

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički fakultet, Biološki odsjek

Računalno ispitivanje svojstava neproteinogene aminokiseline norvalina u sklopu elemenata
sekundarnih struktura proteina

Zara Škibola

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Aleksandre Maršavelski i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Otkriće sekundarnih struktura: α -zavojnica i β -ploča	1
1.2. Građa α -zavojnice	3
1.3. Građa β -ploče	6
1.5. MD simulacije smatanja proteina.....	9
1.6. Biosinteza norvalina	11
1.7. Norvalin- rana evolucijska aminokiselina.....	13
1.8. Načini ugradnje norvalina u proteine	14
2. PREGLED LITERATURE	18
2.1. Norvalin u prirodnim spojevima	18
2.2. Norvalin u peptidima.....	20
2.3. Norvalin u proteinima	25
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	29
4. MATERIJALI I METODE	31
4.1. Izgradnja homopolipeptida za simulacije.....	31
4.2. Provođenje molekulske dinamičke simulacije	32
4.3. Analiza dobivenih trajektorija.....	34
4.4. Druga faza istraživanja- evaluacija/provjera MD simulacije homopolipeptida.....	35
5. REZULTATI I DISKUSIJA	38
6. ZAKLJUČAK	51
7. POPIS LITERATURE	52
8. SAŽETAK.....	59
9. SUMMARY	60

1. UVOD

1.1. Otkriće sekundarnih struktura: α -zavojnica i β -ploča

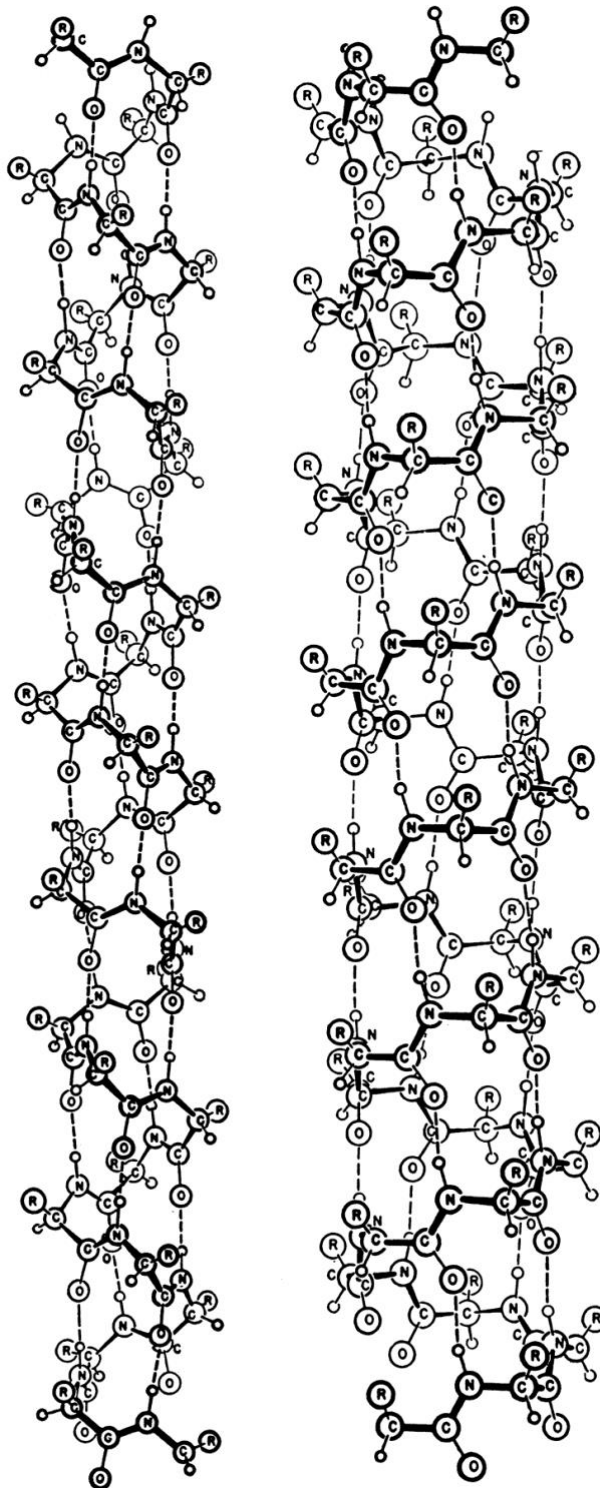
Pedesetih godina prošlog stoljeća, prije nego što su proteinske strukture bile otkrivene pomoću rendgenske kristalografije, Linus Pauling i Robert Corey su otkrili dva glavna strukturalna elementa proteina: α -zavojnica i β -ploču za koje se sada zna da čine glavne elemente sekundarne strukture proteina. Svoj pristup, koji je rezultirao ovim otkrićem, su temeljili na izgradnji modela većih molekula na osnovu karakteristika malih molekula. Svoja saznanja su objavili kao seriju od osam znanstvenih članaka u veljači i ožujku 1951. godine. U prvom od tih članaka (Pauling et al., 1951) objašnjavaju kako su za glavni cilj postavili detaljnu determinaciju kristalnih struktura aminokiselina, peptida i ostalih jednostavnih spojeva povezanih s proteinima, u svrhu dobivanja informacija o udaljenosti između atoma, kutova između veza i ostalih konfiguracijskih parametara koje će inkorporirati u aspekt čitavog proteina i na temelju kojih će izgraditi sveukupnu arhitekturu proteina.



Slika 1. Rezonantne strukture peptidne veze zbog delokalizacije slobodnog elektronskog para s atoma dušika . Preuzeto iz Eisenberg, 2003.

Pomoću tih istraživanja su opazili određena strukturalna ograničenja, a jedno od ključnih je bilo da svih šest atoma peptidne veze koja povezuje susjedne aminokiseline u proteinskom lancu moraju ležati u istoj ravnini. Pauling je predložio planarnu peptidnu vezu zbog rezonancije slobodnog elektronskog para između dvostruke veze karbonila i amidne C—N veze (Slika 1.). Nakon što su konstruirali zavojnice s planarnim amidnim vezama, s preciznim dimenzijama veza, koje su opazili prilikom promatranja kristalnih struktura, otkrili su da su moguće samo dvije opcije. Jednu od tih su nazvali zavojnica s 3,6 aminokiselinskih ostataka po okretu, a druga je bila zavojnica s 5,1 aminokiselinskim ostatkom po okretu. Nedugo nakon toga te zavojnice su prozване α i γ (Slika 2.). Kako sami autori ovog revolucionarnog rada ističu, njihova prednost nad ostalim istraživačima je bila ta što su jedino oni uzeli u obzir zavojnice

koje nemaju cijeli broj aminokiselina po okretu te su se dosljedno držali dobivenih kristalografskih parametara manjih struktura prilikom izgradnje proteinske zavojnice.

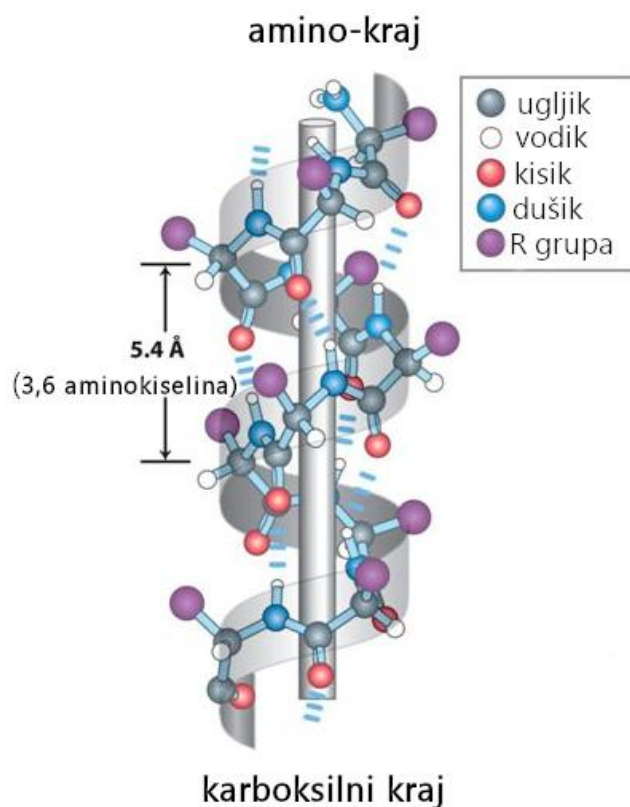


Slika 2. α -zavojnica (lijevo) i γ -zavojnica (desno) kako su prikazane u radu Paulinga, Correya i Bransona iz 1951. Može se primijetiti da je C=O grupe α -zavojnice pokazuju u smjeru C-kraja, a one γ -zavojnice prema N-kraju te također da je prikazana α -zavojnica lijeve orijentacije, izgrađena od D-aminokiselina. Preuzeto iz Eisenberg, 2003.

Drugi rad iz ove serije (Pauling & Corey, 1951) izvještava o pronalasku pločaste strukture polipeptidnih lanaca povezane vodikovim vezama. U takvoj konfiguraciji planarne peptidne veze leže u ravnini te ploče, a sukcesivni proteinski lanci mogu ići u suprotnom smjeru, dajući tako antiparalelnu β -nabranu strukturu ili u istom smjeru što rezultira paralelnom β -pločom. Obje vrste su stabilizirane vodikovim vezama, samo što su za razliku od zavojnica, one između susjednih proteinskih lanaca, a ne u istom lancu. Ipak, u tim radovima iz 1951. postoje i određeni propusti koji se mogu primijetiti pažljivim promatranjem Slike 2. Dva svojstva su posebno iznenađujuća: (i) znanstvenici su predvidjeli lijevu zavojnicu, a danas je dobro poznato da su biološki proteini desne orijentacije i (ii) kemijske skupine oko α -ugljikovih atoma se nalaze u D-konfiguraciji, za razliku od prirodno-pojavljajućih L-enantiomera aminokiselina u proteinima. Stoga je model Paulinga i suradnika zapravo zrcalna slika α -zavojnice u prirodnom proteinu. Zanimljivo je i samo kratko spominjanje 3_{10} -zavojnice, komponente globularnih proteina koja se rijetko pronalazi u kratkim segmentima, ali je ipak puno češća od γ -zavojnice opisane u radu. Vodikove veze 3_{10} -zavojnice su poprilično duge i pod kutom tako da se nisu mogle uklopiti u stroge okvire koje su postavili Pauling i Corey.

1.2. Građa α -zavojnice

Na Slici 3. je prikazana građa α -zavojnice s naglaskom na atome proteinske okosnice. U ovoj strukturi polipeptidna okosnica je čvrsto omotana oko zamišljene osi koja se proteže longitudinalno kroz sredinu zavojnice, a bočni ogranci aminokiselina se pružaju izvan okosnice. Po jednom zavoju zavojnice postoji 3,6 aminokiselinskih ostataka, odnosno za svakih 100 stupnjeva rotacije se pojavljuje jedna aminokiselina ($360/3,6$). Svaki aminokiselinski ostatak ima visinu 1,5 Å duž osi zavojnice što daje udaljenost od 5,4 Å između pojedinačnih zavoja koji čine ponavljajuću jedinicu α -zavojnice. Ponavljajući strukturni uzorak u zavojnici je rezultat karakterističnih ϕ i ψ vrijednosti torzijskih kutova koji se mogu pronaći u naznačenom dijelu Ramachandranovog grafa na Slici 4. Općenito gledano, otprilike četvrtina svih aminokiselinskih ostataka u proteinima se nalazi u α -zavojnicama. Jedan od odgovora zašto se ova struktura pronalazi češće od ostalih mogućih konformacija leži u optimalnoj uporabi unutrašnjih vodikovih veza. Pravilno raspoređene vodikove veze između vodikovog atoma koji je povezan s elektronegativnim dušikom peptidne veze i elektronegativnim kisikom karbonilne skupine koja je udaljena četiri aminokiseline ($i+4$) su jedan od glavnih čimbenika stabilizacije ove strukture.



Slika 3. Struktura α -zavojnice. Preuzeto i prilagođeno iz D. L. Nelson & Cox, 2017.

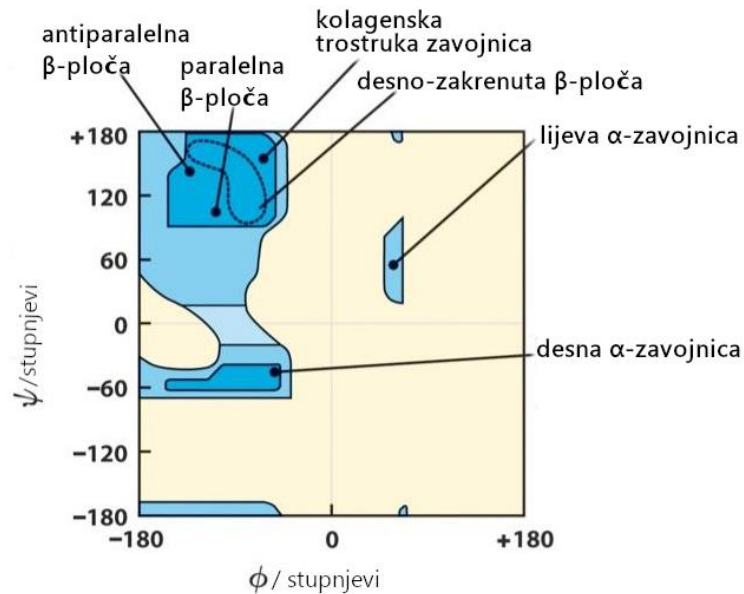
Unutar α -zavojnice svaka peptidna veza, osim onih blizu krajeva zavojnice, sudjeluje u takvom povezivanju. Na krajevima zavojnice se najčešće nalaze tri ili četiri karbonilne i amino skupine koje ne mogu sudjelovati u ovakvom povezivanju. One mogu biti okružene otapalom te stvarati vodikove veze s vodom. Ne mogu svi polipeptidi stvarati stabilne α -zavojnice. Svaka aminokiselina ima intrinzičnu sklonost stvaranju α -zavojnice (Tablica 1.) koja odražava svojstva bočnog lanca te kako ona utječu na mogućnost susjednih atoma okosnice da zauzmu karakteristične ϕ i ψ torzijske kutove.

Tablica 1. Sklonost aminokiselina da grade α -zavojnici. $\Delta\Delta G^\circ$ je promjena slobodne energije u odnosu na onu od alanina, koja je potrebna da aminokiselina zauzme konformaciju potrebnu za formiranje α -zavojnice. Veći brojevi odražavaju manju sklonost izgradnji α -zavojnice. Preuzeto iz D. L. Nelson & Cox, 2017.

aminokiselina	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	aminokiselina	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)
Ala	0	Leu	0,79
Arg	0,3	Lys	0,63
Asn	3	Met	0,88
Asp	2,5	Phe	2,0
Cys	3	Pro	>4
Gln	1,3	Ser	2,2
Glu	1,4	Thr	2,4
Gly	1,6	Tyr	2,0
His	2,6	Trp	2,0
Ile	1,4	Val	2,1

Od proteinogenih aminokiselina, alanin pokazuje najveću sklonost izgradnji α -zavojnice. Pozicija aminokiseline u odnosu na susjede je također bitna. Interakcije između bočnih ogranaka mogu stabilizirati ili destabilizirati α -zavojnici. Primjerice, ako polipeptid ima niz od nekoliko uzastopno ponovljenih Glu, taj segment pri pH 7 neće formirati α -zavojnici jer se negativno nabijene karboksilne grupe susjednih Glu odbijaju. Zbog istog razloga, niz od nekoliko pozitivno nabijenih Lys ili Arg će također spriječiti nastanak α -zavojnice. Okret α -zavojnice omogućava interakcije između bočnih ogranaka koji su udaljeni tri (ponekad četiri) aminokiseline. Pozitivno nabijene aminokiseline se često nalaze za tri mjesta udaljene od negativno nabijenih što omogućuje nastanak ionskog para. Dvije aromatske aminokiseline su također razmaknute na sličan način tako da njihovo pozicioniranje doprinosi stabilizaciji putem hidrofobnog efekta. Najmanju sklonost stvaranju α -zavojnice imaju Pro i Gly. U prolinu je dušikov atom dio rigidnog prstena i rotacija oko N—C $_{\alpha}$ veze nije moguća. Prolin u zavojnici uvodi destabilizirajući okret, stoga se ne nalazi često u njezinoj strukturi. Glicin se također rijetko pojavljuje u α -zavojnici, ali zbog drugačijeg razloga: on posjeduje veću konformacijsku fleksibilnost nego ostale aminokiseline. Posljednji čimbenik stabilnosti α -zavojnice je identitet aminokiselina koje se nalaze blizu krajeva zavojnice. Mali električni dipol postoji u svakoj peptidnoj vezi i njihov zbroj rezultira ukupnim dipolom duž osi zavojnice koji se povećava s njezinom duljinom. Zbog toga se negativno nabijene aminokiseline često nalaze blizu amino-kraja zavojnice gdje ostvaruju stabilizirajuću interakciju s pozitivnim nabojem dipola zavojnice; pozitivno nabijene aminokiseline blizu amino-kraja su destabilizirajuće. Suprotno

vrijedi za karboksi-kraj zavojnice. Sumarno, pet tipova kriterija utječe na stabilnost α zavojnice: (i) intrinzična sklonost aminokiseline za formiranje α zavojnice, (ii) interakcije bočnih lanaca, posebice onih udaljenih za tri mjesta, (iii) veličina susjednih bočnih lanaca, (iv) pojavljivanje Pro ili Gly i (v) interakcije aminokiselina na krajevima zavojnice i električnog dipola zavojnice. Sklonost određenog dijela polipeptida da formira α -zavojnicu ovisi o identitetu aminokiselinske sekvence koja čini taj segment (Nelson & Cox, 2017).



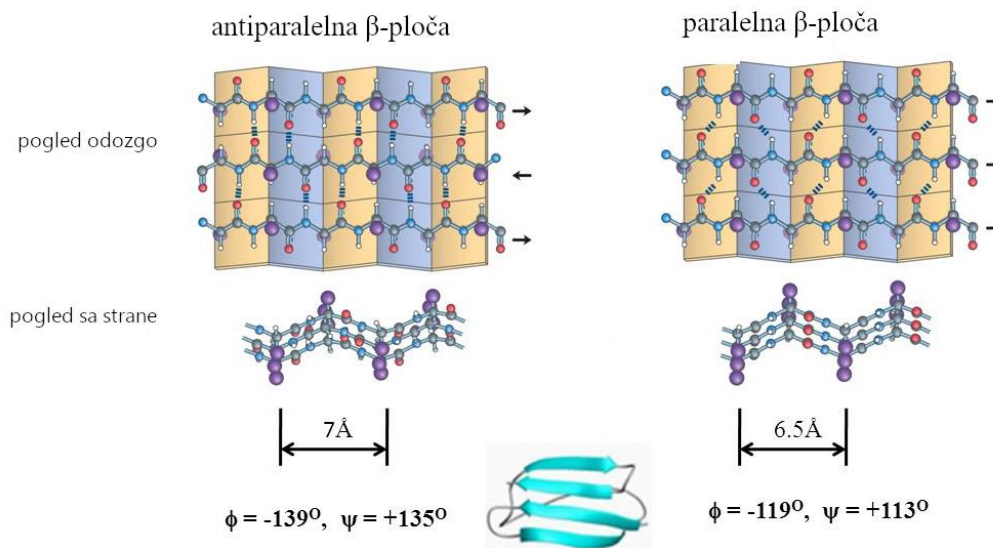
Slika 4. Ramachandranov dijagram. Dozvoljeni kutovi za određene sekundarne strukture.

Preuzeto iz D. L. Nelson & Cox, 2017.

1.3. Građa β -ploče

Drugi važan element sekundarne strukture je β -nabrana struktura koja je također definirana atomima okosnice koji prate pravila slaganja definirana dopuštenim torzijskim kutovima (Slika 4.). U β -konformaciji je okosnica polipeptida ispružena u zig-zag strukturu (Slika 5.). Vodikove veze nastaju između pojedinačnih segmenata polipeptidnog lanca unutar β -ploče. Pojedinačni segmenti koji čine β -ploču su često blizu u polipeptidnoj sekvenci, ali mogu biti i prilično udaljeni jedni od drugih u primarnoj sekvenci proteina. Bočni ogranci aminokiselina se pružaju iznad i ispod ravnine ploče. Ovisno o orijentaciji polipeptidnih lanaca koji čine β -ploču one mogu biti paralelne (kad im se poklapaju N- i C-terminusi) ili antiparalelne (kad je N-terminus jednog lanca pozicioniran pored C-terminusa drugog) te se izgled

vodikovih veza se razlikuje za ove dvije strukture (Slika 5.). Struktura koja se sastoji od samo dva anti-paralelna β -lanca se zove β -ukosnica. Omča između dva lanca se naziva β -okret. Kratki okreti i duže omče imaju također važnu ulogu u 3D strukturi proteina, povezujući međusobno β -lance, β -lanac s α -zavojnicom ili zavojnice međusobno (Nelson & Cox, 2017).



Slika 5. Prikaz strukture antiparalelne i paralelne β -ploče. Vidi se kako se bočni ogranci aminokiselina (ljubičasto) pružaju ispod i iznad ravnine β -ploče i može se primijetiti nabrani izgled cijele strukture. Vodikove veze u antiparalelnoj β -ploči su na pravcu, dok su one u paralelnoj β -ploči pod kutom. Ponavljajuća jedinica antiparalelne strukture je svakih 7 Å, a paralelne 6,5 Å. Crne strelice označavaju orijentaciju lanaca od amino kraja prema karboksi kraju. Preuzeto i prilagođeno D. L. Nelson & Cox, 2017.

1.4. MD simulacije

Proučavanje makromolekularnih struktura je ključno u razumijevanju biologije. Biološka funkcija je bazirana na molekularnim interakcijama u okviru makromolekularnih struktura. Od prvih strukturnih istraživanja u 50.-im godinama prošlog stoljeća, kontinuirano se povećava znanje o građi proteina i nukleinskih kiselina. Zahvaljujući novim saznanjima o strukturi i pravilima molekularnog prepoznavanja šire se i znanja o ključnim biološkim fenomenima kao što su mehanizmi enzimski kataliziranih reakcija kao i njihova regulacija, transport preko membrane, sastavljanje većih struktura poput ribosoma ili virusnih kapsida te ekspresija gena i kako je ona kontrolirana. Jedna od ključnih praktičnih primjena proučavanja

protein-protein interakcija je dizajn lijekova. Analizama trodimenzionalnih (3D) struktura proteina ili nukleinskih kiselina su postignuta brojna značajna otkrića u biokemiji. Iako se baze podataka svakim danom dopunjuju novim unosima (strukture proteina, nukleinskih kiselina i njihovih kompleksa), one ipak pružaju samo djelomični uvid u 3D strukturu (Hospital et al., 2015). I proteini i nukleinske kiseline su fleksibilne molekule čija dinamika može imati ključnu ulogu u njihovoj funkcionalnosti. Proteini prolaze značajne konformacijske promjene prilikom izvršavanja svoje funkcije, u pravilu, svaki kompleks koji sadržava proteine mora proći određenu strukturalnu promjenu i razmještaj. Konformacijske promjene su zajedničke svim enzimima prilikom prolaska kroz katalitički ciklus, primjerice zatvaranje petlje ili domene doprinosi odvajanju aktivnog mjesta od otapala pri čemu se mijenja okoliš koji okružuje supstrat (Kokkinidis et al., 2012). Još jedan primjer koji pokazuje važnost konformacijskih promjena je alosterička regulacija enzimske aktivnosti. Takav način regulacije se temelji na mogućnosti proteina da postoji u različitim konformacijama usporedivih stabilnosti, ali različitim aktivnosti (Ahalawat & Murarka, 2015). U slučaju nukleinskih kiselina konformacijske promjene su još kompleksnije. Standardna B-DNA ima relativno jednostavnu strukturu u usporedbi s proteinima ili složenim RNA, ali zbog svoje plastičnosti DNA drastično mijenja svoju strukturu kako bi se prilagodila molekulama s kojima stupa u interakciju. Vežanje transkripcijskih faktora nije samo ovisno o sekvenci DNA nego je i direktna posljedica sposobnosti DNA molekule da se prilagodi površini proteina (Bouvier et al., 2011). Tradicionalni pristup razumijevanju konformacijskog utjecaja na makromolekularnu funkciju je pokrivanje konformacijskog prostora sakupljanjem različitih eksperimentalnih struktura. Korištenjem eksperimentalnih struktura moguće je dobiti djelomičan uvid u makromolekulsku fleksibilnost, stoga se teoretskim pristupom nastoji dobiti potpuna slika makromolekularnih dinamičkih svojstava. Napretkom svojstava simulacijskih algoritama popularizirao se koncept ansambla konformacija (engl. *conformation ensemble*) kao alternativa analizama pojedinačnih struktura iz baza podataka. Ansambli se mogu analizirati za dobivanje termodinamičkih svojstava sustava ili za rekonstrukciju kompleksnih konformacijskih prijelaza i smatanja. Simulacije molekulske dinamike (MD simulacije) pomoću kojih se mogu generirati ansambli konformacija su razvijene prvi puta u kasnim 70.-ima (McCammon et al., 1977; Warshel & Levitt, 1976) te su znatno napredovale od simuliranja nekoliko stotina atoma do simuliranja biološki relevantnih sustava kao što su proteini u otopini s eksplicitnim prikazom molekula otapala, integralni membranski proteini ili veliki makromolekularni kompleksi poput ribosoma. Simulacije sustava s otprilike 100 000 atoma sada su postale rutinske, a simulacije približno 500 000 atoma su također omogućene s primjerenom računalnom opremom. Ovakav značajni

napredak je omogućen korištenjem engl. *high performance computing* (HPC) i MD algoritama. Za inicijalni model sustava se koriste eksperimentalne strukture ili podaci dobiveni komparativnim homolognim modeliranjem. Prikaz otapala je ključan faktor pri definiranju sustava. Nekoliko pristupa je izrađeno, ali najjednostavniji je ujedno i najučinkovitiji, pri čemu se danas rutinski koristi eksplicitni prikaz molekula otapala. Iako se takav prikaz pokazao najefikasnijim, on ide na štetu povećavanja veličine simuliranog sustava. Eksplicitno otapalo dobro oponaša efekte pravog otapala uključujući i one entropijskog podrijetla kao što je hidrofobni efekt. Nakon izgradnje sustava, sile koje djeluju na svaki atom se dobivaju pomoću derivacije jednadžbi, polja sila, gdje se potencijalna energija određuje iz molekularne strukture (Hermans et al., 1984). Polja sila su kompleksne jednadžbe, ali se temelje na jednostavnim prikazima zakonima klasične mehanike: korištenje Hookeovog zakona za opis istezanja kemijske veze, periodičke funkcije za rotacije oko veza i Lennard-Jones potencijala za opis Van der Waalsovih interakcija te Coulombov zakon za elektrostatske interakcije. Jednostavni prikazi molekulskih svojstava omogućuju vrlo brze izračune energija i sila čak i za velike sustave. Polja sila koja se trenutno koriste u atomističkim molekularnim simulacijama se razlikuju po načinu parametrizacije, no simulacije koje se izvode s modernim poljima sila su ekvivalentne (Rueda et al., 2007). Jednom kad se dobiju sile koje djeluju na pojedinačne atome, klasičan Newtonov zakon se koristi za izračun akceleracija. Pošto se integracija kretanja radi numerički, kako bi se izbjegle nestabilnosti, koriste se vremenski koraci kraći od najbržih vibracija u molekuli. Tako se najčešće koriste vremenski periodi između 1 i 2 fs za atomističke simulacije. Sadašnja generacija računala se koristi prednostima paralelizma; paralelnog računanja i grafičkog akceleratora kako bi ubrzali proces simuliranja. Najpopularniji simulacijski paketi programa (AMBER, CHARMM, GROMACS ili NAMD) su kompatibilni s engl. *messageing passing interface* (MPI). Kad se nekoliko računalnih procesora koristi simultano, MPI znatno smanjuje vrijeme simulacije. Napredci u algoritmima i uporaba grafičkih procesivnih jedinica (engl. *graphical processing units*, GPUs) su uvelike poboljšali performanse MD simulacija.

1.5. MD simulacije smatanja proteina

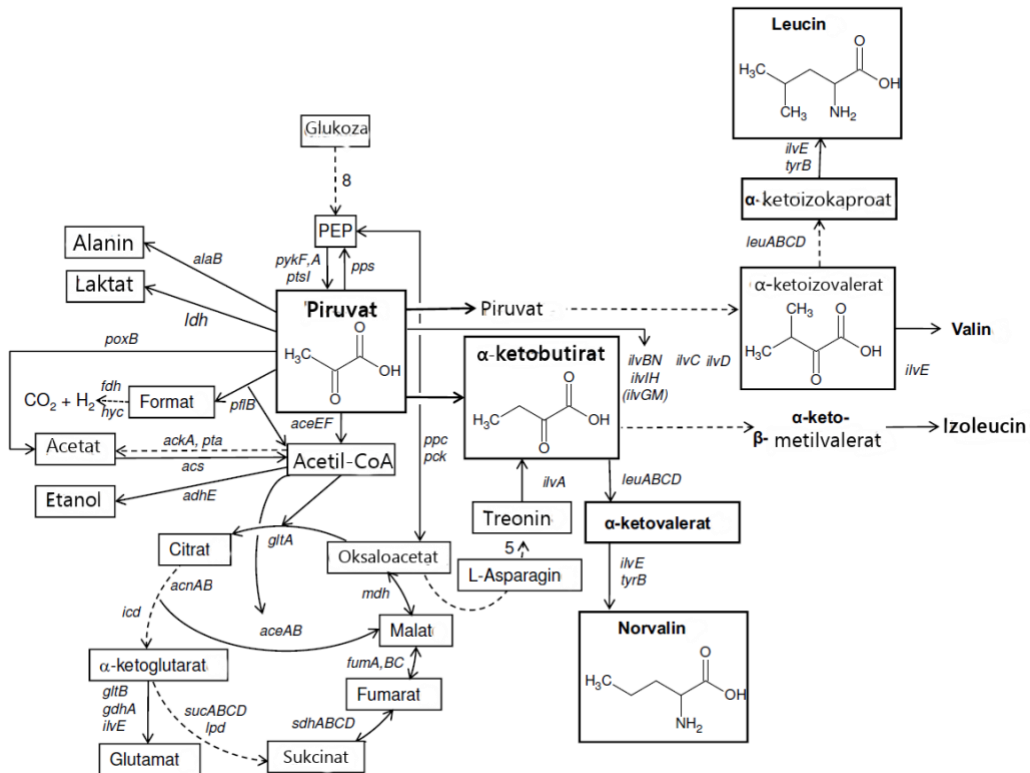
Unatoč desetljećima aktivnog istraživanja, smatanje proteina je i dalje jedan od najvažnijih neriješenih fenomena u molekularnoj biologiji i biokemiji te predstavlja kariku koja nedostaje za potpuno povezivanje i korištenje informacija dobivenih sekvenciranjem gena. Metode predikcije strukture se oslanjaju na informacije koje pružaju nativni, dobro strukturirani proteini, ali kako je pokazano to nije dovoljno za vjerodostojnu predikciju trodimenzionalnih

struktura iz primarnog slijeda proteina koje bi bile visoke točnosti (Tramontano, 2003). Karakterizacija procesa razmatanja je jednako bitna jer razumijevanje ova dva procesa pridonose i potpunom shvaćanju nekih bioloških fenomena kao što su degradacija proteina, starenje i bolesti. Istraživanje smatanja proteina je uvelike uznapredovalo posljednjih 15 godina, velikim dijelom zahvaljujući tehnološkim otkrićima (uporaba NMR za karakterizaciju dijelom smotanih ili denaturiranih stanja proteina, brze spektroskopske metode i poboljšanja u MD simulacijama). Sinergističkim djelovanjem teorijskih i eksperimentalnih saznanja te integracijom rezultata ovih dvaju disciplina dobiva se sve detaljniji i opsežniji prikaz procesa smatanja proteina. Karakterizacija procesa smatanja/razmatanja proteina podrazumijeva opisivanje svih konformacija na tom putu: nativna i prijelazna stanja, intermedijeri i denaturirana stanja proteina. Tako nešto je poprilično teško postići eksperimentalnim metodama zbog dinamičnosti i kratkotrajnosti postojanja takvih stanja. Zbog ograničenosti eksperimentalnog pristupa ovom fenomenu, teorijska istraživanja mogu uvelike doprinijeti samom eksperimentu. MD simulacije proučavaju događaje smatanja i razmatanja proteina na razini atoma, omogućuju detaljno praćenje interakcija između proteina i otapala te također mogu pomoći u razjašnjavanju kinetičkih putova samog procesa. MD simulacije često koriste visoke temperature kako bi ubrzali proces smatanja/razmatanja tako da se prijelazi konformacija mogu promatrati na nanosekundnoj vremenskoj skali. Najranije MD simulacije su koristile temperature od 423 K i 498 K te su primijećena slična ponašanja na obje temperature i uvidjelo se da podizanje temperature samo ubrzava proces smatanja bez da utječe na sam put smatanja (Daggett & Levitt, 1992). Pošto je pokazano dobro slaganje eksperimenata na niskoj temperaturi i simulacija na visokoj, smatra se da visoka temperatura na kojoj se izvode simulacije ne mijenja energetska pozadinu koja je relevantna za eksperimentalna istraživanja. Jedna od najčešćih kritika na račun MD simulacija je da mali broj simulacija koje se rutinski izvode ne može dostojno reproducirati prosječno ponašanje 10^{15} - 10^{18} molekula koje se nalaze u eksperimentalnom uzorku iako se MD simulacije temelje na ergodskoj hipotezi, prema kojoj nastali ansambl konformacija dobiven praćenjem jedne molekule tijekom adekvatnog vremenskog intervala odgovara raspodjeli konformacija u sustavu s velikim brojem istovrsnih molekula. S druge strane, nedostatak eksperimenata koji proučavaju smatanje je da oni daju saznanja isključivo o prosječnom ponašanju grupe molekula te da ne daju informacije za individualne članove te grupe. MD simulacije predstavljaju klasične engl. *single-molecule* eksperimente koji pružaju strukturalne i dinamičke informacije na razini atoma, no ipak kritike takvog eksperimenta se odnose na način uzorkovanja i pitanja u svezi s ponašanjem većeg broja molekula. S razvojem računalnih mogućnosti, ovom problemu se doskočilo u pomoć tako što

se sada izvodi po nekoliko dugih simulacija istog sustava koje se onda kasnije međusobno uspoređuju kako bi se pokrio konformacijski prostor. Jedna studija je opisala 100 neovisnih MD simulacija proteina CI2 na 498 K od kojih je svaka trajala 20 ns (Day & Daggett, 2005). Individualne trajektorije su uzorkovale konformacije poprilično udaljene od prosječnog puta, no ipak sve su pratile prosječni put tako da je mali broj simulacija (5-10) dovoljan kako bi obuhvatio sva prosječna svojstva puta smatanja. U puno slučajeva strukture iz individualne simulacije ne moraju biti primijećene u niti jednoj od ostalih simulacija, ali prosječna svojstva individualnih simulacija će biti slična. Zbog toga iako pojedinačne simulacije uzorkuju različite konformacijske prostore, njihov prosjek daje zajednički skup svojstava. Ovim istraživanjem je tako pokazano da je mali broj pojedinačnih simulacija, najčešće 5-10, primjeren za opisivanje konformacijskih stanja proteina.

1.6. Biosinteza norvalina

Norvalin (Nva) spada u neproteinogene aminokiseline koje se mogu sintetizirati u stanici u određenim uvjetima (Soini et al., 2008; Sycheva et al., 2007). Norvalin nastaje kao nusprodukt reakcija koje su katalizirane enzimima za sintezu razgranatih aminokiselina (Kisumi et al., 1976). Sinteza norvalina (Slika 6.) započinje od α -ketobutirata i odvija se zahvaljujući slaboj specifičnosti enzima za sintezu razgranatih aminokiselina (produkti gena *ilv* i *leu*) za α -keto kiseline (Soini et al., 2008). Postoje dva puta za nastanak α -ketobutirata: jedan ide preko L-aspartata, homoserina, treonina i oksaloacetata, a drugi, kraći put je direktno produživanje ugljikovodičnog lanca od piruvata pomoću enzima kodiranih *leu* operonom.



Slika 6. 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, pri čemu se brojevi odnose na broj enzimskih reakcija. Enzimi su naznačeni genima koji ih kodiraju. Preuzeto i prilagođeno iz Soini et al., 2008.

Istraživanje biosintetskog puta norvalina, rađeno na regulacijskim mutantama biosinteze leucina u bakteriji *Serratia marcescens* (Kisumi et al., 1976) je otkrilo da je enzim α -izopropilmalat sintaza (IPMS) odgovorna za kondenzaciju acetil koenzima A (acetil CoA) s neprikladnim α -keto kiselinama pa tako i α -ketobutiratom. Taj enzim je prvi na biosintetskom putu razgranatih aminokiselina i katalizira kondenzaciju acetil CoA s α -ketoizovaleratom što u konačnici dovodi do leucina koji negativnom povratnom spregom inhibira aktivnost enzima. Ispitivanjem kinetike α -izopropilmalat sintaze za različite α -keto kiseline (Tablica 2.) je ustanovljeno da je afinitet za α -ketobutirat manji nego za primarni supstrat α -ketoizovalerat te je za odvijanje reakcije, koja će započeti biosintezu norvalina, nužno nagomilavanje α -ketobutirata u stanici.

Tablica 2. Kinetički parametri za različite α -keto kiseline u reakciji koju katalizira α -izopropilmalat sintaza u soju Ar 130-1 *Serratia marcescens*. Preuzeto i prilagođeno iz Kisumi et al., 1976.

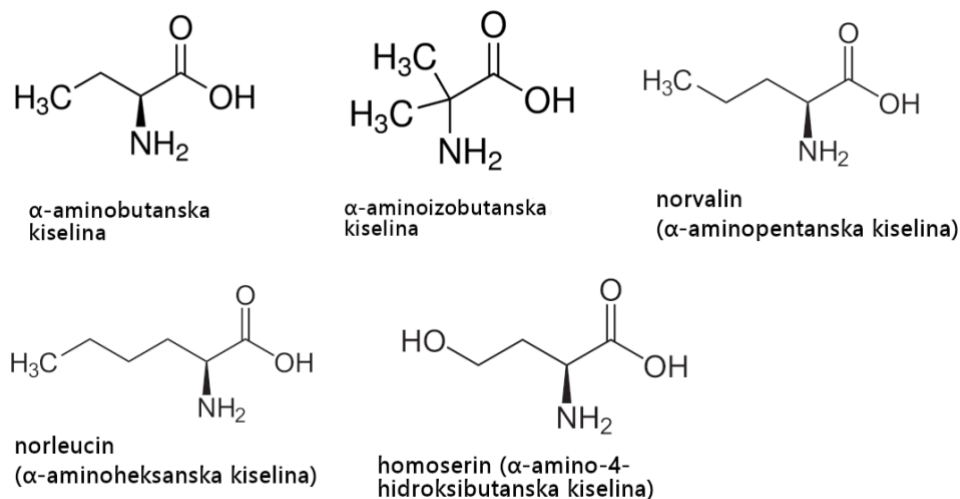
α -keto kiselina	K_M (mol dm ⁻³)	V_{max} (nmol CoA/min/mg proteina)
α -ketoizovalerat	$7,7 \cdot 10^{-4}$	49
piruvat	$3,4 \cdot 10^{-3}$	33
α -ketobutirat	$4,7 \cdot 10^{-3}$	64
α -ketovalerat	$9,0 \cdot 10^{-3}$	16
α -keto- β -metilvalerat	-	1

Osim rasvjetljavanja biosintetskog puta u mutantama *Serratia marcescens* (Kisumi et al., 1976), on je istražen i u nerekombinantnom soju *Escherichia coli* K-12 W3130 u uvjetima smanjene koncentracije kisika (Soini et al., 2008) i u *E. coli* s inaktiviranim prvim enzimom biosintetskog puta razgranatih aminokiselina (Sycheva et al., 2007). Prebacivanje na anaerobni metabolizam dovodi do akumulacije piruvata i nakupljanja norvalina u milimolarnoj koncentraciji (Soini et al., 2008). Ti rezultati govore u prilog kraćeg alternativnog puta za nastanak α -ketobutirata; direktnim produživanjem ugljikovodičnog lanca piruvata. Praktična važnost ovih rezultata je relevantna prvenstveno za farmaceutsku industriju, kada u velikim bioreaktorima zbog nesavršenog miješanja nastaju zone bez kisika, okolišni čimbenik dovoljan da potakne biosintezu norvalina i zatim njegovu pogrešnu ugradnju (mistranslaciju) u proteine, čime se dobiva nehomogeni proizvod što je problem u farmaceutskoj industriji..

1.7. Norvalin - rana evolucijska aminokiselina

Nakon što je otkriveno da smanjenje koncentracije kisika može dovesti do nastanka norvalina (Soini et al., 2008), ova neproteinogena aminokiselina se počela proučavati u svjetlu evolucije i uzročno posljedične veze razvoja visoko oksidirajućeg okoliša tijekom evolucije života na Zemlji (Alvarez-Carreño et al., 2013). O porijeklu života i dalje postoje brojne teorije i različita mišljenja, a jedno od ključnih neodgovorenih pitanja je evolucijski proces koji je doveo do izbora proteinogenog skupa L-aminokiselina koje danas grade proteine. Brojni prebiotički analozi aminokiselina (Slika 7.) mogu se sintetizirati jednostavnim pokusima Miller-Urey tipa (Miller, 1953) što upućuje da su bili prisutni na samom početku stvaranja organskih spojeva na primitivnoj Zemlji. U prilog tim pretpostavkama govore i aminokiseline koje su pronađene u ugljičnim kondritima, jednoj vrsti meteorita (Burton et al., 2012). Prilikom odabira aminokiselina za proteinogeni skup posebno je interesantna činjenica da iz njega izostaju hidrofobne ravnolančane aminokiseline poput norvalina i norleucina (Nle). Jedno od

predloženih objašnjenja zašto norvalin izostaje iz današnjeg seta proteinogenih aminokiselina je njegova manja veličina i hidrofobnost u odnosu na leucin (Tablica 3.) te povećana rotacijska sloboda oko proteinske okosnice (Weber & Miller, 1981).



Slika 7. Neke od prebiotičkih aminokiselina, prilagođeno prema Weber & Miller, 1981.

Tablica 3. Hidrofobnost ($\log P$), van der Waalsov volumen i izoelektrična točka (pI) hidrofobnih aminokiselina. Preuzeto iz Alvarez-Carreño et al., 2013.

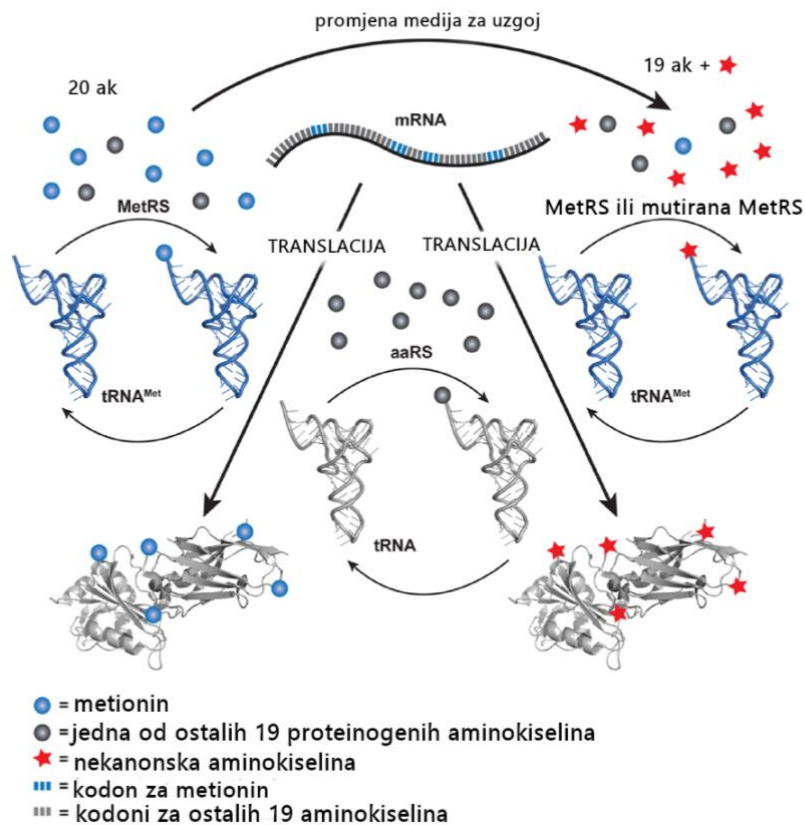
aminokiselina	$\log P$	van der Waalsov volumen (Å^3)	pI
leucin	-1,59	138,27	6,195
norvalin	-2,01	120,98	6,27
metionin	-2,41	139,49	5,77
norleucin	-1,52	138,27	6,15

Kako je stvaranje hidrofobne srži proteina veoma bitno za proces smatanja proteina (Gnanakaran et al., 2003) pretpostavlja se da bi evolucijom enzima, njihovom sve složenijom građom i funkcijom, zamjena leucina s manjim norvalinom utjecala na ispravno pakiranje sekundarnih elemenata potrebnih za nastanak hidrofobne srži (Alvarez-Carreño et al., 2013). Leucin se rijetko nalazi u aktivnim mjestima enzima (Holliday et al., 2009), stoga se smatra da bi njegova zamjena norvalinom primarno utjecala na smatanje, malih, jednostavnih polipeptida tijekom biokemijske evolucije života na Zemlji (Alvarez-Carreño et al., 2013).

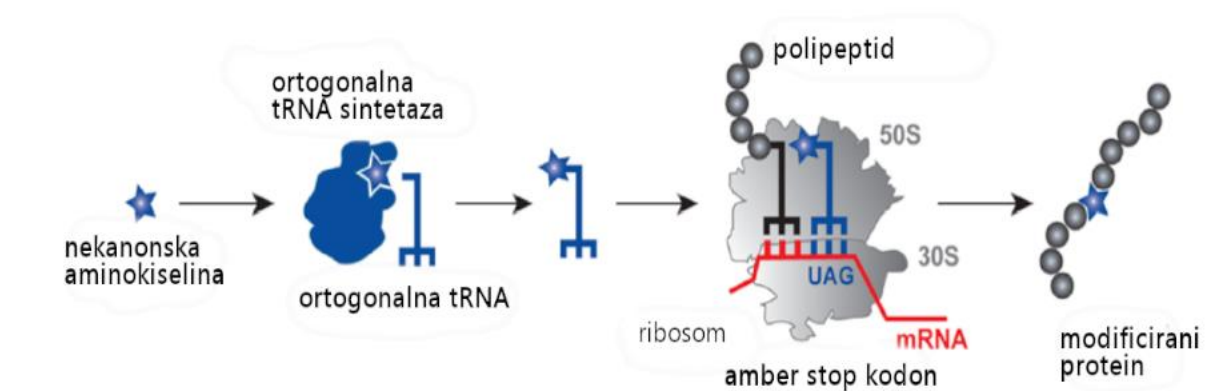
1.8. Načini ugradnje norvalina u proteine

Statistička ugradnja norvalina u proteine je rezultat kombinacije supstratnog promiskuiteta enzima na biosintetskom putu razgranatih aminokiselina kao i leucil-tRNA

sintetaze (LeuRS) (Alvarez-Carreño et al., 2013). Zbog nedostatka potpune specifičnosti elongacijskog faktora Tu i ribosoma, može doći do ugradnje neproteinogenih aminokiselina u polipeptidne lance (Liu & Schultz, 2010). Prirodna pojava norvalina u proteinima je posljedica pogrešne aminoacilacije tRNA za razgranate aminokiseline, primarno leucin (tRNA^{Leu}), s norvalinom (Apostol et al., 1997). Aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju prvi korak sinteze polipeptida na ribosomu i o njihovoj specifičnosti uvelike ovisi točnost same sinteze (Perona & Hadd, 2012). Kako njihova preciznost ipak nije savršena, može doći do ugradnje nepripadne aminokiseline (Cvetesic et al., 2014; Yadavalli & Ibba, 2012; Young et al., 2011). Najbolje istraženi primjeri su oni razgranatih aminokiselina pa tako LeuRS, ValRS i IleRS imaju dodatne domene koje im omogućuju hidrolizu pogrešno nabijene tRNA (Brown & Doolittle, 1995). Za ciljanu ugradnju norvalina u peptide koristi se sinteza na čvrstom nosaču (engl. *solid-phase synthesis*). Prekretnica u razvoju metode dogodila se prije 50 godina kad je uvedena zaštita reaktivnih skupina aminokiselina s 9-fluorenilmetoksikarbonilom (Fmoc) koja je omogućila izvođenje cijelog procesa u puno blažim uvjetima (Amblard et al., 2006). Metoda se znatno razvila uvođenjem različitih čvrstih faza na kojima se sintetiziraju peptidi, blažih otapala i zaštitnih skupina za reaktivne bočne ogranke te je danas u potpunosti automatizirana tako da je sinteza peptida izgrađenog od otprilike 40 aminokiselina postala brza i jednostavna (Coin et al., 2007). Osim ove metode za ciljanu ugradnju, u zadnjih 20 godina se intenzivno razvijala i kotranslacijska ugradnja neproteinogenih aminokiselina (Lang & Chin, 2014). Dvije najkorištenije inačice ove metode su prikazane na Slikama 8. i 9. Prva metoda omogućuje statističku ugradnju neproteinogene aminokiseline na nasumične pozicije po cijelom proteomu, dok je druga inačica specifičnija i omogućuje ugradnju na točno određeno mjesto pomoću razvoja novog aaRS/tRNA para. Metode mjesno specifične ugradnje neproteinogenih aminokiselina omogućuju strukturne i funkcionalne analize modelnih peptida kao i otkrivanje svojstava nekanonskih aminokiselina u prirodnom proteinskom okruženju.



Slika 8. 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 auktrotrofnom soju, i uvodi nekanonsku aminokiselinu zajedno s ostalih 19 proteinogenih aminokiselina. Neprirodna aminokiselina se nabija na tRNA^{Met} i ugrađuje u proteine umjesto metionina. Preuzeto i prilagođeno iz Lang & Chin, 2014.



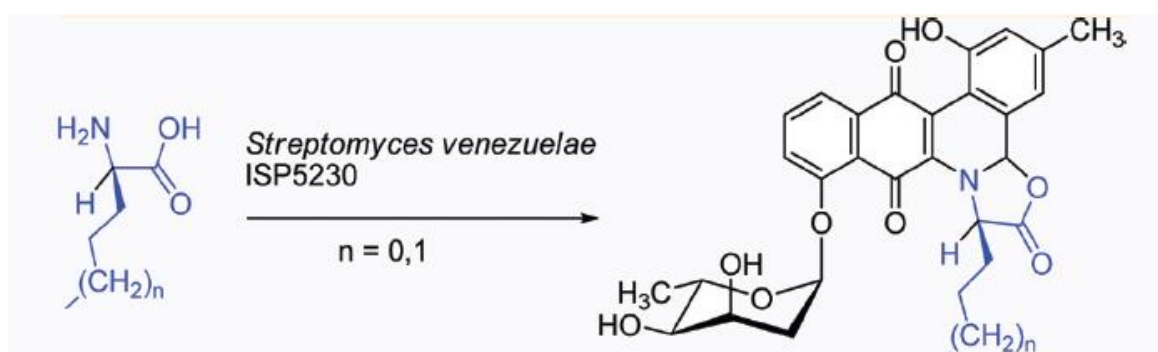
Slika 9. Proširivanje genetičkog koda mjesno specifičnom ugradnjom nekanonskih aminokiselina. Ortogonalna tRNA sintetaza specifično prepoznaje nekanonsku aminokiselinu (plava zvjezdica) dodanu u medij za uzgoj i nabija je na ortogonalnu supresijsku tRNA. Ribosom zatim na mjestu amber stop kodona (UAG) 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. PREGLED LITERATURE

2.1. Norvalin u prirodnim spojevima

Prisustvo norvalina je rijetko u prirodnim spojevima, međutim postoje primjeri spojeva koji u svom sastavu imaju ovu neproteinogenu aminokiselinu, a radi se najčešće o bakterijskim i fungalnim metabolitima. Najstariji opisani primjer norvalina u prirodnom peptidu je antifungalni peptid kojeg proizvodi *Bacillus subtilis* (Nandi & Sen, 1953). Struktura ovog peptida nije riješena, ali je tankoslojnom kromatografijom utvrđen njegov sastav te se tako došlo do saznanja o prisustvu nekanonske aminokiseline norvalina.

Iz bakterijske vrste *Streptomyces venezuelae* je također izoliran spoj s norvalinom. Taj spoj spada u porodicu sekundarnih metabolita jadomicina koji se odlikuju promiskuitetnom biosintezom koja može dovesti do ugradnje različitih aminokiselina i tako omogućiti formiranje različitih derivata jadomicina (Slika 10.).



Slika 10. Ne-enzimska ugradnja aminokiselina (plavo) u oksazolonski prsten jadomicina (crno) u *Streptomyces venezuelae* ISP5230. Preuzeto iz Dupuis et al., 2011.

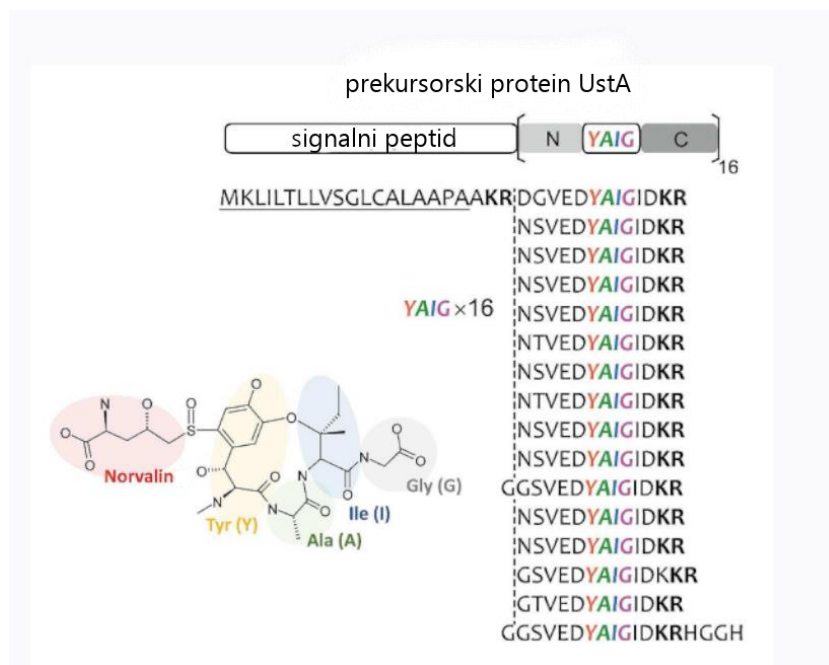
Kako ugradnja različitih aminokiselina rezultira jadomicinima različitih bioloških aktivnosti, Dupuis i suradnici su odlučili istražiti povezanost strukture i aktivnosti inačice jadomicina s norvalinom. Kulture uzgajane s L-norvalinom nisu uspjele proizvesti jadomicine, pretpostavlja se zbog toga što *S. venezuelae* ne može unijeti L-aminokiseline iz medija, ali je D-enantiomer norvalina uspješno inkorporiran u sastav jadomicina. Evaluacija citotoksičnosti jadomicina s D-norvalinom (DNV) na 59 kancerogenih staničnih linija (Tablica 4.) je pokazala kako ta inačica inhibira rast većine staničnih linija na kojima je testirana.

Tablica 4. GI₅₀, TGI i LC₅₀ vrijednosti za jadomicin DNV prilikom screeninga u 59 kancerogenih staničnih linija. ^aPreuzeto iz Dupuis et al., 2011.

jadomicin	raspon koncentracija (nM-μM)	GI ₅₀ (μM)		TGI (μM)		LC ₅₀ (μM)	
			n		n		n
DNV	3,2-32	4,9	59	10	57	19	41

^aGI₅₀-koncentracija potrebna za inhibiciju staničnog rasta za 50%; TGI-koncentracija potrebna za inhibiciju staničnog rasta za 100%; LC₅₀-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.

Osim u bakterijskim metabolitima, norvalin je nedavno otkriven i u ribosomalno sintetiziranim i posttranslacijski modificiranim peptidima (RiPP) eukariotskih stanica odnosno u filamentoznih gljiva (Arnison et al., 2013). Svi RiPP su prvo sintetizirani kao prekursorski peptidi na ribosomu i zatim se posttranslacijski dorađuju. Vrsta RiPP-a za koju se zna da sadrži neobičnu modifikaciju norvalinom je ustiloksin B (Slika 11.) otkriven u biljnoj patogenoj gljivi *Ustilagoidea vireus*. Ustiloksin B se sastoji od tetrapeptida Tyr-Ala-Ile-Gly, a norvalin se nalazi na hidroksiliranom tirozinskom ostatku.



Slika 11. 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 prekursori protein UstA. Preuzeto i prilagođeno iz Keller et al., 2017.

2.2. Norvalin u peptidima

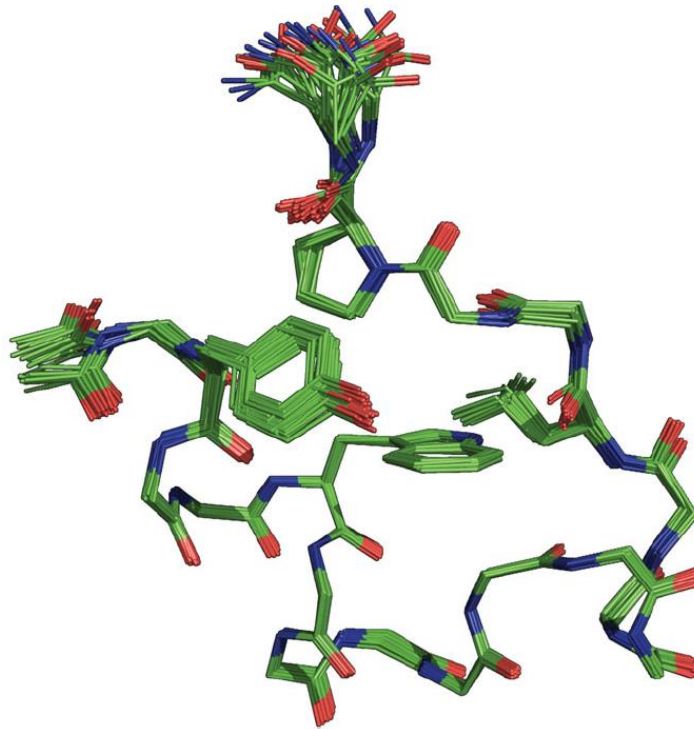
U ovom ulomku su obrađeni oni peptidi koji u svojem sastavu sadrže norvalin i nalaze se u bazi podataka PDB (engl. *Protein Data Bank*) te im je riješena 3D struktura, ali i antimikrobni peptidi s norvalinom kojima još nije određena struktura.

Neproteinogene aminokiseline se često koriste u istraživanjima modelnih sustava pa je tako i norvalin korišten kako bi se ispitale značajke modelnog peptida Trp-cage-a (Graham et al., 2019) i oligopeptid-vezujućeg proteina odnosno njegovih peptidnih liganda (Davies et al., 1999). Trp-cage (Neidigh et al., 2002) je peptid od 18 do 20 aminokiselina koji je dizajniran za evaluaciju računalnih simulacija smatanja proteina (Day et al., 2010; Snow et al., 2002). Kako bi se ispitale stabilizirajuće interakcije koje pomažu održati smotano stanje i njihova ovisnost o pH, korištene su inačice Trp-cage-a s norvalinom (Graham et al., 2019). Najviše pozornosti je posvećeno elektrostatskoj interakciji ionskog mosta između Asp9 i Arg16 (Barua et al., 2008) koja je izravno ovisna o pH. Dizajnirane su verzije ovog modelnog peptida koje su zadržale nativnu strukturu, ali su na mjestu arginina u solnom mostu imale norvalin (R16Nva). Primijećena je destabilizacija u mutiranom peptidu R16Nva (Slika 12.) te je ona veća od destabilizacije koja se događa prilikom zamjene arginina s citrulinom (R16Cit) i od one koja je opažena u inačici peptida s asparaginom umjesto aspartata (D9N) (Tablica 5.).

Tablica 5. 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.

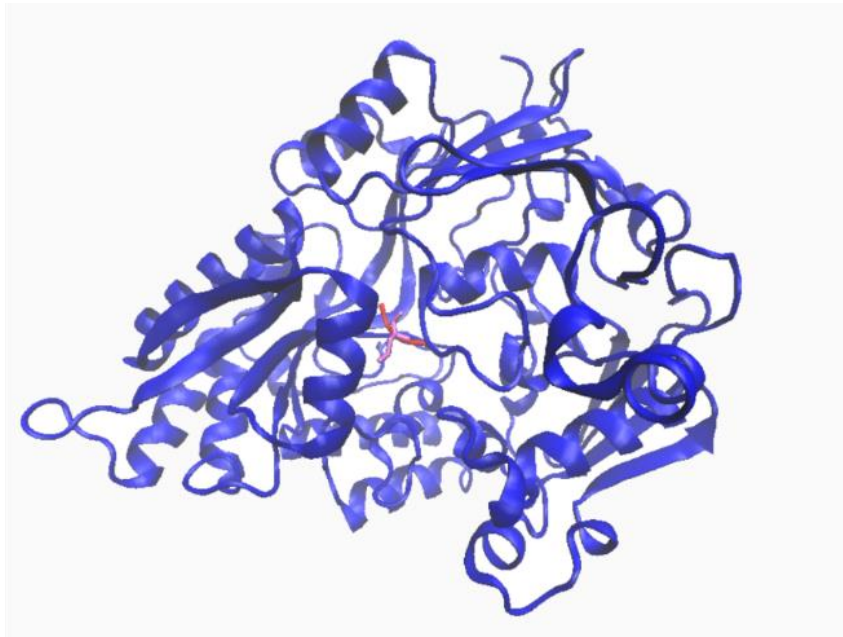
Peptid	$\Delta\Delta G_f$ pri pH 7	$\Delta\Delta G_f$ pri pH 2,5
R16Nva	4,58	1,47
R16Cit	3,65	0,58
D9N	3,65	1,60

Smatra se kako je norvalin najnepovoljniji izbor aminokiseline u tom solnom mostu zbog toga što je njegov nepolarni bočni ogranak u potpunosti izložen otapalu. Prilikom smanjivanja pH, inačica R16Nva je pokazala značajan doprinos stabilizaciji i povećanje stabilnosti je bilo proporcionalno povećanju temperature.



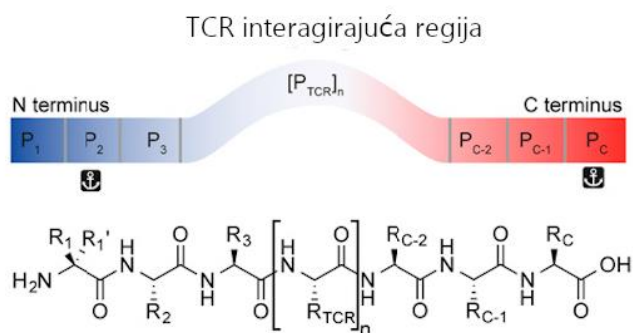
Slika 12. Obitelj NMR struktura mutante R16Nva pri pH 2,5. Prikazani bočni ogranci su Y3, W6, Nva16, i P19. Preuzeto i prilagođeno iz Graham et al., 2019.

Kao drugi primjer modelnog sustava koji se istraživao uz pomoć norvalina u literaturi je zabilježen oligopeptid-vezujući protein OppA. Taj peptid, pronađen u periplazmi Gram-negativnih bakterija služi kao inicijalni receptor za prijenos peptida preko stanične membrane i veže široki spektar liganda peptida veličine od dvije do pet aminokiselina (Guyer et al., 1986). Proteinska okosnica tripeptida ostvaruje vodikove veze s proteinom, a bočni ogranci peptida su smješteni u velikim hidratiziranim šupljinama proteina pošto OppA u potpunosti obuhvati ligande (Tame et al., 1994). Proučavan je utjecaj duljine hidrofobnog bočnog ogranka na drugoj poziciji u tripeptidnom ligandu (Davies et al., 1999). Korištene su inačice tripeptida: Lys-Nle-Lys (KNleK), Lys-Nva-Lys (KNvaK) i Lys-Ala-Lys (KAK). Vezanje inačice KNvaK (Slika 13.) za OppA je bilo čvrsto zahvaljujući maloj, povoljnoj entalpiji. Norvalin se smješta u blizini nepolarnih metilenskih grupa proteinskog bočnog ogranka Glu32 i na taj način omogućuje energetske povoljnu interakciju koja omogućuje čvrsto vezanje.



Slika 13. 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.

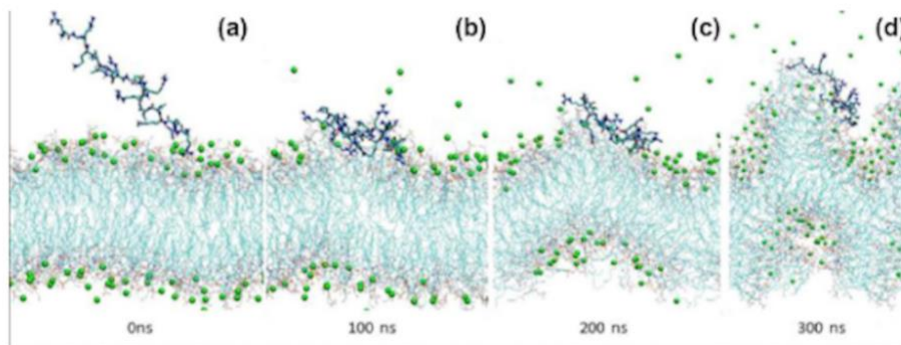
Svoju ulogu norvalin je našao i u istraživanjima kemijski modificiranih peptidnih liganada koji su osnova za razvoj peptidnih cjepiva (Rosenberg et al., 2004). Kako bi se stabilizirala interakcija peptid-MHC molekula (engl. *Major Histocompatibility Complex*) jedno istraživanje je koristilo ugradnju preko 90 neproteinogenih α -aminokiselina među kojima i norvalin (Hoppes et al., 2014). Ta interakcija je jako bitna u imunom odgovoru stanice jer se nakon prepoznavanja epitop-MHC stimuliraju citotoksični limfociti T (Engels et al., 2013), a vrijeme poluživota tog kompleksa direktno korelira s imunogenosti (van der Burg et al., 1996). Nakon opsežnih pretraživanja svih varijanti melanomskog epitopa, primijećeno je da neke inačice pokazuju povećani afinitet za MHC molekulu. Jedna od tih inačica je bila i ona s norvalinom na poziciji P2 u regiji koja ostvaruje kontakt s MHC molekulama (Slika 14.).



Slika 14. 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.

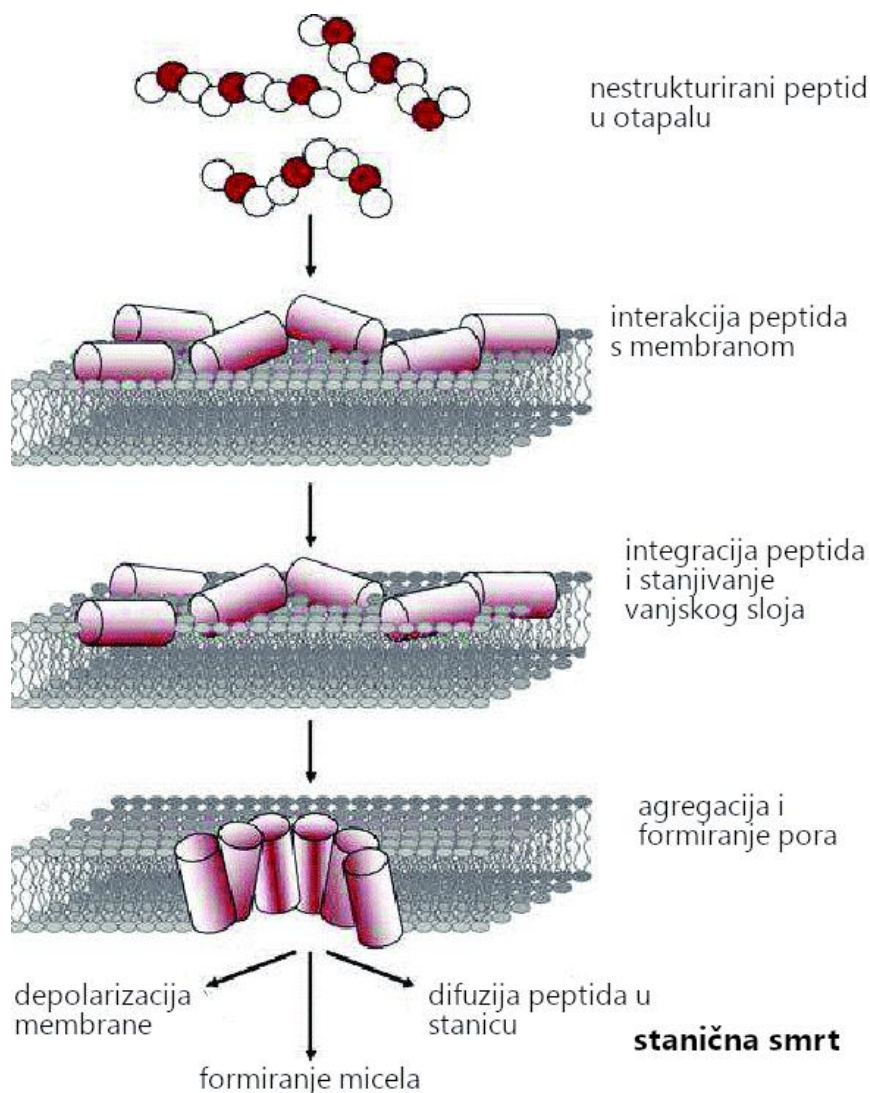
Smatra se da norvalin doprinosi stabilizaciji pomoću van der Waalsovih interakcija i pomoću CH- π interakcije koju ostvaruje s bočnim ogrankom Tyr7 u okviru MHC molekule, a za koju je pokazano da značajno doprinosi stabilnosti kompleksa (Uchtenhagen et al., 2013). Uslijed povećanog afiniteta modificiranog epitopa za MHC molekulu je došlo i do produljene aktivacije citotoksičnih limfocita *in vitro* u odnosu na nativni epitop. Uvođenjem neproteinogenih aminokiselina u epitope peptidnih cjepiva se otvaraju nove mogućnosti za poboljšanje terapijskih ishoda cijepljenja.

Osim riješenih 3D struktura peptida s norvalinom u svom sastavu, u literaturi su zabilježeni i brojni antimikrobni peptidi čije inačice sadrže ovu neproteinogenu aminokiselinu. Zbog rastućeg trenda otpornosti bakterija na antibiotike razvijen je novi pristup liječenju bakterijskih bolesti koji kombinira uporabu antibiotika i antimikrobnih peptida „pomagača“ (Lakshminarayanan et al., 2016). Antimikrobni peptidi razrušavaju vanjsku membranu bakterijske stanice i na taj način pomažu ulasku antibiotika kako bi on mogao djelovati. Jedan od poznatih antimikrobnih peptida je B2088 (Slika 15.). On djeluje protiv različitih Gram-negativnih patogena tako da formira čvrsti kompleks s lipopolisaharidima vanjske membrane (Bai et al., 2012). U svrhu istraživanja povezanosti sastava i funkcije peptida, dizajnirane su inačice s neproteinogenim aminokiselinama (Lakshminarayanan et al., 2016). Modifikacija peptida s norvalinom je pokazala porast minimalne inhibitorne koncentracije, ali je zato za nju utvrđeno da ima najbolji aditivni efekt s aminoglikozidima i kloramfenikolom.



Slika 15. 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.

Djelotvornost antimikrobnih peptida se sve više istražuje i na patogenim gljivicama (Burrows et al., 2006; Stark et al., 2002) i to posebice na vrstama roda *Candida* za koje je poznato da su najčešći uzročnici oportunističkih gljivičnih infekcija (Pittet et al., 1997). Antifungalni peptidi, prozvani kaksini zbog svoje primarne sekvence, se dizajniraju tako da oponašaju transmembranske dijelove integralnih membranskih proteina (Stark et al., 2002) i njihovom interakcijom s membranom dolazi do formiranja pora što posljedično dovodi do stanične smrti (Slika 16.). Kako bi se pronašle što učinkovitije varijante, dizajnirane su brojne modifikacije kaksina (Burrows et al., 2006). Modifikacija s norvalinom je pokazala najbolju antifungalnu aktivnost, ali unatoč odličnoj efikasnosti, kaksin s norvalinom nije prikladan kao terapeutik zbog svoje izražene hemolitičke aktivnosti.

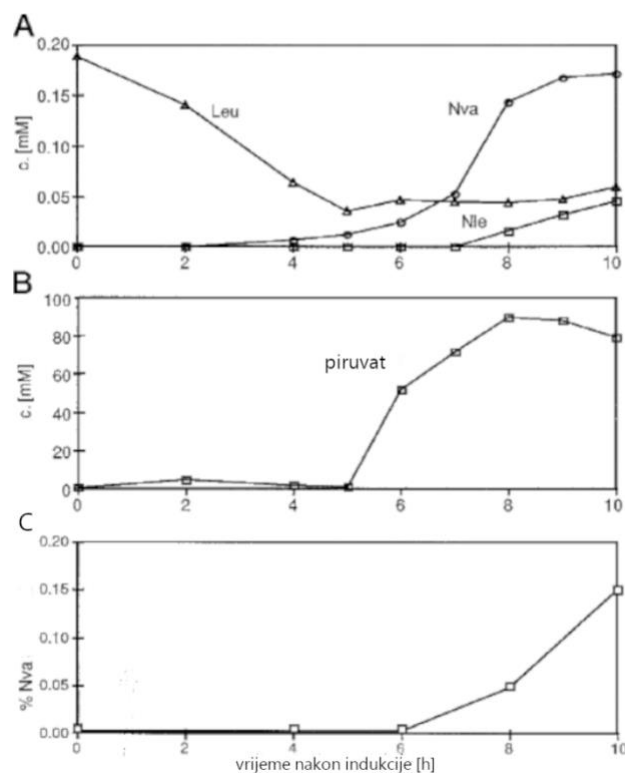


Slika 16. Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida. Preuzeto i prilagođeno iz Osman & Sitohy, 2015.

2.3. Norvalin u proteinima

Prvi, u literaturi zabilježeni, slučaj statističke ugradnje norvalina u protein je bila njegova ugradnja u rekombinantni hemoglobin proizveden u *E. coli* (Apostol et al., 1997). Smatra se kako visoki stupanj ekspresije leucinom-bogatih proteina (u tu skupinu spada i rekombinantni hemoglobin) dovodi do iscrpljivanja staničnih zaliha leucina i zatim derepresije leucinskog operona, što onda može dovesti do biosinteze norvalina (Bogosian et al., 1989). Masenom spektrometrijom je utvrđeno kako postoji varijacija u mjestima ugradnje norvalina kroz α i β -globinske lance, ali da je ona najčešće na leucinskim pozicijama. Pošto se opazilo da su dva mjesta gdje se najčešće ugrađuje norvalin odgovarala najrjeđe korištenom leucinskom

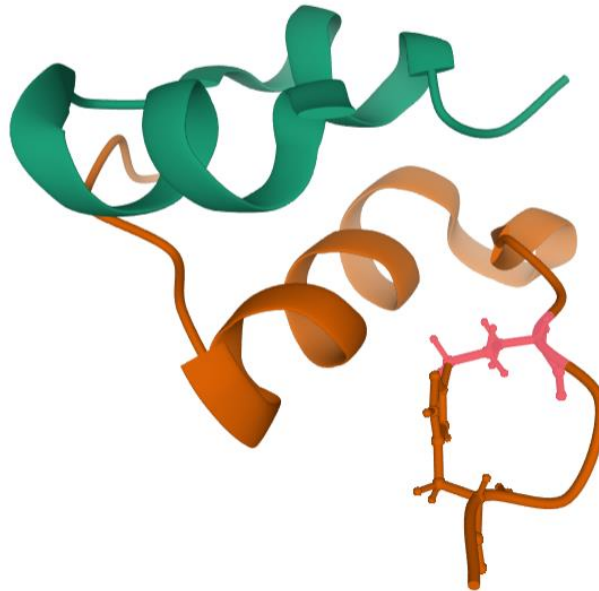
kodonu pretpostavilo se da je ugradnja norvalina tRNA-specifična, no daljnjim istraživanjem nije potvrđena ta pretpostavka. Praćen je nivo leucina kroz vrijeme u staničnom ekstraktu (Slika 17.) te je pokazano kako on pada tijekom prvih 5 sati, ali se onda održava konstantnim. Također je praćen i nivo piruvata, primarnog supstrata za biosintezu norvalina (Sycheva et al., 2007) te je primijećeno da njegova akumulacija pozitivno korelira s pojavom norvalina (Slika 17.). Kako endogena sinteza norvalina nije dostatna da proizvede dovoljno velike količine norvalina koje bi dovele do njegove ugradnje u proteine, predloženo je da je za misinkorporaciju ključan omjer norvalina i leucina u stanici.



Slika 17. 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.

Razvojem metoda ciljane ugradnje neproteinogenih aminokiselina, omogućena je sinteza duljih polipeptida koji u svom sastavu imaju nekanonske aminokiseline. Tako je norvalin korišten i pri istraživanju ključnog hormona ljudskog metabolizma, inzulina (Viková et al., 2016). Korištenjem Cu^I-katalizirane cikloadicije pokušali su stabilizirati aktivnu konformaciju inzulina, odnosno onu kakvu ima prilikom vezanja na inzulinski receptor. Pri tom su kao aminokiselinski prekursori korišteni bočni ogranci s azido i alkinil bočnim ograncima.

Analozi koji su imali kovalentnu poveznicu s azidonorvalinom (jedan od njih je prikazan na Slici 18.) su pokazali izvrsnu aktivnost i selektivnost, pošto je njegovo vezanje na receptor hormona rasta bilo četiri puta slabije u odnosu na prirodni inzulin.

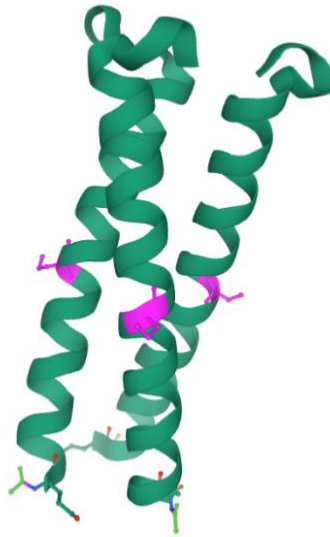


Slika 18. NMR struktura inzulinskog analoga s triazolskom poveznicom između B16 i B29 pri pH 1.9. A-lanac je označen zeleno, B-lanac narančasto s norvalinom u ružičastoj. PDB ID: 2N2V

Osim prilikom istraživanja ljudskih proteina, norvalin je korišten i kako bi se detaljno ispitala različita fizikalno-kemijska svojstva. Kako bi se kvantificirao doprinos hidrofobnog efekta slobodnoj energiji smatanja, Das i suradnici su proveli seriju termodinamičkih i strukturnih istraživanja na mutantima proteinskog kompleksa ribonukleaze S koji se sastoji od S peptida i S proteina. Izmjenom dvije hidrofobne aminokiseline iz središta ribonukleaze S u norvalin dobivene su mutante koje su poslužile za praćenje promjena slobodne energije smatanja. Pošto su ishodišne aminokiseline bile veće od norvalina, njegovo uvođenje je dovelo do nastanka šupljina u unutrašnjosti proteina (Eriksson et al., 1992) i gubitka van der Waalsovih interakcija. U inačicama s norvalinom je došlo do destabilizacije kompleksa i porasta slobodne energije smatanja prvenstveno zbog gubitka interakcija pakiranja (Das et al., 2005).

Zadnje objavljena struktura s norvalinom u bazi podataka PDB je ona iz rada iz prve polovice 2020. godine (Stern et al., 2020) koji istražuje stabilizirajuće interakcije trimerne superzavojnice 1CW (Ogihara et al., 2008). Smatra se da je stabilizirajuća interakcija dugog

dosega, između Glu10 i Lys18, ovisna o identitetu bočnog ogranka na poziciji 14. Kako bi se istražile karakteristike te interakcije, napravljene su inačice trimerne zavojnice s promijenjenom 14.-om aminokiselinom. Varijanta s norvalinom (Slika 19.) je smanjila stabilizaciju superzavojnice te je primijećena povećana slobodna energija. Otkriveno je kako je za ovu vrstu sinergističke stabilizacije ključno da aminokiselina 14 bude donor vodikove veze, a kako to ne vrijedi za norvalin, njegovo pojavljivanje u superzavojnici nepovoljno utječe na $i/i+8$ interakciju dugog dosega.



Slika 19. Kristalna struktura trimerne zavojnice 1CW s norvalinom (ljubičasto). PDB ID:6V57

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Aminokiseline koje ne grade prirodne proteine, a koje nazivamo neproteinogene aminokiseline u posljednje vrijeme su interesantne zbog njihove uporabe u istraživanjima povezanosti strukture i funkcije proteina, ali i u modifikacijama nekih peptidnih spojeva prikladnih za terapijsku upotrebu (peptidna cjepiva, antimikrobni proteini, antitumorski spojevi). Proučavanje utjecaja neproteinogenih aminokiselina je pokazalo da one mogu doprinijeti stabilnosti proteinskih struktura te se također otvaraju i putovi za njihovu primjenu u industriji. S druge strane, postoje i indikacije da statistička, nasumična ugradnja neproteinogenih aminokiselina u proteine *E. coli* dovodi do nestabilnosti proteoma. Iz svega ovoga je vidljivo kako su saznanja o svojstvima neproteinogenih aminokiselina i dalje poprilično ograničena. Cilj našeg istraživanja bio je odrediti sklonost neproteinogene aminokiseline norvalina prema određenoj sekundarnoj strukturi te proučiti stabilnost strukture u ovisnosti o temperaturi. Prethodni eksperimentalni rezultati predlažu da se norvalin preferabilno nalazi u α -zavojnica (Lyu et al., 1991; Padmanabhan & Baldwin, 1994) te se ovim istraživanjem htjelo korištenjem simulacija molekulske dinamike (MD) istražiti te tvrdnje te ih staviti u kontekst temperaturne ovisnosti. Kako bi se pobliže upoznala svojstva neproteinogene aminokiseline norvalina postavljani su sljedeći specifični ciljevi:

1. Ispitati sklonost pojedinih aminokiselina prema određenoj sekundarnoj strukturi koristeći MD simulacije smatanja homopolipeptida u vidu validacije odabrane računalne metode.
2. Analizom geometrijskih parametara provjeriti dobivene sekundarne strukture nastale smatanjem polipeptida kako bi se utvrdila sklonost aminokiselina prema određenom tipu sekundarne strukture.
3. Odabrati modelni peptid te konstruirati njegove inačice s ugrađenim odabranim aminokiselinama kako bi se evaluirala sklonost aminokiselina u realnom aminokiselinskom i strukturnom okruženju pri različitim temperaturama.
4. Analizirati sklonost aminokiselina prateći destabilizaciju modelnog peptida koji se prirodno nalazi u konformaciji antiparalelne β -ploče pri različitim temperaturama tako što će se stabilnost inačica modelnog peptida evaluirati praćenjem radijusa giracije (R_g) i promjene vrijednosti korijena srednjeg kvadrata udaljenosti (engl. *root-mean-square deviation*, RMSD) s divljim tipom peptida kao referentnom vrijednosti.

5. Iz svih provedenih simulacija donijeti zaključke o sklonosti norvalina za određenu sekundarnu strukturu i njegovom utjecaju na stabilnost strukture u ovisnosti o temperaturi.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Izgradnja homopolipeptida za simulacije

Za realizaciju gore navedenih ciljeva korištene su simulacije molekulske dinamike (MD) pri dvije temperature 27 °C i 77 °C. U tu svrhu prvo su konstruirane linearne, nesmotane strukture homopolipeptida: polialanin, polileucin, poliizoleucin i polinorvalin koristeći modul tleap u okviru programskog paketa AmberTools17. Svaki od polipeptida se sastojao od 13 aminokiselina koje su na svojem N- i C- kraju imale acetilnu (ACE) i N-metil amidnu skupinu (NME). Poznato je da je α -zavojnica makrodipol te da njezinoj stabilnosti doprinosi negativno nabijena aminokiselina poput Asp na N-kraju te pozitivno nabijena aminokiselina poput Lys na C-kraju α -zavojnice. S obzirom na to da su korišteni modeli izgrađeni od istih nepolarnih aminokiselina, koje ne mogu doprinositi stabilizaciji na taj način, na N-kraj, odnosno C-kraj α -zavojnice stavljene su skupine ACE i NMA (Cornell et al., 1996). Na ovaj način se također izbjegava i privlačenje slobodne nabijene karboksilne i amino skupine koje se nalaze na C- i N-kraju modela. Pokazano je da broj aminokiselina također utječe na smatanje homopolipeptida u α -zavojnicu. Zavojnice mogu biti podijeljene u dvije grupe ovisno o broju aminokiselina koje ih grade. Polipeptidi sa 6,7,10,11,13,14,17,18,21,22,24,25,28,29 i 31 aminokiselina favoriziraju zavojnicu, a oni s 8,9,12,15,16,19,20,23,26,27 i 30 aminokiselina se svrstavaju u nepovoljnije za sekundarnu strukturu α -zavojnice (Doig et al., 2001). Pokazano je kako termalna ravnoteža između razmatanja vođenog entropijom i smatanja vođenog minimumom slobodne energije odlučuje o tome koje su duljine α -zavojnica favorizirane (Qin et al., 2013). Ti rezultati govore kako je 13 optimalan broj za stabilnost α -zavojnice te je upravo zbog toga odlučeno raditi s homopolipeptidima od 13 aminokiselinskih ostataka. Kako bismo vjerodostojno istražili plohu potencijalne energije i dobili statistički mjerodavne rezultate svaki model je simuliran u šest replika. Pregled modela dan je u Tablici 6.

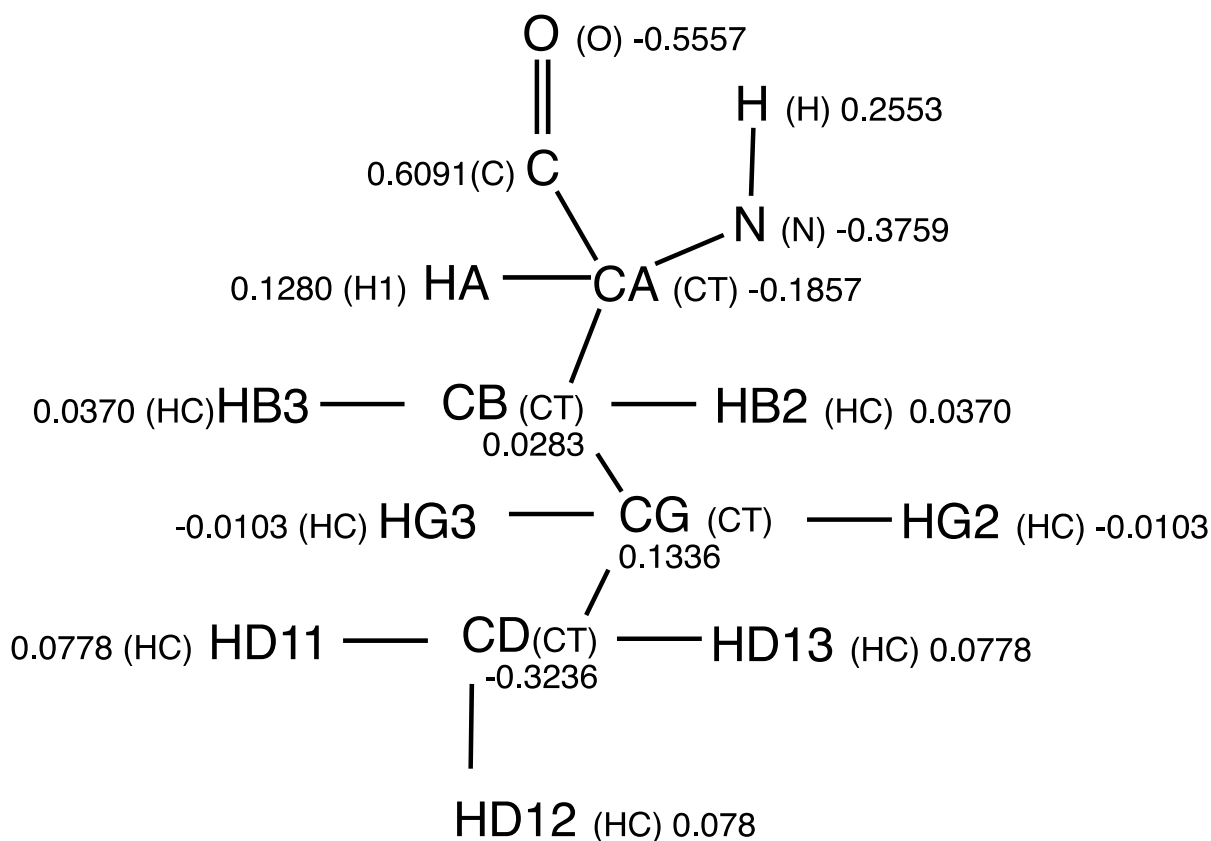
Tablica 6. Homopolipeptidni modeli na kojima su provedene MD simulacije.

Model	Broj AK u strukturi	Temperatura °C	Simulacijsko vrijeme, μ s	Broj simuliranih replika
Polialanin	13	27	1	6
Polialanin	13	77	1	6
Polileucin	13	27	1	6
Polileucin	13	77	1	6
Poliizoleucin	13	27	1	6
Poliizoleucin	13	77	1	6
Polinorvalin	13	27	1	6
Polinorvalin	13	77	1	6

4.2. Provođenje molekulske dinamičke simulacije

Smatanje linearnog homopolipeptida je simulirano pri temperaturama od 27 °C i 77 °C. Parametri za norvalin su izgrađeni *de novo* (Slika 20., Tablica 7.), a ostale aminokiseline su opisane primjenom polja sila Amber ff14SB (Maier et al., 2015). Sve izgrađene strukture su otopljene u eksplicitnom modelu vode TIP3P (Jorgensen et al., 1983) te su izgrađeni sustavi smješteni u simulacijsku kutiju oblika krnjeg oktaedra. Sustavi su minimizirani u četiri koraka, a zatim i uravnoteženi na temperaturi na kojoj su se provodile simulacije: 27 °C i 77 °C. Svaki izgrađeni model simuliran je 1 μ s pri čemu se svaka trajektorija sastojala od milijun struktura. Odabrano je vrijeme simulacije od mikrosekunde jer je vrijeme smatanja α -zavojnice koja se sastoji do 30 aminokiselina na temperaturama između 25 °C i 27 °C (Galzitskaya et al., 2005) u rasponu od 100 do 200 nanosekundi te nam odabrana vremenska skala omogućava praćenje smatanja, ali i stabilnosti smotane strukture. Prva teorija kinetike smatanja homopolipeptidnih α -zavojnica je predložena 1965. godine (Schwarz, 1965). Bazirana je na Zimm-Brag modelu (Zimm & Bragg, 1959) prijelaza *helix-coil*. Ako se promatra prijelaz iz nesmotane u smotanu strukturu, pretpostavka je da je (dovoljno duga) zavojnica stabilnija, odnosno da je slobodna energija elongacije zavojnice negativna. To je zbog toga što se produljivanjem zavojnice svaki novi aminokiselinski ostatak fiksira u zavojnitoj konformaciji pomoću nove vodikove veze i energija veze kompenzira gubitak entropije uzrokovan fiksacijom aminokiselinskog ostatka. Nasuprot elongacijskom koraku, prvi korak, inicijacija, se događa bez takve kompenzacije te je prvi okret zavojnice karakteriziran pozitivnom slobodnom energijom. S ovim teorijama slažu se i eksperimentalni rezultati (Eaton et al., 1998; Williams et al., 1996) kao i rezultati MD

simulacija (Takano et al., 1999) koji pokazuju da je vrijeme smatanja homopolipeptida veličine od 15 do 30 aminokiselina, 100 do 500 ns. Primijenjen je algoritam SHAKE (Ryckaert et al., 1977) te je korišten korak od 2 fs za numeričku integraciju. Temperatura je održavana primjenom Berendsenovog termostata (Berendsen et al., 1984). Granična vrijednost (engl. *cut-off*) vrijednost je postavljena na 9 Å.



Slika 20. Određeni parametri za norvalin, označeni su imena atoma, u zagradama je tip atoma, a brojčane vrijednosti označavaju naboj.

Tablica 7. Određeni parametri za norvalin.

Ime atoma	Tip atoma	Naboj
O	O	-0,5557
C	C	0,6091
CA	CT	-0,1857
CB	CT	0,0283
CG	CT	0,1336
CD	CT	-0,3236
N	N	-0,3759
H	H	0,2553
HA	H1	0,1280
HB2	HC	0,0370
HB3	HC	0,0370
HG2	HC	-0,0103
HG3	HC	-0,0103
HD11	HC	0,0778
HD12	HC	0,0778
HD13	HC	0,0778

4.3. Analiza dobivenih trajektorija

Nakon završenih simulacija smatanja svih modela na obje temperature krenulo se s analizom koja se provodila pomoću modula cpptraj (Roe & Cheatham, 2013) u okviru paketa AmberTools17. Procjena stabilnosti dobivenih struktura praćena je prikazom ovisnosti radijusa giracije R_g o korijenu srednje kvadratne devijacije (engl. *root mean square deviation*, RMSD). Kako bi se izračunale RMSD vrijednosti korištena je referentna struktura α -zavojnice polialanina. Prema literaturnim podacima (Costantini et al., 2006) alanin ima najveću sklonost prema α -zavojnici pri sobnoj temperaturi. Referentna struktura je dobivena iz trajektorije smatanja polialanina tijekom 1 μ s praćenjem geometrijski parametara. Naime, kako je α -zavojnica stabilizirana primarno vodikovim vezama koje se tvore između atoma peptidnih veza aminokiselina na pozicijama n i $n+4$, u strukturi od 13 aminokiselina očekujemo najviše 9 vodikovih veza. Maksimalni pronađeni broj vodikovih veza u trajektorijama smatanja polialanina je bio 7 tako da je ta struktura uzeta za referentnu. U odnosu na tu referentnu strukturu se računao radijus giracije (R_g) te korijen srednje kvadratne devijacije (RMSD) uzimajući u obzir sljedeće atome koji grade peptidnu vezu (N, O, C, C_α). Također je praćena evolucija elemenata sekundarnih struktura u vremenu trajanja simulacije te zastupljenost i sklonost svake aminokiseline u pojedinom strukturnom elementu pri danoj temperaturi.

Elementi sekundarne strukture su dodijeljeni prema DSSP klasifikaciji (Kabsch & Sander, 1983) koja se temelji na analizi ϕ i ψ torzijskih kutova i vodikovih veza.

4.4. Druga faza istraživanja- evaluacija/provjera MD simulacija homopolipeptida

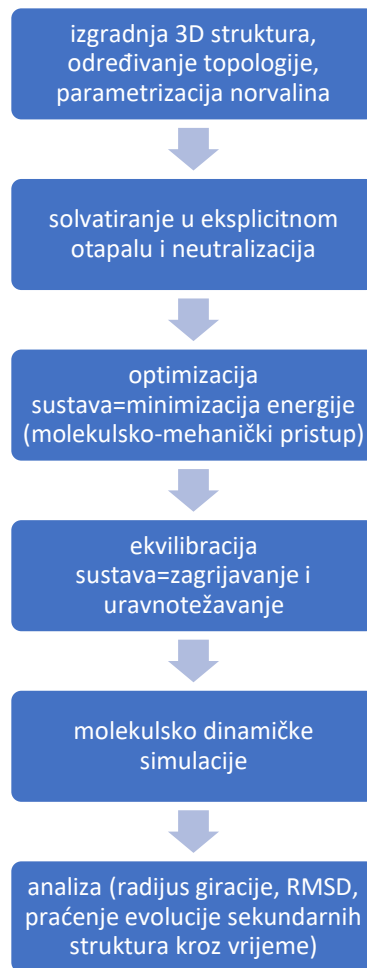
Zaključci dobiveni u prvoj fazi istraživanja s homopolipeptidima su provjereni na primjeru peptida HIV-1 IIIB V3 ovojnice virusa HIV, prirodne β -ukosnice koja se sastoji od 18 aminokiselina. Ovaj element sekundarne strukture ima tri izoleucina te je zamjenom izoleucina, redom u alanin, valin, norvalin i leucin, ispitana stabilnost β -ukosnice na dvije temperature 27 °C i 77 °C, primjenom molekulsko-dinamičkih simulacija. Struktura peptida HIV-1 IIIB V3 je preuzeta iz proteinske baze podataka (PDB ID 1B03), a inačice proteina u okviru kojih su sve tri izoleucinske pozicije zamijenjene alaninom, leucinom i valinom su dizajnirane pomoću programa Chimera (Pettersen et al., 2004) pri čemu je odabran najzastupljeniji rotamer iz knjižnice rotamera (Shapovalov & Dunbrack, 2011) svake od zamjenskih aminokiselina. Norvalin je izgrađen manualno iz strukture divljeg tipa, pri čemu je metilna skupina na C_{β} atomu izoleucina zamijenjena atomom vodika. Modeli peptida HIV-1 IIIB V3 ovojnice virusa HIV simulirani su na dvije temperature, pri čemu su svi model simulirani 1 μ s, također u šest replika (Tablica 8).

Uvjeti MD simulacija su bili isti kao u prethodno opisanoj fazi istraživanja. Stabilnost simuliranih modela je ispitana kao i u prvoj fazi istraživanja. U ovom slučaju za referentnu strukturu je uzeta struktura peptida HIV-1 IIIB V3 ovojnice virusa HIV iz PDB baze podataka koja je riješena eksperimentalno primjenom NMR-a u otopini (PDB ID 1B03, model 1) te se u odnosu na nju računao radijus giracije (R_g) i korijen srednje kvadratne devijacije (RMSD) uzimajući u obzir samo atome koji grade peptidnu vezu (N, O, C, C_{α}). I u ovom slučaju praćena je evolucija elemenata sekundarnih struktura u vremenu te zastupljenost svake aminokiseline u pojedinom strukturnom elementu.

Sveukupni pregled procesa istraživanja prikazan je u obliku hodograma na Slici 21.

Tablica 8. Pripremljeni modeli za drugu fazu istraživanja.

Model	Broj AK u strukturi	Temperatura °C	Simulacijsko vrijeme, μs	Broj simuliranih replika
Peptid V3 divljeg tipa	18	27	1	6
Peptid V3 divljeg tipa	18	77	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Ala)	18	27	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Ala)	18	77	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Val)	18	27	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Val)	18	77	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Nva)	18	27	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Nva)	18	77	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Leu)	18	27	1	6
Peptid V3 (3Ile->3Leu)	18	77	1	6



Slika 21. Hodogram procesa istraživanja

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Primjena polja sila Amber ff14SB i parametara za norvalin pokazali su da vjerodostojno opisuju sklonosti odabranih aminokiselina (Tablica 9.) prema α -zavojnici, kako je i poznato iz literature (Costantini et al., 2006). Iz simulacija je vidljivo da alanin pokazuje gotovo jednaku sklonost prema α -zavojnici na obje temperature. Vrlo slično ponašanje je uočeno i kod homopolipeptida izgrađenog od norvalina čija se sklonost prema α -zavojnici neznatno povećala na višoj temperaturi. Kada je riječ o leucinu, njegova sklonost prema stvaranju polileucinske α -zavojnice opada s povećanjem temperature. S druge strane izoleucin pokazuje znatno veću sklonost prema α -zavojnici na višoj temperaturi (Slika 22. i Tablica 10.), a na sobnoj temperaturi njegova sklonost prema α -zavojnici pokazuje graničnu vrijednost s formiranjem β -ploče, što je poznato iz literature.

α -zavojnice su se smotale na očekivanoj vremenskoj skali (Williams et al., 1996) što je potvrda validnosti odabranog polja sila. Dobiveni rezultati su pokazali da su se sve zavojnice smotale na nanosekundnoj vremenskoj skali što je verifikacija polja sila i pripremljenih *de novo* parametara za norvalin. Na primjeru leucinskog homopolipeptida se najbolje vidi kako je stabilna α -zavojnica nastala na nanosekundnoj skali (Slika 23.)

S obzirom na to da su se odabrano polje sila te *de novo* parametri za norvalin pokazali prikladnim prešlo se na drugi dio istraživanja u okviru kog su napravljene MD simulacije β -ploče divljeg tipa, koja se nalazi u prirodi i njezinih inačica u kojima su tri izoleucinska ostatka zamijenjena odabranim aminokiselinama. Rezultati tih simulacija, koje su također provedene u šest replika i na dvije temperature, su prikazani u Tablici 11. i Tablici 12. Svih šest simulacija β -ploče divljeg tipa (betaWT) na 27 °C je ostalo u stabilnoj konformaciji antiparalelne β -ploče, što je također validacija odabranog polja sila i njegove prikladnosti u opisivanju β -ploče. S druge strane, na 77 °C je došlo do narušavanja strukture β -ploče u tri replike, no tu i dalje prevladava antiparalelna β -ploča, dok je u preostale tri replike došlo do narušavanja strukture i pojavljivanja α -zavojnice. Prilikom simulacija inačice β -ploče s alaninom (betaALA) umjesto izoleucina na tri pozicije je već na 27 °C došlo do narušavanja strukture i pojavljivanja α -zavojnice i 3_{10} zavojnice. Na višoj temperaturi je taj destabilizirajući efekt još izraženiji te se u pet replika pronalazi α -zavojnica, dok je samo u jednoj ostala prisutna antiparalelna β -ploča veoma narušene strukture. Uvođenjem norvalina na izoleucinske pozicije u β -ploči (betaNVA) nije došlo do izražene destabilizacije pa tako pet od šest replika na 27 °C pokazuje stabilnu strukturu antiparalelne β -ploče. Nasuprot tome, na 77 °C je došlo do značajnog narušavanja

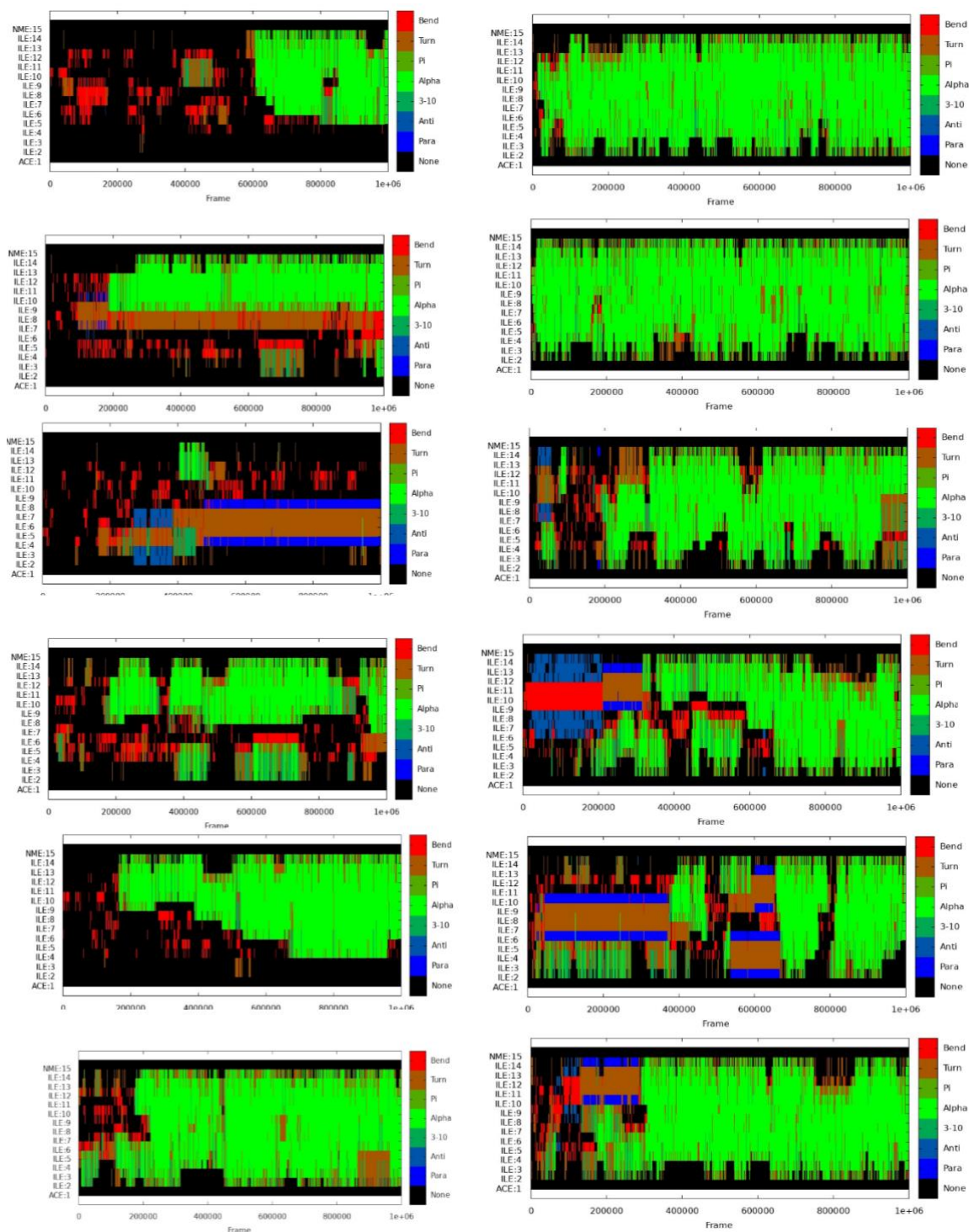
strukture i u svih šest replika se pojavljuje α -zavojnica. Simulacije β -ploče s valinom na tri izoleucinske pozicije (betaVAL) su potvrdile veliku sklonost te aminokiseline prema sekundarnoj strukturi β -ploče pošto je u svih šest simulacija na nižoj temperaturi očuvana nativna struktura. Viša temperatura je ipak uvela određenu destabilizaciju čak i u okviru inačice s valinom. Leucin u kontekstu β -ploče (betaLEU) je dobro stabilizirao strukturu te je u pet simulacija na 27 °C očuvana nativna struktura. Na temperaturi 77 °C je došlo do znatne promjene strukture i u svim simulacijama se pojavljuje α -zavojnica čije je trajanje kraće odnosno manje je stabilna u usporedbi s α -zavojnicama nastalim prilikom promjene strukture uzrokovane norvalinom.

Tablica 9. Tablični prikaz rezultata smatanja homopolipeptida od 13 aminokiselina na 77 °C pri čemu je aminokiselina 1 acetilna skupina stavljena na N-kraj homopolipeptida, a aminokiselina 15 je N-metil amidna skupina na C-kraju homopolipeptida. Vrijednosti u tablici označavaju koliko često se određeni aminokiselinski ostatak našao u konformaciji koja odgovara određenoj sekundarnoj strukturi koje su redom Para - paralelna β -ploča, Anti - antiparalelna β -ploča, 3-10 - zavojnica, Alpha - α -zavojnica, Pi - π -zavojnica, Turn - β -okret, Bend - okret. Dane vrijednosti su aritmetička sredina dobivena iz vrijednosti 6 simuliranih replika svakog modela.

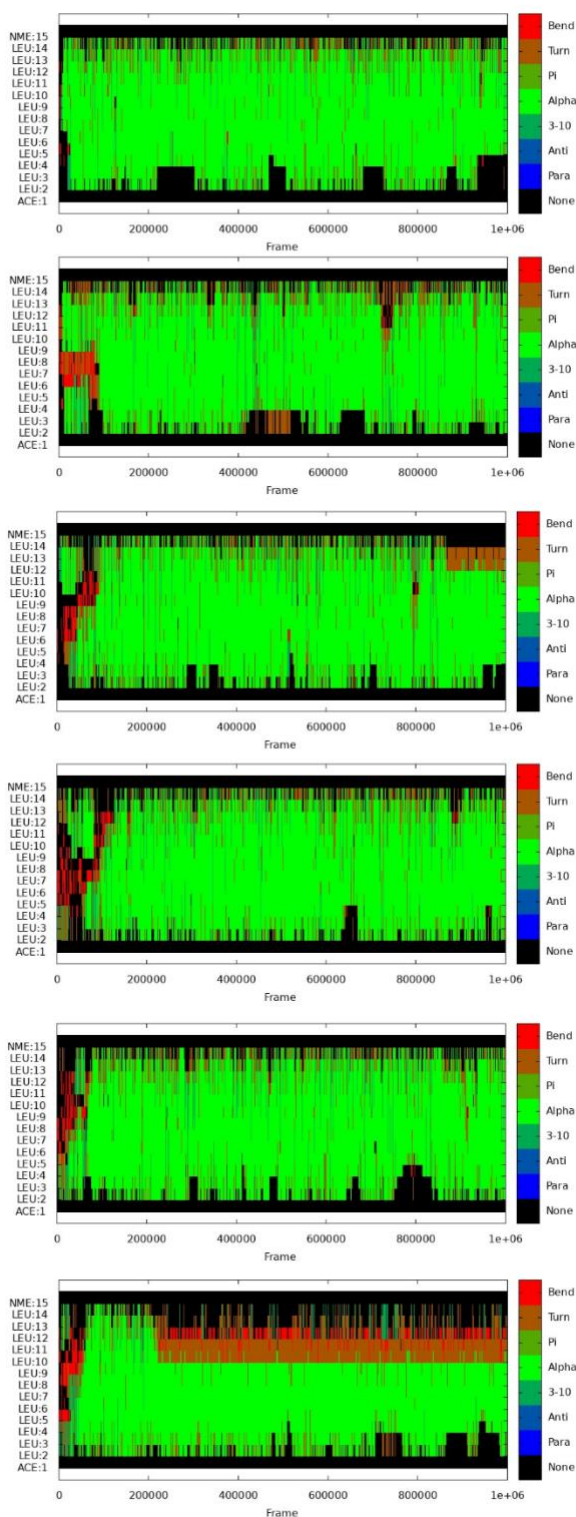
Aminokiselina	Polinorvalin 300 K (27 °C)							Polialanin 300 K (27 °C)						
	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0000	0,0001	0,1350	0,0702	0,0021	0,2643	0,0000	0,0042	0,0064	0,0238	0,1149	0,0000	0,1046	0,0000
3	0,0001	0,0001	0,2326	0,1665	0,0062	0,4104	0,0000	0,0023	0,0107	0,0405	0,1476	0,0000	0,1457	0,0000
4	0,0004	0,0001	0,2849	0,2181	0,0077	0,4172	0,0460	0,0025	0,0102	0,0600	0,1963	0,0000	0,1586	0,1651
5	0,0000	0,0002	0,2201	0,2542	0,0105	0,4160	0,0572	0,0018	0,0081	0,0557	0,2219	0,0001	0,1708	0,1601
6	0,0006	0,0001	0,1823	0,2722	0,0114	0,3840	0,0702	0,0006	0,0042	0,0536	0,2206	0,0001	0,1647	0,1699
7	0,0000	0,0000	0,1980	0,2452	0,0103	0,4308	0,0588	0,0002	0,0188	0,0477	0,2220	0,0001	0,1702	0,1744
8	0,0001	0,0001	0,2030	0,2299	0,0066	0,4464	0,0628	0,0001	0,0034	0,0616	0,2200	0,0001	0,1781	0,1744
9	0,0005	0,0002	0,1906	0,2599	0,0061	0,3883	0,0717	0,0003	0,0050	0,0619	0,2064	0,0001	0,1905	0,1700
10	0,0000	0,0003	0,2202	0,2592	0,0055	0,3272	0,0098	0,0005	0,0066	0,0626	0,1782	0,0001	0,2236	0,1663
11	0,0006	0,0001	0,2389	0,3145	0,0046	0,3629	0,0302	0,0018	0,0157	0,0514	0,1417	0,0001	0,2522	0,1672
12	0,0000	0,0012	0,2003	0,2870	0,0036	0,4340	0,0422	0,0014	0,0055	0,0508	0,1023	0,0001	0,2146	0,1852
13	0,0000	0,0000	0,0995	0,2100	0,0032	0,5470	0,0000	0,0051	0,0180	0,0343	0,0645	0,0001	0,1620	0,0000
14	0,0001	0,0001	0,0301	0,1241	0,0022	0,4040	0,0000	0,0022	0,0068	0,0161	0,0272	0,0001	0,0889	0,0000
15	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	Polileucin 300 K (27 °C)							Polizoleucin 300 K (27 °C)						
	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0000	0,0000	0,0254	0,4816	0,0002	0,1283	0,0000	0,0000	0,0167	0,0437	0,0608	0,0001	0,0889	0,0000
3	0,0000	0,0000	0,0356	0,6679	0,0002	0,1155	0,0000	0,0009	0,0157	0,0631	0,1018	0,0002	0,0998	0,0000
4	0,0000	0,0000	0,0430	0,8460	0,0002	0,0533	0,0106	0,0833	0,0000	0,0701	0,1691	0,0002	0,1200	0,0955
5	0,0000	0,0000	0,0300	0,9047	0,0002	0,0342	0,0123	0,0001	0,0001	0,0369	0,2019	0,0002	0,2100	0,1432
6	0,0000	0,0000	0,0241	0,9063	0,0002	0,0267	0,0208	0,0009	0,0165	0,0169	0,2419	0,0003	0,1555	0,1154
7	0,0000	0,0000	0,0235	0,8982	0,0000	0,0397	0,0184	0,0037	0,0165	0,0141	0,2614	0,0002	0,2532	0,0941
8	0,0000	0,0000	0,0267	0,8840	0,0000	0,0462	0,0215	0,0829	0,0000	0,0141	0,3168	0,0004	0,1675	0,0980
9	0,0000	0,0000	0,0352	0,8706	0,0002	0,0445	0,0207	0,0001	0,0001	0,0314	0,4582	0,0020	0,1081	0,0610
10	0,0000	0,0000	0,0527	0,7356	0,0002	0,1604	0,0199	0,0031	0,0007	0,0353	0,5437	0,0022	0,0420	0,0815
11	0,0000	0,0000	0,0770	0,6821	0,0002	0,1852	0,0301	0,0000	0,0000	0,0368	0,5602	0,0022	0,0446	0,0487
12	0,0000	0,0000	0,1038	0,5755	0,0002	0,1835	0,0722	0,0000	0,0000	0,0208	0,5228	0,0022	0,0849	0,0732
13	0,0000	0,0000	0,0851	0,4594	0,0002	0,2645	0,0000	0,0000	0,0000	0,0115	0,4348	0,0019	0,1138	0,0000
14	0,0000	0,0000	0,0470	0,2370	0,0001	0,2241	0,0000	0,0000	0,0001	0,0035	0,2737	0,0007	0,1573	0,0000
15	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tablica 10. Tablični prikaz rezultata smatanja homopolipeptida od 13 aminokiselina na 77 °C pri čemu je aminokiselina 1 acetilna skupina stavljena na N-kraj homopolipeptida, a aminokiselina 15 je N-metil amidna skupina na C-kraju homopolipeptida. Vrijednosti u tablici označavaju koliko često se određeni aminokiselinski ostatak našao u konformaciji koja odgovara određenoj sekundarnoj strukturi koje su redom Para - paralelna β -ploča, Anti - antiparalelna β -ploča, 3-10 - zavojnica, Alpha - α -zavojnica, Pi - π -zavojnica, Turn - β -okret, Bend - okret. Dane vrijednosti su aritmetička sredina dobivena iz vrijednosti 6 simuliranih replika svakog modela.

Aminokiselina	Polinorvalin 350 K (77 °C)							Polialanin 350 K (77 °C)						
	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0000	0,0002	0,1324	0,0806	0,0038	0,2666	0,0000	0,0036	0,0066	0,0332	0,0729	0,0001	0,1200	0,0000
3	0,0000	0,0001	0,2224	0,1823	0,0062	0,4066	0,0000	0,0042	0,0073	0,0542	0,1098	0,0002	0,1956	0,0000
4	0,0000	0,002	0,2712	0,2369	0,0077	0,4061	0,0483	0,0016	0,0056	0,0799	0,1625	0,0002	0,2055	0,1816
5	0,0000	0,001	0,2146	0,2801	0,0099	0,3890	0,0621	0,0010	0,0062	0,0724	0,1990	0,0003	0,2033	0,1808
6	0,0001	0,0002	0,1895	0,2936	0,0117	0,3616	0,0739	0,0010	0,0078	0,0723	0,2172	0,0004	0,2053	0,1806
7	0,0000	0,0004	0,2069	0,2709	0,0098	0,4053	0,0550	0,0014	0,0044	0,667	0,2257	0,0004	0,2131	0,1797
8	0,0001	0,0005	0,2067	0,2598	0,0087	0,4200	0,0570	0,0013	0,0039	0,0719	0,2199	0,0003	0,2345	0,1746
9	0,0000	0,0006	0,1904	0,2800	0,0097	0,3769	0,0708	0,0007	0,0046	0,0711	0,2093	0,0003	0,2289	0,1811
10	0,0002	0,002	0,2185	0,2803	0,0095	0,3348	0,0758	0,0012	0,0075	0,0761	0,1889	0,0003	0,2200	0,1846
11	0,0001	0,002	0,2347	0,3108	0,0078	0,3556	0,0457	0,0012	0,0055	0,0784	0,1554	0,0002	0,2408	0,1882
12	0,0000	0,0004	0,2037	0,2744	0,0059	0,4317	0,0539	0,0040	0,0059	0,0774	0,1084	0,0002	0,2374	0,2022
13	0,0002	0,0005	0,1005	0,1982	0,0047	0,5299	0,0000	0,0029	0,0061	0,0532	0,0680	0,0002	0,2083	0,0000
14	0,0001	0,0003	0,0333	0,1050	0,0020	0,4056	0,0000	0,0023	0,0055	0,0267	0,0302	0,0001	0,1103	0,0000
15	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Aminokiselina	Polileucin 350 K (77 °C)							Poliizoleucin 350 K (77 °C)						
	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0000	0,0001	0,206	0,4096	0,0003	0,1359	0,0000	0,0223	0,0018	0,0624	0,1889	0,0003	0,1727	0,0000
3	0,0002	0,0000	0,320	0,6197	0,0004	0,1283	0,0000	0,0000	0,0000	0,0772	0,3727	0,0003	0,1757	0,0000
4	0,0000	0,0000	0,0380	0,7978	0,0006	0,0875	0,0222	0,0000	0,0000	0,0919	0,5365	0,0003	0,1510	0,0529
5	0,0000	0,0006	0,0260	0,8690	0,0006	0,0581	0,0175	0,0000	0,0014	0,0510	0,6106	0,0004	0,1287	0,0608
6	0,0000	0,0000	0,0175	0,9096	0,0007	0,0439	0,0085	0,0744	0,180	0,0387	0,6366	0,0004	0,0902	0,0373
7	0,0000	0,0000	0,0144	0,8651	0,0004	0,0986	0,0135	0,0000	0,0316	0,0304	0,6408	0,0003	0,1524	0,0450
8	0,0000	0,0000	0,0144	0,7759	0,0005	0,1672	0,0307	0,0002	0,0344	0,0264	0,6418	0,0005	0,1385	0,0531
9	0,0000	0,0000	0,0255	0,7226	0,0006	0,1797	0,0329	0,0248	0,0045	0,211	0,6256	0,0008	0,1565	0,0739
10	0,0000	0,0000	0,0537	0,7062	0,0007	0,1671	0,0276	0,0722	0,0001	0,0233	0,6667	0,0011	0,1050	0,0666
11	0,0000	0,0000	0,0819	0,5043	0,0006	0,3605	0,0256	0,0003	0,0004	0,0294	0,6416	0,0010	0,1489	0,0741
12	0,0000	0,0000	0,0927	0,3832	0,0006	0,4265	0,0504	0,0000	0,0292	0,0293	0,5576	0,0010	0,2038	0,0633
13	0,0000	0,0000	0,0647	0,3063	0,0005	0,2894	0,0000	0,0246	0,0320	0,0187	0,4734	0,0009	0,1980	0,0000
14	0,0002	0,0004	0,0302	0,1475	0,0002	0,1947	0,0000	0,0203	0,0292	0,0078	0,2719	0,0006	0,2277	0,0000
15	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000



Slika 22. Prikaz razvoja sekundarnih struktura homopolipeptida izgrađenog od izoleucina na 27 °C (lijevo) i 77 °C (desno) tijekom MD simulacije u trajanju od 1 μ s. Boje označavaju određene sekundarne strukture. Para- paralelna β -ploča, Anti- antiparalelna β -ploča, 3-10-zavojnica, Alpha- α -zavojnica, Pi- π -zavojnica, Turn- β -okret, Bend- okret.



Slika 23. Prikaz evolucije sekundarnih struktura tijekom smatanja homopolipeptida u 6 replika, pri čemu je svaka simulacija duga 1 μ s. Homopolipeptid je izgrađen od 13 leucina pri 27 °C. Praćenjem promjene sekundarnih struktura, uočava se da je nastala stabilna α -zavojnica (svijetlo zeleno) već u okviru prvih 200 ns koja ostaje stabilna do kraja simulacija. Paraparalelna β -ploča, Anti- antiparalelna β -ploča, 3-10- zavojnica, Alpha- α -zavojnica, Pi- π -zavojnica, Turn- β -okret, Bend- okret.

Tablica 11. Pregled rezultata MD simulacija antiparalelne β -ploče divljeg tipa (PDB ID 1B03) i njezinih inačica tijekom simulacija dugih 1 μ s, pri 27 °C. Maksimalan broj simulacija za svaku varijantu je 6.

	Broj simulacija u kojima se pojavljuje određena sekundarna struktura			
	antiparalelna β -ploča	α -zavojnica	3_{10} zavojnica	narušena struktura
betaWT	6			
betaALA	2	3	1	
betaNVA	5		1	
betaVAL	6			
betaLEU	5			1

Tablica 12. Pregled rezultata MD simulacija antiparalelne β -ploče divljeg tipa (PDB ID 1B03) i njezinih inačica tijekom simulacija dugih 1 μ s, pri 77 °C. Maksimalan broj simulacija za svaku varijantu je 6.

	Broj simulacija u kojima se pojavljuje određena sekundarna struktura			
	antiparalelna β -ploča	α -zavojnica	3_{10} zavojnica	narušena struktura
betaWT	3	3		
betaALA		5		1
betaNVA		6		
betaVAL	3	2		
betaLEU		6		

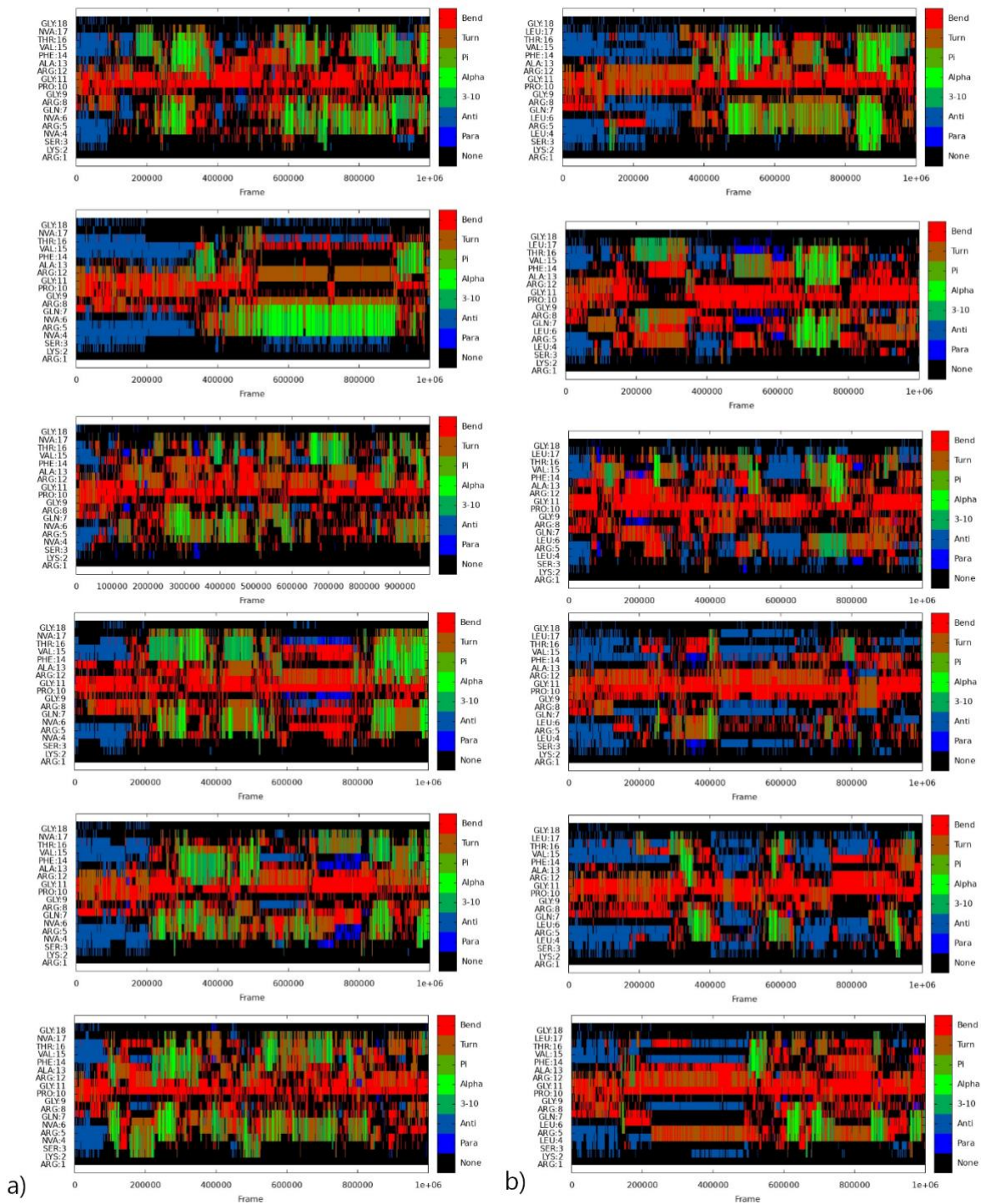
Na temelju danih rezultata vidi se da norvalin na povišenoj temperaturi (77 °C) stabilizira α -zavojnicu bolje od alanina. I prilikom usporedbe zavojnice polialanina s polinorvalinom te kad se uspoređuje betaALA s betaNVA je primijećen ovaj efekt što znači da na višoj temperaturi, ukoliko se norvalin nalazi u kontekstu α -zavojnice dolazi do stabilizacije α -zavojnice. S druge strane, na sobnoj temperaturi, alanin više destabilizira β -ploču od norvalina (ima veću sklonost prema α -zavojnici na sobnoj temperaturi), dok na višoj temperaturi ne doprinosi stabilizaciji α -zavojnice, za razliku od norvalina koji na 77 °C stabilizira α -zavojnicu. Na 27 °C najvećoj destabilizaciji β -ploče doprinosi alanin u usporedbi s odabranim aminokiselinama. Uvođenjem alanina na izoleucinske pozicije se događa najveće narušavanje sekundarne strukture β -ploče i dolazi do pojavljivanja α -zavojnice. Struktura betaALA je jedini slučaj na 27 °C da se pojavljuje α -zavojnica što potvrđuje najveću sklonost alanina prema α -zavojnici kao što je vidljivo u literaturi (Costantini et al., 2006).

Izoleucin na višoj temperaturi (77 °C) isto doprinosi stabilizaciji strukture α -zavojnice što se vidi iz simulacija β -ploče divljeg tipa (3 izoleucina, struktura betaWT) i homopolipeptida

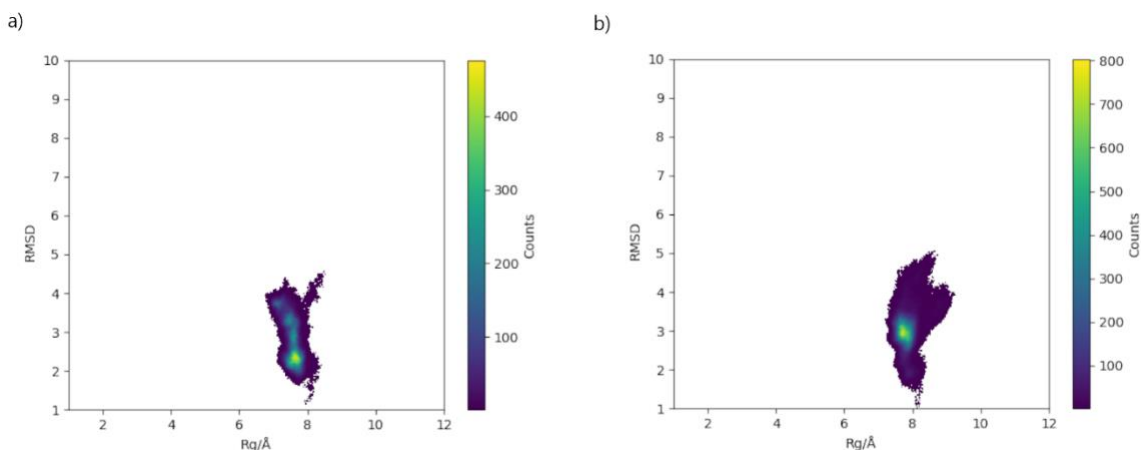
izgrađenog od 13 izoleucina gdje je stabilnija α -zavojnica na 77 °C nego na 27 °C (Slika 22.). Doprinos izoleucina stabilizaciji α -zavojnice je ipak manji nego norvalina, jer od 6 replika na 77 °C u peptidu divljeg tipa betaWT, 3 su s α -zavojnicom, a kod betaNVA na 77 °C je svih 6 replika dalo α -zavojnicu.

Iz navedenih rezultata dalje vidimo da na sobnoj temperaturi stabilizaciji β -ploče najviše doprinosi valin, dok na višoj temperaturi valin nema veliki učinak na stabilizaciju β -ploče. Na 27 °C valin doprinosi stabilizaciji strukture β -ploče koja je u potpunosti očuvana, ali i stabilnija tijekom MD simulacija dugih 1 μ s u usporedbi s divljim tipom peptida. Na 77 °C u simulacijama s valinom se također pojavljuju α -zavojnice, iako se smatra da valin primarno ima sklonost stvaranju struktura β -ploče (Costantini et al., 2006), očigledno na povišenoj temperaturi i on pokazuje sklonost prema strukturi α -zavojnice.

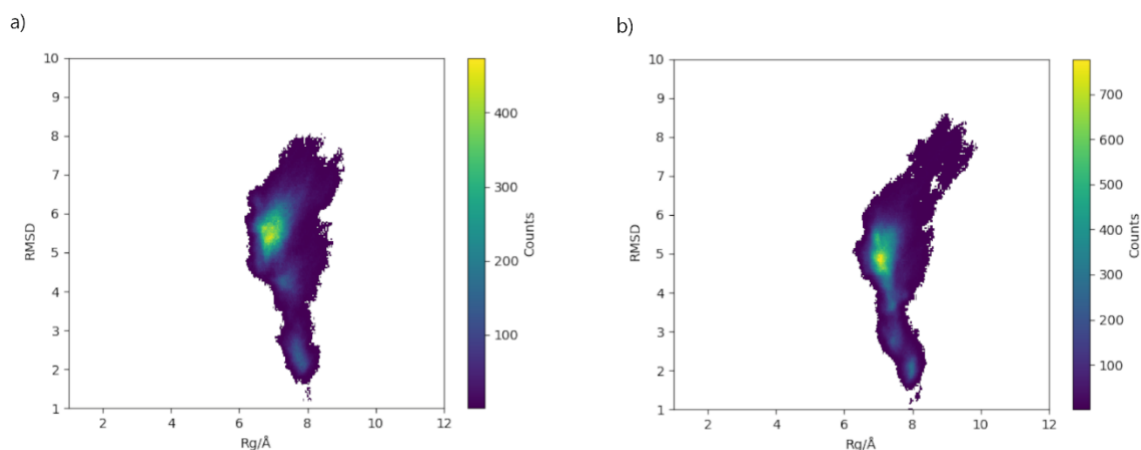
Na 27 °C leucin i norvalin u β -ploči se ponašaju jako slično, ni u jednom slučaju ne dolazi do stvaranja α -zavojnice, a antiparalelna β -ploča je dijelom narušena s bendovima i okretima. Na 77 °C norvalin bolje stabilizira α -zavojnicu od leucina na istoj toj temperaturi (Slika 24, Tablica 10.), ta α -zavojnica zahvaća upravo one aminokiseline koje su u divljem tipu peptida bile u strukturi antiparalelne β -ploče. Primjećuje se i pojavljivanje 3_{10} zavojnice u oba slučaja, malo izraženije u β -ploči s norvalinom. Gledajući grafove ovisnosti RMSD vrijednosti o R_g vidljivo je kako pri nižoj temperaturi (Slika 25.) obje inačice β -ploče imaju malu RMSD vrijednost u odnosu na referentnu strukturu β -ploče divljeg tipa preuzete iz baze podataka PDB (PDB ID 1B03) što znači da su poprilično dobro zadržale nativnu konformaciju antiparalelne β -ploče. Pri višoj temperaturi inačica s norvalinom ima veći RMSD što znači da više odstupa od nativne konformacije antiparalelne β -ploče, odnosno da je norvalin na 77 °C uveo veću destabilizaciju u β -ploči u odnosu na leucin u okviru strukture betaLEU. (Slika 26.).



Slika 24. Prikaz evolucije sekundarnih struktura tijekom μ s smatanja pri 77 °C a) inačice β -ploče s norvalinom i b) inačice β -ploče s leucinom. Iz grafičkih prikaza je vidljivo da je veći udio α -zavojnice (svijetlo zeleno) kod verzije s norvalinom. Para- paralelna β -ploča, Anti- antiparalelna β -ploča, 3-10- zavojnica, Alpha- α -zavojnica, Pi- π -zavojnica, Turn- β -okret, Bend- okret.



Slika 25. Grafički prikaz ovisnosti RMSD vrijednosti o R_g u odnosu na referentnu strukturu antiparalelne β -ploče divljeg tipa (PDB ID 1B03) pri 27 °C a) inačica s norvalinom, betaNVA b) inačica s leucinom, betaLEU.



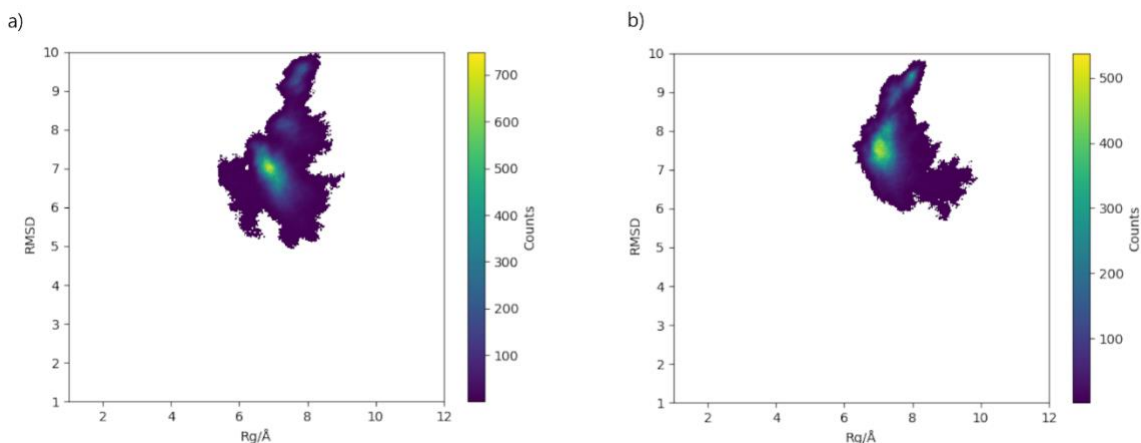
Slika 26. Grafički prikaz ovisnosti RMSD vrijednosti o R_g u odnosu na referentnu strukturu antiparalelne β -ploče divljeg tipa (PDB ID 1B03) pri 77 °C a) inačica s norvalinom, betaNVA b) inačica s leucinom, betaLEU.

Iz Tablice 13. za betaNVA i za betaLEU na 77 °C se vidi da od svih inačica oni daju u najvećem udjelu α -zavojnici. Pošto su brojevi vrlo slični, iako su za norvalin udjeli malo veći, kao što su i RMSD vrijednosti (Slika 26.) kao dodatnu potvrdu sklonosti norvalina prema α -zavojnici napravljeni su grafički prikazi ovisnosti RMSD vrijednosti o R_g u odnosu na referentnu strukturu prirodne α -zavojnice iz baze podataka PDB. Referentna struktura je α -zavojnica od 18 aminokiselina (PDB ID 1ALE) te su se u odnosu na nju računale RMSD i R_g vrijednosti betaLEU i betaNVA na 77 °C kako bi se provjerilo koja od navedenih aminokiselina, jednom kad je uvedena u strukturu β -ploče, doprinosi više destabilizaciji takve strukture i njenoj promjeni u α -zavojnici. U ovom slučaju, što je veća sličnost s referentnom strukturom α -

zavojnice, to je manja RMSD vrijednost i dokaz je da je određena aminokiselina znatno doprinijela destabilizaciji β -ploče i njenoj promjeni u α -zavojnicu.

Tablica 13. Tablični prikaz rezultata smatanja inačica β -ploče na 77 °C (350 K). betaNVA- inačica s norvalinom, betaALA-inačica s alaninom, betaLEU-inačica s leucinom, betaVAL-inačica s valinom. Residue označava broj aminokiselinskog ostatka. Brojevi označavaju koliko često se određeni aminokiselinski ostatak našao u konformaciji koja odgovara određenoj sekundarnoj strukturi. Para- paralelna β -ploča, Anti- antiparalelna β -ploča, 3-10- zavojnica, Alpha- α -zavojnica, Pi- π -zavojnica, Turn- β -okret, Bend- okret.

Aminokiselina	betaNVA 350 K (77 °C)							betaALA 350 K (77 °C)						
	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend	Para	Anti	3-10	Alpha	Pi	Turn	Bend
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0031	0,0678	0,0089	0,0034	0,0000	0,0204	0,0000	0,0191	0,0636	0,0068	0,0017	0,0000	0,0340	0,0000
3	0,0090	0,1581	0,0181	0,0063	0,0000	0,0288	0,0537	0,0086	0,0810	0,0101	0,0031	0,0000	0,0486	0,1356
4	0,0091	0,1533	0,0975	0,1148	0,0001	0,1505	0,1368	0,0010	0,1365	0,0405	0,0498	0,0000	0,1228	0,2327
5	0,0089	0,1560	0,1067	0,1304	0,0001	0,2272	0,1517	0,0087	0,2156	0,0485	0,0654	0,0000	0,1831	0,1937
6	0,0004	0,0560	0,1182	0,1281	0,0001	0,2419	0,1312	0,0116	0,1705	0,0554	0,0642	0,0000	0,1586	0,1339
7	0,0021	0,0458	0,0459	0,1255	0,0001	0,1990	0,2986	0,0021	0,0820	0,0317	0,0630	0,0000	0,1123	0,2665
8	0,0060	0,0836	0,0276	0,0309	0,0004	0,2041	0,2375	0,0064	0,0956	0,0151	0,0371	0,0002	0,0941	0,2817
9	0,0244	0,0015	0,0000	0,0001	0,0004	0,0752	0,2617	0,0102	0,0144	0,0000	0,0001	0,0003	0,0767	0,3620
10	0,0000	0,0002	0,0000	0,0001	0,0004	0,0755	0,7361	0,0000	0,002	0,0000	0,0001	0,0003	0,0779	0,8256
11	0,0060	0,0055	0,0451	0,0138	0,0004	0,2828	0,5130	0,0017	0,0144	0,0143	0,0047	0,0003	0,1748	0,6398
12	0,0003	0,0243	0,0699	0,0381	0,0004	0,3574	0,2819	0,0139	0,0208	0,0292	0,0172	0,0003	0,2449	0,3135
13	0,0158	0,0472	0,0914	0,0603	0,0000	0,1741	0,1963	0,0121	0,0386	0,0403	0,0242	0,0001	0,1848	0,2641
14	0,0135	0,2024	0,1501	0,0838	0,0000	0,1416	0,1292	0,0052	0,2409	0,0377	0,0249	0,0001	0,1815	0,2007
15	0,0094	0,1854	0,1366	0,0751	0,0000	0,1786	0,1716	0,0175	0,2273	0,0321	0,0222	0,0001	0,1396	0,1808
16	0,0166	0,1884	0,1155	0,0527	0,0000	0,1583	0,1213	0,0085	0,2089	0,0215	0,0105	0,0000	0,0983	0,2158
17	0,0014	0,0228	0,0484	0,0278	0,0000	0,1900	0,0000	0,0089	0,0866	0,0116	0,0020	0,0000	0,0445	0,0000
18	0,0023	0,0624	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0191	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	betaLEU 350 K (77 °C)							betaVAL 350 K (77 °C)						
1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0044	0,1188	0,0059	0,0058	0,0000	0,0163	0,0000	0,0015	0,1997	0,0021	0,0039	0,0000	0,0152	0,0000
3	0,0153	0,2287	0,0084	0,0083	0,0000	0,0197	0,0799	0,0058	0,3751	0,0030	0,0050	0,000	0,0171	0,0886
4	0,0024	0,2179	0,0491	0,0532	0,0000	0,1388	0,1831	0,0023	0,4769	0,0171	0,0293	0,000	0,0628	0,1137
5	0,0081	0,2247	0,0541	0,0580	0,0000	0,2131	0,1962	0,0001	0,5643	0,0218	0,0330	0,0000	0,0815	0,1317
6	0,0023	0,1154	0,0592	0,0569	0,0000	0,1552	0,1606	0,0003	0,3624	0,0268	0,0324	0,0000	0,0720	0,0670
7	0,0155	0,1337	0,0234	0,0548	0,0000	0,1498	0,2523	0,0004	0,2686	0,0146	0,0318	0,000	0,1579	0,2207
8	0,0175	0,1106	0,0099	0,0132	0,0003	0,1387	0,2288	0,0011	0,0773	0,0069	0,0119	0,0005	0,1506	0,2317
9	0,0070	0,0028	0,0000	0,0000	0,0003	0,1177	0,8072	0,0023	0,0160	0,0000	0,0008	0,0005	0,1654	0,3735
10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,1177	0,8072	0,000	0,0006	0,0000	0,0008	0,0005	0,1660	0,7415
11	0,0018	0,0072	0,0115	0,0105	0,0003	0,2405	0,5949	0,0009	0,0314	0,0152	0,0053	0,0005	0,2845	0,5241
12	0,0044	0,0288	0,0214	0,0296	0,0003	0,2562	0,3223	0,0018	0,0934	0,0319	0,0129	0,0009	0,2948	0,2747
13	0,0046	0,0657	0,0422	0,0416	0,0000	0,1214	0,2367	0,0003	0,158	0,0394	0,0166	0,0005	0,0751	0,1164
14	0,0173	0,3087	0,0608	0,0445	0,0000	0,1238	0,1966	0,0024	0,5788	0,0416	0,0174	0,0006	0,0737	0,0769
15	0,0128	0,2731	0,0820	0,0398	0,0000	0,1253	0,1422	0,0047	0,5774	0,0214	0,0140	0,0005	0,0871	0,0930
16	0,0237	0,2821	0,0624	0,0256	0,0000	0,1095	0,1713	0,0034	0,5654	0,0124	0,0067	0,0004	0,0485	0,1317
17	0,0056	0,1506	0,0381	0,0061	0,0000	0,0640	0,0000	0,0034	0,2851	0,0024	0,0011	0,0000	0,0245	0,0000
18	0,0016	0,0291	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000



Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti RMSD vrijednosti o R_g izračunatih u odnosu na referentnu strukturu α -zavojnice od 18 aminokiselina (PDB ID 1ALE) pri 77 °C a) inačica s norvalinom, betaNVA b) inačica s leucinom, betaLEU.

Na Slici 27. se vidi da norvalin istražuje veći konformacijski prostor od leucina, što se može pripisati povećanoj slobodi rotacije linearnog bočnog ogranka norvalina od razgranatog bočnog ogranka leucina (Weber & Miller, 1981). Smatra se da je možda ta povećana rotacijska sloboda jedan od razloga zbog čega je norvalin izbačen iz proteinogenog seta aminokiselina pošto bi onda na taj način doprinio destabilizaciji cijelog proteoma. Iz grafova ovisnosti vrijednosti RMSD o R_g (Slika 27.) se vidi da je norvalin uveden u β -ploču razrušio tu sekundarnu strukturu i promijenio je dijelom u α -zavojnicu pošto je veća gustoća struktura pri manjoj RMSD vrijednosti kod inačice s norvalinom, u odnosu na inačicu s leucinom što označava da je ta struktura sličnija referentnoj, odnosno α -zavojnici iz PDB-a. Kod inačice β -ploče s leucinom također je primijećen efekt razrušavanja native antiparalelne β -ploče i nastanka α -zavojnice, ali usporedbom s referentnom strukturom zavojnice od 18 aminokiselina iz PDB-a (Slika 27), on je ipak manji nego kod inačice s norvalinom.

6. ZAKLJUČAK

Primjenom polja sila ff14SB ispitana je sklonost neproteinogene aminokiseline norvaln za određenu sekundarnu strukturu. Smatanjem homopolipeptida izgrađenog od 13 norvalina na temperaturama od 27 °C i 77 °C vidljivo je kako on tvori α -zavojnici, ali ta zavojnica nije jako stabilna i najčešće ne traje dugo te ne obuhvaća nikad svih 13 aminokiselina kao što je slučaj s polialaninom i polileucinom koji se na nanosekundnoj skali smotaju u postojanu α -zavojnici.

Daljnijim ispitivanjem svojstava norvalina, istraženo je njegovo ponašanje u realnom proteinskom okruženju tako što je *in silico* ugrađen u antiparalelnu β -ploču na izoleucinske pozicije. Do sada je pokazano kako norvalin ima sklonost prema α -zavojnici, no pri sobnoj temperaturi ta sklonost je najveća kod alanina pošto je *in silico* ugradnjom alanina na izoleucinske pozicije u antiparalelnoj β -ploči došlo do najvećeg razrušavanja strukture i formiranja α -zavojnice. Rezultati na višoj temperaturi ukazuju kako je sklonost norvalina prema α -zavojnici najveća u odnosu na odabrane testne proteinogene aminokiseline (alanin, valin, leucin i izoleucin). Pri 77 °C norvalin je uveo značajnu destabilizaciju u antiparalelnu β -ploču i doprinio nastanku α -zavojnice.

Provjera sličnosti struktura nastalih uvođenjem norvalina u β -ploču s referentnom α -zavojnicom dala je najmanju RMSD vrijednost, a time i najveću sličnost u odnosu na sve ostale inačice antiparalelne β -ploče. Time je još dodatno potvrđeno kako na višoj temperaturi norvalin najbolje stabilizira α -zavojnici.

Ovi rezultati su posebno značajni u svjetlu razumijevanja osobina norvalina i njegovog utjecaja na stabilnost strukture te njegovoj eventualnoj upotrebi u industrijske svrhe. S obzirom na to da postoje dva načina uvođenja neproteinogenih aminokiselina u strukturu proteina, ovi rezultati pokazuju kako nasumično, statističko uvođenje norvalina u proteine može destabilizirati proteom pri višim temperaturama, zbog toga što se ne može utjecati na poziciju uvođenja norvalina u okviru statističke ugradnje. Stoga, ugradnja norvalina u strukture proteina treba biti mjesno specifična ukoliko se želi postići efekt stabilizacije proteina pri višim temperaturama.

7. POPIS LITERATURE

- 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., Kummeler, 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). Biosynthesis and incorporation into protein of norleucine by *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 531–539.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2642478>

- 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>
- 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., Elsilá, 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>
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., & Kollman, P. A. (1996). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179–5197. *Journal of the American Chemical Society*, 118(9), 2309–2309. <https://doi.org/10.1021/ja955032e>
- Costantini, S., Colonna, G., & Facchiano, A. M. (2006). Amino acid propensities for secondary structures are influenced by the protein structural class. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 441–451.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.159>
- 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>
- Eisenberg, D. (2003). The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 100, Issue 20, pp. 11207–11210). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034522100>
- 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>
- Galzitskaya, O., Higo, J., & Finkelstein, A. (2005). α -Helix and β -Hairpin Folding from Experiment, Analytical Theory and Molecular Dynamics Simulations. *Current Protein & Peptide Science*, 3(2), 191–200. <https://doi.org/10.2174/1389203024605340>
- 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>

- 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>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- 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>
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>

- 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>
- 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>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Ogihara, N. L., Weiss, M. S., Eisenberg, D., & Degrado, 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>
- PAULING, L., & COREY, R. B. (1951). The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *37*(5), 251–256. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.5.251>
- PAULING, L., COREY, R. B., & BRANSON, H. R. (1951). The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *37*(4), 205–211. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.4.205>
- 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>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- 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>
- 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>
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3), 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
- Shapovalov, M. V., & Dunbrack, R. L. (2011). A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*, 19(6), 844–858. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>
- 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/ja028604l>
- 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., & Stoynova, 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>

- 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., & Jiráček, 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>
- Weber, A. L., & Miller, S. L. (1981). Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *Journal of Molecular Evolution*, *17*(5), 273–284. <https://doi.org/10.1007/BF01795749>
- Williams, S., Causgrove, T. P., Gilmanishin, R., Fang, K. S., Callender, R. H., Woodruff, W. H., & Dyer, R. B. (1996). Fast events in protein folding: Helix melting and formation in a small peptide. *Biochemistry*, *35*(3), 691–697. <https://doi.org/10.1021/bi952217p>
- 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>

8. SAŽETAK

Norvalin je neproteinogena aminokiselina koja može nastati u određenim situacijama u stanici i zatim biti pogrešno ugrađena u proteine. Iako se norvalin sve više koristi prilikom istraživanja proteina, raznih kemijsko-fizikalnih fenomena i modelnih sustava, njegova svojstva i dalje nisu dovoljno istražena. U dosadašnjoj literaturi stoji kako norvalin ima sklonost prema sekundarnoj strukturi α -zavojnice te se u ovom radu korištenjem računalnog pristupa ispitala ta tvrdnja. Simulacijama molekulske dinamike (MD simulacije) na dvije temperature ispitana je sklonost norvalina za sekundarnu strukturu. Prvi set provedenih simulacija ispitivao je smatanje linearnog homopolipeptida izgrađenog od 13 aminokiselinskih ostataka norvalina. Kako bi se usporedile zavojnice nastale MD simulacijama za referentnu strukturu je uzeta polialaninska α -zavojnica izgrađena od jednakog broja aminokiselinskih ostataka. Pokazano je da se ova neproteinogena aminokiselina preferabilno pronalazi u α -zavojnici. Kao dodatna potvrda sklonosti prema toj sekundarnoj strukturi, proveden je drugi set simulacija pri čemu je norvalin stavljen u realni proteinski kontekst, *in silico* ugradnjom u peptidnu strukturu antiparalelne β -ploče iz proteinske baze podataka (PDB). Cilj istraživanja ovih modificiranih peptida je bio vidjeti kako norvalin utječe na smatanje, mijenja li nativnu sekundarnu strukturu i uzrokuje li nastanak α -zavojnice. Stabilnost modificiranih inačica peptida je praćena mjerenjem radijusa giracije i RMSD vrijednosti s divljim tipom peptida kao referentnom strukturom. Rezultati ovih simulacija ne samo da su potvrdili sklonost norvalina prema α -zavojnici nego su također pokazali da je ta sklonost pri visokoj temperaturi (77 °C) najveća u usporedbi s modifikacijama peptida s odabranim proteinogenim aminokiselinama. Zbog svoje sve veće uporabe, ne samo u znanstvenim istraživanjima, već i u industriji, ponajprije farmaceutskoj, ovi rezultati bi mogli znatno doprinijeti praktičnoj primjeni norvalina.

Ključne riječi: norvalin, sekundarna struktura, α -zavojnica, MD simulacije

9. SUMMARY

Norvaline is non-proteinogenic amino acid that can be formed in cell under special circumstances and then be mistranslated in proteins. Even though norvaline is often used in experiments examining proteins and their structure-function relationship, different kinds of physicochemical phenomena, properties of norvaline are still not investigated enough. Previous experimental results suggest that norvaline is preferentially found in α -helices and the aim of this research was to investigate those claims by simulating the folding of polynorvaline. First set of conducted simulations examined folding of linear homopolyptide made from 13 norvaline residues. To compare the helices obtained by MD simulations, polyalanine α -helix with the same number of residues was used as a referent structure. It was shown that this non-proteinogenic amino acid is preferentially found in α -helices. As an additional confirmation of these claims, another set of simulations was conducted. These simulations were based on mutant variants of a model peptide from Protein Data Bank (PDB) natively folded in antiparallel β -sheet. Point mutations were introduced *in silico* by replacing three isoleucine residues with parameterized norvaline residues. Objective of investigating those altered peptides by MD simulations was to see how does norvaline affect the folding, does it change native secondary structure and does it induce α -helix when put in context of antiparallel β -sheet on two different temperatures. Stability of modified peptides was examined by measuring radius of gyration and RMSD values with wild type peptide as a referent structure. Results of these simulations not only confirm the propensity of norvaline for α -helix secondary structure, but also show that this propensity is the highest among other peptide modifications with proteinogenic amino acids. Due to its increasing use, not only in scientific experiments but also in industry, these results could significantly contribute to practical use of norvaline.

Key words: norvaline, secondary structure, α -helix, MD simulations