

Priprava i konformacijska analiza ferocenskog dipeptida Boc-L-Pro-Fca-OMe

Tarandek, Ana

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:159:777338>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana Tarandek

7689/BT

PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA
FEROCENSKOG DIPEPTIDA Boc-L-Pro-Fca-OMe

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentor: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKOG DIPEPTIDA

Boc-L-Pro-Fca-OMe

Ana Tarandek, 0058213639

Sažetak: U ovom završnom radu opisani su priprava i konformacijska svojstva ferocenskog dipeptida **1** (Boc-L-Pro-Fca-OMe) koji se priprema kopulacijom ferocenske aminokiseline (Fca, **I**) s L-Pro primjenom standardnog HOBt/EDC postupka. Da bi se ispitalo utjecaj uvođenja prolina na tvorbu intramolekulskih vodikovih veza (IHB), te posljedično i na konformacijski prostor koji ferocenski dipeptid zauzima u otopini, provedena je spektroskopska analiza (IR-, NMR- i CD-spektroskopija). Kristalografskom analizom ispitana je mogućnost tvorbe IHB u čvrstom stanju. Pokazalo se da u čvrstom stanju, kao i u otopini dolazi do tvorbe IHB veze koja rezultira 7-članim prstenom, odnosno γ -okretom.

Ključne riječi: peptidi, prolin, ferocen, kristalna struktura, vodikova veza

Rad sadrži: 24 stranice, 12 slika, 1 tablica, 1 shema, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 01. rujna 2020

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Preparation and conformational analysis of ferrocene dipeptide

Boc-L-Pro-Fca-OMe

Ana Tarandek, 0058213639

Abstract: The research conducted in this work includes the preparation and structural characterization of ferrocene dipeptide **1** (Boc-L-Pro-Fca-OMe), by copulation ferrocene amino acid (Fca, **I**) and L-Pro using standard HOBT/EDC method. To examine the effect of proline introduction on formation of intramolecular hydrogen bond (IHB) in solution, the detailed conformational analysis (IR, NMR- and CD-spectroscopy) in solution was performed. Crystallographic structure of dipeptide **2** in solid state was determined to explore possibility of IHB formation. It has been shown that the formation of intramolecular hydrogen bonding in solid state occurs, forming 7-membered ring, *i.e.* γ -turn. Same pattern is retained in solution state.

Keywords: peptides, proline, ferrocene, crystal structure, hydrogen bond

Thesis contains: 24 pages, 12 figures, 1 tables, 1 sheme, 35 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. Monika Kovačević, Assistant Professor

Defence date: September 1st 2020

SADRŽAJ

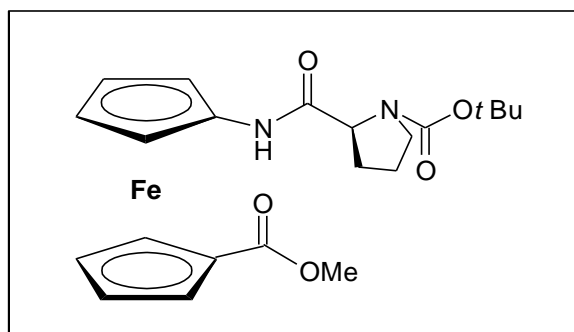
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Ferocen	2
2.2. Peptidi	3
2.3. Prolin.....	Error! Bookmark not defined.
2.4. Važnost prolina u peptidima i proteinima	7
2.5. Dipeptidi izvedeni iz ferocena i različitih prirodnih aminokiselina.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.2. Metode	11
3.2.1. Postupak pripreve Boc-L-Pro-Fca-OMe (2)	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Uvod	14
4.2. Kristalografska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1)	16
4.3. IR- spektroskopska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1).....	16
4.4. NMR-spektroskopska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1)	17
4.5. CD-spektroskopska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1).....	20
5. ZAKLJUČCI	21
6. LITERATURNI IZVORI	22

1. UVOD

Ferocen je bioorganometalni spoj koji je stabilan u biološkom mediju, redoks-aktivan je, lipofilan i olakšano prolazi kroz staničnu membranu, niske je toksičnosti te se jednostavno može kemijski modificirati. [1-2] Zbog toga je našao široku primjenu u katalizi, kemiji materijala te u medicini zahvaljujući poboljšanoj farmakološkoj aktivnosti ferocenom-modificiranih biološki aktivnih molekula. [3-5]

Rezultati mnogih istraživanja ukazuju da aminokiselina prolin (Pro) u peptidima uzrokuje povećanje biološke aktivnosti. Spojevi modificirani prolinom utječu na povećanje antimikrobne aktivnosti, a zbog specifične građe svog pobočnog ogranaka mogu utjecati i na trodimenzionalnu strukturu proteina.

U ovom radu opisat će se sinteza ferocenskog dipeptida **1** (Boc-L-Pro-Fca-OMe) koji se priprema kopulacijom ferocenske aminokiseline (Fca, **I**) s L-Pro primjenom standardnog HOBt/EDC postupka (slika 1.). Konformacijska analiza spoja provest će se da bi se ispitalo utjecaj uvođenja prolina na tvorbu intramolekulskih vodikovih veza [IHB, (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*)].



1 (Boc-L-Pro-Fca-OMe)

Slika 1. Struktura ferocenskog dipeptida **1** (Boc-L-Pro-Fca-OMe)

Konformacijska analiza dipeptida **1** u otopini provest će se standardnim spektroskopskim metodama (IR-, NMR- i CD-spektroskopija), a obrazac vodikovih veza u čvrstom stanju ispitat će se kristalografskom analizom.

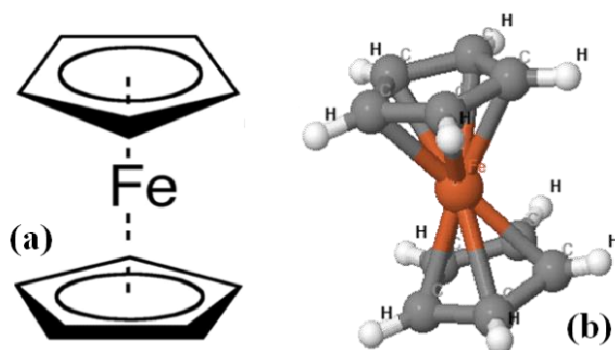
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ferocen

Proučavanjem konjugata organometalnih spojeva i biomolekula (steroida, šećera, peptida, aminokiselina, vitamina, enzima i DNA) razvila se relativno nova znanstvena disciplina pod nazivom bioorganometalna kemija. Spoj koji sadrži barem jednu vezu metal-ugljik koja potječe iz organske molekule smatra se organometalnim spojem. [6] Otkrićem ferocena pojavljuje se novo razdoblje eksplozivnog razvitka organometalne kemije. [7] Od tada su granice organometalne kemije proširene u raznim smjerovima, a uz teorijska načela postignuti su i mnogi primjenjivi rezultati. Na strukturu i svojstva organometalnih spojeva osim metala utječu i ligandi pa su oni po fizikalnim svojstvima često sličniji organskim nego anorganskim spojevima. Ferocen $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]$ je organometalni spoj aromatskog karaktera čije je sustavno ime bis(η^5 -ciklopentadienil)željezo(II). Neka od najvažnijih svojstva ferocena su:

- termostabilnost (stabilan do 400°C) s talištem na temperaturi od 172.5°C ,
- stabilnost na zraku,
- dobra topljivost u organskim otapalima. [8]

Ferocen tvore dva ciklopentadienilna prstena između kojih je smješten atom željeza. Najpoznatiji je predstavnik metalocena, spojeva s takozvanom strukturom „sendviča“, u kojima se metalni atom nalazi između organskih prstenastih struktura (slika 2.). [9]



Slika 2. a) Strukturna formula molekule ferocena, b) 3D struktura molekule [10]

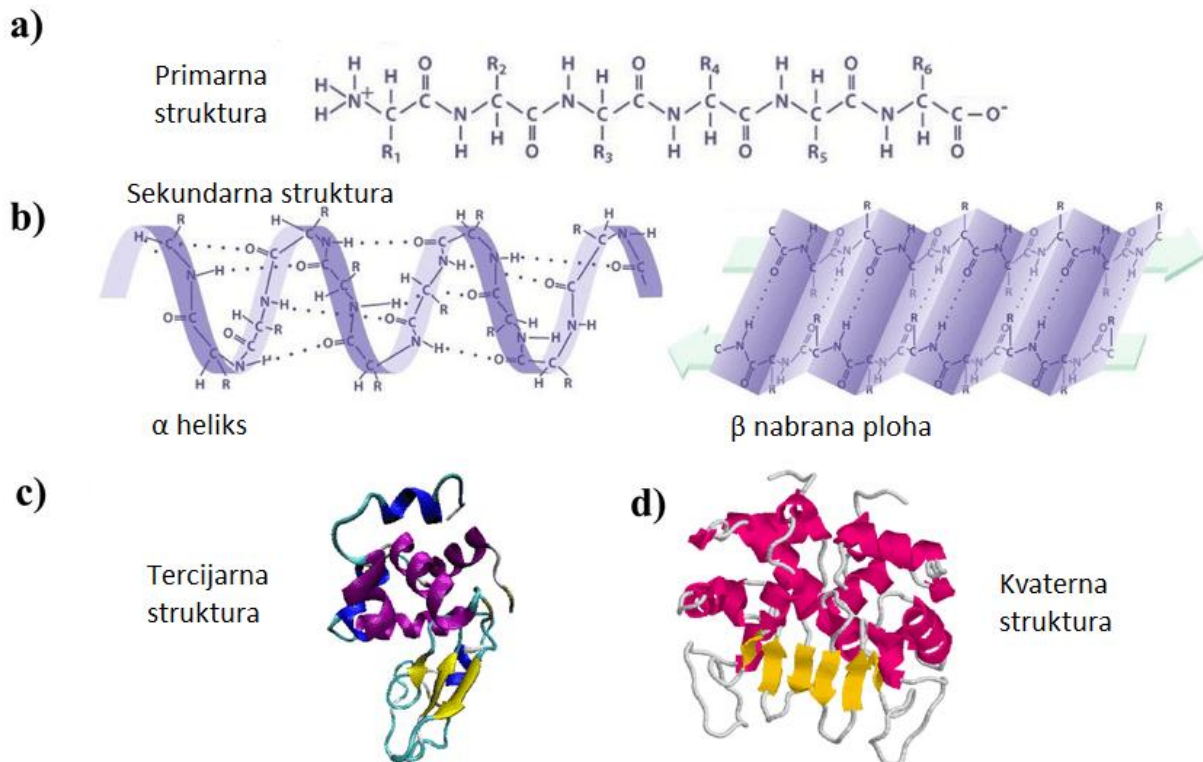
Nakon otkrića ferocena izvedene su brojne elektrofilne supstitucije. U usporedbi s benzenom utvrđena je veća reaktivnost pri čemu su limitirajući faktori sklonost protoniranju i reakcijama s Lewisovim kiselinama te oksidacije željeza u fericenijev ion. [9] Metalni kompleksi

aromatskih ugljikovodika (metaloceni) počeli su se intenzivno istraživati nakon otkrića ferocena u kojem se javlja novi tip veze Fe-Cp čiji je opis okrunjen Nobelovom nagradom. [7] Kod ferocena je formalno stabilni 6π -elektronski ciklopentadienilni anion (Cp^-) vezan za željezov (II) ion. Smatra se da je riječ o delokaliziranoj vezi u kojoj sudjeluju svi atomi liganada. Odlikuje se velikom stabilnošću i reakcijama elektrofilne supstitucije upravo zbog svoje 18-elektronske strukture koja je svojstvena plemenitim plinovima. [9] Iako su najpoznatije reakcije s ferocenom upravo elektrofilne supstitucije i reverzibilna oksidacija ferocena u ferocijanid, reakcije izmjene liganda također su bogati izvor makromolekula i nanomaterijala koji sadrže ferocen. Pokazuje se veliki interes za primjenu organometalnih spojeva, a posebice redoks para ferocen/ferocenij u medicini. Redoks par ferocen/ferocenij koristi se kao redoks posrednik za amperometričku analizu glukoze u krvi. Najviše korišteni lijek na bazi ferocena je ferokin, a koristi se kao lijek u liječenju malarije. [8] Osim u medicini derivati ferocena primjenjuju se u biokemiji i mikrobiologiji, te se također primjenjuju u znanosti o materijalima (ferocenski senzori, elektrooptički materijali, ferocenski polimeri). Zahvaljujući elektrofilnim svojstvima ferocena njegovi se konjugati s biomolekulama često rabe kao biosonde (za određivanje DNA) ili kao već spomenuti amperometrijski biosenzori (za određivanje glukoze u krvi). [9] Zahvaljujući raznolikosti svojstava i funkcija te jednostavnosti i bogatstvu njegove primjene, ferocen se postavlja kao središte velikog broja istraživanja u području molekularnih materijala, što će zasigurno pridonijeti razvoju nanoznanosti. [8] Aromatska reaktivnosti ferocena te stabilnosti ferocena u biološkom okolišu omogućuje njegovu primjenu kod aktiviranja aminokiselina, razvitka imunoloških postupaka te kontrole sinteze peptida. 1957. godine po prvi put sintetiziran je ferocenski spoj koji u sebi sadrži aminokiselinu - ferocenilalanin. [11]

2.2. Peptidi

Peptidi su kratki polimeri aminokiselinskih monomera vezani peptidnim vezama. Povezivanjem najmanje dvije aminokiseline nastaju peptidi. U kemijskoj reakciji sudjeluju amino skupina jedne aminokiseline i karboksilna skupina druge aminokiseline. Primarna struktura peptida određena je slijedom aminokiselina koje su u polipeptidnom lancu vezane peptidnom vezom (slika 3). Zbog stvaranja intramolekulskih vodikovih veza IHB (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*) između donorskih i akceptorskih skupina unutar istog ili između susjednih peptidnih lanaca dolazi do stvaranja sekundarne strukture. Sekundarnu strukturu čine α -uzvojnica, β -nabrana ploha te različiti okreti. [12] IHB obrascem određuje se sekundarna struktura koju će peptid poprimiti:

- α -uzvojnica karakterizirana je vodikovim vezama između NH-skupine aminokiselinskog ostatka i i CO-skupine aminokiselinskog ostatka $i+4$ pri čemu se zatvaraju 13-člani prstenovi unutar istog lanca,
- β -nabrana ploha stabilizira se vodikovim vezama između dvaju različitih polipeptidnih lanaca; s obzirom na njihovo usmjerenje β -nabrana ploha može biti paralelna (lanci su orijentirani u istom smjeru i tvore 12-člane prstenove) ili antiparalelna (izmjenjuju se 10- i 14-člani prstenovi),
- okreti pospješuju stabilnost proteina te imaju važnu ulogu u nabiranju. Budući da omogućavaju promjeru smjera polipeptidnih lanaca, odgovorni su za globularni oblik proteinskih molekula. Ovisno o broju konstituirajućih ostataka dijele se na α -, β -, γ -, δ - i π -okrete. Stabilizirani su intramolekulskim NH...OC vodikovim vezama: zatvaranjem 7-članog prstena nastaju γ -okreti, 10-člani prsten odgovara β -okretu, dok 13-člani prsten rezultira α -uzvojnicom. β -Okreti su najčešći okreti, a definiraju se kao tetrapeptidne sekvence u kojima udaljenost između ostataka $C_{\alpha}(i)$ i $C_{\alpha}(i+3)$ mora biti manja ili jednaka 7Å. Karakteriziraju ih vrlo izražena hidrofilna svojstva, zbog čega su smješteni na površini proteinske molekule, te sudjeluju u procesima molekuskog prepoznavanja kao i u interakcijama različitih liganada s njihovim proteinskim receptorima. [13]



Slika 3. Struktura peptida i proteina [14]

Tercijarna struktura prostorni je odnos aminokiselinskih ostataka nastao formiranjem veza između aminokiselinskih ostataka. Kvaterna struktura nastaje povezivanjem više polipeptidnih lanaca.

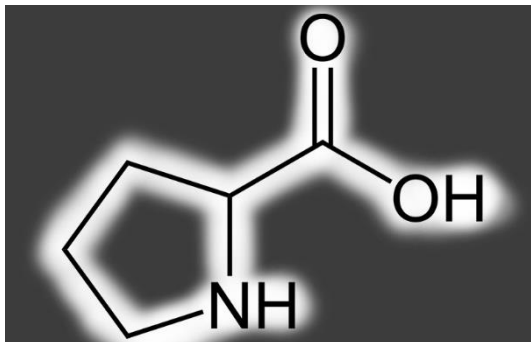
Peptidi i proteini sudjeluju u svim životno važnim funkcijama. Zbog velike biološke i strukturne raznolikosti pokazuju mogući terapijski potencijal, no uporaba peptida kao lijekova ograničena je njihovim nepovoljnim svojstvima:

- sklonost zauzimanju brojnih energetski ekvivalentnih konformacija koje omogućuju međudjelovanje s neželjenim receptorima kao i s proteolitičkim enzimima,
- nestabilnost u fiziološkim uvjetima,
- polarni karakter koji onemogućuje prolazak kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru. [12]

Uporabom odgovarajućih mimetika omogućena je modifikacija nepovoljnih prirodnih peptida s ciljem njihove kliničke primjene. Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji kao ligandi mogu oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora, odnosno spojevi čija su sekundarna strukturna svojstva analogna prirodnim peptidima uslijed čega mogu oponašati njihove biološke funkcije. Kao mimetici α -uzvojnice i okreta između ostalog koriste se ferocenski peptidi ili sam ferocen dok se za β -plohe koriste ciklički i aciklički peptidi. [12]

2.3. Prolin

Prolin (Pro, P) (slika 4.) jedna je od 20 aminokiselina. Budući da je neesencijalna kiselina, u ljudski organizam se unosi hranom.



Slika 4. Strukturna formula prolina [15]

Biosinteza prolina može se odvijati na dva načina. Prvi način je fosforilacija i redukcija karboksilnog dijela lanca glutamata. Produkt reakcije glutamat- γ -semialdehid spontano se ciklizira u δ -1-prolin-5-karboksilat. Redukcijom ovog međuprodukta nastaje prolin. Kod sisavaca biosinteza prolina odvija se na drugi način, putem ciklusa ureje. Arginin kod ovog puta sinteze služi kao međuprodukt koji prelazi u ornitin. Iz ornitina i α -ketoglutarata uz pomoć ornitin α -aminotransferaze nastaje glutamat- γ -semialdehid koji se spontano ciklizira u δ -1-prolin-5-karboksilat. Redukcijom međuprodukta nastaje prolin. Kodoni za sintezu prolina su CCU, CCC, CCA i CCG. [13] U fokusu je istraživanje u području sintetski mimetika peptidne sekundarne strukture zbog toga što prolinski ostaci u linearnim, cikličkim i globularnim proteinima uzrokuju tvorbu 10-članog β -okreta, a upravo je β -okret ključan element prepoznavanja u interakcijama receptor-ligand. Prolinski ostaci prepoznatljivi su po jedinstvenoj strukturi koja osigurava njihovu funkcionalnost. Bočni ogranak kovalentno vezan na dušikov atom iz glavnog lanca stvara pirolidinski prsten. Upravo je zbog toga onemogućeno sudjelovanje prolina u vodikovim vezama, a ograničena je i rotacija oko N-C α veze. Planarne amidne veze u peptidima mogu zauzeti *trans*- i *cis*-konfiguraciju. Najčešće zauzimaju *trans*-konformaciju u kojoj se dva C α -atoma nalaze na suprotnim stranama peptidne veze dok se u *cis*-konformaciji javlja sterička napetost između bočnih ogranaka vezanih na C α -atome. U prirodnim peptidima omjer *trans*- i *cis*-oblika iznosi 95:5. Prolinska imidna veza pokazuje smanjeni afinitet za *trans*-konformaciju zbog toga što dušikov atom vezan na dva susjedna tetraedarska ugljikova atoma smanjuje steričke razlike između *trans*- i *cis*-oblika te se njihov omjer smanjuje na 70:30. [12] Prolin osigurava zaštitu proteinske

strukture na način da smanjuje osjetljivost proteina na većinu peptidaza te povećava aktivnost raznih enzima. [16, 17] Također, kao najznačajnija biološka uloga prolina smatra se vezanje i neutralizacija štetnih tanina unesenih hranom i pićem. Naime, proteinima sline pripada 70% prolinom bogatih proteina. [18] Hidroksiprolin izgrađuje kolagen koji je neophodan za stvaranje i funkciju kože, hrskavica i kostiju. [12]

2.4. Važnost prolina u peptidima i proteinima

MacArthur i Thornton u svom su istraživanju proučavali utjecaj aminokiseline prolin na trodimenzionalnu strukturu proteina. Pratila se konformacija samog prolina, učestalost pojave *cis*- ili *trans*-peptida te utjecaj prolina na konformaciju derivata proteina. Ovim istraživanjem postavile su se određene smjernice i pravila kojima se može predvidjeti sekundarna struktura proteina. Pristup koji omogućuje predviđanje sekundarne strukture proteina podrazumijeva prepoznavanje određenih sekvenci i uzoraka koji određuju sekundarnu strukturu samog proteina (α -uzvojnica, β -nabrana ploha te različiti okreti). Prolin se oduvijek smatrao ključnom aminokiselinom kod smatanja proteina zbog svojih jedinstvenih svojstava. U ovom radu uočeno je da se većina aminokiselinskih ostataka koji prethode prolinu nalazi u β obliku, no dobiven je i značajan broj aminokiselinskih ostataka koji prethode prolinu u α obliku. [19]

Ganguly i Basu u svojem su znanstvenom radu istraživali utjecaj cikličnog bočnog lanca aminokiseline prolin na okosnicu peptida i kuteve pobočnih ogranaka. Djelovanje prolina utječe na dva ravnotežna oblika. Jedan oblik govori o prostornom razmještanju okosnice proteina (*cis* i *trans* oblici), a drugi o razmještanju pobočnih ogranaka (egzo i endo). Raznim supstitucijama na prolinskom prstenu stvaraju se dodatni sterički i stereoelektrični efekti koji mogu mijenjati prije spomenute oblike peptida. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako samo prolin, od svih aminokiselina može tvoriti takozvani izomer u *cis* obliku pobočnog ogranka. [20]

Jedinstvene konformacijske restrikcije prolina mogu se promijeniti raznim supstitucijama, npr. prevođenje prolina u 4-Hyp i 3-Hyp uočeno je kod kolagena te je utvrđeno da se zbog toga mijenja stabilnost samog proteina. Mehanizam koji uzrokuje ovu pojavu naziva se stereoelektrični efekt. U radu su istraživane i razne druge supstitucije na mjestima: α -, 3-, 4-, i 5-, koje ovisno o supstituentu, dovode do kompaktnije ili proširene

konformacije peptida. U ovom su radu istraživani samo monosupstituirani prolina dok polisupstituirani prolina imaju dodatnu steričku i stereoelektričnu kontrolu. [20]

Krane je u svom znanstvenom radu proučavao kolagen, specifični protein koji se posttranslacijski modificira, a u prosjeku se sastoji od 33% glicina, 10% prolina, 10% 4-hidroksiprolina i 0.1 % hidroksiprolina. Rad se bazira na proučavanju jedinstvenih uloga prolina i modificiranih oblika prolina u strukturi i biološkoj stabilnosti, ali i proteolitičkoj degradaciji kolagena tipa 1. Dobiveni rezultati ukazuju kako prolina i 4-hidroksiprolina imaju funkciju stabilizacije strukture uzvojnice u molekulama kolagena. Pozicija prolina i 4-hidroksiprolina u kolagenskim tripletima utječe na osjetljivost kolagena na cijepanje u jedinstvenom lokusu od strane kolagenaza. [21]

Rezultati mnogih istraživanja ukazuju da aminokiselina prolin u peptidima uzrokuje iznimnu biološku aktivnost. Tako su Misiura i Miltyk u svom radu istraživali regulatorne peptide s prolinom. U ovu skupinu spojeva pripadaju također i Gly-Pro, Pro-Gly-Pro, ciklični Gly-Pro te razni derivati Pro-Gly-Pro. Dokazano je da ovi spojevi sudjeluju u raznim proinflamatornim procesima kod bolesti pluća i probavnog sustava te imaju antikoagulacijsku aktivnost. Mehanizam djelovanja ovih spojeva nije još objašnjen [22]

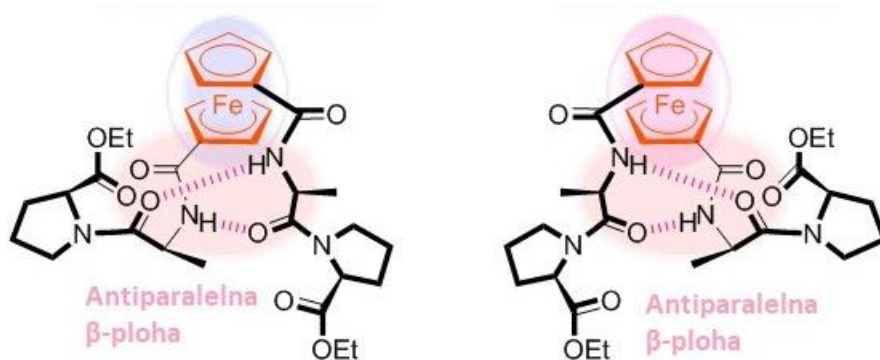
Graf i sur. su u svom znanstvenom radu istraživali antimikrobne peptide, s posebnim naglaskom na podvrsti ovih peptida- antimikrobnim peptidima bogatim prolinima (PrAMPs). PrAMPs pripadaju u grupu kationskih peptida koji su bogati prolinskim ostacima i često su zajedno s argininskim ostacima organizirani u konzervirane uzorke. Ova se podvrsta antimikrobnih peptida veže na ribosome mikroorganizama i time onemogućuje daljnju sintezu proteina. Biokemijska i strukturna istraživanja su pokazala kako se PrAMPs vežu na „izlaz“ ribosoma u obrnutoj orijentaciji u odnosu na rastući polipeptidni lanac. Ovime PrAMPs omogućuju proces inicijacije, ali onemogućuju prelazak u fazu elongacije translacije. [23]

2.5. Dipeptidi izvedeni iz ferocena i različitih prirodnih aminokiselina

Ferocen je predmet raznih istraživanja već više od šest desetljeća. U početku je pozornost bila usmjerena na sintezu derivata ferocena koji nose farmakoforne skupine (značajke koje su neophodne za molekularno prepoznavanje liganda), tj. oligonukleotide, razne heterociklične skupine, aminokiseline, peptide i šećere. *In vitro* i *in vivo* istraživanja pokazuju kako većina ovakvih konjugata ferocena posjeduju široku biološku aktivnost uključujući antianemičnu, antimikrobnu, antibakterijsku, antimalarijsku te antitumorsku. [24]

Feroceron je lijek na bazi ferocena i uspješno se koristi već duži period za liječenje anemije.[25] Dobiveni rezultati Rodionova i sur. kao i literaturni podaci sugeriraju kako aminokiseline modificirane ferocenom mogu imati značajan utjecaj na neurodegenerativne procese. Poznato je kako ferocen utječe na njime modificirane spojeve iniciranjem povoljnih svojstava. Najprije, značajno smanjuje njihovu toksičnost i povećava njihovu mogućnost penetracije kroz lipidne membrane. Nadalje, omogućuje ovakvim spojevima da postoje u ionskom i neutralnom obliku, što omogućuje njihov transport u krvi, ali i preko membrana u citoplazmu. Prednost feroceni-supstituiranih spojeva je mogućnost oksidacije i redukcije pri fiziološkom pH, zbog čega se ovi spojevi smatraju nekom vrstom posrednika u različitim reakcijama. [24]

Moriuchi i sur. u svom radu istraživali su mogućnosti kontrole helične kiralnosti i nastajanje sekundarnih proteinskih struktura u bioorganometalnim konjugatima ferocendipeptida što je postignuto podešavanjem konformacijske fleksibilnosti samih dipeptidnih lanaca. U dosad promatranim sustavima, heličnu kiralnost konjugata određuje apsolutna konfiguracija susjedne aminokiseline. Uspješno je inducirana *M*- i *P*-helična kiralnost (slika 5.), iako konfiguracija susjedne aminokiseline ostaje jednaka. [26]



Slika 5. *M*-helična kiralnost (*desno*) i *P*-helična kiralnost (*lijevo*) [27]

Zanimljivo je kako se *M*-helična kiralnost inducira u cikličnom konjugatu ferocendipeptida sastavljenog od L-Ala-D-Pro-cistamin-D-Pro-L-Ala sekvenci dipeptida, u kojem je nastala sekundarna struktura nalik II β -okretu. U prijašnjem radu ovih autora naglašeno je kako niz konjugata ferocenskih dipeptida dobivenih iz 1,1'-ferocenedikarboksilne kiseline mogu uzrokovati heličnu kiralnost preko intramolekulskih vodikovih veza dipeptidnih lanaca. Zaključeno je da prikladna regulacija konformacijske stabilnosti omogućuje nastajanje strukture nalik II β -okretu čime se inducirala *M*-helična kiralnost koja je suprotna onoj koju su inducirali ferocenski dipeptidi dobiveni iz 1,1'-ferocenedikarboksilne kiseline. [26]

Wang i sur. u svom su znanstvenom radu pronašli novi racionalan dizajn za kiralne nanostrukture koje se baziraju na hijerarhijskom sastavljanju ferocenskog dipeptida, tj. ferocen-L-Phe-L-Phe-OH (Fc-FF). Uspoređujući ovaj sustav s ostalim kiralnim samozdružujućim sustavima, Fc-FF je jedinstven po svojoj manjoj veličini, biokompatibilnosti, mnogim funkcijama (redoks centar) i utjecajem na svoju okolinu. Precizna ekspresija Fc-FF dovodi do formiranja mnogih različitih kiralnih nanostrukture. U ovom su radu predložili 3 strategije kojima se može kontrolirati kiralnost ovog spoja pri različitim stupnjevima samozdružujućih peptida:

- ubacivanje suprotnih iona između Fc-FF β -plohe dovodi do strukturne mutacije kojom se antiparalelne β -plohe pretvaraju u uvrnute β -plohe;
- povećanje temperature potiče promjenu heličnog zakretanja ploha u dobro definirane kiralne nanostrukture dok smanjenje temperature dovodi do sastavljanja nanostrukture trombocita ili jednog kristala. Malim promjenama temperature može se precizno kontrolirati promjer, kut zakretanja i uređenost kiralnih samozdružujućih kiralnih nanostrukture;
- polarnost otapala potiče inverzije kiralnih interakcije i povećava hidrofobne interakcije između Fc-FF molekula, čime se može kontrolirati uređenost i promjer nastalih kiralnih nanostrukture. [28]

Inhibitori bazirani na peptidima postepeno se implementiraju kao lijekovi za tretiranje bolesti koje su uzrokovane pogrešnim smatanjem proteina zbog njihove poželjne biokompatibilnosti i niske toksičnosti. Yao i sur. su, kako bi se razvile potencijalne terapijske strategije za tretiranje poremećaja povezanih sa amiloidima, modificirali kratke peptide s ferocenom. Dobiveni su spojevi ferocen-L-Phe-L-Phe (Fc-FF) i ferocen-L-Phe-L-Tyr (Fc-FY) korišteni kao inhibitori za proučavanje agregacije inzulina. Predvidjeli su postojanje jakih intermolekulskih interakcija između Fc-peptida i inzulina metodom molekularnog spajanja. Eksperimenti su potvrdili inhibitorno djelovanje Fc-FF i Fc-FY što je dovelo do elongacije vremena t_{lag} , smanjenja umrežavanja inzulina i djelomične razgradnje inzulinskih vlakana. Dodavanjem Fc-peptida u različitim vremenima, dokazano je da je inhibitorno djelovanje posljedica interakcija Fc-peptida i inzulinskih monomera. [29]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima.[30]

3.2. Metode

Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat = 5:1 kao eluensâ. Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonance (NMR), HRMS analize i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 u CH₂Cl₂.

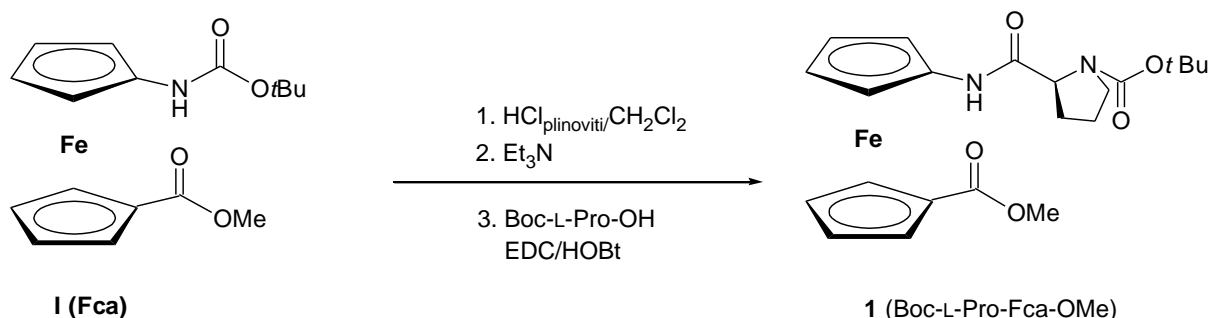
¹H- i ¹³C-NMR-spektri određeni su u CDCl₃, Bruker Advance DRX 400 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm.

Maseni spektri izmjereni su na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS ionizacija). HRMS-spektri izmjereni su u Centru za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković.

UV/Vis- i CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH₂Cl₂ i DMSO.

Sinteza Boc-Fca (**I**) opisana je u literaturi [31], a spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima.

3.2.1. Postupak priprave Boc-L-Pro-Fca-OMe (2)



Shema 1. Sinteza ferocenskog dipeptida (Boc-L-Pro-Fca-OMe)

Boc-zaštićena ferocenska aminokiselina Fca **I** (1 g, 2,8 mmol) otopi se u diklormetanu, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30' miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u CH₂Cl₂ i obradi sa suviškom Et₃N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-L-Pro-OH (1,18 g, 5,5 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1 kao eluens.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3419 sr, 3405 sr (NH_{slobodni}), 3290 sr, 3234 sl (NH_{asocirani}), 1706 j (C=O_{COOMe}), 1694 j (C=O_{Boc}), 1655 j (C=O_{CONH}), 1561 j (amid II).

$t_f = 128-132$ °C; $R_f = 0,33$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1).

¹H NMR* (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,78 (s, 0,66H, NH_{trans}); 7,52 (s, 0,33H, NH_{cis}); 4,78 (s, 0,66H, CH_{Fn trans}); 4,77 (s, 0,66H, CH_{Fn trans}); 4,74 (s, 0,66H, CH_{Fn trans}); 4,71-4,69 (m, 0,66H, CH_{Fn trans}); 4,64 (s, 0,33H, CH_{Fn cis}); 4,49 (s, 0,34H, CH_{Fn cis}); 4,47 (s, 0,65H, CH_{Fn trans}); 4,43 (s, 0,34H, CH_{Fn cis}); 4,40 (s, 0,34H, CH_{Fn cis}); 4,38 (s, 0,7H, CH_{Fn trans}); 4,37 (s, 0,33H, CH_{Fn cis}); 4,36 (s, 1,03H, CH_{Fn cis} + CH_{Pro trans}); 4,27 (dd, 0,34H, $J = 3,4$ Hz, $J = 8,7$ Hz, CH_{Pro trans}); 4,11-4,09 (s, 0,68H, CH_{Fn cis}); 4,00 (brs, 1,35H, CH_{Fn trans}); 3,80 (s, 0,96 H, CH₃COOMe_{trans}); 3,78 (s, 2,06 H, CH₃COOMe_{cis}); 3,64-3,61 (m, 0,36H, CH_{Pro cis}); 3,53-3,50 (m, 0,36H, CH_{Pro cis}); 3,46-3,43 (m, 0,7H, CH_{Pro trans}); 3,31-3,26 (m, 0,7H, CH_{Pro trans}); 2,47 (šj, 0,3H,

CH. _{Pro cis}); 2,42-2,40 (m, 0,7H, CH. _{Pro trans}); 2,26-2,24 (m, 0,3H, CH. _{Pro cis}); 1,96-1,91 (m, 2H, CH. _{Pro}); 1,89-1,85 (m, 0,72H, CH. _{Pro}); 1,49 (s, 6H, CH_{3Boc trans}); 1,45 (s, 3H, CH_{3Boc cis}).

¹³C NMR*, APT (75 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 172,39 (CO_{COOMe cis}); 172,21 (CO_{COOMe trans}); 171,52 (CO_{CO-NH cis}); 170,24 (CO_{CO-NH trans}); 156,34 (CO_{Boc trans}); 155,06 (CO_{Boc cis}); 95,30 (C_{qFn trans}); 93,94 (C_{qFn cis}); 81,19 (C_{qFn}); 80,91 (C_{qBoc trans}); 73,04; 71,10; 70,69; 66,54; 66,33; 62,54; 62,40; (CH_{Fn trans}); 72,74; 71,44; 70,95; 66,84; 66,82; 63,77; 62,98 (CH_{Fn cis}); 72,90 (CH_{Fn}); 61,59 (CH. _{Pro cis}); 59,83 (CH. _{Pro trans}); 52,25 (CH_{3COOMe cis}); 52,08 (CH_{3COOMe trans}); 47,17 (CH_{2. Pro}); 31,21 (CH_{2. Pro cis}); 28,33 (CH_{3Boc}); 27,21 (CH_{2. Pro trans}); 24,71 (CH_{2. Pro trans}); 23,77 (CH_{2. Pro cis}).

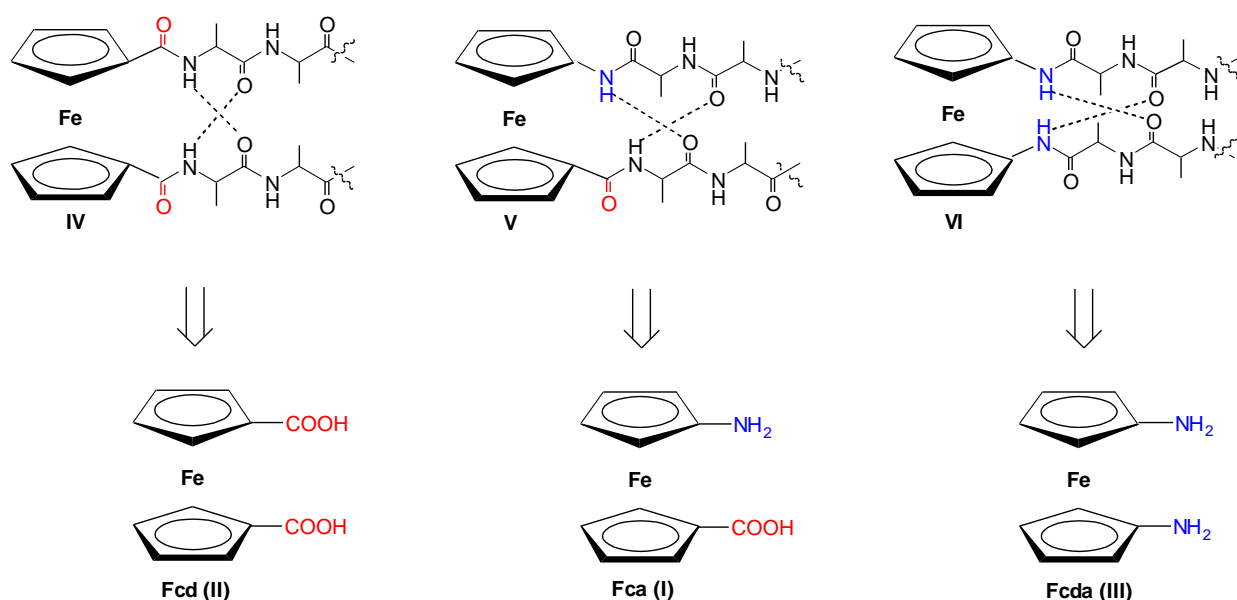
*Zbog slabog razdvajanja signala pri sobnoj temperaturi, NMR-spektri snimljeni su pri 228 K.

HRMS analiza za C₂₂H₂₈N₂O₅Fe (456,1342) nađeno: 456,132.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Put prema tvorbi velikih, kompleksnih ferocenskih peptida koji će zahvaljujući nadogradnji početne ferocenske molekule različitim aminokiselinama imati veću mogućnost tvorbe vodikovih veza, pa samim time i veću mogućnost tvorbe različitih elemenata sekundarne strukture, započinje od najjednostavnijih ferocenskih peptida. Ovisno o građi ferocenskog sintona (slika 6.), moguće je pripremiti dipeptide kopulacijom ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline Fcd (**II**) odnosno 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline Fca (**I**), odnosno ferocen-1,1'-diamina (**III**) s prirodnim aminokiselinama (slika 6).



Slika 6. Ferocenski peptidi **IV-VI** izvedeni iz Fcd (**II**), Fca (**I**) i Fcda (**III**)

(IHB označene su isprekidanim crtama)

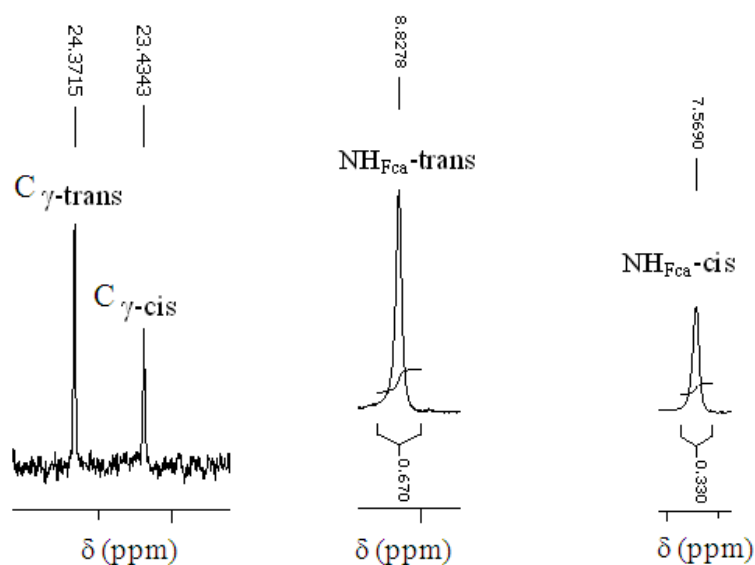
Spojevi koji nastaju konjugacijom takvim sintona s aminokiselinama - 1,1'-disupstituirani feroceni- nameću se kao učinkoviti bioorganometalni „kalupi“ zahvaljujući sposobnosti indukcije kiralnog uređenja u pripadajućim peptidima.

Ferocenski dipeptid **1** koji je pripremljen u ovom Završnom radu, predstavlja ishodišni dipeptid za tvorbu ferocenskih tri- i tetrapeptida.

Sinteza peptida **1** započinje deprotekcijom amino-skupine iz Fca (**I**) djelovanjem plinovitog HCl. Nakon obrade nastalog hidroklorida s Et₃N uslijedila je kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-L-Pro-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode pri čemu je dobiveni peptidi **1** (shema 1). Rezultirajući dipeptid dobiven je u visokom iskorištenju od 90% u obliku žutog praha koji je iskristalizirao u obliku žutih duguljastih kristala.

Mjerenjem ¹H- i ¹³C-NMR-spektara prolinskog peptida **1** pri sobnoj temperaturi dobiveni su prošireni i srasli signali koje nije bilo moguće asignirati. Stoga je njegova struktura određena mjerenjem NMR-spektara pri 228 K pri čemu je uočen dupli set signala koji odgovara *cis*- i *trans*-izomerima.

¹H-, ¹³C-, COSY- i HMBC NMR-spektroskopijom najprije smo asignirali prolinske *trans*- i *cis*-C_γ-atome pri δ = 24,37 odn. 23,43 ppm. Pri tomu smo viši kemijski pomak pripisali *trans*-izomeru, a prema visinama signala odredili smo njihov omjer (*trans* : *cis* = 67 : 33). Također, razlika kemijskih pomaka C_β- (δ = 26,87 ppm) i C_γ- atoma (δ = 24,37 ppm) iznosi 2,5 ppm što dodatno potvrđuje dominaciju *trans*-izomera. Isti omjer proizlazi i nakon integriranja signalâ izomernih amidnih protona (slika 7.).

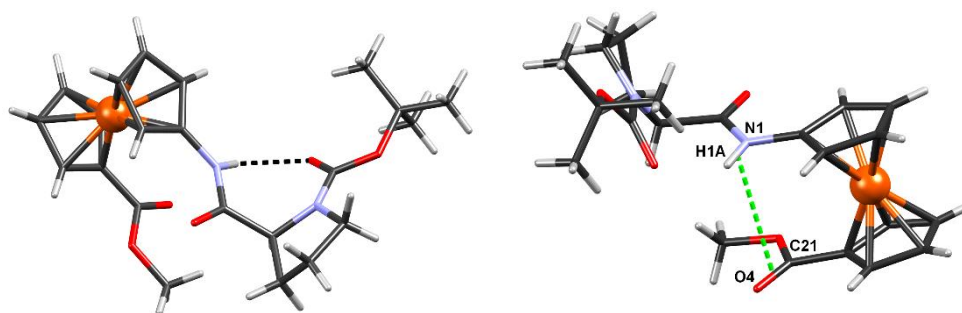


Slika 7. Kemijski pomaci *trans*- i *cis*-izomernih prolinskih C_γ- i amidnih protona u NMR-spektrima peptida **1** mjenenima pri 228 K

Konformacija prolinskog peptida **1** u čvrstom stanju utvrđena je kristalografskom analizom. Utjecaj prolinskog ostatka na konformaciju izvedenog biokonjugata **1** u otopini ispitan je CD-, IR- i NMR-spektroskopskom analizom.

4.2. Kristalografska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1)

Rendgenskom strukturnom analizom peptida **1** dobili smo točne trodimenzionalne podatke o njegovoj geometriji (slika 8.). Opaža se intramolekulska vodikova veza N-H \cdots O (udaljenosti N \cdots O odn. H \cdots O iznose 2,82 Å, odn. 2,11 Å; kut N-H \cdots O je 139°) (slika 8., *lijevo*) kao i intermolekulska dipolarna interakcija: veze N-H i C=O (s drugog ciklopentadienilnog prstena) (slika 8., *desno*) gotovo su paralelne (kut među njima je samo 6,5°) i udaljene su oko 3,35 Å. Očito ovdje dolazi do interakcije između antiparalelnih dipola, što dodatno stabilizira konformaciju molekule. Konformacija pirolidinskog prstena je blago izvijena "omotnica" (envelope). Među molekulama u kristalu nema jakih interakcija, tako da 3D-slagalinu drže slabe vodikove veze C-H \cdots O i interakcije C-H \cdots n.



Slika 8. Molekulska struktura peptida **1** u čvrstom stanju: IHB (*lijevo*) i dipolarna interakcija (*desno*)

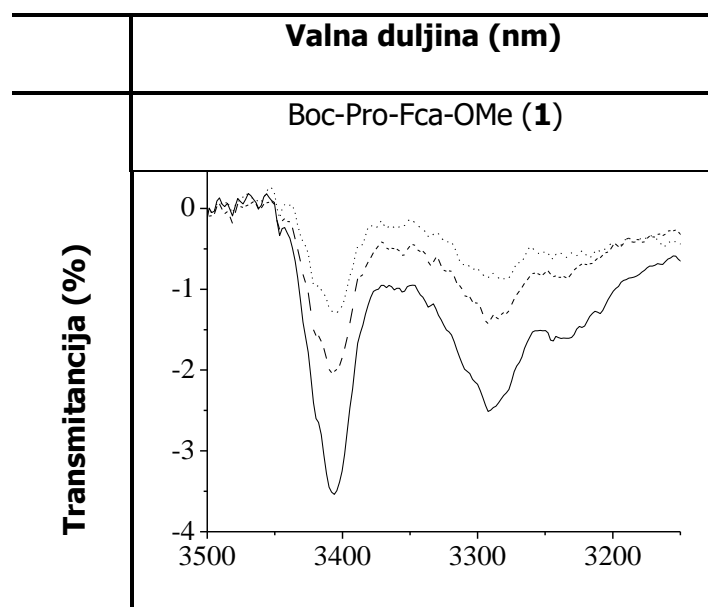
4.3. IR- spektroskopska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1)

IR-spektroskopija je metoda koja omogućava pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini. [32] Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm⁻¹ ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se signali iznad 3400 cm⁻¹ pripisuju slobodnim NH-skupinama.

Karakter vodikove veze (inter- ili intramolekulski) određuje se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara. Postupnim razrjeđivanjem otopine ispitivanog uzorka cijepaju se intermolekulske vodikove veze uslijed čega znatno opada intenzitet njihovih signala u području nižem od 3400 cm⁻¹. Ukoliko su, pak, u molekuli prisutne intramolekulske

vodikove veze njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

Nešto jači signal pri 3405 cm^{-1} u IR-spektru Boc-Pro-Fca-OMe (**1**) pripisuje se njegovim slobodnim NH-skupinama, dok signali pri 3290 cm^{-1} i 3238 cm^{-1} odgovaraju asociranim NH-skupinama (slika 9.). Omjer intenziteta slobodne i asocirane NH-skupine ne mijenja se razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida **1** što je jaka indikacija njegove stabilizacije intramolekulskom vodikovom vezom (IHB).



Slika 9. Koncentracijski ovisni IR-spektri^[a] biokonjugata **1**

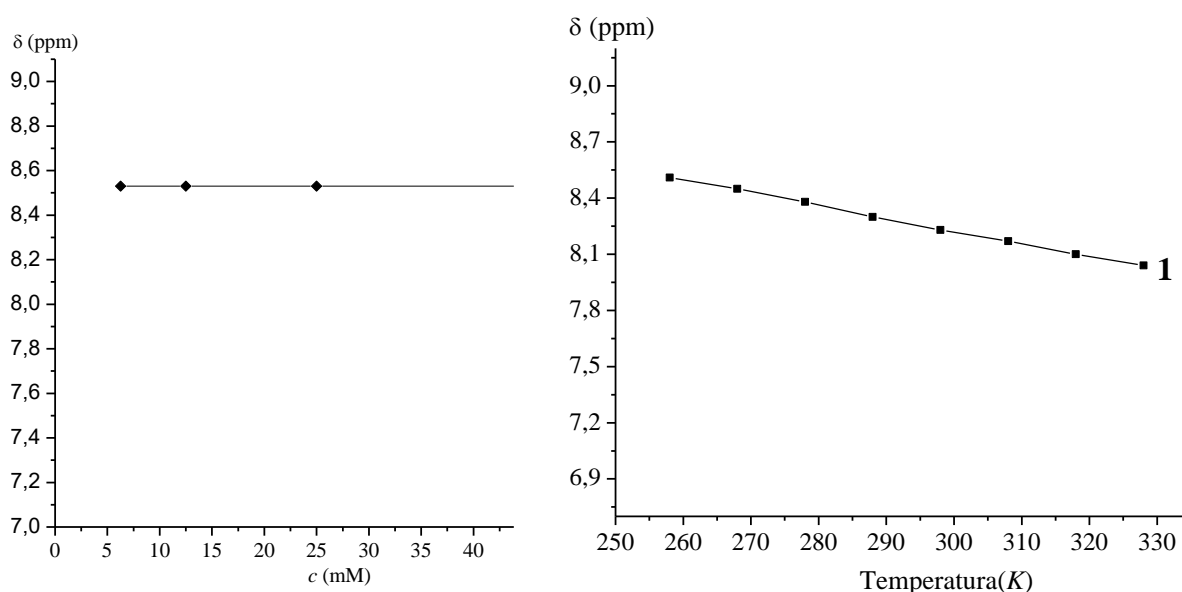
^[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2 , [(—) $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$, (----) $c = 2,5 \times 10^{-2}\text{ M}$, (....) $c = 1,25 \times 10^{-2}\text{ M}$].

4.4. NMR-spektroskopska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**)

NMR-spektroskopska analiza daje jasniji uvid u obrasce vodikovih veza, prethodno indiciranih IR-spektroskopijom. Naime, tom je tehnikom moguće razlikovati pojedine NH-skupine u molekuli te na temelju njihovih kemijskih pomaka zaključiti sudjeluju li u vodikovim vezama (kemijski pomaci iznad 7 ppm pripisuju se asociranim NH-skupinama).

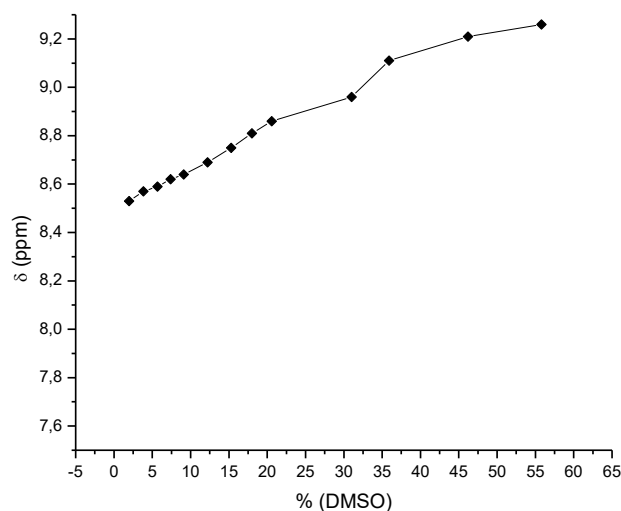
Visok kemijski pomak NH-skupine vezane za ferocensku jezgru u peptidu **1** (u aprotičnom CDCl_3) koji iznosi 8,53 ppm podržava vodikove veze indicirane nalazima IR-spektroskopije.

Prirodu vodikovih veza indiciranih IR- i NMR-analizom odredili smo mjerenjem koncentracijski i temperaturno ovisnih NMR-spektara. Pri tome smo imali na umu da se razrjeđivanjem ili zagrijavanjem cijepaju intermolekulske vodikove veze što uzrokuje pomak amidnih protona u više polje. Kako (i) postupnim smanjivanjem koncentracije te (ii) zagrijavanjem peptida **1** u CDCl_3 nije došlo do značajnijih promjena kemijskih pomaka NH-skupina vezanih za ferocensku jezgru, intramolekulski karakter vodikovih veza, predložen IR-spektroskopijom, dodatno je potvrđen (slika 10.).



Slika 10. Koncentracijska i temperaturna ovisnost kemijskih pomaka IHB-asociranih NH-skupina u peptidu **1**

Jakost IHB indiciranih naprijed opisanim rezultatima IR- i NMR-analize ispitana je titracijom s DMSO. Pri tome se očekuje značajan pomak u niže polje onih NH-protona koji su izloženi polarnom DMSO. S druge strane, ne očekuju se značajnije promjene kemijskih pomaka NH-protona doniranih u jake vodikove veze. Postupnim dodatkom do 20% DMSO kao akceptora vodikove veze ne dolazi do bitnije promjene kemijskog pomaka NH-skupine prolinskog peptida **1** što se tumači njezinim sudjelovanjem u jačoj IHB (slika 11.).



Slika 11. DMSO-titracija otopina peptida Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) u CDCl_3 ($c = 2,5 \times 10^{-2}$ M)

Svi naprijed opisani rezultati sugeriraju prisutnost IHB u peptidu **1**. Naime, IR-apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih i karbamatnih skupina indiciraju su njihovog angažmana u vodikovim vezama, dok NMR-analiza upućuje na sudjelovanje NH-skupina vezanih na ferocen u IHB-interakcijama. Da bi se dodatno rasvijetlio obrazac IHB, istraženi su i NOE-kontakti sudjelujućih amidnih skupina.

Na temelju rezultata spektroskopskih mjerenja, predložena je sljedeća konformacija peptida (tablica 1.):

- intralančana $\text{NH}_{\text{Fca}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ IHB koja rezultira 7-članim prstenom, odn. γ -okretom.

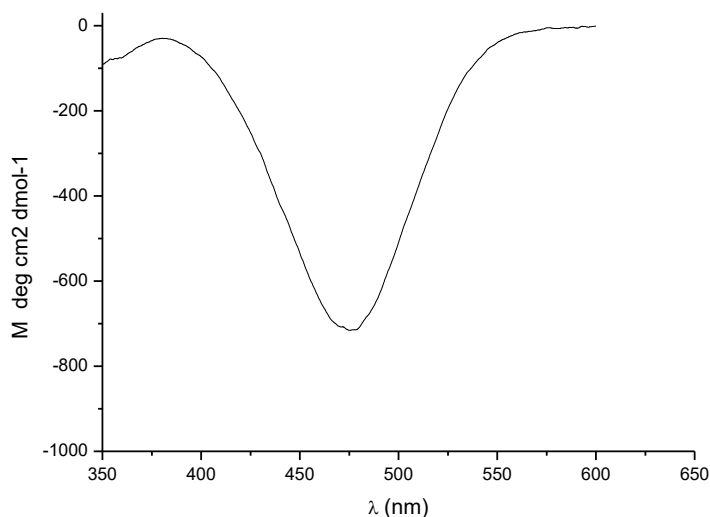
Tablica 1. NOE-kontakti (strelice) i intramolekulske vodikove veze (isprekidane crte) u mogućim konformacijama peptida **1**

Mogući konformeri	NOE kontakti
<p>1 (Boc-L-Pro-Fca-OMe)</p>	

4.5. CD-spektroskopska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1)

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja se koristi za određivanje sekundarnih strukturnih elemenata u kiralnim peptidima. [33,34] Pokazalo se da ferocenski kromofor ($\lambda \sim 480$ nm), inkorporiran u kiralno peptidno okruženje ferocenskih peptida inducira Cottonov efekt kao posljedicu helične kiralnosti uzrokovane interlančanim IHB.¹²⁻³⁵ Pri tomu je utvrđeno da na predznak Cottonovog efekta utječu otapalo, zaštitne skupine te vrsta i slijed vezanih prirodnih aminokiselina.

CD-aktivnost peptida **1** u području ferocenskog kromofora potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini (slika 12.). Slabi intenziteti njihovih Cottonovih efekata ($M_{\theta} < 1000$ deg cm² dmol⁻¹) odgovaraju ranije istraživanim kratkim ferocenskim peptidima. [35]



Slika 12. Cottonov efekt u CD-spektru peptida **1** u CH₂Cl₂ pri $c = 5 \times 10^{-3}$

5. ZAKLJUČCI

- Dipeptid Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) pripravljen je u visokom iskorištenju (90%).
- Mjerenjem ^1H - i ^{13}C -NMR-spektara prolinskog peptida **1** pri sobnoj temperaturi dobiveni su prošireni i srasli signali koje nije bilo moguće asignirati. Stoga je njegova struktura određena mjerenjem NMR-spektara pri 228 K pri čemu je uočen dupli set signala koji odgovara *cis*- i *trans*-izomerima.
- Rendgenskom strukturnom analizom peptida **1** utvrđena je intramolekulska vodikova veza $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}_{\text{Boc}}$.
- U IR-spektru Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) pronađene su dvije vrpce koje odgovaraju NH-skupinama: slobodnim i asociranim NH-skupinama.
- Omjer intenziteta slobodne i asocirane NH-skupine ne mijenja se razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida **1** što je jaka indikacija njegove stabilizacije intramolekulskom vodikovom vezom (IHB).
- Visok kemijski pomak NH-skupina (8,53 ppm) podržava vodikove veze indicirane nalazima IR-spektroskopije.
- Koncentracijski i temperaturno ovisni NMR-spektri potvrđuju intramolekulski karakter vodikovih veza koji je predložen IR-spektroskopijom.
- DMSO-titracija otopina peptida Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) ne ukazuje na bitnije promjene kemijskog pomaka NH-skupine prolinskog peptida **1** što se tumači sudjelovanjem u jačoj IHB.
- NOE-kontakti sudjelujućih amidnih skupina sugeriraju tvorbu intralančane $\text{NH}_{\text{Fca}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$ IHB koja rezultira 7-članim prstenom, odn. γ -okretom.
- CD-aktivnost peptida **1** u području ferocenskog kromofora potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini.

6. LITERATURNI IZVORI

- [1] Jaouen G. (2006), Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine. John Wiley & Sons, str. 1-31.
- [2] Štepička P. (2006) Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules, 1. izd., John Wiley & Sons Ltd.
- [3] Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N. (2011) Organometallic Anticancer Compound. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**: 3-25.
- [4] Štepička P. (2006) Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules, 1. izd., John Wiley & Sons Ltd.
- [5] Jaouen G., Top S., Vessières A., Leclercq G., McGlinchey M. J. (2001) The first organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs) and their relevance to breast cancer. *Current Medicinal Chemistry* **11**: 2505-2517.
- [6] Popović Z. (2012) Osnove kemije organometalnih spojeva, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- [7] Kealy T. J., Pauson P. L. (1951) A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature*, **168**: 1039–1040.
- [8] Astruc D. (2016). Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**: 6–29.
- [9] Rapić V. i Čakić Semenčić M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija, *Kemija u industriji* **60**: 61–79.
- [10] Photo-ignition process of multiwall carbon nanotubes and ferrocene by continuous wave Xe lamp illumination - Scientific Figure on ResearchGate. <https://www.researchgate.net/figure/Ferrocene-molecular-structure-a-and-its-view-as-a-3D-model-b_fig1_312298263> pristupljeno 10. kolovoza 2020.
- [11] Schlögl K. (1957) Über Ferrocen-Aminosäuren und verwandte Verbindungen. *Monatshefte für Chemie* **88**: 601–621.
- [12] Kovačević M. (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- [13] Stryer L. (1991) Biokemija (preveli Vuk-Pavlović S., Kućan Ž.), Školska knjiga, Zagreb.
- [14] Small angle X-ray scattering studies on proteins under extreme conditions - Scientific Figure on ResearchGate. <<https://www.researchgate.net/figure/Dierent-hierarchical>

[structures-in-proteins-a-Primary-structure-Polypeptide-chain_fig15_258020421](#)> pristupljeno 11. kolovoza 2020.

[15] <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.treningplatforma.com%2Fprolin%2F&psig=AOvVaw1s6Lmb80hz5Xi40ZRXuJbo&ust=1598694372844000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCKDwluzOvesCFQAAAAAdAAAAABAE>>

pristupljeno 12.kolovoza 2020.

[16] Szabados L. & Savouré A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**: 89–97.

[17] Yaron A., Naider F. (1993) Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**: 31-81.

[18] Mehansho H., Butler L. G., Carlson D. M. (1987) Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Induction, and Defense Mechanisms. *Annual Review of Nutrition* **7**: 423-440.

[19] MacArthur M. W. & Thornton J. M. (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *Journal of Molecular Biology* **218**: 397–412.

[20] Ganguly H.K., Basu G. (2020) Conformational landscape of substituted prolines. *Biophysical Reviews* **12**: 25–39.

[21] Krane S. M. (2008) The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens. *Amino Acids* **35**: 703–710.

[22] Misiura M., Miltyk W. (2019) Proline-containing peptides—New insight and implications: A Review. *BioFactors* **45**.

[23] Graf M., Mardirossian M., Nguyen F., Seefeldt A. C., Guichard G., Scocchi M., Wilson D. N. (2017) Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Natural Product Reports* **34**: 702–711.

[24] Simonneaux G. (2006) Bioorganometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

[25] Rodionov A. N., Snegur L. V., Simenel A. A., Dobryakova Y. V. & Markevich V. A. (2017) Ferrocene-modified amino acids: synthesis and in vivo bioeffects on hippocampus. *Russian Chemical Bulletin* **66**: 136–142.

[26] Moriuchi T., Nishiyama T., Nobu M. & Hirao T. (2017) Control of Helical Chirality of Ferrocene-Dipeptide Conjugates by the Secondary Structure of Dipeptide Chains. *Chemistry - A European Journal* **23**: 12704–12708.

[27] Chirality Induction in Bioorganometallic Conjugates - Scientific Figure on ResearchGate. <https://www.researchgate.net/figure/Ferrocene-dipeptide-conjugates-2-and-3_fig6_328289660> pristupljeno 19. kolovoza 2020.

- [28] Wang Y., Qi W., Huang R., Yang X., Wang M., Su R. & He Z. (2015) Rational Design of Chiral Nanostructures from Self-Assembly of a Ferrocene-Modified Dipeptide. *Journal of the American Chemical Society* **137**: 7869–7880.
- [29] Yao P., Zhang J., You S., Qi W., Su R. & He Z. (2020) Ferrocene-modified peptides as inhibitors against insulin amyloid aggregation based on molecular simulation. *Journal of Materials Chemistry B*.
- [30] Perrin D. D., Armarego W. L. F. (1998) Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press.
- [31] Barišić L., Rapić V., Kovač V. (2002) Ferrocene Compounds. XXIX.* Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croatica Chemica Acta* **75**: 199-210.
- [32] Kong J., Yu S. (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **39**: 549-559.
- [33] Pelton J. T., McLean L. R. (2000) Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Analytical Biochemistry* **277**: 167-176.
- [34] Comba A. (2011) Modeling of Molecular Properties: Heinze K., Hüttinger K., Siebler D. 'Elucidation of the Conformational Freedom of Ferrocene Amino Acid (Bio)Conjugates: A Complementary Theoretical and Experimental Approach, John Wiley & Sons, str. 325-345.
- [35] Moriouchi T., Kikushima-Honda N., Ohmura S. D., Hirao T. (2010) Design and characterization of ferrocene-peptide-oligoaniline conjugates. *Tetrahedron Letters* **51**: 4530-4533.

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.

Ana Taramdek

ime i prezime studenta