

# Norvalin u prirodnim spojevima, peptidima i proteinima

---

Škibola, Zara

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:939437>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET

Seminarski rad

**Norvalin u prirodnim spojevima, peptidima i proteinima**

**Norvaline in natural products, peptides and proteins**

Zara Škibola

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate Study of Molecular Biology

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2020.

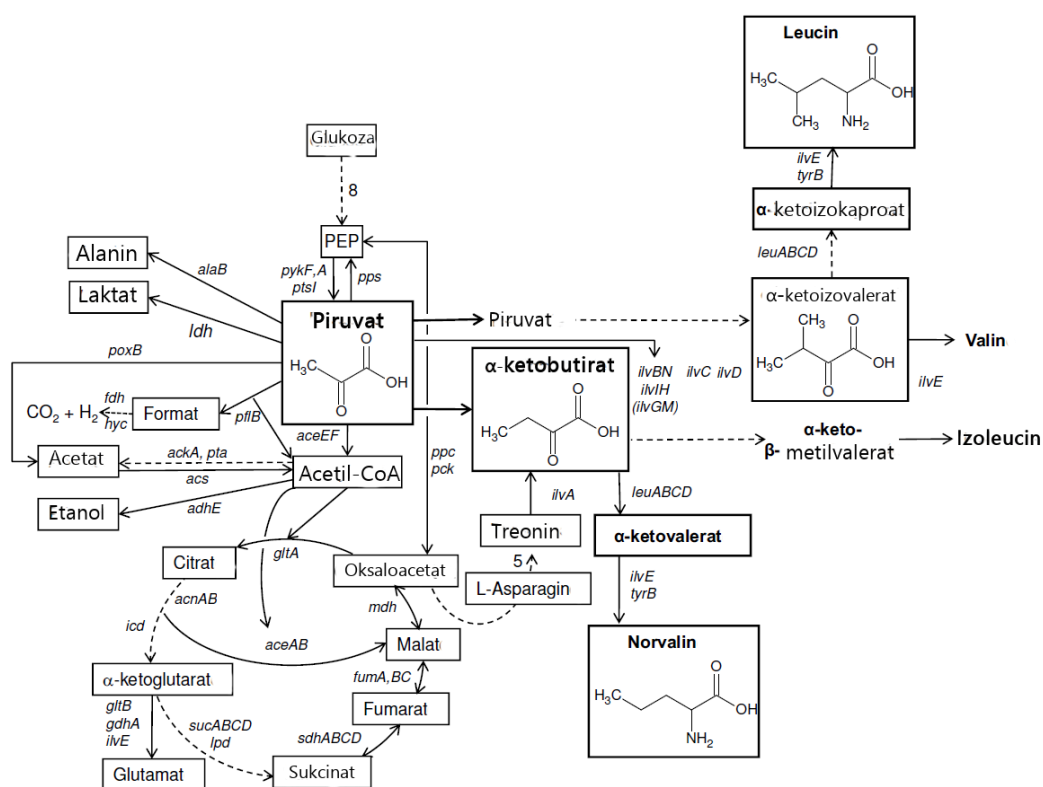
## Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Biosinteza norvalina .....	1
1.2. Norvalin- prebiotička aminokiselina.....	3
1.3. Načini ugradnje norvalina u proteine.....	4
2. Norvalin u prirodnim spojevima, peptidima i proteinima.....	8
2.1. Norvalin u prirodnim spojevima.....	8
2.2 Norvalin u peptidima.....	10
2.2.1. Modelni peptidi .....	11
2.2.2. Peptidna cjepiva .....	15
2.2.3. Antimikrobni peptidi .....	17
2.3. Norvalin u proteinima .....	20
2.3.1. Ključni proteini ljudskog metabolizma .....	21
3. Literatura .....	29
4. Sažetak.....	35
5. Summary.....	35

# 1. Uvod

## 1.1. Biosinteza norvalina

Norvalin (Nva) pripada grupi neproteinogenih aminokiselina koje se sintetiziraju u stanici pod određenim uvjetima (Soini et al., 2008; Sycheva et al., 2007) kao nusprodukt reakcija kataliziranih enzimima za sintezu razgranatih aminokiselina (Kisumi et al., 1976). Sinteza ove nekanonske aminokiseline (Slika 1.) počinje s  $\alpha$ -ketobutiratom te je omogućena slabom specifičnošću enzima za sintezu razgranatih aminokiselina (produkti gena *ilv* i *leu*) za  $\alpha$ -keto kiseline (Soini et al., 2008).  $\alpha$ -ketobutirat je sintetiziran iz oksaloacetata preko međuprodukata koji uključuju: L-aspartat, homoserin i treonin. Kao kraći, alternativni put za akumulaciju  $\alpha$ -ketobutirata predloženo je direktno produživanje ugljikovodičnog lanca od piruvata pomoću enzima kodiranih *leu* operonom.



**Slika 1.** Shematski prikaz biosintetskog puta razgranatih aminokiselina s predloženim putem za sintezu norvalina u korelaciji s glikolizom i ciklusom limunske kiseline u *E. coli*. Zbog jednostavnosti neki koraci su preskočeni što je naznačeno isprekidanim linijama, brojevi se odnose na broj enzimskih reakcija. Enzimi su naznačeni genima koji ih kodiraju. Preuzeto i prilagođeno iz Soini et al., 2008.

Kako bi se ispitao biosintetski put nastanka norvalina, istraživani su regulacijski mutanti biosinteze leucina u bakteriji *Serratia marcescens* (Kisumi et al., 1976). Prvi enzim na biosintetskom putu razgranatih aminokiselina je  $\alpha$ -izopropilmalat sintaza (IPMS) koja je inhibirana krajnjim produktom, leucinom. Kako bi dokazali da taj enzim može katalizirati kondenzaciju acetil CoA s drugim  $\alpha$ -keto kiselinama osim s  $\alpha$ -ketoizovaleratom (prekursor leucina) napravljena su kinetička istraživanja s različitim  $\alpha$ -keto kiselinama. Dobiveni kinetički parametri (Tablica 1.) pokazuju da je afinitet za  $\alpha$ -ketobutirat manji nego za primarni supstrat, stoga je za odvijanje ove reakcije nužna akumulacija  $\alpha$ -ketobutirata u stanici.

**Tablica 1.** Kinetički parametri za različite  $\alpha$ -keto kiseline u reakciji koju katalizira  $\alpha$ -izopropilmalat sintaza u soju Ar 130-1 *Serratia marcescens*. Preuzeto i prilagođeno iz Kisumi et al., 1976.

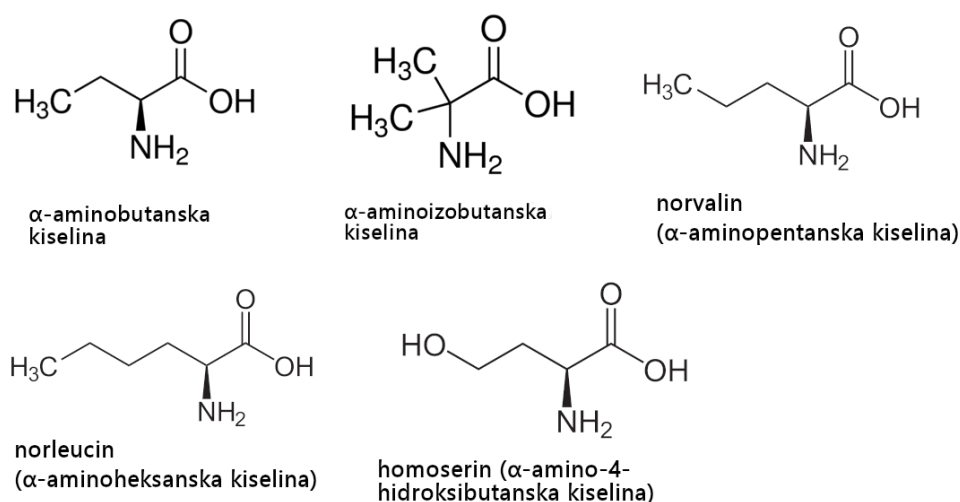
$\alpha$ -keto kiselina	$K_M$ (mol dm <sup>-3</sup> )	$V_{max}$ (nmol CoA/min/mg proteina)
$\alpha$ -ketoizovalerat	$7,7 \cdot 10^{-4}$	49
piruvat	$3,4 \cdot 10^{-3}$	33
$\alpha$ -ketobutirat	$4,7 \cdot 10^{-3}$	64
$\alpha$ -ketovalerat	$9,0 \cdot 10^{-3}$	16
$\alpha$ -keto- $\beta$ -metilvalerat	-	1

Sposobnost enzima kodiranih *leuABCD* operonom da koriste druge supstrate omogućuje izravno produživanje lanca piruvata, preko  $\alpha$ -ketobutirata i  $\alpha$ -ketovalerata do  $\alpha$ -ketokaproata. (Soini et al., 2008). Ovu hipotezu podupiru i eksperimentalni podaci od Apostol i suradnika koji su pokazali kako je pad koncentracije leucina praćen porastom koncentracije piruvata za kojim je slijedila akumulacija norvalina. Biosintetski put norvalina je tako razjašnjen u regulatornim mutantama *Serratia marcescens* (Kisumi et al., 1976). No, također je otkrivena akumulacija norvalina i u nerekombinantnom soju *E. coli* K-12 W3130 u uvjetima smanjene koncentracije kisika (Soini et al., 2008) i u *E. coli* s inaktiviranim prvim enzimom u biosintetskom putu razgranatih aminokiselina (Sycheva et al., 2007). Nakon prebacivanja na anaerobni metabolizam, uz smanjeni stanični rast uočena je i akumulacija piruvata pri čemu se norvalin znatno nakupio u stanici (1mM) (Soini et al., 2008). Rezultati istraživanja u *E. coli* podupiru model direktne konverzije piruvata u  $\alpha$ -ketobutirat, odnosno daju manju važnost protoku metabolita dužim putem preko oksaloacetata i treonina. Uvjeti za koje je pokazano da rezultiraju akumulacijom norvalina su relevantni kada je u velikim bioreaktorima zbog nesavršenog miješanja moguć nastanak zona bez kisika, a to su uvjeti dovoljni da potaknu biosintezu norvalina, a zatim i njegovu ugradnju u proteine tj. mistranslaciju. Ovi rezultati su

od praktične važnosti posebice u farmaceutskoj industriji prilikom osiguravanja proizvodnje nemodificiranih rekombinantnih proteina.

## 1.2. Norvalin- prebiotička aminokiselina

Saznanja da smanjenje koncentracije slobodnog kisika dovodi do akumulacije piruvata i posljedično biosinteze norvalina (Soini et al., 2008) sugeriraju moguće biokemijske i metaboličke posljedice razvoja visoko oksidirajućeg okoliša tijekom evolucije života na Zemlji. Jedno od glavnih neriješenih pitanja porijekla života je priroda evolucijskog procesa koji je doveo do selekcije L-aminokiselina koje danas pronalazimo u proteinima između mnoštva prebiotičkih analoga. Jednostavnost nastanka takvih prebiotičkih spojeva u pokusima Miller-Urey tipa (Miller, 1953) sugerira da su bili prisutni na primitivnoj Zemlji. Takve pretpostavke su poduprte kemijskom karakterizacijom gotovo 80 različitih aminokiselina u ugljičnim kondritima (vrsta meteorita) (Burton et al., 2012). U svom radu iz 1981. Weber i Miller diskutiraju odabir 20 proteinogenih aminokiselina. Naglasili su kako je poprilično iznenađujuća činjenica da se neki od glavnih prebiotičkih produkata (Slika 2.) ne pojavljuju u današnjim proteinima. Posebno su izdvojili pitanje izostanka hidrofobnih aminokiselina norvalina i norleucina (Nle). Kao objašnjenje je predloženo da je izostanak Nva iz današnjeg seta proteinogenih aminokiselina posljedica povećane rotacijske slobode norvalina oko proteinske okosnice u usporedbi s valinom. Hidrofobnost i električni naboj imaju ključnu ulogu u smatanju proteina i stabilnosti (Lu & Freeland, 2008). Iako su naboji leucina i norvalina usporedivi, norvalin je ne samo značajno manji, nego i manje hidrofoban (Tablica 2.).



**Slika 2.** Neke od prebiotičkih aminokiselina, prilagođeno prema Weber & Miller, 1981.

**Tablica 2.** Hidrofobnost ( $\log P$ ), van der Waalsov volumen i izoelektrična točka (pI) hidrofobnih aminokiselina. Preuzeto iz Alvarez-Carreño et al., 2013.

aminokiselina	$\log P$	van der Waalsov volumen ( $\text{Å}^3$ )	pI
leucin	-1,59	138,27	6,195
norvalin	-2,01	120,98	6,27
metionin	-2,41	139,49	5,77
norleucin	-1,52	138,27	6,15

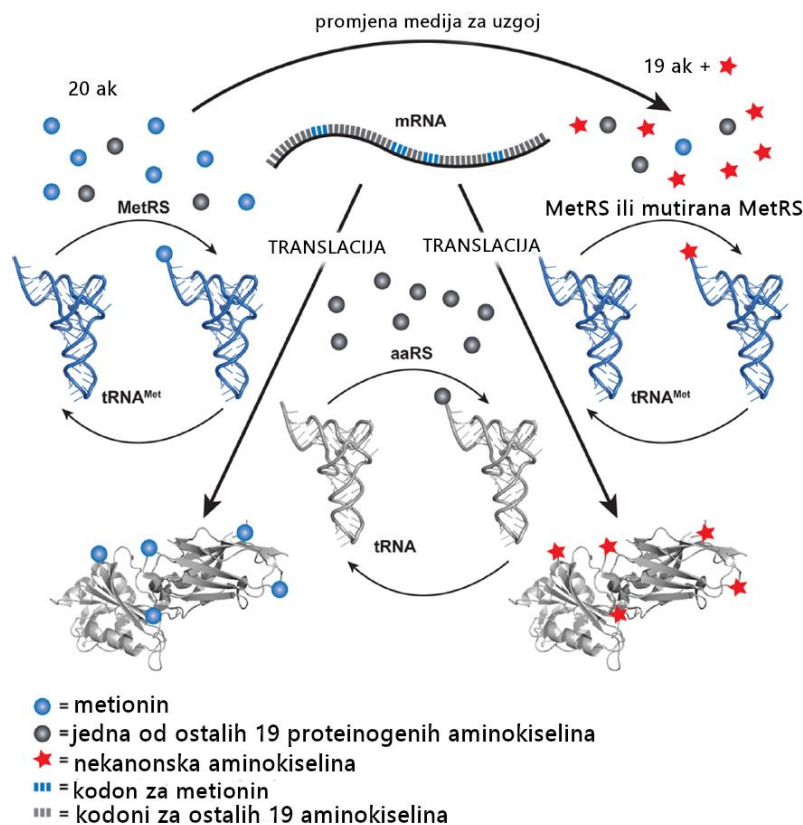
Pošto je stvaranje hidrofobne srži proteina jedan od procesa koji navodi smatanje (Gnanakaran et al., 2003), pretpostavlja se da bi tijekom razvoja sve kompleksnijih enzima, zamjena Leu s manjim Nva utjecala na pakiranje sekundarnih elemenata potrebnih za pravilno formiranje srži. Također bi utjecalo i na vezanje liganda te protein-protein interakcije te bi ograničilo sposobnost stvaranja stabilizirajućih struktura poput leucinom-bogatih ponavljanja ili leucinskih zatvarača koji su značajan motiv brojnih DNA i RNA- vezujućih proteina (Alvarez-Carreño et al., 2013). Vjerojatno je da su najraniji enzimi kodirani genomom bili mali polipeptidi s relativno jednostavnom strukturom. Iako leucin, kao i ostale hidrofobne aminokiseline, doprinosi nastanku hidrofobne srži proteina te njegovom ispravnom smatanju, ipak je poprilično odsutan iz aktivnih mjesta većine enzima (Holliday et al., 2009). Taj podatak sugerira kako su katalitičke aktivnosti leucina poprilično ograničene te da bi njegova zamjena manje hidrofobnim norvalinom primarno utjecala na svojstva smatanja malih, strukturno jednostavnih polipeptida tijekom rane biokemijske evolucije (Alvarez-Carreño et al., 2013).

### 1.3. Načini ugradnje norvalina u proteine

Ugradnja norvalina, primarno na leucinske pozicije u proteinima, je ishod kombinacije supstratnog promiskuiteta i multifunkcionalnosti biosintetskih enzima razgranatih aminokiselina i leucil-tRNA sintetaze (LeuRS) (Alvarez-Carreño et al., 2013). *In vivo* i *in vitro* pokusi pokazuju da nedostatak savršene specifičnosti elongacijskog faktora Tu i ribosoma može dovesti do ugradnje nekanonskih aminokiselina (Liu & Schultz, 2010). Ova saznanja potvrđuju da je primitivna sinteza proteina bila podložna greškama, a kao rezultat su se proizvodili mali katalitički peptidi heterogeni u točnosti i specifičnosti (Woese, 1987). Prirodna pojava Nva u proteinima je posljedica pogrešne aminoacilacije tRNA<sup>Leu</sup> norvalinom (Apostol et al., 1997). Točnost sinteze proteina ovisi o specifičnosti aminoacil-tRNA sintetaza (aaRS), koje

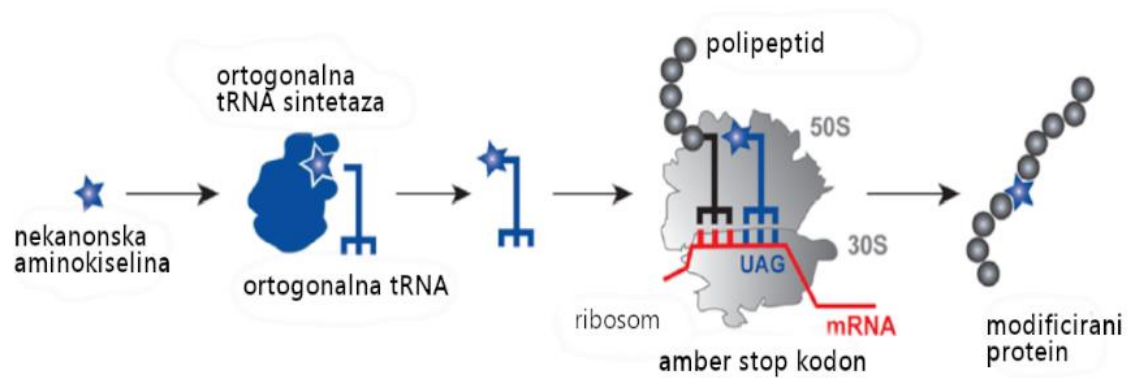
kataliziraju prvi korak biosinteze proteina, prema pripadnim aminokiselinama. Svaka aaRS prepoznaje jednu pripadnu aminokiselinu i kovalentno je veže na ispravnu tRNA (Perona & Hadd, 2012). Ipak, preciznost aaRS nije potpuna, stoga brojne aaRS mogu dovesti do ugradnje nepripadne, strukturno slične aminokiseline (Cvetesic et al., 2014; Yadavalli & Ibba, 2012; Young et al., 2011). Ovo je slučaj s razgranatim aminokiselinama pa tako LeuRS, ValRS i IleRS, koje su članovi razreda I aaRS imaju dodatne aktivnosti za popravak (engl. *proofreading*) koje hidroliziraju pogrešno nabijene tRNA (Brown & Doolittle, 1995). Dokaz da su leucil-, valil- i izoleucil-tRNA sintetaze ishod serijskih duplikacija gena, implicira da potiču od poprilično nespecifičnog enzima (Zhu et al., 2007) čija je supstratna nespecifičnost mogla dovesti do povećane ugradnje norvalina u evolucijski prve proteine. Njihove homologne domene za popravak (engl. *editing*) imaju isti način smatanja (engl. *fold*) koji se vjerojatno razvio nakon što se utvrdilo primarno katalitičko mjesto, ali prije duplikacije i divergencije koja je dovela do tri različite sintetaze (Zhu et al., 2007). Za ciljanu ugradnju norvalina u peptide često se koristi sinteza na čvrstom nosaču. Razvoj metode je zahtijevao pronalaženje prikladnih mehanički stabilnih, čvrstih faza i blage, ali djelotvorne kemikalije kako bi se spriječile negativne popratne reakcije (Amblard et al., 2006). Tako je 1970. uvedena zaštita reaktivnih skupina aminokiselina pomoću 9-fluorenilmetoksikarbonila (Fmoc) koja je omogućila izvođenje cijelog procesa sinteze uz korištenje blaže kemije. Metoda je značajno unapređivala od vremena kada je nastala. Uvođenjem različitih čvrstih faza, zaštitnih grupa za bočne ogranke i boljim razumijevanjem uvjeta solvatacije standardna metoda je unaprijeđena, automatizirana te se danas sinteza peptida od 30 do 50 aminokiselina može vrlo lako postići (Coin et al., 2007).





**Slika 3.** Ugradnja nekanonske aminokiseline u proteine pomoću selektivnog pritiska. Prirodna mRNA sadrži kodone za 20 proteinogenih aminokiselina (sivo). Metionin (plave sfere i pripadni plavi kodoni na mRNA) je zamijenjen s nekanonskom aminokiselinom (crvena zvjezdica). Promjena medija za uzgoj uklanja metionin, u auksotrofnom soju, i uvodi nekanonsku aminokiselinu zajedno s ostalih 19 proteinogenih aminokiselina. Neprirodna aminokiselina se nabija na tRNA<sup>Met</sup> i ugrađuje u proteine umjesto metionina. Preuzeto i prilagođeno iz Lang & Chin, 2014.

U zadnjih 15 godina rapidno se razvijala i kotranslacijska ugradnja nekanonskih aminokiselina u proteine koji se proizvode u stanici (Lang & Chin, 2014). Postoje dvije inačice ove metode; u prvoj se nekanonska aminokiselina natječe s proteinogenom kako bi postala supstrat za aaRS te se tako ugradila širom proteoma procesom statističke ugradnje (Slika 3.), a drugi pristup omogućava mjesno specifičnu ugradnju neproteinogenih aminokiselina razvojem novog aaRS/tRNA para (Slika 4.). Mogućnost specifične ugradnje neproteinogenih aminokiselina je veoma pogodna za eksperimentalne analize s modelnim polipeptidima.



**Slika 4.** Proširivanje genetičkog koda mjesno specifičnom ugradnjom nekanonskih aminokiselina. Ortogonalna tRNA sintetaza specifično prepoznaje nekanonsku aminokiselinu (plava zvjezdica) dodanu u medij za uzgoj i nabija je na ortogonalnu supresijsku tRNA. Ribosom zatim na mjestu amber stop kodona (UAG) u genu od interesa ugrađuje neprirodnu aminokiselinu i tako omogućava sintezu proteina s nekanonskom aminokiselinom na specifičnom mjestu. Preuzeto i prilagođeno iz Lang & Chin, 2014.

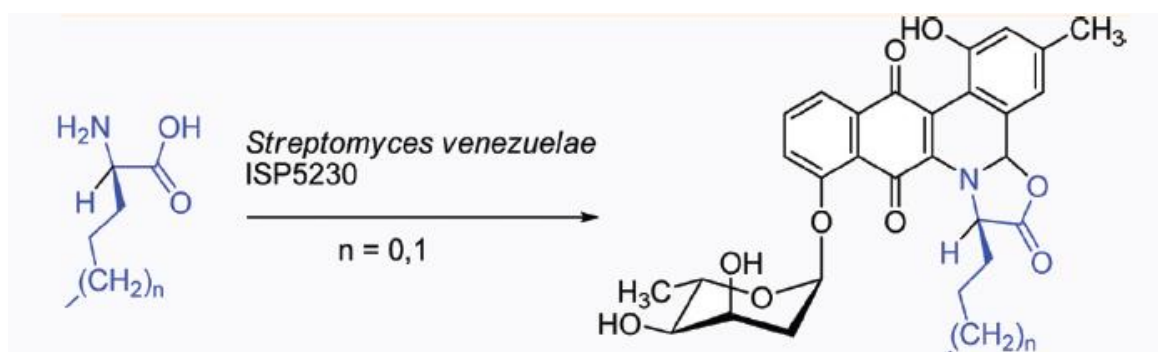
## 2. Norvalin u prirodnim spojevima, peptidima i proteinima

### 2.1. Norvalin u prirodnim spojevima

U ovom dijelu opisani su prirodni produkti bakterija i gljiva u kojima se prirodno pojavljuje norvalin ili je on umjetno dodan u njihovu strukturu kako bi se istražile funkcionalne promjene nastale uvođenjem nekanonske aminokiseline.

Prvi opisani primjer peptida u kojem se norvalin prirodno pojavljuje je antifungalni peptid kojeg proizvodi *Bacillus subtilis* (Nandi & Sen, 1953). Struktura ovog peptida nije određena, ali je tankoslojnom kromatografijom utvrđeno da se sastoji od: Asp, Glu, Ser, Thr, Ala, Tyr, Nva i Phe. Najintezivnija točka na kromatogramu je upućivala na najveću zastupljenost serina. Utvrđeno je da se radi o veoma hemolitičkoj supstanci koja se razlikuje od ostalih poznatih anti-gljivičnih peptida *B. subtilis* po svojim antibiotskim aktivnostima te izrazito niskim sadržajem glutamata i prisustvu nekanonske aminokiseline norvalina.

Poliketidi predstavljaju jednu od najvećih obitelji sekundarnih metabolita koji se nalaze u prirodi i često posjeduju zanimljive biološke aktivnosti. Zanimljivi članovi te porodice spojeva su jadomicini čija je jedinstvena značajka biosinteze promiskuitetnost koraka inkorporacije aminokiselina (Fan et al., 2012) (Slika 5.). To omogućuje formiranje različitih derivata jadomicina jednostavnim dodavanjem različitih aminokiselina u medij za uzgoj. Ugradnja različitih aminokiselina rezultira produktima različitih bioloških aktivnosti.



**Slika 5.** Ne-enzimska ugradnja aminokiselina (plavo) u oksazolonski prsten jadomicina (crno) u *Streptomyces venezuelae* ISP5230. Preuzeto iz Dupuis et al., 2011.

Kako bi proširili saznanja o povezanosti strukture i aktivnosti jadomicina, Dupuis i suradnici su odlučili analizirati kulture *Streptomyces venezuelae* ISP5230 uzgajanih s D-norvalinom (D-Nva), L-norvalinom (L-Nva), D-norleucinom (D-Nle) i L-norleucinom (L-Nle). Prethodno je pokazano da se oba enantiomera valina, metionina i fenilalanina ugrađuju i formiraju očekivane jadomicine (Borissow et al., 2007). Međutim, kulture uzgajane na L-Nva i L-Nle nisu uspjele proizvesti jadomicine, dok su kulture s dodatkom D-Nva i D-Nle dale dobre prihode jadomicina. Nisu poznati razlozi zašto je preferiran D-enantiomer, no jedna od mogućnosti je da *S. venezuelae* ISP5230 ne može unijeti L-aminokiseline iz medija. Citotoksičnost jadomicina s D-Nva (DNV) i D-Nle (DNL) je evaluirana korištenjem 59 vrsta kancerogenih staničnih linija. Obje komponente su inhibirale rast većine staničnih linija koje su testirane (Tablica 3.). Potvrđeno je da ovi jadomicini pokazuju antibakterijsku aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija. Ni jadomicin DNV, ni DNL nisu pokazali aktivnost protiv Gram-negativnih sojeva, ali su zato bili aktivni protiv *Staphylococcus epidermidis* C960 i kliničkog soja MRSA-e. Iz dobivenih podataka je zaključeno da dodatak metilenske skupine koja razlikuje DNV i DNL ne utječe na antimikrobna svojstva ova dva jadomicina.

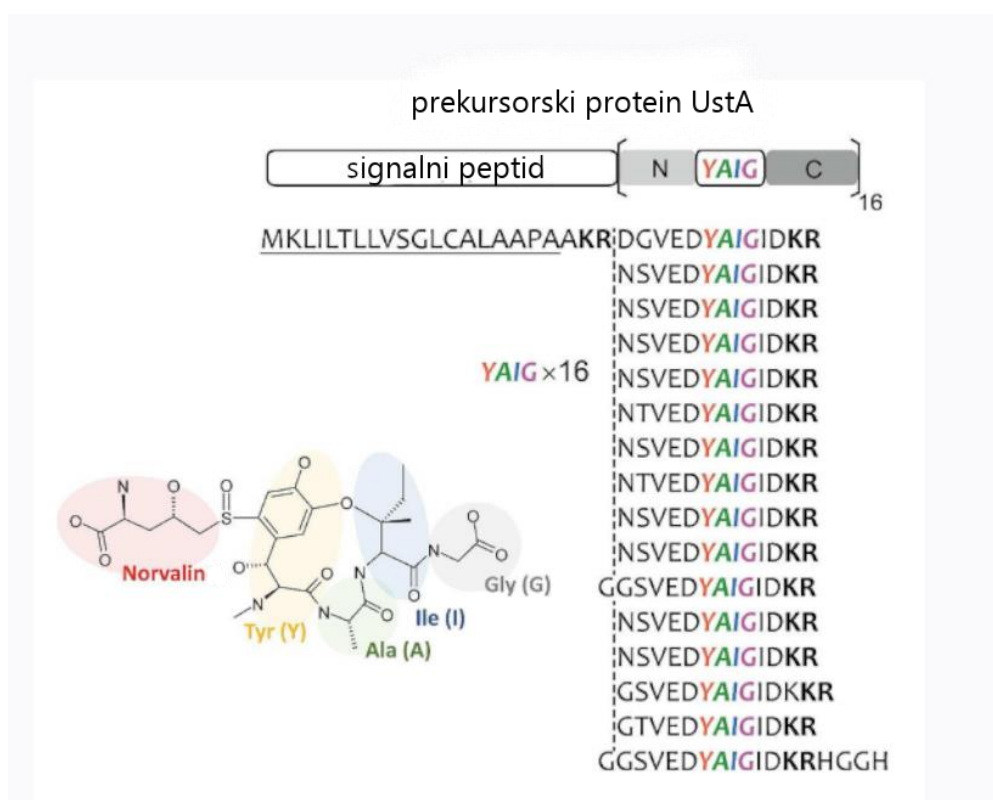
**Tablica 3.** GI<sub>50</sub>, TGI i LC<sub>50</sub> vrijednosti za jadomicine DNV i DNL prilikom *screeninga* u 59 kancerogenih staničnih linija. <sup>a</sup> Preuzeto iz Dupuis et al., 2011.

jadomicin	raspon koncentracija (nM-μM)	GI <sub>50</sub> (μM)		TGI (μM)		LC <sub>50</sub> (μM)	
			n		n		n
DNV	3,2-32	4,9	59	10	57	19	41
DNL	3,2-32	4,2	59	8,7	56	18	44

<sup>a</sup> GI<sub>50</sub>-koncentracija potrebna za inhibiciju staničnog rasta za 50%; TGI-koncentracija potrebna za inhibiciju staničnog rasta za 100%; LC<sub>50</sub>-koncentracija potrebna da uzrokuje smrt 50% stanica. Sve vrijednosti su izražene kao medijan, n je jednak broju kancerogenih staničnih linija od kojih je maksimum 59.

Još jedna skupina prirodnih spojeva koji imaju nezamjenjive uloge u razvoju lijekova i istraživanjima u području biomedicine su ribosomalno sintetizirani i posttranslacijski modificirani peptidi (RiPP). Svi RiPP prirodni produkti su prvo sintetizirani kao prekursorski peptidi na ribosomu, a zatim se posttranslacijski dorađuju (Arnison et al., 2013). Ustiloksini su prvi pronađeni prirodni produkti koji se sintetiziraju RiPP putem u filamentoznim gljivama. Ustiloksin B (Slika 6.) je otkriven u biljnoj patogenoj gljivi *Ustilaginoidea vireus*. Struktura ustiloksina B se sastoji od tetrapeptida Tyr-Ala-Ile-Gly (YAIG) i sadrži neobičnu modifikaciju norvalinom na hidroksiliranom tirozinskom ostatku. Tetrapeptid potječe od proteinskog

prekursora koji se nakon opsežne enzimske dorade pretvara u ustiloksin B. Istraživanjem biosintetskog puta je primijećeno da do ove neobične modifikacije norvalinom dolazi nakon ciklizacije tetrapeptida djelovanjem flavoprotein monooksigenaze (FMO) i piridoksal 5'-fosfat-ovisnog enzima. Još jedna posebnost ovog peptida uključuje prisutnost atoma sumpora (koji ne dolazi od Met ili Cys) koja se podudara s prisutnošću GST, cistein desulfuraze i  $\gamma$ -glutamil transpeptidaze u susjednom genskom klasteru (Keller et al., 2017).



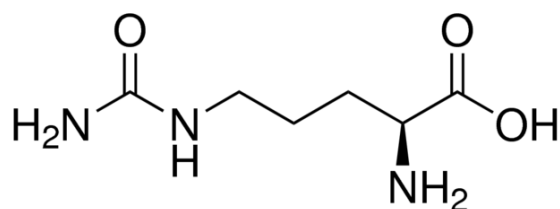
**Slika 6.** Struktura ustiloksina B i njegovog prekursorskog proteina UstA. Ustiloksin B se sastoji od cikličkog tetrapeptida Tyr-Ala-Ile-Gly (YAIG) čiji je tirozin modificiran neproteinogenom aminokiselinom norvalinom. Ciklički tetrapeptid je direktno kodiran genom za prekursor protein UstA. Preuzeto i prilagođeno iz Keller et al., 2017.

## 2.2 Norvalin u peptidima

U ovom odjeljku je napravljen pregled svih peptida iz baze podataka PDB (Protein Data Bank) koji sadrže norvalin te im je određena struktura. Norvalin se nalazi u sastavu peptida koji služe pri istraživanju modelnih sustava (Trp-cage i oligopeptid-vezujući protein) te u kemijski modificiranim peptidnim ligandima koji su osnova za razvoj peptidnih cjepiva. Osim peptida s riješenom strukturom, norvalin je korišten i prilikom istraživanja različitih varijanti antimikrobnih peptida.

### 2.2.1. Modelni peptidi

Trp-cage (Neidigh et al., 2002), peptid od 18 do 20 aminokiselina, je nastao kao primarni testni sustav za evaluaciju računalnih simulacija smatanja proteina (Day et al., 2010; Snow et al., 2002). Brojne stabilizirajuće interakcije u smotanom stanju Trp-cage-a su jako ovisne o pH. Jedna od značajnijih interakcija je ionski most između Asp9 i Arg16 (Barua et al., 2008). U istraživanju Graham et al. (2019) su dizajnirane vrste ovog modelnog peptida koje su značajno stabilnije pri pH 2,5 nego 7, a da su pri tom zadržale nativnu strukturu. Iako su već postojala istraživanja koja su istraživala stabilnost ovog peptida u ovisnosti o pH (Barua et al., 2008) ovo je prva studija koja je koristila norvalin kao nepolarnu zamjenu za arginin. S obzirom na to da je stabilnost solnog mosta (Asp9-Arg16) očito ovisna o pH, za pronalaženje stabilne strukture neovisne o pH je bilo nužno minimizirati utjecaj te interakcije. Zbog toga je uveden Nva na poziciju 16. Opažena destabilizacija u mutiranom peptidu R16Nva je veća i od one u mutaciji D9N i R16Cit (Cit-citrulin, Slika 7.) pri pH 7 (Tablica 4.).



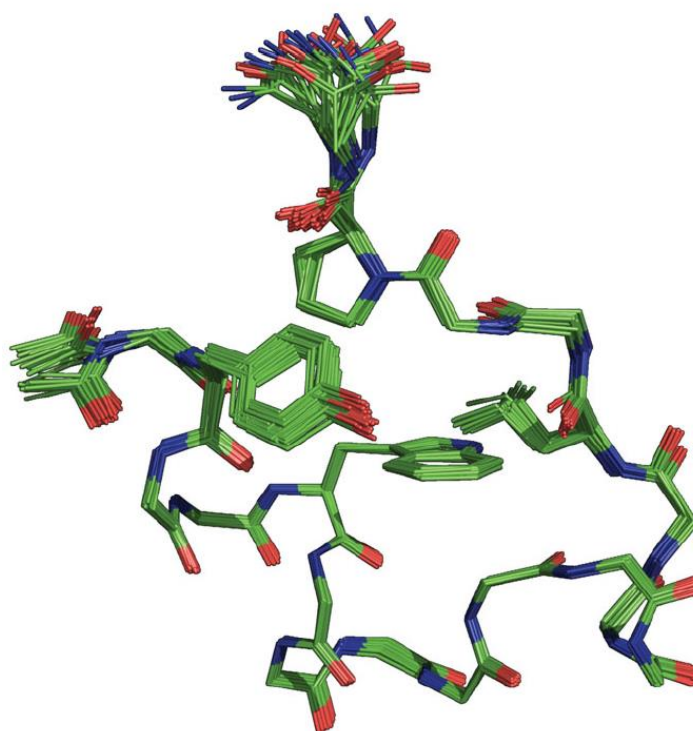
**Slika 7.** Struktura citrulina. Izvor <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/lcitrulline1751937275811?lang=en&region=HR>

Zamjena R16 s citrulinom rezultirala je manjom destabilizacijom na oba pH (Tablica 4.). Moguće je da R16Cit doprinosi većoj stabilnosti u odnosu na R16Nva zbog povoljnijeg smještaja bočnog ogranka na poziciji 16. Jedna strana tog bočnog ogranka je u potpunosti površinski izložena otapalu pa je nepolarni norvalin nepovoljniji na toj poziciji. Analizi R16Cit i R16Nva su pokazali značajan doprinos stabilizaciji prilikom zakiseljavanja, a povećanje stabilnosti pri pH 2,5 je izraženije s povećanjem temperature.

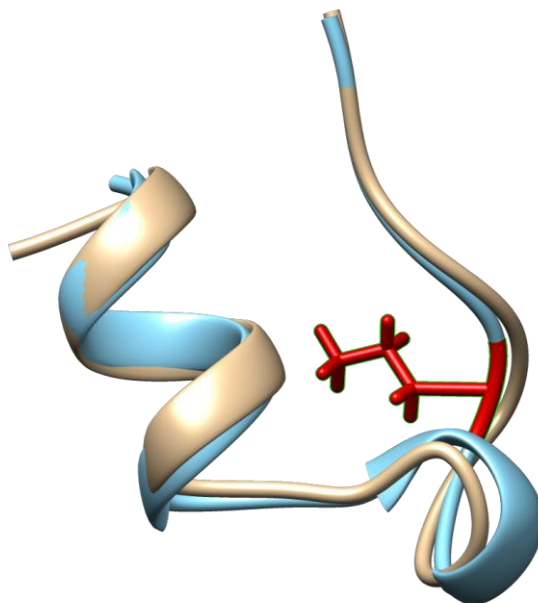
**Tablica 4.** Promjene u stabilnosti ( $\Delta\Delta G_f$ ) inducirane mutacijama u Trp-cage-u i promjenama pH na 300K. Preuzeto i prilagođeno iz Graham et al., 2019.

Peptid	$\Delta\Delta G_f$ pri pH 7	$\Delta\Delta G_f$ pri pH 2,5
R16Nva	4,58	1,47
R16Cit	3,65	0,58
D9N	3,65	1,60

Zbog opsežnosti mutacija potrebnih za generiranje Trp-cage peptida s većom stabilnosti na pH 2,5 postavilo se pitanje je li struktura nativnog motiva ostala sačuvana. Uspoređivanjem strukture R16Nva (Slika 8.) pri pH 2,5 s prethodnim NMR strukturama Trp-cage peptida divljeg tipa na pH 6,5-7, u kojima je solni most očuvan, vidi se da se strukture podudaraju te da se R16Nva varijanta peptida pravilno smotala (Slika 9.). Jedina primijećena devijacija između struktura je bila u serinskom bočnom ogranku na poziciji 14. Primijećeno je da bočni ogranak Ser ulazi duboko u srž Trp-cage-a kad je Arg zamijenjen Nva, dok se u prisutnosti Arg hidroksilna skupina Ser može povezati vodikovom vezom s  $\epsilon$ -amino skupinom Arg.



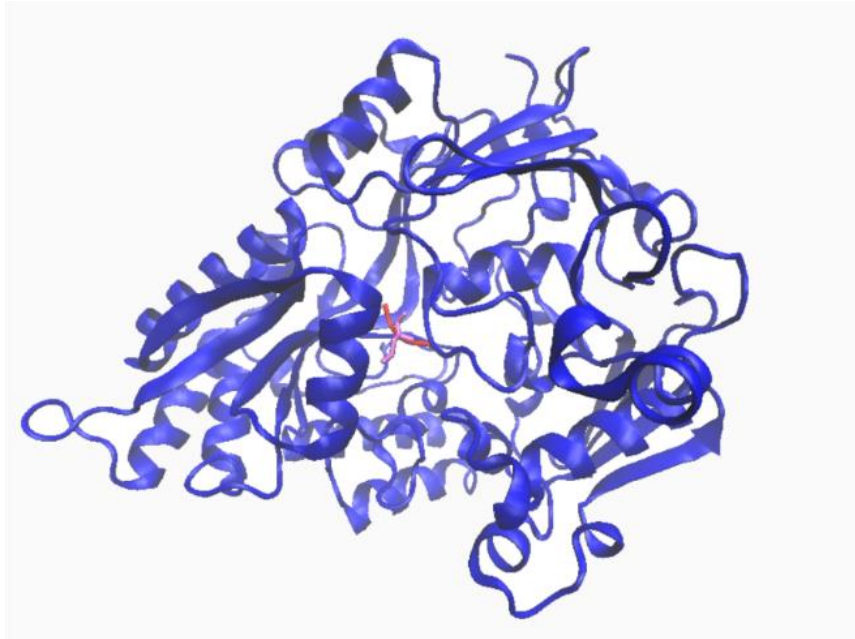
**Slika 8.** Obitelj NMR struktura mutante R16Nva pri pH 2,5. Prikazani bočni ogranci su Y3, W6, Nva16, i P19. Preuzeto i prilagođeno iz Graham et al., 2019.



**Slika 9.** Preklopljene NMR strukture Trp-cage peptida divljev tipa (bež) s mutantom R16Nva (plavo) na kojem je norvalin označen crveno. Preuzeto i prilagođeno iz Graham et al., 2019.

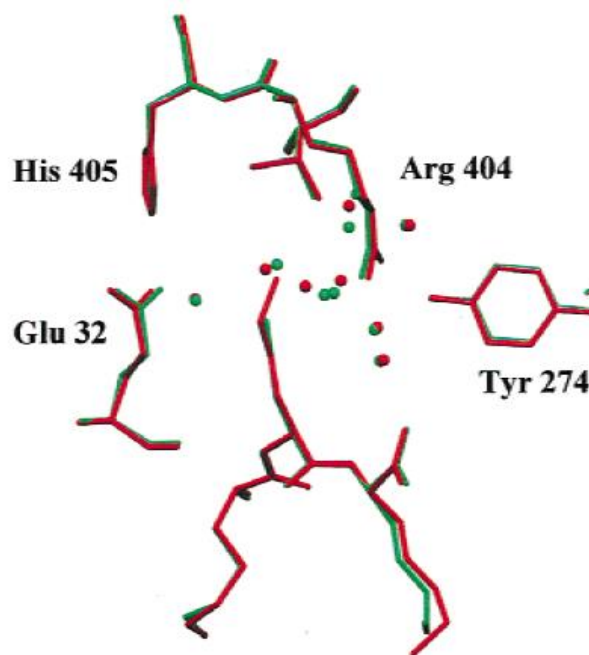
Još jedan modelni sustav koji se proučavao koristeći neproteinogene aminokiseline je oligopeptid-vezujući protein OppA. Ovaj protein, prvi put pronađen u periplazmi Gram-negativnih bakterija, veže široki spektar peptida veličine od dvije do pet aminokiselina te služi kao inicijalni receptor za transport peptida preko stanične membrane (Guyer et al., 1986). OppA predstavlja pogodan sustav za istraživanje nekovalentnih interakcija te veze između strukture i energije. OppA u potpunosti obuhvaća svoje ligande i tako ih razdvoji od sloja otapala (Tame et al., 1994). Okosnica tripeptida stvara vodikove veze s proteinom, a bočni lanci peptida su smješteni u velikim hidratiziranim šupljinama proteina. U istraživanju Davies et al. (1999) su koristili peptide s neproteinogenim aminokiselinama koji su im omogućili sistematičnije istraživanje manjih, suptilnijih promjena nego što je moguće kad se koristi ograničeni set 20 proteinogenih aminokiselina. U dijelu istraživanja u kojem su proučavali utjecaj dužine hidrofobnog bočnog lanca koristili su tripeptide Lys-Nle-Lys (KNleK), Lys-Nva-Lys (KNvaK) (Slika 10.) i prirodni ligand Lys-Ala-Lys (KAK).





**Slika 10.** Struktura OppA proteina u kompleksu s tripeptidom Lys-Nva-Lys dobivena pomoću rendgenske kristalografije. Protein je označen plavo, tripeptid crveno, a norvalin na drugoj poziciji u ligandu rozo. PDB ID: 1B6H.

Metodama izotermalne titracijske kalorimetrije i difrakcijom X-zraka na kristalu okarakterizirane su interakcije između OppA i peptidnih liganda. Svi kompleksi OppA::mutirani ligand su pokazali identičnu poziciju  $C_{\alpha}$  atoma i sličnu konformaciju bočnih ogranaka proteina OppA. Jedina iznimka su bili bočni ogranci koji stvaraju džep za drugu aminokiselinu u tripeptidu koja je varijabilna. Oba tripeptida, KNvaK i KNleK (Slika 11.) se vežu sa sličnim afinitetima, ali s različitim promjenama entalpije. KNvaK se čvrsto veže zahvaljujući maloj, relativno povoljnoj entalpiji ( $\Delta H=7.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), dok se KNleK veže s relativno velikom promjenom entropije ( $\Delta S=220 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ). Izmjereno povećanje entropije za KNleK u odnosu na KNvaK dolazi od povećanog broja istisnutih molekula vode prilikom desolvatacije dodatne metilne skupine. Kako bi se objasnio nepovoljan utjecaj dodatne metilenske skupine na entalpiju, treba uzeti u obzir proteinske bočne ogranke Arg404 i Glu32. Nva se smješta u blizini nepolarnih metilenskih grupa Glu32, a veći Nle dolazi bliže karbonilu glutamata i argininu. Stoga, prilikom vezanja KNleK dolazi do uvođenja nepolarne skupine u nabijenu regiju džepa proteina.

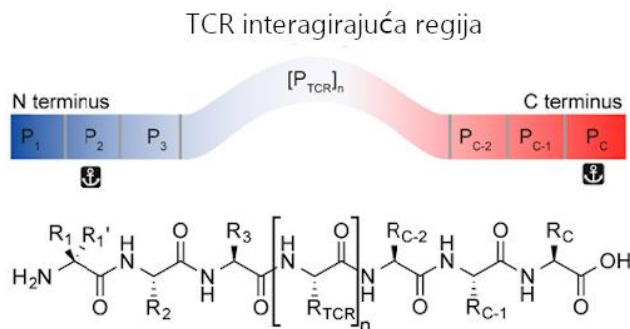


**Slika 11.** Preklopljene strukture tripeptida KNvaK (zeleno) i KNleK (crveno) s naznačenim bočnim ograncima proteina u veznom džepu. Preuzeto i prilagođeno iz Davies et al., 1999.

Tijekom istraživanja tripeptida s pozitivno nabijenom drugom aminokiselinom također nije primijećena izravna korelacija između afiniteta i  $\Delta H$  i  $\Delta S$ , ali je opaženo preferabilno vezanje hidrofobnih u odnosu na pozitivno nabijene bočne ogranke.

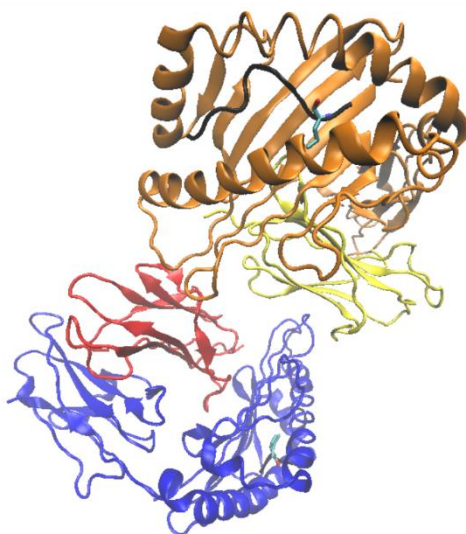
### 2.2.2. Peptidna cjepiva

Uz razvoj lijekova, i razvoj novih, poboljšanih cjepiva se može istraživati primjenom kemijski modificiranih peptidnih liganda (engl. *chemically enhanced altered peptide ligands-CPLs*) (Rosenberg et al., 2004). Peptidi koji se na taj način unesu u pacijenta oponašaju epitope ciljnih stanica koji su u kompleksu s MHC molekulama. Nakon prepoznavanja epitop-MHC, stimuliraju se citotoksične T stanice i započinje imunski odgovor (Engels et al., 2013). Vrijeme poluživota peptid-MHC kompleksa direktno korelira s imunogenosti (van der Burg et al., 1996) i produljeno trajanje te interakcije bi stoga moglo dovesti do učinkovitijih peptidnih cjepiva preko indukcije većeg broja epitop-specifičnih limfocita T (Yu et al., 2004). MHC molekule razreda I vežu peptide veličine 8-10 aminokiselina ako oni sadrže preferirane bočne ogranke na tzv. sidrećim (engl. *anchoring*) pozicijama (Rammensee et al., 1995) (Slika 12.).



**Slika 12.** Shematski prikaz epitopa koji se veže na MHC molekulu HLA-A\*0201, simbolom sidra su označene sidreće (engl. *anchoring*) pozicije na N- i C-terminusu. Sidreće pozicije se većinom nalaze blizu N- i C-kraja peptida dok se interakcija s TCR receptorima limfocita T ostvaruje preko središnjeg dijela peptida. Preuzeto i prilagođeno iz Hoppes et al., 2014.

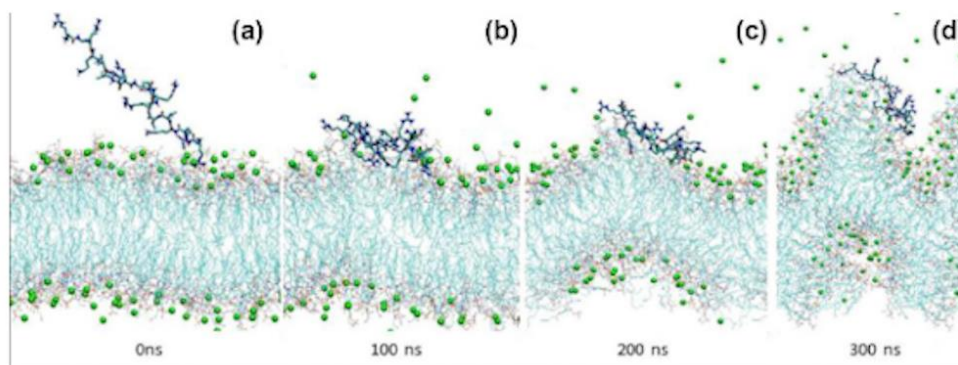
Kako bi poboljšali i stabilizirali interakciju peptid-MHC Hoppes i suradnici su u svom istraživanju koristili ugradnju više od 90 neproteinogenih  $\alpha$ -aminokiselina među kojima i norvalin. Nakon opsežnih pretraživanja (engl. *screeninga*) CPL varijanti melanomskog epitopa primijećeno je da određene zamjene neproteinogenim aminokiselinama pokazuju povećani afinitet melanomskog epitopa Melan-A/Mart-1 za MHC molekulu HLA-A\*0201. U slučaju sidreće pozicije P2 (Slika 12.) to su bile ak: Nle, Nva i 2-aminooctena kiselina. Kako bi odredili čimbenike na molekularnoj razini koji doprinose povećanom afinitetu riješili su kristalnu strukturu HLA-A\*0201 u kompleksu s modificiranim ligandom [am-phg] [Nva] AGIGILT [Prg] (Slika 13.). Predloženo je da Nva doprinosi stabilizaciji pomoću van der Waalsovih interakcija i također pomoću CH- $\pi$  interakcije s Tyr7 MHC molekule. Za ovaj potonji tip interakcije je pokazano da značajno doprinosi stabilnosti kompleksa (Uchtenhagen et al., 2013). Takav modificirani melanomski epitop je pokazao imunogenost i produljenu aktivaciju citotoksičnih T stanica *in vitro* u odnosu na nativni epitop. Uvođenje neproteinogenih aminokiselina u peptidna cjepiva tako otvara nove putove za dizajn epitopa koji će poboljšati terapijske ishode cijepljenja.



**Slika 13.** Kristalna struktura HLA-A\*0201 u kompleksu s modificiranim melanomskim epitopom [amphg][Nva]AGIGILT[Prg]. Lanci proteina HLA-A\*0201 su označeni plavom, crvenom, žutom i narančastom, a modificirani epitop je prikazan pomoću crne linije i na njemu je svijetloplavo označen norvalin. PDB ID 4WJ5.

### 2.2.3. Antimikrobni peptidi

Gram-negativne bakterije su karakteristične po prisustvu dodatne vanjske membrane koja im pruža zaštitu kao prva linija obrane protiv toksičnih agensa (Nikaido, 2003). Zbog rastuće otpornosti na antibiotike i porasta smrtnosti uzrokovane otpornim patogenima razvijen je alternativni pristup koji kombinira upotrebu antibiotika i antimikrobnih peptida „pomagača“ (Lakshminarayanan et al., 2016). Metoda se temelji na narušavanju strukture vanjske membrane koje je potaknuto „pomagačima“ kako bi se olakšao brži unos antibiotika u bakteriju. Pokazano je da razgranati peptid B2088 formira čvrsti kompleks s lipopolisaharidima vanjske membrane (Slika 14.) te da ima antibakterijsko djelovanje protiv različitih Gram-negativnih patogena (Bai et al., 2012). Kako bi se dobio bolji uvid u povezanost strukture i funkcije, dva valina iz peptidne sekvence (RGRKVRR)<sub>2</sub>KK su supstituirana nekolicinom proteinogenih i neproteinogenih ak (Lakshminarayanan et al., 2016). Modifikacije s alaninom i norvalinom su pokazale porast minimalne inhibitorne koncentracije što upućuje na važnost hidrofobnosti izopropilnih bočnih lanaca valina. Ispitivanjem sinergističkog učinka s antibioticima je pokazano da modifikacije peptida B2088 s norvalinom imaju najbolji aditivni efekt s aminoglikozidima i kloramfenikolom.



**Slika 14.** Prikaz MD simulacije interakcija antimikrobnog peptida „pomagača“ B2088 i dvosloja lipida A koji gradi vanjsku membranu bakterija. a) 0 ns b) 100 ns c) 200 ns d) 300 ns. Peptid je označen plavim štapićima, lipidni dvosloj svijetloplavim linijama, a kalcijevi ioni zelenim sferama. Preuzeto iz Lakshminarayanan et al., 2016.

Istraživanje aktivnosti antimikrobnih peptida i njihovih modificiranih verzija nije ograničeno samo na bakterijske vrste već se ispituje i njihova djelotvornost protiv patogenih gljivica (Burrows et al., 2006; Stark et al., 2002). Vrste roda *Candida* su najčešći uzročnici oportunističkih gljivičnih infekcija sisavaca (Pittet et al., 1997). Zato je razvijena nova vrsta antifungalnih peptida koju su dizajnirani tako da oponašaju transmembranske dijelove integralnih membranskih proteina (Stark et al., 2002). Takvi peptidi, prozvani kaksini zbog svoje primarne strukture KKAAAXAAAAAXAAWAAX-AAAKKKK-amid (X označava bilo koju aminokiselinu), se razlikuju od prirodnih kationskih antimikrobnih peptida (CAP, Slika 15.) po tome što imaju ne-amfipatski hidrofobni segment za razliku od tipične amfipatske  $\alpha$ -zavojnice. Kao nastavak istraživanja kaksina testirano je antifungalno djelovanje nekoliko derivata modificiranih neproteinogenim aminokiselinama protiv 8 patogenih vrsta *Candida* (Burrows et al., 2006). Jedan od peptida dw17-Nva-6K sadrži norvalin na mjestu alanina. Peptidna modifikacija s norvalinom je pokazala najbolju antifungalnu aktivnost (Tablica 5.) u usporedbi s prirodnim CAP. Unatoč obećavajućoj djelotvornosti protiv različitih sojeva, kaksin s norvalinom je pokazao znatnu hemolitičku aktivnost. Zbog povećane toksičnosti za stanice sisavaca, ova modifikacija peptida nije prikladna kao terapeutik usprkos dobroj MIC vrijednosti.

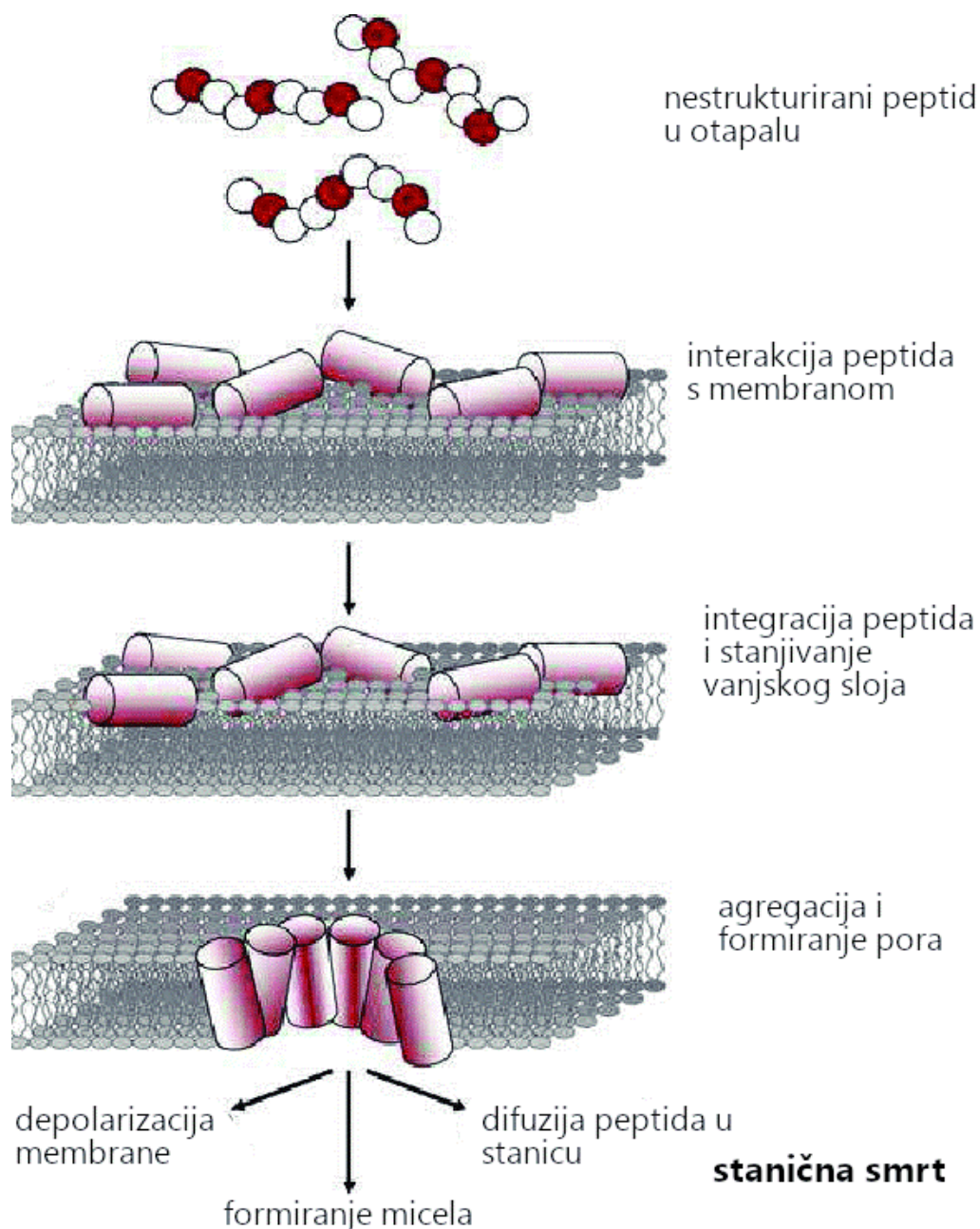
**Tablica 5.** Kationski peptidi korišteni u istraživanju Burrows et al., 2006. MIC-minimalna inhibitorna koncentracija.

<b>Peptid</b>	<b>Sekvenca <sup>a</sup></b>	<b>Hemolitička aktivnost (%)<sup>b</sup></b>	<b>MIC (mg/L) protiv Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	<b>MIC (mg/L) versus Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>
F18	KAFKKWAKFAAKAA KAAA-NH <sub>2</sub>	7,0	16	>128
dF21-10K	kkkkkkkkkkaafaawaafaa-NH <sub>2</sub>	1,0	32	32
dW17-6K	kkkkkkaawaawaawaa-NH <sub>2</sub>	0,8	16	128
5W17-6K	KKKKKKAWWAAWAAW WA-NH <sub>2</sub>	52,4	64	32
dW17-Nva-6K	kkkkkka(Nva)wa(Nva)w(Nva) aw(Nva)a-NH <sub>2</sub>	44,0	64	32
Referentni peptid				
Magainin II amid	GIGKFLHAAKKFAKAFVA EIMNS-NH <sub>2</sub>	106,7	64	16
Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRIS EGIAIQGGPR-NH <sub>2</sub>	1,6	16	>128

<sup>a</sup> peptidne sekvence velikim slovom označavaju L-enantiomere, ona malim slovima su D-enantiomeri

<sup>b</sup> Hemolitička aktivnost uspoređena s Triton X-100 (100%) i samim puferom (0%)





**Slika 15.** Mehanizam djelovanja kationskih antimikrobnih peptida. Preuzeto i prilagođeno iz Osman & Sitohy, 2015. (Osman & Sitohy, 2015)

### 2.3. Norvalin u proteinima

Prvi slučaj statističke ugradnje norvalina na leucinske pozicije u proteinu je bio prije više od 20 godina kad je opisan rekombinantni hemoglobin proizveden u *E. coli*. Napretkom kemijske sinteze, ugradnja nekanonskih aminokiselina više nije ograničena na kratke peptide te je omogućena sinteza čitavih proteina koji u svom sastavu imaju neproteinogene

aminokiseline. Tako je zabilježena ugradnja norvalina u inzulin- jedan od ključnih proteinskih hormona ljudskog metabolizma. Osim u proteinima koji su iznimno važni za funkcioniranje ljudskog organizma opisane su i inačice proteina koje su korištene za istraživanje fundamentalnih kemijsko-fizikalnih svojstava (ribonukleaza S i superzavojnica 1CW).

### 2.3.1. Ključni proteini ljudskog metabolizma

Osim ugradnje norvalina u peptide, zabilježena je i ugradnja u čitave proteine. Prvi opisani slučaj prirodne ugradnje norvalina na leucinske pozicije bio je prilikom ekspresije rekombinantnog hemoglobina u *E. coli* (Apostol et al., 1997). Rekombinantni hemoglobin (rHb1.1) je ljudski hemoglobin stabiliziran fuzijom dva  $\alpha$ -globinska lanca (di- $\alpha$ -globin) te sadrži 72 leucina od ukupno 575 aminokiselina što je 12,5%. Naspram tome, tipičan protein *E.coli* sadrži prosječno 8,4% leucina (Schaechter, 2001), stoga rHb1.1 spada u leucinom-bogate proteine. Visoki stupanj ekspresije leucinom-bogatih proteina može dovesti do nedostatka leucina i na taj način stimulirati derepresiju leucinskog operona uz posljedičnu proizvodnju norvalina (Bogosian et al., 1989). Analizom aminokiselina je određen ukupni postotak ugradnje Nva (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Ukupna razina zamjene norvalinom određena OPA (*orto*-ftalaldehid) aminokiselinskom analizom u kontrolnom uzorku A i uzorku B. Preuzeto iz Apostol et al., 1997.

Uzorak rHb1.1	Leu (mM)	Nva (mM)	% zamjene
uzorak A	4,96	BD <sup>a</sup>	<0,05
uzorak B	5,04	0,037	0,73

<sup>a</sup> BD (below detection)-ispod razine detekcije



**Tablica 7.** Postotak misinkorporacije norvalina na leucinska mjesta pomoću LC/MS. Preuzeto iz Apostol et al., 1997.

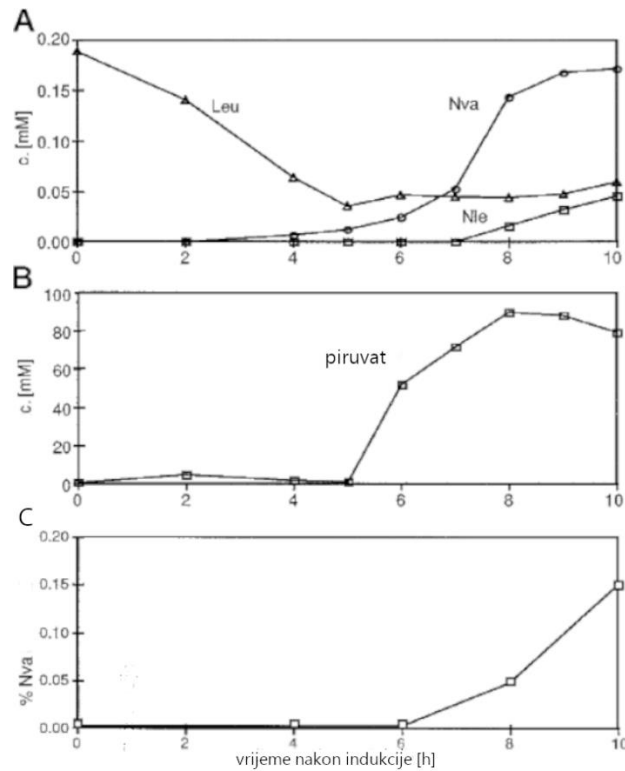
Pozicija supstitucije	Uzorak A (%)	Uzorak B (%)
Leu <sup>β3</sup>	ND <sup>a</sup>	0,6
Leu <sup>β14</sup>	ND	0,7
Leu <sup>β48</sup>	ND	0,6
Leu <sup>β96</sup>	ND	34,
Leu <sup>β141</sup>	0,2	3,0
Leu <sup>β110</sup> Leu <sup>β114</sup> <sup>b</sup>	ND	1,6
Leu <sup>di-α29</sup>	ND	0,5
Leu <sup>di-α34</sup>	ND	0,9
Leu <sup>di-α48</sup>	ND	0,6
Leu <sup>di-α144</sup>	ND	0,5

<sup>a</sup> ND- nije detektirano

<sup>b</sup> u ovom peptidu su dva leucina; postotak supstitucije je prosjek na ove dvije pozicije

Za određivanje distribucije Nva u rekombinantnom hemoglobinu uzeto je 8 triptičkih peptida koji sadrže po jedan Leu i u Tablici 7. je prikazan postotak pogrešne ugradnje Nva. Podaci za uzorak B upućuju na to da postoji varijacija u mjestima ugradnje kroz di-α i β-globinske lance. Kontrolni uzorak A je pokazao mjerljivu supstituciju isključivo na poziciji 141 u β-lancu (Tablica 7.) što je jedna od najfrekventnijih pozicija u uzorku B. Dvije pozicije s najvećom ugradnjom Nva u uzorku B (Tablica 7.) se poklapaju s pojavom CUA, najrjeđe korištenim leucinskim kodonom u *E. coli* (Sharp et al., 1988). Ova pojava sugerira da bi misinkorporacija mogla biti tRNA-specifična, odnosno vjerojatnija na rijetko korištenim kodonima. Kako bi se ispitala ta hipoteza, konstruirana je nova verzija β-globinskog gena u kojem su dva CUA kodona zamijenjena s CUG, najčešće korištenim Leu kodonom u *E. coli*. Ova promjena je rezultirala jednakom količinom proizvedenog rHb1.1 i identičnom razinom ugradnje Nva. Tako je pokazano da kodon-dirigirana ugradnja norvalina ne igra značajnu ulogu u ukupnoj razini misinkorporacije. Moguće je da niske razine na pojedinim pozicijama odražavaju strukturne zahtjeve za ispravno smatanje, ugradnju hema i slaganje funkcionalnog trimernog rHb1.1. Nivo leucina izmjeren u staničnom ekstraktu je padao tijekom prvih 5h te se onda zadržao relativno konstantan tijekom fermentacije. Praćen je i nivo piruvata, primarnog supstrata za biosintezu Nva (Sycheva et al., 2007) te je primijećeno da je on naglo porastao nakon stabilizacije razine

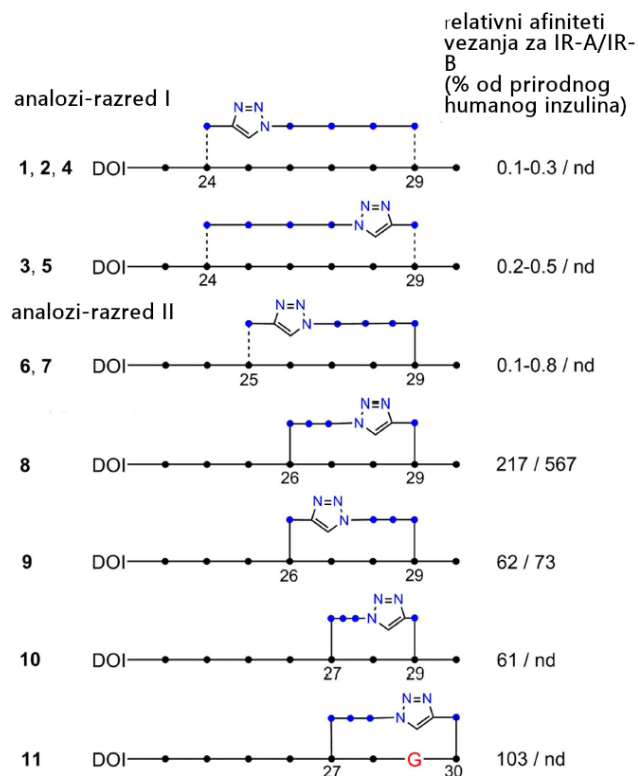
leucina. Akumulacija piruvata je zatim brzo praćena pojavom norvalina (Slika 16.). Pošto endogena sinteza Nva sama nije dovoljna da proizvede mjerljive razine pogrešne ugradnje Nva u proteine, predloženo je da je za misinkorporaciju bitan omjer Nva i Leu. Relativna koncentracija Leu je u normalnim stanicama viša od Nva pa je omjer Nva/Leu mali. Takav omjer omogućava da se tRNA<sup>Leu</sup> ispravno nabije što sprječava značajnu ugradnju Nva.



**Slika 16.** Akumulacija odabranih aminokiselina i piruvata te postotak misinkorporacije norvalina u staničnom lizatu *E. coli* nakon fermentacije A) akumulacija Leu, Nva i Nle B) akumulacija piruvata C) postotak pogrešne ugradnje norvalina u rekombinantni hemoglobin. Preuzeto iz Apostol et al., 1997.

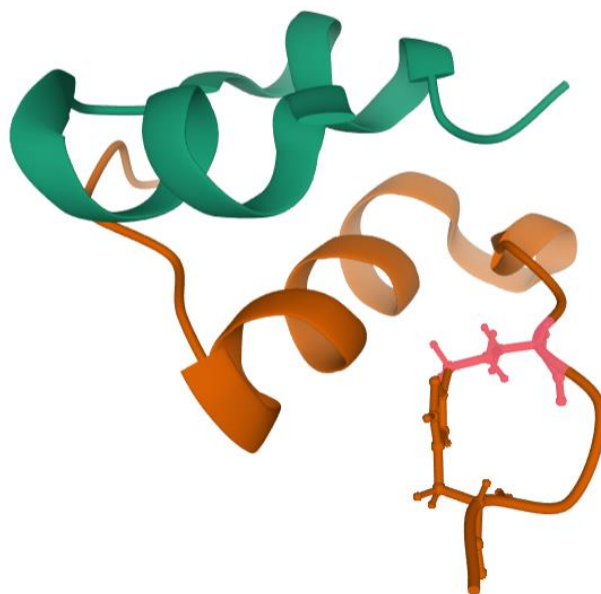
Nadalje, norvalin je korišten i prilikom istraživanja ključnog hormona ljudskog metabolizma inzulina (Viková et al., 2016). Inzulin je mali proteinski hormon koji se sastoji od A-lanca (21 aminokiselina) i B-lanca (30 aminokiselina) te svoj biološki utjecaj vrši prilikom vezanja na tirozin-kinazni receptor (IR) (Taniguchi et al., 2006). Postoje dvije izoforme IR: IR-A i IR-B čija je raspodjela tkivno specifična (Moller et al., 1989). Nakon nedavno otkrivene 3D strukture kompleksa inzulina s IR (Menting et al., 2013) primijećeno je da dio inzulinskog B-lanca (B22-B30) mora promijeniti konformaciju prilikom vezanja na receptor. Kako bi postigli stabilizaciju te aktivne konformacije, u radu iz 2016. (Viková et al., 2016) su koristili Cu<sup>I</sup>-kataliziranu cikloadiciju da povežu određene aminokiseline C-terminalnog dijela B-lanca. Kao prekursori su korišteni bočni ogranci s azido i alkinil bočnim ograncima. Sintetizirano je 11

inzulinskih analoga koji su podijeljeni u dva razreda na temelju korelacije između afiniteta analoga za receptor i vrste kovalentne poveznice (engl. *crosslinking*) (Slika 17.). Osim smanjene udaljenosti između kovalentno povezanih bočnih ogranaka, u drugoj skupini analoga je azidonorleucinski prekursor zamijenjen s kraćim azidonorvalinom kako bi se omogućilo čvršće povezivanje te su ti analozi pokazali znatno bolju aktivnost.



**Slika 17.** Shematski prikaz kovalentnog povezivanja unutar oktapeptida B-lanca inzulina (engl. *crosslinking*). Prva grupa se sastojala od  $i+5/i+4$  povezanih analoga koji su bili neaktivni. Za razliku od tih prvih sedam analoga, druga grupa je imala kraće,  $i+3/i+2$  ciklizacije te su pokazivali visoku aktivnost. Crne točke predstavljaju  $C_{\alpha}$  atome proteinske okosnice, a plave predstavljaju  $CH_2$  skupine linker-aminokiselina s azido i alkinil bočnim ogranacima. Isprekidane linije označuju alternativne kiralnosti. Crveno slovo G označava mutaciju glicinom. Desno su prikazani afiniteti vezanja u odnosu na nativni inzulin. DOI-des(B23-B30) oktapeptid-inzulin. nd-nije određeno. Preuzeto i prilagođeno iz Viková et al., 2016.

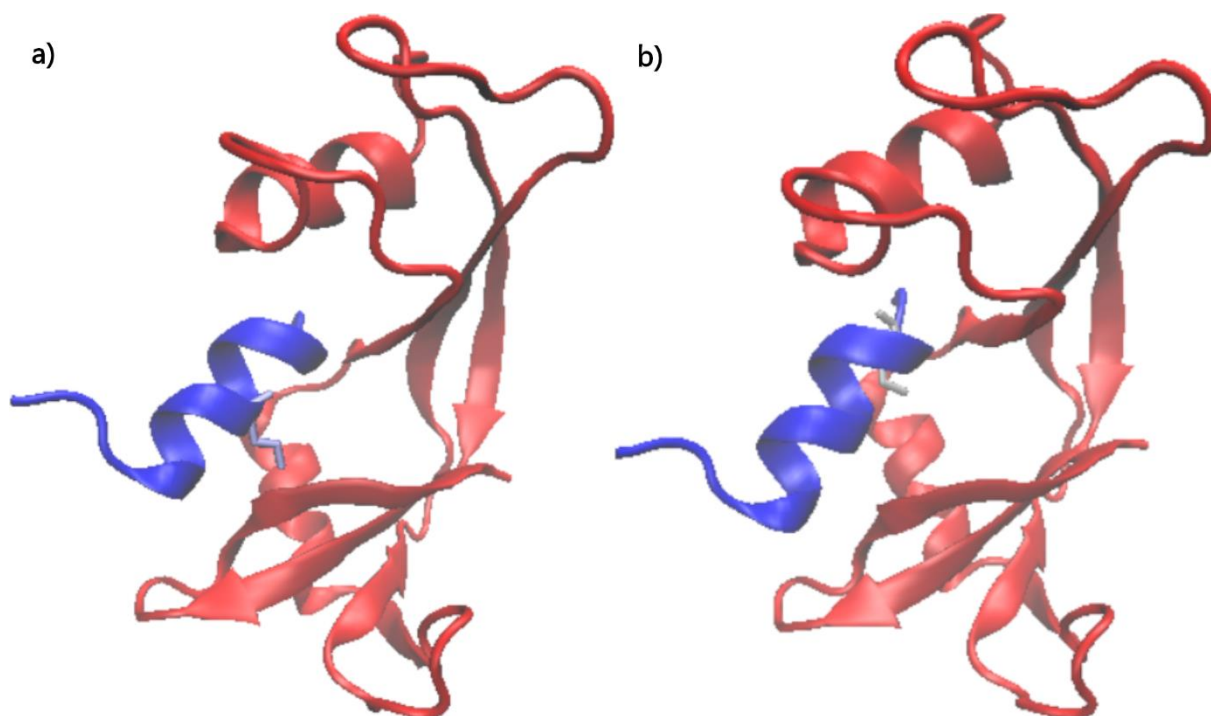
Značaj najaktivnijeg analoga 8 s azidonorvalinskim prekursorom u kovalentnoj poveznici (Slika 18.) koji je pokazao željeni afinitet je utoliko veći što je njegovo vezanje za receptor hormona rasta bilo 4 puta slabije u odnosu na prirodni inzulin. NMR strukture analoga 8 su veoma slične i homologne nativnom inzulinu sve do dijela B-lanca gdje je uvedena poveznica (B26-B29), a sam kraj B-lanca odgovara strukturi pri aktivnoj konformaciji.



**Slika 18.** NMR struktura inzulinskog analoga s triazolskom poveznicom između B16 i B29 (analog 8) pri pH 1.9. A-lanac je označen zeleno, B-lanac narančasto s norvalinom u ružičastoj. PDB ID: 2N2V

### 2.3.2. Istraživanja fizikalno-kemijskih svojstava

Smatra se da je hidrofobni efekt jedna od glavnih determinanti stabilnosti proteina (Dill, 1990). Kako bi kvantificirali doprinos hidrofobnog efekta slobodnoj energiji smatanja  $\Delta\Delta G^{\circ}_f$  Das i suradnici su odlučili provesti seriju termodinamičkih i strukturnih istraživanja na mutantima proteinskog kompleksa ribonukleaze S (RNaza S). Goveđa ribonukleaza A (RNaza A) se može subtilizinom pocijepati na dva fragmenta: S peptid i S protein (Richards & Wyckoff, 1971). Ovi fragmenti se mogu odvojiti i zatim rekonstituirati da formiraju nekovalentni S peptid::S protein kompleks, odnosno RNazu S. Phe8 i Met13 su dvije hidrofobne aminokiseline u S-peptidu koje su smještene u unutrašnjost RNaze S. Ove pozicije su bitne prilikom vezanja peptida na protein (Hearn et al., 1971) te su zamijenjene manjim, također hidrofobnim aminokiselinama. Tako su nastale mutante: 8Nle, 8Nva (Slika 19.a.), 13Nva (Slika 19.b.).



**Slika 19.** Kristalna struktura mutirane ribonukleaze S. a) mutanta 8Nva, PDB ID:1Z3M b) mutanta 13Nva, PDB ID: 1Z3P. Crveno označeno je S protein, plavo S peptid s norvalinskom zamjenom označenom sivo.

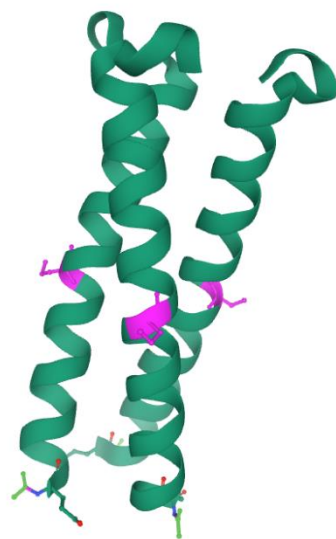
Ovakvim mutacijama dolazi do formiranja šupljina u unutrašnjosti proteina (Eriksson et al., 1992) što dovodi do gubitka van der Waalsovih interakcija. Iz kristalnih struktura određeni su volumeni šupljina oko bočnih ogranaka na pozicijama 8 i 13. U mutantu 8Nva je opažena manja šupljina u odnosu na očekivanu što je zbog pretpostavke da se bočni ogranak s pozicije 13 dijelom smjestio u tu šupljinu.

**Tablica 8.** Termodinamički parametri za interakcije S-peptidnih analoga sa S-proteinima (u odnosu na divlji tip) u funkciji koncentracije metanola na 25°C. Preuzeto iz Das et al., 2005.

Peptid	pufer	% metanola	$\Delta\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$T\Delta\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kcal/mol)
13Nva	acetatni pH 6,0	0	0,4±0,9	0,5±1,0	-0,1±0,03
		10	-0,1±0,5	-0,2±0,6	0,1±0,04
		20	4,4±1,2	4,5±1,2	-0,1±0,0
		30	6,8±0,6	6,9±0,6	0,0±0,05
8Nva	fosfatni pH 7,0	0	2,4±1,4	0,2±1,4	2,3±0,1
		10	3,1±1,8	1,0±3,4	2,1±0,1
		20	13,9±4,0	11,5±3,9	2,5±0,2

Norvalinski bočni ogranak mutante 13Nva pokazuje naizmjenične konformacije, a uočeni volumen šupljine te mutante je bio blizu očekivane vrijednosti. CD spektar mutante 13Nva je pokazao blagi porast u zavojitosti. Titracijom mutiranih peptida sa S-proteinom bez i s dodatkom različitih koncentracija metanola određeni su termodinamički parametri (Tablica 8.). Supstitucija aminokiselina na poziciji 8 i 13 manjim aminokiselinama destabilizira kompleks što pokazuju pozitivne vrijednosti  $\Delta\Delta G^\circ_f$  (Tablica 8.). Razlika u slobodnoj energiji prilikom mutacija iz veće u manju aminokiselinu prvenstveno dolazi od gubitka interakcija pakiranja (Das et al., 2005).

Superzavojnica  $\alpha$ -zavojnica (engl.  *$\alpha$ -helical coiled coil*) je česti strukturni motiv tercijarne strukture proteina (Burkhard et al., 2001). Primarna sekvenca ovakve skupine zavojnica (engl. *helix-bundle*) se sastoji od nekoliko heptamera *abcdefg* (McLachlan & Stewart, 1975). Napolarni bočni ogranci najčešće zauzimaju *a*- i *d*-pozicije i formiranje sekundarne strukture  $\alpha$ -zavojnice smješta ove bočne ogranke na istu stranu amfipatske zavojnice. Stern i suradnici su objavili rad u prvoj polovici 2020.godine koji se bavi proučavanjem stabilizirajuće interakcije trimerne superzavojnice 1CW (Ogihara et al., 2008) te je pritom korišten norvalin. Smatra se da stabilizirajuća interakcija dugog dosega (engl. *long-range*) između Glu10 (*i*-4 u odnosu na poziciju 14) i Lys18 (*i*+4) ovisi o identitetu bočnog ogranka na poziciji 14. Kako bi istražili strukturalne osnove ove sinergističke stabilizacije napravljene su varijante superzavojnice 1CW mijenjanjem četrnaeste aminokiseline. Prethodno je pokazano da varijanta Trp14 doprinosi pojačanoj interakciji Glu10-Lys18 (Smith et al., 2017) pa su uvođenjem većih, napolarnih bočnih lanaca htjeli provjeriti važnost hidrofobnosti aminokiseline na poziciji 14. Varijanta s norvalinom je smanjila stabilizaciju superzavojnice. Iz riješene kristalne strukture (Slika 20.) je određeno da RMSD vrijednost inačice s norvalinom dobro odgovara originalnoj superzavojnici 1CW i da se alifatski lanci na poziciji 14 pojavljuju u nekoliko rotamera. Zbog smanjenja stabilizirajuće interakcije u verziji superzavojnice s norvalinom primijećena je povećana slobodna energija u odnosu na Trp14 varijantu. Povećani hidrofobni karakter omogućava bočnom ogranku 14 da poboljša sinergističku stabilizaciju, no ipak je za stabilizaciju najbitnije da aminokiselina 14 bude donor vodikove veze, a kako to nije slučaj s norvalinom njegovo prisustvo u superzavojnici nepovoljno utječe na *i*/*i*+8 interakciju dugog dosega.



**Slika 20.** Kristalna struktura trimerne zavojnice 1CW s norvalinom (ljubičasto). PDB ID:6V57

### 3. Literatura

- Alvarez-Carreño, C., Becerra, A., & Lazcano, A. (2013). Norvaline and Norleucine May Have Been More Abundant Protein Components during Early Stages of Cell Evolution. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 43(4–5), 363–375. <https://doi.org/10.1007/s11084-013-9344-3>
- Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J., & Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. In *Molecular Biotechnology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 239–254). Springer. <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>
- Apostol, I., Levine, J., Lippincott, J., Leach, J., Hess, E., Glascock, C. B., Weickert, M. J., & Blackmore, R. (1997). Incorporation of norvaline at leucine positions in recombinant human hemoglobin expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28980–28988. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.28980>
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K. D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., ... Van Der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. In *Natural Product Reports* (Vol. 30, Issue 1, pp. 108–160). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c2np20085f>
- Bai, Y., Liu, S., Li, J., Lakshminarayanan, R., Sarawathi, P., Tang, C., Ho, D., Verma, C., Beuerman, R. W., & Pervushin, K. (2012). Progressive structuring of a branched antimicrobial peptide on the path to the inner membrane target. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26606–26617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363259>
- Barua, B., Lin, J. C., Williams, V. D., Kummler, P., Neidigh, J. W., & Andersen, N. H. (2008). The Trp-cage: optimizing the stability of a globular miniprotein. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, 21(3), 171. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZM082>
- Bogosian, G., Violand, B. N., Dorward-King, E. J., Workman, W. E., Jung, P. E., & Kane, J. F. (1989). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Biosynthesis and Incorporation into Protein of Norleucine by Escherichia coli\** (Vol. 264, Issue 1).
- Borissow, C. N., Graham, C. L., Syvitski, R. T., Reid, T. R., Blay, J., & Jakeman, D. L. (2007). Stereochemical integrity of oxazolone ring-containing jadomycins. *ChemBioChem*, 8(10), 1198–1203. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700204>
- Brown, J. R., & Doolittle, W. F. (1995). Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2441–2445. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2441>
- Burkhard, P., Stetefeld, J., & Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: A highly versatile protein folding motif. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 11, Issue 2, pp. 82–88). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01898-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01898-5)
- Burrows, L. L., Stark, M., Chan, C., Glukhov, E., Sinnadurai, S., & Deber, C. M. (2006). Activity of novel non-amphipathic cationic antimicrobial peptides against *Candida* species. *March*, 899–907. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl056>



- Burton, A. S., Stern, J. C., Elsila, J. E., Glavin, D. P., & Dworkin, J. P. (2012). Understanding prebiotic chemistry through the analysis of extraterrestrial amino acids and nucleobases in meteorites. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 41, Issue 16, pp. 5459–5472). <https://doi.org/10.1039/c2cs35109a>
- Coin, I., Beyermann, M., & Bienert, M. (2007). Solid-phase peptide synthesis: From standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols*, 2(12), 3247–3256. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.454>
- Cvetesic, N., Palencia, A., Halasz, I., Cusack, S., & Gruic-Sovulj, I. (2014). The physiological target for Leu RS translational quality control is norvaline. *The EMBO Journal*, 33(15), 1639–1653. <https://doi.org/10.15252/embj.201488199>
- Das, M., Rao, B. V., Ghosh, S., & Varadarajan, R. (2005). Attempts to delineate the relative contributions of changes in hydrophobicity and packing to changes in stability of ribonuclease S mutants. *Biochemistry*, 44(15), 5923–5930. <https://doi.org/10.1021/bi050001+>
- Davies, T. G., Hubbard, R. E., & Tame, J. R. H. (1999). Relating structure to thermodynamics: The crystal structures and binding affinity of eight OppA-peptide complexes. *Protein Science*, 8(7), 1432–1444. <https://doi.org/10.1110/ps.8.7.1432>
- Day, R., Paschek, D., & Garcia, A. E. (2010). Microsecond simulations of the folding/unfolding thermodynamics of the Trp-cage miniprotein. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(8), 1889–1899. <https://doi.org/10.1002/prot.22702>
- Dill, K. A. (1990). Dominant Forces in Protein Folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133–7155. <https://doi.org/10.1021/bi00483a001>
- Dupuis, S. N., Veinot, T., Monro, S. M. A., Douglas, S. E., Syvitski, R. T., Goralski, K. B., McFarland, S. A., & Jakeman, D. L. (2011). Jadomycins derived from the assimilation and incorporation of norvaline and norleucine. *Journal of Natural Products*, 74(11), 2420–2424. <https://doi.org/10.1021/np200689w>
- Engels, B., Engelhard, V. H., Sidney, J., Sette, A., Binder, D. C., Liu, R. B., Kranz, D. M., Meredith, S. C., Rowley, D. A., & Schreiber, H. (2013). Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer Cell*, 23(4), 516–526. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.018>
- Eriksson, A. E., Baase, W. A., Zhang, X. J., Heinz, D. W., Blaber, M., Baldwin, E. P., & Matthews, B. W. (1992). Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. *Science*, 255(5041), 178–183. <https://doi.org/10.1126/science.1553543>
- Fan, K., Zhang, X., Liu, H., Han, H., Luo, Y., Wang, Q., Geng, M., & Yang, K. (2012). Evaluation of the cytotoxic activity of new jadomycin derivatives reveals the potential to improve its selectivity against tumor cells. *The Journal of Antibiotics*, 65, 449–452. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.48>
- Gnanakaran, S., Nymeyer, H., Portman, J., Sanbonmatsu, K. Y., & García, A. E. (2003). Peptide folding simulations. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(2), 168–174. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00040-X)
- Graham, K. A., Byrne, A., Son, R., & Andersen, N. H. (2019). Reversing the typical pH stability profile of the Trp-cage. *Biopolymers*, 110(3), e23260.

<https://doi.org/10.1002/bip.23260>

- Guyer, C. A., Morgan, D. G., & Staros, J. V. (1986). Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding protein from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *168*(2), 775–779. <https://doi.org/10.1128/jb.168.2.775-779.1986>
- Hearn, R. P., Richards, F. M., Sturtevant, J. M., & Watt, G. D. (1971). Thermodynamics of the Binding of S-Peptide to S-Protein to Form Ribonuclease S'. *Biochemistry*, *10*(5), 806–817. <https://doi.org/10.1021/bi00781a013>
- Holliday, G. L., Mitchell, J. B. O., & Thornton, J. M. (2009). Understanding the Functional Roles of Amino Acid Residues in Enzyme Catalysis. *Journal of Molecular Biology*, *390*(3), 560–577. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.015>
- Hoppes, R., Oostvogels, R., Luimstra, J. J., Wals, K., Toebes, M., Bies, L., Ekkebus, R., Rijal, P., Celie, P. H. N., Huang, J. H., Emmelot, M. E., Spaapen, R. M., Lokhorst, H., Schumacher, T. N. M., Mutis, T., Rodenko, B., & Ovaa, H. (2014). Altered Peptide Ligands Revisited: Vaccine Design through Chemically Modified HLA-A2–Restricted T Cell Epitopes. *The Journal of Immunology*, *193*(10), 4803–4813. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400800>
- Keller, N., Palmer, J., & Bayram, O. (2017). Fungal Jewel; Secondary Metabolite. In *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-136-4>
- Kisumi, M., Sugiura, M., & Chibata, I. (1976). Biosynthesis of norvaline, norleucine, and homoisoleucine in *Serratia marcescens*. *Journal of Biochemistry*, *80*(2), 333–339. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131281>
- Lakshminarayanan, R., Tan, W. X., Aung, T. T., Goh, E. T. L., Muruganantham, N., Li, J., Chang, J. Y. T., Dikshit, N., Saraswathi, P., Lim, R. R., Kang, T. S., Balamuralidhar, V., Sukumaran, B., Verma, C. S., Sivaraman, J., Chaurasia, S. S., Liu, S., & Beuerman, R. W. (2016). Branched peptide, B2088, disrupts the supramolecular organization of lipopolysaccharides and sensitizes the gram-negative bacteria. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep25905>
- Lang, K., & Chin, J. W. (2014). Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal Labeling of Proteins. In *Chemical Reviews* (Vol. 114, Issue 9, pp. 4764–4806). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr400355w>
- Liu, C. C., & Schultz, P. G. (2010). Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annual Review of Biochemistry*, *79*(1), 413–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.105824>
- Lu, Y., & Freeland, S. J. (2008). A quantitative investigation of the chemical space surrounding amino acid alphabet formation. *Journal of Theoretical Biology*, *250*(2), 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.10.007>
- McLachlan, A. D., & Stewart, M. (1975). Tropomyosin coiled-coil interactions: Evidence for an unstaggered structure. *Journal of Molecular Biology*, *98*(2), 293–304. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80119-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80119-7)
- Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, C. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W., & Lawrence, M. C. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*, *493*(7431), 241–

245. <https://doi.org/10.1038/nature11781>
- Miller, S. L. (1953). A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, *117*(3046), 528–529. <https://doi.org/10.1126/science.117.3046.528>
- Moller, D. E., Yokota, A., Caro, J. F., & Flier, J. S. (1989). Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Molecular Endocrinology*, *3*(8), 1263–1269. <https://doi.org/10.1210/mend-3-8-1263>
- Nandi, P., & Sen, G. P. (1953). An antifungal substance from a strain of *B. subtilis* [24]. In *Nature* (Vol. 172, Issue 4384, pp. 871–872). <https://doi.org/10.1038/172871b0>
- Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., & Andersen, N. H. (2002). Designing a 20-residue protein. *Nature Structural Biology*, *9*(6), 425–430. <https://doi.org/10.1038/nsb798>
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.593-656.2003>
- Ogihara, N. L., Weiss, M. S., Eisenberg, D., & Degradó, W. F. (2008). The crystal structure of the designed trimeric coiled coil coil-VaLd: Implications for engineering crystals and supramolecular assemblies. *Protein Science*, *6*(1), 80–88. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060109>
- OSMAN, A., & Sitohy, M. (2015). *Protein Esterification: Design, Antibacterial and Safety Assessment Protein Esterification*. LAP LAMBERT Academic Publishing.
- Perona, J. J., & Hadd, A. (2012). Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA Synthetases. *Biochemistry*, *51*(44), 8705–8729. <https://doi.org/10.1021/bi301180x>
- Pittet, D., Li, N., Woolson, R. F., & Wenzel, R. P. (1997). Microbiological Factors Influencing the Outcome of Nosocomial Bloodstream Infections: A 6-Year Validated, Population-Based Model. *Clinical Infectious Diseases*, *24*(6), 1068–1078. <https://doi.org/10.1086/513640>
- Rammensee, H. G., Friede, T., & Stevanović, S. (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. In *Immunogenetics* (Vol. 41, Issue 4, pp. 178–228). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00172063>
- Ribas de Pouplana, L., & Schimmel, P. (2007). Aminoacyl-tRNA Synthetases as Clues to Establishment of the Genetic Code. In *The Genetic Code and the Origin of Life* (pp. 119–133). Springer US. [https://doi.org/10.1007/0-387-26887-1\\_8](https://doi.org/10.1007/0-387-26887-1_8)
- Richards, F. M., & Wyckoff, H. W. (1971). Bovine Pancreatic Ribonuclease. *Enzymes*, *4*(C), 647–656. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60384-4](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60384-4)
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines. In *Nature Medicine* (Vol. 10, Issue 9, pp. 909–915). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nm1100>
- Schaechter, M. (2001). *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the View From Here. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *65*(1), 119–130. <https://doi.org/10.1128/membr.65.1.119-130.2001>
- Sharp, P. M., Cowe, E., Higgins, D. G., Shields, D. C., Wolfe, K. H., & Wright, F. (1988). Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*,

- Schizosaccharomyces pombe, Drosophila melanogaster and Homo ... - PubMed - NCBI. *Nucleic Acid Research*, 16(17), 8207–8211. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3138659>
- Smith, M. S., Billings, W. M., Whitby, F. G., Miller, M. B., & Price, J. L. (2017). Enhancing a long-range salt bridge with intermediate aromatic and nonpolar amino acids. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(28), 5882–5886. <https://doi.org/10.1039/c7ob01198a>
- Snow, C. D., Zagrovic, B., & Pande, V. S. (2002). The Trp cage: Folding kinetics and unfolded state topology via molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 124(49), 14548–14549. <https://doi.org/10.1021/ja0286041>
- Soini, J., Falschlehner, C., Liedert, C., Bernhardt, J., Vuoristo, J., & Neubauer, P. (2008). Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in Escherichia coli W3110. *Microbial Cell Factories*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-30>
- Stark, M., Liu, L. P., & Deber, C. M. (2002). Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3585–3590. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3585-3590.2002>
- Stern, K. L., Smith, M. S., Billings, W. M., Loftus, T. J., Conover, B. M., Della Corte, D., & Price, J. L. (2020). Context-Dependent Stabilizing Interactions among Solvent-Exposed Residues along the Surface of a Trimeric Helix Bundle. *Biochemistry*, 14. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00045>
- Sycheva, E. V., Yampol'skaya, T. A., Preobrajenskaya, E. S., Novikova, A. E., Matrosov, N. G., & Stoyanova, N. V. (2007). Overproduction of noncanonical amino acids by Escherichia coli cells. *Microbiology*, 76(6), 712–718. <https://doi.org/10.1134/S0026261707060094>
- Tame, J. R. H., Murshudov, G. N., Dodson, E. J., Neil, T. K., Dodson, G. G., Higgins, C. F., & Wilkinson, A. J. (1994). The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science*, 264(5165), 1578–1581. <https://doi.org/10.1126/science.8202710>
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 85–96). <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- Uchtenhagen, H., Abualrous, E. T., Stahl, E., Allerbring, E. B., Sluijter, M., Zacharias, M., Sandalova, T., van Hall, T., Springer, S., Nygren, P. Å., & Achour, A. (2013). Proline substitution independently enhances H-2Db complex stabilization and TCR recognition of melanoma-associated peptides. *European Journal of Immunology*, 43(11), 3051–3060. <https://doi.org/10.1002/eji.201343456>
- van der Burg, S. H., Visseren, M. J., Brandt, R. M., Kast, W. M., & Melief, C. J. (1996). Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(9), 3308–3314. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617954>
- Viková, J., Collinsová, M., Kletvíková, E., Budšínský, M., Kaplan, V., Záková, L., Veverka, V., Hexnerová, R., Aviñó, R. J. T., Straková, J., Selicharová, I., Vank, V., Wright, D. W., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Brzozowski, A. M., & Jiráek, J. (2016). Rational steering of insulin binding specificity by intra-chain chemical crosslinking. *Scientific Reports*, 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep19431>

- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. In *Microbiological Reviews* (Vol. 51, Issue 2, pp. 221–271). American Society for Microbiology (ASM).  
<https://doi.org/10.1128/membr.51.2.221-271.1987>
- Yadavalli, S. S., & Ibba, M. (2012). Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis: Its role in translational fidelity. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 86, pp. 1–43). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386497-0.00001-3>
- Young, D. D., Young, T. S., Jahnz, M., Ahmad, I., Spraggon, G., & Schultz, P. G. (2011). An evolved aminoacyl-tRNA synthetase with atypical polysubstrate specificity. *Biochemistry*, 50(11), 1894–1900. <https://doi.org/10.1021/bi101929e>
- Yu, Z., Theoret, M. R., Touloukian, C. E., Surman, D. R., Garman, S. C., Feigenbaum, L., Baxter, T. K., Baker, B. M., & Restifo, N. P. (2004). Poor immunogenicity of a self/tumor antigen derives from peptide–MHC-I instability and is independent of tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 551–559.  
<https://doi.org/10.1172/jci21695>
- Zhu, B., Zhao, M. W., Eriani, G., & Wang, E. D. (2007). A present-day aminoacyl-tRNA synthetase with ancestral editing properties. *RNA*, 13(1), 15–21.  
<https://doi.org/10.1261/rna.228707>
- <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/lcitrulline1751937275811?lang=en&region=HR>

#### 4. Sažetak

Neobične (ili rijetko korištene) aminokiseline su prisutne u nekolicini staničnih peptida. Često su uključene u peptidne antibiotike proizvedene ne-ribosomalnom sintezom, a u drugim slučajevima do njihove ribosomalne ugradnje dolazi prilikom ekspresije heterolognih proteina u bakterijskim stanicama. Norvalin je jedna od takvih, nekanonskih aminokiselina koji može biti ugrađen u proteine na leucinske pozicije. Razvijene su i metode koje omogućuju ciljanu ugradnju nekanonskih aminokiselina u proteine te tako povećavaju strukturalnu različitost proteinskih bočnih ogranaka. Proširivanjem seta od 20 aminokiselina uporabom nekanonskih analoga, omogućeno je sustavnije istraživanje različitih fizikalno-kemijskih fenomena. Osim korištenja u fundamentalnim istraživanjima, veliki je interes i za ugradnju neproteinogenih aminokiselina u prirodne spojeve i peptide za terapijsku uporabu kako bi se poboljšala njihova svojstva i učinkovitost. Korištenjem ovakvog proširenog genetičkog koda pružaju se mogućnosti za stvaranje modelnih proteina te proteina s poboljšanim ili potpuno novim svojstvima.

#### 5. Summary

Unusual (or infrequently occurring) amino acids are present in a number of cellular peptides. They are often included in peptide antibiotics produced by nonribosomal synthesis, in other cases, misincorporation of these amino acids into proteins by the ribosomes occurs when heterologous proteins are expressed in bacterial cells. Norvaline is one of those noncanonical amino acids that can be incorporated in proteins on leucine positions. Methods that allow site-specific incorporation of noncanonical amino acids were developed; thereby increasing the structural diversity of amino acid residues used in proteins. By expanding the natural occurring set of 20 proteinogenic amino acids, more systematic research of different physicochemical phenomena is enabled. Except for its use in fundamental research, there is a great interest in incorporation of nonproteinogenic amino acids in natural products and peptides for therapeutic use. Usage of this expanded genetic code offers possibilities for designing model peptides and proteins with enhanced or novel properties.