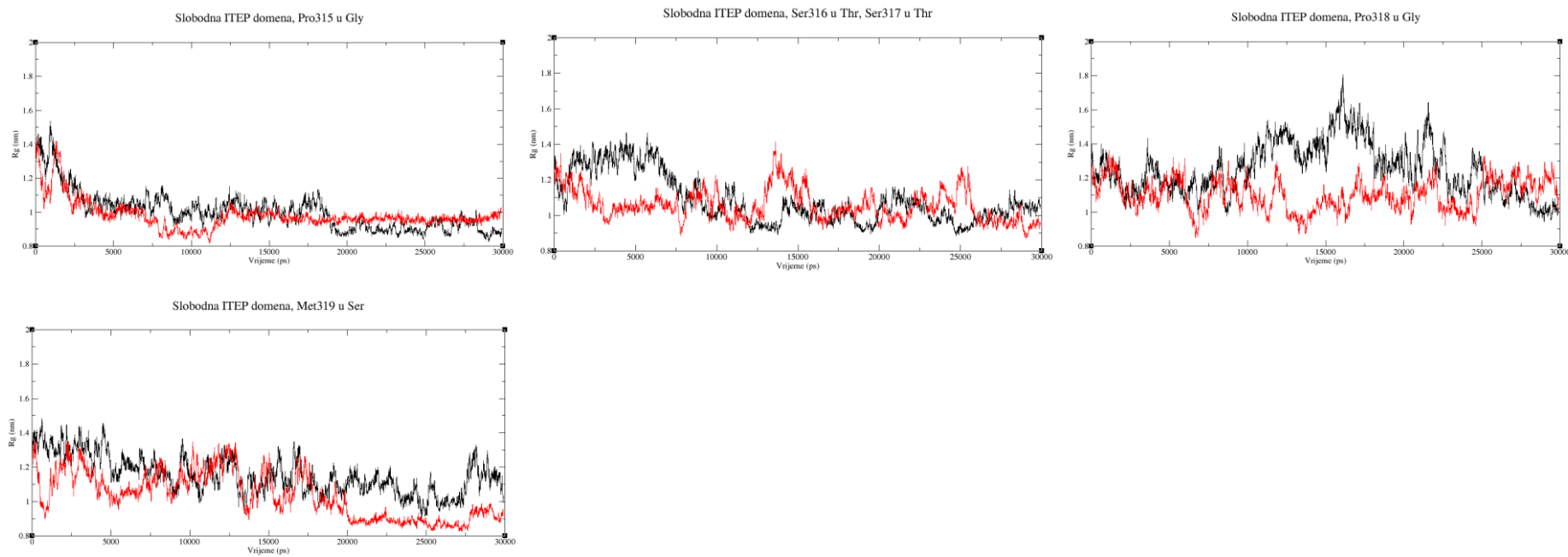
Slika P8. Grafovi prikazuju vrijednosti *RMSF* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, a crvenom vrijednosti pri pH=7.

Prilog VII Detaljni rezultati mjerenja *radijusa giracije* slobodne ITEP domene



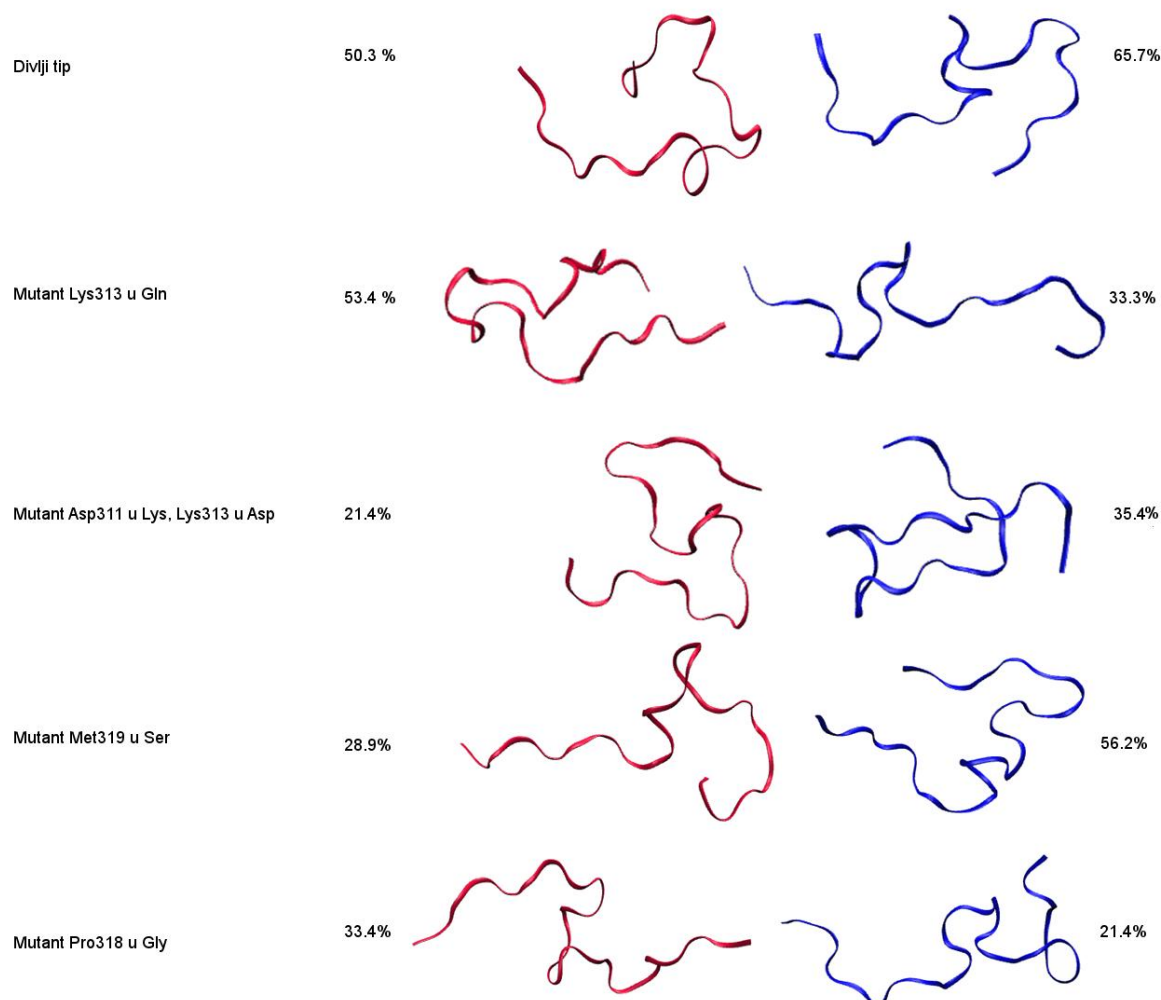
Slika P9. Grafovi prikazuju vrijednosti *radijusa giracije* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, a crvenom su označene vrijednosti pri pH=7.

Detaljni rezultati mjerenja *radijusa giracije* slobodne ITEP domene



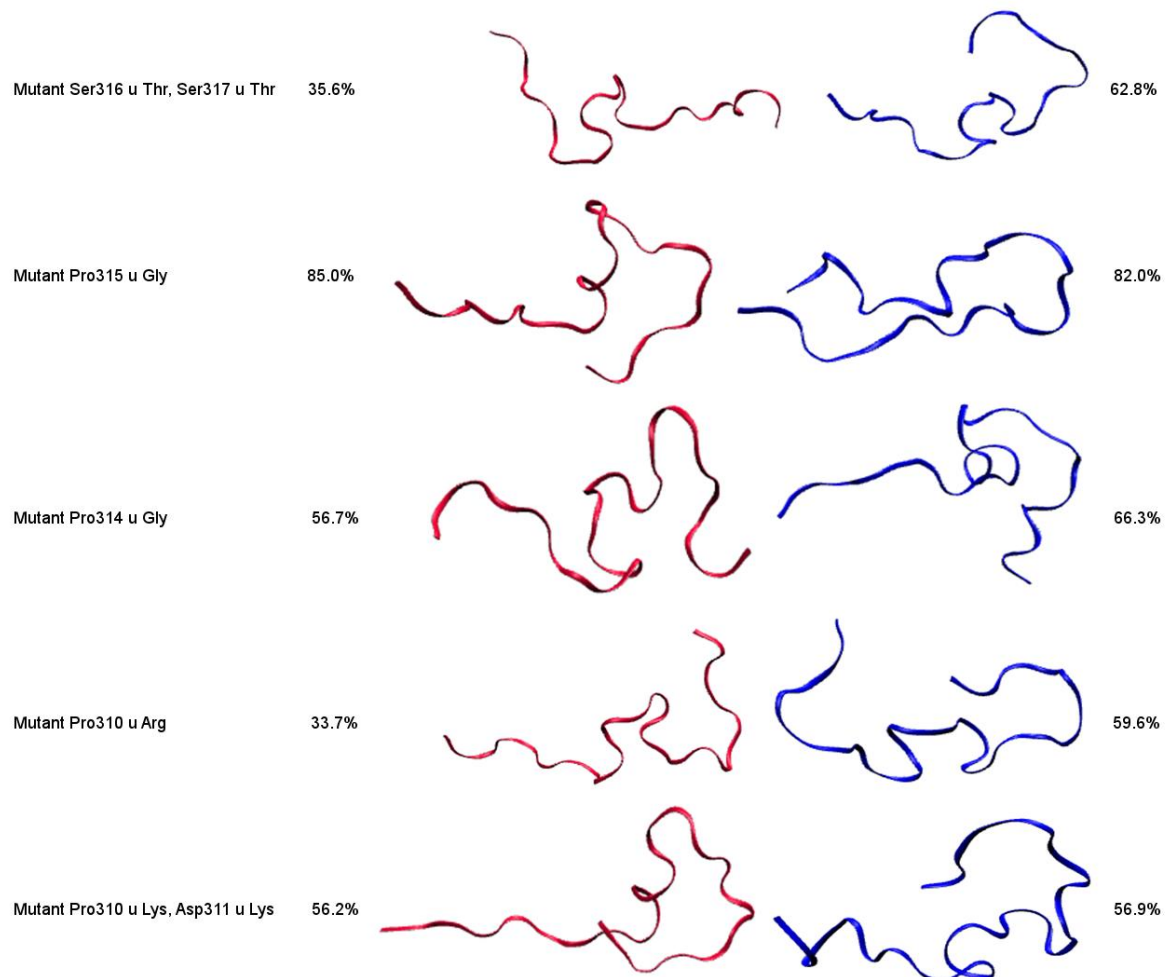
Slika P10. Grafovi prikazuju vrijednosti *radijusa giracije* za sustave simulirane pri različitim pH. Crnom bojom označene su vrijednosti koje pripadaju sustavima simuliranim pri pH=6, a crvenom su označene vrijednosti pri pH=7.

Prilog VIII Reprezentativne strukture najnapućenijih klastera sustava slobodne ITEP domene



Slika P11. Vizualizacija reprezentativnih struktura najnapućenijih klastera sustava slobodne ITEP domene pri pH=6 (crveno) i pH=7 (plavo). Uz strukture su prikazani postoci zastupljenosti pripadajućeg klastera u ukupnom vremenu trajanja MD simulacija.

Reprezentativne strukture najnapućenijih klastera sustava slobodne ITEP domene



Slika P12. Vizualizacija reprezentativnih struktura najnapućenijih klastera sustava slobodne ITEP domene pri pH=6 (crveno) i pH=7 (plavo). Uz strukture su prikazani postoci zastupljenosti pripadajućeg klastera u ukupnom vremenu trajanja MD simulacija.

Životopis

Rođen sam 7. 3. 1989. godine u Zagrebu, u kojemu 2008. godine završavam XV gimnaziju, te upisujem preddiplomski studijski smjer Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Preddiplomski studij završavam 2012. godine sa završnim radom pod naslovom „Regulacija apoptoze pod utjecajem poli [ADP–riboza] polimeraze I“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Maje Matulić. Iste godine upisujem diplomski studijski smjer Molekularne biologije u kojemu se usmjeravam u područje bioinformatike i biofizike.

Tijekom studiranja aktivno sudjelujem u radu nekoliko studentskih udruga u kojima obavljam poslove komunikacije sa sponzorima, organizacije događanja i pisanja za studentske novine, uz to obavljam posao studentskog predstavnika u Vijeću biološkog odsjeka, zamjenika studentskog predstavnika u Kolegiju biološkog odsjeka, te člana Etičkog povjerenstva PMF-a.

Stručno se usavršavam u nekoliko laboratorija zagrebačkog sveučilišta, gdje bih istaknuo laboratorij za eksperimentalnu kancerologiju i mentorstvo prof. dr. sc. Maje Matulić, laboratorij za filogeografiju i molekularnu sistematiku i mentorstvo prof. dr. sc. Zlatka Libera, te zavod za fizikalnu kemiju i mentorstvo izv. prof. dr. sc. Branimira Bertoše. Stručno usavršavanje u inozemstvu obavljam na odsjeku za staničnu i molekularnu biologiju instituta za biotehnologiju, Tartu, Estonija, pod mentorstvom prof. dr. sc. Eve Tusinaite.

Tijekom studija izrađujem dva znanstvena rada u suradnji s kolegicama Anamarijom Skenderović i Nelom Jantol te ih prijavljujem na natječaj za Rektorovu nagradu, koju i osvajam 2013. godine s radom pod nazivom „Analiza raznolikosti kloroplastne DNA i filogeografija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.)“. Specijalnu rektorovu nagradu osvajam godinu dana ranije u grupi studenata koji su organizirali i proveli znanstveno-popularni festival „Noć biologije“, u čijem radu sudjelujem kroz 5 godina.

Stručno se usavršavam kroz pasivno i aktivno sudjelovanje u desetak kongresa i simpozija gdje bih istaknuti pasivno sudjelovanje na kongresima ISABS (2011, 2013), te aktivno sudjelovanje na Hrvatskom biološkom kongresu (2015), te simpoziju studenta bioloških usmjerenja (2015).

Kroz studij obavljam posao demonstratora na kolegiju Strukturalna računalna biofizika, te posao stručnog vodič u botaničkom vrtu PMF-a, zoološkom vrtu grada Zagreba, te parku Maksimir. Uz ove poslove, kao vijećnik mjesnog odbora „Dinko Šimunović“, obavljam poslove organizacije i nadgledanja komunalnih radova u gradskoj četvrti Maksimir.