



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Katarina Radman

**Mehanizmi interakcija transkripcijskih faktora SloR iz  
*Streptococcus mutans* i ScaR iz *Streptococcus gordonii* s  
ionima mangana(II) i DNA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Katarina Radman

**Mehanizmi interakcija transkripcijskih faktora SloR iz  
*Streptococcus mutans* i ScaR iz *Streptococcus gordonii* s  
ionima mangana(II) i DNA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Branimir Bertoša  
dr. sc. Ivana Leščić Ašler, v. zn. sur.

Zagreb, 2025.





University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Katarina Radman

**Mechanism of interaction of transcription factors SloR  
from *Streptococcus mutans* and ScaR from  
*Streptococcus gordonii* with manganese (II) ions and DNA**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Prof. Branimir Bertoša, PHD  
Ivana Leščić Ašler, PHD

Zagreb, 2025.



Ovaj doktorski rad izrađen je na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalizaciju Instituta Ruđer Bošković pod dvojnim mentorstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše i dr. sc. Ivane Leščić Ašler, v. zn. sur. u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Računalne simulacije provedene su na računalnim resursima nabavljenim u sklopu HRZZ projekta Manganovi metalosenzori (IP-2020-02-3446) te na računalnim serverima Isabella i Supek Sveučilišnog računskog centra Sveučilišta u Zagrebu (SRCE).

Izrada ovog doktorskog rada financirana je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta Manganovi metalosenzori (IP-2020-02-3446)



*Zahvaljujem mentorima na vodstvu tijekom izrade doktorske disertacije te na znanju koje ste mi prenijeli.*

*Posebno hvala...*

*...mentorici dr. sc. Ivani Leščić Ašler, v. zn. sur. na brojnim savjetima i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ove disertacije. Hvala na velikoj podršci te svim ugodnim i konstruktivnim razgovorima, bilo mi je stvarno jako lijepo iskustvo raditi s Vama u labosu.*

*...mentoru prof. dr. sc. Branimiru Bertoši na pruženoj prilici za izradu doktorske disertacije te na pruženoj slobodi u istraživačkom radu. Hvala Vam na pristupačnosti, susretljivosti i podršci.*

*Hvala svim djelatnicima Zavoda za Fizikalnu kemiju na PMF-u na ugodnoj radnoj okolini. Posebno hvala bivšim i sadašnjim kolegama iz ureda 224, Zoe, Antunu, Sanji, Andrei H.K., Mateju te Silviji na lijepoj i vedroj atmosferi.*

*Hvala dr. sc. Ivi Crnolatcu, v. zn. sur. i kolegama iz Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na IRB-u na pomoći pri radu te provođenju mjerjenja metodom DSC i CD. Hvala na znanju i vještinama koje ste mi prenijeli, ali i pruženoj prilici da sama nešto novo “iskemijam”!*

*Hvala izv. prof. dr. sc. Nikoli Bregoviću na provedenim mjerjenjima metodom ITC i angažmanu pri pisanju zajedničkih znanstvenih članaka.*

*Zahvala Laboratoriju za magnetske rezonancije na IRB-u, posebno voditeljici dr. sc. Dijani Žilić, v. zn. sur., na provedenim mjerjenjima metodom EPR.*

*Hvala curama, Lei, Marini, Antoniji i Ani, iz Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsко modeliranje, IRB, na pomoći, podršci i ugodnim druženjima. Uljepšali ste mi boravak na IRB-u!*

*Veeeliko hvala kolegama s PMF-a (a sad već i prijateljima) iz „rupe“, Ani, Andrei H.K., Antunu., Davidu, Gregoru, Katarini J., Karlu, Marku, Mirni, Tei, Filipu, Ediju, Nei, Zlatanu, Zoe te Sari s IRB-a – hvala na svim druženjima i nezaboravnim trenucima na i izvan PMF-a!*

*Zahvaljujem svim svojim divnim prijateljima iz srednjoškolskih i studentskih dana koji će uvijek naći vremena za druženje i razgovor. Hvala vam na podršci!*

*Iz svega srca hvala mom ginger Rovinježu Andrei na razumijevanju i ljubavi. Hvala ti što si uvijek tu!*

*I na kraju posebno hvala mojoj obitelji, pogotovo mojoj braći, Ivanu, Karlu i Marku, koji su odmalena uvijek tu za mene. Hvala vam na ogromnoj podršci, brizi i pomoći pri savladavanju svih prepreka.*

*...Ova disertacija je za vas!*



**Sadržaj**

<b>SAŽETAK .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Cilj i hipoteza.....</b>	<b>2</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Metaloregulatorni transkripcijski faktori .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Homeostaza iona Mn(II) u bakterijama <i>Streptococcus mutans</i> i <i>Streptococcus gordonii</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Teorijska osnova računalnih metoda .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4. Teorijska osnova metode fluorescencijske anizotropije .....</b>	<b>21</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Metode rada s bakterijama .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Metode rada s DNA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4. Metode rada s proteinima.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5. Biokemijske i biofizičke metode za karakterizaciju pročišćenih proteina ScaR i SloR.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6. Računalne metode .....</b>	<b>40</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Struktura i dinamička svojstva SloR i ScaR u kompleksu s ionima Mn(II).....</b>	<b>47</b>
<b>4.2. Biofizička karakterizacija vezanja iona Mn(II) za proteine SloR i ScaR .....</b>	<b>60</b>

4.3. Rezultati <i>in silico</i> uklapanja proteina na DNA.....	71
4.4. Rezultati simulacije molekulske dinamike proteina SloR i ScaR s DNA .....	74
4.5. Testovi vezanja izoliranih proteina SloR i ScaR na DNA .....	82
§ 5. ZAKLJUČAK .....	87
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ .....	89
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	91
§ 8. DODATAK.....	98
§ 9. ŽIVOTOPIS .....	V







Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

**Kemijski odsjek**

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### MEHANIZMI INTERAKCIJA TRANSKRIPCIJSKIH FAKTORA SLOR IZ *STREPTOCOCCUS MUTANS* I SCAR IZ *STREPTOCOCCUS GORDONII* S IONIMA MANGANA(II) I DNA

**Katarina Radman**

Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb

Održavanje homeostaze iona prijelaznih metala neophodno je za preživljavanje i virulenciju bakterija. U bakterijama *Streptococcus gordonii* i *Streptococcus mutans*, primarnim kolonizatorima površine zuba, koncentracija dvostrukog nabijenih kationa mangana (Mn(II)) regulirana je homodimernim transkripcijskim faktorima osjetljivim na Mn(II), ScaR i SloR, koji kontroliraju ekspresiju proteina uključenih u unos mangana. Kako bi se razjasnio mehanizam kojim vezanje Mn(II) utječe na vezanje proteina ScaR i SloR za DNA, primjenjene su različite računalne (QM i MD) i eksperimentalne (ITC, DSC, EMSA, FA, EPR i CD) metode. Računalni rezultati pokazali su da vezanje Mn(II) inducira konformacijsku promjenu proteina SloR i ScaR koja prvenstveno utječe na položaj i fleksibilnost DNA veznih domena te, posljedično, na afinitet vezanja proteina za DNA. Eksperimentalni rezultati otkrili su da proteini po monomeru vežu dva do tri iona Mn(II), koji stabiliziraju strukturu proteina. Računalna analiza kompleksa protein-DNA pokazala je da oblik DNA, definiran palindromskim nukleotidnim slijedom, igra ključnu ulogu u pravilnom pozicioniranju proteina na DNA.

(111+VII stranica, 48 slika, 19 tablica, 93 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: transkripcijski faktori, SloR, ScaR, manganovi(II) ioni, alosterija, *S. mutans* *S. gordonii*

Mentori prof. dr. sc. Branimir Bertoša i dr. sc. Ivana Leščić Ašler, v. zn. sur

Rad prihvaćen: 5. ožujka 2025.

Ocjenzitelji:

izv. prof. dr. sc. Gordana Horvat, PMF, Zagreb

izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski, PMF, Zagreb

dr. sc. Zrinka Kovarnik, zn. savj. i nasl. izv. prof. PMF, Zagreb





University of Zagreb

Faculty of Science

**Department of Chemistry**

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

MECHANISM OF INTERACTION OF TRANSCRIPTION FACTORS SLOR FROM *STREPTOCOCCUS MUTANS* AND SCAR FROM *STREPTOCOCCUS GORDONII* WITH MANGANESE (II) IONS AND DNA

**Katarina Radman**

Faculty of Science, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb

Maintaining transitional metal ion homeostasis is crucial for bacterial survival and virulence. In *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus mutans*, manganese ion (Mn(II)) concentration is regulated by homodimeric transcription factors ScaR and SloR, which control the expression of proteins involved in manganese uptake. Various computational (QM and MD) and experimental (ITC, DSC, EMSA, FA, EPR, and CD) methods were used to elucidate how Mn(II) binding affects ScaR and SloR binding to DNA. Computational results showed that Mn(II) binding induces a conformational change in SloR and ScaR, affecting the position and flexibility of the DNA binding domains, and thus DNA binding affinity. Experimental results revealed that the proteins bind per monomer two to three Mn(II) ions, which stabilize the protein structure. Computational analysis of the protein-DNA complex indicated that the DNA shape, defined by a palindromic nucleotide sequence, is crucial for proper protein positioning on DNA.

(111+VII pages, 48 figures, 19 tables, 93 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: transcription factors, SloR, ScaR, manganese(II) ions, allostery, *S. mutans*, *S. gordonii*

Supervisor: Dr. Branimir Bertoša, Professor and Dr. Ivana Leščić Ašler, Senior Research Associate

Thesis accepted: 5<sup>th</sup> March 2025

Reviewers:

Dr. Gordan Horvat, Associate Professor, Faculty of Science, Zagreb  
Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor, Faculty of Science, Zagreb  
Dr. Zrinka Kovarnik, Senior Scientist, IMI, Zagreb







## § 1. UVOD

Prijelazni metali su esencijalni mikronutrijenti za različite unutarstanične procese kod svih živih bića, ali previsoka koncentracija metalnih iona u stanici može imati toksičan učinak na preživljavanje. U bakterijskim stanicama, manjak metalnih iona aktivira puteve za unos i mobilizaciju metalnih iona, dok previsoka koncentracija metalnih iona aktivira puteve izbacivanja ili skladištenja istih.<sup>1</sup> Dvovalentni kationi mangana (Mn(II)) imaju važnu ulogu za preživljavanje i virulenciju bakterijskih stanica jer sudjeluju kao kofaktori u procesima replikacije DNA i rezistencije na oksidativni stres.<sup>2</sup> Homeostaza iona Mn(II) unutar bakterijskih stanica odražava se ekspresijom i aktivacijom mašinerije za unos i izvoz iona Mn(II) koja je pod kontrolom transkripcijskih faktora tzv. metaloregulatora i elemenata posredovanih molekulom RNA (eng. *RNA-mediated elements*).<sup>1,2</sup> Bakterije iz roda *Streptococcus* reguliraju ekspresiju ABC transportera, koji su selektivni za ione Mn(II), putem grupe homolognih metaloregulatornih proteina iz obitelji proteina DtxR/IdeR. U tu skupinu ubrajamo transkripcijske faktore SloR iz bakterije *Streptococcus mutans* te ScaR iz bakterije *Streptococcus gordonii*.<sup>3</sup> Proteini SloR i ScaR dolaze u obliku homodimera te imaju očuvanu strukturu koja se sastoji od tri glavne domene: DNA-vezna N-terminalna domena oblika krilate spirale (eng. *N-terminal winged helical DNA binding domain*, DBD), središnja dimerizacijska domena koja promovira kvaternu strukturu homodimera, te C-terminalna domena FeoA (poznata i kao domena nalik SH3).<sup>4</sup> Iako nije razriješena struktura proteina SloR i ScaR u kompleksu s ionima Mn(II), istraživanja su pokazala da je Mn(II) jedan od najjačih aktivatora ovih proteina (uz ione Ni(II) i Cd(II))<sup>5,6</sup>. Smatra se da proteini SloR i ScaR i njihovi homolozi (primjerice PsaR i MtsR), djeluju na principu alosterije te da je mehanizam regulacije vezanja DNA ovisan o koncentraciji metalnih iona.<sup>6,7</sup> Vezanje odgovarajućeg iona metala alosterički utječe na strukturu proteina na način da potiče ili inhibira nastajanje konformacije u kojoj je orientacija DNA veznih domena pogodna za vezanje na DNA.<sup>8</sup> Prema istraživanjima na homolognom proteinu MntR iz bakterije *Mycobacterium tuberculosis*, apo-protein pokazuje međudomensku fleksibilnost koja omogućuje domenama DBD da zauzmu različite orijentacije jedna prema drugoj i prema veznom mjestu za metalne ione prije vezanja iona metala. Prilikom

vezanja iona metala za MntR dolazi do smanjenja fleksibilnosti domena DBD.<sup>9</sup> Za proteine SloR i ScaR do sada nije bilo razjašnjeno koja je razlika u strukturi i dinamici aktivne holo i inaktivne apo forme proteina te koji je alosterički mehanizam odgovoran za prelazak proteina iz inaktivne u aktivnu formu koja može vezati DNA.

## 1.1. Cilj i hipoteza

Cilj predložene doktorske disertacije je razjasniti mehanizam regulacije vezanja transkripcijskih faktora SloR iz bakterije *Streptococcus mutans* te ScaR iz bakterije *Streptococcus gordonii* na DNA. Na temelju prijašnjih istraživanja proteina SloR i ScaR te njihovih homologa, donesene su iduće hipoteze za ovaj rad: (i) Konformacijska promjena proteina SloR i ScaR uzrokovana je vezanjem iona Mn(II). (ii) Vezanjem iona Mn(II) proteini SloR i ScaR poprimaju konformaciju koja je povoljna za vezanje na operatorsku sekvencu DNA koju ovi proteini prepoznaju. (iii) SloR i ScaR vežu tri iona Mn(II) po monomeru proteina. (iv) Vezanje iona Mn(II) povećava termičku stabilnost proteina.

U svrhu provjere navedenih hipoteza, istražena su strukturna i dinamička svojstva proteina SloR i ScaR u prisutnosti i odsutnosti iona Mn(II) u veznom mjestu, kao i interakcija navedenih proteina s DNA koristeći računalnu metodu simulacija molekulske dinamike (MD). Simulacije MD izvrsna je računalna metoda za istraživanje proteinske alosterije jer omogućavaju uvid u strukturna i dinamička svojstva sustava na molekulskoj razini te se njima mogu istraživati konformacijski ansambl te promjene u mrežama nekovalentnih interakcija uslijed vezanja alosteričkog efektora.<sup>10</sup> Uz računalne metode provedeni su i razni *in vitro* eksperimenti kojima je prethodila sama izolacija i pročišćavanje proteina. Promjene u strukturi i stabilnosti proteina pratila se korištenjem metode cirkularnog dikroizma (CD) i metode razlikovne pretražn kalorimetrije (DSC). Nadalje, energija vezanja iona kao i stehiometrija vezanja iona Mn(II) određena je pomoću metode izotermne titracijske kalorimetrije (ITC), te metodom elektronske paramagnetske rezonancije (EPR). Nапослјетку, afinitet vezanja proteina za prikladne operatorne sekvence molekule DNA istražen je pomoću metoda fluorescencijske anizotropije (FA) te testa pomaka elektroforetske pokretljivosti (EMSA).

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Metaloregulatorni transkripcijski faktori

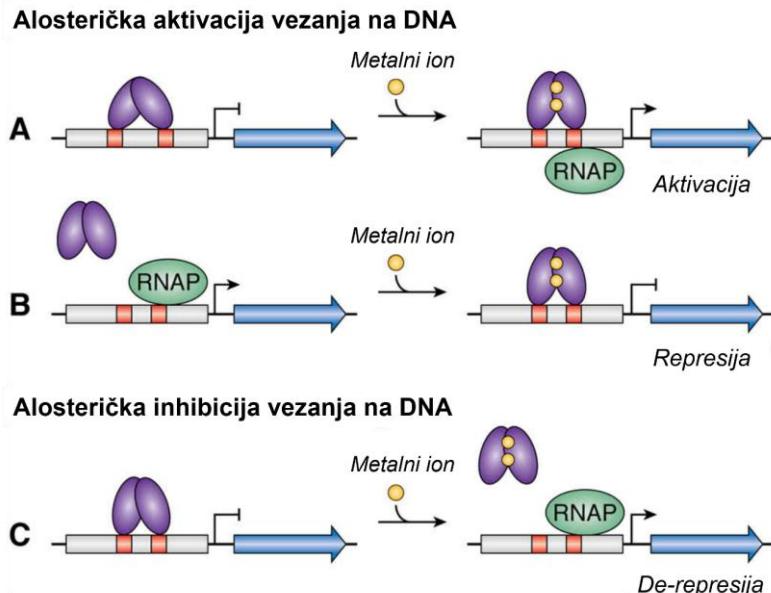
#### 2.1.1. Održavanje homeostaze iona metala

Ioni prijelaznih metala imaju esencijalnu ulogu u biologiji bakterijskih stanica. Prijelazni metali, uključujući željezo, bakar, cink, nikal i mangan, neophodni su za razne stanične procese u kojima djeluju kao kofaktori za enzime ili stabiliziraju strukturu bioloških makromolekula.<sup>11,12</sup> Primjerice, ioni željeza su ključna komponenta citokroma, koji su uključeni u prijenos elektrona i proizvodnju energije u stanici.<sup>12</sup> Ioni bakra i cinka važni su za funkciju superoksid dismutaze, enzima koji štiti stanicu od oksidativnog oštećenja, dok je mangan uključen u detoksifikaciju reaktivnih kisikovih vrsta.<sup>12</sup> Osim navedenog, ioni prijelaznih metala sudjeluju kao prekursori u biosintezi, replikaciji DNA i transkripciji<sup>13</sup>.

U prirodi se prijelazni metali većinom nalaze u tragovima te zbog njihove važnosti bakterijske stanice odvajaju značajnu količinu energije kako bi se osigurala dovoljna opskrba metalima u uvjetima njihove oskudice.<sup>14</sup> Međutim, unatoč tome što su neophodni za funkcioniranje stanice, postoji nekoliko razloga zbog kojih opskrba metalima mora biti ograničena.<sup>13</sup> Kao prvo, transport metala preko membrane energetski je zahtjevan proces, zbog čega unos metala koji premašuje potrebe stanice predstavlja nepotreban gubitak resursa tj. energije.<sup>15</sup> Kao drugo, stanice moraju izbjegavati nakupljanje viška metala koji se mogu vezati za nasumične biomolekule te tako katalizirati neželjene reakcije i uzrokovati biomolekularna oštećenja.<sup>16</sup> Kako bi održale preciznu kontrolu razine svakog esencijalnog iona metala, bakterije su razvile mehanizme za unos, transport i skladištenje te za izbacivanje metala u slučaju intoksikacije. Ono što je karakteristično za te kontrolne sustave je da su međusobno povezani te da su najčešće specifični za samo jedan tip iona.

Regulaciju homeostaze iona metala u bakterijama vrše transkripcijski faktori, tzv. metaloregulatori koji detektiraju razinu metala unutar stanice. Svaki metaloregulator alosterički je reguliran specifičnim metalnim ionom za čiju homeostazu je odgovoran. Vezanje iona metala u određeno vezno mjesto može pozitivno ili negativno utjecati na sposobnost vezanja

metaloregulatora na operatorske sekvene DNA, što posljedično dovodi do aktivacije, represije ili de-represije transkripcije gena potrebnih za metabolizam određenog iona metala (slika 2.1.).<sup>8</sup>



**Slika 2.1.** Shematski prikaz odgovora metaloregulatora na vezanje iona metala. Metaloregulatorni transkripcijski faktori (ljubičasto) vežu se na specifične sekvene (narančasto) u promotorskoj regiji gena (sivo) kako bi blokirali pristup RNA polimerazi (RNAP) ili pojačali njezinu aktivnost. Vezanje metalnih iona alosterički stimulira ili inhibira vezanje proteina na DNA što posljedično dovodi do: aktivacije (A), represije (B) ili de-represije (C) transkripcije. Preuzeto i prilagođeno iz literarnog izvora.<sup>8</sup>

### 2.1.2. Karakteristike metaloregulatora te mehanizam alosteričke kontrole

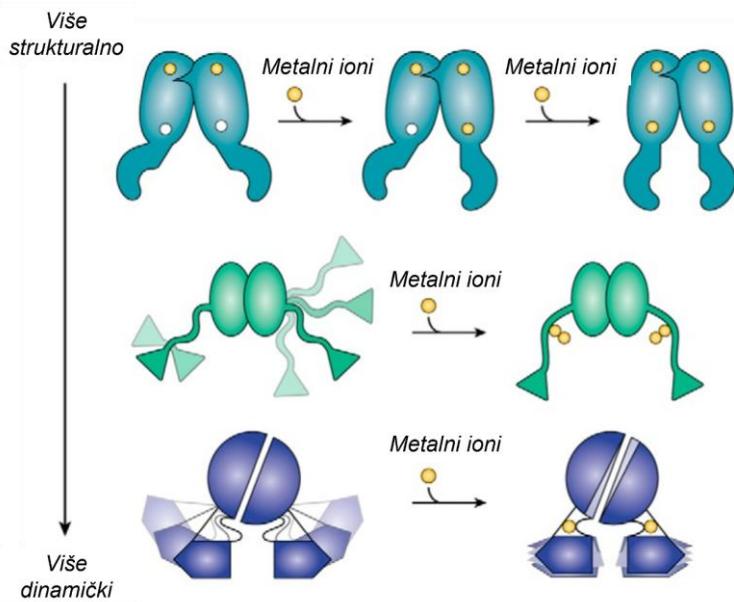
Metaloregulatori su homo-oligomerni proteini (dimeri ili tetrameri) koji sadrže dvije DNA vezne domene (eng. *DNA Binding Domain*, DBD). Vezna mjesta za ione metala nalaze se na posebnom položaju koji je udaljen od domene DBD. Općenita organizacija strukture ovih proteina je takva da se domena DBD nalazi na N-terminalnom dijelu, dok se vezno mjesto za ione metala nalazi ili bliže C-terminalnom dijelu proteina ili negdje u centru same strukture proteina (između N- i C- terminalnog dijela).

Postoji desetak različitih obitelji metaloregulatornih transkripcijskih faktora, koje su nazvane prema prvo otkrivenom predstavniku obitelji. Članovi svake obitelji imaju sličnu proteinsku strukturu te se vežu na slične motive DNA, ali imaju varijacije u aminokiselinama unutar mesta vezanja za ione metala, tako da koordiniraju tj. reagiraju na različite vrste

metala.<sup>13,17,18</sup> U različitim organizmima, transkripcijski regulatori iz različitih obitelji metaloregulatornih proteina ponekad reguliraju ekspresiju gena s identičnom funkcijom. Ova pojava je konzistentna s pristupom „*mix and match*“ u evoluciji metalo-senzornih operona ili regulona gdje se smatra da je došlo do horizontalnog prijenosa gena između prokariota te kasnije konvergentne evolucije metaloregulatora.<sup>19</sup>

Alosterička kontrola kod većine metaloregulatornih transkripcijskih faktora podrazumijeva aktivaciju ili inhibiciju vezanja metaloregulatora za operatorsku sekvencu DNA. Vezanje odgovarajućeg iona metala alosterički utječe na strukturu proteina na način da potiče ili inhibira nastajanje konformacije u kojoj je orientacija domena DBD pogodna za vezanje na DNA.<sup>8</sup> Drugačiji oblik alosteričke kontrole pronađen je kod MerR obitelji transkripcijskih faktora koji su konstantno vezani za DNA. Vezanje odgovarajućeg iona metala alosterički utječe na strukturu proteina koji zatim mijenja strukturu DNA i promovira vezanje RNA polimeraze.<sup>20,21</sup> Trenutna saznanja o alosteričkim mehanizmima vezanja DNA koja su regulirana metalima još uvijek nisu potpuna. No, kako istraživanja napreduju, postaje jasno da proteini koriste više strategija koje se manifestiraju kao kontinuum između velikih promjena u trodimenzionalnoj strukturi i suptilnijih promjena u samoj dinamici proteina (Slika 2.2.). Iz tog razloga, ove sustave treba promatrati unutar šireg okvira alosteričke modulacije proteinskih ansambla.<sup>22</sup>

Osim navedene alosteričke promjene i specifičnosti veznog mjesta za određeni ion metala, za specifičnost adaptivnog odgovora metaloregulatora prema određenom metalu zasluzna je i citoplazmatska koncetracija metalnih iona koja osigurava da se regulacija ekspresije sustava za održavanje homeostaze metala odvija u fiziološki relevantnom rasponu.<sup>8,18,23</sup>



**Slika 2.2.** Alosterički odgovor metaloregulatora na vezanja metalnih iona koji utječe na sposobnost vezanja na DNA. Od vrha prema dnu: shematski prikaz promjena uzrokovanih metalnim ionima u proteinu Zur iz obitelji TF Fur (plavo), MntR iz obitelji DtxR (zeleno) i AdcR iz obitelji MarR (tamno plavo). U svakom od ovih primjera apo-protein se ne može vezati na DNA, a aktivacija proteina za vezanje na DNA posredovana je vezanjem metala (žuti krugovi). Svetlijije obojani dijelovi MntR i AdcR predstavljaju kretanje tih regija. Na primjer, MntR pokazuje međudomensku fleksibilnost, koja omogućuje domenama DBD da zauzmu različite orijentacije u odnosu na vezno mjesto za ione metala prije samog vezanja metala. Preuzeto i prilagođeno iz literarnog izvora.<sup>8</sup>

## 2.2. Homeostaza iona Mn(II) u bakterijama *Streptococcus mutans* i *Streptococcus gordonii*

### 2.2.1. Bakterije *Streptococcus mutans* i *Streptococcus gordonii*

Bakterije *Streptococcus gordonii* i *Streptococcus mutans* dio su mikrobioma ljudske usne šupljine koje formiraju biofilmove na površini zuba. Obje bakterijske vrste spadaju u skupinu gram-pozitivnih bakterija, ali je njihov utjecaj na mikrobiom ljudske usne šupljine drugačiji. Kao metabolički produkt fermentacije šećera, *S. mutans* proizvodi mlječnu kiselinu koju izbacuje u svoju okolinu. Izbacivanje kiseline dovodi do demineralizacije zubne cakline i stvaranja karijesa. S druge strane, *S. gordonii* je nepatogena bakterija koja može inhibirati rast *S. mutans* putem proizvodnje vodikovog peroksida i drugih antimikrobnih tvari. Interakcija

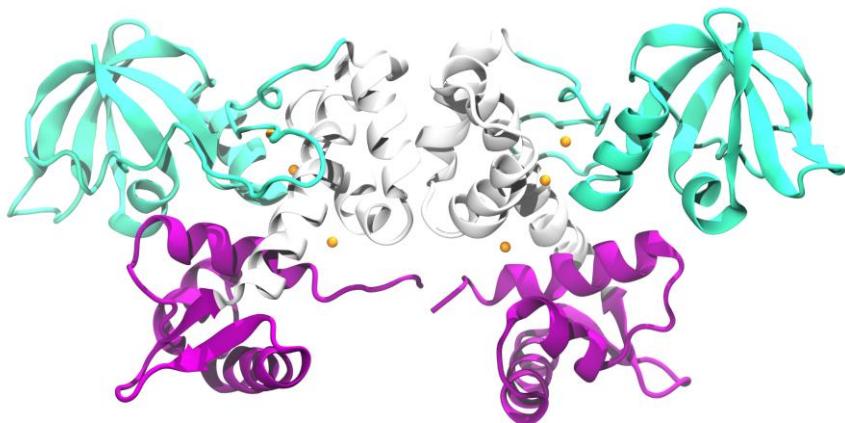
između *S. mutans* i *S. gordonii* je kompleksna i može utjecati na ravnotežu mikrobioma usne šupljine.<sup>24</sup>

Uz ostale dvovalentne katione, streptokokima su potrebni ioni Mn(II) za preživljavanje u domaćinu. Ovisno o okolini i o bakterijskoj vrsti, Mn(II) je kofaktor različitih enzima uključenih u esencijalne procese poput metabolizma ugljikohidrata i nukleotida, translacije i unutarstanične signalizacije, ili se može povezati s raznim metabolitima, proteinima i nukleinskim kiselinama.<sup>2</sup> Najznačajnija uloga iona Mn(II) u bakterijama je da djeluje kao kofaktor u procesu rezistencije na reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species - ROS*) te u procesu replikacije molekula DNA.<sup>2</sup> Iz tog razloga, održavanje homeostaze iona Mn(II) od izrazite je važnosti za rast i virulenciju bakterija, uključujući i *S. mutans* te *S. gordonii*.

U bakterijama *S. gordonii* i *S. mutans*, homeostaza iona Mn(II) regulirana je pomoću transkripcijskih faktora ScaR (*S. gordonii*) i SloR (*S. mutans*).<sup>3,6,7,25,26</sup> Pri povišenim koncentracijama iona Mn(II), ScaR i SloR prelaze u aktivnu formu te inhibiraju ekspresiju gena za ABC transportere koji selektivno unose ione Mn(II) unutar stanice.

### 2.2.2. Transkripcijski faktori SloR i ScaR

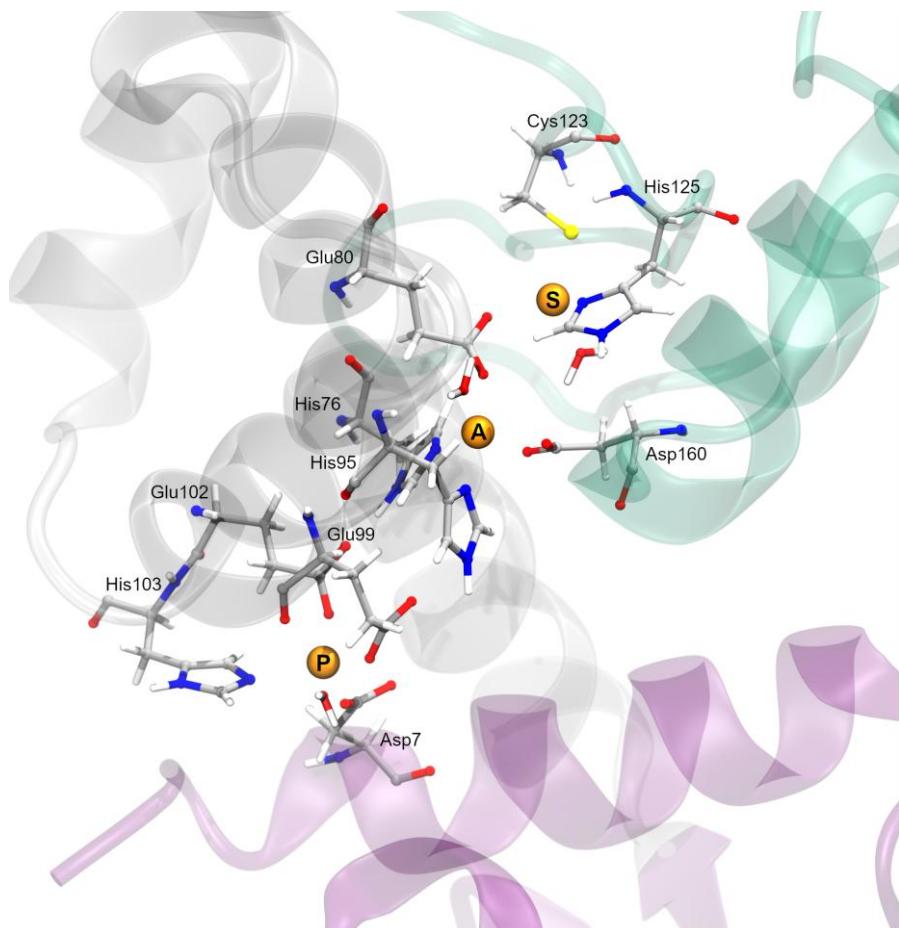
Proteini SloR i ScaR, zajedno s ostalim streptokokalnim homologima, pripadaju DtxR/IdeR obitelji proteina represora za ABC transportere metalnih iona koji su regulirani ionima prijelaznih metala, poput željeza i mangana.<sup>3,4,26–28</sup> Poznato je da se proteini SloR i ScaR nalaze u obliku stabilnih homodimera (25 kDa po monomeru)<sup>3,25,29</sup>, dok se primjerice DtxR nalazi u obliku monomera koji prelazi u aktivni homodimerni oblik prilikom vezanja prvog metalnog iona.<sup>4,17</sup> Pripadnici ove obitelji proteina imaju karakterističnu strukturu u kojoj se svaki monomer sastoji od tri glavne domene (slika 2.3.): DNA-vezna N-terminalna domena oblika krilate spirale (eng. *N-terminal winged helical DNA binding domain*), središnja dimerizacijska domena koja promovira kvaternu strukturu homodimera, te C-terminalna domena FeoA (poznata i kao domena nalik SH3).<sup>4</sup>



**Slika 2.3.** Struktura proteina ScaR. Domena DBD prikazana je ljubičastom bojom, dimerizacijska domena s linker zavojnicom prikazana je bijelom bojom, a tirkiznom bojom je prikazana domena FeoA. Narančastim kuglicama prikazani su ioni metala.

Za protein SloR poznata je samo jedna kristalna struktura (PDB kod: 5CVI) u kojoj je na protein vezano osam iona Zn(II). Dva od osam prisutnih iona vezana su samo na jednu podjedinicu (monomer) proteina i to na mjestima koja ne odgovaraju veznim mjestima za ione metala u homolognim proteinima. Međutim preostalih šest iona vezana su simetrično na obje podjedinice proteina i nalaze se u dva odvojena vezna mesta – mononuklearno vezno mjesto koje se nalazi između DBD i dimerizacijske domene te binukelarno vezno mjesto koje se nalazi između dimerizacijske i FeoA domene (slika 2.4.). Za protein ScaR poznate su tri strukture: apo (PDB kod: 3HRS), s dva simetrično vezana iona Cd(II) (PDB kod: 3HRT) te s dva simetrično vezana iona Zn(II) (PDB kod: 3HRU). Položaj vezanih iona u razriješenim strukturama proteina ScaR poklapa se s položajem iona Zn(II) u binuklearnom veznom mestu proteina SloR. Proteini SloR i ScaR dijele 86,4 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu (na temelju BL80<sup>30</sup>, slika 2.5.), a prepostavljena vezna mesta za ione metala (mononuklearno i binuklearno) sadrže iste aminokiseline (slika 2.4.-2.5.).<sup>3,26</sup> Mononuklearno vezno mjesto se u literaturi još naziva primarno vezno mjesto, dok se binuklearno sastoji od dva vezna mesta koja dijele jedan aminokiselinski bočni ogrank (Glu80) te koja se nazivaju pomoćno i sekundarno vezno mjesto.<sup>3,5,17</sup> Najveće razlike u strukturi između ova dva proteina su u domeni FeoA za

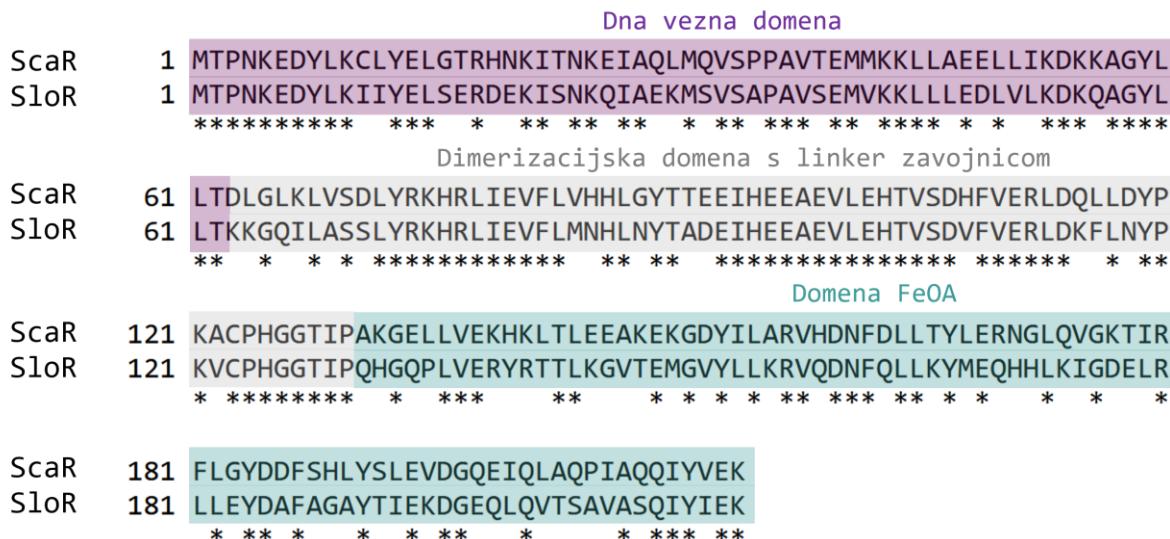
koju se pretpostavlja da u proteinima ima ulogu u multimerizaciji ili interakciji s drugim proteinima te u prijenosu signala unutar stanice.<sup>9,31</sup>



**Slika 2.4.** Vezna mjesta za ione prijelaznih metala u proteinima SloR i ScaR. P – primarno vezno mjesto, A – pomoćno (eng. ancillary) vezno mjesto, S – sekundarno vezno mjesto. Vezno mjesto A i S dijele jedan aminokiselinski bočni ogrank – Glu80, zbog čega se u literaturi ova vezna mjesta još skupno nazivaju binuklearno vezno mjesto.

Iako nije razriješena struktura proteina SloR i ScaR u kompleksu s ionima Mn(II), razne studije pokazale su da je Mn(II) jedan od najjačih aktivatora ovih proteina (uz ione Ni(II) i Cd(II)) te da ScaR veže od 2 do 3 iona metala po monomeru proteina.<sup>5,6</sup> Štoviše, homologni proteini čije su strukture razriješene u kompleksu s ionima Mn(II) (MtsR – *Streptococcus pyogenes* (PDB kod: 5ZR6) i MntR – *Mycobacterium tuberculosis* (PDB kod: 5ZR6)) imaju iste pozicije veznih mjesto te aminokiselinske bočne ogranke u veznim mjestima za ione metala

što ukazuje da se ioni Mn(II) u proteinima SloR i ScaR najvjerojatnije vežu na ista vezna mjesta kao i ioni Zn(II) i Cd(II) u njihovim razriješenim kristalnim strukturama.



**Slika 2.5.** Poravnanje sekvenci proteina ScaR i SloR napravljeno pomoću mrežno dostupnog alata BLASTp.

Selektivnost proteina ScaR i SloR za ione Mn(II), a ne za ione Fe(II), najvjerojatnije proizlazi iz selekcije liganda.<sup>32</sup> Primarno mjesto vezanja iona metala na proteinu DtxR sadrži dvije aminokiseline koje u bočnom ogranku imaju sumpor, Met10 i Cys102, dok se na analognim pozicijama u proteinu SloR i ScaR nalaze negativno nabijene aminokiseline Asp7 i Glu99.<sup>3,4,25</sup> Dosad napravljena istraživanja pokazala su da nije poznat niti jedan protein, selektivan na ione Mn(II) koji ima ligande (aminokiselinske bočne ogranke) s atomima sumpora.<sup>33</sup>

Za proteine SloR i ScaR poznata je važnost primarnog i pomoćnog veznog mesta metalnih iona za prelazak u aktivni oblik represora.<sup>3,5</sup> Prema istraživanjima napravljenim na homolognom proteinu MntR iz bakterije *M. tuberculosis*, apo-protein pokazuje međudomensku fleksibilnost, koja omogućuje domenama DBD da zauzmu različite orientacije jedna naspram druge te u odnosu na vezno mjesto za ione metala prije samog vezanja metala. Dok prilikom vezanja iona metala dolazi do smanjenja fleksibilnosti domena DBD. Međutim, za proteine SloR i ScaR do sada nije razjašnjeno koja je razlika u strukturi i dinamici aktivne i inaktivne (apo) forme proteina te koji je alosterički mehanizam odgovoran za prelazak proteina iz apo forme u holo formu koja može vezati DNA.

## 2.3. Teorijska osnova računalnih metoda

### 2.3.1. Molekulska dinamika

Simulacije molekulske dinamike (MD) korisna su računalna metoda za istraživanje proteinske alosterije jer omogućavaju uvid u struktura i dinamička svojstva sustava na molekulskoj razini te se njima mogu istraživati konformacijski ansambl te promjene u mrežama nekovalentnih interakcija uslijed vezanja alosteričkog efektora.<sup>10</sup>

Ovisno o načinu tretiranja atoma razlikujemo: klasičnu molekulsku mehaniku (MM) u kojoj su atomi predstavljeni kao najmanji element sustava te kvantno-mehaničke (eng. *quantum mechanics*, QM) račune u kojima su atomi predstavljeni eksplicitno te su pritom u račun uključene i subatomske čestice. Simulacije MD spadaju u metode koje atome tretiraju prema modelu klasične MM gdje su atomi najmanje jedinice koje se modeliraju kao tvrde kuglice određenog volumena, a kovalentne veze su predstavljene oprugama. U ovom pristupu se elektronska struktura atoma uzima u obzir implicitno putem parametara kojima se opisuje sustav. Upravo zbog pretpostavke da se sustav može tretirati klasičnom mehanikom dolazi do velikog pojednostavljenja u računima zbog čega je moguće promatrati sustave s većim brojem čestica. Za razliku od molekulske mehanike, QM računi mogu vrlo precizno opisati ponašanje atoma, ali glavni nedostatak ove metode je to što je ograničena veličinom sustava (u pravilu na nekoliko stotina atoma) zbog velikih računskih zahtjeva te se zbog toga ne može koristiti za proučavanje sustava makromolekula u cjelini.

U MM, pa tako i u simulacijama MD, jedan atom može imati više tipova ovisno o okolnim atomima za koje je vezan. Iz tog razloga se prilikom pripreme sustava za simulacije MD svakom atomu dodjeljuje tip atoma koji sadrži informaciju o atomskom broju, vrijednosti parcijalnog naboja, hibridizaciji, te vrstama kemijskih veza u koje je navedeni atom uključen. Parametri kojima se opisuje odnos atoma koji se nalaze u kovalentnoj ili nekovalentnoj interakciji (primjerice duljina veze, torzijski kut itd.) dobiveni su ili eksperimentalno (polja sila prve generacije) ili QM računima (polja sila druge generacije). Skup parametara te funkcija koja korištenjem tih parametara omogućava računanje ukupne potencijalne energije sustava i rezultantnih sila koje djeluju na pojedine čestice naziva se polje sila.<sup>34</sup> Optimalne vrijednosti, odnosno energetski minimumi veza i kutova između istih atoma u različitim sustavima, podrazumijevaju iste duljine veza i iste veličine kutova što upućuje na to da je prenosivost

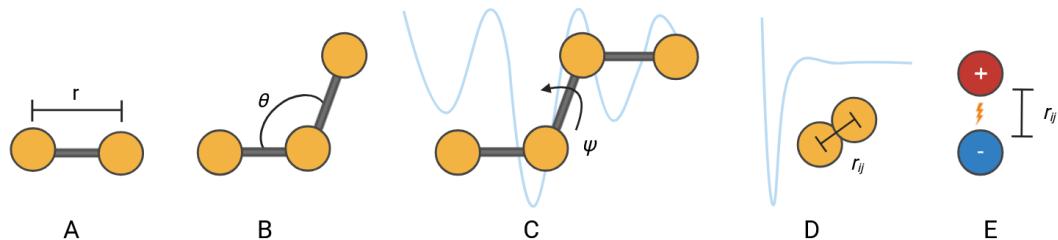
parametara važna stavka svakog polja sila. Polja sila međusobno se razlikuju s obzirom na broj i vrstu atoma za koje sadrže parametre te po izrazu koji se koristi za računanje potencijalne energije sustava.<sup>35-37</sup>

Ukupna potencijalna energija ( $E_{uk}$ ) sustava definirana je kao zbroj energetskih doprinosa veznih i ne-veznih interakcija (izrazi 2.1. i 2.2., slika 2.6.).

$$E(\vec{R})_{uk} = \sum E(\vec{R})_{vezne} + \sum E(\vec{R})_{nevezne} \quad (2.1.)$$

gdje je  $\vec{R} = \{\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots, \vec{r}_N\}$  skup pojedinačnih pozicijskih vektora atoma  $\vec{r}_i = (x, y, z)$ , dok N predstavlja ukupan broj atoma u sustavu.

$$E_{uk} = E_{veze} + E_{kutovi} + E_{torz} + E_{oop} + E_{el} + E_{vdw} + \sum E_{mix} \quad (2.2.)$$



**Slika 2.6.** Shematski prikaz energetskih doprinosa potencijalnoj energiji sustava u simulacijama MD. Energija veznih interakcija rezultat je potencijalne energije koja se javlja zbog: A) istezanja veze, B) promjene valentnog kuta, C) promjene torzijskog kuta te odstupanja atoma iz ravnine, dok je energetski doprinos neveznih interakcija rezultat D) van der Waalsovih i E) elektrostatskih interakcija atoma koji su udaljeni minimalno tri kovalentne veze.

Energija veznih interakcija računa se kao zbroj potencijalnih energija koje se javljaju zbog: istezanja veze ( $E_{veze}$ ), promjene valentnog kuta ( $E_{kutovi}$ ), promjene torzijskog kuta ( $E_{torz}$ ), te odstupanja atoma iz ravnine koji čine planarne sustave ( $E_{oop}$ ). Nevezna energija računa se kao energetski doprinos: elektrostatskih interakcija ( $E_{el}$ ) te van der Waalsovih interakcija ( $E_{vdw}$ ). Zadnji član u izrazu 2.2., tzv. „miješani član“ javlja se kao posljedica nemogućnosti neovisnog

promatranja različitih doprinosa ukupnoj potencijalnoj energiji<sup>35</sup>. Samo neka polja sila sadrže miješani član.

Energetski doprinos istezanja veze između dva kovalentno povezana atoma  $i$  i  $j$  opisan je harmonijskim potencijalom prema izrazu 2.3.

$$E(\vec{R})_{veze} = \frac{1}{2} \sum_{veze} K_b (\vec{r}_{i,j} - \vec{r}_0) \quad (2.3.)$$

gdje se atomi  $i$  i  $j$  nalaze na udaljenosti  $r_{ij}$ ,  $r_0$  predstavlja ravnotežnu udaljenost dok  $K_b$  predstavlja konstantu opruge.

Energetski doprinos savijanja kuta između tri povezana atoma  $i$ ,  $j$  i  $k$  također se prikazuje harmonijskim potencijalom prema izrazu 2.4.

$$E(\vec{R})_{kutovi} = \frac{1}{2} \sum_{kutovi} K_\theta (\theta_{ijk} - \theta_0) \quad (2.4.)$$

gdje je  $\theta_{ijk}$  veličina kuta između atoma  $i$ ,  $j$  i  $k$  u radijanima,  $\theta_0$  je veličina ravnotežnog kuta, dok  $K_\theta$  predstavlja konstantu opruge.

Energetski doprinos promjene torzijskog kuta između  $ijk$  i  $kl$  ravnine četiriju povezanih atoma  $i$ ,  $j$ ,  $k$  i  $l$  računa se prema izrazu 2.5.

$$E(\vec{R})_{torz} = \frac{1}{2} \sum_{torz} V_n [1 + \cos(n\psi_{ijkl} - \gamma)] \quad (2.5.)$$

gdje  $\psi$  predstavlja vrijednost torzijskog kuta između  $ijk$  i  $kl$  ravnine četiriju povezanih atoma  $i$ ,  $j$ ,  $k$  i  $l$ ,  $V_n$  predstavlja konstantu rotacijske barijere, a  $n$  je njen multiplicitet. Kada je  $n > 0$ ,  $\gamma$  predstavlja kutni pomak u fazi, a kada je  $n = 0$ ,  $\gamma$  predstavlja ravnotežnu vrijednost torzijskog kuta. Osim navedenog izraza, za izračun energetskog doprinosa promjene torzijskog kuta često se koriste Ryckaert-Belleman-ove i Fourierov-e funkcije.

Energetski doprinos odstupanja atoma iz ravnine uvrštava se u izraz za računanje potencijalne energije kako bi se osigurala planarnost sustava kod kojih je ona uzrokovana elektronskom struktrom. Ovaj energetski doprinos računa se prema izrazu 2.6.

$$E(\vec{R})_{oop} = \frac{1}{2} \sum_{oop} K_\xi \xi_{ijkl} \quad (2.6.)$$

gdje je  $\xi_{ijkl}$  kut odstupanja iz ravnine. Kut  $\xi_{ijkl}$  računa se između ravnine  $(i,j,k)$  koju tvore prva tri atoma i ravnine  $(j,k,l)$  koju čine zadnja tri sukcesivno vezana atoma  $(i,j,k,l)$ .  $K_\xi$  je konstanta savijanja izvan ravnine.

Nevezni doprinos potencijalnoj energiji sustava uključuje van der Waalsove interakcije i elektrostatske interakcije između svih  $(i, j)$  parova atoma koji su razdvojeni s tri ili više kovalentnih veza. Nevezne interakcije također spadaju u fundamentalne interakcije među atomima i određuju odvijanje mnogih biofizičkih procesa. U van der Waalsove interakcije ubrajamo članove za odbijanje i disperziju koji su najčešće kombinirani u Lennard-Jonesov<sup>38</sup> ili Buckinghamov<sup>39</sup> potencijal. Za opis van der Waalsovih interakcija češće se koristi Lennard-Jonesov potencijal u obliku prikazanom izrazom 2.7.

$$E(\vec{R})_{vdW} = \sum_i \sum_j \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.7.)$$

gdje  $r_{ij}$  predstavlja udaljenost atoma  $i$  i  $j$ , dok  $r_{0,ij}$  predstavlja sumu van der Waalsovih radijusa atoma  $i$  i  $j$ .

Elektrostatski doprinos potencijalnoj energiji koji opisuje interakciju dvaju točkastih naboja atoma  $i$  i  $j$  dan je izrazom 2.8.

$$E(\vec{R})_{el} = \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r_{ij}} \quad (2.8.)$$

gdje  $q_i$  i  $q_j$  predstavljaju naboje  $i$ -og i  $j$ -og atoma,  $\varepsilon_0$  predstavlja dielektričnu permitivnost vakuuma, a  $\varepsilon_r$  predstavlja dielektričnu permitivnost medija, dok je  $r_{ij}$  udaljenost između naboja

$q_i$  i  $q_j$ . Iz navedenih izraza za vezne i nevezne doprinose dobiva se ukupni izraz za potencijalnu energiju.

Za biološke makromolekule najčešće se upotrebljavaju polja sila AMBER<sup>40</sup>, CHARMM<sup>41</sup>, GROMOS<sup>42</sup> i OPLS<sup>43</sup>. Postoje i općenita polja sila MMFF<sup>44</sup>, COMPASS<sup>45</sup>, ESFF<sup>46</sup> i UFF<sup>47</sup> koja se mogu primijeniti za razne sustave. Za svako od ovih polja sila postoji nekoliko podvrsta polja sila koja se malo razlikuju u određenim parametrima koji su s vremenom izmijenjeni, nadodani ili su razvijeni specijalno za neki tip makromolekule (protein ili DNA).

Računi optimizacije geometrije sustava, odnosno minimizacije energije, provode se prije pokretanja simulacije molekulske dinamike. Ovim postupkom nastoje se ukloniti nepovoljne interakcije koje nastaju zbog premalih ili prevelikih udaljenosti između atoma ili nepovoljnih kutova. Minimizacija se odvija u jedan ili više ciklusa te omogućuje optimizaciju duljina kovalentnih veza, valentnih kutova i sl., odnosno dovodi do relaksacije sustava u neki od lokalnih minimuma bliskih početnoj strukturi na plohi potencijalne energije. Dvije nejčešće korištene metode za optimizaciju sustava su algoritam najstrmijeg spusta (eng. *steepest descent*) te algoritam konjugiranog gradijenta.

Nakon što se izvrši početna parametrizacija sustava u određenom polju sila te optimizira geometrija sustava, moguće je pokrenuti simulacije MD. Početna brzina svakog atoma u sustavu na položaju definiranom pozicijskim vektorom  $\vec{r}_i = (x, y, z)$  dobiva se pomoću Maxwell-Boltzmannove raspodjele prema izrazu 2.9.

$$p(v)_i = \left[ \frac{m_i}{2\pi k_b T} \right]^{\frac{3}{2}} 4\pi v^2 e^{-\frac{m_i v^2}{2k_b T}} \quad (2.9.)$$

gdje je  $p_i$  vjerojatnost da se atom mase  $m_i$  pri zadanoj temperaturi simulacija  $T$  giba u prostoru brzinom  $v$ .  $k_b$  je Boltzmanova konstanta.

Gibanje atoma dovodi do promjene konformacije molekule i samim time do promjene položaja sustava na plohi potencijalne energije. Deriviranjem izraza za potencijalnu energiju sustava te korištenjem drugog Newtonovog zakona dobiva se skup Newtonovih jednadžbi gibanja za svaki atom prema izrazu 2.10.

$$m_i a_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{F}(\vec{r}_i) \quad (2.10.)$$

gdje  $\vec{F}(\vec{r}_i)$  predstavlja silu koja djeluje na  $i$ -ti atom sustava. Ova sila povezana je s ukupnom potencijalom energijom sustava preko izraza 2.11.

$$\vec{F}(\vec{r}_i) = -\nabla E(\vec{R})_{uk} \quad (2.11.)$$

čime se u konačnici dobiva izraz 2.12.

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = -\nabla E(\vec{R})_{uk} \quad (2.12.)$$

Rješavanjem izraza 2.12. dolazi se do vremenske zavisnosti položaja atoma u sustavu tj. do trajektorije. Budući da skup Newtonovih jednadžbi gibanja nema analitičko rješenje potrebno je primijeniti numeričke metode rješavanja. Algoritmi koji se najčešće koriste za numeričko rješavanje su *Leap-frog*<sup>48</sup> algoritam i *Verletov*<sup>49</sup> integracijski algoritam, te njihove inačice poput *velocity Verlet*<sup>50</sup> algoritma i *Beemanovog*<sup>51</sup> algoritma.

Simulacijama MD se u vremenu generira ansambl struktura koje predstavljaju različita mikroskopska stanja sustava, pri čemu je očuvano makroskopsko stanje određeno brojem čestica ( $N$ ), temperaturom ( $T$ ), tlakom ( $p$ ), kemijskim potencijalom ( $\mu$ ) i/ili energijom ( $E$ ). Ansamble razlikujemo ovisno o kombinaciji parametara koji ostaju nepromijenjeni tijekom simulacije: kanonski ( $NVT$ ), mikrokanononski ( $NVE$ ), velekanonski ( $\mu VT$ ), izobarno-izotermni ( $NPT$ ) i izoentalpijsko-izobarni ( $NPH$ ) ansambl. Najčešće eksperimentalni uvjeti podrazumijevaju konstantan tlak i temperaturu zbog čega se u simulacijama nastoji generirati  $NPT$  ansambl. Međutim, u prvim koracima simulacija MD prilikom dovođenja sustava na temperaturu pri kojoj se želi simulirati generira se  $NVT$  ansambl. U tom slučaju volumen se održava konstantnim dok se temperatura postepeno mijenja do željene vrijednosti. Nakon toga, temperatura se određeni vremenski interval održava konstantnom kako bi se postigla odgovarajuća gustoća sustava. S obzirom na to da se temperatura može prikazati kao funkcija raspodjele kinetičke energije ( $E_k$ ) među česticama u sustavu (izraz 2.13.), najjednostavniji način regulacije temperature tijekom molekulske dinamike je (re)skaliranjem brzine čestica.

$$E(\vec{r})_k = \frac{3}{2} N k_B T = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2} \quad (2.13.)$$

Za regulaciju temperature u sustavu koriste se različiti tipovi termostata, koji se dijele na termostate s jakim i slabim sprezanjem te stohastičke termostate. Najčešće korišten termostat sa slabim sprezanjem je *Berendsenov*<sup>52</sup> termostat koji simulira uranjanje sustava u kupelj konstantne temperature, pri čemu se intenzitet interakcije sustava i kupelji regulira konstantom sprezanja. *Langevinov*<sup>53</sup> termostat je najpoznatiji stohastički termostat koji se temelji na interakciji fiktivnih čestica s promatranim sustavom. Ovaj pristup uključuje dodavanje stohastičke sile i disipativne sile u jednadžbe gibanja čestica. Stohastička sila simulira slučajne sudare čestica s okolinom, dok disipativna sila oponaša trenje koje smanjuje kinetičku energiju čestica. Kombinacija ovih sila omogućuje održavanje konstantne temperature sustava jer se kinetička energija izmjenjuje kroz sudare.

Nadalje, održavanje stalnog tlaka u simulacijama MD postiže se korištenjem barostata. Barostati su algoritmi koji prilagođavaju volumen simulacijskog sustava kako bi održali željeni tlak. Jedan od najčešće korištenih barostata je *Berendsenov*<sup>52</sup> barostat, koji radi na principu sprezanja sustava s vanjskim tlakom. Ovaj barostat regulira tlak skaliranjem koordinata i stranica simulacijske kutije, čime se postiže ravnoteža između unutarnjeg tlaka sustava i vanjskog tlaka. Drugi često korišteni barostat je *Parrinello-Rahmanov*<sup>54</sup> barostat, koji omogućuje promjene oblika i volumena simulacijskog sustava kako bi se održao konstantan tlak.

Otapala igraju ključnu ulogu u simulacijama jer značajno utječu na strukturu i dinamiku molekula u sustavu. U simulacijama se otapala mogu tretirati na dva načina: eksplisitno i implicitno. Implicitni modeli tretiraju otapalo kao kontinuum dielektrične konstante dok eksplisitni modeli uključuju izričito dodavanje molekula otapala u simulacijski sustav. Eksplisitni modeli omogućuju detaljno proučavanje interakcija između molekula otapala i molekule koja je „uronjena“ u otapalo. Zahtjevnost simulacija za računalne resurse raste s vjerodostojnošću modela koji se koristi za opisivanje stvarnih svojstava molekula otapala, najčešće vode. Modeli otapala poput SPC (eng. *Simple Point Charge*) i TIP3P (eng. *Transferable Intermolecular Potential with 3 Points*) često se koriste za simulacije vode.

Prilikom odabira otapala definira se i oblik simulacijske kutije u kojoj će se odvijati simulacije, zbog čega se javlja problem rubnih uvjeta, odnosno, na rubovima simulacijske kutije

dolazi do gubitka čestica. Kako bi se izbjegao ovaj artefakt metode primjenjuju se periodični rubni uvjeti (eng. *Periodic Boundary Conditions*, PBC). Primjenom PBC središnja simulacijska kutija se replicira u sve tri dimenzije što omogućuje da se čestice koje napuštaju simulacijski okvir s jedne strane ponovno pojavljuju sa suprotne strane. PBC također pomaže u održavanju konzistentnosti gustoće i energije sustava tijekom simulacija, odnosno, osigurava zatvorenost sustava.

### 2.3.2. Uklapanje proteina i DNA

Interakcije proteina i nukleinskih kiselina osnova su za funkciranje stanica svih živih bića jer njihove interakcije reguliraju većinu bioloških procesa kao što su sinteza proteina, prijenos signala, replikacija i popravak DNA. Iako su ove interakcije od izrazite važnosti, manje od 7 % razriješenih struktura bioloških makromolekula koje se nalaze u bazi podataka *Protein Data Bank* odnosi se na kompleksne proteina i DNA.<sup>55</sup> S obzirom na kompleksnost i visok trošak eksperimentalnih metoda, računalno predviđanje kompleksa proteina i DNA postupkom uklapanja postaje sve važnije. Iako je teorijski model makromolekularnih struktura većinom manje vjerodostojan od eksperimentalnih modela, teorijski model može se iskoristiti u nadopunjavanju eksperimentalnog pristupa u razjašnjavanju interakcija protein-DNA ili u planiranju daljnjih eksperimentalnih analiza za identifikaciju ključnih aminokiselina ili nukleotidnih ostataka.

Postupak uklapanja proteina i DNA uključuje dva koraka: (i) uzorkovanje svih mogućih načina vezanja jedne strukture u odnosu na drugu<sup>55,56</sup> te (ii) ocjenjivanje odnosno bodovanje u kojem svaki program koristi svoju funkciju bodovanja za rangiranje uzorkovanih načina vezanja.

Postoje dva glavna računalna pristupa u modeliranju kompleksa protein i DNA: modeliranje temeljeno na predlošku i *ab initio* uklapanje. Prvi pristup bazira se na modeliranju kompleksa na temelju strukture homolognog kompleksa. U posljednjih nekoliko godina za protein-protein kompleks porasla je popularnost korištenja metoda temeljenih na predlošcima, zahvaljujući velikom broju novo razriješenih struktura. Programi za modeliranje protein-protein kompleksa koji se baziraju na ovom pristupu su 3D Complex, Dockground i Interactome3D. Međutim, budući da trenutno ne postoji velik broj riješenih struktura kompleksa protein-DNA, a kvaliteta

modeliranja temeljenog na predlošku ovisi o dostupnosti specifičnih kompleksa, ovaj pristup u modeliranju je jako ograničen za primjenu u izradi kompleksa protein-DNA. Iz tog razloga se za modeliranje kompleksa protein-DNA koristi drugi pristup *ab initio* uklapanja koji ne ovisi o dostupnosti predloška homolognog kompleksa. Ovaj pristup predviđa 3D strukturu makromolekulskega kompleksa na temelju koordinata atoma njihovih komponenti. Programi za modeliranje DNA-protein kompleksa koji se baziraju na ovom pristupu su HADDOCK protein-DNA docking te PyDockDNA. Nedostatak informacija o veznim mjestima često zahtijeva globalno uklapanje kako bi se uzorkovali potencijalni načini vezanja u šest stupnjeva slobode (tri rotacije i tri translacije).<sup>57</sup>

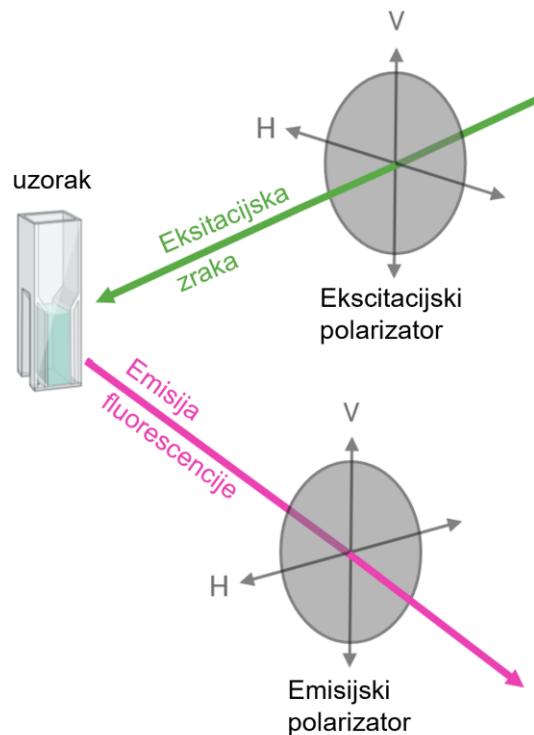
Program PyDockDNA, koji je korišten u sklopu ovog doktorata, temelji se na kombinaciji stohastičkog i determinističkog pristupa. Za uzorkovanje svih načina vezanja, program PyDockDNA koristi algoritam FTDOCK<sup>55,58</sup> koji generira rigidne pozicije između proteina i DNA. Ovaj proces uključuje generiranje više orijentacija i konformacija kompleksa proteina i DNA, što se može smatrati stohastičkim elementom. Međutim, ocjenjivanje i rangiranje ovih pozicija temelji se na determinističkim parametrima baziranim na polju sila. Funkcije rangiranja/bodovanja bazirane na polju sila računaju interakcijsku energiju između makromolekula kao zbroj energetskih doprinosa disperznih (van der Waalsovih) interakcija, vodikovih veza te Columbovih interakcija.<sup>55</sup> Ovaj program omogućava korisnicima da preuzmu predviđene modele te vizualiziraju najbolje rangirane 3D modele.

Priprema sustava za račun molekulskog uklapanja započinje pripremom strukture makromolekule, pri čemu je najvažnije provesti protonaciju proteina i DNA te generirati moguće konfiguracije makromolekula. Poznato je da makromolekule proteini i DNA mogu mijenjati konformaciju u veznom i ne-veznom stanju, pri čemu promjena u veznom stanju može ovisiti o prisustvu druge makromolekule. S ciljem pojednostavljenja računa, većina algoritama za uklapanje ne dozvoljava fleksibilnost makromolekula, zbog čega postoje dva pristupa kojima se može „zaobići“ navedeni problem. Jedan od pristupa je izvođenje simulacija MD apo-makromolekula s ciljem dobivanja različitih konformacija tj. isječaka iz trajektorije makromolekule u apo-formi koji će se kasnije koristiti u računima uklapanja.<sup>59</sup> Drugi pristup uključuje korištenje simulacija MD kompleksa makromolekula nakon računa uklapanja kako bi se optimizirale ostvarene interakcije te dobio bolji uvid u njihovu stabilnost. Često se koristi kombinacija oba pristupa u računalnim istraživanjima interakcija makromolekula. Također jedno od rješenja je korištenje algoritama koji dozvoljavaju definiranje bočnih ograna

aminokiselina kojima će se omogućiti rotacija veza u svrhu uspostave optimalnih interakcija s ligandom. Negativna strana fleksibilne metode uklapanja je značajno povećanje računalne zahtjevnosti, ali i potencijalno stvaranje nerealnih i energetski nepovoljnih konformacija makromolekule tj. proteina ili DNA.

## 2.4. Teorijska osnova metode fluorescencijske anizotropije

Fluorescencijska anizotropija (FA) je metoda koja mjeri promjenu orijentacije molekule u prostoru s obzirom na vrijeme između apsorpcije i emisije svjetlosti.<sup>60</sup> Apsorpcija i emisija označavaju prostorno poravnanje dipola molekule u odnosu na električni vektor elektromagnetskog vala ekscitacijske i emitirane svjetlosti. Odnosno, ako je populacija fluorofora pobuđena okomito polariziranim svjetлом, emitirano svjetlo će zadržati nešto od te polarizacije ovisno o brzini rotacije molekule u otopini. Što je gibanje molekule brže, to će emitirana svjetlost biti više depolarizirana. Što je gibanje sporije, to će emitirana svjetlost biti manje depolarizirana. Kako bi se iskoristila ta informacija, polarizatori se postavljaju na put ekscitacijskog i emisijskog svjetla fluorometra (Slika 2.7.).



**Slika 2.7.** Prikaz eksperimenta fluorescentne anizotropije korištenjem ekscitacijskih i emisijskih polarizatora. Ovisno o orijentaciji polarizatora dolazi do vertikalne (V) ili horizontalne (H) polarizacije ekscitacijske zrake svjetlosti i fluorescencijske emisije.

Fluorescencijska anizotoropija,  $r$ , računa se prema izrazu 2.14:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2.14.)$$

gdje je  $I_{VV}$  intenzitet vertikalno polarizirane ekscitacije i vertikalno polarizirane detektirane emisije.  $I_{VH}$  predstavlja intenzitet svjetlosti kada se koristi vertikalna polarizacija ekscitacije i horizontalna polarizacija emisije.  $G$  se naziva faktor rešetke (eng. *grating factor*) te je zapravo korekcija instrumenta za diferencijalni prijenos dviju ortogonalnih vektorskih orijentacija i računa se prema izrazu 2.15.:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2.15.)$$

gdje je  $I_{HV}$  intenzitet horizontalno polarizirane ekscitacije i vertikalno polarizirane detektirane emisije.  $I_{HH}$  predstavlja intenzitet svjetlosti kada se koristi horizontalna polarizacija ekscitacije i detektirane emisije.

Metoda FA može se koristiti za mjerenje konstanti vezanja i kinetike reakcija koje uzrokuju promjenu vremena rotacije molekula. Ako je fluorofor mala molekula npr. oligonukleotidna DNA, brzina kojom se vrati može se znatno smanjiti kada je vezana za veliku molekulu npr. protein. Ako je fluorofor vezan za veći protein u veznom paru, razlika u polarizaciji između vezanog i nevezanog stanja bit će manja, a sukladno s tim vrijednost anizotropije će biti veća<sup>61</sup>.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### Standardne kemikalije:

Agaroza (*Invitrogen*), akrilamid/bis-akrilamid (*Sigma-Aldrich*), amonijev persulfat (*Sigma-Aldrich*), albumin iz goveđeg seruma, BSA (eng. *Bovine Serum Albumine*) (*Sigma-Aldrich*), borna kiselina (*Sigma-Aldrich*), ditiotreitol, DTT (*Sigma-Aldrich*), etanol (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Kemika*), fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF (*Sigma-Aldrich*), glicerol redestilirani (*Kemika*), N-(2-hidroksietyl) piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina, HEPES (*Carl Roth*), imidazol (*Carl Roth*), izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG (*Ambion*), kloramfenikol (*Sigma-Aldrich*), magnezijev klorid (*Sigma-Aldrich*), 2-merkaptetoanol (*Cytiva Life Sciences*), metanol (*Kemika*), N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (*Serva*), natrijev dihidrogenfosfat (*Carl Roth*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Carl Roth*), natrijev hidrogenfosfat (*Carl Roth*), natrijev klorid (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), streptomycin sulfat (*Sigma-Aldrich*), Tris (*Carl Roth*), tris-(2-karboksietil) fosfin hidroklorid, TCEP (*Carl Roth*).

#### Proteinski i DNA standardi:

smjesa proteina poznate molekulske mase – LMW-SDS Marker Kit (*Cytiva Life Sciences*), smjesa DNA odsječaka poznate duljine – 1 kb DNA Ladder (*Solis Biodyne*), 100 bp DNA Ladder (*Thermofisher*)

#### Boje:

Bromfenol-plavo (*Serva*), brilljantno modrilo Coomassie G-250 (*Cytiva Life Sciences*), DNA Loading Dye (*Fermentas*), etidijev bromid (*Sigma-Aldrich*),

**Početnice i sekvence DNA:** sve početnice i sekvence DNA su servisno sintetizirane u tvrtki Macrogen Europe

**Proteini i enzimi:**

*DpnI* endonukleaza (*Agilent Technologies*), Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (*Thermofisher*), Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix (*NEB*), *PfuUltra* DNA-polimeraza (*Agilent Technologies*), proteaza HRV-3C (prethodno pročišćena u LKBK, IRB).

**Antibiotici:** Ampicilin (*Fermentas*)

**Sojevi bakterijskih stanica:**

*Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (genotip: B F<sup>-</sup> ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]) (*Stratagene*).

*Escherichia coli* XL10-Gold® ultrakompetentne stanice (genotip: Tet<sup>r</sup>Δ (*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Camr]) (*Agilent Technologies*)

**Plazmidi:**

N-His\_SSloR\_pET-45b(+) i N-His\_SScaR\_pET-45b(+) naručeni su preko tvrtke GenScript Biotech (*Leiden*, Nizozemska) i nose gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin.

**Kompleti:**

Komplet za izolaciju plazmidne DNA - ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (*Zymo Research*); komplet za ciljanu mutagenезу - QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (*Agilent Technologies*).

**Ostali materijal:**

Ni-NTA agaroza (*Macherey-Nagel*), HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (*Cytiva Life Sciences*), Centrikoni Amicon® Ultra centrifugal filters (*Milipore*), mili Q - deionizirana voda niske vodljivosti proizvedena u sustavu za proizvodnju deionizirane vode Millipore, voda koja ne sadrži nukleaze (eng. Nuclease Free Water, NFW, *Invitrogen*)

## 3.2. Metode rada s bakterijama

### 3.2.1. Uzgoj bakterijskih kultura

Za uzgoj bakterija korišteni su tekući hranjivi medij i krute hranjive podloge. Tekući hranjivi medij, LB (Luria-Bertani), pripravljen je otapanjem 25 g *Difco* praha (baktotripton  $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ , ekstrakt kvasca  $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$  i NaCl  $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$  pH = 7,0) u 1 L destilirane vode. Sterilizacija medija postignuta je autoklaviranjem 20 minuta pri 121 °C i 1,5 atm. U svrhu probira bakterija s otpornošću na antibiotik ampicilin, u ohlađeni, sterilni medij dodan je ampicilin do koncentracije 0,1 g dm $^{-3}$  (LB/Amp). Izvorna otopina ampicilina, koncentracije 100 g dm $^{-3}$ , priređena je otapanjem ampicilina u mili Q vodi i sterilizacijom kroz filter veličine pora 0,22 μm. Ovako priređene otopine ampicilina čuvane su na –20 °C.

Krute hranjive podloge LB pripravljene su kao i tekući hranjivi medij, uz dodavanje agara do masene koncentracije 15 g dm $^{-3}$ . Sterilizirana podloga hlađi se do ~50 °C kad se dodaje ampicilin do koncentracije 0,1 g dm $^{-3}$ . Smjesa se zatim izljeva u sterilne plastične Petrijeve zdjelice koje se nakon skrtnjavanja podloge spremaju u frižider na 4 °C do upotrebe.

Nasađivanje bakterija na krutu hranjivu podlogu postiže se razmazivanjem prethodno transformiranih bakterijskih stanica sterilnim štapićem (ezom) po krutoj hranjivoj podlozi. Tako nasadene bakterijske stanice uzgajaju se u inkubatoru na 37 °C preko noći (~16 h).

Nasađivanje bakterija u tekućem hranjivom mediju postiže se nacjepljivanjem pojedinačne kolonije bakterija s krute LB/Amp podloge u tekući LB/Amp medij. Uzgajanje se zatim provodi u inkubatoru na 37 °C uz miješanje na rotacijskoj platformi pri 140-220 rpm. Vrijeme inkubacije ovisi o svrsi uzgoja bakterija.

### 3.2.2. Transformacija bakterija plazmidnom DNA

Za transformaciju bakterijskih stanica korištene su dvije metode: elektrotransformacija (elektroporacija) i metoda toplinskog šoka (kemijska transformacija).

Elektrotransformacija je metoda kojom se strana DNA unosi u bakterijske stanice, a temelji se na kratkotrajnom povećanju propusnosti stanične stijenke bakterija uslijed izlaganja bakterija električnom pulsu. Metoda elektrotransformacije korištena je na stanicama *E. coli* soja BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-X. U 30  $\mu\text{L}$  elektrokompetentnih stanica dodan je 1  $\mu\text{L}$  plazmidne DNA koncentracije 30-50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Pripremljena suspenzija prebačena je u ohlađenu sterilnu kivetu za elektroporaciju s razmakom elektroda od 2 mm. Elektrotransformacija je napravljena na uređaju *Gene Pulser Xcell (BioRad)* primjenom napona  $\sim 2.5$  kV u trajanju od 5 milisekundi. Odmah nakon toga, u kivetu je dodano 1 mL tekućeg LB medija te je takva suspenzija prebačena u sterilnu epruvetu i inkubirana u termobloku sat vremena na 37 °C uz miješanje na rotacijskoj platformi pri 300 rpm. Na krutu hranjivu podlogu LB/Amp nacijspljeno je 200-300  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije kako bi se selektirale bakterijske stanice koje su primile plazmid.

Kemijska transformacija je metoda koja omogućuje unos strane DNA u bakterijske stanice, a posredovana je s  $\text{CaCl}_2$  i temperaturnim šokom pri povišenoj temperaturi od 42 °C. Temperaturni šok rezultira stvaranjem pora na membranama bakterijskih stanica, dok ioni kalcija neutraliziraju naboje na membranama. Neutralizacijom naboja membrane smanjuje se elektrostatsko odbijanje između negativno nabijene molekule DNA i membrane bakterija, što olakšava ulazak strane molekule DNA u bakterijsku stanicu. Transformacija temperaturnim šokom provedena je s 45  $\mu\text{L}$  kemijski kompetentnih stanica *E. coli* soja XL10-Gold®. U stanice je prvo dodano 2  $\mu\text{L}$  2-merkaptoetanola, nakon čega su inkubirane 10 min na ledu uz povremeno miješanje. Zatim je dodano 2  $\mu\text{L}$  izolirane plazmidne DNA koncentracije  $\sim 35$  ng/ $\mu\text{L}$ , nakon čega su inkubirane 30 minuta na ledu. Stanice su nakon inkubacije izložene temperaturnom šoku na 42 °C u trajanju od 30 sekundi, a potom su relaksirane dvije minute na ledu. Oporavak stanica postignut je dodavanjem 1 mL tekućeg LB medija (prethodno zagrijanog na 42 °C) te inkubacijom dobivene suspenzije u termobloku 60 minuta na 37 °C uz miješanje na rotacijskoj platformi pri 300 rpm. Na krutu hranjivu podlogu LB/Amp nacijspljeno je 200-300  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije u svrhu selekcije samo bakterijskih stanica koje su primile plazmid.

### 3.3. Metode rada s DNA

#### 3.3.1. Lančana reakcija polimerazom u svrhu uvođenja ciljane mutacije

Metoda ciljane mutageneze (eng. *Site Directed Mutagenesis*, SDM) je postupak u kojem se korištenjem dizajniranih oligonukleotidnih početnica uvodi željena mutacija (supstitucija, dodavanje ili brisanje baza) u dvolančanu plazmidnu DNA. Mutacija se ugrađuje u amplikon tijekom protokola lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), zamjenjujući tako izvornu sekvencu DNA. Dizajnirane početnice s obje strane izmijenjenih nukleotida sadrže 15-20 nukleotida komplementarnih s genom u koji se uvodi mutacija kako bi se osiguralo točno mjesno specifično vezanje početnica. Mutageneza je provedena koristeći komplet *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)* prema uputama proizvođača. Početnice koje sadrže željenu mutaciju (tablica 3.1.) otopljene su u sterilnoj mili Q vodi do koncentracije 1 g dm<sup>-3</sup> i pohranjene na -20 °C do upotrebe. Sastav reakcijske smjese i tijek lančane reakcije polimerazom navedeni su u tablicama 3.2.-3.4. Korišteni PCR uređaj bio je *Biometra TGradient Thermocycler (Whatman)*.

**Tablica 3.1.** Dizajnirane početnice za uvođenje mutacija u plazmide koji nose gene za protein ScaR ili SloR

Mutacija	Početnica	Nukleotidni slijed
ScaR R157A	Nizvodna:	5'-cgaaggattatcatggac <b>agcggcc</b> agtataatcgcc-3'
	Uzvodna:	5'-ggcgattatactggcc <b>gttgtccat</b> gataacttcg-3'
ScaR Y211A	Nizvodna:	5'-ccttaaatctttctac <b>agcaatctgttggcaatagttggctag</b> -3'
	Uzvodna:	5'-ctagccccacccattgcccaacagatt <b>gtgttagaaaagatttaagg</b> -3'
SloR E14A E17A	Nizvodna:	5'-gctgatcttctcatcacgt <b>gcactgagtgcataaataatttaaggt</b> aatc-3'
	Uzvodna:	5'-gattacctaaaattttat <b>gcactcagtgcacgtatgagaagatcgc</b> -3'

**Tablica 3.2.** Sastav reakcijske otopine za ciljanu mutagenezu proteina ScaR

Komponenta otopine	Radna koncentracija	V / $\mu\text{L}$
RB buffer	10x	5
Kalup: <i>pET-21b(+) ScaR</i>	35 ng $\mu\text{L}^{-1}$	1
Nizvodna početnica <sup>a</sup>	125 ng $\mu\text{L}^{-1}$	0,80-1,01
Uzvodna početnica <sup>a</sup>	125 ng $\mu\text{L}^{-1}$	0,80-1,01
<i>Quick Solution</i>		3
Smjesa QuickChange XL		1
dNTP		
<i>PfuUltra</i> DNA polimeraza	2,5 j $\mu\text{L}^{-1}$	1
Mili Q voda		37,89-38,20
$\Sigma$		50

<sup>a</sup>volumen ovisi o veličini početnice te je izračunat prema uputama proizvođača

**Tablica 3.3.** Sastav reakcijske otopine za ciljanu mutagenezu proteina SloR

Komponenta otopine	Radna koncentracija	V / $\mu\text{L}$
RB buffer	10x	5
Kalup: <i>pET-21b(+) SloR</i>	35 ng $\mu\text{L}^{-1}$	1
Nizvodna početnica <sup>a</sup>	125 ng $\mu\text{L}^{-1}$	0,794
Uzvodna početnica <sup>a</sup>	125 ng $\mu\text{L}^{-1}$	0,791
<i>Quick Solution</i>		3
Smjesa QuickChange XL		1
dNTP		
<i>Pfu</i> polimeraza	2,5 j $\mu\text{L}^{-1}$	1
Mili Q voda		37,415
$\Sigma$		50

<sup>a</sup>volumen ovisi o veličini početnice te je izračunat prema uputama proizvođača

**Tablica 3.4.** Reakcijska shema i uvjeti lančane reakcije polimerazom

Korak reakcije	Broj ciklusa	$\vartheta / ^\circ\text{C}$	$t / \text{s}$
Inicijalna denaturacija	1	95	60
Denaturacija	18	95	50
Prianjanje početnica	18	53	50
Elongacija	18	72	354
Završna elongacija	1	72	120
Hlađenje sustava	1	0	120

U dobivene PCR produkte dodano je po 1  $\mu\text{L}$  endonukleaze *DpnI* (*Agilent Technologies*) koja se koristi za cijepanje početnog metiliranog kalupa DNA i selekcije samo novosintetizirane mutirane plazmidne DNA. Suspenzija plazmida i endonukleaze *DpnI* inkubirana je 1 sat na  $37^\circ\text{C}$  u uređaju za PCR te je zatim stavljena na hlađenje 2 min na  $0^\circ\text{C}$ .

Bakterijske stanice XL10-Gold® su zatim transformirane *DpnI*-tretiranom smjesom plazmida metodom kemijske transformacije, te nasadene na krutu hranjivu podlogu s antibiotikom ampicilinom. Po dvije kolonije naraslih bakterijskih stanica nacijsjepljene su u tekući LB/Amp medij u svrhu umnažanja i izolacije ciljanog plazmida. Izolacija plazmida napravljena je pomoću kompleta za izolaciju plazmidne DNA - ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (*Zymo Research*) prema uputama proizvođača. Komercijalni komplet se bazira na klasičnoj metodi alkalne lize. Genomska DNA, proteini i fragmenti stanične membrane uklanjaju se iz staničnog lizata, dok se plazmidna DNA veže i dodatno pročišćava na priloženoj koloni.

Koncentracija izolirane plazmidne DNA određena je spektrofotometrijski na uređaju *BioDrop μLite<sup>+</sup> Microvolume Spectrophotometer* pri valnoj duljini od 260 nm te su uzorci poslani na servisno sekvenciranje u tvrtku *Macrogen*, Nizozemska, kako bi se provjerila prisutnost željenih mutacija. U slučaju dvostrukog mutanta, SloR R157A-Y211A, mutacije su uvođene jedna po jedna tj. plazmid koji nosi gen SloR-Y211A, korišten je kao kalup za uvođenje sljedeće mutacije R157A.

### 3.4. Metode rada s proteinima

#### 3.4.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Prekomjerna ekspresija proteina SloR i ScaR napravljena je u elektrokompetentnim bakterijskim stanicama *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Transformacija bakterija plazmidnim konstruktima pET45-b(+), koji sadrže gen za SloR ili ScaR, provedena je metodom elektrotransformacije kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Transformirane bakterijske stanice nasađene su na LB ploče koje sadrže antibiotik ampicilin. Za pročišćavanje proteina u preparativnim količinama, prvo je pripremljeno po 10-30 mL predkulture prebacivanjem jedne bakterijske kolonije vrhom sterilne eze u tekući LB medij koji sadrži ampicilin i inkubacijom na 37 °C uz miješanje pri brzini od 220 rpm preko noći. Sljedećeg dana LB/Amp tekuća hranjiva podloga nacijepljena je predkulturom u omjeru 1:50. Nacijepljene stanice inkubirane su na temperaturi od 37 °C uz miješanje pri brzini od 140 rpm. Prirast stanica praćen je spektrofotometrijski, mjeranjem optičke gustoće medija pri valnoj duljini od 600 nm (eng. *Optical density*, OD600). Nakon što je OD600 dosegla vrijednost između 0,5-0,6 zaustavljen je uzgoj stanica te je započeta prekomjerna ekspresija proteina dodavanjem IPTG-a do konačne koncentracije 0,5 mmol dm<sup>-3</sup>. Ekspresija je provedena preko noći pri temperaturi od 18 °C uz miješanje pri brzini od 50 rpm. Nakon završetka ekspresije, kultura stanica centrifugirana je 20 min na 4500 × g pri 4 °C. Talog stanica pohranjen je na –20 °C.

#### 3.4.2. Priprema uzorka proteinskog ekstrakta za izolaciju prekomjerno eksprimiranih proteina metodom afinitetne kromatografije

Prethodno smrznuti talog stanica izvagan je i resuspendiran u hladnom puferu A (10 mL po 1 g taloga stanica) sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 10 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol, 5 % glicerol, pH = 8,0. Razaranje bakterijskih stanica i oslobađanje proteina u suspenziju napravljeno je pomoću visokotlačnog homogenizatora Avestin Emulsiflex C3. Prije homogenizacije dodan je inhibitor proteaza PMSF (do konačne koncentracije od 0,1 mmol dm<sup>-3</sup>). Homogenizacija je provedena na hladnom pri pulsirajućem tlaku od 1500 bar.

U ovako obrađen stanični lizat dodan je streptomycin sulfat do konačne koncentracije 1% [w/v] te je suspenzija nakon 10 min stajanja na ledu centrifugirana 45 min na 15 000 × g pri 4

°C. Dobiveni supernatant je čuvan na ledu do pročišćavanja proteina (opisano u idućem poglavlju 3.4.3.).

### 3.4.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi

Afinitetna kromatografija je metoda izolacije proteina iz proteinskog ekstrakta koja se temelji na njegovoj reverzibilnoj interakciji sa specifičnim ligandom imobiliziranim na čestice kromatografskog punila. Uzorak proteina prolazi kroz kolonu koja sadrži ligand koji specifično veže ciljnu molekulu. Nakon vezanja, ostale molekule se ispiru, a ciljana molekula se zatim elucijom odvaja od liganda.

Geni za proteine SloR i ScaR klonirani su u vektor pET-45b(+) na način da se prilikom njihove ekspresije stvara rekombinantni protein s privjeskom od šest histidina na N-kraju proteina. S obzirom da protein sadrži histidinski privjesak, u prvom koraku pročišćavanja korištena je metoda afinitetne kromatografije s Ni – NTA agarozom. Elucija željenog proteina postiže se ispiranjem puferom visoke koncentracije imidazola, budući da kompetitivnim vezanjem imidazola na ione Ni(II) dolazi do otpuštanja vezanog proteina.

Filtrirani supernatant je inkubiran 1 h s 3 mL Ni-NTA agaroze na 4 °C uz stalno miješanje. Ni-NTA agara je prethodno isprana redestiliranim vodom mQ i uravnotežena u hladnom puferu A sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer, 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 10 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol, 5 % glicerol, pH = 8,0. Inkubacijska smjesa prebačena je u plastičnu kolonu koja je zatim spojena na pumpu s konstantnim protokom 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Nakon što je nanesena cijela inkubacijska smjesa, kolona je isprana u dva koraka s 12 mL pufera A i 12 mL pufera B, sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer, 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 20 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol, 5 % glicerol, pH = 8,0, kako bi se uklonili nespecifično vezani proteini. Elucija vezanih proteina postignuta je ispiranjem kolone s 12 mL pufera C, sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer, 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 500 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol, 5 % glicerol, pH = 8,0. Svi ispiri i eluat sakupljani su plastičnim epruvetama ohlađenim na ledu. Eluat je stavljen na dijalizu kako je opisano u idućem poglavlju (3.4.4.). Tijek pročišćavanja provjeren je na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a (opisano u poglavlju 3.5.2.).

#### 3.4.4. Cijepanje histidinskog privjeska te izmjena pufera dijalizom

Budući da je N-terminalni dio proteina SloR i ScaR bitan za pravilnu koordinaciju iona metala u primarnom veznom mjestu, proteinski uzorak podvrgnut je dijalizi u prisustvu proteaze HRV-3C koja cijepa specifičnu proteinsku sekvencu (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-↓Gly-Pro) umetnutu između histidinskog privjeska i istraživanog proteina. Proteinski uzorak prebačen je u crijevo za dijalizu Spectra/Por® s gornjom granicom prolaska molekula 10-12 kDa te je u uzorak dodana proteaza HRV-3C u omjeru 1:30 ([v/v] μmol). Crijevo je stavljeno u 1 L hladnog pufera za cijepanje histidinskog privjeska sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES, 150 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA, 1 mmol dm<sup>-3</sup> 2-merkaptoetanol, 10% glycerol, pH = 7,5, uz stalno miješanje. Nakon 1 h dijalize, uzorak je prebačen u svježi pufer istog sastava i stavljen na dijalizu preko noći pri 4 °C i uz stalno miješanje. Nakon izmjene pufera, proteinski uzorci su po potrebi koncentrirani u centrifugalnim sistemima *Amicon Ultra-15* s gornjom granicom prolaska molekula 10 000 Da. Koncentriravanje je provedeno prema uputama proizvođača na 4 °C.

#### 3.4.5. Gel-filtracijska kromatografija

Nakon afinitetne kromatografije i cijepanja histidinskog privjeska, izolirani su proteini dalje pročišćeni kromatografskom metodom gel-filtracije. Gel-filtracijska kromatografija je tehnika koja se koristi za razdvajanje molekula na temelju njihove veličine i oblika. Kolona je ispunjena poroznim materijalom, obično gelom, koji ima određeni raspon veličine pora. Kada se uzorak nanese na vrh kolone, molekule različitih veličina prolaze kroz kolonu različitim brzinama. Veće molekule ne mogu ući u pore gela i stoga prolaze kroz kolonu brže, dok manje molekule ulaze u pore i zadržavaju se duže unutar kolone.

Prije nego što je nanesen na sustav za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti Äkta Pure (*GE Healthcare*), uzorak je centrifugiran 10 min pri 10000 × g i 4 °C kako bi se izbjeglo nanošenje nečistoća i proteinskih agregata koji bi mogli oštetiti kolonu. Pročišćavanje proteina gel-filtracijom provedeno je na kromatografskoj koloni HiLoad Superdex 75pg 16/600 za volumene do 5 mL. Prije nanošenja uzorka proteina volumena 2 mL kolona je isprana miliQ vodom i uravnotežena puferom za gel-filtraciju sastava: 25 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES, 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA, glicerol 10 % [v/v] i pH = 8.0. Gel-filtracija proteinskog uzorka provedena je na 4 °C uz konstantan protok 1 mL min<sup>-1</sup>. Tijek pročišćavanja praćen je

spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 280 nm, a volumen svake sakupljene frakcije iznosio je dva mililitra. Čistoća frakcija provjerena je na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a (opisano u poglavlju 3.5.2.). Prema dobivenim kromatogramima proteina te rezultatima SDS-PAGE elektroforeze odabrane su frakcije s najvećom količinom čistog proteina.

Odarbane frakcije proteina su sjedinjene te su koncentrirane u centrifugalnim sistemima *Amicon Ultra – 15* s gornjom granicom prolaska molekula 10 000 Da. Koncentriravanje je provedeno prema uputama proizvođača na 4 °C. Proteinski uzorak je zatim preveden u pufer za analizu sastava: 25 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES, 100 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl pH = 8,0. Za prevođenje u pufer za analizu, uzorak je prebačen u posudu za dijalizu *Tube-O-Dialyzer Medi* s gornjom granicom prolaska molekula 8 000 Da. Dijaliza tj. prevođenje u drugi pufer postavljeno je preko noći u 1 L pufera za analizu pri 4 °C i uz stalno miješanje. U posudu s puferom dodano je 10 g *Chelex* 100 smole (*BioRad*), koja služi kao kelator polivalentnih iona teških metala. Prema potrebi, uzorak za analizu je ukoncentriran.

## 3.5. Biokemijske i biofizičke metode za karakterizaciju pročišćenih proteina ScaR i SloR

### 3.5.1. Određivanje koncentracije proteina na spektrofotometru

Za određivanje koncentracije proteina korištena je metoda koja se temelji na teorijskom izračunu ekstinkcijskog koeficijenta proteina. Teorijska vrijednost ekstinkcijskog koeficijenta proteina SloR i ScaR izračunata je pomoću alata *ProtParam*<sup>62</sup> korištenjem primarnog slijeda aminokiselina (tablica 3.5.). Proteinskom uzorku volumena 1 do 2 µL mjerena je apsorbancija zračenja pri valnoj duljini od 280 nm na uređaju *BioDrop µLite<sup>+</sup> Microvolume Spectrophotometer*. Prije mjeranja proteinskog uzorka, izmjerena je apsorbancija slijepe probe (pufer bez proteina ili mQ voda) koja je u mjeranjima oduzeta od ukupne apsorbancije proteinskog uzorka.

**Tablica 3.5.** Teorijske vrijednosti ekstinkcijskog koeficijenta proteina izračunate pomoću alata *ProtParam*.

Protein	Sustav	Maseni ekstinkcijski koeficijent ( $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
SloR	s His privjeskom	0,716
	nakon odcjepljenja	0,768
	His privjeska	
ScaR	s His privjeskom	0,612
	nakon odcjepljenja	0,657
	His privjeska	

### 3.5.2. Provjera čistoće uzorka proteina metodom diskontinuirane denaturirajuće poliakrilamidne gel-elektroforeza u prisustvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Za praćenje tijeka pročišćavanja proteina i analizu čistoće proteinskih uzoraka korištena je metoda diskontinuirane SDS-poliakrilamidne elektroforeze (SDS-PAGE) u kojoj se u proteinske uzorke dodaje detergent natrij-dodecilsulfat (SDS) i reduksijsko sredstvo. SDS i reduksijsko sredstvo eliminiraju utjecaj strukture i naboja proteina te osiguravaju da se razlika u pokretljivosti proteina temelji isključivo na veličini proteina tj. dužini polipeptidnog lanca.

Metoda vertikalne SDS-PAGE elektroforeze napravljena je na uređaju Mini-PROTEAN Tetra Cell (*Bio Rad*) prema uputama proizvođača. Za izvođenje SDS-PAGE pripremljeni su 12,5 % [w/v] poliakrilamidni gelovi koji se sastoje od dvije komponente: sabijajuće komponente gela (eng. *stacking gel*) i razdvajajuće komponente gela (eng. *separating gel*). Sastav korištenog gela za razdvajanje je: akrilamid-bisakrilamid u omjeru 29:1 12,5 % [w/v], 0,375 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH = 8,8, SDS 0,1 % [w/v], 0,007 g dm<sup>-3</sup> APS i TEMED 0,05 % [w/v]. Komponenta gela za sabijanje sastoji se od 4 % [w/v] akrilamid-bisakrilamid u omjeru 29:1, 0,125 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH = 6,8, SDS 0,1 % [w/v], 0,007 g dm<sup>-3</sup> APS i TEMED 0,05 % [w/v]. Proteinski uzorci su pripremljeni dodavanjem 5 × SDS pufera za nanošenje na gel sastava: 0,25 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH = 6,8, β-merkaptoetanol 5% [v/v], glicerol 50 % [v/v], SDS 10 % [w/v], bromfenolno plavilo 0,01 % [w/v], nakon čega su zagrijani 10 min na 98 °C. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi u SDS puferu sastava: 14,4 g dm<sup>-3</sup> glicin, 3,03 g dm<sup>-3</sup> Tris pH = 8,3, SDS 0,1 % [w/v]. Prvih 15 min, elektroforeza je provedena pri 120 V s ciljem sabijanja uzorka proteina, a zatim je idućih 45 min napon stavljen na 180 V s ciljem

razdvajanja proteina. Nakon elektroforeze gelovi su bojani 15 min uz lagano ljuštanje u otopini sastava: 1 g dm<sup>-3</sup> Coomassie Brilliant Blue R-250, metanol 30 % [v/v] i octena kiselina 10 % [v/v]. Višak boje je uklonjen kuhajući gel u kipućoj destiliranoj vodi cca. 15 minuta.

### 3.5.3. Provjera očuvanosti sekundarne strukture metodom cirkularnog dikroizma

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda u kojoj se mjeri razlika u apsorpciji između lijevo i desno cirkularno polariziranog i monokromiranog elektromagnetskog zračenja. Na temelju dobivenih CD spektara moguće je izračunati udio određenih konformacijskih motiva u proteinu.<sup>63</sup> CD je korišten u svrhu usporedbe sekundarne strukture proteina SloR i ScaR u prisustvu i odsutnosti iona Mn(II) te u svrhu usporedbe struktura divljeg tipa i mutanata istih proteina. Spektri CD snimljeni su na spektropolarimetru JASCO J-815 koristeći kvarcnu „sendvič“ kivetu s optičkim putem 0,01 cm. Postavke snimanja bile su: razlučivanje 0,2, širina puta zrake 1,0 nm, vrijeme mjerena u jednoj točki 1 sekunda te brzina snimanja 200 nm min<sup>-1</sup>. Snimanje spektara napravljeno je pri sobnoj temperaturi, a uzorci su prije snimanja razrijeđeni do koncentracije 20 nM u puferu za analizu sastava: 20 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES, 100 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, pH = 8,0. Konačni spektar bio je rezultat uprosječivanja tri snimanja u rasponu valne duljine 190-300 nm. Za analizu CD spektara i određivanje sekundarne strukture proteina korišten je mrežno dostupni program *BeStSel* (Beta Structure Selection)<sup>64</sup>.

### 3.5.4. Provjera stabilnosti proteina metodom razlikovne pretražne kalorimetrije

Razlikovna pretražna kalorimetrija (eng. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) je metoda koja se koristi za proučavanje stabilnosti proteina i toplinskih efekata povezanih s procesom smatanja proteina. Mjeranjem topline povezane s termalnom denaturacijom proteina, metoda DSC daje nam uvid u termodinamička svojstva proteina.<sup>65</sup> U ovom istraživanju, metoda DSC korištena je za provjeru promjene stabilnosti proteina SloR i ScaR prilikom vezanja iona Mn(II) te uvođenja dvostrukih mutacija.

Mjerena DSC izvedena su na razlikovnom pretražnom kalorimetru Nano DSC (*TA Instruments*) u čelijama volumena 300 µL. Temperaturni raspon mjerena bio je 20-110 °C sa stopom zagrijavanja 1 °C/min pri tlaku od 6 bara. Korak ekvilibracije trajao je 1 min. Za mjerena su korišteni uzorci proteina koji su se nalazili u puferu za analizu (20 mmol dm<sup>-3</sup>

HEPES pufer pH = 8,0 koji sadrži 100 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl). Iz uzoraka i samog pufera prije mjerena je uklonjen zrak pri sniženom tlaku od 0,64 bara u trajanju od 10 min. Bazna linija za mjerena dobivena je mjeranjem pufera u odnosu na pufer. Za mjerena DSC uzorka proteina, referentna ćelija napunjena je puferom za analizu dok je ćelija uzorka sadržavala otopinu proteina ( $\gamma = 1 \text{ g dm}^{-3}$ ). Podaci su obrađeni pomoću softverskog paketa *NanoAnalyze Data Analysis* (verzija 3.11.0).

### 3.5.5. Određivanje stehiometrije vezanja Mn(II) za proteine metodom izotermne titracijske kalorimetrije

Metoda izotermne titracijske kalorimetrije (eng. *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) korištena je za istraživanje interakcije vezanja iona Mn(II) na divlji tip proteina SloR i ScaR. ITC je osjetljiva fizikalna metoda koja se koristi za određivanje termodinamičkih parametara povezanih s biomolekularnim interakcijama u otopini. Tijekom izvođenja eksperimenta direktno se mjeri promjena topline prilikom svakog dodavanja alikvota titranta (ioni Mn(II)) u otopinu titranda (divlji tip proteina SloR i ScaR), u određenim vremenskim razmacima. Dobiveni eksperimentalni podaci se prilagođavaju (eng. *fit*) određenom matematičkom modelu iz čega se dobiju podaci o standardnoj reakcijskoj entalpiji ( $\Delta_r H^\circ$ ), standardnoj konstanti disocijacije  $K_a^\circ$  te stehiometrijskom omjeru vezanja ( $N$ ). Prema izazu 3.1., se iz prije navedenih podataka računa standardna Gibbsova energija  $\Delta_r G^\circ$  i standardna reakcijska entropija  $\Delta_r S^\circ$ .

$$\Delta G = \Delta H_0 - T\Delta S_0 = -R T \ln K_a \quad (3.1.)$$

Pri čemu je  $R = 8,31446 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$  (plinska konstanta),  $T$  temperatura u Kelvinima, a  $K_a$  konstanta asocijacije dobivena direktno iz eksperimentalnih mjerena.  $K_a$  se također definira kao recipročna vrijednosti konstante disocijacije ( $K_d$ ).

Mjerenja ITC provedena su na izotermalnom titracijskom kalorimetru (*MicroCal VP-ITC*) pri 25 °C. Za prikupljanje i obradu podataka korišten je softver Origin 7.0<sup>66</sup>. Kalorimetar je električki kalibriran. Volumen kalorimetrijske ćelije bio je 1,449 mL, dok je ukupni volumen birete bio 0,3 mL. ITC titracije provedene su postupnim dodavanjem 1,88 mmol dm<sup>-3</sup> otopine MnCl<sub>2</sub> pripremljene u puferu za analizu (20 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES pufer pH = 8,0 koji sadrži 100 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl) u 0,1 mmol dm<sup>-3</sup> otopinu proteina pripremljenu u istom puferu. Vrijeme

između dodavanja titranta postavljeno je na 500 s, a otopina titranda je stalno miješana. Izmjerene su topline razrjeđivanja samog titranta (iona Mn(II)) koje su zatim oduzete od toplinskih signala izmjerenih u eksperimentu titracije. Ovisnost izmjerene promjene entalpije o dodanom volumenu titranta obrađena je nelinearnim modelom metodom najmanjih kvadrata.

### *3.5.6. Određivanje stehiometrije vezanja Mn(II) za proteine metodom elektronske paramagnetske rezonancije*

Elektronska spinska rezonancija (ESR), također poznata kao i elektronska paramagnetska rezonancija (EPR), je spektroskopska metoda koja se koristi za proučavanje atoma, iona, molekula ili molekularnih fragmenata koji imaju neparan broj elektrona. Elektron ima spin uslijed kojeg dolazi do pojave magnetskog momenta. Iz tog razloga tvari s nesparenim brojem elektrona pokazuju karakteristična magnetska svojstva. Izlaganjem takvog uzorka mikrovalovima u prisutnosti jakog magnetnog polja, nespareni elektroni apsorbiraju mikrovalno zračenje što rezultira prijelazom između različitih razina energije. Mjerenja EPR napravljena su sa svrhom određivanja stehiometrije vezanja iona Mn(II) na proteine SloR i ScaR.

Mjerenja metodom EPR napravljena su na spektrometru X-band Bruker EMX. Spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi korištenjem mikrovalne snage od 2 mW, amplitude modulacije od 0,5 mT i frekvencije modulacije od 100 kHz. Snimanje je ponovljeno 10 puta za smanjenje šuma. Otopine proteina i iona Mn(II) mjerene su u staklenim kapilarama od 75  $\mu\text{L}$  umetnutim u kvarcnu cijev od 4 mm.

### *3.5.7. Određivanje sposobnosti vezanja proteina na DNA metodom fluorescencijske anizotropije*

Mjerenja FA provedena su pri 25 °C na spektrofluorimetru FS5 (*Edinburgh Instruments*) s temperaturno kontroliranim držačem SC-25. Sekvence DNA (tablica 3.6.) koje su korištene za FA testove naručene su iz tvrtke *Macrogen Europe* s fluorescentnim privjeskom 5'-6-karboksifluorescein (FAM). FAM postiže maksimalnu ekscitaciju pri valnoj duljini od 496 nm, te maksimalnu emisiju pri valnoj duljini od 520 nm.

**Tablica 3.6.** Oligonukleotidne DNA sekvence korištene u testovima vezanja proteina na DNA metodom fluorescencijske anizotropije.

Nukleotidni slijed	naziv
5'-CAAAATTAACCTGACTTAATTGG-3'	<i>ScaC*</i> , <i>SloB**</i>
5'-CGGAATTAATTACATCTAATATAG-3'	<i>SloA**</i>

\*vezno mjesto I u promotoru *scaC*<sup>3</sup>

\*\**SloA* označava sekvencu veznog mjesta I, a *SloB* sekvencu veznog mjesta II u promotoru *sloABC*<sup>67</sup>

Iz tog razloga, mjerena FA prikupljena su s valnom duljinom ekscitacije od 496 nm ( $\pm 8$  nm) te valnom duljinom emisije od 520 nm ( $\pm 0,8$  nm) i vremenom zadržavanja od 0,2 s. Pripremljena su po dva tipa otopina proteina: otopina proteina u puferu te otopina proteina i iona Mn(II) u puferu. Otopine divlje tipa proteina SloR i ScaR koncentracije  $\sim 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$  pripremljene su u puferu za analizu sastava 20 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES pH = 8,0 koji sadrži 100 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl dok su otopine mutanata proteina SloR E14A-E17A i ScaR R157A-Y211A, iste koncentracije, pripremljene u puferu sastava 20 mmol dm<sup>-3</sup> HEPES pH = 8,0 koji sadrži 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA te glicerola 10 % [v/v]. Finalna koncentracija iona Mn(II) u otopinama bila je 700  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Otopine proteina postepeno su titrirane u 2 mL otopine FAM obilježene DNA koncentracije 0,1  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  pripremljene u istom puferu kao i proteini. Titracije su provedene pri 25 °C, a anizotropija je izmjerena nakon inkubacijskog perioda od 2 minute. Faktor rešetke, G, za sva mjerena iznosio je  $1,444 \pm 0,025$ .

Dobiveni rezultati mjerena obrađeni su u programskom paketu R. Očekivana stehiometrija vezanja proteina i DNA bila je 1:1 te su podaci prilagođeni (eng. *fit*) nelinearnom modelu prema izrazu 3.2:

$$r = (r_{max} - r_{min}) \left( \frac{[P]}{[P] + K_d} \right) + r_{min} \quad (3.2.)$$

gdje je  $r$  izmjerena anizotropija, dok su  $r_{min}$  i  $r_{max}$  vrijednosti anizotropije nevezane i potpuno vezane DNA.  $P$  je koncentracija proteina, a  $K_d$  konstanta disocijacije proteina od DNA. Jednadžba 3.2. opisuje jednostavni 1:1 model interakcije između dimera proteina i

oligonukleotidne DNA, gdje je koncentracija DNA najmanje 10 puta manja od izmjerene konstante disocijacije.

### 3.5.8. Određivanje sposobnosti vezanja proteina na DNA testom pomaka elektroforetske pokretljivosti

Test pomaka elektroforetske pokretljivosti (eng. *Electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) je metoda nativne elektroforeze koja je korištena u svrhu provjere sposobnosti vezanja proteina na DNA. Generalno načelo iza ove metode je da kompleksi proteina i nukleinske kiseline sporije migriraju kroz gel u usporedbi sa slobodnim fragmentima nukleinske kiseline zbog razlike u veličini i naboju. Taj „pomak“ u pokretljivosti daje nam uvid u interakcije vezanja između proteina i nukleinske kiseline.

Za izvođenje testa korišten je komercijalni gradijentni poliakrilamidni gel *Bio-Rad Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel 4-15%* te je pripremljen Tris-Boratni (TB) pufer za elektroforezu sastava  $0,445 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris,  $0,445 \text{ mol dm}^{-3}$  borna kiselina pH = 7.6. Prije nanošenja uzorka na gel, provedeno je pred-uravnoteženje gela u trajanju 45 min uz napon 100 V i pri  $4^\circ\text{C}$ . Pripremljene su reakcijske smjese volumena  $20 \mu\text{L}$  prema tablici 3.7. u puferu za vezanje sastava  $50 \text{ g dm}^{-3}$  BSA,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl,  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  DTT, glicerol 5% [v/v] i  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pufer pH = 7.6. Pripremljeni uzorci inkubirani su prije nanošenja na gel 15 min na  $4^\circ\text{C}$ .

Elektroforeza DNA u agaroznom gelu provođena je 60 minuta. Prvih 10 minuta elektroforeze provedeno je uz napon 80V i pri  $4^\circ\text{C}$ , a tijekom ostalih 50 minuta elektroforeze napon je povišen na 100 V. Nakon završetka elektroforeze, gel je uronjen u otopinu tris-acetnog pufera sastava  $40 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris i  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  octena kiselina pH = 8,0 i etidijevog bromida koncentracije  $0,0005 \text{ g dm}^{-3}$  u trajanju od oko 15 minuta. Svišak etidijevog bromida je uklonjen dvostrukim ispiranjem gela destiliranom vodom. Etidijev bromid se snažno veže na nukleinske kiseline tako što se interkalira (umeće) među parove nukleotidnih baza. Njegovo svojstvo fluorescencije pod ultraljubičastim svjetлом omogućava vizualizaciju uzorka DNA na gelu. Vizualizacija je postignuta pomoću uređaja za snimanje gelova pod UV svjetlom valne duljine 302 nm.

**Tablica 3.7.** Sastav reakcijske smjese za test pomaka elektroforetske pokretljivosti.

Uzorak	DNA (100µM)	Protein* (40mM)	Mn(II) (40mM)	5 × pufer	mQ	50 % glicerol**
DNA	0,5 µL	/	/	4 µL	15,5 µL	2 µL
DNA+Mn(II)	0,5 µL	/	2 µL	4 µL	13,5 µL	2 µL
DNA+protein	0,5 µL	4 µL	/	4 µL	11,5 µL	2 µL
DNA+protein+Mn(II)	0,5 µL	4 µL	2 µL	4 µL	9,5 µL	2 µL

\*Koncentracija proteina bila je 200- 400 µmol dm<sup>-3</sup>

\*\*dodano nakon inkubacije uzorka 15 min

### 3.6. Računalne metode

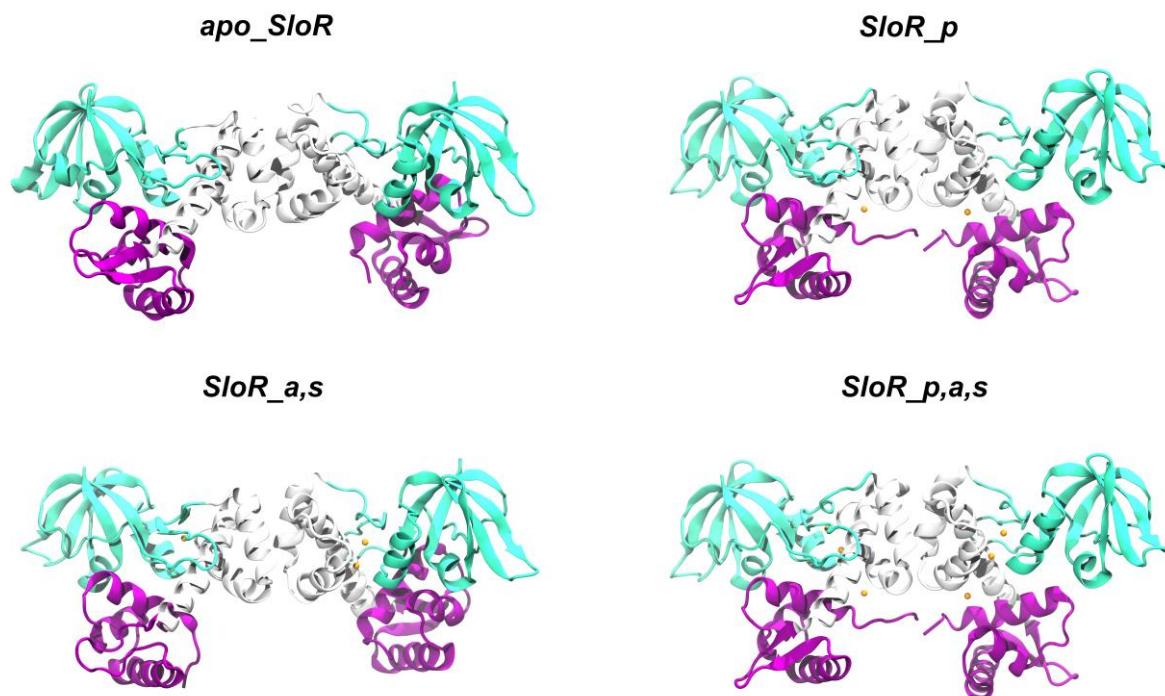
#### 3.6.1. Kompletiranje strukture proteina i DNA

Strukture bioloških makromolekula dobivene kristalografijom često nemaju koordinate vodikovih atoma, a ponekad im nedostaju i koordinate određenih aminokiselina ili čak čitavih strukturnih elemenata poput omči ili zavojnica. Iz tog razloga, prvi korak pripreme sustava za simulacije molekulske dinamike je kompletiranje strukture makromolekule što uključuje izgradnju strukturnih dijelova molekule koji nedostaju te dodavanje mreže vodikovih atoma (protoniranje).

Svi sustavi proteina SloR i ScaR pripremljeni su iz iste početne kristalne strukture preuzete iz kristalografske baze podataka proteina i nukleinskih kiselina – *Protein Data Bank* (PDB kod: 5CVI<sup>5</sup> za SloR i PDB kod: 3HRT<sup>3</sup> za ScaR). Dijelovi strukture proteina koji su nedostajali na N i/ili C-terminalnim dijelovima monomera proteina, izgrađeni su pomoću mrežno dostupnog alata SWISS\_MODEL<sup>68</sup> te programa za vizualizaciju i obradu 3D-struktura molekula Maestro<sup>69</sup>. Kod proteina ScaR nedostajale su četiri aminokiseline: Thr2-Pro3-Asn4-Lys5, dok je kod proteina SloR u jednom monomeru nedostajao: Thr2 i Lys215.

Pripravljena su četiri sustava proteina SloR i ScaR: (i) apo (bez iona Mn(II)); (ii) sustav u kojem se ioni Mn(II) nalaze u primarnom veznom mjestu (dva iona Mn(II) po homodimeru); (iii) sustav u kojem se ioni Mn(II) nalaze u pomoćnom i sekundarnom veznom mjestu (četiri iona Mn(II) po homodimeru); (iv) sustav u kojem se ioni Mn(II) nalaze u primarnom,

pomoćnom i sekundarnom veznom mjestu (šest iona Mn(II) po homodimeru) (slika 3.1). Položaj iona Mn(II) temeljio se na položaju divalentnih iona Zn(II) u kristalnoj strukturi proteina SloR (PDB kod: 5CVI). Budući da u oba proteina, SloR i ScaR, prepostavljena vezna mjesta za ione Mn(II) imaju očuvane iste aminokiseline<sup>3,26</sup>, položaji iona Mn(II) u strukturi proteina ScaR dobiveni su preklapanjem strukture proteina SloR s ionima Mn(II) sa strukturu proteina ScaR bez iona Mn(II).



**Slika 3.1.** Sustavi proteina SloR koji su pripremljeni za simulacije MD: *apo\_SloR*, *SloR\_p*, *SloR\_a,s* i *SloR\_p,a,s*. *p*, *a*, *s* su oznake ze vezna mjesta za ione Mn(II) (primarno, pomoćno i sekundarno). Domena DBD prikazana je u ljubičastoj boji, dimerizacijska domena prikazana je u bijeloj boji, domena FeoA u tirkiznoj boji. Vezani ioni Mn(II) prikazani su kao narančaste kuglice.

Za protonaciju sustava proteina korišten je mrežno dostupni program H++<sup>70</sup>. Protonacija je provedena pri pH = 7,0 što predstavlja prosječni unutarstanični pH bakterija *S. gordonii* i *S. mutans*.<sup>71</sup> Protonaciju bočnog ogranka histidina u nekim sustavima bilo je potrebno ručno provjeriti i prilagoditi da bi bila identična u oba monomera te kako bi se osigurala simetričnost homodimera.

Nadalje, na temelju palindromskih sekvenci koje proteini SloR i ScaR vežu te koje su poznate iz prijašnjih istraživanja (Tablica 3.8.) izgrađena je *in silico* 3D-struktura dvaju molekula DNA koristeći program Maestro.

**Tablica 3.8.** Sekvence DNA korištene za izgradnju 3D-struktura DNA u programu Maestro<sup>69</sup>.

Nukleotidni slijed	naziv
5'-GCAAAATTAACCTGACTTAATTATGG-3'	<i>ScaC*</i> , <i>SloB**</i>
5'-CGGAATTAATTGCATCTAATATAG-3'	<i>SloA**</i>

\*vezno mjesto I u promotoru *scaC*<sup>3</sup>

\*\**SloA* označava sekvencu veznog mjesta I, a *SloB* sekvencu veznog mjesta II u promotoru *sloABC*<sup>67</sup>

### 3.6.2. Parametrizacija metalnih centara za ione Mn(II)

Parametrizacija primarnog veznog mjesta (mononuklearno) napravljena je odvojeno od parametrizacije pomoćnog i sekundarnog veznog mjesta (binukelarno) koji su parametrizirani zajedno budući da dijele jednu aminokiselinu, Glu80. Pojam parametrizacije podrazumijeva da se pomoću kvantno-mehaničkih računa odrede vrijednosti parametara potrebnih za opisivanje interakcije iona Mn(II) s aminokiselinama u veznom mjestu proteina. U te parametre ubrajaju se duljina i kutovi (torzijski i diedarski) veza između iona Mn(II) i atoma koji koordiniraju ion Mn(II), naboј atoma i iona u veznom mjestu, itd. Za parametrizaciju veznog mjesta korišten je vezni model (eng. *bonded model*). Geometrija veznih centara za metale optimizirana je u programu Gaussian 16 rev. B.01 koristeći UB3LYP/aug-cc-pVDZ neograničeni stupanj teorije (eng. *unrestricted UB3LYP/aug-cc-pVDZ level of theory*) s Grimme-ovom empirijskom korekcijom za raspršenje (GD3). Svi računi su izvedeni u otapalu (vodi) koristeći model polarizibilnog kontinuuma (eng. *Polarizable Continuum Model - PCM*). Računi frekvencija pojedinih točaka napravljeni su na optimiziranim strukturama u Gaussianu na istom stupnju teorije. Nadalje, koristeći programske softvere VFFDT<sup>72</sup> iz računa frekvencija uzeti su parametri polja sila za duljinu veze i veličine kuteva. Naboј atoma i iona u metalnom centru određeni su prvo pomoću Merz-Singh-Kollmanove sheme<sup>73</sup> unutar programa Gaussian16, a zatim su konačne vrijednosti naboјa izračunate metodom RESP<sup>74</sup>. Parametri Lennard-Jones uzeti su iz Li/Merz parametra za ion Mn(II) u TIP3P modelu vode<sup>75</sup>. Parametri polja sila za

diedarski kut koji uključuje ione Mn(II) postavljeni su na nula, dok su prenosivi van der Waalsovi parametri za atome preuzeti iz literature.<sup>76</sup> Dobiveni parametri su potom korišteni u programu MCPB.py<sup>77</sup> za kreiranje datoteke s modificiranim parametrima polja sila (.frcmod) koja je kompatibilna s poljem sila u programskom paketu AMBER20<sup>78</sup>.

### 3.6.3. Parametrizacija sustava za račun molekulske dinamike

Nakon dobivenih struktura i parametara za metalne centre, svi sustavi su parametrizirani koristeći polje sila Amber ff14SB i modelom molekula vode TIP3P. Datoteke koje sadrže topologiju sustava dobivene su pomoću programa *t leap* unutar programskog paketa Amber20<sup>78,79</sup>. Proteini su smješteni unutar kubične kutije vode pri čemu su primijenjeni periodični rubni uvjeti. Najveća udaljenost između ruba proteina i kraja kutije vode iznosila je 20 Å, a budući da je sustav bio negativno nabijen, za neutralizaciju sustava su korišteni ioni natrija.

Nadalje, sustavi DNA parametrizirani su koristeći polje sila amber DNA *bsc 1* i model vode TIP3P. Datoteke koje sadrže topologiju sustava su također dobivene pomoću programa *t leap* unutar programskog paketa Amber20<sup>78,79</sup>. Oligonukleotidne sekvene DNA su smještene unutar kubične kutije vode pri čemu su primijenjeni periodični rubni uvjeti. Najveća udaljenost između ruba DNA i kraja kutije vode iznosila je 10 Å, a budući da je sustav bio negativno nabijen, za neutralizaciju sustava su korišteni ioni natrija. Dobivene datoteke za topologiju i parametre cijelog sustava upotrijebljene su za simulacije molekulske dinamike.

### 3.6.4. Optimizacija geometrije sustava (minimizacija energije)

Svi sustavi proteina, DNA i kompleksa protein-DNA dovedeni su u lokalni energetski minimum kroz pet ciklusa minimizacije. Svaki ciklus minimizacije imao je 1000 koraka. Prvih 200 koraka minimizacije energije izvedeno je pomoću metode najstrmijeg spusta (eng. *steepest descent*), a idućih 800 koraka je izvedeno koristeći algoritam konjugiranog gradijenta. U prvom ciklusu minimizacije svim atomima proteina i/ili DNA te ionima Mn(II) bilo je onemogućeno gibanje korištenjem harmonijskog potencijala s konstantom sile 100 kcal/(molÅ<sup>2</sup>). U drugom ciklusu minimizacije, gibanje je onemogućeno samo teškim atomima proteina i/ili DNA te ionima Mn(II) koristeći isti potencijal. U trećem i četvrtom ciklusu, gibanje atoma okosnice proteina i/ili DNA bilo je onemogućeno s time da je u trećem ciklusu korišten harmonijski

potencijal s konstantom sile  $100 \text{ kcal}/(\text{mol}\text{\AA}^2)$ , dok je u četvrtom korišten potencijal iznosa  $50 \text{ kcal}/(\text{mol}\text{\AA}^2)$ . Peti ciklus minimizacije odvijao se bez ikakvih ograničenja na gibanje atoma.

### 3.6.5. Simulacije molekulske dinamike

U sklopu ovog doktorskog rada, svi pripremljeni sustavi podvrgnuti su simulacijama uravnoteženja prije pokretanja produkcijske faze simulacija molekulske dinamike (MD).

Tijekom prvih 250 ps simulacija uravnoteženja temperatura se linearno povećavala od 0 K do 310 K, dok je temperatura od 250 ps do 300 ps održavana konstantom (kanonski *NVT* ansambl) koristeći *Langevinov*<sup>53</sup> termostat s frekvencijom sudaranja od  $3 \text{ ps}^{-1}$ . Tijekom prvih 300 ps volumen sustava održavan je konstantnim, a gibanje atoma otapala ograničeno je korištenjem harmonijskog potencijala s konstantom sile  $32 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ . Idućih 200 ps, sustav je uravnotežen pri konstantnoj temperaturi (310 K) i konstantom tlaku (1 bar) (ansambl *NPT*) koristeći *Langevinov* termostat s frekvencijom sudara od  $3 \text{ ps}^{-1}$  te *Berendsenov*<sup>52</sup> barostat s izotropnim skaliranjem tlaka. Nadalje, sustavi proteina su podvrgnuti produkcijskoj fazi simulacija molekulske dinamike minimalno 550 ns, dok je DNA podvrgнутa simulacijama minimimalno 150 ns. Produkcijska faza izvođena je u ansamblu *NPT* pri temperaturi  $T = 310 \text{ K}$  koja je održavana pomoću *Langevinov* termostat s frekvencijom sudara od  $3 \text{ ps}^{-1}$  te barostat *Monte Carlo* s izotropnim skaliranjem tlaka. U simulaciji je vremenski korak postavljen na 1 fs te je svakih 100 ps uzorkovana struktura cijelog sustava. Periodični rubni uvjeti korišteni su u sve tri dimenzije s dalekodosežnim elektrostatskim interakcijama koje su izračunate pomoću metode *Particle Mesh Ewald*.<sup>80</sup>

### 3.6.6. Analiza rezultata simulacija molekulske dinamike

Svi geometrijski parametri, kao i vodikove veze, analizirani su koristeći modul *cpptraj*<sup>81</sup> iz programskog paketa Amber20<sup>78</sup>. U svrhu analize trajektorija simulacija MD, promatrani su sljedeći geometrijski parametri: korijen srednjeg kvadrata odstupanja molekule (proteina ili DNA) od referentnog (početnog) položaja definiran izrazom 3.3. (eng. *Root Mean Square Deviation*, RMSD), te korijen srednjeg kvadrata fluktuacija pojedinih bočnih ogranačaka aminokiselina definiran izrazom 3.4. (eng. *Root Mean Square Fluctuation*, RMSF). Za računanje vrijednosti RMSD i RMSF uzeti su u obzir samo atomi okosnice proteina kako bi se izbjegle velike varijacije u vrijednostima koje su posljedica nasumičnog gibanja bočnih ogranačaka aminokiselina. Analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) napravljena je na koordinatama Cα atoma okosnice proteina posljednjih 500 ns simulacije u modulu *cpptraj*.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r_{i,A} - r_{i,B})^2}{N}} \quad (3.3.)$$

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{ij}^T (x_i(t_j) - \tilde{x}_i)^2}{T}} \quad (3.4.)$$

Za određivanje prisutnih vodikovih veza korištena je opcija *hbond* iz modula *cpptraj*, koja bilježi ostvarene vodikove veze tijekom cijele trajektorije, pri čemu se u obzir uzima udaljenost i kut između atoma donora i akceptora. U ovom radu, granične vrijednosti pri određivanju vodikovih veza su kut u rasponu od 135° do 180° te maksimalna udaljenost od 3,0 Å između atoma donora i akceptora vodikove veze. Opcija *hbond* u izlaznoj datoteci ispisuje atome koji sudjeluju u stvaranju vodikove veze, učestalost struktura tijekom simulacije u kojima se navedena veza pojavljuje, te prosječnu udaljenost i kut između atoma donora i akceptora. Program APBS (eng. *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) korišten je za analizu elekstrostatske površine proteina.<sup>82</sup> Vizualizacija trajektorija i analiza struktura napravljena je u programima VMD<sup>83</sup> i UCSF Chimera<sup>84</sup>. Izračun udaljenosti između atoma tijekom simulacija MD također

je proveden u vizualizacijskom programu VMD ili u modulu *cpptraj*. Za prikaz i uređivanje grafičkog prikaza podataka korišteni su *data.table* i *ggplot2* paketi u programu R.<sup>85,86</sup>

### 3.6.7. Priprema mutanata proteina SloR i ScaR za simulacije MD

Na temelju analize sustava proteina SloR i ScaR, odabrane su potencijalne aminokiseline koje imaju ključnu ulogu u stabilizaciji strukture proteina. Za SloR to su bile aminokiseline Glu14 i Glu17 koje pripadaju  $\alpha$ 1 zavojnici, a za ScaR to su bile aminokiseline Arg157 i Tyr211 koje pripadaju domeni FeoA. Navedene aminokiseline zamijenjene su za Ala u programu Maestro<sup>69</sup>. Dobivene strukture mutanta proteina pripremljene su i podvrgnute simulacijama MD kao što je opisano u prethodnim poglavlјima 3.6.1, 3.6.3-3.6.5..

### 3.6.8. Uklapanje proteina i DNA

Kako bi se analizirao potencijal vezanja transkripcijskih faktora SloR i ScaR s DNA, provedeni su računi molekulskog uklapanja korištenjem mrežno dostupnog poslužitelja PyDockDNA. Protein je postavljen kao receptor, dok je DNA postavljena kao ligand. Ograničenja su postavljena na bočne ogranke Lys (25, 43, 45) koji su dio DNA vezujućih zavojnica, a funkcija koja je korištena za ocjenjivanje bila je PyDockDNA (bez desolvatacije) (preporučena od autora PyDockDNA). Početne koordinate DNA sekvenci (Tablica 3.8) preuzete su iz središta prva tri najzastupljenija klastera simulacija MD DNA, dok su početne koordinate proteina preuzete iz središta najzastupljenijeg klastera tijekom 550 ns simulacija MD različitih sustava (apo i holo). Predložak odabranih sustava DNA-protein temeljen je na strukturi DNA-protein kompleksa iz homolognih proteina.<sup>28,87</sup>

Nakon odabira najboljih struktura kompleksa proteina i DNA na temelju bodova vrednovanja molekulskog uklapanja (eng. *docking score*) te vizualne analize dobivenih struktura, provedena je priprema kompleksa i računi simulacija MD kao što je objašnjeno u poglavlјima 3.6.1.-3.6.6..

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

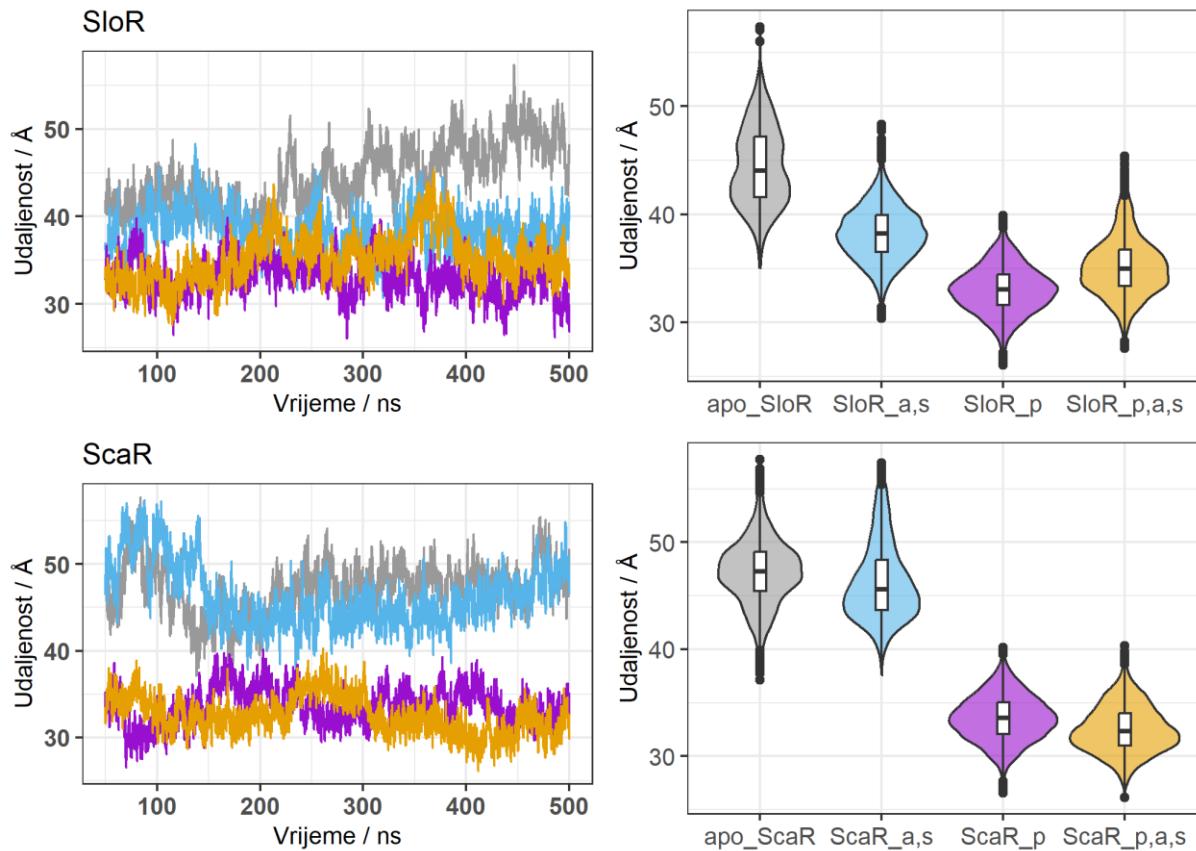
### 4.1. Strukturna i dinamička svojstva SloR i ScaR u kompleksu s ionima

#### Mn(II)

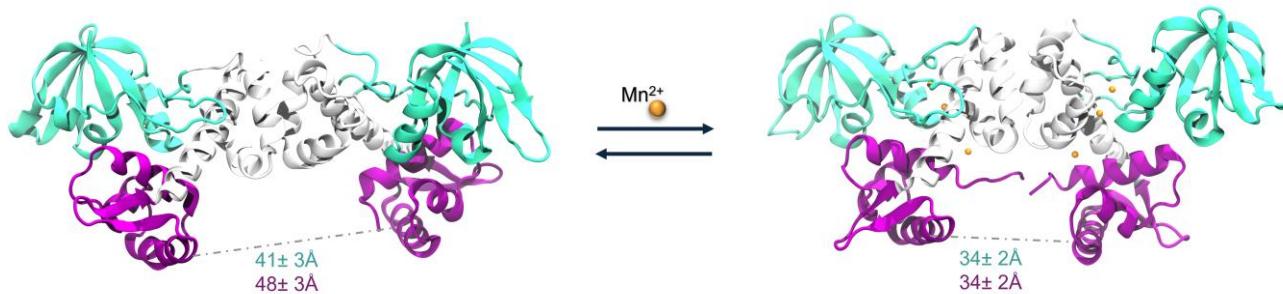
4.1.1. *Udaljenost između DNA veznih domena regulirana je vezanjem iona Mn(II) u primarno vezno mjesto*

Kako bi se istražio utjecaj vezanja iona Mn(II) na proteine SloR i ScaR pripremljene su i pokrenute simulacije MD proteina u četiri različita sustava (slika 3.1): (i) sustav bez iona Mn(II) (*apo\_SloR* i *apo\_ScaR*), (ii) sustav u kojem se ioni Mn(II) nalaze u primarnom veznom mjestu (*SloR\_p* i *ScaR\_p*), (iii) sustav u kojem se ioni Mn(II) nalaze u pomoćnom i sekundarnom veznom mjestu (*SloR\_a,s* i *ScaR\_a,s*) te (iv) sustav u kojem se ioni Mn(II) nalaze u primarnom, pomoćnom i sekundarnom veznom mjestu (*SloR\_p,a,s* i *ScaR\_p,a,s*).

Simulacije MD pokazale su da je prosječna udaljenost između DNA veznih domena (DBD, aminokiseline 1-63 u oba lanca) veća u sustavima proteina bez vezanih iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu u usporedbi s onim sustavima u kojima su ioni Mn(II) prisutni u primarnom veznom mjestu (slika 4.1). Tijekom simulacija sustava s ionima Mn(II) prisutnim u primarnom veznom mjestu, *SloR\_p* i *SloR\_p,a,s* te *ScaR\_p* i *ScaR\_p,a,s*, domene DBD približile su se jedna drugoj (slika 4.2) u odnosu na početnu strukturu sustava te je prosječna udaljenost između centra mase domena DBD za ove sustave iznosila 34 Å. Udaljenost između dva velika utora DNA također iznosi 34 Å<sup>88</sup> što sugerira da se ovi sustavi nalaze u konformaciji koja bi mogla biti povoljna za vezanje na DNA.



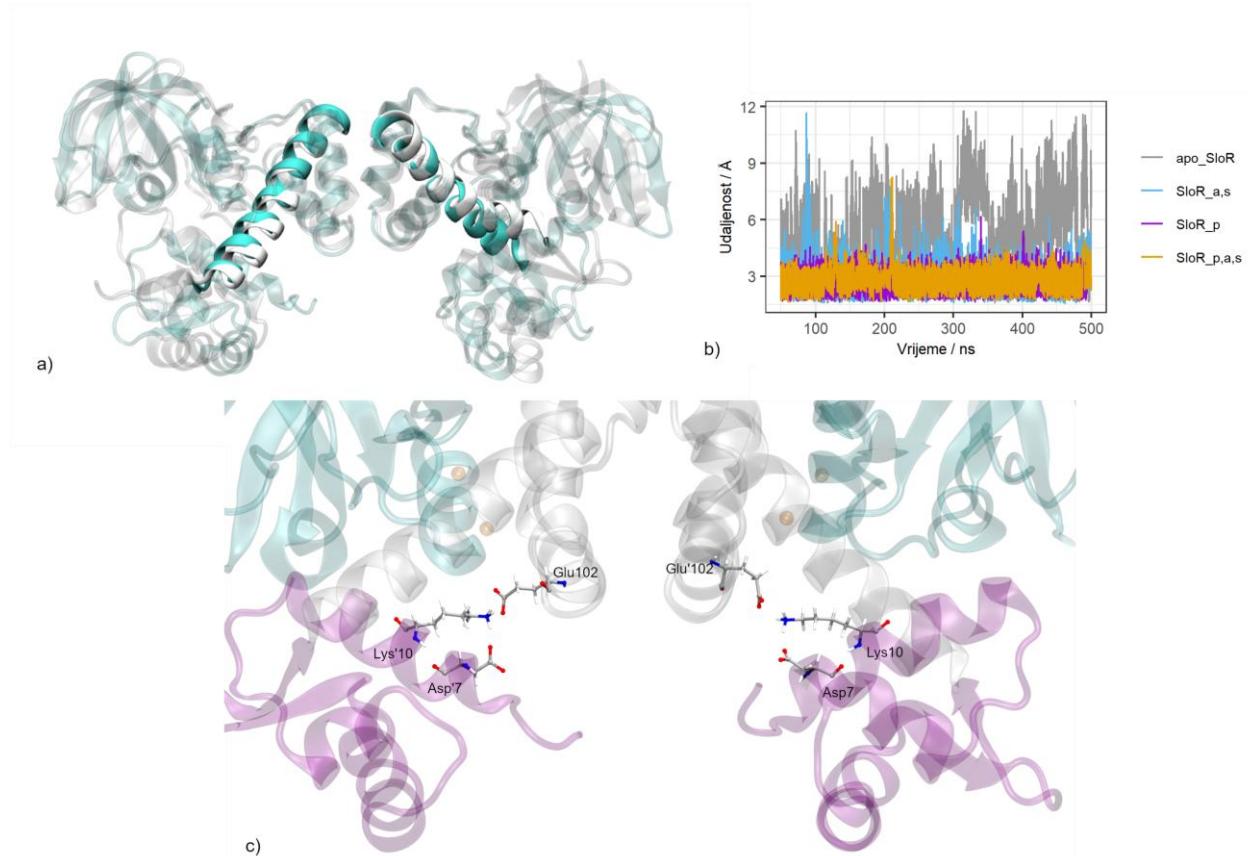
**Slika 4.1.** Udaljenost DNA veznih domena (DBD) u različitim sustavima proteina SloR i ScaR. Lijevo: Udaljenost između centra mase  $\alpha_3$  zavojnice domena DBD kroz vrijeme trajanja simulacije MD.  $\alpha_3$  zavojnica definirana je kao svi atomi između aminokiselinskih ostataka 34 i 47 za oba monomera proteina. Desno: Distribucija udaljenosti između domena DBD u simulacijama MD različitih sustava proteina SloR i ScaR.



**Slika 4.2.** Utjecaj vezanja iona Mn(II) na promjenu konformacije proteina SloR i ScaR. Prosječna udaljenost za sustave proteina ScaR označene su ljubičastom bojom dok su za sustave proteina SloR označene tirkiznom bojom.

Nadalje, suprotne rezultate pokazale su simulacije sustava u kojima nema prisutnih iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu. U ovim simulacijama se udaljenost između domena DBD povećala u usporedbi s početnom strukturuom sustava. U simulacijama sustava *apo\_ScaR* i *ScaR\_a,s* prosječna udaljenost između centra mase domena DBD bila je identična i iznosila je 48 Å, dok su udaljenosti između domena DBD u analognim SloR sustavima bile nešto drugačije. U simulacijama sustava *apo\_SloR*, prosječna udaljenost između centara mase domena DBD bila je 41 Å, dok je ista udaljenost u sustavu *SloR\_a,s* iznosila u prosjeku 38 Å. Mogući razlog za kraću udaljenost između domena DBD u sustavu *SloR\_a,s* je prisutnost iona Mn(II) u pomoćnom i sekundarnom veznom mjestu što uzrokuje blago pomicanje tzv. „linker“ zavojnice (između dimerizacijske domene i domene FeoA) i približavanje domena DBD jedne prema drugoj (slika 4.3.a). Taj mali pomak u strukturi ne mijenja među-domenske vodikove veze koje su prisutne u sustavima *apo\_SloR* i *SloR\_a,s* (poglavlje 4.1.2.), ali mijenja položaj bočnih ograna aminokiselina Asp7 i Lys10 u odnosu na ostale bočne ogranke aminokiselina u primarnom veznom mjestu (slike 4.3.b i 4.3.c). Ovaj preuređeni položaj bočnih ograna Asp7 i Lys10 mogao bi biti pogodan za pravilnu koordinaciju iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu. Uočene razlike za sustave proteina SloR u korelaciji su s ITC rezultatima (poglavlje 4.2.2.) dobivenim za oba proteina te s prethodnim studijama napravljenim na homolognim proteinima kao što su MtsR iz bakterije *Streptococcus pyogenes* te DtxR iz bakterije *Corynebacterium diphtheriae* u kojima je potvrđeno da pomoćno vezno mjesto ima neizravan učinak na vezanje iona u primarno vezno mjesto te samim time i regulaciju vezanja proteina na DNA.<sup>4,17,28</sup> Iako provedene simulacije sustava *ScaR\_a,s* nisu pokazale identično ponašanje kao

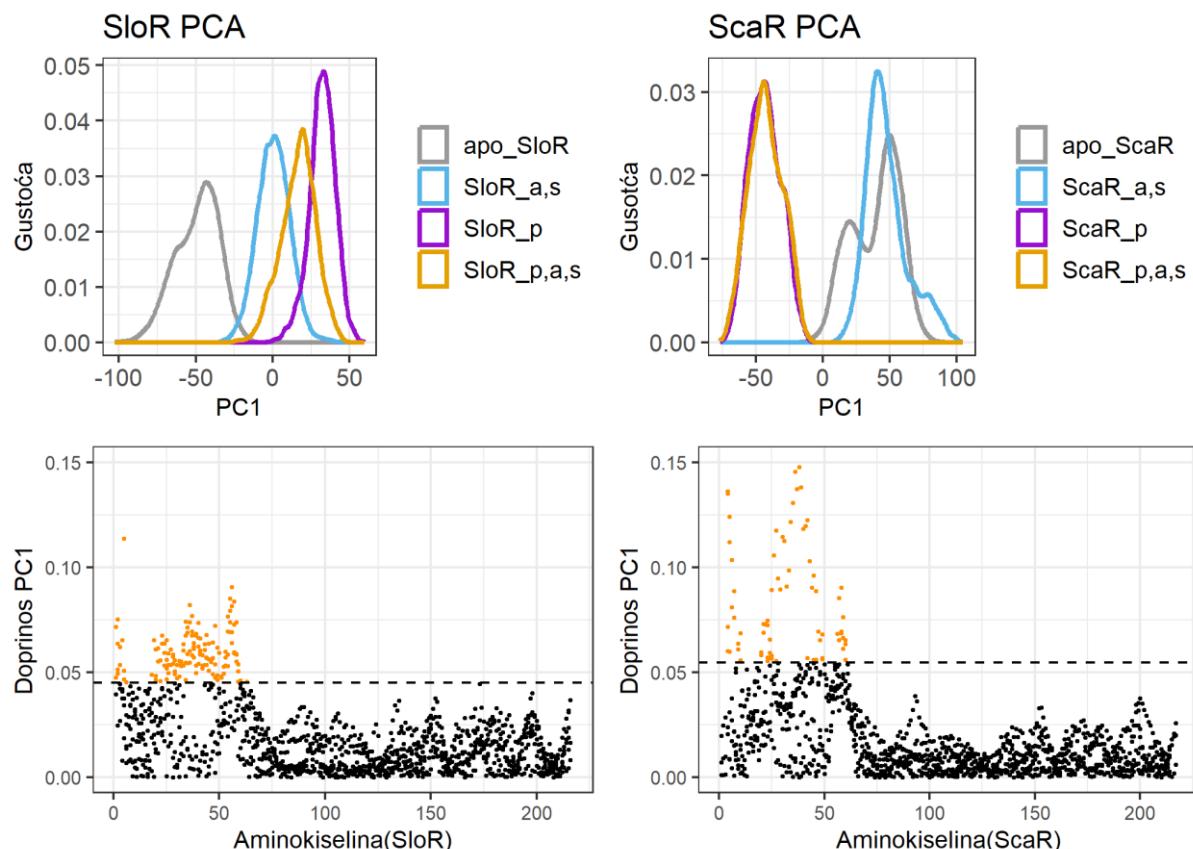
sustav *SloR<sub>a,s</sub>*, zbog dobivenih rezultata metodom ITC-a te sličnosti u strukturi proteina SloR i ScaR, može se prepostaviti da i kod proteina ScaR postoji prijelazni oblik koji nastaje vezanjem prvih iona Mn(II).



**Slika 4.3.** Pomak linker zavojnice u sustavu *SloR<sub>a,s</sub>*. a) Sustav *apo\_SloR* prikazan je bijelom bojom, dok je *SloR<sub>a,s</sub>* prikazan plavom bojom; b) razlika udaljenosti između Lys10 i Glu102 tijekom simulacija MD; c) položaj bočnih ograna aminokiselina Lys10 i Asp7 u odnosu na položaj Glu102 u sustavu *SloR<sub>a,s</sub>*. U sustavima *SloR<sub>a,s</sub>* udaljenost između Lys10 i Glu102 sličnija je udaljenosti između istih ostataka u sustavima *SloR<sub>p</sub>* i *SloR<sub>p,a,s</sub>* nego sustavu *apo\_SloR*.

Opisane razlike u ponašanju sustava tijekom simulacija MD potvrđene su analizom glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) koja je napravljena na koordinatama Cα atoma okosnice proteina posljednjih 500 ns simulacije. Za sustave proteina SloR, prva glavna komponenta (PC1) opisuje 75 % varijance u svim simulacijama, dok druga (PC2) opisuje 15 % i treća (PC3) 4 % varijance. Za sustave proteina ScaR, PC1 opisuje 92 % varijance u svim simulacijama, dok PC2 opisuje 5 % i PC3 2 % varijance. Komponenta PC1 sustava SloR

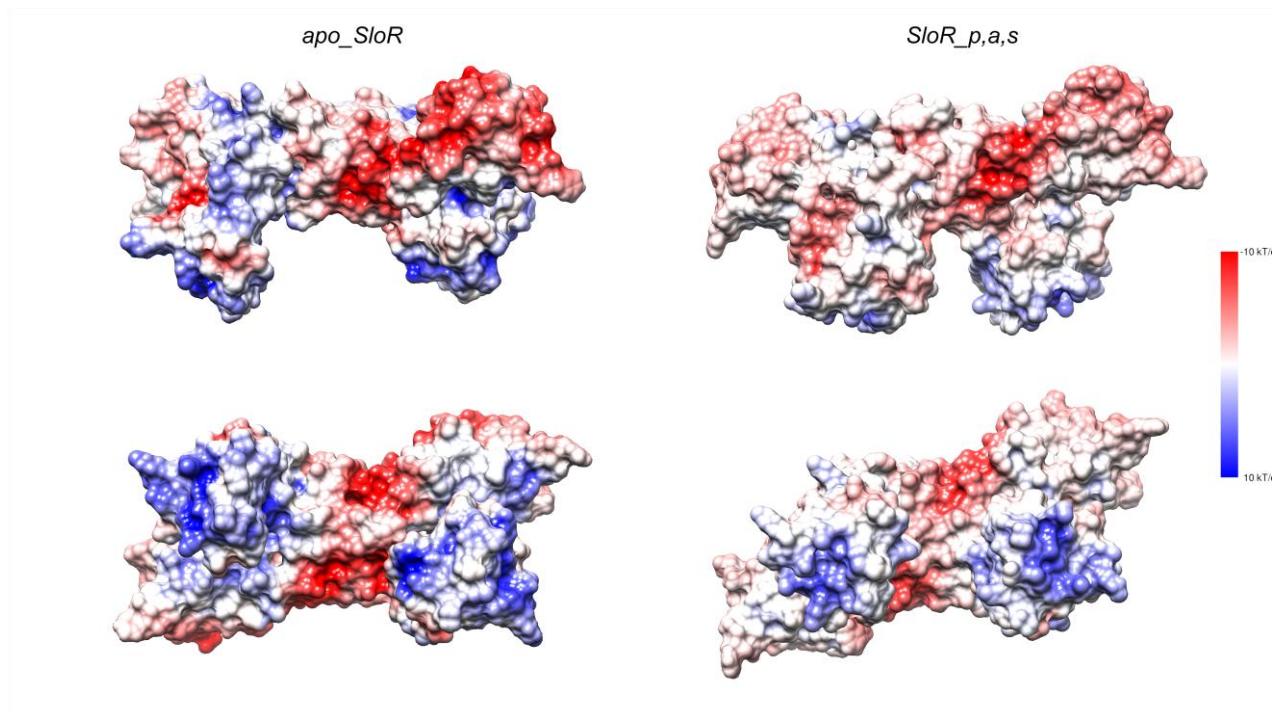
i ScaR identificirala je aminokiseline koje pripadaju DBD kao glavne doprinose razlikama u sustavima. Za sustave proteina SloR istaknute su aminokiseline 1-56, dok su za sustav ScaR istaknute aminokiseline 1-60 (slika 4.4).



**Slika 4.4.** Analiza glavnih komponenti (PCA) trajektorija proteina SloR i ScaR. Gore: Projekcija sustava na glavnu komponentu PC1. Dole: Doprinos aminokiselinskog ostatka za komponentu PC1. Aminokiseline koje najviše doprinose varijanci opisanoj s PC1 prikazane su kao narančaste točke.

Nadalje, usporedba elektrostatskog potencijala površine strukture proteina SloR i ScaR u apo i holo obliku pokazala je da se prilikom promjene konformacije mijenja i raspodjela elektrostatskog naboja. U sustavima *apo\_SloR* i *apo\_ScaR* pozitivni elektrostatski naboј Lys u domenama DBD pomaknut je i raspršen prema van dok je u sustavima *SloR\_p* i *SloR\_p,a,s* te *ScaR\_p* i *ScaR\_p,a,s* pozitivni naboј koncentriran i usmjeren prema istom smjeru u obje domene DBD (slika 4.5). Ovakva raspodjela pozitivnog naboja u domeni DBD uočena je i u homolognom proteinu IdeR<sup>87</sup> te vrlo vjerojatno ima bitnu ulogu za interakciju proteina s

negativno nabijenom molekulom DNA. Dodatno, analize fluktuacije sustava, pokazale su da domene DBD manje fluktuiraju u sustavima s vezanim ionima Mn(II) u primarnom veznom mjestu (slika D1 u dodatku). Iz svega navedenog može se zaključiti da vezanje iona Mn(II) za proteine SloR i ScaR ima kombiniran alosterički učinak kod kojeg uslijed vezanja iona dolazi i do očite promjene u strukturi, odnosno konformaciji proteina, ali i u dinamici domena DBD koja pogoduje vezanju proteina na DNA.



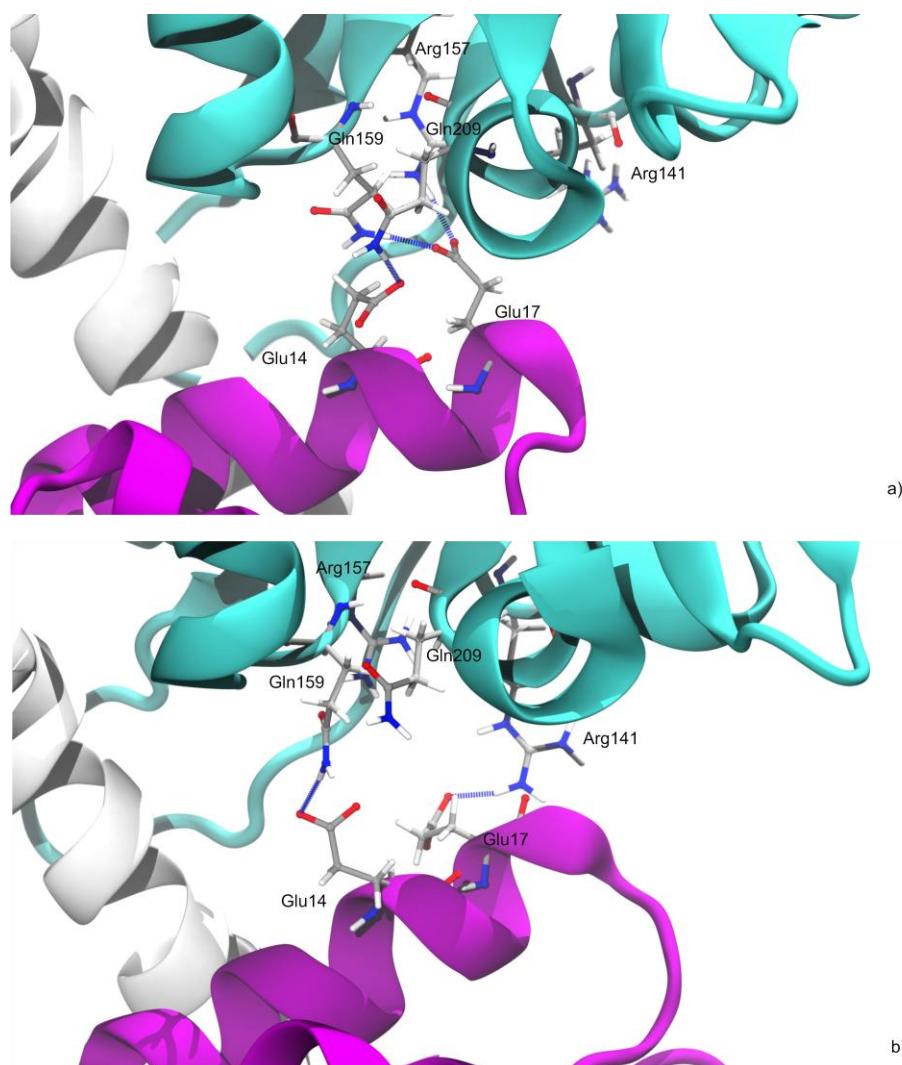
**Slika 4.5.** Raspodjela elektrostatskog naboja u sustavima *apo\_SloR* i *SloR\_p,a,s* izračunata pomoću mrežno dostupnog programa APBS<sup>82</sup>.

#### 4.1.2. Promjena interakcija između proteinskih domena

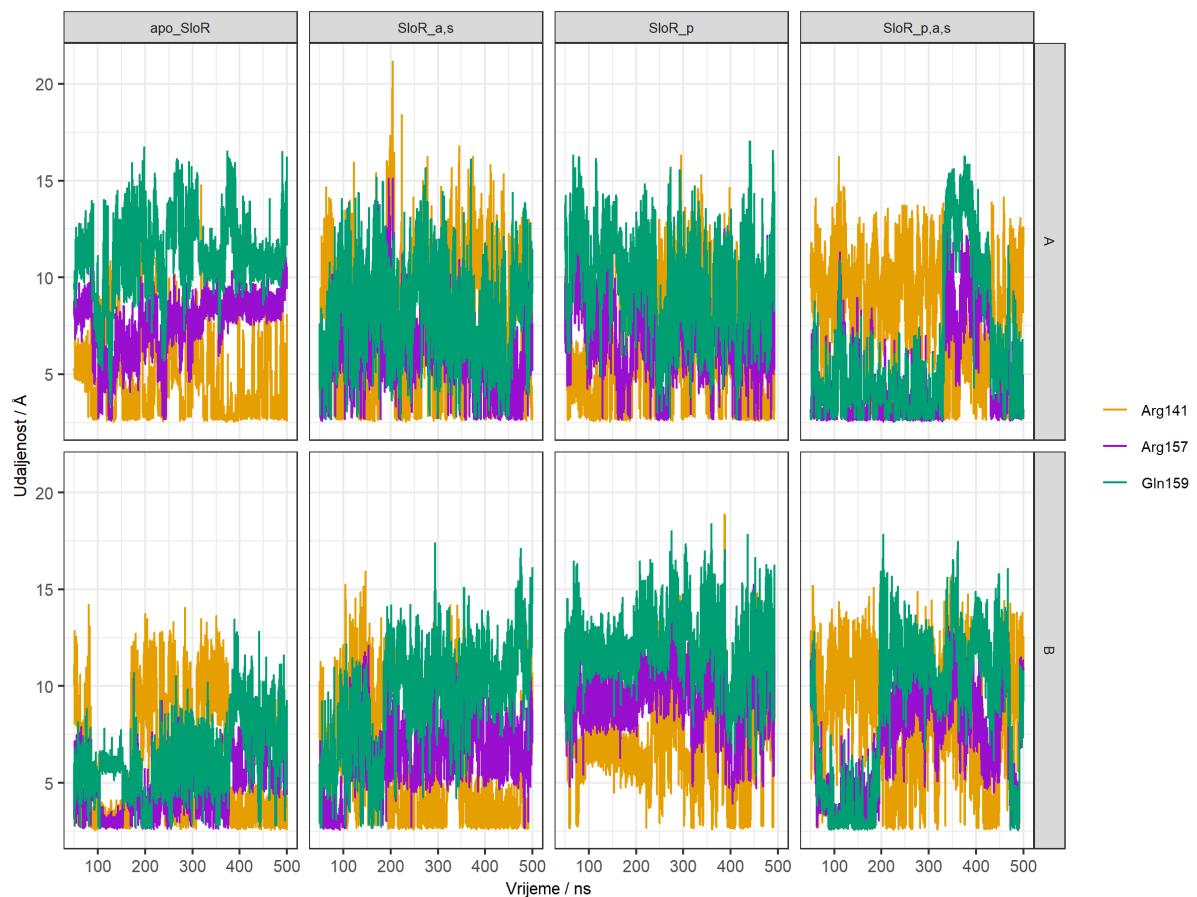
Analiza simulacija MD omogućila je bolji uvid u molekulsku osnovu regulacije udaljenosti između domena DBD koja je posredovana prisustvom iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu proteina SloR i ScaR. U simulacijama sustava *SloR\_p* i *SloR\_p,a,s* te *ScaR\_p* i *ScaR\_p,a,s.*, zavojnice  $\alpha 1$ , koje čine aminokiseline 1-18, ostale su zakočene u početnom položaju zbog veze između iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu i bočnog ogranka Asp7 iz zavojnice  $\alpha 1$ . Kao rezultat očuvanja položaja zavojnice  $\alpha 1$ , međudomenska udaljenost između domene FeoA i DBD ostala je konstantna tijekom simulacija. U simulacijama navedenih sustava proteina SloR, najzastupljenije vodikove veze između navedenih domena bile su između Glu14 i Gln159 ili Gln209 te Glu17 i Arg157 ili Gln159 (slike 4.6 i 4.7.), dok je u analognim sustavima proteina ScaR najzastupljenija vodikova veza bila između Glu14 i His158 (slika 4.8 i 4.9). SloR na poziciji 17 ima Glu dok se kod proteina ScaR na istoj poziciji nalazi Thr koji ne ostvaruje interakcije s domenom FeoA. „Zakočenost“ zavojnice  $\alpha 1$  uzrokovana prisustvom iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu oba proteina rezultirala je približavanjem domena DBD jedne prema drugoj u usporedbi s početnom strukturu (slike 4.1 i 4.2).

Nasuprot tome, odsutnost iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu u sustavima *apo\_SloR* i *SloR\_a,s* te *apo\_ScaR* i *ScaR\_a,s* izazvala je premještanje zavojnice  $\alpha 1$  prema Arg141 iz domene FeoA u oba monomera. Ovo premještanje dovelo je do povećanja međudomenske udaljenosti između domena DBD i reorganizacije interakcija između zavojnice  $\alpha 1$  i domene FeoA (slike 4.1 i 4.2). U sustavu *apo\_ScaR*, na početku simulacije, Glu14 iz zavojnice  $\alpha 1$  formirao je vodikovu vezu s His158 iz domene FeoA (slika 4.8.a). Nakon 250 ns simulacija MD sustava *apo\_ScaR*, došlo je do prekida vodikove veze između Glu14 i His158 zbog pomaka zavojnice  $\alpha 1$  prema domeni FeoA. Na ovoj poziciji zavojnice  $\alpha 1$ , Glu14 stvarao je nove vodikove veze s Arg157 i Tyr211 iz domene FeoA koje su ostale prisutne do kraja simulacija (slike 4.8.b-4.9). Ovo veliko gibanje unutar simulacije bilo je vidljivo samo u jednom monomeru sustava *apo\_ScaR*, dok se u drugom monomeru te u sustavu *ScaR\_a,s* ta promjena dogodila odmah na početku simulacije, tijekom simulacije uravnuteženja. Nadalje, u simulacijama MD analognih sustava proteina SloR (*apo\_SloR*), Glu17 je učestalije stvarao vodikove veze s Arg141 i rjeđe s Arg157 iz petlje u domeni FeoA u usporedbi sa sustavima *SloR\_p* i *SloR\_p,a,s*. Interakcije između Glu14 i Gln159 bile su očuvane u većem dijelu simulacija (slika 4.7). Promjena relativnog položaja zavojnice  $\alpha 1$  prema domeni FeoA pojavila

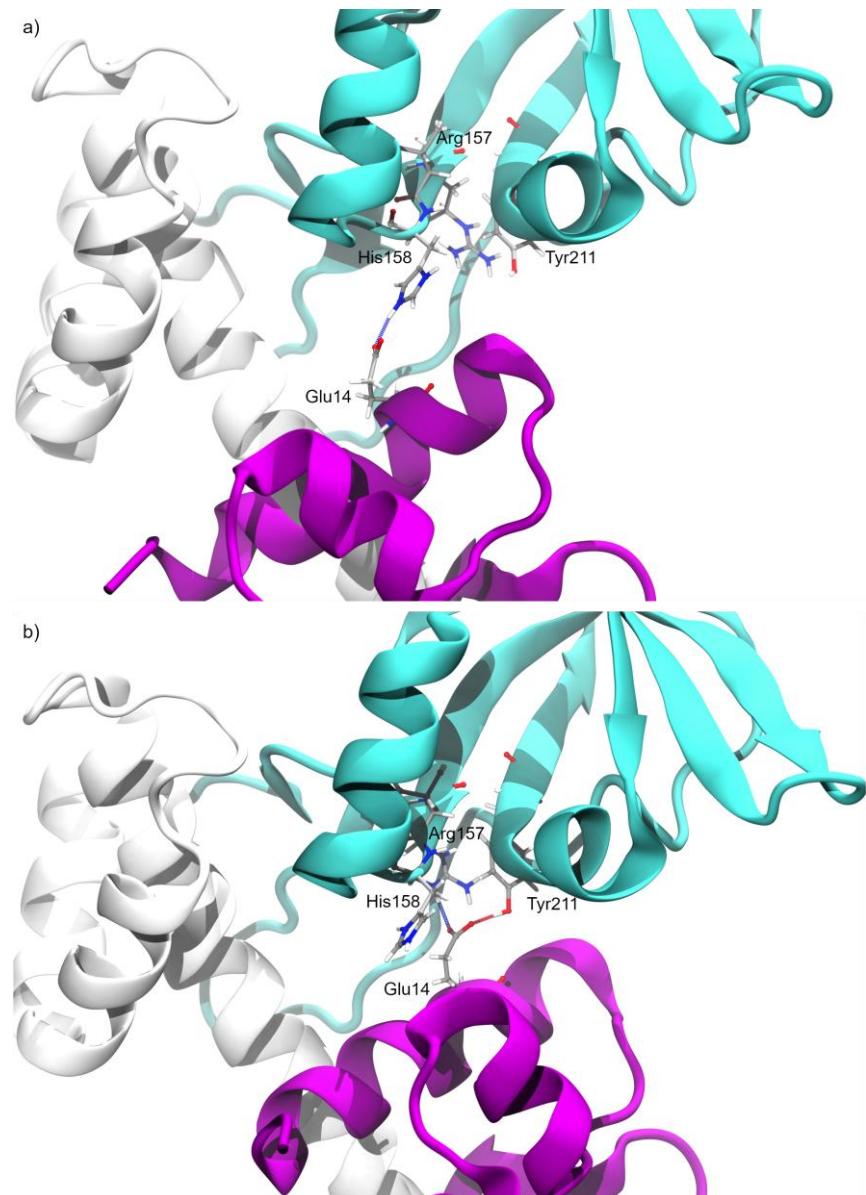
se također na početku simulacija sustava *apo\_SloR* i *SloR<sub>a,s</sub>*, tijekom simulacije uravnoteženja, i nije se mogla uočiti na isti način kao u sustavu *apo\_ScaR*. Na temelju rezultata simulacija proteina SloR i ScaR te prema razriješenim strukturama homolognih proteina u apo obliku, može se zaključiti da je bez manganovih kationa povoljnija konformacija proteina ona u kojoj su zavojnice  $\alpha$ 1 udaljenije od aminokiselina primarnog veznog mjesta za metal.



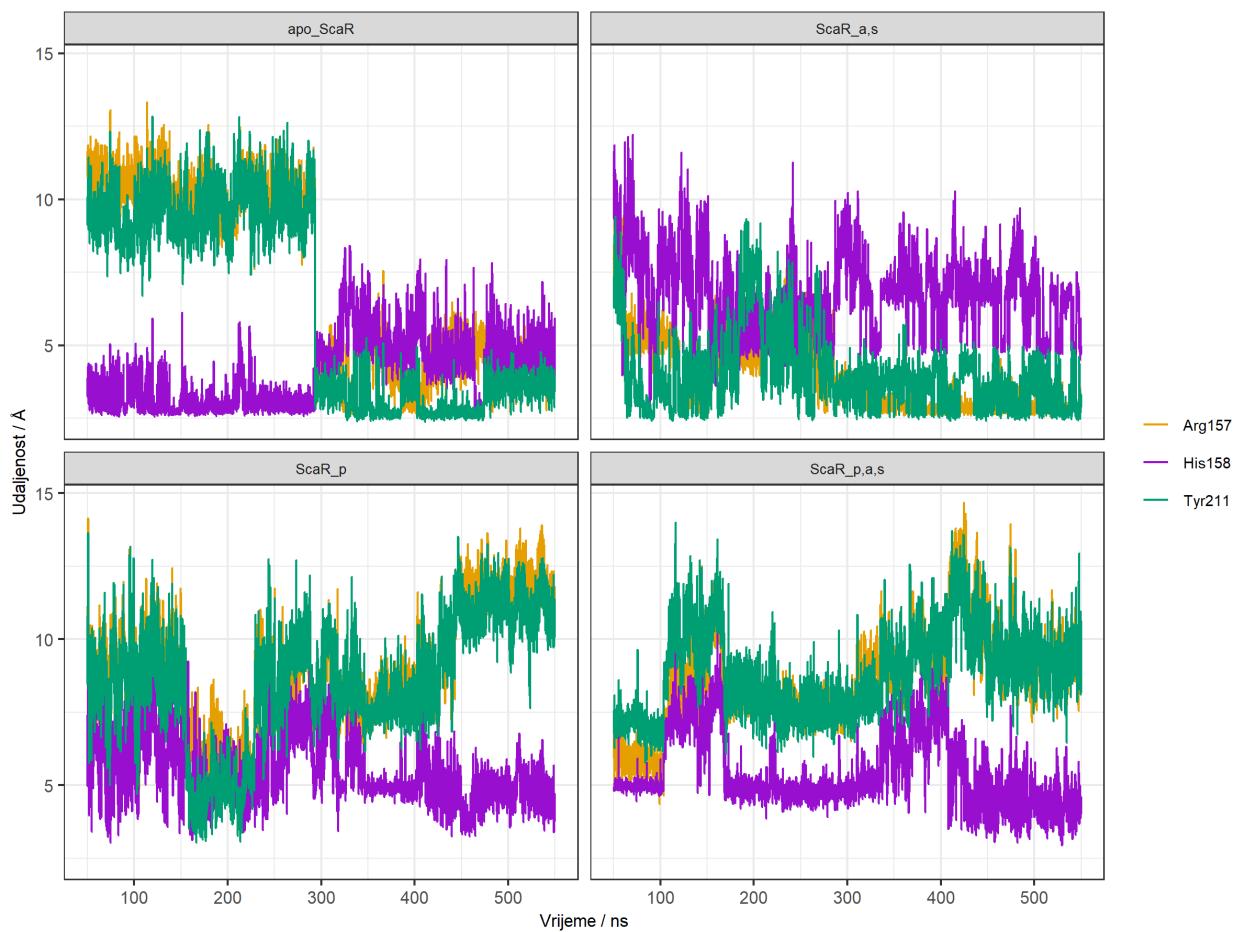
**Slika 4.6.** Razlika u interakcijama između bočnih ogranača aminokiselina zavojnice  $\alpha$ 1 u domeni DBD te domene FeoA tijekom simulacija MD sustava proteina SloR s i bez iona Mn(II) u primarnom veznom mjestu. a) Sustavi *SloR\_p* i *SloR\_p,a,s*; b) Sustavi *apo\_SloR* i *SloR\_a,s*. Domena DBD prikazana je u ljubičastoj boji, dimerizacijska domena prikazana je u bijeloj boji, a domena FeoA u tirkiznoj boji.



**Slika 4.7.** Udaljenost Glu17 iz zavojnice  $\alpha$ 1 od aminokiselina domene FeoA kroz simulacije MD različitih sustava proteina SloR.

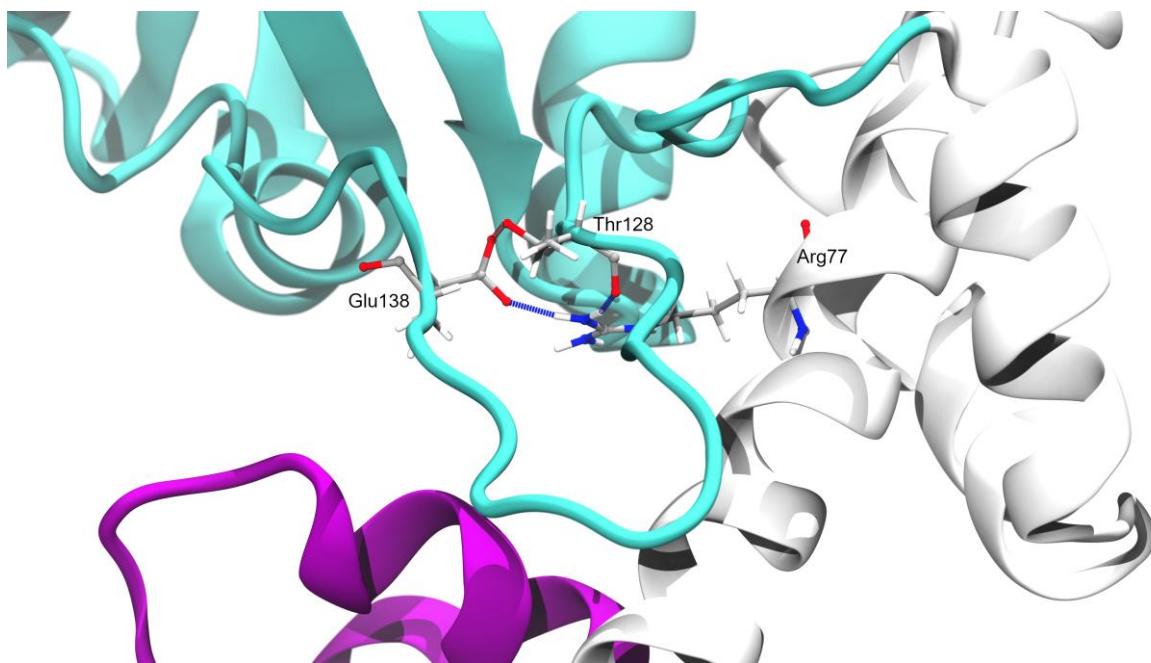


**Slika 4.8.** Promjena interakcija između bočnih ogrankova aminokiselina zavojnice  $\alpha 1$  u domeni DBD te domene FeoA tijekom simulacije MD sustava *apo\_ScaR*. a) položaj zavojnice  $\alpha 1$  na početku simulacije; b) položaj zavojnice  $\alpha 1$  nakon odmicanja domena DBD jedne od druge. Domena DBD prikazana je u ljubičastoj boji, dimerizacijska domena prikazana je u bijeloj boji, domena FeoA u tirkiznoj boji.



**Slika 4.9.** Udaljenost Glu14 iz zavojnice  $\alpha$ 1 od aminokiselina domene FeoA kroz simulacije MD različitih sustava proteina ScaR.

Također, daljnje analize interakcija između aminokiselina pokazale su da je najzastupljenija vodikova veza u svim sustavima proteina SloR i ScaR bila ona između Arg77 iz tzv. „linker“ zavojnice (između dimerizacijske domene i domene FeoA, slika 4.10) te Glu138 i Thr128 iz petlje koja povezuje dimerizacijsku domenu i domenu FeoA (slika 4.10). Budući da se uočena vodikova veza formira između dviju domena, Arg77 bi mogao biti važan za održavanje stabilne udaljenosti između dimerizacijske domene i domene FeoA. Nadalje, pregledom struktura homolognih proteina u PDB bazi podataka (PDB kodovi: 3HRT, 6O5C, 54R4, 1U8R), uočeno je da i drugi proteini imaju Arg na poziciji 77 koji ostvaruje vodikove veze s bočnim ograncima iz petlje koja povezuje dimerizacijsku i FeoA domenu. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se potvrdila važnost Arg77 za očuvanost strukture.

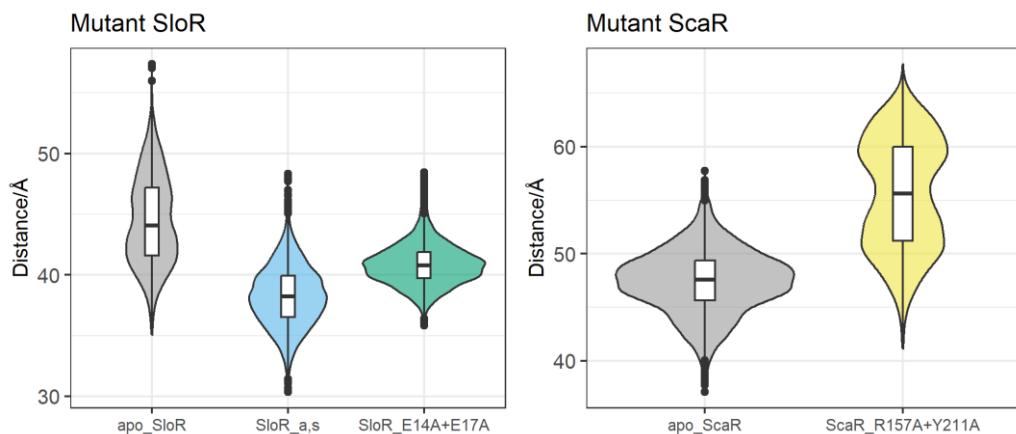


**Slika 4.10.** Interakcija između bočnog ogranka Arg77 iz tzv. „linker“ zavojnice i Glu138 te Thr128 koji se nalaze u petlji koja povezuje domenu FeoA s ostatkom strukture proteina.

#### 4.1.3. Utjecaj mutacija na konformaciju proteina in silico

Simulacije MD različitih apo i holo sustava proteina SloR i ScaR dale su uvid u potencijalni mehanizam aktivacije i inaktivacije (stabilizacije) proteina SloR i ScaR u kojem sudjeluju aminokiselinski bočni ogranci iz zavojnice  $\alpha$ 1 te domene FeoA. Kako bi se testiralo kako se sustavi tj. proteini SloR i ScaR ponašaju bez tih aminokiselina, korištenjem programa *Maestro* zamijenjene su istaknute aminokiseline Glu14 i Glu17 na proteinu SloR te Arg157 i Tyr211 na proteinu ScaR.

Simulacije mutanta *SloR\_E14A-E17A* pokazale su da odsustvo Glu14 i Glu17 dovodi domene DBD bliže jednu drugoj u odnosu na simulacije divljeg tipa proteina *apo\_SloR* (slika 4.11). Razlog tomu je vjerojatno nedostatak interakcija koje su inače ostvarivali Glu14 i Glu17 iz zavojnice  $\alpha$ 1 s bočnim ograncima aminokiselina iz domene FeoA (Arg141, Arg157, Gln159) te koje su držale strukturu proteina u raširenijem obliku. Nasuprot tome, simulacije mutanta *ScaR\_R157A-Y211A* pokazale su da odsustvo Arg157 i Tyr211 dovodi do razmicanja domena DBD u odnosu na simulacije divljeg tipa proteina *apo\_ScaR* (slika 4.11).



**Slika 4.11.** Usporedba udaljenosti domena DBD u sustavima mutanata i divljeg tipa proteina SloR i ScaR.

Dosadašnja istraživanja na proteinu SloR te na njegovim homologima u kojima su *in vitro* rađeni mutanti uključivala su aminokiseline veznog mjesta za metale te aminokiseline koje sudjeluju u vezanju DNA u domeni DBD.<sup>3,29</sup> Utvrđeno je da za protein SloR bočni ogranci aminokiselina za sva tri vezna mjesta iona metala utječu na aktivaciju proteina, dok mutanti bočnih ograna aminokiselina u domeni DBD, Ser34, Pro36, Ser39 i Glu40, utječu na specifičnost vezanja na određenu sekvencu DNA. Na temelju simulacija MD mutanata proteina SloR i ScaR moglo bi se pretpostaviti da *in vitro* mutant proteina SloR, *SloR\_E14A-E17A*, može u apo obliku prijeći u aktivnu formu s približenim domenama DBD, dok mutant *ScaR\_R157A-Y211A* vjerojatno ne može jer se nalazi u raširenijoj konformaciji nego divlji tip proteina ScaR. Potrebno je napomenuti da simulacije kreću iz već pravilno smotanog oblika proteina, dok u eksperimentalnim uvjetima protein (mutant) poprima svoju strukturu tek nakon transkripcije (i translacije) mutiranog gena. Mutacije u nekim konzerviranim aminokiselinama, kao što je R157<sup>3,29</sup>, u domeni FeoA mogu značajno utjecati na pravilno smatanje proteina pa samim tim i na njegovu aktivnost. Iz tog razloga, kako bi se eksperimentalno proučio utjecaj mutacija u α1 zavojnici te domeni FeoA na aktivnost proteina SloR i ScaR, metodom ciljane mutageneze uvedene su mutacije u plazmide koji sadrže gen za divlje tipove proteina te su mutirani proteini prekomjerno eksprimirani i pročišćeni za analize. U ovom istraživanju nije direktno praćena ekspresija gena već se utjecaj mutacija na aktivnost proteina SloR i ScaR pratila na temelju sposobnosti proteina da veže određenu sekvencu DNA (opisano u poglavljju 4.5.).

## 4.2. Biofizička karakterizacija vezanja iona Mn(II) za proteine SloR i ScaR

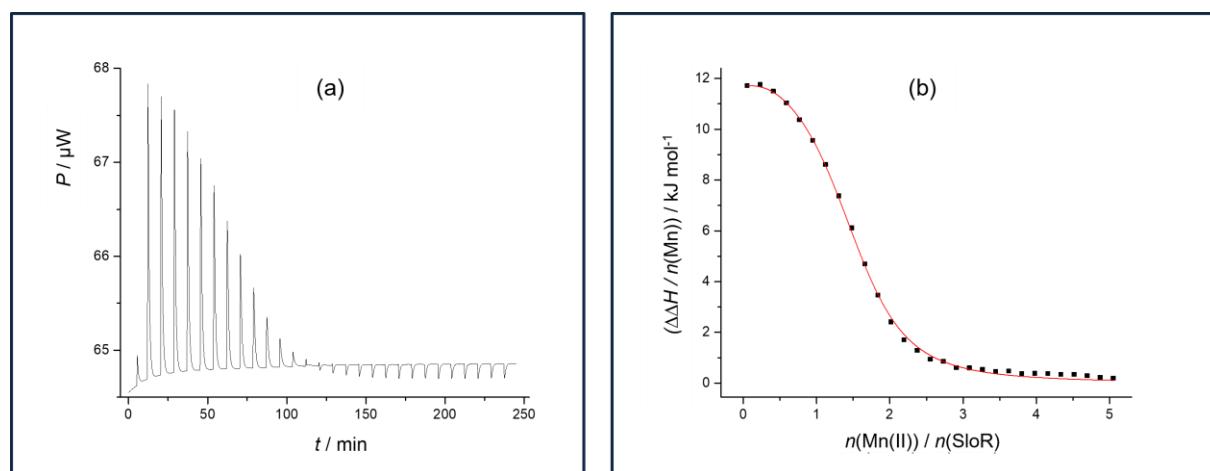
### 4.2.1. Pročišćavanje divljeg tipa i mutanata proteina

Geni za divlji tip proteina SloR i ScaR uspješno su eksprimirani u bakterijama *E. coli* te pročišćeni kroz dva koraka kromatografije. Dobiveno je ~20 mg nativnog proteina ScaR i ~15 mg nativnog proteina SloR iz 1,5 L bakterijske kulture. Konačno pripremljeni uzorak proteina vizualiziran metodom SDS-PAGE elektroforeze bio je odgovarajuće čistoće, s molekularnom masom monomera ~25 kDa (slika D2 u dodatku). Prosječni volumen elucije (SloR 54,8 mL i ScaR 54,4 mL) iz kolone za gel-filtracijsku kromatografiju odgovara molekularnoj masi od približno 60 kDa, što ukazuje da se protein nalazi u obliku dimera u danim uvjetima (slika D3 u dodatku).

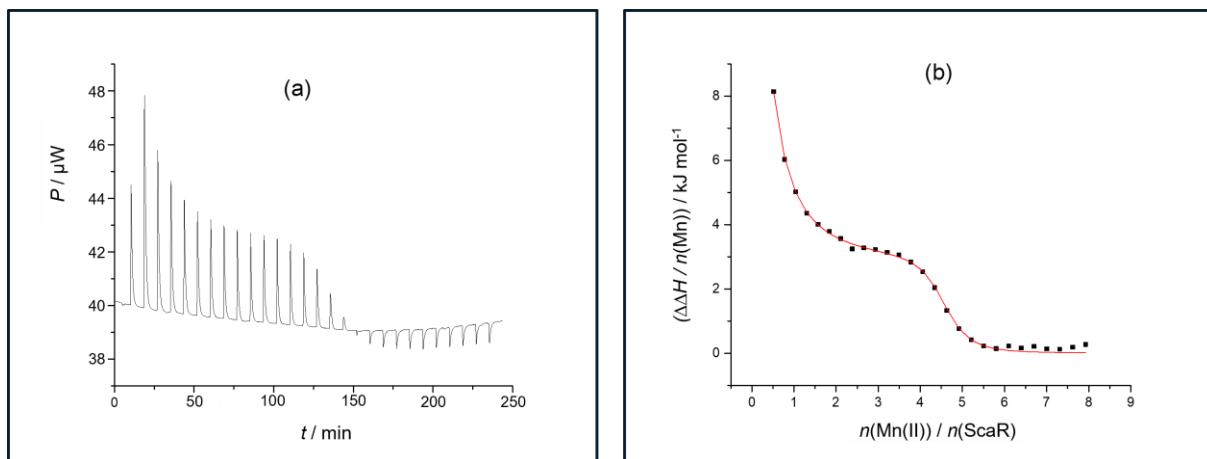
Rezultati sekvenciranja plazmida nakon postupka mutageneze pokazali su da su uspješno uvedene obje mutacije u divlji tip gena za proteine SloR i ScaR te da su dobiveni plazmidi za dvostrukе mutante proteina SloR E14A-E17A i ScaR R157A-Y211A. Navedeni mutanti uspješno su eksprimirani u bakterijama *E. coli* te pročišćeni metodom afinitetne kromatografije. Dobiveno je ~15 mg mutanata SloR i ScaR iz 1,5 L bakterijske kulture. Konačno pripremljeni uzorak mutanta proteina SloR i ScaR nakon afinitetne kromatografije bio je odgovarajuće čistoće, s molekularnom masom monomera ~25 kDa kao i divlji tip proteina (slika D2, D4 i D5 u dodatku), no nakon postupka gel-filtracijske kromatografije uzorak mutanta proteina ScaR pokazivao je značajnu prisutnost onečišćenja s nekim nepoznatim proteinom molekulske mase ~80 kDa (slika D4 u dodatku). Također, nakon finalnog prebacivanja uzorka mutanata SloR u pufer za analizu sa smolom *Chelex* došlo je do značajnog taloženja i gubitka mutanta. Iz tog razloga su postupci ekspresije i pročišćavanja mutanta metodom afinitetne kromatografije ponovljeni dok je korak dodatnog pročišćavanja gel-filtracijom izostavljen. Mutanti proteina SloR i ScaR prebačeni su i čuvani u puferu za analizu koji je u sebi imao 10 % glicerola. Dodatak glicerola u pufer za analizu osigurao je stabilnost proteina tj. nije došlo do taloženja uzorka kao pri prvim pokušajima izolacije.

#### 4.2.2. Mjerenje afiniteta i određivanje stehiometrije vezanja iona Mn(II) za proteine SloR i ScaR

U sklopu ove doktorske disertacije, metoda izotermne titracijske kalorimetrije (ITC) korištena je za proučavanje interakcije izoliranih proteina i metala. Mjerenja metodom ITC napravljena na uzorku proteinu SloR pokazala su da dodavanje kationa Mn(II) u otopinu proteina rezultira pozitivnim toplinskim signalima, što potvrđuje da se odvija vezanje iona Mn(II) u primijenjenim eksperimentalnim uvjetima i otkriva da su povezani procesi vezanja endotermni (slika 4.12.a). Vezanje je opaženo do molarnog omjera Mn:SloR manjeg od 4, dok je daljnje dodavanje titranta uzrokovalo samo neznatne signale. Unatoč velikoj sličnosti u strukturi, mjerenja napravljena na proteinu ScaR rezultirala su nešto drugačijim oblikom titracijske krivulje sugerirajući da vezanje iona Mn(II) ima složen sljed vezanja koji uključuje nekoliko kompleksnih vrsta prisutnih u ravnoteži (slika 4.13.a). Snažni endotermni signali uočeni su pri niskom molarnom omjeru Mn:ScaR koji su brzo gubili intenzitet do ekvimolarnog omjera. Nakon toga uslijedila je plato faza s konstantnim izraženim endotermnim toplinskim efektima koja je trajala do dodavanja 4 ekvivalenta iona Mn(II). Dalnjim dodavanjem Mn(II) toplinski signali opadali su sigmoidalno, postajući neznatni nakon dodavanja 5 ekvivalenta Mn(II).



**Slika 4.12.** Mikrokalorimetrijska titracija (ITC) proteina SloR ( $c = 0,041 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $V = 1,449 \text{ ml}$ ) s otopinom  $\text{MnCl}_2$  pri  $\text{pH} = 8$  ( $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  HEPES pufer, koji sadrži  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{NaCl}$ ) i pri  $25^\circ\text{C}$ . a) termogram titracije, b) ovisnost molarnih sukcesivnih promjena entalpije o množinskom omjeru Mn(II) i monomera SloR.



**Slika 4.13.** Mikrokalorimetrijska titracija (ITC) proteina ScaR ( $c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $V = 1,449 \text{ ml}$ ) s otopinom  $\text{MnCl}_2$  pri  $\text{pH} = 8$  ( $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  HEPES bufer, koji sadrži  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{NaCl}$ ) i pri  $25^\circ\text{C}$ . a) termogram titracije, b) ovisnost molarnih sukcesivnih promjena entalpije o množinskom omjeru  $\text{Mn(II)}$  i monomera ScaR.

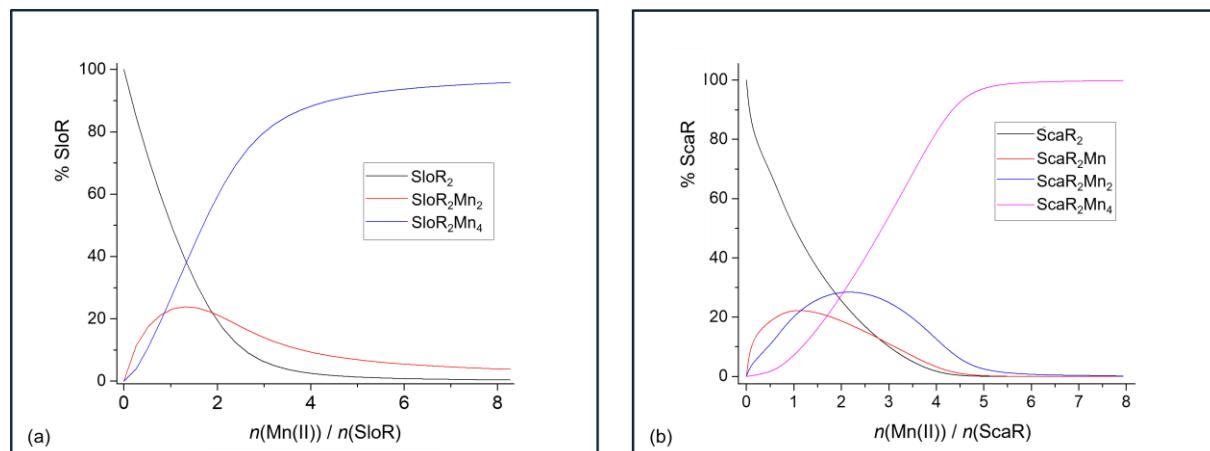
Najbolje podudaranje za dobivene eksperimentalne podatke za protein SloR postignuto je primjenom modela koji prepostavlja nastajanje kompleksa s dva i četiri iona  $\text{Mn(II)}$  po SloR dimeru ( $\text{SloR}_2$ ) (slika 4.12.b), dok je za protein ScaR najbolje podudaranje postignuto primjenom modela koji prepostavlja nastajanje kompleksa s jednim, dva i četiri iona  $\text{Mn(II)}$  po ScaR dimeru ( $\text{ScaR}_2$ ) (slika 4.13.b). Prema navedenim modelima, određene su konstante stabilnosti nastalih kompleksa i povezane reakcijske entalpije te su njihove vrijednosti prikazane u tablici 4.1..

**Tablica 4.1.** Termodinamički parametri reakcije nastajanja kompleksa proteina s ionima  $\text{Mn(II)}$  pri  $25^\circ\text{C}$ .<sup>a</sup>

Vrsta kompleksa	$\log \beta$	$\Delta_r H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S^\circ / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
$\text{SloR}_2\text{Mn}_2$	$4,8 \pm 0,2$	$27,1 \pm 0,3$	$184,1 \pm 29,3$
$\text{SloR}_2\text{Mn}_4$	$10,1 \pm 0,1$	$47,7 \pm 0,1$	$263,6 \pm 37,7$
$\text{ScaR}_2\text{Mn}$	$5,01 \pm 0,06$	$91,9 \pm 2,5$	$404,6$
$\text{ScaR}_2\text{Mn}_2$	$10,33 \pm 0,04$	$37,2 \pm 0,4$	$323,0$
$\text{ScaR}_2\text{Mn}_4$	$20,59 \pm 0,04$	$83,2 \pm 0,1$	$672,9$

<sup>a</sup>standardne devijacije dobivene su iz prilagođavanja (eng. *fit*) podataka modelu

Na temelju prikupljenih konstanti ravnoteže, izračunati su dijagrami distribucije za sustav koji sadrži Mn(II) i SloR (slika 4.14.a) te Mn(II) i ScaR (slika 4.14.b). Kompleks SloR<sub>2</sub>Mn<sub>4</sub> prevladava tijekom većine titracije. Čak i pri približno ekvimolarnom omjeru proteina SloR i Mn, postotak kompleksa SloR<sub>2</sub>Mn<sub>4</sub> veći je od očekivanog kompleksa SloR<sub>2</sub>Mn<sub>2</sub>, dok pri niskim koncentracijama iona Mn(II) prevladava slobodni oblik proteina. Iz navedenog može se zaključiti da kompleks koji sadrži jedan ion Mn(II) vezan po monomeru proteina SloR, SloR<sub>2</sub>Mn<sub>2</sub>, nije prevladavajuća vrsta kompleksa ni u jednom dijelu titracije. Za razliku od titracije napravljene s proteinom SloR, prema dijagramu distribucije za sustav Mn(II) i ScaR, vidljivo je da tek nakon dodatka više od dva ekvivalenta iona Mn(II) po monomeru proteina ScaR, kompleks ScaR<sub>2</sub>Mn<sub>4</sub>, prevladava tijekom ostatka titracije. Pri relativno niskom omjeru Mn:ScaR prisutan je monokationski kompleks, ScaR<sub>2</sub>Mn, te kompleks ScaR<sub>2</sub>Mn<sub>2</sub>.



**Slika 4.14.** Dijagram distribucije prisutnih molekulskih vrsta u otopini koja sadrži: (a) SloR ( $c = 0,041 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i Mn(II) te (b) ScaR ( $c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i Mn(II). Mjerena oba uzorka metodom ITC napravljeno je pri  $\text{pH} = 8$  ( $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  HEPES pufer, koji sadrži  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl) i pri  $25^\circ\text{C}$ .

Za oba sustava, svi procesi su bili endotermni i entropijski povoljni (tablica 4.1). Pozitivna promjena entropije pri vezanju iona Mn(II) najvjerojatnije je uzrokovana desolvatacijom proteina i kationa Mn(II) tijekom stvaranja kompleksa, zajedno s gubitkom povoljnih intramolekularnih interakcija u slobodnom obliku proteina. Navedena desolvatacija, u kombinaciji sa samim procesom vezanja, vjerojatno je odgovorna za pozitivne reakcijske entalpije povezane s procesima kompleksiranja.

Izmjereni termodinamički parametri za proteine SloR i ScaR ukazuju na sličan alosterički učinak vezanja prvih iona Mn(II) tj. da dolazi do povećanja afiniteta vezanja za drugi par iona Mn(II). Za protein ScaR, najnepovoljnija reakcijska entalpija izmjerena je za stvaranje monokationskog kompleksa,  $\text{ScaR}_2\text{Mn}$ . Stvaranje ovog kompleksa povoljno je pri niskom molarnom omjeru Mn:ScaR zbog čega su izmjereni toplinski signali bili prilično visoki pri prvim dodavanjima otopine Mn(II). Vezanje drugog Mn(II) bilo je entropijski manje povoljno, ali entalpijski manje nepovoljno zbog čega je vezanje drugog kationa Mn(II), na već formirani kompleks egzoterman proces. Ovi rezultati upućuju na slabi alosterički utjecaj vezanja prvog iona Mn(II) na jačinu vezanja drugog iona Mn(II). Naposlijetku, proces vezanja iona Mn(II) u kompleks  $\text{ScaR}_2\text{Mn}_4$  imao je manje povoljnu reakcijsku entalpiju, ali povoljniji entropijski doprinos od vezanja iona Mn(II) u kompleks  $\text{ScaR}_2\text{Mn}_2$ . Analognе rezultate pokazala su mјerenja na proteinu SloR gdje je proces vezanja iona Mn(II) u kompleks  $\text{SloR}_2\text{Mn}_4$  imao manje povoljnu reakcijsku entalpiju, ali povoljniji entropijski doprinos od vezanja iona Mn(II) u kompleks  $\text{SloR}_2\text{Mn}_2$ .

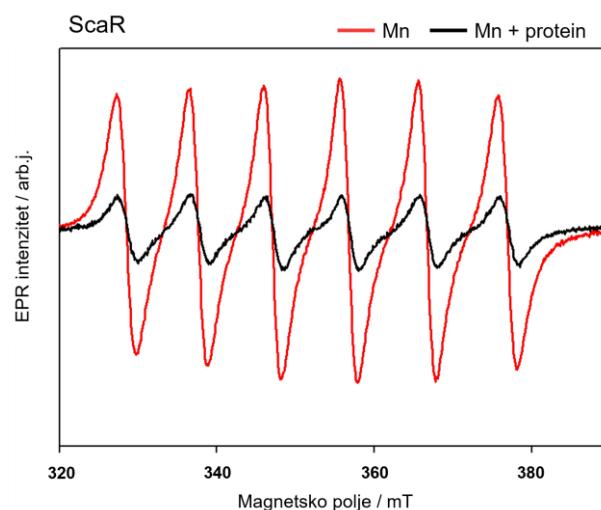
Na temelju navedenog može se pretpostaviti da vezanje prvog para iona Mn(II) reorganizira proteine SloR i ScaR za jače vezanje idućeg para iona Mn(II). Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnom studijom u kojoj su proučavane interakcije mangana i proteina. Dodatno, simulacije MD proteina SloR potvrđuju i ukazuju na mogućnost da vezanje prvog metalnog iona na pomoćno i sekundarno vezno mjesto potiče promjenu položaja aminokiselinskih bočnih ogranka u primarnom veznom mjestu, što bi moglo potaknuti vezanje metalnih iona u primarnom veznom mjestu. Ovi računalni i eksperimentalni rezultati ukazuju na postojanje određenog redoslijeda u vezanju metalnih iona, koji dovodi do reorganizacije strukture proteina, a time i do konačne organizacije strukture. U studiji o proteinu DtxR, P.D. Twigg i sur.<sup>89</sup> nazvali su ovaj fenomen "od nereda do reda" (eng. „*Disorder to Order*“).

#### 4.2.3. Određivanje stehiometrije vezanja iona Mn(II) metodom EPR

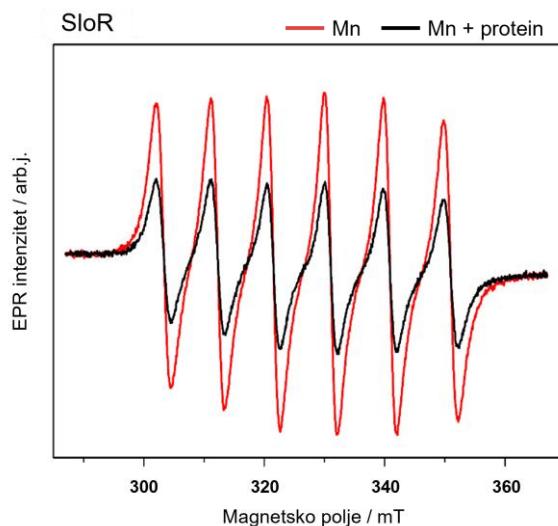
Stehiometrija vezanja iona Mn(II) za proteine SloR i ScaR, osim metodom ITC, određena je i metodom elektronske paramagnetske rezonancije (EPR). Dobiveni EPR spektri Mn(II) u puferu bez i u prisutnosti proteina prikazani su na slikama 4.15. i 4.16.. Izotropni signali dobiveni pri sobnoj temperaturi tipični su za ione  $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  koji pokazuju 6 linija zbog hiperfine interakcije elektronskih spinova s jezgrom  $^{55}\text{Mn}$  koja ima spin 5/2. Prisutnost proteina ScaR u

otopini iona Mn(II) dovodi do smanjena intenziteta spektra otprilike 4 puta dok pristunost proteina SloR dovodi do smanjena intenziteta spektra otprilike 2 puta. Uočeno smanjenje intenziteta signala mangana u otopini s proteinom implicira vezanje iona Mn(II) na proteine<sup>90</sup>. Razlika u redukciji magnetske susceptibilnosti između uzorka SloR i ScaR posljedica je različite koncentracije proteina naspram iona Mn(II). Koncentracija proteina ScaR je ~3 puta manja od Mn(II), dok je proteina SloR ~6 puta manja od Mn(II). Za oba uzorka proteina, na temelju uočenih razlika u intenzitetu signala može se procijeniti da se veže otprilike 3 iona Mn(II) po monomeru proteina tj. 6 iona Mn(II) po dimeru proteina.

Iako se EPR podaci ne podudaraju u potpunosti s ITC podacima, treba napomenuti da se na temelju dobivenih ITC podataka ne može isključiti mogućnost interakcije proteina s trećim manganovim kationom. Takva interakcija mogla bi biti izoentalpijska ili preslabu da bi rezultirala značajnim stupnjem kompleksacije u primijenjenim eksperimentalnim uvjetima metode ITC. Prema modelima kojima su obrađene ITC titracije u slučaju proteina SloR trebalo bi biti 69% slobodnog Mn(II) tj. sukcesivnost bi se trebala smanjiti za 1,43 puta (dobiveno je 1,87). Ako se prepostavi relativno slabo vezanje i trećeg iona Mn(II) na SloR dobije se 55,3% slobodnog Mn(II) što u potpunosti odgovara rezultatu mjerenja napravljenog metodom EPR.



**Slika 4.15.** EPR spektar otopine Mn(II) i proteina ScaR. EPR spektar dobiven snimanjem  $0,27 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopine iona Mn(II) bez (crveno) i s prisutnim (crno)  $0,087 \text{ mmol dm}^{-3}$  proteinom ScaR. Spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi.



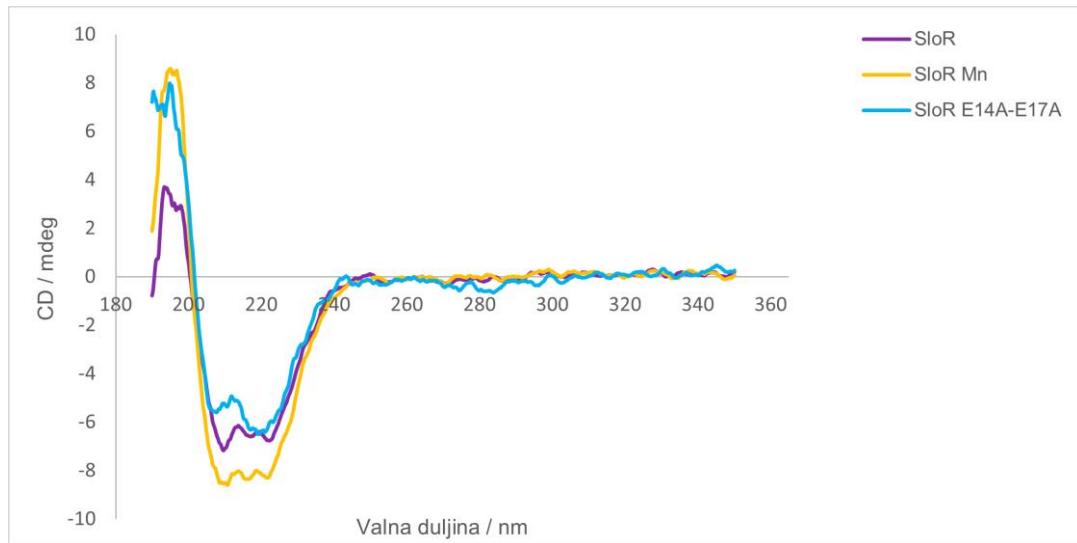
**Slika 4.16.** EPR spektar otopine Mn(II) i proteina SloR. EPR spektar dobiven snimanjem  $0,134 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopine iona Mn(II) bez (crveno) i s prisutnim (crno)  $0,021 \text{ mmol dm}^{-3}$  proteinom SloR. Spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi.

U slučaju proteina ScaR, udio slobodnog Mn(II) trebao bi biti 35,7% što odgovara padu od 2,8 u donosu na inicijalni signal. Slično kao i za protein SloR, ako se prepostaviti vezanje 3 iona Mn(II) po monomeru i uz ne preveliku konstantu stabilnosti dobije se eksperimentalno utvrđeni pad koncentracije slobodnog Mn(II) od 4 puta.

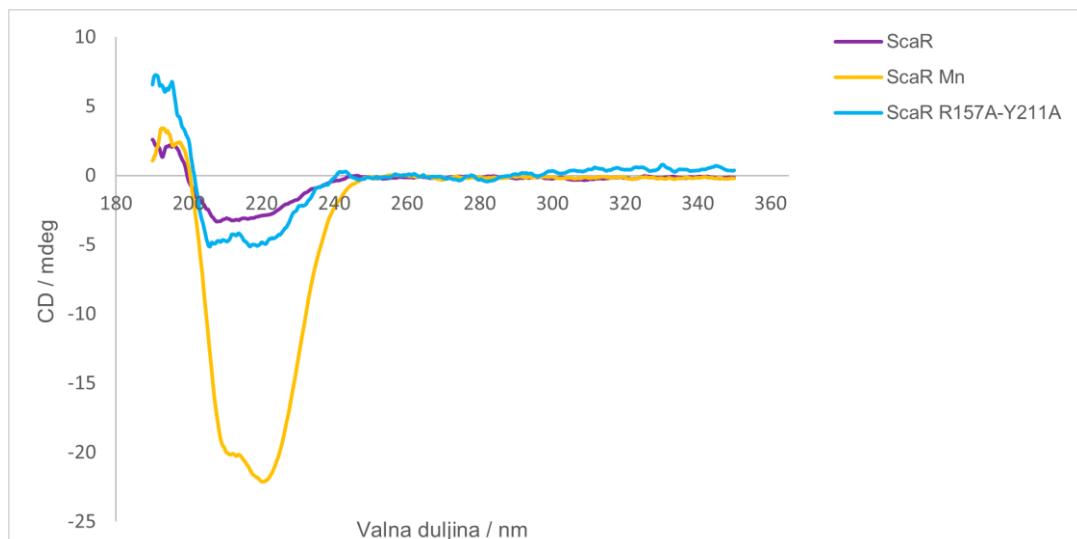
Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnim studijama na proteinima SloR i ScaR koju ukazuju na to da su za aktivaciju potrebna dva do tri iona Mn(II) po monomeru.<sup>3,26,29</sup> Do sada nije razriješena kristalna struktura ovih proteinova u kompleksu s ionima Mn(II), ali postoje kristalne strukture proteinova ScaR u kompleksu s ionima Zn(II) i Cd(II) (PDB kodovi: 3HRS i 3HRT) te protein SloR u kompleksu s ionima Zn(II) (PDB kod: 5CVI), gdje je barem jedan metalni ion pozicioniran u sekundarnom veznom mjestu što potvrđuje mogućnost kompleksiranja do tri iona Mn(II) po monomeru proteina. Također, napravljena su istraživanja proteinova SloR gdje su se u pomoćno i sekundarno vezno mjesto uvodile različite mutacije<sup>5</sup>. Uvođenje mutacija u oba vezna mesta dovelo je do smanjene aktivnosti proteinova SloR za regulaciju ekspresije gena, što ukazuje da su sva tri vezna mesta ključna za pravilno funkciranje proteinova. Dodatna potvrda mogućnosti vezanja iona Mn(II) u sekundarno vezno mjesto je razriješena struktura homolognog proteinova MtsR iz bakterije *Streptococcus pyogenes* u kompleksu s ionima Mn(II) u kojoj se ioni Mn(II) nalaze u pomoćnom i sekundarnom veznom mjestu (PDB kod: 6O5C).

#### 4.2.4. Utjecaj vezanja iona Mn(II) i uvođenja mutacija na strukturu proteina

Za proučavanje utjecaja vezanja iona Mn(II) na sekundarnu strukturu proteina korištena je metoda cirkularnog dikroizma (CD). Strukturna analiza apo proteina SloR i ScaR te njihovih kompleksa s ionima Mn(II) potvrđuje da je protein stabilan pri 4°C te da dominira sekundarna struktura  $\alpha$ -zavojnica (slike 4.17 i 4.18, slike D6 i D7 u dodatku). Linije CD spektra proteina SloR u prisutnosti iona Mn(II) (slika 4.17) povećale su se u intenzitetu, ali su zadržale oblik, pri čemu su omjeri između maksimuma na 195 nm, 208 nm i 222 nm ostali isti, što ukazuje na to da vezanje metalnih iona ne uključuje veće promjene u sekundarnoj strukturi. Povećanje intenziteta promatranoj CD spektra može se pripisati povećanju rigidnosti proteina pri vezanju metala, dok se zadržava početna sekundarna struktura. Snimljeni uzorci proteina ScaR pokazali su također povećanje u intenzitetu CD spektra prilikom dodatka iona Mn(II). No, zastupljenost pojedinačnih strukturalnih elemenata u strukturi proteina ScaR u kompleksu s ionima Mn(II) nije se mogla odrediti iz CD spektra pomoću mrežno dostupnog programa *BeStSel*. Sam spektar upućuje da najveći signal daju  $\alpha$ -zavojnice (negativni signal na 222 i 208 nm, te pozitivni signal na 195 nm) (slika 4.18). Dobiveni rezultati na proteinu SloR u skladu su s istraživanjem iz 2013. godine, gdje Haswell i sur.<sup>29</sup> nisu uočili značajnije promjene u CD spektrima proteina SloR pri dodavanju MnCl<sub>2</sub> u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 125  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  na 40  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  SloR. Međutim, najviši molarni omjer iona Mn(II) prema proteinu koji su koristili bio je ~3, dok je ovdje dodana veća relativna koncentracija iona Mn(II) u odnosu na protein (6:1) što je posljedično moglo utjecati na promjenu u intenzitetu signala. Nadalje, analiza struktura u simulacijama MD također potvrđuje da je zastupljenost pojedinih strukturalnih elemenata u oba proteina ostala većinom konstanta u apo i holo sustavima (slike D8 i D9 u dodatku) te da se prilikom aktivacije ili inaktivacije proteina za vezanje na DNA ne događa veća promjena strukturalnih elemenata već konformacijska promjene cijele molekule koja rezultira pomicanjem domena DBD jedne prema drugoj.



**Slika 4.17.** CD spektri SloR ( $c = 20 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) u  $20 \text{ mol dm}^{-3}$  HEPES puferu (koji sadrži  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl, pH = 8).



**Slika 4.18.** CD spektri ScaR ( $c = 20 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) u  $20 \text{ mol dm}^{-3}$  HEPES puferu (koji sadrži  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl, pH = 8).

Analiza sekundarne strukture mutanta SloR E14A-E17A ukazuje na to da je u ovom mutantu većinom očuvana zastupljenost  $\alpha$ -zavojnica, ali uz smanjenje zastupljenosti struktturnih elemenata  $\beta$ -ploča te povećanje neuređenosti (slika D7 u dodatku). Mutant ScaR R157A-Y211A pokazuje veće smanjenje struktturnih elemenata  $\beta$ -ploča naspram divljeg tipa proteina ScaR, ali i naspram mutanta SloR E14A-E17A. Smanjenjem zastupljenosti  $\beta$ -ploča, povećao se stupanj neuređenosti što se očituje s većom zastupljenosću neuređenih petlji (slika D6 u

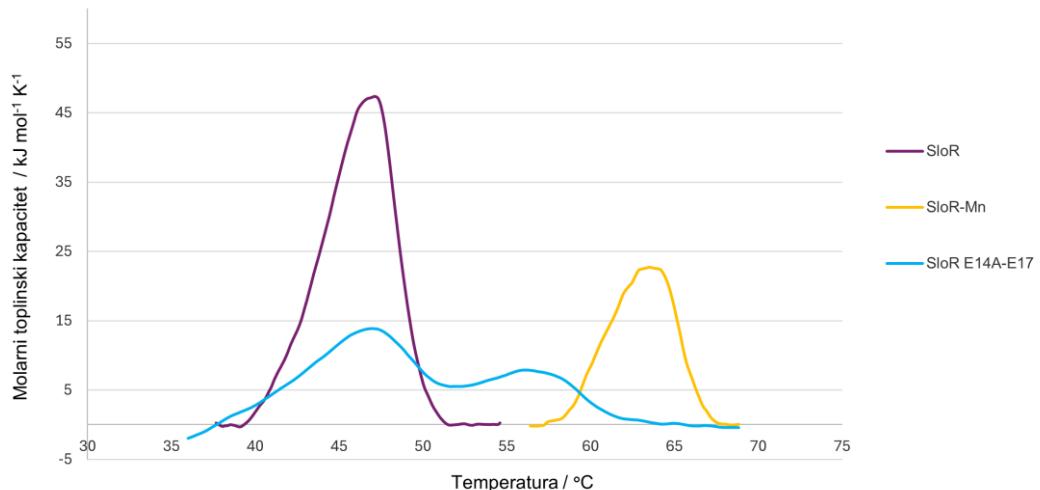
dodatku). Budući da su mutacije u proteinu ScaR uvedene u domeni FeoA gdje je pretežito struktura  $\beta$ -ploča, uočena promjena ukazuje na mogućnost nepravilnog smatanja proteina koje posljedično može utjecati i na samu sposobnost proteina za vezanje na DNA. Međutim, simulacije MD nisu pokazale neke veće razlike u sekundarnoj strukturi u usporedbi sa simulacijama divlјeg tipa proteina u apo obliku. Budući da se prilikom pripreme mutanata *in silico* mutacije uvode u već pravilno smotani oblik proteina, moguće je da uvedene mutacije nisu uspjele ostvariti utjecaj na sekundarnu strukturu proteina unutar vremena simulacije.

#### 4.2.5. Utjecaj vezanja iona Mn(II) i uvođenja mutacija na termičku stabilnost proteina

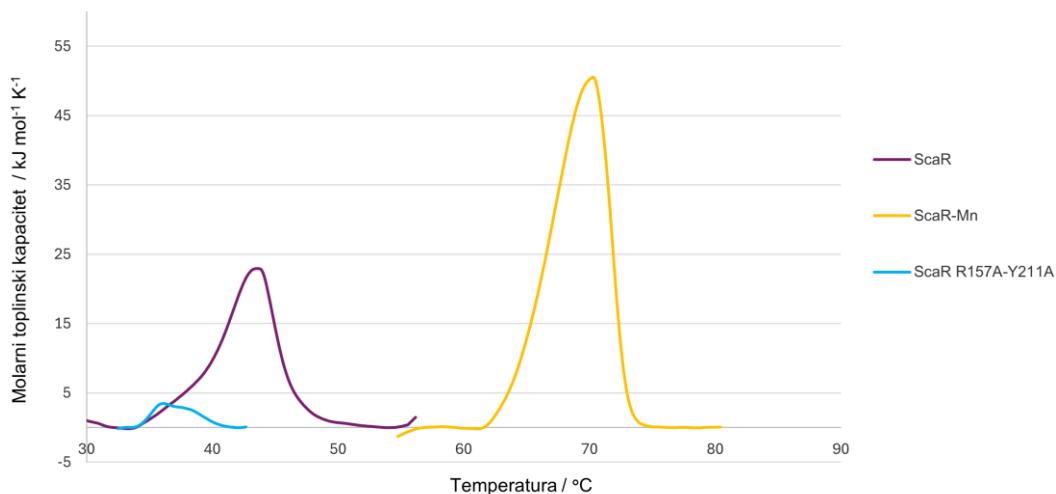
Kako bi se istražio utjecaj vezanja iona Mn(II) na termodinamiku procesa denaturacije te na termičku stabilnost proteina, provedena su mjerena metodom DSC. Termogrami dobiveni zagrijavanjem otopina proteina ScaR u apo i holo obliku, pokazuju da je kod proteina ScaR došlo do značajnog povećanja entalpije denaturacije nakon kompleksacije proteina ScaR s ionima Mn(II) (slika 4.19 i tablica 4.2). Shodno tome, temperatura denaturacije se također povećala. Termogrami dobiveni DSC istraživanjima proteina SloR pokazali su povećanje temperature denaturacije nakon kompleksacije, no za razliku od proteina ScaR, došlo je do smanjenja entalpije denaturacije (slika 4.20 i tablica 4.2). Endotermno vezanje, uočeno u ITC mjeranjima oba proteina, može se povezati s efektom stabilizacije uočenim u DSC rezultatima. Kada se ioni Mn(II) vežu za protein, stabiliziraju nativnu konformaciju proteina stvaranjem koordinacijskih veza i drugih stabilizirajućih interakcija. Kod proteina SloR ova stabilizacija smanjuje ukupnu energiju potrebnu za održavanje smotanog stanja proteina, što dovodi do smanjenja entalpije razmatanja (denaturacije) proteina. Kod proteina ScaR s druge strane, interakcije s ionima Mn(II) čine protein otpornijim na razmatanje (denaturaciju), zahtijevajući više energije da se poremeti stabilizirana struktura (kinetička stabilizacija), što rezultira povećanjem promjene entalpije tijekom razmatanja (denaturacije) proteina.

Nadalje, uvođenje mutacija u oba proteina imalo je značajan utjecaj na stabilnost proteina (slika 4.19 i 4.20 te tablica 4.2). Uvođenje mutacija u protein ScaR dovelo je do velikog smanjenja u termičkoj stabilnosti proteina, ali i u entalpiji denaturacije. Utjecaj na stabilnost proteina uočen je i pri samom pročišćavanju proteina, gdje je mutant ScaR R157A-Y211A bio puno osjetljiviji na promjene uvjeta u odnosu na divlji tip proteina zbog čega je i djelomično izmijenjen protokol za pročišćavanje mutanta (poglavlje 4.2.1.). Budući da su mutacije uvedene na poziciju

aminokiseline R157 koja je visoko sačuvana kod pripadnika ove skupine proteina, dobivena promjena u stabilnosti mutanta naspram divljeg tipa proteina mogla se očekivati. S druge strane, DSC analiza mutanta proteina SloR pokazala je također smanjenje stabilnosti proteina u odnosu na divlji tip. Na DSC termogramu mutanta SloR E14A-E17A vidljiva su dva blago istaknuta i raširena vrha koja najvjerojatnije ukazuju na to da protein agregira prilikom mjerena. Druga pretpostavka je da uzorak mutanta SloR E14A-E17A sadrži mješavinu različitih konformacija ili izoformi proteina, od kojih svaka ima svoju temperaturu razmotavanja, no budući da su vrhovi dosta rastegnuti pretpostavka da mutant proteina SloR agregira tokom mjerena je vjerojatnija.<sup>91</sup>



**Slika 4.19.** Utjecaj vezanja iona Mn(II) i uvođenja mutacija na termičku stabilnost proteina SloR prema mjerenjima DSC.



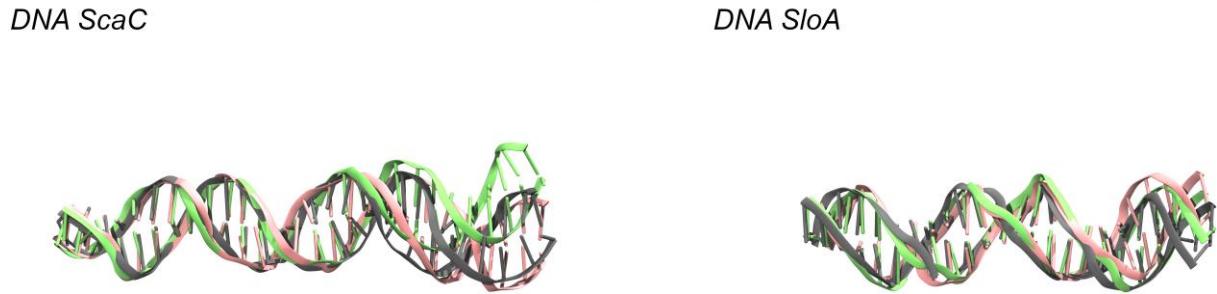
**Slika 4.20.** Utjecaj vezanja iona Mn(II) i uvođenja mutacija na termičku stabilnost proteina ScaR prema mjeranjima DSC.

**Tablica 4.2.** Vrijednosti temperature i entalpije razmotavanja proteina SloR i ScaR dobivene metodom DSC

uzorak	$\theta_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_m / \text{kJ mol}^{-1}$
ScaR	43,6	136,8
ScaR-Mn(II)	70,2	280,3
ScaR R157A-Y211A	36,1	13,9
SloR	46,3	282,1
SloR-Mn(II)	63,2	128,2
SloR E14A-E17A	46,9	166,4

### 4.3. Rezultati *in silico* uklapanja proteina na DNA

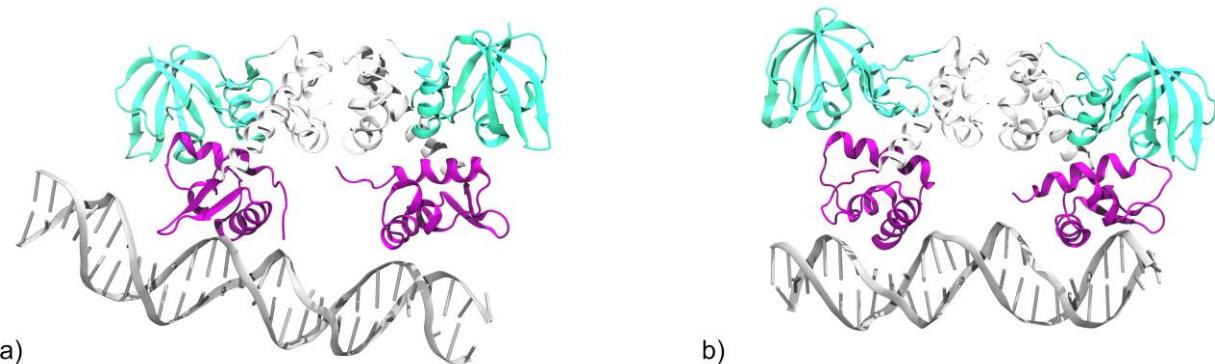
Prije samog uklapanja proteina i DNA, postupkom klasteriranja odabrane su strukture proteina i DNA koje će se koristiti za uklapanje. Odabrana granična vrijednost (eng. *cutoff*) u razlikama vrijednosti RMSD struktura za ScaR bila je 2,1 Å, za SloR 2,3 Å, za DNA ScaC 3,0 Å, te za DNA SloA 2,5 Å. Predstavnici prva tri najnapučenija klastera DNA *SloA* i *ScaC* koji su korišteni za račune uklapanja prikazani su na slici 4.21. Predstavnik prvog klastera DNA *SloA*, u tekstu će biti označen SloA-M1 (M1 - Model 1), predstavnik drugog klastera SloA-M2 te trećeg klastera SloA-M3. Predstavnici DNA *ScaC*, analogno će biti označeni ScaC-M1, ScaC-M2 te ScaC-M3. Najveća razlika u tri odabrana modela DNA *ScaC* je izvijenost DNA i samim tim oblik velikih utora na DNA (slika 4.21).



**Slika 4.21.** Predstavnici prva tri najnapučenija klastera DNA *SloA* i *ScaC* tijekom 150 ns simulacije MD. Predstavnici klastera: M1 označen sivo, M2 označen ružičastom te M3 označen zelenom bojom.

Rezultati računa uklapanja proteina SloR i ScaR na DNA, potvrdili su da je za pravilno pozicioniranje proteina na DNA ključna udaljenost između domena DBD proteina, ali su također pokazali da je i konformacija (izvijenost) koju molekula DNA zauzima izuzetno važna za pravilno pozicioniranje. Energije najboljih 10 modela protein-DNA koje su dobivene prilikom računa uklapanja navedene su u tablicama u dodatku (tablica D1-D8 u dodatku). Općenito, uklapanje svih sustava proteina ScaR na ScaC-M1 te sustava proteina SloR na SloA-M1 pokazalo je najbolje rezultate na temelju energije uklapanja, ali i na temelju vizualne analize same strukture modela kompleksa protein-DNA.

Prilikom računa uklapanja sustava *apo\_SloR* i *apo\_ScaR* te sustava *SloR\_a,s* i *ScaR\_a,s* na DNA, protein se pozicionira u jedan od dva velika utora DNA s jednom domenom DBD tj. samo jedan monomer stupa u kontakt s DNA (slika 4.22.a). Budući da je udaljenost između dva velika utora u B-DNA približno jednaka 34 Å, a udaljenost između centra mase domena DBD u sustavima *apo\_SloR* i *apo\_ScaR* te *SloR\_a,s* i *ScaR\_a,s* veća od 38 Å ovakvi rezultati bili su očekivani. U nekim od najniže rangiranih modela kompleksa protein-DNA, dobivenih uklapanjem navedenih sustava proteina na DNA, domena FeoA ostvarivala je nespecifične interakcije s DNA. Domena FeoA, još poznata kao i domena nalik domeni SH3, ima ulogu u interakciji i prijenosu signala<sup>31</sup> među proteinima, ali ne i u interakciji proteina i DNA zbog čega se ovi dobiveni modeli mogu smatrati artefaktima računa uklapanja.



**Slika 4.22.** Modeli sustava kompleksa protein-DNA dobiveni računima uklapanja pomoću programa *PyDockDNA*. a) Model koji je nasumični rezultat uklapanja i ne predstavlja dobar početni model za simulacije kompleksa protein i DNA; b) model koji je sličan dosad poznatim kompleksima homolognih proteina s DNA i predstavlja vjerodostojan početni model za simulacije kompleksa protein-DNA

Nadalje, prilikom računa uklapanja sustava *SloR\_p* i *ScaR\_p* te sustava *SloR\_p,a,s* i *ScaR\_p,a,s* na DNA najbolji modeli sustava bili su pozicionirani s obje domene DBD u dva velika susjedna utora DNA (slika 4.22.b). Udaljenost između domena DBD u ovim sustavima proteina iznosi  $\sim 34$  Å, što točno odgovara udaljenosti između dva susjedna velika utora u molekuli B-DNA. Međutim, u nekim od visoko rangiranih modela dobivenih računima uklapanja ovih proteina SloR i ScaR na DNA, protein se pozicionira u jedan od dva velika utora DNA s jednom domenom DBD tj. samo s jednim monomerom stupa u kontakt s DNA. Dobivene strukture kompleksa protein-DNA slične su rezultatima računa uklapanja kod kojih su korištene strukture proteina s udaljenijim domenama DBD.

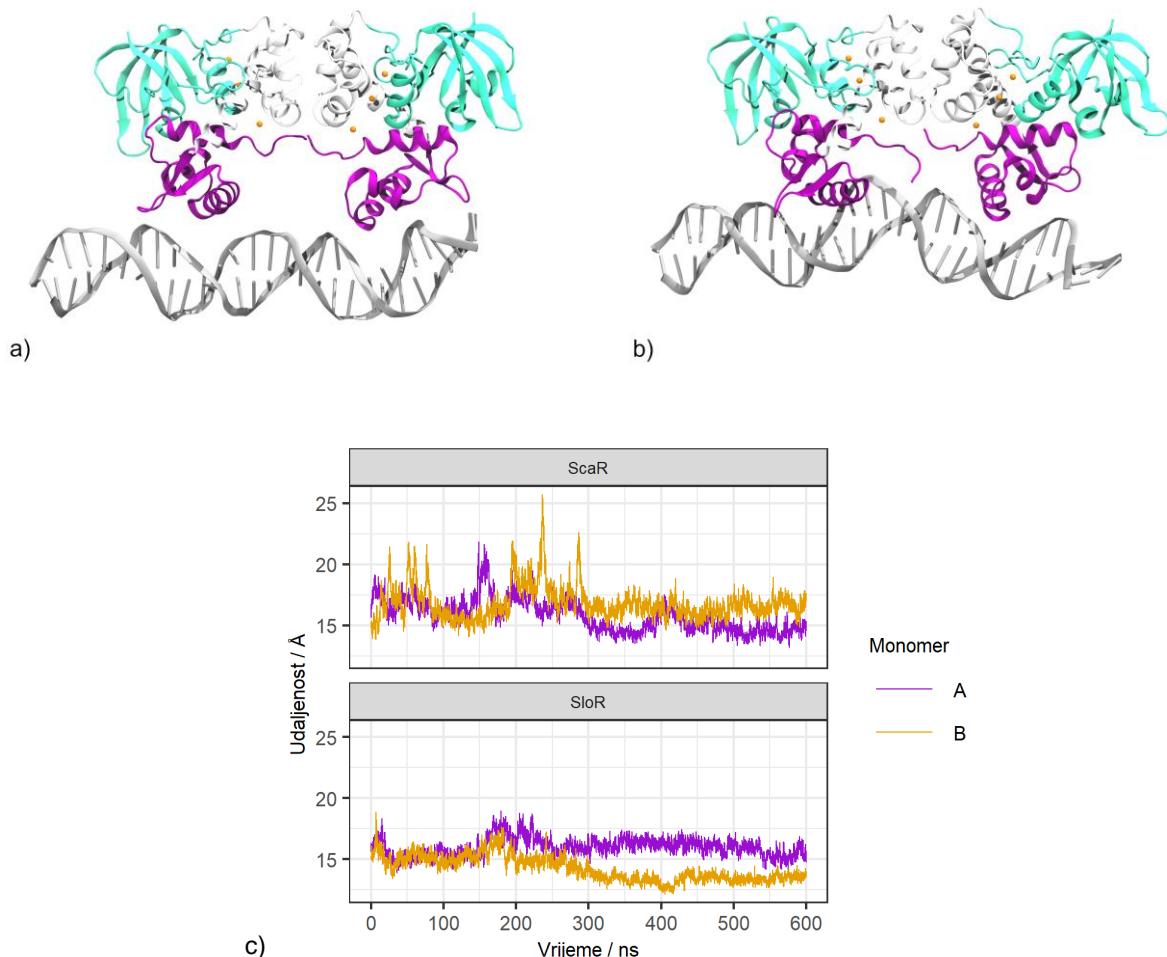
Razriješene kristalne strukture homolognih proteina represora IdeR (PDB kod: 1U8R), DtxR (PDB kod: 1F5T) i MntR (PDB kod: 9C4C) u kompleksu s DNA pokazale su da se protein pozicionira unutar oba susjedna dva utora DNA zbog čega je za daljnje simulacije kompleksa protein DNA odabran najbolji model između proteina SloR i DNA *SloA* te najbolji model između proteina ScaR i DNA *ScaC* u kojem se obje domene DBD nalaze unutar velikih utora DNA. Najbolji modeli odabrani su na temelju njihove potencijalne energije dobivene računima uklapanja i na temelju sličnosti s razriješenim kristalnim strukturama kompleksa protein-DNA. Odabrani model za simulacije kompleksa protein-DNA za protein ScaR bio je četvrto rangirani

model kompleksa *ScaR\_p,a,s* – ScaC-M1, a za protein SloR bio je prvo rangirani model kompleksa *SloR\_p,a,s* – SloA-M1.

#### 4.4. Rezultati simulacije molekulske dinamike proteina SloR i ScaR s DNA

Proteini SloR i ScaR imaju međusobno visoko očuvane aminokiselinske bočne ogranke u zavojnicama koje vežu DNA (slika 2.5) te se u stanici vežu na identične palindromske sekvene DNA koje su bogate adenozinom i timidinom. Kao zadnji korak računalnog dijela istraživanja provedene su simulacije MD kompleksa aktivnog oblika proteina SloR i ScaR s njihovim specifičnim palindromskim sekvencama DNA.

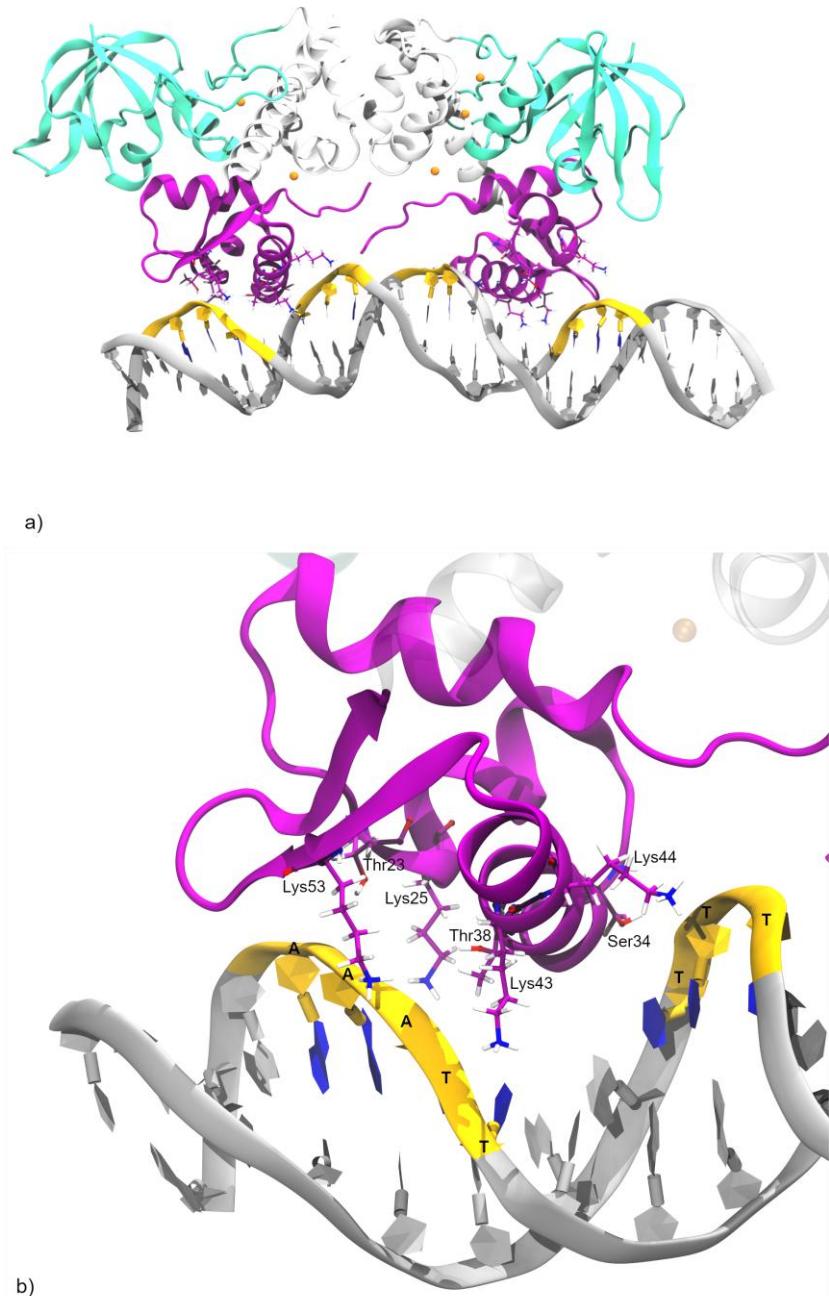
Simulacije MD pokazale su da ključnu ulogu za pravilno pozicioniranje tj. vezanje proteina ima sama konformacija DNA. Simulacije kompleksa ScaR i DNA *ScaC* pokazale su da početni model iz kojeg su krenule simulacije nije bio povoljan za stabilno vezanje/pozicioniranje proteina na DNA. Tijekom početnog dijela simulacija MD, protein ScaR je naizmjenično, poput „klackalice“, s jednom domenom DBD sjedao unutar velikog utora DNA i izlazio van. Na otprilike trećini od ukupnog vremena simuliranja, DNA i ScaR su se malo udaljili (slika 4.23.c) te nisu međusobno više ostvarivali interakcije. U tom periodu od otprilike 100 ns, DNA se neovisno o proteinu izvijala te je mijenjala svoju konformaciju, pritom se oblik same zavojnice nije mijenjao te je DNA bila oblika B zavojnice. Zatim se protein ScaR ponovno pozicionirao na izmijenjenu DNA i ostao u stabilnom kompleksu s DNA do kraja simulacije (slika 4.23.a-b). Nasuprot tome, simulacije kompleksa SloR i DNA *SloA* pokazale su da je početna struktura modela iz kojeg su krenule simulacije bila povoljna za održavanje stabilnog kompleksa protein i DNA. Tijekom simulacije došlo je do minimalnog pomaka DNA veznih zavojnica od DNA te je krajnja udaljenost DNA veznih zavojnica bila identična kao i u stabilnom kompleksu ScaR – DNA *ScaC* (slika 4.23.c). Na temelju udaljenosti DNA veznih zavojnica od DNA moglo bi se zaključiti da vezanje proteina na DNA nije u potpunosti simetrično, već da se jedna domena DBD nalazi dublje unutar velikog utora DNA, dok se druga strana nalazi malo plića unutar velikog utora DNA. Obje simulacije su također pokazale da se fluktuacije u gibanju DNA smanje kada je DNA u kompleksu s proteinom u odnosu na simulacije same DNA (slika D10 u dodatku).



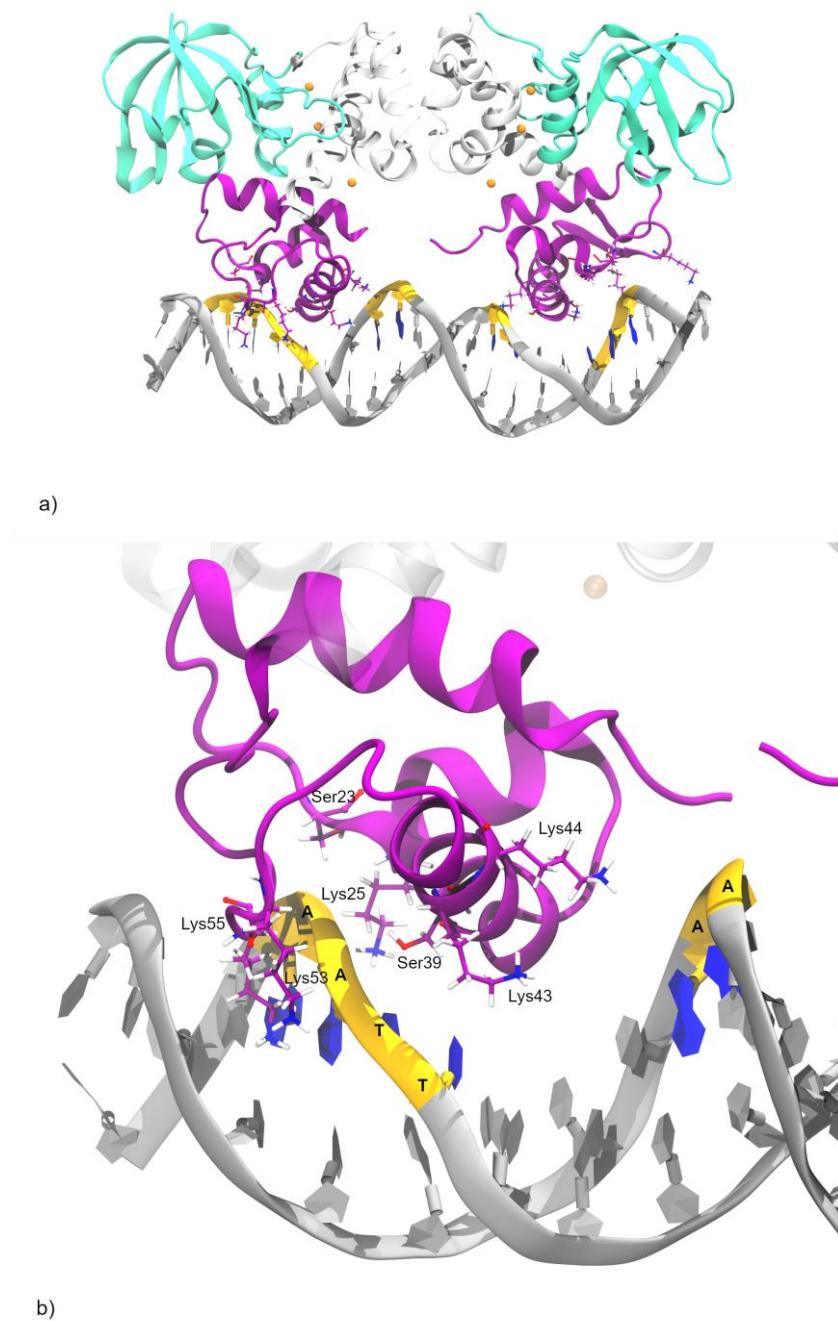
**Slika 4.23.** Kompleks protein ScaR i DNA *ScaC* u simulacijama MD. a) Nakon odvajanja proteina i DNA zbog nepogodne konformacije DNA. b) Nakon ponovnog kompleksiranja proteina i DNA zbog promjene konformacije DNA. c) Udaljenost centra mase DNA veznih zavojnica od DNA tijekom simulacije MD kompleksa protein-DNA.

Nadalje, svaki monomer proteina SloR i ScaR prepoznaje palindromski slijed DNA. DNA-vezna N-terminalna domena s motivom krilate spirale (wHTH) nalazi se usidrena u DNA na rubovima susjedna dva velika utora pomoću neveznih interakcija koje se stvaraju između proteina i šećerno fosfatne okosnice DNA (slika 4.24 i 4.25). Za stabilnost kompleksa protein-DNA najbitniju ulogu imaju bočni ogranci lizina (Lys21, Lys25, Lys43, Lys44, Lys53, Lys55) u DNA veznim zavojnicama koji stvaraju solni most i vodikove veze s fosfatnim skupinama na šećerno-fosfatnoj okosnici DNA. Osim za bočne ogranke Lys25 i Lys53, bitno je napomenuti

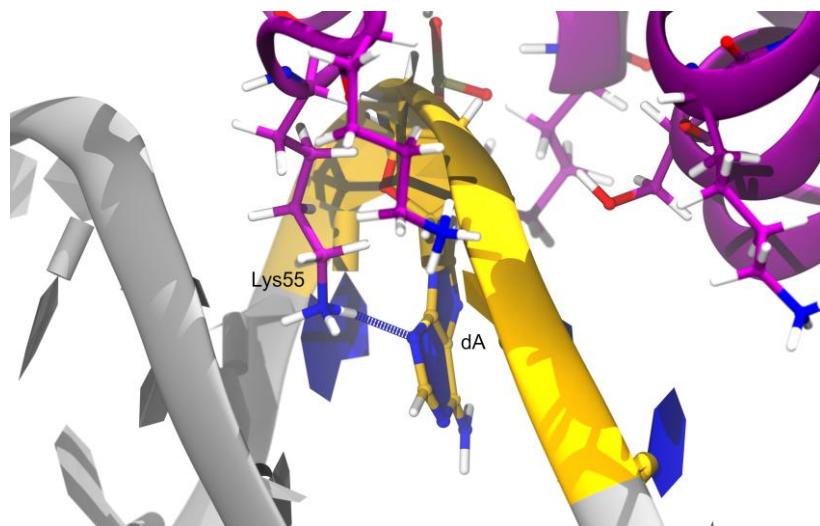
da vodikove veze ili solni mostovi koje su ostvarivali ostali Lys sa šećerno-fosfatnom okosnicom nisu bili simetrični u oba monomera. Lys25 iz prve zavojnice motiva wHTH te Lys53 iz petlje izvan motiva wHTH najvjerojatnije imaju ulogu pri početnom sidrenju proteina koje onda pozicioniraju drugu zavojnicu tzv. zavojnicu za prepoznavanje unutar velikih utora DNA<sup>92</sup>. Nadalje, u simulacijama kompleksa protein ScaR-DNA *ScaC*, Lys43 iz jednog monomera se također vezao vodikovom vezom s adeninskom dušičnom bazom u velikom utoru DNA, dok se Lys55 iz jednog monomera u simulacijama kompleksa SloR-DNA *SloA* vezao vodikovom vezom s adeninskom dušičnom bazom u malom utoru DNA (slika 4.26). Za razliku od elektrostatskih interakcija, ova vodikova veza u oba proteina nije bila prisutna tijekom većine simulacije već samo ~20 % vremena simulacije.



**Slika 4.24.** Kompleks ScaR i DNA *ScaC*. a) Cijeli kompleks s istaknutim aminokiselinama i bazama koje interagiraju. b) Položaj DNA vezne domene s motivom wHTH u velikom utoru DNA. Žutom bojom označene su baze s kojima istaknute aminokiseline najčešće interagiraju tijekom simulacija MD.

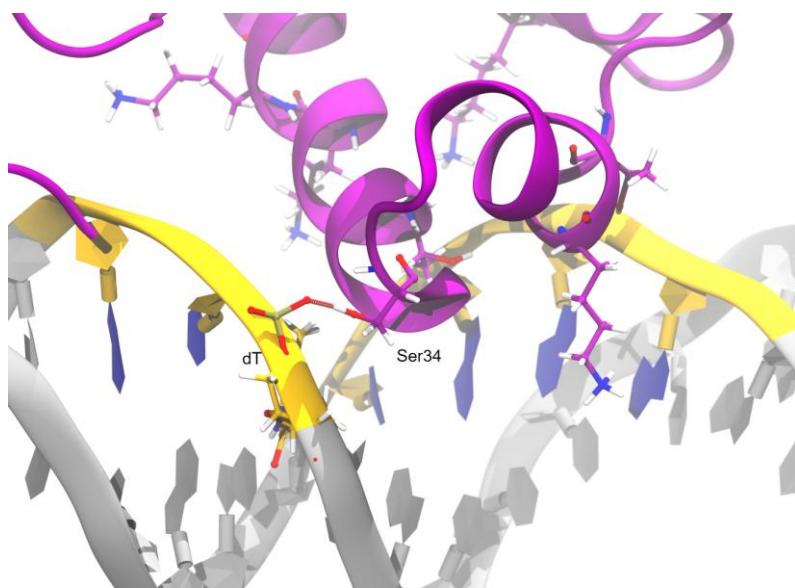


**Slika 4.25.** Kompleks SloR i DNA *SloA*. a) Cijeli kompleks s istaknutim aminokiselinama i bazama koje interagiraju. b) Položaj DNA vezne domene s motivom wHTH u velikom utoru DNA. Žutom bojom označene su baze s kojima istaknute aminokiseline najčešće interagiraju tijekom simulacija MD.



**Slika 4.26.** Interakcija Lys55 s dušičnom bazom adenozina u malom utoru DNA.

Osim navedenih vodikovih veza, tijekom simulacija oba kompleksa protein-DNA pojavljivale su se vodikove veze i/ili solni mostovi između polarnih aminokiselinskih bočnih ograna Ser34 i Ser39 (ScaR)/Thr39 (SloR) u DNA veznim zavojnicama te šećerno-fosfatne okosnice DNA. Vodikova veza između Ser34 u jednom monomeru i šećerno-fosfatne okosnice DNA bila je najzastupljenija vodikova veza (~85% vremena simulacije) (slika 4.27), dok su interakcije Ser39 tj. Thr39 i šećerno-fosfatne okosnice DNA bile kratkoročnije (zastupljenost <5% vremena simulacije). Ova globalna asimetričnost u vezanju proizlazi iz već spomenute činjenice da se DNA vezne zavojnice u jednom monomeru nalaze dublje unutar velikog žlijeba DNA, za razliku od DNA veznih zavojnica u drugom monomeru (slika 4.23.c).



**Slika 4.27.** Interakcija Ser34 sa šećerno-fosfatnom okosnicom u velikom utoru DNA.

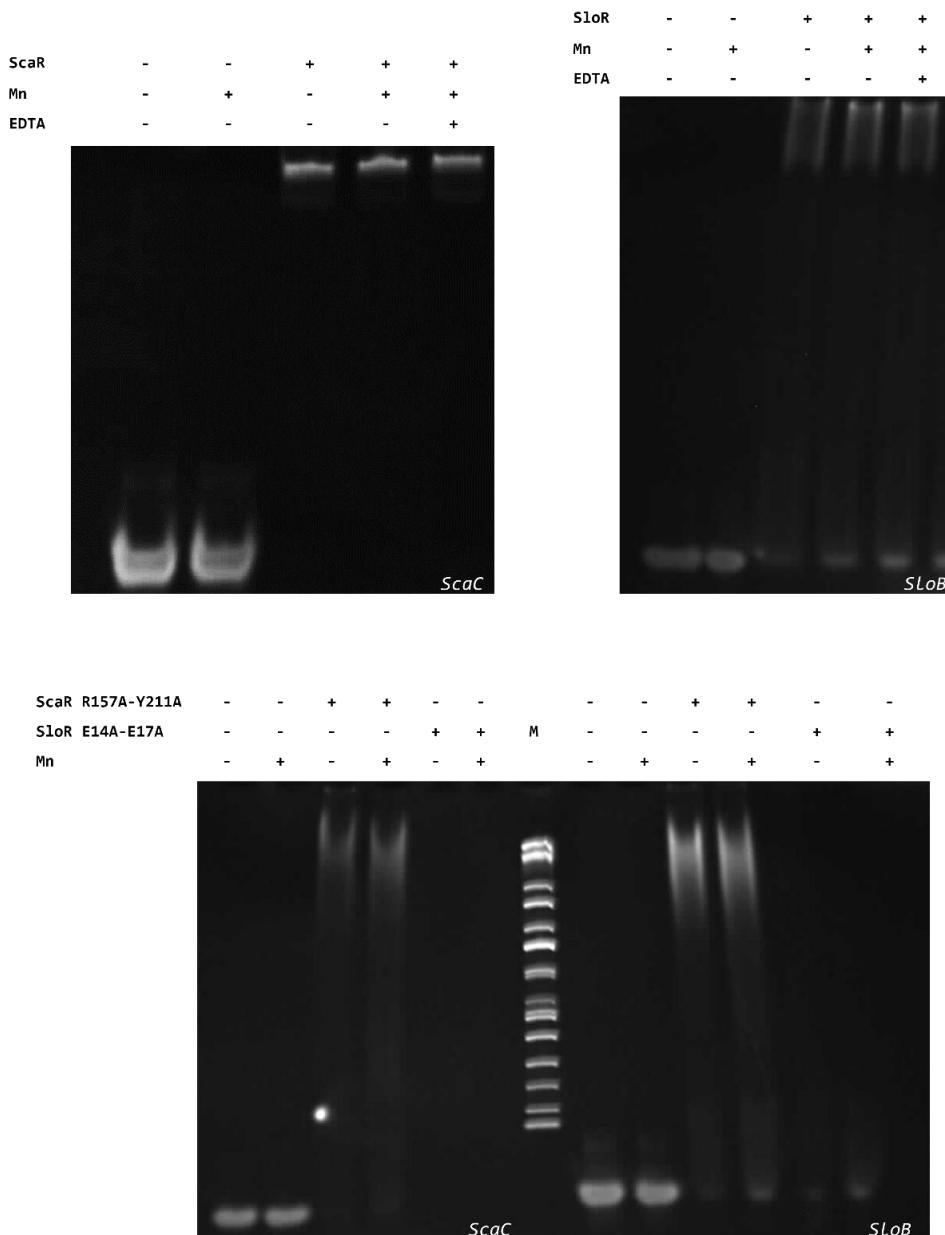
Prijašnja istraživanja pokazala su da se specifičnost transkripcijskih faktora *in vivo*, odnosno njihova sposobnost razlikovanja vlastitih ciljnih sekvenci od sličnih, smatra posebno važnom za pravilnu regulaciju ekspresije gena. Vodikove veze se zbog svoje ovisnosti o geometriji, često se smatraju nositeljima te specifičnosti, ali u nekim kompleksima proteina i DNA zapravo ih nema. Istraživanja napravljena na homolognom proteinu IdeR iz *M. tuberculosis* pokazala su slične rezultate kao i istraživanja napravljena u sklopu ove doktorske disertacije na proteinima SloR i ScaR, a to je da je unutar provedene simulacije kompleksa IdeR i DNA uočena samo jedna vodikova veza između dušične baze i aminokiselinskog bočnog ogranka Gln43.<sup>92</sup> Nastavno na prvo istraživanje proteina IdeR, napravljeno je novo istraživanje 2021. godine gdje je uočen mehanizam tzv. indirektnog čitanja (eng. *indirect readout*) DNA, pri kojem se protein IdeR oslanja na oblik zavojnice, a ne na interakcije s dušičnim bazama kako bi se vezao na pravi slijed nukleotida.<sup>87</sup> Specifični obrasci parova baza određuju kakav će biti oblik zavojnice tj. utora u DNA. Budući da su istraživanja na proteinu SloR i ScaR također pokazala da u interakciji proteina i DNA najveći utjecaj ima struktura DNA, moguće je da ova dva proteina koriste isti mehanizam kao i njihov homolog IdeR. Nadalje, simulacije proteina IdeR dovele su do prijedloga dva modela vezanja za DNA. Prvi model sugerira da je važno sidro, tj. snažno vezana DNA-vezna zavojnica jednog monomera koja regulira vezanje DNA-vezne zavojnice u drugom monomeru. Drugi model sugerira da jedan dimer potiče vezanje drugog dimera.<sup>92</sup> Što se tiče prvog modela, opisana asimetrija u vezanju za DNA uočava se kod

različitih proteina iz obitelji DtxR/IdeR, uključujući proteine SloR i ScaR, gdje se jedna domena DBD nalazi dublje vezana unutar velikog utora za razliku od druge domene DBD. S obzirom na to da su navedena dva kompleksa (SloR i ScaR s DNA) dobivena *in silico*, može se postaviti pitanje je li uzrok tome to što protein nije namješten na DNA u idealnoj konformaciji. No, simulacija IdeR-DNA kompleksa temeljena na strukturi dobivenoj kristalografskom pokazala je sličan rezultat. Moguće je da opisana pojava asimetričnosti pomaže kompleksu da njegova stabilnost bude optimalna. Vezanje proteina SloR i ScaR za DNA nije previše čvrsto (većina interakcija je elektrostatska), što im omogućava lakšu disocijaciju kao odgovor na smanjenje koncentracije iona Mn(II).

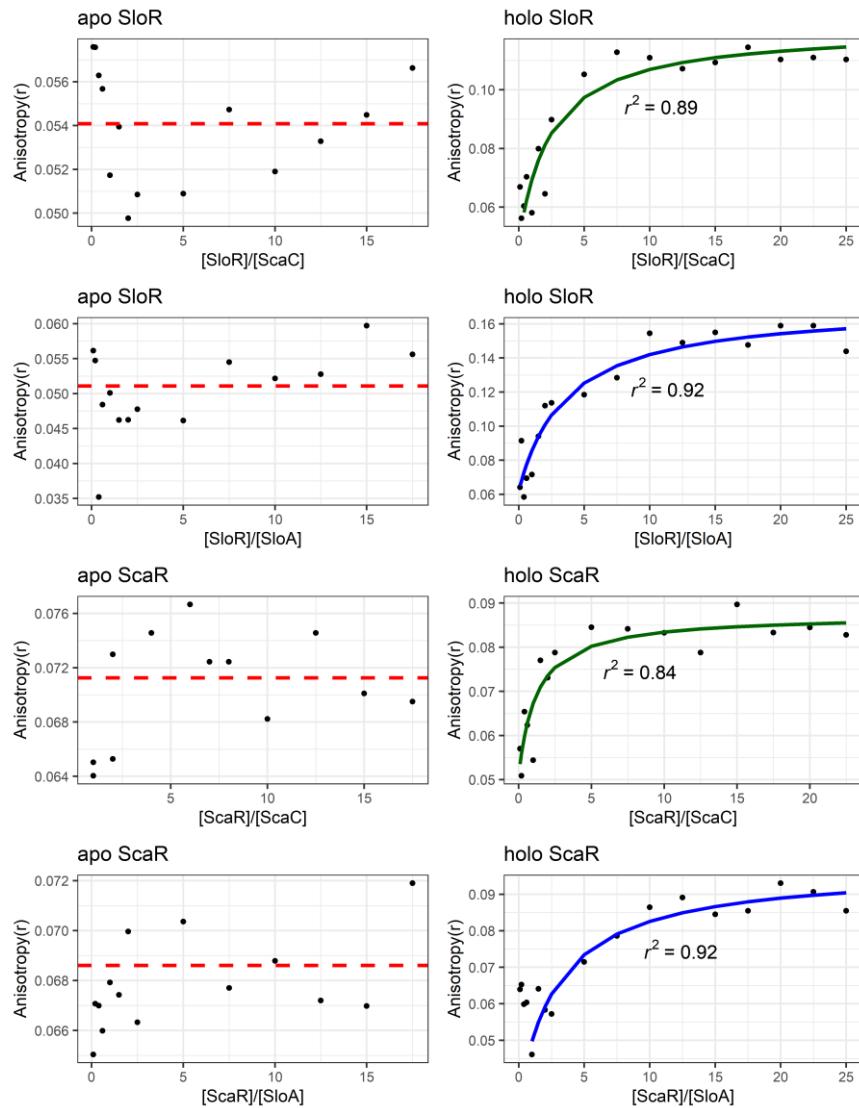
#### 4.5. Testovi vezanja izoliranih proteina SloR i ScaR na DNA

Provjera mogućnosti vezanja izoliranih proteina u apo, holo te mutiranom obliku provedena je pomoću metode EMSA i FA. Testovi vezanja napravljeni su na dvije različite sekvene DNA (tablica 3.6).

U uvjetima u kojima je provedena metoda EMSA, pokazalo se da divlji tip i mutanti proteina SloR i ScaR stvaraju kompleks s DNA, neovisno o prisutnosti iona Mn(II) (slika 4.28). Odnosno, samo prisustvo proteina u uzorku dovodi do stvaranja kompleksa protein-DNA što rezultira usporavanjem elektroforetske pokretljivosti DNA na gelu. Metoda FA, s druge strane, pokazala je da je vezanje tj. stvaranje kompleksa divljevog tipa proteina s DNA ovisno o ionima Mn(II). U prisutnosti iona Mn(II), test vezanja metodom FA pokazao je da dolazi do povećanja anizotoprije sustava, dok je u odsustvu iona Mn(II) vrijednost anizotropije bila otprilike konstanta (slika 4.29). Porast anizotropije ukazuje na to je došlo do stvaranja kompleksa jer se fluorofor (FAM obilježena DNA) sporije giba u otopini te je emitirana svijetlost manje depolarizirana.



**Slika 4.28.** Test pomaka elektroforetske pokretljivosti DNA *ScaC* i *SloB*. Gore lijevo: divlji tip proteina ScaR i DNA *ScaC*, gore desno: divlji tip proteina SloR i DNA *SloA*, donji dio slike: mutanti ScaR-R157A-Y211A te SloR E14A-E17A i obje DNA *ScaC* te *SloA*.



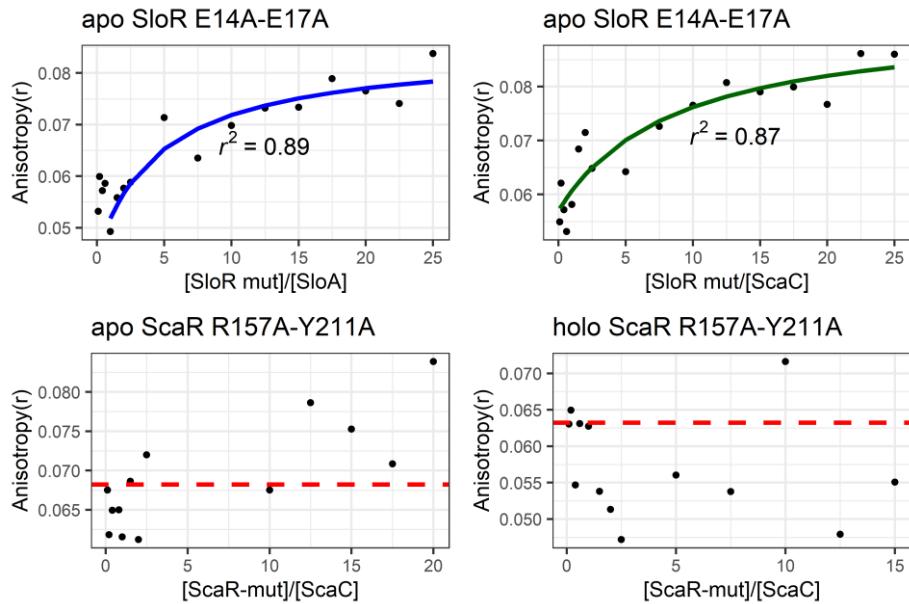
**Slika 4.29.** Test vezanja divljenog tipa proteina SloR i ScaR na DNA metodom FA. Istraživanje je provedeno s  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$  DNA (FAM obilježena) u puferu za analizu koja je titrirana s otopinom apo ili holo proteina ( $\sim 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$  proteina s  $0,7 \text{ mol dm}^{-3}$  Mn(II) u puferu za analizu). Očekivana stehiometrija vezanja proteina i DNA bila je 1:1 te su podaci prilagođeni (eng. *fit*) nelinearnom modelu prema izrazu 3.4. Crvena linija označava vrijednost anizotropije same FAM-obilježene DNA.

Dobivene konstante disocijacije  $K_d$  (tablica 4.3) pokazale su da oba divlja tipa proteina imaju veći afinitet prema sekvenci DNA *ScaC* nego prema sekvenci DNA *SloA* što je u skladu s prethodnim istraživanjima.<sup>6,93</sup> Mjerenja metodom FA koja su provedena s mutantom SloR E14A-E17A pokazuju da ovaj oblik proteina može formirati kompleks s DNA i bez pristunosti Mn(II), dok je mutant ScaR R157A-Y211A potpuno izgubio mogućnost vezanja na DNA (slika 4.30).

**Tablica 4.3.** Konstante disocijacije proteine i DNA dobivene metodom fluorescencijske anizotropije

Uzorak	dDNA	$K_d / \text{nM}$	$p$ - value
ScaR-wt* + Mn(II)	ScaC / SloB	121	0,091
	SloA	300	0,144
SloR-wt* + Mn(II)	ScaC / SloB	235	0,099
	SloA	362	0,031
SloR E14A-E17A	ScaC / SloB	866	0,156
	SloA	478	0,201

\*wt – divlji tip proteina (eng. *wild type*)



**Slika 4.30.** Test vezanja mutanta proteina SloR i ScaR na DNA metodom FA. Istraživanje je provedeno s  $10 \text{ nmol dm}^{-3}$  DNA (FAM obilježena) u puferu za analizu koja je titrirana s otopinom apo ili holo proteina ( $\sim 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$  proteina s  $0.7 \text{ mol dm}^{-3}$  Mn(II) u puferu za analizu). Očekivana stehiometrija vezanja proteina i DNA bila je 1:1 te su podaci prilagođeni (eng. fit) nelinearnom modelu prema izrazu 3.4. Crvena linija označava vrijednost anizotropije same FAM-obilježene DNA.

Iako su obje metode iskorištene za ispitivanje sposobnosti vezanja izoliranih proteina s DNA, razlike u rezultatima između metoda vjerojatno su posljedica eksperimentalnih uvjeta kao što je korištenje različitog pufera, koncentracija soli u puferu itd. Prema dobivenim rezultatima, metoda EMSA je manje pouzdana od FA jer se reproducibilnost metode EMSA pokazala jako teškom.

## § 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu istražen je alosterički mehanizam kojim ioni Mn(II) utječu na promjenu konformacije homolognih proteina SloR i ScaR te posljedično na njihovu aktivaciju (i inaktivaciju) za vezanje na molekulu DNA. U apo obliku, proteini SloR i ScaR zauzimaju konformaciju u kojoj su centri masa DNA-veznih domena udaljeni za više od 41 Å što onemogućava adekvatno vezanje na DNA kod koje udaljenost dva susjedna velika utora iznosi 34 Å. Vezanje iona Mn(II) u primarno vezno mjesto rezultira konformacijskom promjenom proteina koja dovodi do međusobnog približavanja domena DBD na udaljenost od ~34 Å, pri čemu se i fleksibilnost domena DBD smanji u odnosu na apo-protein. Prilikom promjene konformacije iz apo u holo oblik proteina, dolazi do reorganizacije vodikovih veza između domene FeoA i DBD.

Eksperimentalno je istražen afinitet i stehiometrija vezanja iona Mn(II) za proteine SloR i ScaR. Mjerenja metodom ITC pokazala su da dodavanjem otopine iona Mn(II) u uzorak proteina SloR nastaju dva kompleksa: SloR<sub>2</sub>Mn<sub>2</sub> te SloR<sub>2</sub>Mn<sub>4</sub>, dok dodavanjem otopine Mn(II) u uzorak proteina ScaR nastaju tri kompleksa: ScaR<sub>2</sub>Mn, ScaR<sub>2</sub>Mn<sub>2</sub> i ScaR<sub>2</sub>Mn<sub>4</sub>. Kompleks SloR<sub>2</sub>Mn<sub>4</sub> prevladava tijekom većine titracije, čak i pri približno ekvimolarnom omjeru proteina SloR i Mn(II). Za sustav proteina ScaR i Mn(II), vidljivo je da tek nakon dodatka više od dva ekvivalenta iona Mn(II) po monomeru proteina, kompleks ScaR<sub>2</sub>Mn<sub>4</sub> prevladava tijekom ostatka titracije dok su pri relativno niskom omjeru Mn:ScaR također prisutni kompleksi ScaR<sub>2</sub>Mn i ScaR<sub>2</sub>Mn<sub>2</sub>. Za oba sustava proteina i Mn(II), svi procesi su bili entropijski povoljni. Mjerenja ITC i simulacije MD potvrstile su da postoji određeni redoslijed u vezanju iona metala, koji dovodi do reorganizacije strukture proteina, a time i do konačne organizacije strukture. Osim metodom ITC, stehiometrija vezanja iona Mn(II) za proteine SloR i ScaR istražena je metodom EPR. Prema rezultatima dobivenim metodom EPR, oba proteina vežu po tri iona Mn(II) po monomeru, odnosno šest iona Mn(II) po dimeru proteina. Iako se rezultati dobiveni metodom EPR ne slažu u potpunosti s rezultatima dobivenim metodom ITC, treba napomenuti da se na temelju dobivenih ITC podataka ne može isključiti mogućnost interakcije proteina s trećim ionom Mn(II). Ta interakcija mogla bi biti izoentalpijska ili

preslabu da bi rezultirala značajnim stupnjem kompleksacije pri uvjetima korištenim prilikom provođenja metode ITC. Nadalje, eksperimenti napravljeni metodama CD i DSC pokazali su da prisustvo iona Mn(II) nema značajan utjecaj na sekundarnu strukturu proteina SloR i ScaR, ali značajno povećava termičku stabilnost proteina.

Računi molekulskog uklapanja (eng. *docking*) proteina na DNA pokazali su da ključnu ulogu za pravilno pozicionirane proteina na DNA ima razmak između DNA veznih domena (~34 Å), kao i izvijenost molekule DNA. Vezanje proteina na DNA nije u potpunosti simetrično. Jedna domena DBD nalazi se dublje unutar velikog utora DNA, dok se druga strana nalazi pliće unutar drugog velikog utora DNA. Većina interakcija koje se ostvaruju između proteina i DNA su elektrostatske prirode te proteini SloR i ScaR najvjerojatnije prepoznaju svoju odgovarajuću sekvencu na temelju oblika zavojnice DNA (princip indirektnog čitanja).

Eksperimentalno je također potvrđeno da je za vezanje proteina na DNA bitna prisutnost iona Mn(II) te da se oba proteina jače vežu za promotorsku sekvencu DNA *ScaC/SloB*. U divlji tip proteina SloR i ScaR uvedene su mutacije na pozicije aminokiselinskih bočnih ograna koji ostvaruju vodikove veze između domene FeoA i DBD. Mutacije su uvedene kako bi se istražio utjecaj tih aminokiselina na stabilnost i pravilnu regulaciju aktivacije proteina SloR i ScaR. Uvođenje mutacije SloR E14A-E17A rezultiralo je oblikom proteina SloR koji može vezati DNA i bez prisustva iona Mn(II) dok je uvođenje mutacije ScaR R157A-Y211A rezultiralo oblikom proteina ScaR koji je izgubio mogućnost vezanja na DNA i u prisustvu iona Mn(II). Oba mutanta proteina su bila termički nestabilnija u odnosu na divlji tip.





## § 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

### Popis kratica:

CD	circularni dikroizam
DSC	razlikovna pretražna kalorimetrija
EPR	elektronska paramagnetska rezonancija
FA	fluorescencijska anizotropija
ITC	izotermna titracijska kalorimetrija
MD	molekulska dinamika

Amp              ampicilin

### Popis aminokiselina:

Ala (A)	Alanin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Aspartat
Arg (R)	Arginin
Cys (C)	Cistein
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutamat
Gly (G)	Glicin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Izoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lizin
Met (M)	Metionin
Phe (F)	Fenilalanin
Pro (P)	Prolin
Ser (S)	Serin
Thr (T)	Treonin
Trp (W)	Triptofan
Tyr (Y)	Tirozin
Val (V)	Valin



## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. J. Lippard, J. M. Berg, D. A. Capdevila, K. A. Edmonds, and D. P. Giedroc, *Essays Biochem* **61** (2017) 177–200.
2. S. Aggarwal, and M. Kumaraswami, *Front Cell Dev Biol* **10** (2022) 1307.
3. K. E. Stoll, W. E. Draper, J. I. Kriegman, M. V. Golynskiy, R. A. T. Brew-Appiah, R. K. Phillips, H. K. Brown, W. A. Breyer, N. S. Jakubovics, H. F. Jenkinson, R. G. Brennan, S. M. Cohen, and A. Glasfeld, *Biochemistry* **48** (2009) 10308.
4. J. A. D'Aquino, J. Tetenbaum-Novatt, A. White, F. Berkovitch, and D. Ringe, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005) 18408–18413.
5. G. Spatafora, J. Corbett, L. Cornacchione, W. Daly, D. Galan, M. Wysota, P. Tivnan, J. Collins, D. Nye, T. Levitz, W. A. Breyer, and A. Glasfeld, *J Bacteriol* **197** (2015) 3601–3615.
6. N. S. Jakubovics, A. W. Smith, and H. F. Jenkinson, *Mol Microbiol* **38** (2000) 140–153.
7. E. Rolerson, A. Swick, L. Newlon, C. Palmer, Y. Pan, B. Keeshan, and G. Spatafora, *J Bacteriol* **188** (2006) 5033–5044.
8. K. A. Baksh, and D. B. Zamble, *Journal of Biological Chemistry* **295** (2020) 1673–1684.
9. H. Do, N. Makthal, P. Chandrangsu, R. J. Olsen, J. D. Helmann, J. M. Musser, and M. Kumaraswami, *Nucleic Acids Res* **47** (2019) 7476–7493.
10. L. G. Ahuja, P. C. Aoto, A. P. Kornev, G. Veglia, and S. S. Taylor, *Proc Natl Acad Sci U S A* **116** (2019) 15052–15061.
11. C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, G. L. Holliday, and J. M. Thornton, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **13** (2008) 1205–1218.

12. M. M. Harding, M. W. Nowicki, and M. D. Walkinshaw, *Crystallogr Rev* **16** (2010) 247–302.
13. L. D. Palmer, and E. P. Skaar, *Annu Rev Genet* **50** (2016) 67.
14. S. S. Merchant, and J. D. Helmann, *Adv Microb Physiol* **60** (2012) 91–210.
15. J. S. Klein, and O. Lewinson, *Metallomics* **3** (2011) 1098–1108.
16. J. A. Lemire, J. J. Harrison, and R. J. Turner, *Nature Reviews Microbiology* **2013 11:6** **11** (2013) 371–384.
17. D. A. Capdevila, K. A. Edmonds, and D. P. Giedroc, *Essays Biochem* **61** (2017) 177.
18. D. P. Giedroc, and A. I. Arunkumar, *Dalton Trans* (2007) 3107–3120.
19. Z. Ma, F. E. Jacobsen, and D. P. Giedroc, *Chem Rev* **109** (2009) 4644–4681.
20. S. J. Philips, M. Canalizo-Hernandez, I. Yildirim, G. C. Schatz, A. Mondragón, and T. V. O'Halloran, *Science* **349** (2015) 877.
21. J. L. Hobman, *Mol Microbiol* **63** (2007) 1275–1278.
22. D. K. Chakravorty, and K. M. Merz, *Adv Protein Chem Struct Biol* **96** (2014) 181–218.
23. A. J. Guerra, and D. P. Giedroc, *Arch Biochem Biophys* **519** (2012) 210–222.
24. N. S. Jakubovics, S. A. Yassin, and A. H. Rickard, *Adv Appl Microbiol* **87** (2014) 43–110.
25. S. C. Crepps, E. E. Fields, D. Galan, J. P. Corbett, E. R. Von Hasseln, and G. A. Spatafora, *Mol Oral Microbiol* **31** (2016) 526–539.
26. P. Monette, R. Brach, A. Cowan, R. Winters, J. Weisman, F. Seybert, K. Goguen, J. Chen, A. Glasfeld, and G. Spatafora, *J Bacteriol* **200** (2018) 214–232.
27. J. W. Johnston, D. E. Briles, L. E. Myers, and S. K. Hollingshead, *Infect Immun* **74** (2006) 1171.
28. H. Do, N. Makthal, P. Chandrangsu, R. J. Olsen, J. D. Helmann, J. M. Musser, and M. Kumaraswami, *Nucleic Acids Res* **47** (2019) 7476.

29. J. R. Haswell, B. W. Pruitt, L. P. Cornacchione, C. L. Coe, E. G. Smith, and G. A. Spatafora, *J Bacteriol* **195** (2013) 126.
30. W. R. Pearson, and D. J. Lipman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85** (1988) 2444–2448.
31. J. C. Whisstock, and A. M. Lesk, *Trends Biochem Sci* **24** (1999) 132–133.
32. E. Guedon, and J. D. Helmann, *Mol Microbiol* **48** (2003) 495–506.
33. M. M. Harding, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55** (1999) 1432–1443.
34. D. Frenkel, and B. Smit, *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications, Third Edition* (2023) 1–728.
35. C. J. Cramer, in: *Essentials of Computational Chemistry*, 2nd ed.: (John Wiley & Sons, Ltd, 2004), pp. 17–67.
36. O. M. Becker, A. D. MacKerell Jr, B. Roux, and W. Masakatsu, in: *Computational Biochemistry and Biophysics*, 1st ed.: (CRC Press, 2001), pp. 1–169.
37. W. F. Van Gunsteren, and H. J. C. Berendsen, *Mol Phys* **34** (2006) 1311–1327.
38. T. Steinbrecher, D. L. Mobley, and D. A. Case, *J Chem Phys* **127** (2007).
39. N. Swindells, and C. Sykes, *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci* **168** (1938) 264–283.
40. P. K. Weiner, and P. A. Kollman, *J Comput Chem* **2** (1981) 287–303.
41. B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus, *J Comput Chem* **30** (2009) 1545–1614.
42. X. Daura, A. E. Mark, and W. F. Van Gunsteren, *J Comput Chem* **19** (1998).

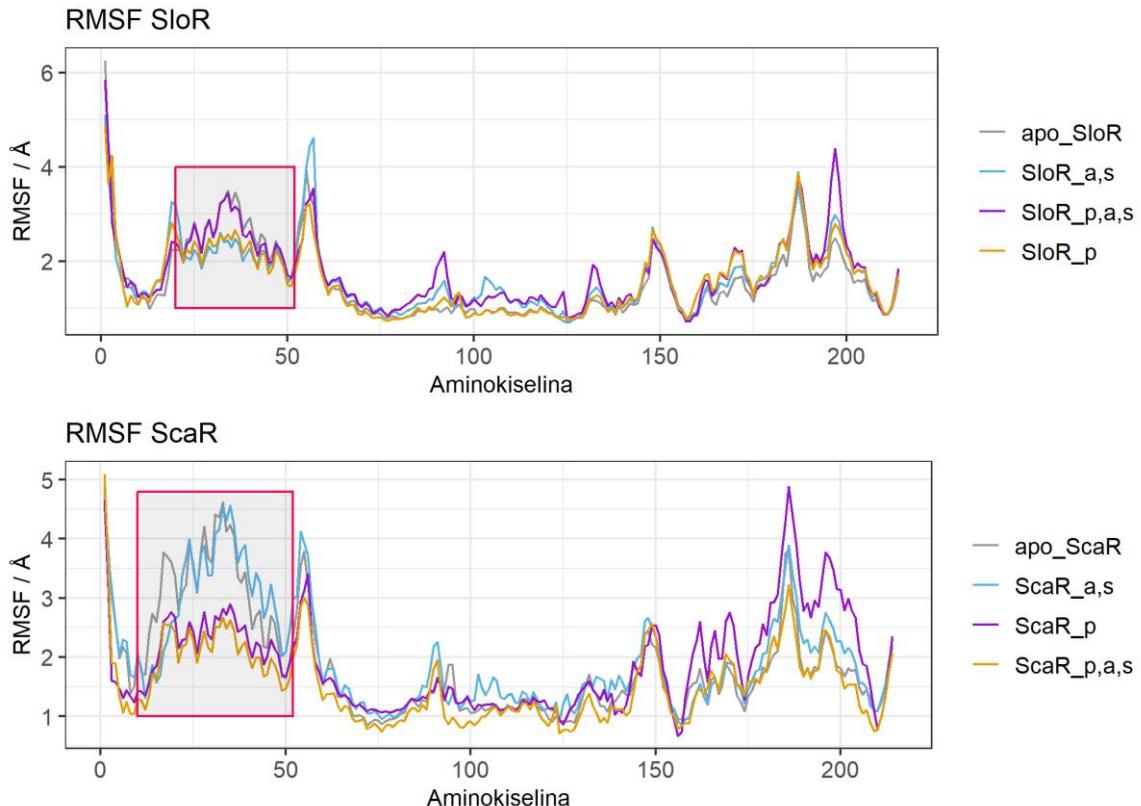
43. W. L. Jorgensen, J. D. Madura, and C. J. Swenson, *J Am Chem Soc* **106** (1984) 6638–6646.
44. T. A. Halgren, *Scope, Parameterization, and Journal of Computational Chemistry* **17** (1996) 490–519.
45. H. Sun, *Journal of Physical Chemistry B* **102** (1998) 7338–7364.
46. S. Shi, L. Yan, Y. Yang, J. Fisher-Shaulsky, and T. Thacher, *J Comput Chem* **24** (2003) 1059–1076.
47. A. K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, and W. M. Skiff, *J Am Chem Soc* **114** (1992) 10024–10035.
48. M. A. Cuendet, and W. F. Van Gunsteren, *J Chem Phys* **127** (2007) 184102.
49. L. Verlet, *Physical Review* **159** (1967) 98.
50. W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson, *J Chem Phys* **76** (1982) 637–649.
51. D. Beeman, *J Comput Phys* **20** (1976) 130–139.
52. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. Dinola, and J. R. Haak, *J Chem Phys* **81** (1984) 3684–3690.
53. R. J. Loncharich, B. R. Brooks, and R. W. Pastor, *Biopolymers* **32** (1992) 523–535.
54. M. Parrinello, and A. Rahman, *J Appl Phys* **52** (1981) 7182–7190.
55. L. A. Rodríguez-Lumbreras, B. Jiménez-García, S. Giménez-Santamarina, and J. Fernández-Recio, *Front Mol Biosci* **9** (2022).
56. G. C. P. Van Zundert, J. P. G. L. M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. L. Kastritis, E. Karaca, A. S. J. Melquiond, M. Van Dijk, S. J. De Vries, and A. M. J. J. Bonvin, *J Mol Biol* **428** (2016) 720–725.
57. Y. Yan, D. Zhang, P. Zhou, B. Li, and S. Y. Huang, *Nucleic Acids Res* **45** (2017) W365.

58. X. H. Ma, C. H. Li, L. Z. Shen, X. Q. Gong, W. Z. Chen, and C. X. Wang, *Proteins* **60** (2005) 319–323.
59. J. H. Lin, A. L. Perryman, J. R. Schames, and J. A. McCammon, *J Am Chem Soc* **124** (2002) 5632–5633.
60. D. M. Jameson, and W. H. Sawyer, *Methods Enzymol* **246** (1995) 283–300.
61. J. R. Lundblad, M. Laurance, and R. H. Goodman, *Mol Endocrinol* **10** (1996) 607–612.
62. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and Bairoch A., in: The Proteomics Protocols Handbook, J. M. Walker (ed.), 1st ed.: (Humana Press, 2005), pp. 571–607.
63. A. Micsonai, F. Wien, L. Kerna, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, and J. Kardos, *Proc Natl Acad Sci U S A* **112** (2015) E3095–E3103.
64. A. Micsonai, É. Moussong, F. Wien, E. Boros, H. Vadászi, N. Murvai, Y. H. Lee, T. Molnár, M. Réfrégiers, Y. Goto, Á. Tantos, and J. Kardos, *Nucleic Acids Res* **50** (2022) W90–W98.
65. G. Bruylants, J. Wouters, and C. Michaux, *Curr Med Chem* **12** (2005) 2011–2020.
66. P. M. Edwards, *J Chem Inf Comput Sci* **42** (2002) 1270.
67. S. Paik, A. Brown, C. L. Munro, C. N. Cornelissen, and T. Kitten, *J Bacteriol* **185** (2003) 5967–5975.
68. N. Guex, M. C. Peitsch, and T. Schwede, *Electrophoresis* **30** (2009) S162–S173.
69. N. Y. Schrödinger, LLC, (2021).
70. R. Anandakrishnan, B. Aguilar, and A. V. Onufriev, *Nucleic Acids Res* **40** (2012) W537–541.
71. H. F. Jenkinson, and R. J. Lamont, *Crit Rev Oral Biol Med* **8** (1997) 175–200.

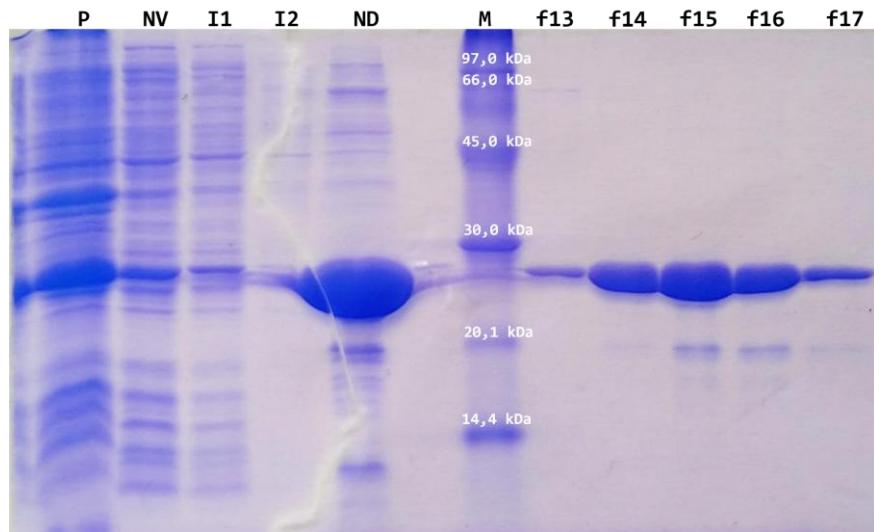
72. S. Zheng, Q. Tang, J. He, S. Du, S. Xu, C. Wang, Y. Xu, and F. Lin, *J Chem Inf Model* **56** (2016) 811–818.
73. U. C. Singh, and P. A. Kollman, *J Comput Chem* **5** (1984) 129–145.
74. W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, and P. A. Kollman, *J Am Chem Soc* **115** (1993) 9620–9631.
75. P. Li, B. P. Roberts, D. K. Chakravorty, and K. M. Merz, *J Chem Theory Comput* **9** (2013) 2733–2748.
76. R. P. P. Neves, S. F. Sousa, P. A. Fernandes, and M. J. Ramos, *J Chem Theory Comput* **9** (2013) 2718–2732.
77. P. Li, and K. M. Merz, *J Chem Inf Model* **56** (2016) 599–604.
78. D. A. Case, K. Belfon, I. Y. Ben-Shalom, S. R. Brozell, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham III, V. W. D. Cruzeiro, T. A. Darden, R. E. Duke, G. Giambasu, M. K. Gilson, H. Gohlke, A. W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S. A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K. M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C. L. Simmerling, N. R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R. M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D. M. York, and P. A. Kollman, (2020).
79. A. W. Götz, M. J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. Le Grand, and R. C. Walker, *J Chem Theory Comput* **8** (2012) 1542–1555.
80. U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, *J Chem Phys* **103** (1998) 8577.
81. D. R. Roe, and T. E. Cheatham, *J Chem Theory Comput* **9** (2013) 3084–3095.

82. E. Jurrus, D. Engel, K. Star, K. Monson, J. Brandi, L. E. Felberg, D. H. Brookes, L. Wilson, J. Chen, K. Liles, M. Chun, P. Li, D. W. Gohara, T. Dolinsky, R. Konecny, D. R. Koes, J. E. Nielsen, T. Head-Gordon, W. Geng, R. Krasny, G. W. Wei, M. J. Holst, J. A. McCammon, and N. A. Baker, *Protein Science* **27** (2018) 112–128.
83. W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, *J Mol Graph* **14** (1996) 33–38.
84. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, *J Comput Chem* **25** (2004) 1605–1612.
85. H. Wickham, *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-Verlag New York, 2016).
86. M. Dowle, and A. Srinivasan, (2021).
87. F. J. Marcos-Torres, D. Maurer, L. Juniar, and J. J. Griese, *Nucleic Acids Res* **49** (2021) 10120–10135.
88. T. J. Richmond, and C. A. Davey, *Nature 2003 423:6936* **423** (2003) 145–150.
89. P. D. Twigg, G. Parthasarathy, L. Guerrero, T. M. Logan, and D. L. D. Caspar, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (2001) 11259–11264.
90. K. I. Sen, A. Sienkiewicz, J. F. Love, J. C. VanderSpek, P. G. Fajer, and T. M. Logan, *Biochemistry* **45** (2006) 4295–4303.
91. P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, *J Biomol Tech* **21** (2010) 167.
92. S. Ghosh, N. Chandra, and S. Vishveshwara, *PLoS Comput Biol* **11** (2015) e1004500.
93. K. P. O'Rourke, J. D. Shaw, M. W. Pesesky, B. T. Cook, S. M. Roberts, J. P. Bond, and G. A. Spatafora, *J Bacteriol* **192** (2010) 1433–1443.

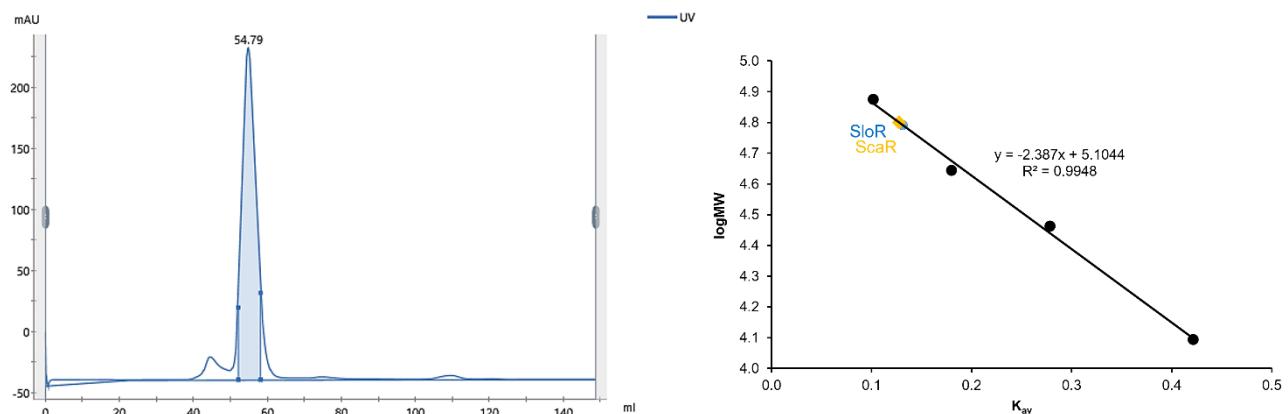
## § 8. DODATAK



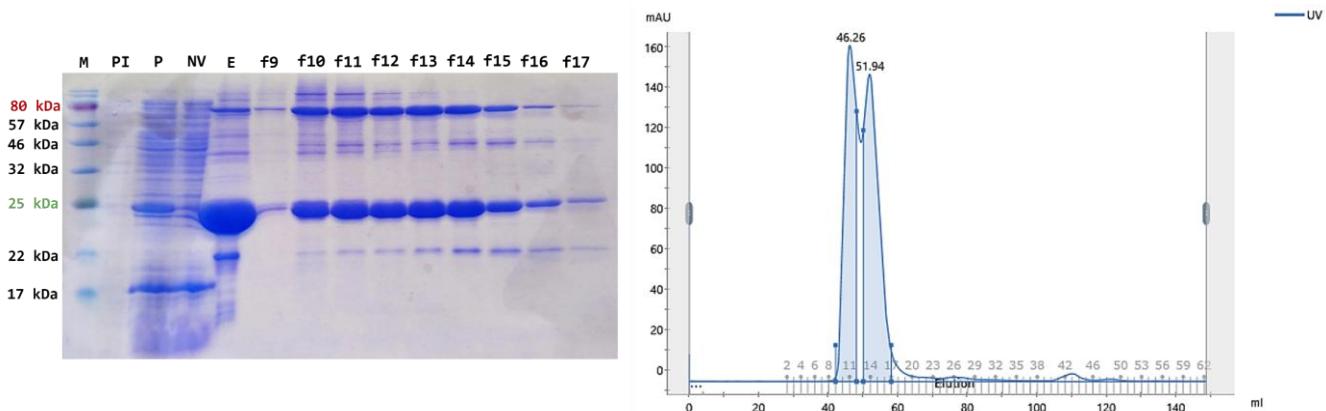
**Slika D1.** Fluktuacije aminokiselinskih ostataka (RMSF) tijekom simulacija MD sustava proteina SloR i ScaR. Crvenim pravokutnikom istaknute su aminokiseline iz domene DBD u kojoj se vide najveće promjene u fluktuaciji između različitih sustava proteina.



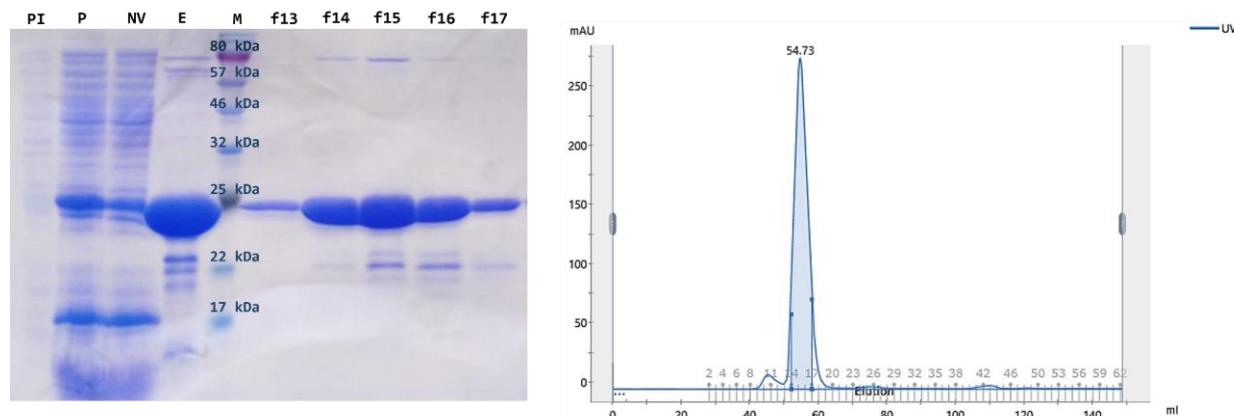
**Slika D2.** Pročišćavanje divljeg tipa proteina SloR afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijskom kromatografijom. Tijek pročišćavanja analiziran je SDS-PAG elektroforezom. P-ND uzorci iz afinitetne kromatografije; f13-f17 frakcije dobivene gel-filtracijskom kromatografijom. P – početni stanični uzorak; NV – nevezani proteini; I1 – prvo ispiranje; I2 – drugo ispiranje; ND – eluat koji je prebačen u pufer za gel-filtraciju; M – marker. Za daljnju biokemijsku analizu spojene su i koncentrirane frakcije proteina 14-16. Budući da su oba divlja tipa proteina SloR i ScaR imali sličnu čistoću i prinos, nije prikazan SDS-PAGE gel proteina ScaR.



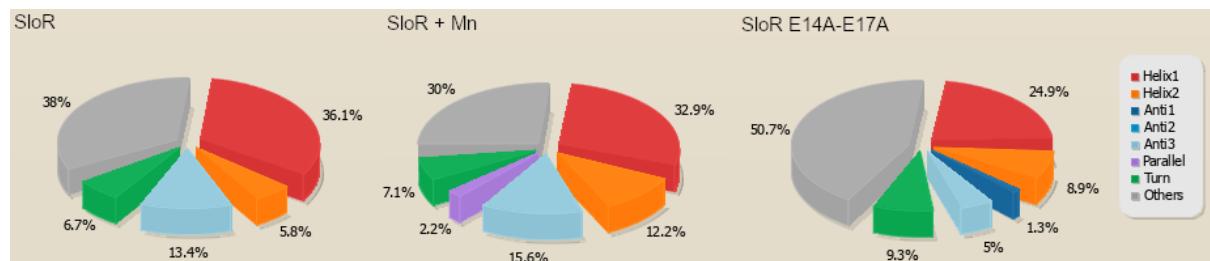
**Slika D3.** Kromatogram pročišćavanja divljeg tipa proteina ScaR metodom gel-filtracijske kromatografije na koloni HiLoad 16/600 Superdex 75pg. Desno se nalazi kalibracijska krivulja za korištenu kolonu, gdje je prosječna konstanta distribucije jednaka  $K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_c - V_0)}$ ,  $V_0$  označava volumen otapala u koloni,  $V_c$  označava geometrijski volumen stupca kolone, dok  $V_e$  označava volumen elucije uzorka. Budući da su oba divlja tipa proteina SloR i ScaR imali sličan kromatogram prikazan je samo kromatogram ScaR-a.



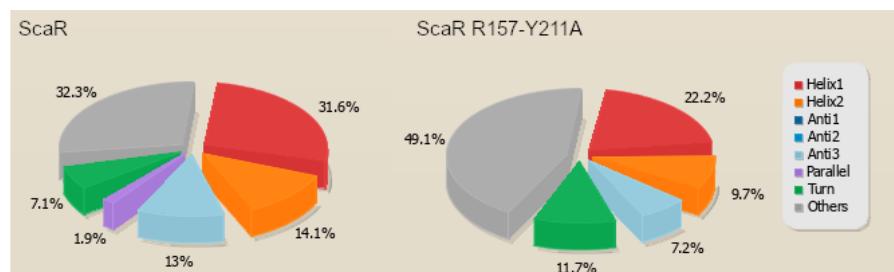
**Slika D4.** Pročišćavanje mutant proteina ScaR R157A-Y211A afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijskom kromatografijom. Lijevo: Tijek pročišćavanja vizualiziran je SDS-PAGE elektroforezom. PI-E uzorci iz afinitetne kromatografije; f9-f17 frakcije dobivene gel-filtracijskom kromatografijom mutantnog ScaR. PI – stanični uzorak prije indukcije ekspresije; P – početni uzorak za afinitetnu kromatografiju; NV – nevezani proteini; E – konačni eluat koji je prebačen u pufer za gel-filtraciju. Desno: Kromatogram mutantnog ScaR R157A-Y211A s dva istaknuti vrha dobiven metodom gel-filtracijske kromatografije na koloni HiLoad 16/600 Superdex 75pg.



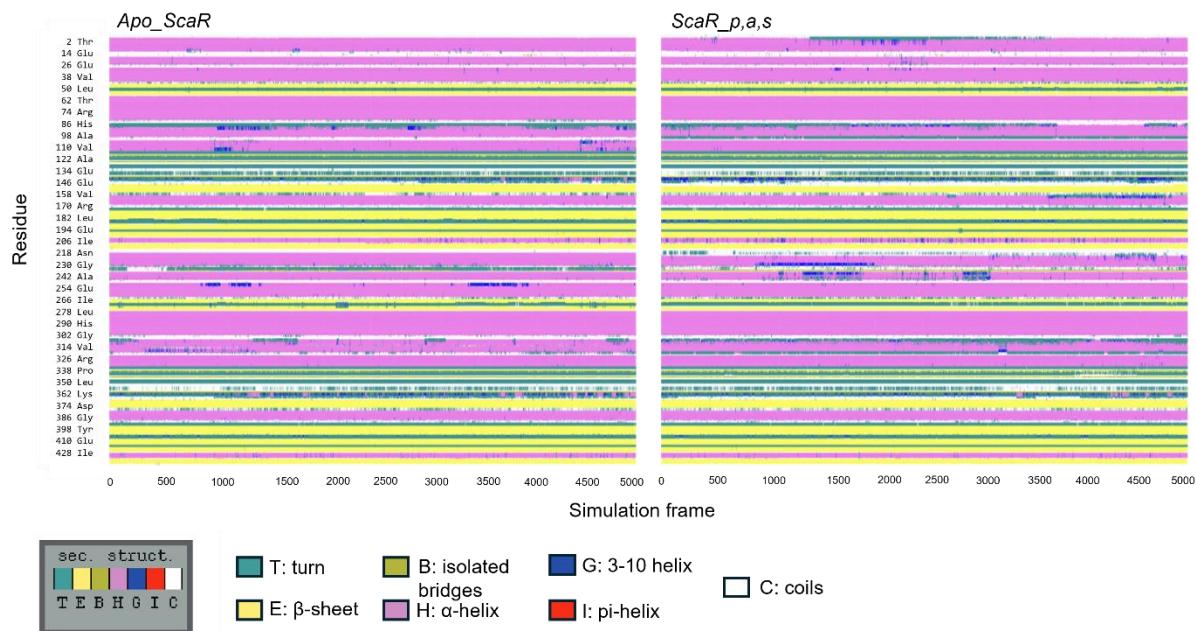
**Slika D5.** Pročišćavanje mutant proteina SloR E14A-E17A afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijskom kromatografijom. Lijevo: Tijek pročišćavanja vizualiziran je SDS-PAG elektroforezom. PI-E uzorci iz afinitetne kromatografije; f13-f17 frakcije dobivene gel-filtracijskom kromatografijom mutanta SloR. PI – stanični uzorak prije indukcije ekspresije; P – početni uzorak za afinitetu kromatografiju; NV – nevezani proteini; E – konačni eluat koji je prebačen u pufer za gel-filtraciju. Desno: Kromatogram pročišćavanja mutanta SloR E14A-E17A metodom gel-filtracijske kromatografije na koloni HiLoad 16/600 Superdex 75pg.



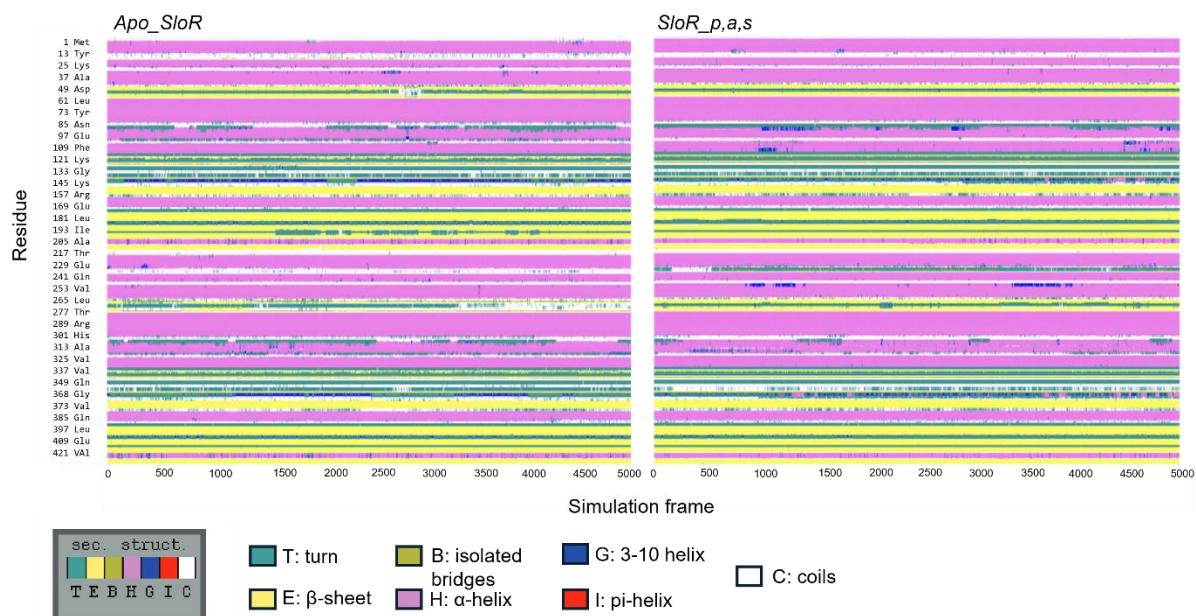
**Slika D6.** Sekundarna struktura proteina SloR izračunata iz CD spektra pomoću programa *BeStSel*.



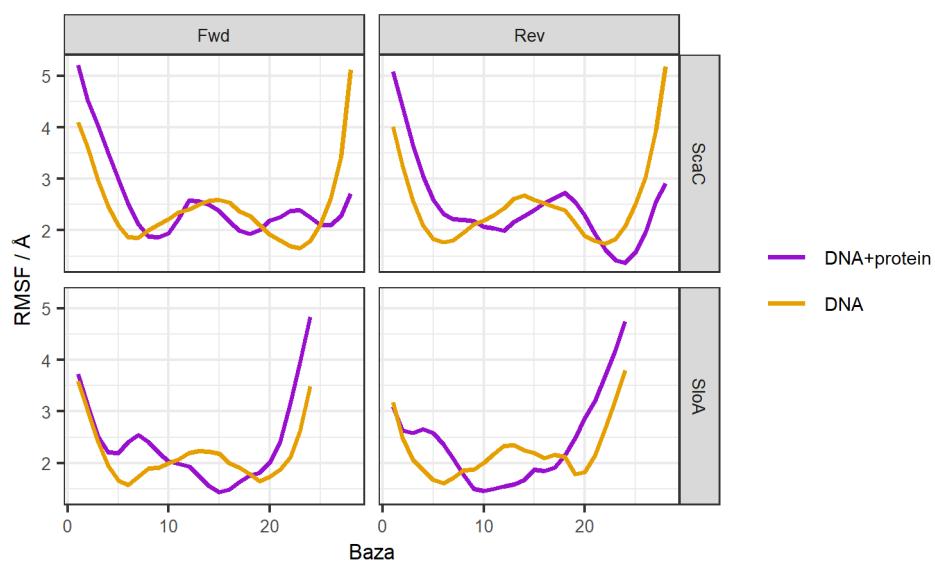
**Slika D7.** Sekundarna struktura proteina SloR izračunata iz CD spektra pomoću programa *BeStSel*.



**Slika D8.** Analiza sekundarne strukture sustava *apo\_ScaR* i *ScaR\_p,a,s* u programu VMD.



**Slika D9.** Analiza sekundarne strukture sustava *apo\_SloR* i *SloR\_p,a,s* u programu VMD.



**Slika D10.** Promjena fluktuacija baza (RMSF) tijekom simulacija MD sustava DNA *SloA* i *ScaC*.

**Tablica D1.** Rezultati uklapanja *SloR\_p,a,s* na DNA *SloA* dobiveni programom *PyDockDNA*.

<b>Sustav</b>	<b>Rang</b>	<b>Ele / kJ</b>	<b>Desolv / kJ</b>	<b>vdW / kJ</b>	<b>PyDockDNA / kJ</b>
<b>SloR_p,a,s</b> <i>SloA-M1</i>	1	-85,53	54,81	-3,68	-169,23
	2	-74,20	42,88	-9,67	-158,50
	3	-85,38	51,40	1,12	-151,93
	4	-77,28	38,23	16,45	-142,31
	5	-73,86	37,43	6,85	-139,84
	6	-72,27	31,66	-5,94	-139,53
	7	-72,94	31,89	6,76	-138,93
	8	-70,06	32,69	-17,29	-138,46
	9	-67,86	36,72	-17,09	-136,24
	10	-54,18	28,32	20,87	-135,43
<b>SloR_p,a,s</b> <i>SloA-M2</i>	1	-92,72	65,50	-6,22	-193,35
	2	-97,07	64,14	13,33	-162,40
	3	-98,77	62,76	47,48	-160,69
	4	-63,37	35,79	-28,47	-149,55
	5	-73,00	40,79	4,11	-139,26
	6	-61,41	42,92	60,72	-138,68
	7	-70,21	40,62	-2,45	-137,12
	8	-70,11	36,88	-1,70	-136,95
	9	-71,22	35,56	25,40	-135,34
	10	-54,27	38,36	39,46	-133,66
<b>SloR_p,a,s</b> <i>SloA-M3</i>	1	-63,95	35,02	38,66	-143,42
	2	-79,41	43,14	35,62	-142,51
	3	-78,15	41,94	24,61	-142,36
	4	-70,78	31,81	5,42	-136,90
	5	-71,76	33,42	27,35	-135,69
	6	-74,48	34,13	60,19	-135,13
	7	-54,82	32,61	32,15	-134,94
	8	-51,62	40,72	2,13	-134,74
	9	-68,96	39,58	34,63	-132,16
	10	-74,33	45,03	-37,98	-128,12

*Ele* – Elekstrostatski doprinos energiji

*Desolv* – Energija desolvacije

*VdW* – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

*PyDockDNA* –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>

**Tablica D2.** Rezultati uklapanja proteina *apo-SloR* na DNA *SloA* dobiveni programom *PyDockDNA*.

Sustav	Rang	Ele / kJ	Desolv / kJ	vdW / kJ	PyDockDNA / kJ
<b>apo SloR</b> <b>SloA-M1</b>	1	-41,56	23,40	61,17	-102,11
	2	-51,87	24,86	38,54	-98,02
	3	-50,74	28,14	34,25	-97,32
	4	-46,78	22,89	5,87	-96,19
	5	-49,24	20,07	44,08	-94,83
	6	-52,82	30,01	85,68	-94,25
	7	-30,49	21,57	42,98	-92,86
	8	-44,40	25,18	24,54	-91,94
	9	-43,89	16,75	20,68	-91,82
	10	-46,64	22,43	49,88	-91,65
<b>apo SloR</b> <b>SloA-M2</b>	1	-56,80	20,18	37,09	-103,09
	2	-38,88	30,00	25,01	-103,04
	3	-50,93	24,41	-19,15	-102,85
	4	-53,92	24,17	14,54	-102,47
	5	-52,60	21,79	1,50	-102,45
	6	-49,75	23,56	-20,46	-101,80
	7	-55,42	23,93	41,52	-101,27
	8	-48,36	22,48	-10,97	-99,45
	9	-30,93	23,11	21,23	-95,47
	10	-45,39	22,33	15,13	-93,88
<b>apo SloR</b> <b>SloA-M3</b>	1	-51,45	15,94	1,55	-101,29
	2	-50,97	23,26	-2,90	-101,26
	3	-30,79	15,90	-11,86	-98,65
	4	-39,47	24,24	75,78	-98,56
	5	-50,43	26,29	27,51	-97,68
	6	-51,10	18,29	36,26	-97,47
	7	-47,74	21,91	11,64	-96,58
	8	-47,30	21,17	30,95	-94,21
	9	-45,56	20,93	20,32	-93,52
	10	-47,40	23,90	43,20	-93,08

Ele – Elekstrostatski doprinos energiji

Desolv – Energija desolvatacije

VdW – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

PyDockDNA –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>

**Tablica D3.** Rezultati uklapanja proteina *SloR\_p* na DNA *SloA* dobiveni programom *PyDockDNA*.

Sustav	Rang	Ele / kJ	Desolv / kJ	vdW / kJ	PyDockDNA / kJ
<b>SloR_p</b> <i>SloA-M1</i>	1	-64,66	43,14	-8,60	-132,19
	2	-55,89	30,16	-9,44	-123,50
	3	-54,58	36,76	14,89	-119,75
	4	-50,17	35,95	-21,00	-118,94
	5	-64,56	39,96	24,13	-112,15
	6	-42,06	47,64	-3,20	-109,05
	7	-53,81	33,31	-30,66	-106,88
	8	-60,89	42,18	55,27	-105,36
	9	-63,33	42,49	83,18	-105,01
	10	-51,81	33,02	-30,86	-104,89
<b>SloR_p</b> <i>SloA-M2</i>	1	-59,93	33,61	30,10	-123,59
	2	-57,68	30,83	19,48	-122,39
	3	-58,75	27,24	49,59	-120,46
	4	-56,76	41,69	47,55	-118,67
	5	-57,98	34,76	60,61	-118,58
	6	-51,81	30,48	53,58	-113,11
	7	-56,86	34,53	110,80	-112,45
	8	-42,77	42,25	-13,93	-110,83
	9	-42,14	33,51	1,46	-108,66
	10	-39,36	36,71	-12,35	-107,26
<b>SloR_p</b> <i>SloA-M3</i>	1	-56,48	25,98	60,33	-117,11
	2	-64,82	41,93	-13,30	-116,15
	3	-48,34	25,54	12,12	-113,79
	4	-48,34	25,54	12,12	-113,79
	5	-62,39	41,42	-8,01	-113,19
	6	-66,58	37,79	47,94	-111,78
	7	-59,82	31,50	-19,55	-111,77
	8	-44,14	39,30	-7,53	-111,56
	9	-65,95	38,78	52,60	-110,69
	10	-45,38	26,58	20,40	-110,01

*Ele* – Elekstrostatski doprinos energiji

*Desolv* – Energija desolvatacije

*VdW* – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

*PyDockDNA* –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>

**Tablica D4.** Rezultati uklapanja proteina *SloR<sub>a,s</sub>* na DNA *SloA* dobiveni programom *PyDockDNA*.

Sustav	Rang	Ele / kJ	Desolv / kJ	vdW / kJ	PyDockDNA / kJ
<b>SloR<sub>a,s</sub></b> <b>SloA-M1</b>	1	-53,44	27,69	34,26	-116,68
	2	-61,80	52,48	122,54	-116,21
	3	-60,25	30,25	-1,43	-110,39
	4	-67,78	43,50	75,32	-110,24
	5	-43,97	23,70	38,45	-106,79
	6	-56,36	33,32	2,10	-106,15
	7	-69,67	52,27	-4,89	-103,49
	8	-55,28	27,92	18,58	-103,42
	9	-53,38	28,14	36,42	-99,74
	10	-51,02	23,97	16,37	-99,38
<b>SloR<sub>a,s</sub></b> <b>SloA-M2</b>	1	-59,60	29,47	34,46	-122,83
	2	-69,95	32,36	-24,24	-122,37
	3	-51,27	41,28	25,24	-115,41
	4	-46,27	34,07	-10,93	-114,03
	5	-64,39	46,57	19,87	-112,40
	6	-64,67	47,96	23,84	-112,28
	7	-43,36	40,81	21,27	-107,90
	8	-60,67	29,14	44,40	-106,23
	9	-42,34	31,88	32,69	-105,74
	10	-48,86	44,05	100,40	-105,49
<b>SloR<sub>a,s</sub></b> <b>SloA-M3</b>	1	-56,69	31,08	41,22	-135,90
	2	-51,52	24,17	32,93	-131,56
	3	-48,32	41,81	-3,42	-115,33
	4	-47,37	41,45	-4,34	-114,47
	5	-47,60	28,44	10,53	-113,22
	6	-42,07	31,06	-13,77	-110,12
	7	-55,17	33,97	-12,02	-106,37
	8	-54,77	29,90	19,54	-102,81
	9	-56,08	26,46	48,53	-101,23
	10	-51,05	21,42	15,46	-99,51

*Ele* – Elekstrostatski doprinos energiji

*Desolv* – Energija desolvatacije

*VdW* – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

*PyDockDNA* –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>

**Tablica D5.** Rezultati uklapanja *ScaR\_p,a,s* na DNA *ScaC* dobiveni programom *PyDockDNA*.

<b>Sustav</b>	<b>Rang</b>	<b>Ele / kJ</b>	<b>Desolv / kJ</b>	<b>vdW / kJ</b>	<b>PyDockDNA / kJ</b>
<b>ScaR_p,a,s ScaC-M1</b>	1	-48,45	48,13	51,51	-126,63
	2	-45,18	51,12	53,12	-106,54
	3	-23,06	43,71	20,82	-104,31
	4	-38,29	35,49	20,73	-102,89
	5	-36,83	35,64	13,89	-102,11
	6	-36,57	27,83	18,24	-101,42
	7	-37,86	35,63	40,77	-100,45
	8	-21,37	20,25	43,15	-100,38
	9	-32,79	44,50	19,48	-97,51
	10	-24,08	44,34	123,02	-95,11
<b>ScaR_p,a,s ScaC-M2</b>	1	-44,31	29,67	-2,25	-111,20
	2	-43,43	29,92	17,35	-108,36
	3	-44,25	44,23	54,47	-105,47
	4	-35,11	35,47	38,76	-97,90
	5	-46,05	48,49	35,42	-92,51
	6	-28,65	36,71	33,24	-92,00
	7	-23,44	32,69	11,81	-88,92
	8	-41,04	45,24	30,33	-88,00
	9	-41,88	43,80	39,50	-87,93
	10	-43,50	38,36	66,82	-86,82
<b>ScaR_p,a,s ScaC-M3</b>	1	-56,60	40,24	14,31	-138,50
	2	-35,00	46,92	-23,75	-104,05
	3	-41,97	46,31	54,17	-103,22
	4	-33,76	49,63	0,83	-100,35
	5	-30,20	45,24	1,44	-96,72
	6	-41,60	44,29	-5,69	-92,17
	7	-26,73	27,04	27,81	-90,62
	8	-30,40	28,00	69,47	-90,12
	9	-25,89	46,68	24,59	-90,10
	10	-42,32	48,84	25,67	-89,75

*Ele* – Elekstrostatski doprinos energiji

*Desolv* – Energija desolvacije

*VdW* – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

*PyDockDNA* –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>

**Tablica D6.** Rezultati uklapanja proteina *apo\_ScaR* na DNA *ScaC* dobiveni programom *PyDockDNA*.

Sustav	Rang	Ele / kJ	Desolv / kJ	vdW / kJ	PyDockDNA / kJ
<b>apo ScaR</b> <i>ScaC-M1</i>	1	-44,76	33,25	52,62	-39,49
	2	-35,34	34,45	10,97	-34,24
	3	-35,64	34,94	37,16	-31,93
	4	-33,45	21,01	19,56	-31,50
	5	-34,20	27,26	30,00	-31,20
	6	-32,44	25,15	13,97	-31,04
	7	-30,27	32,09	-7,34	-31,01
	8	-33,61	35,32	26,10	-31,00
	9	-29,95	21,20	-8,00	-30,75
	10	-33,98	14,71	40,66	-29,91
<b>apo ScaR</b> <i>ScaC-M2</i>	1	-44,36	28,00	62,30	-88,13
	2	-24,31	29,16	53,30	-85,64
	3	-22,07	29,94	37,48	-84,98
	4	-18,97	34,39	32,00	-82,44
	5	-32,88	32,18	30,53	-79,82
	6	-33,60	28,45	49,26	-78,68
	7	-34,04	27,23	56,90	-78,35
	8	-17,12	37,43	63,30	-77,45
	9	-33,07	10,63	68,12	-76,26
	10	-30,32	24,16	59,33	-74,39
<b>apo ScaR</b> <i>ScaC-M3</i>	1	-23,40	30,95	47,49	-101,98
	2	-19,24	30,20	14,32	-101,14
	3	-20,33	29,19	31,17	-100,55
	4	-20,61	35,18	66,65	-97,28
	5	-39,62	27,26	56,90	-83,93
	6	-32,93	23,29	3,80	-82,55
	7	-32,27	30,92	20,48	-80,22
	8	-32,66	29,04	26,78	-79,98
	9	-32,83	27,21	39,67	-78,86
	10	-32,69	21,71	38,61	-78,83

*Ele* – Elekstrostatski doprinos energiji

*Desolv* – Energija desolvatacije

*VdW* – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

*PyDockDNA* –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>

**Tablica D7.** Rezultati uklapanja proteina *ScaR\_p* na DNA *ScaC* dobiveni programom *PyDockDNA*.

Sustav	Rang	Ele / kJ	Desolv / kJ	vdW / kJ	PyDockDNA / kJ
<b>ScaR_p</b> <i>ScaC-M1</i>	1	-32,93	31,24	43,73	-28,55
	2	-30,82	17,60	36,01	-27,22
	3	-26,45	20,90	16,81	-24,77
	4	-24,74	22,83	16,92	-23,05
	5	-21,45	13,41	-5,24	-21,98
	6	-19,28	22,97	-22,15	-21,49
	7	-23,52	14,94	20,52	-21,47
	8	-24,64	26,98	34,87	-21,15
	9	-23,27	19,77	35,17	-19,76
	10	-29,50	26,79	98,97	-19,61
<b>ScaR_p</b> <i>ScaC-M2</i>	1	-33,76	21,76	12,19	-115,87
	2	-22,13	25,77	28,06	-102,65
	3	-19,62	24,71	34,47	-99,50
	4	-26,84	21,29	16,35	-91,87
	5	-20,19	25,20	23,66	-84,49
	6	-30,48	35,73	41,10	-76,37
	7	-12,77	32,49	45,47	-74,89
	8	-29,22	29,14	43,71	-74,85
	9	-17,59	39,97	104,03	-73,86
	10	-11,71	26,58	55,93	-72,79
<b>ScaR_p</b> <i>ScaC-M3</i>	1	-29,26	27,38	99,80	-102,61
	2	-39,21	29,57	37,57	-102,12
	3	-20,85	20,22	6,67	-86,85
	4	-24,81	25,36	49,82	-86,49
	5	-17,64	24,69	-16,53	-85,96
	6	-27,45	30,78	31,89	-74,26
	7	-6,74	19,69	-7,01	-74,11
	8	-6,39	20,89	-9,16	-73,98
	9	-8,61	20,33	25,71	-72,70
	10	-2,56	29,58	-23,32	-71,56

Ele – Elekstrostatski doprinos energiji

Desolv – Energija desolvacije

VdW – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

PyDockDNA –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>

**Tablica D8.** Rezultati uklapanja proteina *ScaR<sub>a,s</sub>* na DNA *ScaC* dobiveni programom *PyDockDNA*.

Sustav	Rang	Ele / kJ	Desolv / kJ	vdW / kJ	PyDockDNA / kJ
<b>ScaR<sub>a,s</sub></b> <b>ScaC-M1</b>	1	-25,65	40,04	44,96	-104,48
	2	-12,64	32,08	15,68	-94,41
	3	-47,05	26,53	44,38	-92,61
	4	-18,91	44,03	-5,29	-86,11
	5	-19,94	29,97	48,56	-81,75
	6	-15,25	31,83	14,77	-80,44
	7	-11,34	30,79	33,18	-74,69
	8	-42,09	36,40	14,02	-74,02
	9	-14,58	28,97	74,95	-73,75
	10	-13,21	35,05	62,94	-73,58
<b>ScaR<sub>a,s</sub></b> <b>ScaC-M2</b>	1	-10,08	40,16	-5,95	-94,01
	2	-10,46	31,95	39,43	-89,85
	3	-27,64	40,92	45,55	-89,75
	4	-40,40	33,40	31,88	-87,22
	5	-20,21	29,65	33,27	-83,55
	6	-31,59	29,23	19,87	-79,60
	7	-13,31	23,33	4,66	-79,51
	8	-31,47	35,22	23,52	-79,12
	9	-12,61	33,92	4,97	-78,78
	10	-14,30	28,92	39,00	-77,06
<b>ScaR<sub>a,s</sub></b> <b>ScaC-M3</b>	1	-23,40	30,95	47,49	-101,98
	2	-19,24	30,20	14,32	-101,14
	3	-20,33	29,19	31,17	-100,55
	4	-20,61	35,18	66,65	-97,28
	5	-39,62	27,26	56,90	-83,93
	6	-32,93	23,29	3,80	-82,55
	7	-32,27	30,92	20,48	-80,22
	8	-32,66	29,04	26,78	-79,98
	9	-32,83	27,21	39,67	-78,86
	10	-32,69	21,71	38,61	-78,83

*Ele* – Elekstrostatski doprinos energiji

*Desolv* – Energija desolvatacije

*VdW* – energetski doprinos van der Waalsovih interakcija

*PyDockDNA* –Ukupna energija vezanja izračunata prema zbroju prethodne tri<sup>55</sup>



## § 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Rijeci 1997. godine, gdje sam 2016. godine završila Prirodoslovno-matematičku gimnaziju Andrije Mohorovičića Rijeka. Iste sam godine upisala Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Zbog izvrsnog prosjeka tijekom preddiplomskog studija bila sam stipendistica državne stipendije u STEM područjima znanosti. Prvostupničku diplomu sam stekla 2019. godine izradom završnog rada: „Evolucijske zavrzlame RNaze P: od katalitičke RNA do isključivo proteinskog enzima“ pod vodstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj, te sam iste godine upisala Diplomski studij molekularne biologije. Diplomirala sam 2021. godine s radom „Molekulsко uklapanje potencijalnih inhibitora na protein ABCG2“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše. Od studenog iste godine zaposlena sam kao asistentica na Zavodu za fizikalnu kemiju na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### STRUČNO USAVRŠAVANJE:

**Srpanj 2023. i 2024. godine** – kratki studijski boravak u laboratoriju „Mass Spectrometric Bio and Polymer Analysis“ na Tehničkom sveučilištu u Beču u sklopu bilateralnog projekta između instituta Ruđer Bošković i Instituta za Kemijsku Tehnologiju i Analitiku na Tehničkom sveučilištu u Beču: “Native mass spectrometry in analysis of transcription factors modus operandi - Interactions of manganese metallosensors with Mn<sup>2+</sup> and DNA”

**20.-22. Ožujak 2023. godine** – sudjelovanje na “Radionici primjene Pythona u biostatistici i kemometriji”; organizator: chemical codes d.o.o

**Srpanj – Rujan 2020. godine** – laboratorijska stručna praksa u sklopu ERASMUS+ programa napravljena u Single Molecule Genetics grupi na Institutu za Biofiziku Sveučilišta Johannes Kepler Linz, Austrija.

**Ožujak – Lipanj 2020. godine** – stručna praksa u laboratoriju za fotoniku i optičku spektroskopiju na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

## ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

1. **Radman, K.**, Crnolatac, I., Bregović, N., Jelić Matošević, Z., Fernandes, P. A., Merunka, D., Žilić, D., Piantanida, I., Leščić Ašler, I., Bertoša, B. (2025) Conformational change induced by binding of Mn<sup>2+</sup> ions activates SloR transcription factor in *Streptococcus mutans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 290, 138828. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2025.138828](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.138828)
2. Leščić Ašler, I., **Radman, K.**, Jelić Matošević, Z., Bertoša, B., Weiss, V. U., & Marchetti-Deschmann, M. (2024). Exploring the manganese-dependent interaction between a transcription factor and its corresponding DNA: insights from gas-phase electrophoresis on a nES GEMMA instrument. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(24), 5377–5386. doi:10.1007/S00216-024-05473-9/
3. **Radman, K.**, Jelić Matošević, Z., Žilić, D., Crnolatac, I., Bregović, N., Kveder, M., Piantanida, I., Fernandes, P. A., Ašler Leščić, I., & Bertoša, B. (2023). Structural and dynamical changes of the *Streptococcus gordonii* metalloregulatory ScaR protein induced by Mn<sup>2+</sup> ion binding. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127572. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2023.127572
4. Vujica, L., Lončar, J., Mišić, L., Lučić, B., **Radman, K.**, Mihaljević, I.,... Smital, T. (2023). Environmental contaminants modulate transport activity of zebrafish (*Danio rerio*) multidrug and toxin extrusion protein 3 (mate3/slcl47a2.1). *Science of The Total Environment*, 901, 165956. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.165956
5. Jelić Matošević, Z., **Radman, K.**, Loubser, J., Crnolatac, I., Piantanida, I.,...Bertoša, B. (2023). Structural dynamics of the *bacillus subtilis* mntr transcription factor is locked by Mn<sup>2+</sup> binding. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). doi:10.3390/ijms24020957
6. Mioč, M., Telbisz, Á., **Radman, K.**, Bertoša, B., Šumanovac, T., Sarkadi, B., & Kralj, M. (2022). Interaction of crown ethers with the ABCG2 transporter and their implication for multidrug resistance reversal. *Histochemistry and Cell Biology*, 158(3):261-277. doi:10.1007/s00418-022-02106-z

## SUDJELOVANJE NA KONGRESIMA

### Sažeci u zbornicima

Radman, K., Bertoša, B. (2024). Unveiling the Molecular Dance: Exploring SloR and ScaR Protein-DNA Interactions through MD Simulations // Book of Abstracts of the FEBS3+ Meeting: Exploring Molecular Frontiers / Dulić, Morana; Sinčić, Nino; Stuparević, Igor (ur.). Pula: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, 2024. str. 164-164. (poster, strana recenzija, sažetak, znanstveni)

Radman, K., Jelić Matošević, Z., Bregović, N., Leščić Ašler, I., Crnolatac, I., Piantanida, I.,... Bertoša, B. Structural Changes in the Metalloregulatory Protein ScaR (*Streptococcus gordonii*) Influenced by Mn<sup>2+</sup> Ion Binding, //EMBO workshop: ImmunoBiophysics: From fundamental physics to understanding the immune response”, Les Houches, Francuska, 2023. (poster, strana recenzija, sažetak, znanstveni)

Radman, K., Jelić Matošević, Z., Leščić Ašler, I., Crnolatac, I., Piantanida, I., & Bertoša, B. Influence of Mn<sup>2+</sup> ion binding on structural changes in metalloregulatory proteins SloR (*S. mutans*) and ScaR (*S. gordonii*). // 28. Simpozij Kemičara i Kemijskih inženjera/ Rogošić, Marko (ur.) Rovinj, Hrvatska, 2022. str. 119 (poster, strana recenzija, sažetak, znanstveni)

Radman, K., & Bertoša, B. Računalne simulacije proteina SloR iz bakterije *Streptococcus mutans*. //6. Simpozij Studenata doktorskih studija/ Schneider, Petra (ur.) Zagreb, Hrvatska, 2022. str. 294 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Radman, K., Jelić Matošević, Z., Neves, P., & Bertoša, B. Parametrization of the Mn<sup>2+</sup> Binding Site of Protein SloR (*S. mutans*) Starting from the Zn<sup>2+</sup> bound Crystal Structure. // *Supramolecular Chemistry 2021*: Book of abstracts/ Frkanec, Leo; Tomišić, Vladimir (ur.) Zagreb, Hrvatska, 2021. str. 26 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)