

Spektroskopske metode (IR, NMR I CD) u konformacijskoj analizi ferocenskih peptida

Hasl, Karolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:814092>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Karolina Hasl

7489/PT

**SPEKTROSKOPSKE METODE (IR, NMR I CD) U
KONFORMACIJSKOJ ANALIZI
FEROCENSKIH PEPTIDA**

Završni rad

Predmet: Organska kemija

Mentor: Prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

SPEKTROSKOPSKE METODE (IR, NMR I CD) U KONFORMACIJSKOJ ANALIZI FEROCENSKIH PEPTIDA

Karolina Hasl, 0058211788

Sažetak: Najveća zapreka za korištenje biološki aktivnih peptida u terapijske svrhe je njihova konformacijska fleksibilnost koja može izazvati nuspojave uslijed vezanja na neželjene receptore. Kako bi se uz spomenuto prevladala i ostala ograničenja za terapijsku primjenu peptida, dizajnirani su peptidomimetici. Ferocenski peptidomimetici građeni su iz ferocenskog kalupa na koji su vezane aminokiselinske sekvence, a svrha kalupa je indukcija elemenata sekundarne strukture i "zaključavanje" peptida u biološki aktivnoj konformaciji. U ovom radu opisana je konformacijska analiza homokiralnog tetrapeptida Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**1**) i njegovog dijastereomera, heterokiralnog peptida Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc (**2**). Kao kalup, na kojeg su vezani Pro-Ala peptidi koji se međusobno razlikuju u kiralnosti alaninskog ostatka, upotrijebljen je ferocen-1,1'-diamin (Fcda). Strukturna analiza tih peptidomimetika provedena je mjerenjem IR-spektara (ovisno o koncentraciji), te NMR-spektara (ovisno o koncentraciji, temperaturi i otapalu) i CD-spektara. Cilj ovog rada jest prikazati upotrebu spektroskopskih metoda u konformacijskoj analizi ferocenskih peptida te ukazati na utjecaj kiralnosti peptidne okosnice na njihova konformacijska svojstva.

Ključne riječi: ferocenski peptidi, intramolekulske vodikove veze, konformacijska analiza, spektroskopske metode

Rad sadrži: 25 stranica, 14 slika, 3 tablice, 23 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i digitalnom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Lidija Barišić

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 1. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

SPECTROSCOPIC METHODS (IR, NMR AND CD) IN CONFORMATIONAL ANALYSIS OF FERROCENE PEPTIDES

Karolina Hasl, 0058211788

Summary: The greatest obstacle for clinical usage of peptides is their conformational flexibility capable to cause side effects due to the binding to undesired receptors. To overcome all the limitations for the therapeutic application of peptides, peptidomimetics have been designed. Ferrocene peptidomimetic are composed of a ferrocene scaffold equipped with peptide strands, aimed to induce secondary structure elements and to lock peptide in biologically active conformation. Herein, a conformational analysis of the homochiral tetrapeptide Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**1**) and its diastereomeric heterochiral peptide Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc (**2**) is described. Ferrocene-1,1'-diamine (Fcda) was used as the scaffold for attachment of Pro-Ala sequences which differ in the chirality of alanine unit. Structural analysis of these peptidomimetics was performed by measuring of IR (concentration-dependent), NMR (concentration-, temperature- and solvent-dependent) and CD spectra. The goal of this work is to present the application of the spectroscopic methods in the conformational analysis of ferrocene peptides and to point out the impact of the peptide backbone chirality on its conformational properties.

Keywords: ferrocene peptides, intramolecular hydrogen bonds, conformational analysis, spectroscopic methods

Paper contains: 25 pages, 14 figures, 3 tables, 23 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph. D. Lidija Barišić, Full Professor

Tehnickal support and assistance: Ph. D. Monika Kovačević, Assistant Professor

Defence date: September 1, 2020.

Najtoplije se zahvaljujem dragoj mentorici, prof. dr. sc. Lidiji Barišić, na predloženoj temi, susretljivosti, potpori i prenesenom znanju.

Veliko hvala doc. dr. sc. Moniki Kovačević na pomoći prilikom izrade ovog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Peptidni mimetici	2
2.2. Ferocenski peptidi	3
2.2.1. Ferocen	3
2.2.2. Ferocenski biokonjugati sa aminokiselinama	4
2.3. Spektroskopske metode	6
2.3.1. IR-spektroskopija	6
2.3.2. NMR-spektroskopija	7
2.3.3. CD-spektroskopija	9
2.4. Konformacijska analiza homo- i heterokiralnih ferocenskih tetrapeptida 1 i 2	9
2.4.1. IR-spektroskopska analiza tetrapeptida 1 i 2	10
2.4.1.1. Koncentracijski ovisni IR-spektri tetrapeptida 1 i 2	11
2.4.2. NMR-spektroskopska analiza tetrapeptida 1 i 2	12
2.4.2.1. Koncentracijski-ovisna NMR-analiza tetrapeptida 1 i 2	13
2.4.2.2. Temperaturno-ovisni NMR-spektri tetrapeptida 1 i 2	14
2.4.2.3. Temperaturni koeficijenti ($\Delta\delta/\Delta T$) tetrapeptida 1 i 2	15
2.4.2.4. Titracija tetrapeptida s DMSO	16
2.4.2.5. NOESY NMR	18
2.4.3. CD-spektroskopska analiza tetrapeptida 1 i 2	21
3. ZAKLJUČAK	23
4. LITERATURA	24

1. UVOD

Proteini su najrasprostranjenije biološke makromolekule. Nalaze se u svim stanicama te posreduju u gotovo svakom procesu koji se odvija u stanici, pokazujući time gotovo beskonačnu raznolikost funkcija. Enzimska kataliza, stvaranje i provođenje živčanih impulsa, mehanička čvrstoća, imunološki odgovor, stanično prepoznavanje, kontrola rasta i diferencijacija su samo neki od bioloških procesa u kojima sudjeluju proteini.¹ Ovakvu široku lepezu funkcija peptida omogućava njegova strukturna raznolikost, dobro definirane trodimenzijske strukture te sudjelovanje u interakciji s receptorima (protein-protein interakcije) uspostavljanjem vodikovih ili van der Waalsovih veza.² Na prvi pogled, proteini pokazuju izrazit terapijski potencijal. Međutim, njihovu primjenu u terapijske svrhe sprječava njihova velika fleksibilnost, slaba metabolička stabilnost i slaba apsorpcija nakon oralne konzumacije.³ Kako bi se prevladala njihova nepovoljna farmakološka i biofarmaceutska svojstva te omogućila njihova klinička primjena, sintetizirani su peptidomimetici. Peptidomimetici su male peptidne ili nepeptidne molekule koje oponašaju elemente peptidne sekundarne strukture odgovorne za molekulsko prepoznavanje, a samim time i za biološku aktivnost. Pri tom kao ligandi oponašaju ili blokiraju biološki učinak peptidnog receptora i zadržavaju sposobnost interakcije s biološki ciljanim sustavima. U odnosu na peptide, njihovi mimetici pokazuju veću metaboličku stabilnost, bolju bioraspodivnost, veću selektivnost i minimalne nuspojave. Jedan od najčešćih načina pripreme peptidomimetika je uvođenje rigidnih kalupa čija je uloga "zaključavanja" peptidne konformacije i tvorba elemenata sekundarne strukture kako bi se ograničila njegova konformacijska fleksibilnost. Zadnjih 20-ak godina za pripravu konformacijski spregnutih peptida koriste se 1,1-disupstituirani ferocenski kalupi koji imaju svojstvo induciranja vodikovih veza između peptidnih niti koje su na njih vezane. Tako sintetizirani biokonjugati nazivaju se ferocenski peptidi. U sklopu ovog rada prikazat će se upotreba standardnih spektroskopskih metoda IR-, NMR- (ovisnim o koncentraciji, temperaturi i otapalu) i CD-spektroskopije u konformacijskoj analizi ferocenskih peptida na primjeru homokiralnog tetrapeptida Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**1**) i njegovog dijastereomera, heterokiralnog tetrapeptida Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc (**2**). Kako se analizirani tetrapeptidi međusobno razlikuju u kiralnosti Ala-Pro peptida vezanog na ferocen-1,1'-diamin kao kalup, istražiti će se i utjecaj strukture i kiralnosti peptidne okosnice na konformacijsko uređenje biokonjugata zasnovano na uspostavljenim intramolekulskim vodikovim vezama između podandnih peptidnih lanaca.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Peptidni mimetici

Peptidi se intenzivno istražuju zbog svojih biokompatibilnih i bioaktivnih svojstava, te velike biološke i strukturne raznolikosti što ih čini potencijalno dobrim terapeutima.⁴ Visoki afinitet vezivanja, veća specifičnost i manja toksičnost čine peptide potencijalno potentnijim molekulama za proizvodnju lijekova u odnosu na druge male molekule.

Ipak, unatoč spomenutim prednostima, peptidi imaju i nekoliko ograničenja koja ih čine nepogodnima za terapijsku primjenu. Naime, pokazuju nisku metaboličku stabilnost prema proteolitičkim enzimima u gastrointestinalnom traktu i serumu uslijed čega dolazi do njihove razgradnje. Nakon oralne konzumacije slabo se apsorbiraju zbog relativno velike molekulske mase, manjka specifičnih membranskih prenosioca i kratkog vremena zadržavanja u organizmu. Također, polarni karakter peptida otežava njihov transport kroz hidrofobne stanične membrane. Osim toga, moguće su neželjene nuspojave uzrokovane konformacijskom fleksibilnošću proteina i peptida. Biološko djelovanje proteina (peptida) posljedica je molekuskog prepoznavanja sa specifičnim receptorom do kojeg može doći samo ukoliko su kompatibilne njihove trodimenzijske strukture te polarnost.⁵ Na zauzimanje bioaktivne konformacije proteina znatnu ulogu ima okruženje u kojemu se nalazi.⁶ Primjerice, ovisno o otapalu može se nabrati u konformaciju različitu od native te uspostaviti interakcije s neželjenim receptorima što rezultira nuspojavama.⁷

U cilju poboljšanja nepovoljnih farmakoloških svojstva peptida i omogućavanja njihove kliničke primjene, dizajniraju se i sintetiziraju peptidomimetici, spojevi koji oponašaju prirodne peptide u njihovoj interakciji s receptorima, a koji se najčešće definiraju na sljedeće načine:

(1) Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora tako što oponaša trodimenzijsku strukturu prirodnog proteina i zadržava sposobnost interakcije s biološki ciljanim sustavima.

(2) Peptidomimeticici su spojevi koji neovisno o svojoj kemijskoj strukturi imitiraju strukturu i/ili biološku aktivnost peptida.

U usporedbi s nativnim peptidima, peptidomimetici pokazuju veću metaboličku stabilnost, bolju bioraspodivnost, veću selektivnost i minimalne nuspojave.⁸ Postoji više načina pripreme peptidomimetika: sustavna zamjena pojedinih aminokiselina s neprirodnim aminokiselinama i njihovim mimeticima, zamjena redosljeda pojedinih aminokiselina,

ciklizacija i uvođenje dvostrukih veza s ciljem ograničavanja konformacijske slobode, modifikacija okosnice peptida, zamjena određenih L-aminokiselina s D-aminokiselinama, sinteza peptida s *cis*-konfiguracijom peptidne veze itd.⁹ Cilj navedenih metoda je stvaranje malih molekula koje oponašaju visoko uređene elemente sekundarne strukture (α -uzvojnica, β - i γ -okreta, β -nabrane ploče).

Do sada općenito primjenjiva i uspješna metoda za kreiranje peptidomimetika uključuje stvaranje konformacijski ograničenih analoga koji imitiraju konformaciju endogenih liganda. Cilj ovakvog pristupa je ograničavanje konformacijske fleksibilnosti peptida što rezultira povećanim afinitetom i selektivnošću za željeni tip receptora, a time se izbjegava međudjelovanje s neželjenim receptorima. Ograničavanje fleksibilnosti peptida može se postići uvođenjem malih strukturnih ograničenja koja će ga "zaključati" u biološki aktivnoj konformaciji. Najvažnije je odrediti koji su aminokiselinski ostatci u strukturi peptida odgovorni za prepoznavanje i uspostavljanje interakcija sa receptorom, te samim time odgovorni za biološku aktivnost. Takva strukturna regija peptida odgovorna za farmakološko djelovanje naziva se farmakofor. Ostatak peptidne okosnice koji ne sudjeluje u interakciji s receptorom služi za fiksiranje farmakofora u točno određenom prostornom rasporedu.⁸

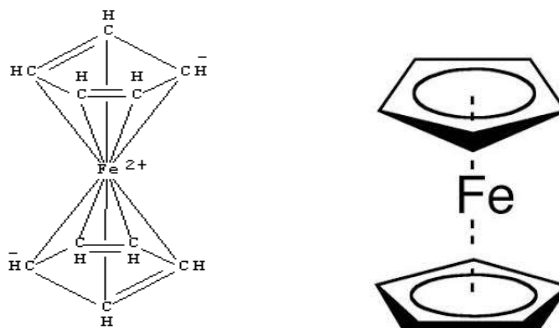
Zaključavanje peptida u bioaktivnoj konformaciji najčešće se izvodi ugradnjom malih, rigidnih molekulskih kalupa u neuređenu peptidnu sekvenciju, a koji imaju sposobnost indukcije elemenata uređene sekundarne strukture. 1,1'-Disupstituirani feroceni pokazali su se pogodnim kalupima za indukciju okreta različitih veličina te stoga omogućuju pripravu konformacijski spregnutih peptida.¹⁰

2.2. Ferocenski peptidi

2.2.1. Ferocen

1951. godine slučajno je sintetiziran do tada nepoznat spoj koji sadrži željezo i dva ciklopentadienilna liganda. Zbog reaktivnosti slične benzenu, Woodward je novi spoj nazvao ferocen $[(C_5H_5)_2Fe]$ (slika 1.).¹¹ Otkriće ferocena i definiranje njegove sendvič-strukture može se smatrati početkom moderne organometalne kemije (organometalni spojevi su oni koji sadrže barem jednu vezu metal-ugljik koja potječe iz organske molekule). Ferocen je spoj u kojem je željezov kation (Fe^{2+}) smješten između dva ciklopentadienilna liganda (Cp), te zbog toga pripada skupini spojeva zvanih „sendvič“ spojevi.^{10,11} Ferocen je jedan od najstabilnijih organometalnih spojeva i najkorisniji je među metalocenima, te se stoga nalazi u središtu interesa bioorganometalne kemije. Odlikuje se elektrokemijskim svojstvima, lipofilnošću,

niskom toksičnošću kao i stabilnošću u fiziološkim uvjetima.¹² Stabilnost ferocenilne skupine u vodenom i aerobnom mediju, mogućnost pripreme velikog broja derivata te njegova povoljna elektrokemijska svojstva učinili su ferocen i njegove derivate vrlo popularnim molekulama za biološku primjenu i za konjugaciju s biomolekulama.¹³



Slika 1. Kemijska struktura ferocena.

2.2.2. Ferocenski biokonjugati sa aminokiselinama

Konjugiranje organometalnih spojeva s biomolekulama kao što su DNA, aminokiseline i peptidi koristi se za dobivanje biokonjugata čije značajke ovise o svojstvima obiju vrsta molekula. U takvim biokonjugatima, organometalni dio može poslužiti kao molekulski kalup (eng. *scaffold*), kromofor, osjetljiva sonda, redoks-aktivno mjesto, biološki marker, katalitički aktivno mjesto itd.¹³ Ferocen nudi brojne prednosti u odnosu na druge kalupe, a među njima su i jednostavna derivatizacija s biomolekulama, elektrokemijska reverzibilnost i stabilnost. Ferocen se lako funkcionalizira na jednom ili na oba ciklopentadienilna prstena, s identičnim ili različitim supstituentima.¹² Simetrično ili asimetrično disupstituirani biokonjugati ferocena induciraju tvorbu visokoređenih heličnih struktura s visokom razinom supramolekulske kontrole.

Za dobivanje funkcionaliziranih spojeva važna je prostorna kontrola molekulske samoorganizacije, a bitnu ulogu u oblikovanju molekulskih struktura ima regulacija vodikovih veza zbog njihove prostorne usmjerenosti, specifičnosti i reverzibilnosti. Aminokiseline i kratki peptidi pokazuju mogućnost samoorganizacije, a tome pridonosi činjenica da imaju kiralne centre te donore i akceptore vodikovih veza, što ih čini pogodnima za kreiranje visoko uređenih molekulskih agregata.¹³

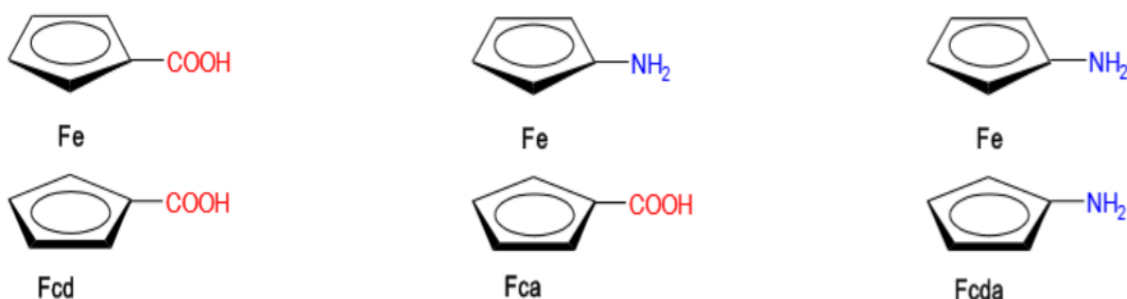
Studij ferocen-peptidnih biokonjugata omogućava razumijevanje nabiranja peptida i utjecaja ferocenskog kalupa na takve strukturne i konformacijske promjene. Također,

dizajnirani su kako bi omogućili ne samo nabiranje peptida već i zauzimanje visoko-uređene molekulske strukture u pripadajućim peptidomimeticima.

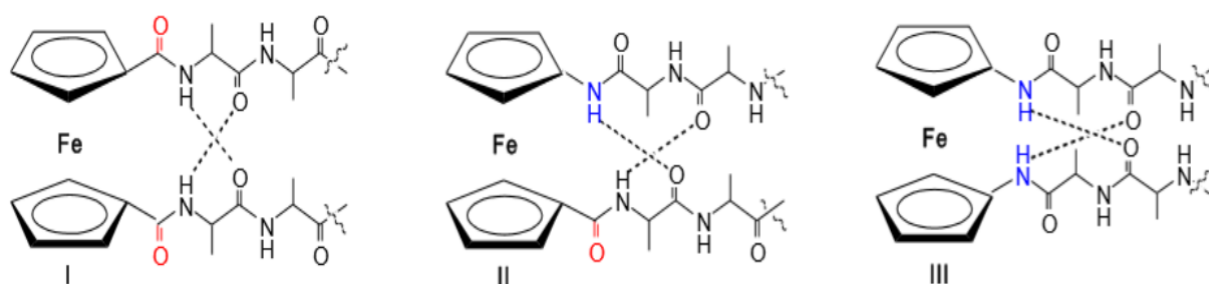
Ciklopentadienilni (Cp) prstenovi u ferocenu nalaze se na međusobnoj udaljenosti od 3.3 Å, što odgovara duljini vodikove veze u sekundarnoj strukturi β -nabrane ploče. Stoga se uvođenjem dvaju peptidnih lanaca na dva Cp-prstena omogućava njihova međusobna komunikacija putem intramolekulskih vodikovih veza (eng. *Intramolecular Hydrogen Bond*, IHB) te tvorba elemenata sekundarne strukture (α -uzvojnice, β - i γ -okreta ili β -nabrane ploče). Najbolje proučeni IHB-prstenovi u ferocenskim peptidima sadrže 7, 10 ili 13 atoma, a induciraju γ - ili β -okret odnosno α -uzvojniciu.

Ako govorimo o peptidima koji su direktno vezani na ferocenski kalup [ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (Fcd), 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca) i ferocen-1,1'-diamin (Fcda), (slika 2.)], razlikujemo tri glavne vrste biokonjugata (**I-III**) (slika 3.) u kojima je inducirana tvorba 10-, 12- ili 14- članih IHB-prstenova:¹⁴

- **Fn-[CO-AK-OMe]₂ (I)** izvedeni iz Fcd-kalupa, a sadrže 10-člani IHB-prsten,
- **Y-AK-Fca-AK-OMe (II)** izvedeni iz Fca-kalupa, a sadrže 12-člani IHB-prsten,
- **Fn-[NH-AK-Y]₂ (III)** izvedeni iz Fcda-kalupa, a sadrže 14-člani IHB-prsten.



Slika 2. Ferocenski kalupi Fcd, Fca i Fcda.¹⁴



Slika 3. Ferocenski biokonjugati **I-III**.¹⁴

2.3. Spektroskopske metode

Metode instrumentalne analize, koje omogućavaju strukturnu karakterizaciju organskih molekula korištenjem elektromagnetskog zračenja valnih duljina infracrvenih (IR) i ultraljubičastih (UV) valova, mikrovalova i X-zraka, nazivamo spektroskopijom tj. spektrometrijom.

Najčešće korištene spektrometrijske tehnike i njihova uloga su:^{15a}

- **Infracrvena (IR) spektroskopija** – koristi se za određivanje funkcijskih skupina u organskom spoju,
- **UV/Vis-spektroskopija** – prikazuje prisutnost π -konjugiranog elektronskog sustava u molekuli,
- **Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) spektroskopija** – daje specifično uređenje svih ugljikovih (¹³C-NMR) i vodikovih atoma (¹H-NMR) u molekuli.
- **CD-ORD-spektroskopija** – koristi se za identifikaciju kiralnih spojeva i njihove konfiguracije, predviđanje sekundarne strukture bioloških molekula (peptida, proteina, nukleinskih kiselina) i sl.,
- **Masena spektrometrija** – ne koristi elektromagnetno zračenje, a služi za određivanje molekulske mase spoja.

Ovaj završni rad detaljnije će se baviti spektroskopskim metodama (IR, NMR i CD) koje su primijenjene u konformacijskoj analizu biokonjugatâ ferocena i peptida, s naglaskom na sekundarnu strukturu i vodikove veze pripremljenih mimetika.

2.3.1. IR-spektroskopija

Infracrvena (IR) spektroskopija je tehnika koja se temelji na vibracijama grupa atoma, izazvanih apsorpcijom energije infracrvenih fotona.¹⁶ Takva energija nije dovoljno velika da izazove prijelaz elektrona, već apsorpcijom infracrvenog zračenja dolazi do pobuđenja molekulskih vibracija, pa molekule počinju jače vibrirati. Ovisno o prirodi veze, kovalentne veze u molekulama stalno vibriraju i pri tome razlikujemo rastezne (uzrokuju promjenu duljine veze) i deformacijske (uzrokuju svijanje veze, tj. promjenu veznog kuta) vibracije. Različite vibracije odgovaraju različitim energijama, a molekule apsorbiraju infracrveno zračenje pri točno određenim valnim duljinama i frekvencijama karakterističnim za pojedinu kovalentnu vezu.

Apsorpcija IR-zračenja ne događa se kod svih molekulskih vibracija. Veza mora biti polarna, odnosno mora imati dipolni moment koji stvara električno polje oko polarne veze i

služi kao "antena" za apsorpciju IR- zračenja.^{15b} Polarna veza apsorbira foton jer i foton ima oscilirajuće električno polje, pa dolazi do međudjelovanja dvaju električna polja. Infracrveno područje spektra korespondira frekvenciji 8×10^{-5} do 1×10^{-2} cm.

IR-spektar je graf ovisnosti postotka transmitancije (odn. apsorbancije) o valnom broju (vrijednost recipročna valnoj duljini) zračenja, a dobiva se prolaskom infracrvenog zračenja kroz uzorak u instrumentu koji se zove IR-spektrometar. Kada sva energija IR-zračenja prođe kroz ispitivani uzorak transmitacija je 100%-tna, što znači da molekula nije apsorbirala zračenje. Da bi došlo do apsorpcije energije, molekula se treba podvrgnuti zračenju frekvencije koja točno odgovara frekvenciji jedne od spomenutih vibracija. Kada su vrijednosti postotka transmitancije niže, znači da su molekule apsorbirale dio zračenja što se prikazuje apsorpcijskim vrpčama u IR-spektaru. IR-spektar se dijeli na područje funkcijskih skupina ($4000-1400 \text{ cm}^{-1}$) u kojem većina funkcijskih skupina apsorbira zračenje i područje otiska prsta ($1400-600 \text{ cm}^{-1}$) za koje je karakteristično da pokazuje jedinstveni oblik apsorpcijskih vrpca pojedinih vrsta organskih spojeva.

Tehnikom IR-spektroskopije mogu se ne samo određivati funkcijske skupine u organskim molekulama već i pratiti promjene unutar molekule (nestanak nekih funkcijskih skupina i pojava novih), kao i pratiti mikrobiološke promjene organskog uzorka rezultirane kvarenjem, te uspoređivati dobiveni spektri s onima u bazi. IR-spektar se koristi u kombinaciji s ostalim spektroskopskim metodama kako bi se odredila točna struktura molekule.

2.3.2. NMR–spektroskopija

NMR-spektroskopija odnosi se na područje frekvencije radiovalova (10^7-10^9 nm) i uzrokuje izvrtanje jezgre atoma pod utjecajem magnetskog polja elektromagnetskog zračenja. Takvo izvrtanje jezgre iz jednog magnetskog usmjerenja u drugo, pod utjecajem radiovalova, naziva se rezonancija. Rezonancija je sinonim izraza apsorpcija u IR-spektroskopiji i označava apsorpciju energije vezane uz promjenu nuklearnih energijskih stanja.¹⁷

Da bi jezgra mogla rezonirati nakon izlaganja vanjskom magnetskom polju i radiozračenju mora imati neparan atomski ili neparan maseni broj što vrijedi za konstituente biomolekula ili njihove izotope (vodik, ugljik, dušik i fosfor).¹⁸ S obzirom da su ugljik i vodik najčešći elementi organskih spojeva, u NMR-spektroskopija najčešće se istražuju jezgre vodika (^1H) i izotop ugljika (^{13}C).

NMR-spektar je graf koji prikazuje ovisnost apsorbirane energije o jakosti vanjskog magnetskog polja, a mjeri se NMR-spektrometrom. Općenito, ^1H NMR-spektar pruža četiri vrste informacija: (1) broj signala govori o broju različitih vrsta vodikovih atoma u molekuli, (2) kemijski pomak ukazuje o kojoj se vrsti vodikovih atoma radi, (3) površina ispod signala odgovara broju vodikovih atoma iste vrste dok (4) cijepanje signala ukazuje na broj susjednih vodikovih atoma.¹⁹

U peptidnoj kemiji NMR-spektar indicira prisutnosti ili odsutnosti stabilne sekundarne strukture. NMR-spektroskopskom analizom moguće je odrediti prirodu i obrasce vodikovih veza u peptidima, pri čemu rezultati NMR-analize moraju podržavati strukturne motive indicirane IR-spektroskopskom analizom.

Što je veća gustoća elektrona oko protona, proton „osjeća“ slabije efektivno magnetsko polje, pa kažemo da su takvi protoni zasjenjeni. Protoni su različito zasjenjeni u različitom kemijskom okruženju što uzrokuje različitu rezonanciju. Zasjenjeni protoni apsorbiraju pri višem, a odsjenjeni pri nižem polju. Pojava vodikovih veza utječe na kemijski pomak protona. Kemijski pomak O-H veza u alkoholima i N-H veza u aminima ovise o koncentraciji; što je veća koncentracija molekule se nalaze na manjoj udaljenosti i populacija intermolekulskih vodikovih veza između molekula je veća. Vodikova veza smanjuje gustoću elektrona oko protona, te su takvi protoni odsjenjeni i apsorbiraju pri nižem polju. Kad se alkoholi ili amini razrijede otapalima s kojima ne mogu uspostaviti vodikove veze, kidaju se postojeće intermolekulske veze, te njihovi protoni apsorbiraju pri višim poljima. Stoga slaba ovisnost kemijskog pomaka o koncentraciji upućuje na postojanje intramolekulskih veza.

Također, često korištena NMR metoda je i ^{13}C NMR-spektroskopija koja služi za detekciju ugljikovih atoma. Kemijski pomaci ugljika često su 10–15 puta veći od pomaka pripadajućeg protona jer je C-atom bliže odsjenjujućoj skupini u odnosu na H-atom.

Osim spomenutih, 1D NMR metoda postoje i 2D NMR spektroskopske metode (npr. COSY, NOESY, HMBC, HSQC) koje daju informaciju o prostornim odnosima atoma u molekuli.

U peptidnoj kemiji posebno je koristan NOESY NMR (engl. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*), homonuklearna tehnika koja se temelji na sprezanju protona kroz prostor.¹⁸ NOESY predstavlja vrlo korisnu tehniku kojom je moguće utvrditi prostorni odnos dviju jezgri čija udaljenost manja od 5 Å,¹⁴ te se stoga koristi za detekciju atoma povezanih vodikovim vezama, a koji su na međusobnoj udaljenosti od ~ 3.3 Å. Za određivanje peptidnih sekundarnih strukturnih elemenata upotrebljavaju se analize ^1H – ^1H NOE kontakata u njihovim NOESY NMR spektrima.

2.3.3. CD-spektroskopija

CD-spektroskopija je moćna metoda koja se u kemiji i strukturnoj biologiji koristi za određivanje strukture proteina, polipeptida i peptida. U dalekim ultraljubičastim područjima spektra tih molekula prevladavaju $n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelazi amidnih protona, na koje utječe geometrija peptidne okosnice, a njihovi spektri su odraz prisutnih sekundarnih struktura.²⁰

CD-spektroskopija spada u kirooptičke metode ovisne o kiralnosti istraživanog spoja. Molekule ili predmeti su kiralni (optički aktivni) ako nisu identične svojoj zrcalnoj slici, što podrazumijeva da ne posjeduju ravninu simetrije te da zakreću ravninu polariziranog svjetla za određeni kut (α) pri određenoj valnoj duljini (λ) svjetla koje se koristi. CD (cirkularni dikroizam) predstavlja razliku u apsorpciji lijevo cirkularno polariziranog svjetla (L-CPL) i desno cirkularno polariziranog svjetla (R-CPL), a javlja se kod molekula koje imaju jednu ili više kiralnih skupina koje apsorbiraju svjetlo, tzv. kromofor. CD-spektrometrija mjeri kružni dikroizam molekula u rasponu valnih duljina, a provodi se spektrometrom kružnog dikroizma koji naizmjenično mjeri apsorpciju L- i R-CPL obično pri frekvenciji od 50kHz i računa signal kružnog dikroizma.

Mjerenja se provode u vidljivom i ultraljubičastim području spektra praćenjem elektronskih prijelaza. Ukoliko molekula ima kiralne kromofore tada dolazi do apsorpcije jednog CPL-a u većoj mjeri od drugog, i kod određene valne duljine bilježi se CD-signal. CD-signal je pozitivan ako je L-CPL apsorbirano u većoj mjeri nego R-CPL, a negativan ako je u manjoj.¹⁸ Iz dobivenih CD-spektara može se odrediti konformacija i kiralnost molekule, predvidjeti sekundarna struktura proteina i drugih biomolekula, odrediti strukturne promjene prilikom nabiranja ili odmatavanja proteina, praćenje procesa vezivanja liganda, itd.

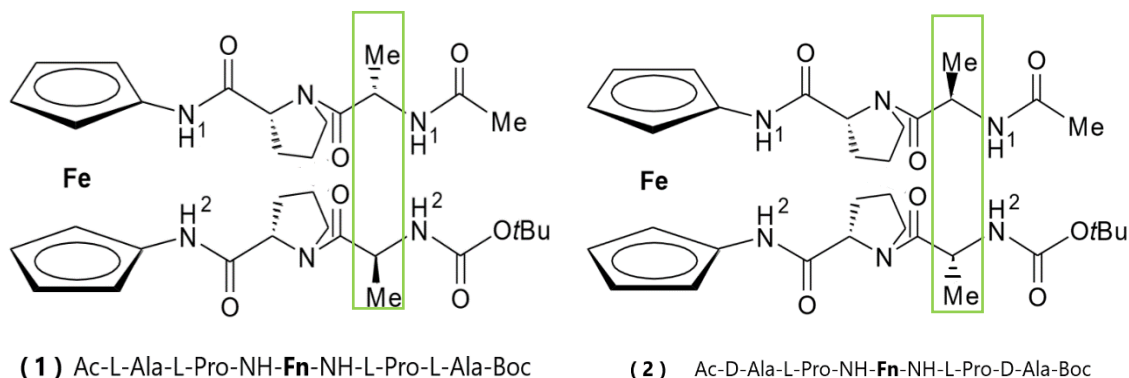
2.4. Konformacijska analiza homo- i heterokiralnih ferocenskih tetrapeptida **1** i **2**

Konformacijska analiza dvaju ferocenskih biokonjugata tipa **III**, homokiralnog Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**1**) i heterokiralnog Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc (**2**), koji su u sklopu disertacije doc. dr. sc. Monike Kovačević¹⁴ sintetizirani u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, poslužit će kao model za određivanje prostornog uređenja i elemenata peptidne sekundarne strukture.

Zajedničko strukturno svojstvo spomenutih ferocenskih tetrapeptida **1** i **2** je prisutnost dipeptida Ala-Pro koji su vezani na NH-skupine iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) kao

kalupa. Kako je vidljivo na slici 4., terminalna amino-skupina jednog lanca zaštićena je voluminoznom *tert*-butoksikarbonilnom (Boc) skupinom, dok je terminalna amino-skupina na drugom lancu zaštićena acetilnom (Ac) skupinom. Ova dva biokonjugata međusobno se razlikuju po kiralnosti alanina (L-Ala i D-Ala) vezanog na L-prolin (slika 4.) pri čemu homokiralni biokonjugat **1** sadrži L-Ala, a heterokiralni biokonjugat **2** sadrži D-Ala.

Konformacijskom analizom biokonjugata **1** i **2** istražit će se utjecaj kiralnosti okosnice na njihova konformacijska svojstva.



Slika 4. Struktura homokiralnog tetrapeptida **1** i heterokiralnog tetrapeptida **2**.

Alanin je odabran kao najmanja kiralna aminokiselina, dok je prolin dobro poznat kao začetnik 10-članog β -okreta u peptidima koji se sastoje od Pro- X_{AK} sekvenci (X_{AK} = Pro, Gly, Asn, Ala).²¹ Pobočni ogranak prolina vezan je za N-atom glavnog lanca zatvarajući pirolidinski prsten, što ograničava rotaciju oko N-C α veze. Zbog izostanka amino-skupine, prolin ne sudjeluje u tvorbi vodikovih veza kao donor. Veliki broj istraživanja peptida koji sadrže Pro ukazuju da stereokemijsko okruženje značajno utječe na obrasce vodikovih veza, a samim time i na mogućnost indukcije okreta.

2.4.1. IR spektroskopska analiza tetrapeptida **1** i **2**

IR-spektroskopija daje pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini. Ovom metodom određujemo sudjeluju li peptidne NH- i CO-skupine u vodikovim vezama, a moguće je odrediti i karakter vodikove veze (intra- ili intermolekulski) u kojoj sudjeluju. Apsorpcijske vrpce amidnih skupina detektirane u području nižem od 3400 cm^{-1} pripisuju se asociiranim NH-skupinama, dok se slobodne NH-skupine (one koje nisu uključene u tvorbu vodikovih veza) detektiraju apsorpcijskim vrpčama u područjima višim od 3400 cm^{-1}

Apsorpcijske vrpce u IR-spektrima tetrapeptida **1** i **2** koje se javljaju pri $\sim 3430\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 3250\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ (tablica 1.) ukazuju na postojanje i slobodnih i asociranih NH-skupina.^{21,22} Nadalje, kod oba ispitana tetrapeptida uočljiv je slabiji intenzitet isteznih vibracija slobodnih NH-skupina iznad 3400 cm^{-1} , te jači intenzitet apsorpcijskih vrpce asociranih NH-skupina ispod 3300 cm^{-1} .¹⁴

Detektirane karbonilne skupine u spojevima **1** i **2** apsorbiraju pri valnim duljinama nižim od 1730 cm^{-1} što ukazuje na njihovo potencijalno sudjelovanje u vodikovim vezama. Također, prema literaturnim navodima asocirane uretanske karbonilne skupine javljaju se ispod 1700 cm^{-1} , što dopušta mogućnost da uretanske skupine ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$) iz peptida **1** i **2** koje su apsorbirale pri višim valnim duljinama 1707 i 1706 cm^{-1} nisu uključene u vodikove veze.

Tablica 1. Istezne vibracije* NH- i CO-skupina tetrapeptida **1** i **2**.¹⁴

Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.)	ν_{NH} (asoc.)	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
1	Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc	3427sr	3300j	1707	1571
			3253sr	1684	1506
				1633	1486
					1465
2	Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc	3425sr	3304j	1706	1572
			3254sr	1684	1505
				1633	1485
					1457

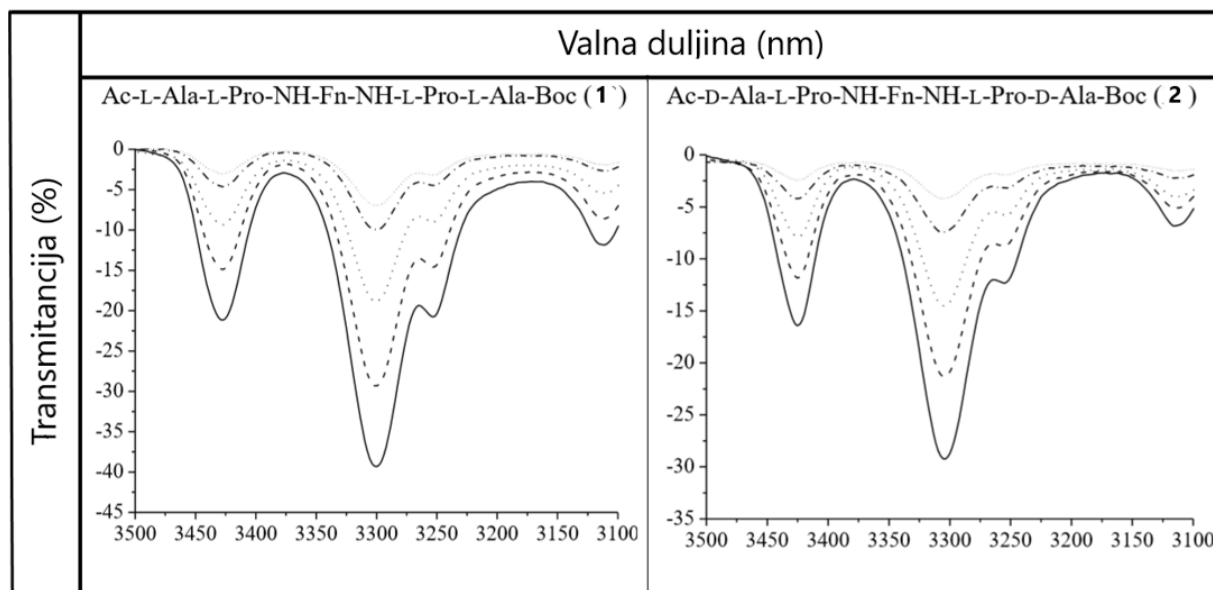
*IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2 , $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$

2.4.1.1. Koncentracijski ovisni IR-spektri tetrapeptida **1** i **2**

Karakter vodikove veze (inter- ili intramolekulski) određuje se mjerenjem koncentracijski ovisnih IR-spektara. Takvi IR-spektri pokazuju utjecaj razrjeđenja ispitivanog uzorka na postojeće vodikove veze. Naime, intermolekulske vodikove veze (one koje se uspostavljaju između samozdruženih molekula) cijepaju se tijekom postupnog razrjeđivanja što uzrokuje smanjenje intenziteta NH-signala u područje nižem od 3400 cm^{-1} . Kod prisutnih intramolekulskih vodikovih veza (one koje se uspostavljaju unutar iste molekule i pridonose konformacijskom uređenju) njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine. Dakle, intenzitet NH-skupina asociranih (NH_{asoc}) u intermolekulske vodikove veze, u odnosu na intenzitet slobodnih NH-skupina (NH_{slob}), izraženije se smanjuje uslijed razrjeđivanja.²² Karakter vodikove veze u navedenim

konformerima određuje se iz omjera intenziteta vrpce slobodnih i asociраних NH-skupina ispitivanih uzoraka.

Diklormetanske otopine ispitivanih tetrapeptida postupno se razrjeđivane u koncentracijskom rasponu 5×10^{-2} M – 3×10^{-3} M pri čemu se promatraju promjene signala NH_{asoc} i NH_{slob} . Iz dobivenih koncentracijski-ovisnih IR-spektara (slika 5.) vidljivo je da signali slobodne i asociране NH-skupine slabe proporcionalno, a takvo ponašanje *sugerira da asociране NH-skupine oba konformera sudjeluju u intramolekulskim vodikovim vezama (IHB).*



*IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2 , [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (---) $c = 2,5 \times 10^{-2}$ M, (....) $c = 1,25 \times 10^{-2}$ M, (-.-.) $c = 6,13 \times 10^{-3}$ M, (· · ·) $c = 3 \times 10^{-3}$ M].

Slika 5. Koncentracijski ovisni IR-spektri* biokonjugata **1** i **2**.¹⁴

2.4.2. NMR-spektroskopska analiza tetrapeptida **1** i **2**

Nakon što se IR-spektroskopijom utvrdi sudjelovanje NH-skupina u IHB, provodi se NMR-spektroskopska analiza kojom se, osim asignacije svih vodikovih atoma u molekuli, utvrđuje i koje od prisutnih NH-skupina sudjeluju u vodikovim vezama te se stječe jasniji uvid u IHB-obrasce. Formiranje vodikove veze utječe na kemijski pomak protona asociраних NH-skupina, tako što vodikova veza odsjenjuje proton koji stoga rezonira pri nižem polju,²¹ odnosno signal se pomiče u niže polje i ima viši kemijski pomak. Dakle, kemijski pomaci (δ) asociраних amidnih protona viši su u odnosu na kemijske pomake slobodnih amidnih protona. Preciznije, u literaturi je opisano da se signali asociраних NH-skupina javljaju pri $\delta > 7$ ppm, dok su slobodne NH-skupine registrirane pri $\delta < 7$ ppm.¹⁴ Međutim, na kemijski pomak

amidnih protona utječe i ukupna kemijska okolina skupine te su stoga moguća odstupanja od gore navedenih okvira.

Kako su u NMR-spektrima tetrapeptida **1** i **2** kemijski pomaci amidnih protona vezanih izravno za ferocen (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) registrirani pri $\delta > 9$ ppm, sugerirana je njihova participacija u vodikovim vezama.

S druge strane, zabilježeni kemijski pomaci Ala- NH_{Ac} protona u višem polju ($\delta = 6.20$ – 6.52 ppm), sugeriraju manju vjerojatnost sudjelovanja u vodikovim vezama. Drugim riječima, dobiveni rezultati upućuju da je asocijacija NH^1_{Ala} i NH^2_{Ala} protona u vodikovim vezama slabo vjerojatna, ali ne i potpuno isključena.²¹

Niži kemijski pomak ($\delta = 5.18$ – 5.41 ppm), primijećen je kod Ala- NH_{Boc} protona što se pripisuje specifičnom kemijskom karakteru Boc-zaštitne skupine.

Tablica 2. Kemijski pomaci (δ)* amidnih protona tetrapeptida **1** i **2**¹⁴

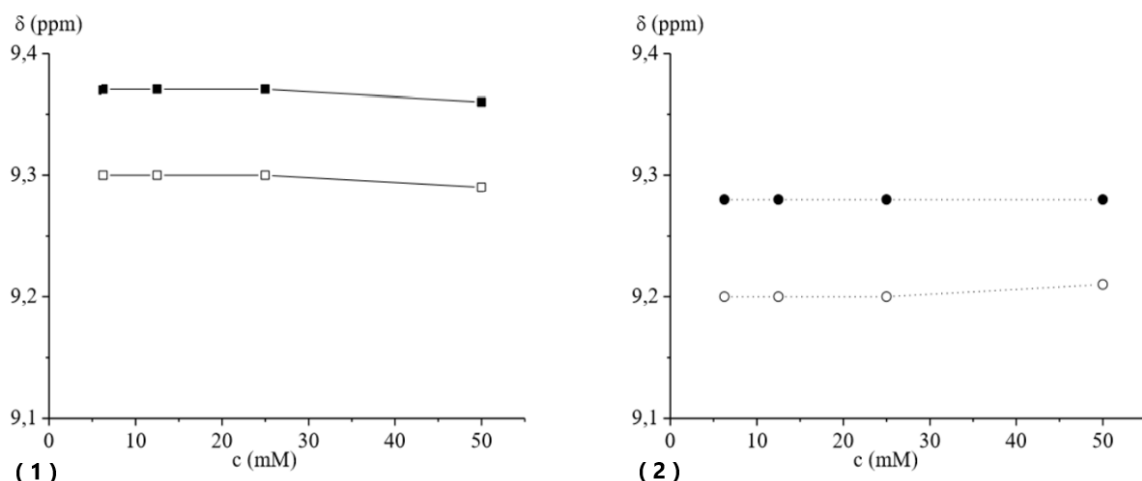
Spoj	Formula	$(\text{NH}^1_{\text{Fn}})$	$(\text{NH}^2_{\text{Fn}})$	$(\text{NH}^1_{\text{Ala}})$	$(\text{NH}^2_{\text{Ala}})$
		δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
1	Ac-L-Ala-L-Pro- NH^1 -Fn- NH^2 -L-Pro-L-Ala-Boc	9,36	9,29	6,20	5,18
2	Ac-D-Ala-L-Pro- NH^1 -Fn- NH^2 -L-Pro-D-Ala-Boc	9,28	9,21	6,52	5,39

*NMR-spektri snimljeni su u CDCl_3 , $c = 5 \times 10^{-2}$ M, 298 K

Kako bismo dodatno definirali prirodu vodikovih veza u ispitanim tetrapeptidima, dobivene rezultate potkrepljujemo mjerenjem koncentracijski- i temperaturno-ovisnih ^1H -NMR-spektara. Naime, razrjeđivanjem ili zagrijavanjem cijepaju se intermolekulske vodikove veze što uzrokuje pomak amidnih protona u više polje.

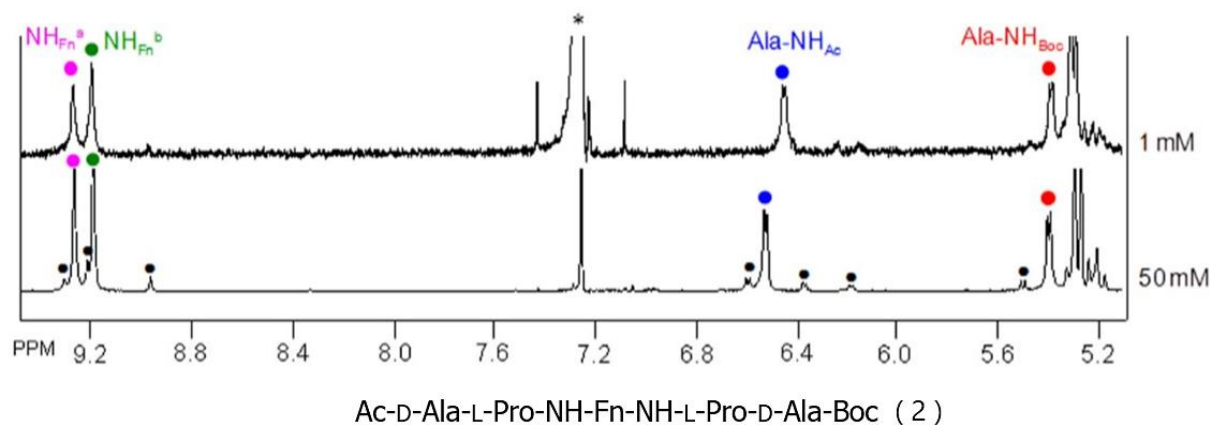
2.4.2.1. Koncentracijski-ovisna NMR-analiza tetrapeptida **1** i **2**

Iz koncentracijski ovisnih NMR-spektara (slika 6.) vidljivo je da nema promjene kemijskog pomaka NH-protona vezanih na ferocensku jezgru (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) uslijed razrjeđivanja ispitivanog uzorka s CDCl_3 što isključuje mogućnost njihovog sudjelovanja u intermolekulskim vodikovim vezama i istovremeno potkrepljuje indicaciju o intramolekulskom karakteru vodikove veze, prethodno postavljenoj IR-analizom.



Slika 6. Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} iz tetrapeptida **1** (■ NH^1_{Fn} , □ NH^2_{Fn}) i **2** (● NH^1_{Fn} , ○ NH^2_{Fn})¹⁴

Nadalje, na slici 7. koja prikazuje koncentracijski-ovisne NMR-spektre heterokiralnog peptida **2** uočavaju se oštri signali, nepromijenjeni kemijski pomaci NH_{Fn} i $\text{Ala-NH}_{\text{Boc}}$ protona te neznatno promijenjeni kemijski pomaci $\text{Ala-NH}_{\text{Ac}}$ što potvrđuje rezultate IR-spektroskopije prema kojima se analizirani tetrapeptidi međusobno ne povezuju intermolekulskim vodikovim vezama.



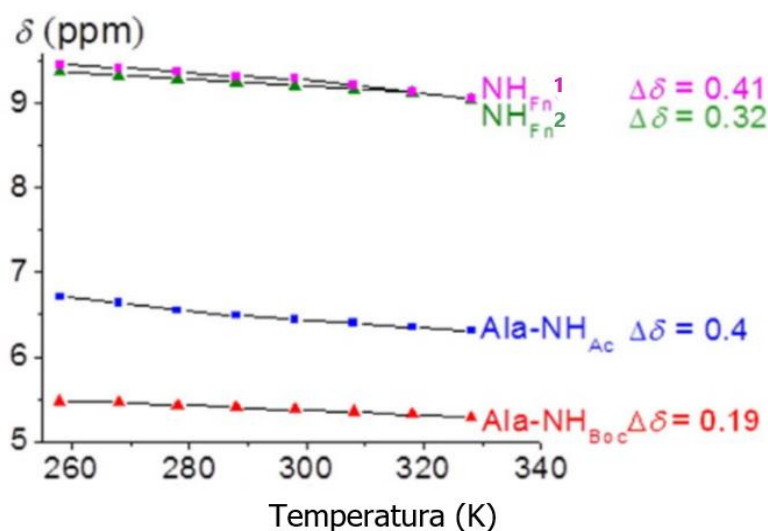
Slika 7. Koncentracijska-ovisnost kemijskih pomaka NH-protona heterokiralnog tetrapeptida **2**.²¹

2.4.2.2. Temperaturno-ovisni NMR-spektri tetrapeptida 1 i 2

Kao što je već ranije spomenuto, zagrijavanje dovodi do cijepanja intermolekulskih vodikovih veza, s tim da pri višim temperaturama dolazi do cijepanja i intramolekulskih vodikovih veza i razmotavanja uređenih peptida. Protoni iz amidnih skupina koji sudjeluju u

vodikovim vezama zaklonjeni su od otapala, a kako se zagrijavanjem te vodikove veze cijepaju proton postaje izložen otapalu što uzrokuje pomak njegovog signala u više polje.

U temperaturno-ovisnim NMR–spektrima tetrapeptida **1** i **2** (slika 8.) uočena je neznatna promjena kemijskih pomaka ($\Delta\delta < 0,5$ ppm) amidnih protona uslijed zagrijavanja u temperaturnom rasponu 258–328K. Takav rezultat upućuje ili na sigurno sudjelovanje protona u jakim IHB ili da protoni uopće ne sudjeluju u vodikovim vezama.^{21,22}



Slika 8. Temperaturna ovisnost amidnih protona NH_{Fn}¹ i NH_{Fn}² iz tetrapeptida **2**.

2.4.2.3. Temperaturni koeficijenti ($\Delta\delta/\Delta T$) tetrapeptida **1** i **2**

Na temelju ovisnosti kemijskih pomaka o temperaturi (temperaturni koeficijent, $\Delta\delta/\Delta T$) određuje se izloženost NH-skupina otapalu i zaključuje o njihovoj inicijalnoj uključenosti u vodikove veze. Niski temperaturni koeficijenti (-2.4 ± 0.5 ppb/K) odgovaraju i izloženim i zaklonjenim NH-skupinama u kratkim peptidima. Visoki temperaturni koeficijenti odgovaraju NH-skupinama koje su u početku bile zaklonjene od otapala (zbog sudjelovanja u intermolekulskim vodikovim vezama u samozdruženim peptidima ili zbog sudjelovanja u intramolekulskim vodikovim vezama odgovornim za nabiranje peptida u uredene konformacije), a zagrijavanjem su postale izložene otapalu zbog cijepanja vodikovih veza.

Povećane temperaturne ovisnosti koncentracijski-neovisnih NH_{Fn}¹ i NH_{Fn}² protona podržavaju indicaciju o njihovom sudjelovanju u intramolekulskim vodikovim vezama pri nižim temperaturama (slika 9).

Nadalje, primijećena je veća temperaturna ovisnost D-Ala-NH_{Ac} protona iz heterokiralnog peptida **2** u odnosu na L-Ala-NH_{Ac} iz homokiralnog diastereomera **1** što se pripisuje njegovoj participaciji u IHB. Osim toga, signal D-Ala-NH_{Ac} protona se blago pomaknuo prema nižem polju ($\delta \sim 6.5$ ppm) u odnosu na signal L-Ala-NH_{Ac} protona ($\delta \sim 6.2$ ppm).

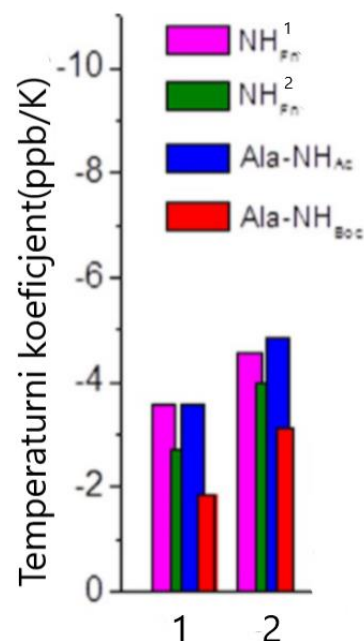
Također, primijećena je i razlika u amidnim rezonancijama homo- i heterokiralnog tetrapeptida uslijed zagrijavanja, što indicira konformacijske razlike uzrokovane različitom kiralnosti okosnice tetrapeptida. Dok su kod homokiralnog konformera **1** signali rezonancija amidnih protona ostali razdvojeni, kod heterokiralnog konformera **2** uočeno je njihovo srastanje.²²

Prema tome, *zaključujemo da je na konformacijski obrazac homo- i heterokiralnih peptida utjecala različita kiralnost peptidne okosnice.*

2.4.2.4. Titracija tetrapeptida s DMSO

Nakon što je IR- i NMR-analizom snažno sugeriran intramolekulski karakter vodikovih veza (IHB) u tetrapeptidima **1** i **2**, u nastavku se ispituje njihova jakost. Jakost IHB u tetrapeptidima ispitana je titracijom njihovih 25 mM otopina u CDCl₃ s polarnim otapalom DMSO. DMSO se, zahvaljujući prisutnosti slobodnih elektronskih parova na kisikovom atomu, ponaša kao snažan akceptor vodikove veze, te može izazvati razmotavanje uređene peptidne strukture. Naime, kada se u otopinu peptida u CDCl₃ doda otapalo s kojim peptid ne može uspostavljati vodikove veze dolazi do cijepanja postojećih intermolekulskih vodikovih veza što uzrokuje pomak signala amidnih protona u više polje.¹⁹ Međutim, dodatkom kompeticijskog polarnog otapala kao što je DMSO dolazi do cijepanja i inter- i intramolekulskih vodikovih veza i solvatacije izloženih NH-protona s otapalom te oni apsorbiraju pri nižem polju.²¹

Prilikom postupne titracije otopina tetrapeptida **1** i **2** s DMSO (1,96-56%) očekuje se povećanje kemijskog pomaka onih protona koji su izloženi polarnom otapalu DMSO, dok se

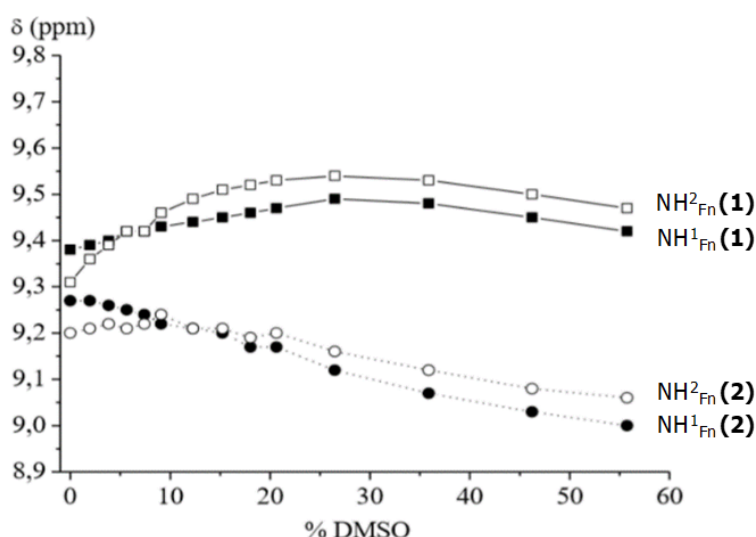


Slika 9. Amidni temperaturni koeficijenti homokiralnog (**1**) i heterokiralnog (**2**) tetrapeptida. ($c = 2,5 \times 10^{-2}$ M u CDCl₃, 258-328 K).²²

kemijski pomak protona koji su uključeni u jake intramolekulske vodikove veze značajno ne mijenja.

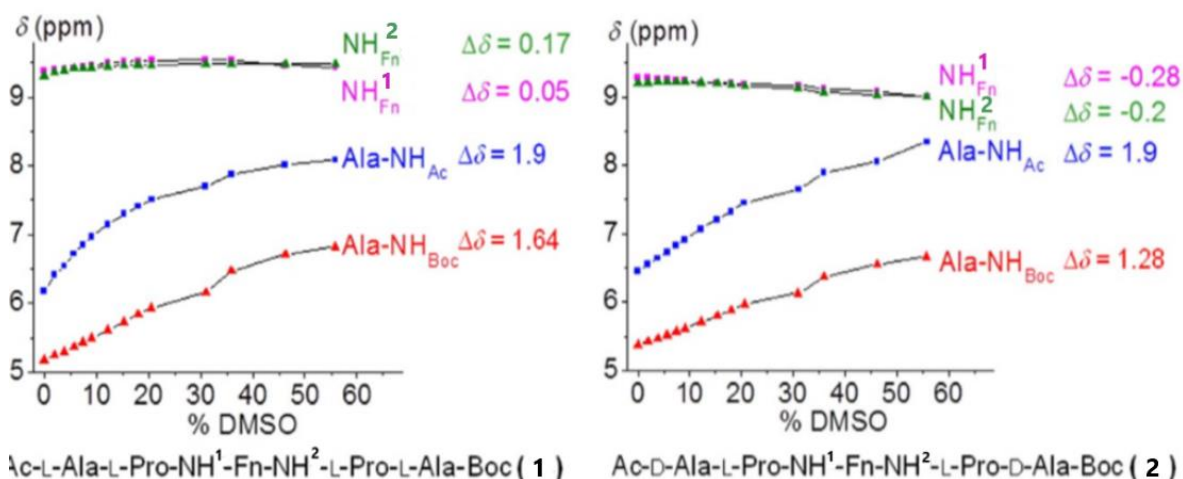
Postupnom titracijom peptida **1** i **2** s DMSO signali asociраних NH_{F_n} protona pomiču se u suprotnom smjeru što ukazuje na različitu konformaciju. Dok se signali NH_{F_n} iz homokiralnog peptida **1** neznatno pomiču u niže polje, signali NH_{F_n} iz heterokiralnog peptida **2** pomiču se u više polje. Relativno neobičan pomak u više polje pripisuje se zasjenjujućem utjecaju karbonilnih skupina.¹⁴ Nadalje, inicijalnom titracijom s DMSO nije zabilježena promjena kemijskog pomaka. Tek u prisutnosti 10% DMSO signal se pomiče u više polje, što je karakteristika zaklonjenih NH-skupina, odnosno NH-skupina uključenih u IHB.

Kako je vidljivo na slici 10., NH_{F_n} iz homokiralnog tetrapeptida **1** ostali su zaklonjeniji od DMSO ($\Delta\delta < 0.17$) u odnosu na NH_{F_n} iz heterokiralnog tetrapeptida **2** ($\Delta\delta < 0.28$) što je dokaz njihovog sudjelovanja u nešto jačim IHB.



Slika 10. Titracijske krivulje NH_{F_n}-skupina tetrapeptida **1** i **2** kao rezultat dodatka DMSO.¹⁴

Iz titracijskih krivulja peptida **1** (slika 11.) vidljiv je pomak signala amidnih protona u niže polje kao i visok stupanj osjetljivosti Ala-NH_{Boc/Ac} skupina na otapalo ($\Delta\delta \approx 1.64-1.9$) što implicira njihovo nesudjelovanje ili eventualno sudjelovanje u slabim IHB. Kemijski pomaci Ala-NH_{Boc/Ac} skupina peptida **2** (slika 11.) u niža polja ($\Delta\delta \approx 1.28-1.9$) ukazuju na njegovu izloženost otapalu kao i u slučaju diastereomera **1**.



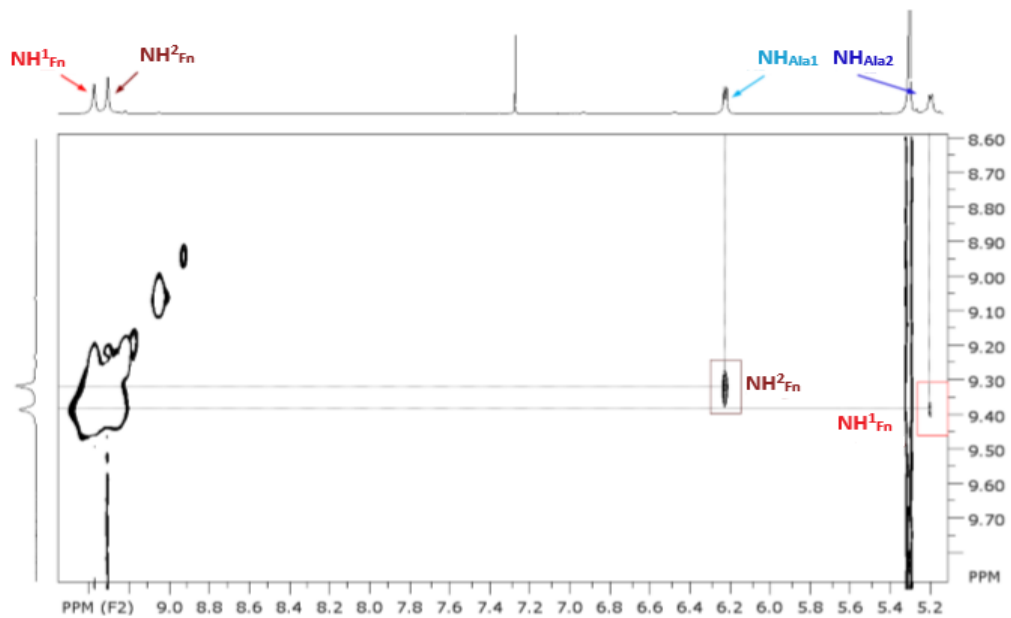
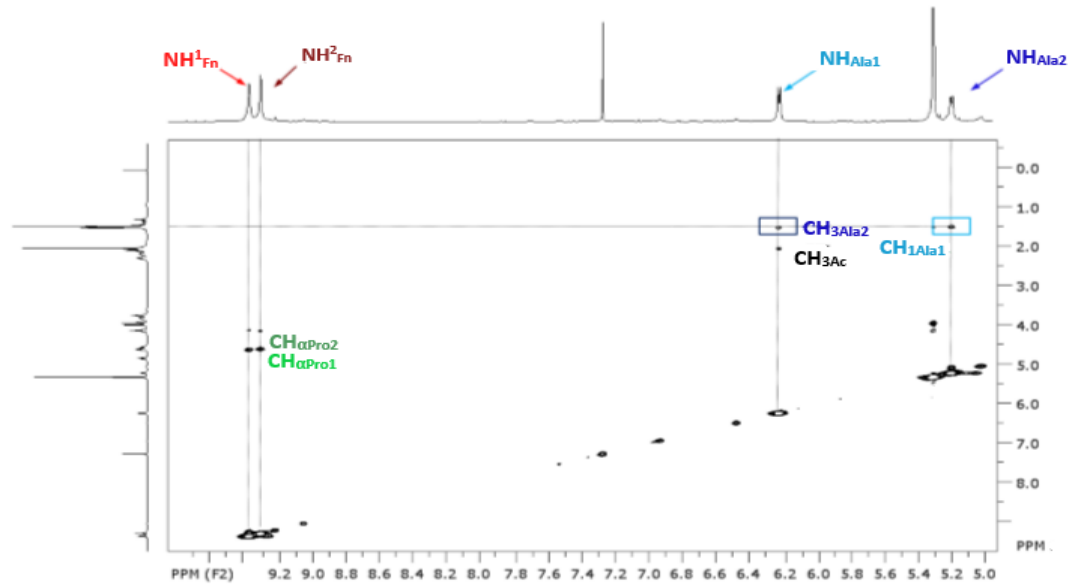
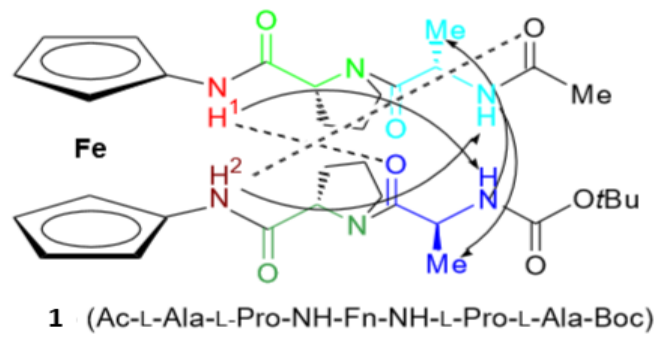
Slika 11. Titracijske krivulje svih amidnih skupina iz homokiralnog (**1**) i heterokiralnog (**2**) tetrapeptida kao rezultat dodatka DMSO.^{21,22}

2.4.2.5. NOESY-NMR

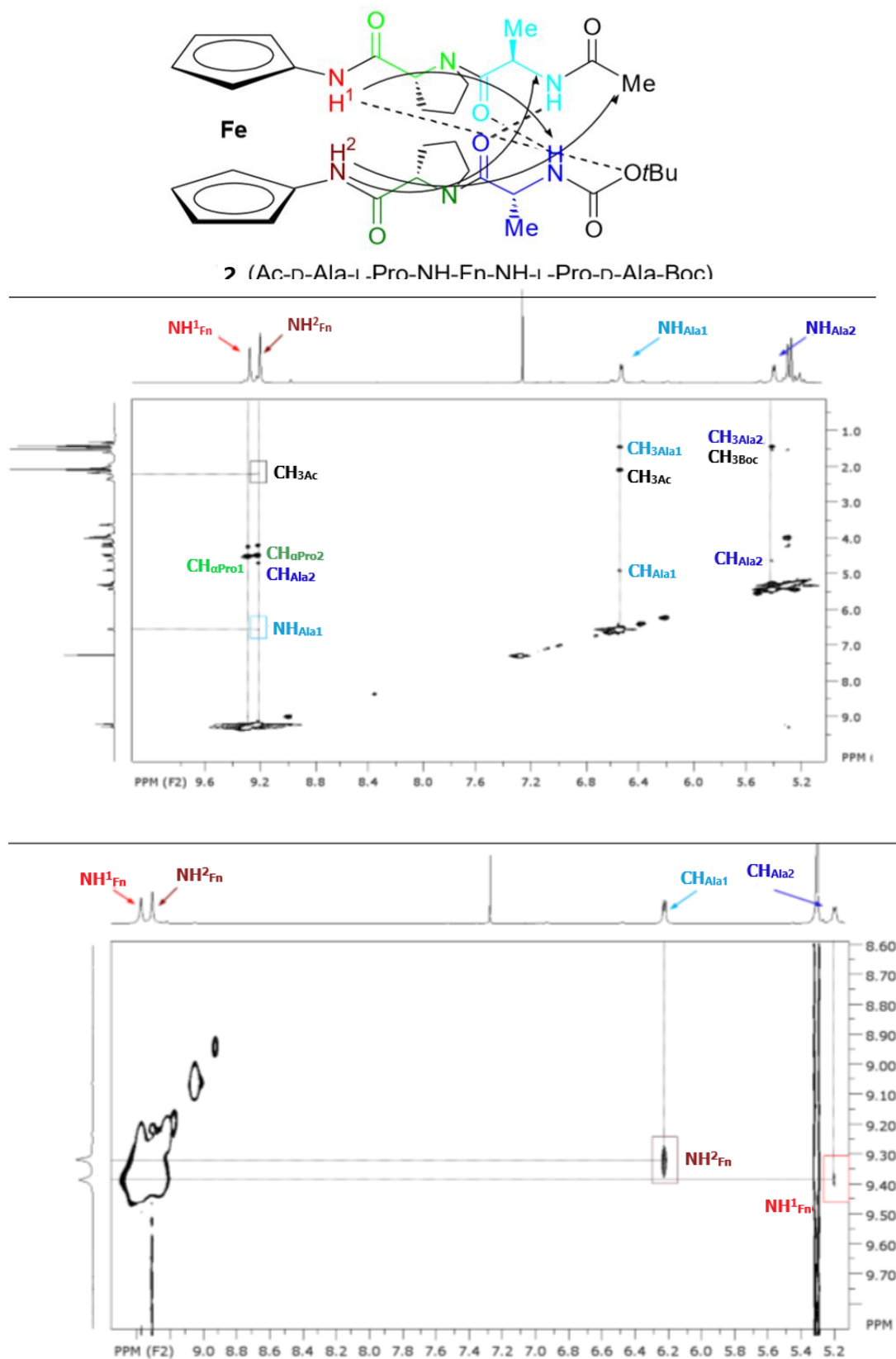
Dosad dobiveni rezultati provedenih spektroskopskih analiza upućuju na sudjelovanje NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} iz homo- (**1**) i heterokiralnog (**2**) peptida u jakim intramolekulskim vodikovim vezama (IHB) dok je IHB-angažman protona iz NH^1_{Ala} i NH^2_{Ala} pod upitnikom.

Kako bismo stekli bolji uvid u konformaciju i IHB-obrasce u analiziranim peptidima provodi se NOESY-analiza. Analizom NOE kontakata (u NOESY NMR spektru) NH-skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama moguće je predložiti konformacije ispitivanih tetrapeptida **1** i **2**.

Iz snimljenih NOESY spektara homokiralnog tetrapeptida **1** (slika 12.) dobiveni su NEO-kontakati: $\text{NH}^1-\text{NH}_{\text{Ala}2}$, $\text{NH}^2-\text{NH}_{\text{Ala}1}$, $\text{NH}_{\text{Ala}1}-\text{CH}^3_{\text{Ala}2}$ i $\text{NH}_{\text{Ala}2}-\text{CH}^3_{\text{Ala}}$. Uz korelaciju s ostalim dobivenim rezultatima indicirane su IHB $\text{NH}^1\cdots\text{OC}_{\text{Ala}2}$ i $\text{NH}_2\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$. Prostorna udaljenost akceptorskih skupina $\text{NH}^1-\text{NH}_{\text{Ala}2}$ kod heterokiralnog tetrapeptida **2** (slika 13.) dopušta tvorbu $\text{NH}^1\cdots\text{O}t\text{Bu}$ IHB, odnosno $\text{NH}_{\text{Ala}2}\cdots\text{OC}_{\text{Ala}1}$ IHB. Dobiveni NOE-kontakt dviju akceptorskih skupina $\text{NH}^2-\text{NH}_{\text{Ala}1}$ može se pripisati $\text{NH}_{\text{Ala}1}\cdots\text{OC}_{\text{Ala}2}$ IHB.



Slika 12. NOE-kontakti u otopini homokiralnog peptida **1**. Predložene IHB prikazane su crtkano.¹⁴



Slika 13. NOE-kontakti u otopini heterokiralnog peptida **2**. Predložene IHB prikazane su crtkano.¹⁴

2.4.3. CD-spektroskopska analiza tetrapeptida **1** i **2**

Spektroskopska metoda cirkularni dikroizam (CD) koristi se za određivanje sekundarnih strukturnih elemenata u kiralnim peptidima, te je primjenjujemo kao dodatnu potvrdu predloženih intramolekulskih vodikovih veza. Iz dosadašnjih istraživanja ferocenskih peptida, primijećeno je povećanje intenziteta vrpce oko 480 nm prilikom IHB-induciranog kiralnog uređenja peptida. Stoga je položaj apsorpcijskih vrpce karakterističnih za ferocenski kromofor (465 – 471 nm) ukazuje na kiralno uređenje ispitanih tetrapeptida.

Prema literaturi, proksimalna aminokiselina (u ovom slučaju Pro) određuje usmjerenje uzvojnice, a distalna aminokiselina (Ala) samo pomaže u indukciji ferocenske kiralnosti. Konjugati koji imaju L-Pro vezan na ferocensku jezgru poprimaju *P*-heličnu strukturu, a oni koji u svom sastavu imaju D-Pro poprimaju *M*-heličnu strukturu. Drugim riječima, ako je proksimalna aminokiselina L-konfiguracije tada se javlja pozitivan Cottonov efekt i desno orijentirana uzvojnica.²³

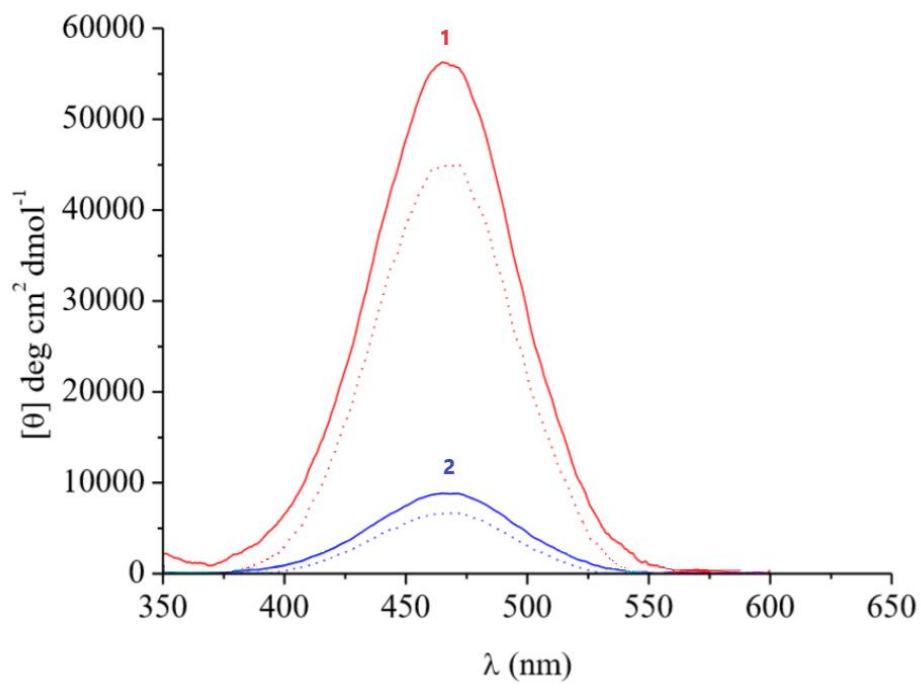
Izrazita CD-aktivnost tetrapeptida **1** i **2** bila je očekivana, s obzirom da su dosad provedene metode utvrdile prisutnost jakih IHB, a time i visok stupanj kiralnog uređenja. Višestruko povećane vrijednosti Cottonovih efekata homokiralnog tetrapeptida **1** (slika 14.) u odnosu na heterokiralni tetrapeptid **2** upućuju na postignuti viši stupanj kiralnog uređenja induciranog jačim IHB, što je u skladu s prethodno opisanim rezultatima IR- i NMR-analize.

Tablica 3. UV/Vis-signal i CD-*vrpce** tetrapeptida **1** i **2**.¹⁴

Spoj	Formula	$\lambda_{\max} / \text{nm}$		$[\theta] / \text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$	
		CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ + DMSO	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ + DMSO
1	Ac-L-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -L-Pro-L-Ala-Boc	465	470	56293	45044
2	Ac-D-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -L-Pro-D-Ala-Boc	471	469	8810	6690

*CD-spektri mjereni su u CH₂Cl₂ (c = 5×10⁻³M) uz 20 % DMSO

Jakost prisutnih IHB ponovno je ispitana titracijom sa DMSO, prateći promjene Cottonovog efekta. Kao što je već spomenuto, DMSO je polarno otapalo koje može izazvati cijepanje intramolekulskih vodikovih veza i uzrokovati razmotavanje uređene strukture čime se narušava kiralna organizacija, a što dovodi do smanjenja CD-aktivnosti. Redukcija intenziteta Cottonovih efekata tetrapeptida **1** i **2** za manje od 30% *podržava pretpostavku o njihovoj stabilizaciji jakim IHB.*



Slika 14. CD-spektri tetrapeptida **1** i **2** u CH₂Cl₂ [$c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$ (puna crta)] te uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta) ¹⁴

3. ZAKLJUČAK

- Konformacijskom analizom homokiralnog Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**1**) i heterokiralnog tetrapeptida Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc (**2**) spektroskopskim metodama (IR, NMR, CD) utvrđeno je da alteracija kiralnosti okosnice utječe na krajnju konformaciju peptida:
- Koncentracijski-neovisni IR- i NMR-spektri ispitivanih peptida sugeriraju njihovu stabilizaciju intramolekulskim vodikovim vezama (IHB).
- Visoka temperaturna ovisnost koncentracijski-neovisne D-Ala-NH_{Ac} skupine heterokiralnog konformera **2** dodatno podržava pretpostavku o njegovom sudjelovanju u IHB. Nasuprot tome, kemijski pomak u viša polja i slabija temperaturna ovisnost L-Ala-NH_{Ac} skupine iz homokiralnog konformera **1** odgovara smanjenom potencijalu te skupine za sudjelovanje u IHB.
- Titracijom s DMSO ne dolazi do promjene kemijskih pomaka NH-skupina vezanih na ferocen što govori u njihovom sudjelovanju u jakim IHB.
- NOESY-analiza ukazuje na postojanje dviju interlančanih IHB između NH¹_{Fn}...OC_{Ala2} i NH²_{Fn}...OC_{Ac} u tetrapeptidu **1** što rezultira 13-članim, odnosno dvama 10-članim IHB-prstenovima.
- Tetrapeptid **2** stabiliziran je kroz pet IHB. Od toga su dvije intralančane (NH¹...OC_{Ala1} i NH²...OC_{Ala2}) i formiraju 7-člani prsten, odnosno dva γ-okreta; dvije su interlančane (NH¹_{Ala}...OC_{Ala2} i NH²_{Ala}...OC_{Ala1}) i formiraju dva 16-člana prstena te jedan 13-člani IHB-prsten proistekao iz veze NH¹_{Fn}...O_{Boc}.
- Jaki pozitivni Cottonov efekti (8810-56293 deg cm²/dmol) pri λ ~ 465 nm u CD-spektrima analiziranih biokonjugata, čiji se intenzitet nije značajno smanjio dodatkom DMSO, indicira prisutnost visokouređenih stabilnih (*P*)-uzvojnica.

4. LITERATURA

- 1 Nelson, D. L., Cox, M. M. (2013) *Lehninger principles of biochemistry*, 6. izdanje, New York: W. H. Freeman and Company, str. 75-100.
- 2 Ross, N. T., Katt, W. P., Hamilton, A. D. (2010) Synthetic mimetics of protein secondary structure domains. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **368**: 989–1008.
- 3 Pollaro, L., Heinis, C. (2010) Strategies to prolong the plasma residence time of peptide drugs. *Medicinal Chemistry Communications*, **1(5)**: 319.
- 4 Reese, H. R., Shanahan, C. C., Proulx, C., & Menegatti, S. (2019). Peptide science: a "rule model" for new generations of peptidomimetics. *Acta Biomaterialia*. **102**: 1-4.
- 5 Sato, A. K., Viswanathan, M., Kent, R. B., Wood, C. R. (2006) Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Current Opinion in Biotechnology*, **17(6)**: 638–642.
- 6 Vagner, J., Qu, H., Hruby, V. J. (2008) Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **12(3)**: 292–296.
- 7 Kahn, M. (1993) Peptide Secondary Structure Mimetics: Recent Advances and Future Challenges. *Synlett*, **1993(11)**: 821–826.
- 8 Giannis, A., Kolter, T. (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands: Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **32(9)**: 1244–1267.
- 9 Jelić, I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kemija u industriji*, **53(11)**: 495–504.
- 10 Barišić, L. (2018) *Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida*, nastavni materijal iz kolegija Peptidni mimetici i pseudopeptidi, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Zagreb
<http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organ_sku_kemiju/peptidni_mimetici_i_pseudopeptidi> (datum objave: 19. lipnja 2018.)
- 11 Van Staveren D. R., Metzler-Nolte N. (2004) Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chemical Reviews*, **104(12)**: 5931–5934.
- 12 Martić S., Labib M., Shipman P. O., Kraatz H. B. (2011) Ferrocene-peptide conjugates: From synthesis to sensory applications. *Dalton Transactions*, **40(28)**: 7264.
- 13 Moriuchi T., Hirao, T. (2006) Ferrocene–Peptide Bioconjugates. *Bioorganometallic Chemistry* **17**: 143–175.

- 14 Kovačević M. (2014.) „Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima“, doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb, Zagreb.
- 15 (a) Kovač, V. (2018) *Uvod u spektroskopske i kromatografske metode analize*, nastavni materijal za kolegij Instrumentalne analize, Prehrambeno-biološki fakultet Zagreb (b) Kovač, V. (2018) *IR spektrometrija/spektrometrija*, nastavni materijal za kolegij Instrumentalne analize, Prehrambeno-biološki fakultet Zagreb
<http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_opcu_i_anorgansku_kemiju_i_elektroanalizu/instrumentalna_analiza_pt_i_bt> pristupljeno 23. lipnja 2020.
- 16 Stuart, B. (2005) Infrared Spectroscopy. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, **14**: 2-5.
- 17 Gazivoda Kraljević, T., (2016) *Određivanje struktura organskih spojeva*, nastavni materijal kolegija Određivanje struktura organskih spojeva, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zgrebu
<https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/Određivanje_struktura_organskih_spojeva_nastavni_tekst.pdf> (datum objave: 20. siječnja 2016.)
- 18 Hinds, M. G., Norton, R. S. (1997) NMR spectroscopy of peptides and proteins. *Molecular Biotechnology*, **7(3)**: 315–331.
- 19 Barišić, L. (2018), *Predavanja (NMR, kromatografija, plinska kromatografija)*, nastavni materijal za kolegij Instrumentalna analiza, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb
<http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organisku_kemiju/instrumentalna_analiza_n> (datum objave: 19. svibnja 2018.)
- 20 Whitmore L., Wallace B. A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, **89(5)**: 392–400.
- 21 Kovačević M., Kodrin I., Roca S., Molčanov K., Shen Y., Adhikari B., Kraatz H. B., Barišić L. (2017) Helically Chiral Peptides That Contain Ferrocene-1,1'-diamine Scaffolds as a Turn Inducer. *Chemistry – A European Journal*, **23(43)**: 1037-10395.
- 22 Čakić Semenčić M. i Barišić L. (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croatica Chemica Acta*, **90(4)**: 537-569.
- 23 Kovačević M., Kodrin I., Cetina M., Kmetič I., Murati T., Semenčić M. Č., Roca S., Barišić L. (2015). The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Transactions*, **44(37)**: 16405–16420.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Ime i prezime studenta