

Priprava i konformacijska analiza ferocenskih dipeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s aminokiselinama leucinom i alaninom

Mezić, Maj

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:897120>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2024.

Maj Mezić

**PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA
FEROCENSKIH DIPEPTIDA IZVEDENIH IZ
FEROCEN-1,1'-DIAMINA S
AMINOKISELINAMA LEUCINOM I
ALANINOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Monike Kovačević.

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2020-02-9162 (Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija) čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Moniki Kovačević na iznimnom strpljenju, trudu i velikoj pomoći tijekom cijelog diplomskog rada.

Zahvaljujem se kolegici Evelin koja mi je pomogla savladati prepreke novog fakulteta.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na strpljenju i brizi tijekom cijelog školovanja.

Posebno se zahvaljujem Matei na konstantnoj potpori i motivaciji bez koje bi studiranje bilo puno teže.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH DIPEPTIDA IZVEDENIH IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA S AMINOKISELINAMA LEUCINOM I ALANINOM

Maj Mezić, univ. bacc. ing. agr.
0178114023

Sažetak: Sintetski peptidi, odnosno peptidomimetici, sadrže strukturne značajke kojima se prevladavaju ograničenja prirodnih peptida. Oponašanje sekundarne strukture prirodnih peptida jedan je od mogućih pristupa u dizajnu peptidomimetika. Peptidomimetici na bazi ferocena imaju mogućnost zauzimanja sekundarnih strukturnih elemenata nakon inkorporiranja različitih aminokiselina, ovisno o njihovu kiralnosti i steričkim svojstvima C- i N- zaštitnih skupina.

Cilj ovog diplomskog rada bio je opisati sintezu i prikazati konformacijsku analizu biokonjugata Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-D-Leu-Boc (**6** i **7**), dobivenih iz ferocen-1,1'-diamina i aminokiselina leucina i valina. Korištenjem različitih spektroskopskih metoda (IR-, NMR- i CD-spektroskopija) ispitivao se utjecaj kiralnosti leucina na strukturu sintetiziranog dipeptida. Rezultati su pokazali kako konformacijski prostor homokiralnog dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**7**) odgovara prije pripremljenim konjugatima Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc (**VIII**) i Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**XI**). Uz to, utvrđeni su nepromijenjeni obrasci vodikovih veza nakon zamjene aminokiselina leucinom.

Ključne riječi: ferocen, sekundarna struktura, leucin, peptidomimetici, konformacijska analiza

Rad sadrži: 46 stranica, 22 slika, 1 tablica, 66 literaturnih navoda, 4 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Lidija Barišić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Anita Horvatić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjenski član)

Datum obrane: 4. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

PREPARATION AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF FERROCENE DIPEPTIDES DERIVED FROM FERROCENE-1,1'-DIAMINE WITH LEUCINE AND ALANINE AMINO ACIDS

Maj Mezić, univ. bacc. ing. agr.
0178114023

Abstract: Synthetic peptides, also known as peptidomimetics, have structural features that overcome the limitations of natural peptides. Mimicking the secondary structure of natural peptides is one of the possible approaches for the development of peptidomimetics. Ferrocene-based peptidomimetics have the ability to adopt secondary structure elements after the incorporation of different amino acids, depending on their chirality and the steric properties of the C- and N- protecting groups.

The aim of this work was to describe the synthesis and present the conformational analysis of the bioconjugates Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L/D-Leu-Boc (**6** and **7**), obtained from ferrocene-1,1'-diamine and the amino acids leucine and valine. Various spectroscopic methods (IR, NMR, and CD spectroscopy) were used to investigate the influence of the chirality of leucine on the structure of the synthesized dipeptides. The results showed that the conformational space of the homochiral dipeptide Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**7**) corresponds to the previously prepared conjugates Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc (**VIII**) and Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**XI**). In addition, unchanged hydrogen bonding patterns were observed after replacement of the amino acids with leucine.

Keywords: ferrocene, secondary structure, leucine, peptidomimetics, conformational analysis

Thesis contains: 46 pages, 22 figures, 1 table, 66 references, 4 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Monika Kovačević, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Lidija, Barišić, PhD, Full professor (president)
2. Monika, Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Anita, Horvatić, PhD, Assistant professor (member)
4. Antonela, Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 4th, 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PEPTIDI I NJIHOVA SVOJSTVA	2
2.2. PEPTIDOMIMETICI	5
2.3. SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PROTEINSKE STRUKTURE	6
2.4. BIOORGANOMETALNA KEMIJA	7
2.5. FEROCEN	8
2.6. FEROCENSKI PEPTIDOMIMETICI	9
2.7. FEROCENSKI PEPTIDI IZVEDENI IZ FCDA (VI).....	11
2.8. ALANIN	13
2.9. LEUCIN	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI I METODE	17
3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH PEPTIDA	19
3.2.1. Priprava peptida Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (1)	22
3.2.2. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2)	23
3.2.3. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)	24
3.2.4. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-CON ₃ (4).....	24
3.2.5. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5).....	24
3.2.6. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (6) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (7)	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. SINTEZA CILJNOG FEROCENSKOG PEPTIDA Ac-D-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -L-Leu-Boc (6) i Ac-D-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Leu-Boc (7)	27
4.2. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA	28
4.3. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCIJA (NMR)	32
4.3.1. Temperaturni ¹ H NMR-spektar spoja 7	33
4.3.2. Koncentracijski ¹ H NMR-spektar spoja 7.....	35
4.4. TITRACIJA SPOJA 7 S DMSO	35
4.5. CD-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA SPOJA 7	37
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40
7. PRILOZI	47
7.1. Prilog 1.....	47
7.2. Prilog 2.....	48
7.3. Prilog 3.....	48
7.4. Prilog 4.....	49

1. UVOD

Bioorganometalna kemija je znanstvena disciplina koja zadnjih 40-ak godina proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula, pri čemu organometalni spojevi sadrže barem jednu vezu metal–ugljik koja potječe iz organske molekule (1-3). Iz literature je vidljiva primjena bioorganometalnih spojeva kao receptora za biološki važne molekule, kalupa za stvaranje foldamera, osjetljivih sonde, kromofora, redoks-aktivnih spojeva, kemosenzora, te kao potencijalnih terapeutika (slika 5) (2,3). Jedan od najpoznatijih organometalnih spojeva jest ferocen, koji se odlikuje izrazitom stabilnošću i izuzetnim kemijskim i biološkim svojstvima.

Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji kao ligandi mogu oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora, odnosno spojevi čija su sekundarna strukturalna svojstva analogna prirodnim peptidima uslijed čega mogu oponašati njihovu biološku funkciju (4).

S obzirom da udaljenost između dva ferocenska ciklopentadienilna prstena od 3,3 Å omogućava tvorbu intramolekulskih vodikovih veza (IHBs, engl. *Intramolecular Hydrogen Bonds*), a samim time i tvorbu različitih elemenata sekundarne strukture u peptidnim lancima vezanim na ferocen, jasno je da heteroanularno disupstituirani feroceni predstavljaju prave peptidomimetike.

U ovom radu osnovni cilj je bio priprava homo- i heterokiralnog ferocenskog peptida tipa Ac–D–Ala–NH–Fn–NH–L–Leu–Boc (**6**) i Ac–D–Ala–NH–Fn–NH–D–Leu–Boc (**7**) kako bi se istražio utjecaj strukture i kiralnosti aminokiselinskog bočnog ogranka na obrazac IHB. Pri tome je zauzimanje uređene sekundarne strukture istraženo konformacijskom analizom dipeptida **6** i **7**, temeljenoj na standardnim spektroskopskim metodama (IR-, NMR- i CD-spektroskopija).

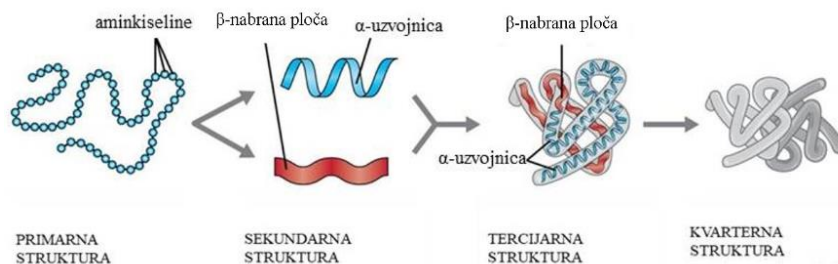
2. TEORIJSKI DIO

2.1. PEPTIDI I NJIHOVA SVOJSTVA

Peptidi, građeni iz aminokiselina spadaju među najvažnije biološke molekule. Peptidni lanci mogu varirati u dužini od par do nekoliko stotina konstitutivnih aminokiselina. Peptidi koji u svojoj strukturi sadrže 10-50 aminokiselinskih ostataka nazivaju se polipeptidi, dok oni s više od 50 aminokiselinskih ostataka nose naziv proteini (5). Osim uloge gradivnih molekula, peptidi imaju ulogu i u brojnim biološkim procesima, uključujući regulaciju metabolizma, imunskog odgovora, međustanične signalizacije te u kontroli rasta i razvoja. Široki spektar funkcija rezultat je specifične konformacije peptidnih i proteinskih lanaca kao i njihove sposobnosti interakcije s drugim biomolekulama.

Primarna struktura proteina sastoji se od linearnih lanaca aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama između α -karbonilne skupine jedne aminokiseline s α -amino-skupinom druge aminokiseline (slika 1). Peptidna veza se, zahvaljujući rezonancijskoj stabilizaciji, odlikuje djelomičnim dvostrukim karakterom i rigidnošću. Za razliku od krute peptidne veze oko koje nema slobodne rotacije, rotacija oko jednostrukih veza $\text{HN}-\text{C}\alpha$ te $\text{OC}-\text{C}\alpha$ omogućuje nabiranje proteina u različite sekundarne strukturne elemente (2).

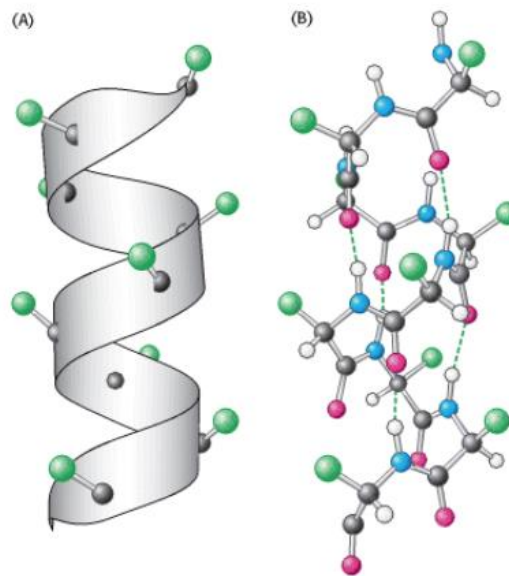
Sekundarna struktura proizlazi iz vodikovih veza $\text{HN}\cdots\text{OC}$ uspostavljenih unutar istog ili između susjednih peptidnih lanaca. U većina proteina (poli)peptidni lanci su ili spiralno uvijeni ili presavijeni, što rezultira tvorbom uzvojnica i okreta (5).



Slika 1. Strukturne razine proteina (primarna, sekundarna, tercijarna i kvarterna struktura) (6).

Dva najčešća sekundarna strukturna elementa su α -uzvojnica i β -nabrana ploča, koje su znanstvenici Linus Pauling i Robert Corey predložili 1951. godine. Kasnijih godina otkriveni su i drugi oblici sekundarne strukture, koji se neperiodično nalaze u proteinima, kao što su β -okret te Ω -petlje (7). Kod α -uzvojnice polipeptidni lanac je tijesno spiralno uvijen tvoreći

štapićastu strukturu. Pri tomu su aminokiselinski ogranci usmjereni prema van u uzvojitom rasporedu (7). Sama α -uzvojnica stabilizirana je vodikovim vezama koje se stvaraju između CO skupine aminokiselinskog ostatka i i NH skupine ostatka $i+4$ u istom linearnom slijedu (2). Uzvojnica može imati lijevi (suprotni smjer kazaljke na satu) ili desni (smjer kazaljke na satu) zaokret. Sve α -uzvojnice koje se nalaze u proteinima su u pravilu desne orijentacije, zbog manjih steričkih ometanja između bočnih lanaca i uzvojnice.

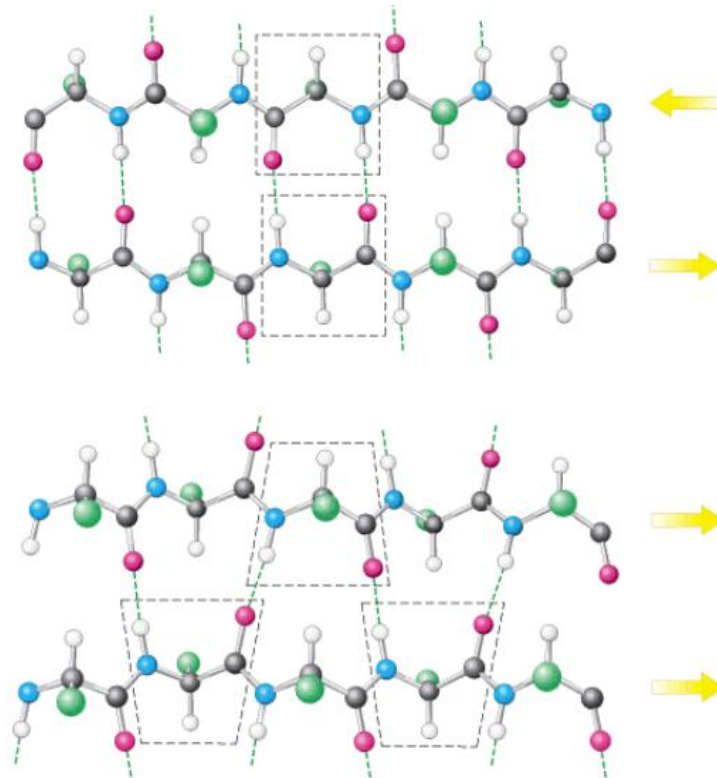


Slika 2. Struktura α -uzvojnice (7)

Uz α -uzvojnica, Pauling i Corey predložili su još jednu periodički zastupljenu strukturu, nazvanu β -nabrana ploča. Razliku između dviju struktura čini oblik polipeptidnog lanca, koji je kod β -nabrane ploče sasvim istegnut, dok je kod α -uzvojnice gusto uvijen. β -Nabrana ploča formira se povezivanjem dvaju ili više polipeptidnih lanaca, nazvanih β -nitima, putem vodikovih veza. Veze u strukturi su međusobno paralelne, no okomite orijentacije s obzirom na smjer pružanja lanaca što rezultira određenom udaljenosti između lanaca, odnosno sprječavanjem sabijanja lanaca (7).

Slično kao i kod α -uzvojnica, postoje različiti oblici β -nabrane ploče koji su rezultat različitih načina nabiranja polipeptidnih lanaca, te međusobnog povezivanja vodikovim vezama. Susjedni lanci u β -nabranoj ploči mogu se protezati u međusobno suprotnim smjerovima (antiparalelna β -nabrana ploča) ili u istom smjeru (paralelna β -nabrana ploča) (2). Kod antiparalelnog rasporeda lanaca, NH i CO skupine svake aminokiseline su povezane sa CO i NH skupinama susjednog lanca vodikovim vezama (slika 3). U paralelnom rasporedu, vezanje vodikovih veza je nešto složenije. NH skupina svake aminokiseline u jednome lancu vezana je vodikovim vezama za CO skupinu aminokiseline na susjednom lancu, dok je CO

skupina tih aminokiselina vezana vodikovim vezama za NH skupinu aminokiselina koje se nalazi dva ostatka dalje u lancu (slika 3). β -Nabrana ploča građena je od više β -niti, najčešće 4 do 5, što rezultira različitim formama: paralelne, antiparalelne ili miješane β -nabrane ploče.



Slika 3. Struktura antiparalelne (*gore*) i paralelne (*dolje*) β -nabrane ploče (7)

Proteini zbog svoje specifične strukture često poprimaju kompaktne, kuglaste oblike. Promjene u orijentaciji lanaca ostvaruju se pomoću specifičnog strukturnog elementa obrnutog zavoja koji se naziva i β -okret. β -Okret nastaje uslijed vodikove veze između CO skupine aminokiselinskog ostatka i i NH skupine ostatka $i+3$. Samostalno stabiliziranje β -okreta je nemoguće, iz razloga što je ovakva struktura iznimno sterički spregnuta. Iz tog razloga uspostavljaju se nekovalentne interakcije između pobočnih ogranaka u tercijarnoj strukturi polipeptida.

Uz sekundarnu strukturu, proteini tvore i kompaktnu strukturu koja se naziva tercijarna struktura. Tercijarna struktura odnosi se na prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu udaljeni jedan od drugoga. Tercijarna struktura nastaje uslijed svijanja elemenata sekundarne strukture, te pozicioniranja pobočnih lanaca u prostoru što ostvaruje 3D strukturu proteina. Do svijanja proteina dolazi zbog postojanja hidrofobnih interakcija, uslijed kojih se proteinski ostatci okreću od okolinske vode prema jezgri proteina. Dodatna stabilnost tercijarne strukture osigurana je ostalim nekovalentnim vezama između određenih

pobočnih ogranaka aminokiselina, kao što su ionske, vodikove veze i van der Waalsove interakcije (8).

Proteini koji u svojoj građi sadrže više od jednog polipeptidnog lanca ostvaruju i kvaternu strukturu, u kojoj svaki polipeptidni lanac čini jednu podjedinicu. Uz povezivanje podjedinica, koje mogu ali i ne moraju biti identične da bi se povezale, moguće je vezanje i neproteinskih elemenata koji omogućuju aktivaciju određenih proteina. U održavanju kvaterne strukture sudjeluju iste interakcije koje su prisutne i u tercijarnoj strukturi.

Peptidi, zahvaljujući svojoj specifičnoj strukturi, posjeduju izuzetno raznoliku funkcionalnost, što ukazuje na njihov potencijal za primjenu u terapijske svrhe. Međutim, uporaba peptida kao lijekova ograničena je njihovim farmaceutskim i farmakološkim nepovoljnim svojstvima, uključujući imunogenost, stabilnost i ograničenu biodostupnost. Uz veliku nestabilnost pri fiziološkim uvjetima, dodatni limitirajući faktor je njihov polarni karakter koji im onemogućuje prolaz kroz staničnu membranu. Dodatni problem stvara mogućnost zauzimanja različitih energetskih ekvivalentnih konformacija, što može rezultirati vezanjem sa proteolitičkim enzimima i različitim nepoželjnim receptorima (9). Primjena odgovarajućih mimetika omogućuje modifikaciju nepovoljnih farmakoloških i biofarmaceutskih karakteristika prirodnih peptida s ciljem poboljšanja njihove kliničke primjenjivosti (10).

2.2. PEPTIDOMIMETICI

Peptidi zbog svoje jedinstvene strukture imaju izuzetno široku primjenu koja obuhvaća sve životno važne funkcije; od prijenosa i pohrane drugih molekula, preko prijenosa živčanih impulsa do enzimske katalize, kontrole rasta i diferencijacije (10). Uz to zbog visokog afiniteta i velike specifičnosti vezanja, uz smanjenu toksičnost, peptidi imaju odlike poželjnih molekula za proizvodnju lijekova u usporedbi s drugim manjim molekulama (11). Međutim, unatoč mnogobrojnim prednostima, peptidi također posjeduju neke karakteristike koje su nepogodne za njihovu terapijsku primjenu što ograničava njihovu uporabu kao lijekova. Slaba apsorpcija nakon oralne konzumacije zbog izuzetno velike molekulske mase, kratko vrijeme zadržavanja unutar organizma i niska metabolička stabilnost prema proteolitičkim enzimima ograničavajuća su svojstva uporabe peptida kao terapeutika. Uz to, specifični polarni karakter dodatno otežava njihov transport kroz hidrofobne stanične membrane, dok mogućnost konformacijske fleksibilnosti može uzrokovati nepoželjne nuspojave (12).

Kako bi se uklonila nepovoljna svojstva peptida te istovremeno maksimalno iskoristila njihova poželjna bioaktivna svojstva u svrhu kliničke uporabe, sintetiziraju se peptidomimetici (10). Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji kao ligand mogu oponašati ili

blokirati biološki učinak peptidnog receptora (13). Drugim riječima, peptidomimetici su spojevi čija sekundarna strukturalna svojstva oponašaju trodimenzijsku strukturu prirodnih peptida te zadržavaju njihovu sposobnost interakcije s ciljanim biološkim odredištem uz zadržavanje ili pojačavanje biološkog učinka (4). Sintezom peptidomimetika uklanjaju se nepoželjna svojstva peptida što rezultira većom metaboličkom stabilnošću i selektivnošću te smanjenjem nuspojava.

Prilikom dizajna i sinteze peptidomimetika može se upotrijebiti nekoliko različitih metoda: zamjena peptidne veze nepeptidnim analogima, ugradnja nepeptidnih kalupa u peptidnu sekvencu, konjugacija aminokiselinskih bočnih ograna s malim molekulama i ciklizacija glavnog lanca (13). Sve navedene metode imaju isti cilj, a to je oponašanje sekundarne strukture prirodnih peptida, odnosno tvorba α -uzvojnice odnosno β -nabrane ploče (uz prisustvo β -okreta). Jedna od najčešće korištenih metoda je umetanje nepeptidnih kalupa unutar peptidne strukture, a zadaća „kalupa“ je ograničiti konformacijsku slobodu peptida, što dovodi do sprječavanja međudjelovanja s nepoželjnim receptorima (13). Pri tom su se prigodno funkcionalizirani feroceni iznimno učinkovitijim kalupima za indukciju elemenata sekundarne strukture u pripadajućim peptidima (10).

2.3. SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PROTEINSKE STRUKTURE

Sekundarna struktura proteina ima bitnu ulogu u konačnoj strukturi proteina, stabilnosti, biološkim procesima i u samoj funkciji proteina. Razumijevanje elemenata sekundarne strukture proteina omogućuje uvođenje specifičnih promjena unutar njihove strukture s ciljem razvoja specifičnih proteina za terapijske svrhe (14). Metode spektroskopske analize koje se koriste prilikom određivanja sekundarne strukture su: infracrvena (IR) spektroskopija, cirkularni dikroizam (CD) i spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) (15). Ove metode pružaju informacije o konformacijskim promjenama i interakcijama proteina s drugim molekulama.

IR spektroskopija se ističe kao ključna tehnika u analizi sekundarne strukture proteina (16). Ova metoda omogućuje preciznu identifikaciju i karakterizaciju ključnih elemenata sekundarne strukture, uključujući α -uzvojnice i β -nabranu ploču, određivanjem frekvencije pri kojoj kemijske veze apsorbiraju infracrveno zračenje, pri čemu jačina apsorpcije raste povećanjem dipolnog momenta kovalentne veze (15). Primjerice, karakteristične apsorpcijske vrpce u području od 1650 do 1655 cm^{-1} signaliziraju prisutnost α -uzvojnice, dok frekvencijska područja oko 1630 cm^{-1} ukazuju na β -nabranu ploču (15). IR spektroskopija također omogućuje praćenje konformacijskih promjena proteina pod različitim uvjetima. Analiza promjena u

infracrvenom spektru omogućuje razumijevanje interakcija između peptidnih lanaca i varijacija u vodikovim vezama unutar proteinske strukture (16). Izrazita osjetljivost i preciznost čine IR spektroskopiju nezamjenjivim alatom u istraživanju strukture i funkcije proteina (16). Integracija ove tehnike s drugim analitičkim metodama omogućuje sveobuhvatan uvid u biološke procese koji definiraju aktivnost proteina, a time i razvoj novih terapijskih pristupa i dijagnostičkih alata (15).

CD spektroskopija je tehnika koja može poslužiti i za karakterizaciju proteina, a temelji se na razlici u apsorpciji lijevo i desno polariziranog svjetla optički aktivnih molekula (15). Osim za ispitivanje sekundarne strukture, CD spektroskopija se koristi i pri utvrđivanju tercijarne strukture proteina. Mana ove metode je nemogućnost određivanja egzaktnih aminokiselina koje sudjeluju u formiranju sekundarnih strukturnih elemenata (17). Ova metoda omogućava ispitivanje utjecaja pH, temperature i drugih vanjskih čimbenika na konformaciju proteina (15).

NMR-spektroskopija se koristi prilikom određivanja strukture proteina, pri čemu daje detaljan uvid u kemijsku strukturu ali i trodimenzijsku strukturu makromolekula (18). Najvažnija značajka NMR-a jest da pruža mogućnost lociranja sekundarnih strukturnih elemenata unutar sekvence proteina (15). NMR omogućuje i prikupljanje informacija o trodimenzijskoj strukturi proteina te odnosu konformacije i funkcije proteina. NMR metoda zahtijeva korištenje otopina visoke čistoće i koncentracije (0,1 do 3 mM) te je primjenjiva na relativno male molekule, s maksimalnom veličinom od 35 kDa (18). Uz podatke o sekvenci ispitanog proteina te poznatim geometrijskim odnosima među atomima, moguće je u bazama podataka pronaći informacije o sličnim molekulama i usporediti ih s eksperimentalno dobivenim rezultatima.

2.4. BIOORGANOMETALNA KEMIJA

Bioorganometalna kemija je interdisciplinarna znanost koja proučava interakcije između konjugata organometalnih spojeva i različitih biomolekula. Organometalni spojevi su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže barem jednu vezu metal–ugljik koja potječe iz organske molekule. Upravo ova veza između metalnog i ugljikovog atoma je izvor različitih elektronskih i steričkih efekata koji omogućuju korištenje organometalnih spojeva u terapijske svrhe, u različitim imunotestovima i enzimskoj katalizi (9). Nukleofilni atom ugljika koji se nalazi u organometanom spoju ima mogućnost nukleofilne adicije na elektrofilni atomo ugljika iz alkil-halogenida, estera, aldehida i ketona, pri čemu se stvara nova veza C–C veza, koja omogućuje sintezu velikih molekula iz puno manjih prekursora (10).

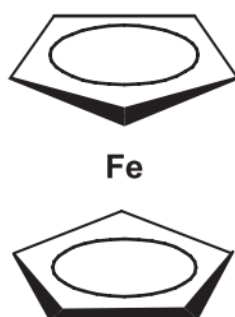
Jedan od najvažnijih aspekata bioorganometalne kemije je mogućnost sinteze konjugata organometalnih spojeva i biomolekula kao što su peptidi, ugljikohidrati, steroidi, DNA

i aminokiseline. Sinteza biokonjugata, posebice konjugata ferocena i aminokiselina, omogućuje stvaranje specifičnih peptidomimetika te proširuje mogućnost uporabe biokonjugata unutar biomedicine (10). Metaloceni su organometalni kompleksni spojevi koji se sastoje od dvaju paralelnih aromatskih prstenova (najčešće ciklopentadienilnih, C_5H_5), između kojih se nalazi atom ili ion prijelaznih elemenata (metala) (19). S obzirom da se atom metala nalazi između dva aromatska prstena ovi spojevi se također mogu nazvati i „sendvič-spojevi“. Najpoznatiji metalocenski spoj je ferocen, kod kojeg se između dvaju ciklopentadienilnih prstenova nalazi atom željeza. Zbog svojih izuzetno povoljnih fizikalnih svojstava, ferocen je jedan od najzastupljenijih spojeva unutar bioorganometalne kemije.

2.5. FEROCEN

Ferocen, spoj koji pripada skupini metalocenskih spojeva, predstavlja jednu od najzanimljivijih i najznačajnijih organometalnih molekula. Ova molekula, prvi puta sintetizirana 1951. godine zaslugom kemičara Pausona i Kealyja, ubrzo je postala predmet opsežnih istraživanja zbog svoje neobične strukture i raznovrsnih kemijskih svojstava.

Ferocen, molekulske formule $(C_5H_5)_2Fe$, aromatski je „sendvič“ spoj koji se odlikuje visokom stabilnošću i podložnošću reakcijama elektrofilne supstitucije (20). Izuzetna stabilnost ferocena, produkt je organometalne veze nastale vezanjem željezovog (II) kationa s dva aromatska ciklopentadienilna prstena (slika 4). Zbog mogućnosti rotacije oko veze $Cp-Fe-Cp$ (Cp = ciklopentadienil), kao i mogućeg gubitka koplanarnosti Cp -prstenova riječ je o vrlo fleksibilnoj molekuli (20).



Slika 4. Struktura molekule ferocena (20)

Stabilnost u neoksidirajućim uvjetima, niska potencijalna toksičnost te lipofilni karakter koji omogućuje lakši prolazak kroz stanične membrane (21,4), razlozi su velikog interesa znanstvene zajednice za ferocen i njegove derivate. Jedan od poznatijih lijekova u borbi protiv malarije, ferokin, dobiven je umetanjem ferocena u strukturu antiparazitika klorokina (22). Još

jedan pokazatelj iznimne važnosti, ali i mogućnosti ferocena te njegovih derivata, je mogućnost uporabe kod razvoja antikancerogenih, antifungalnih, antiparazitskih i antibakterijskih lijekova (23). Specifična fizikalna i kemijska svojstva ferocenskih derivata omogućuju njihovu primjenu u: (i) dizajnu peptidomimetika, (ii) pripravi neprirodnih α -aminokiselina, (iii) razvitku imunoloških postupaka, (iv) kontroliranoj sintezi peptida, te (v) enantioselektivnoj katalizi (20).

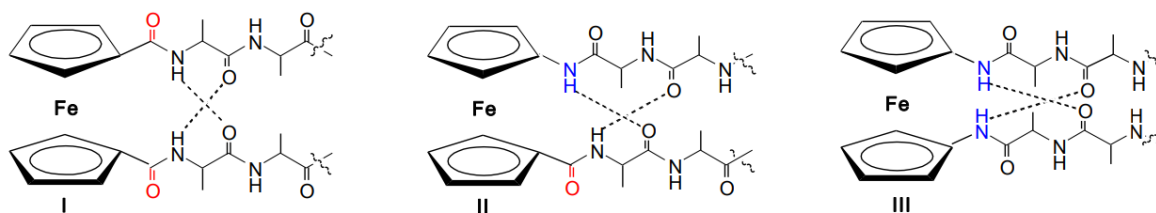
2.6. FEROCENSKI PEPTIDOMIMETICI

Konjugacija organometalnih spojeva s biomolekulama je proces povezivanja organskih spojeva koji sadrže metalne centre s biomolekulama poput proteina, DNA ili RNA, pri čemu nastali biokonjugati sadrže značajke obje molekule. Za pripravu biokonjugata s peptidima, ferocen je zbog svojih prednosti istaknut kao jedan od najučinkovitijih kalupa za indukciju elemenata sekundarne strukture u peptidomimeticima dobivenim umetanjem ferocena u male peptide. Izuzetna stabilnost, mogućnost elektrokemijske reverzibilnosti i jednostavna derivatizacija s različitim biomolekulama, samo su neke od prednosti koje ferocen čine pogodnim za izosterne modifikacije bioaktivnih molekula (24).

Stabilnost ferocena u biološkom okolišu i mogućnost pripreme ferocenskih derivata koji imaju mogućnost kopulacije s aminokiselinama i peptidima, razlozi su velike zastupljenosti ferocenskih konjugata s aminokiselinama unutar skupine ferocenskih bioorganometalnih konjugata (20).

Priprava peptidomimetika može biti izvedena na više različitih načina, a prilikom sinteze ferocenskih peptidomimetika najčešće se koristi metoda „umetanja“ rigidnih kalupa, koji za cilj imaju ograničiti konformacijsku slobodu peptida i spriječiti njihovo međudjelovanje s nepoželjnim receptorima. Heteroanularno disupstituirani feroceni pokazali su se kao iznimni bioorganometalni kalupi za sintezu peptidomimetika, koji imaju ključnu ulogu u tvorbi konformacijski ograničenih peptida. Udaljenost od 3,3 Å između ciklopentadienilnih prstenova kod ferocenskih konjugata, omogućuje nastajanje IHB, što dovodi do nastajanja strukture nalik β -nabranoj ploči.

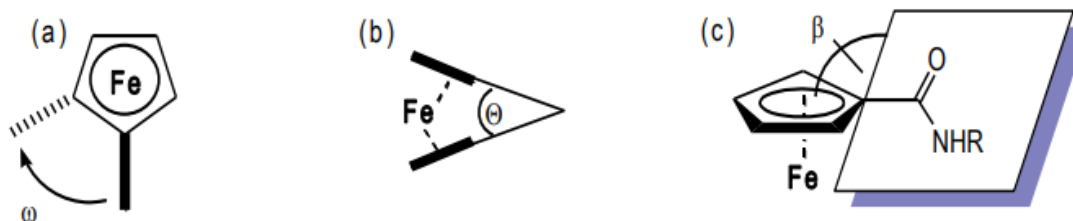
S obzirom na strukturu ferocenskog prekursora, 1,1'-disupstituirani feroceni mogu se podijeliti u tri glavne skupine (slika 5):



Slika 5. Ferocenski peptidi **I**, **II**, **III** izvedeni iz Fcd (**IV**), Fca (**V**) i Fcda (**VI**) (10)

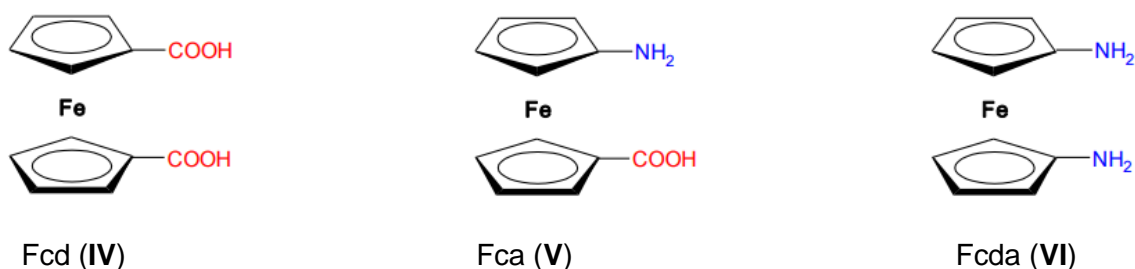
$\text{Fn-CO-AA}_m\text{-OMe}_2$ (**I**) izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd (**IV**)), $\text{Y-AA}_n\text{-Fca-AA}_m\text{-OMe}$ (**II**) izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca (**V**)) i $\text{Fn-[NH-(AA)}_m\text{-Y]}_2$ (**III**) izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda (**VI**)) [Fn = ferocenilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil), $m = 1, 2, \dots$; $n = 1, 2, \dots$]. (10).

Ferocenski peptidi konformacijski se razlikuju torzijskim kutem, kutevima iskrivljenosti i izvijenosti koji su pod utjecajem supstituenata ciklopentadienilnih prstenova (10). Simetrično supstituirane peptide **I** i **III** karakteriziraju paralelno usmjereni peptidni lanci, dok su kod ferocenskih peptida **II** peptidni lanci orijentirani antiparalelno. Peptidi **I-III** ostvaruju različite konformacije karakterizirane torzijskim kutom ω ($0 - 180^\circ$), kutom iskrivljenosti θ ($0 - 5^\circ$) i kutom izvijenosti β ($5 - 30^\circ$) (25).



Slika 6. Deformacija fleksibilne ferocenske molekule: (a) torzijski kut, (b) kut iskrivljenosti i (c) kut izvijenosti (10)

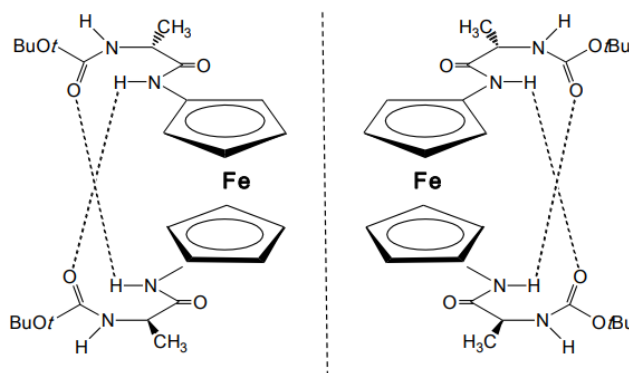
Odabirom jednog od tri različita ferocenska prekursora [Fcd (**IV**), Fca (**V**) ili Fcda (**VI**)] kao kalupa, utječe se na svojstva nastalih vodikovih veza, odnosno utječe se na stabilnost konformacije peptidomimetika u različitim fizikalnim uvjetima.



Slika 7. Ferocenski prekursori: Fcd (IV), Fca (V) i Fcda (VI)

2.7. FEROCENSKI PEPTIDI IZVEDENI IZ FCDA (VI)

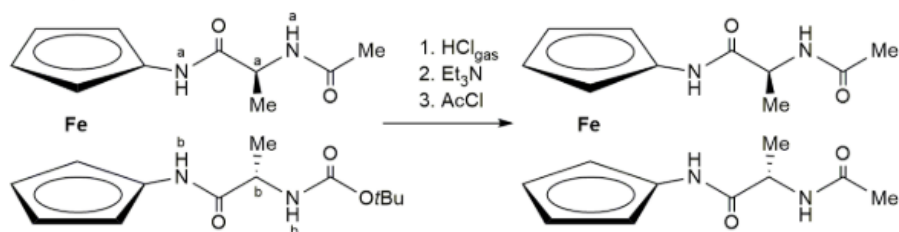
Za razliku od mnogobrojnih biokonjugata izvedenih iz Fcd (IV) i Fca (V), ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda,VI) slabije su istraženi. Kraatz i suradnici sintetizirali su prve takve peptide kopulacijom Fcda (VI) s L- i D-Ala (26). Kopulacijom Fcda (VI) s L- i D-Ala dobivena su dva enantiomerna konjugata $\text{Fn}-(\text{NH}-\text{Ala}-\text{Boc})_2$ (VIIa) i $\text{Fn}-(\text{NH}-\text{D}-\text{Ala}-\text{Boc})_2$ (VIIb) (27). Oba spoja u čvrstom stanju tvore dva 10-člana IHB-prstena, tvorbom $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ IHB pri čemu se inducira tvorba β -okreta, što je prikazano na slici 8. Primjenom CD-spektroskopske analize utvrđena je prisutnost helične kiralnosti istoimenih peptida u otopini, pri čemu VIIa poprima pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području što upućuje na *P*-heličnost, dok VIIb poprima signal suprotnog predznaka što odgovara *M*-heličnosti ferocena.



Slika 8. Shematski prikaz IHB dipeptida $\text{Fn}-(\text{NH}-\text{Ala}-\text{Boc})_2$ (VIIa, lijevo) i $\text{Fn}-(\text{NH}-\text{D}-\text{Ala}-\text{Boc})_2$ (VIIb, desno) (10)

Ferocen-1,1'-diamin prvotno je bio korišten za sintezu spojeva s identičnim aminokiselinama na *N*-krajevima. Međutim, Kovačević i suradnici 2015. godine su korištenjem novog sintetskog pristupa u Laboratoriju za organsku kemiju, pripravili asimetrične biokonjugate ferocena koji se sastoje od ferocen-1,1'-diamina te strukturno i kiralno različitih

aminokiselinskih sekvenci. Sintetizirani biokonjugati stabilizirani su pomoću 14-članih IHB-prstenova. Korištenjem „desimetrizacije“ ferocenskih peptida (**III**) po prvi put objavljena je sinteza ortogonalno zaštićenog homokiralnog peptida Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc (**VIII**). Detaljna analiza konformacije novih spojeva, uključujući **VIII** i Fn-(NH-Ala-Ac)₂ (**IX**), ukazuje na tendenciju formiranja 14-članih IHB-prstenova između dvaju peptidnih lanaca, bez obzira na prisutnost Boc i/ili Ac zaštitnih skupina. Spektroskopska analiza (IR, NMR, CD), podržana DFT (*Density functional theory*) studijama, ukazala je na zanimljive značajke okosnice ferocen-1,1'-diamina. Zanimljivo je što se isti uzorak vodikovih veza, odnosno 14-člani prsten koji se formira putem IHB, nalazi i u otopini i u krutom stanju, što čini spojeve **IX** i **X** obećavajućim kandidatima za peptidomimetike koji imaju mogućnost oponašanja sekundarne strukture β-nabrane ploče.



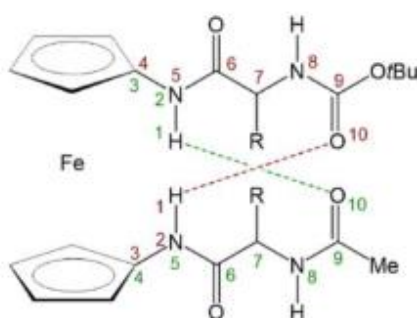
Slika 9. Struktura Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc (**VIII**) (*lijevo*) i Fn-(NH-Ala-Ac)₂ (**IX**) (*desno*)

S obzirom da je Boc-zaštićeni biokonjugat **VIIa** stabiliziran dvjema NH_{Fn}...OC_{Boc} IHB kojima se zatvara 14-člani prsten, cilj ovog istraživanja bio je ispitati kako će zamjena jedne ili obje voluminozne Boc-skupine peptida **VIII** s manjim Ac-skupinama u peptidima **IX** i **X** utjecati na obrazac IHB. Ferocen-1,1'-diamin (**VI**), prekursor ferocenskih peptida **III**, pokazao je iznimni potencijal za očuvanje β-okreta u otopini, oponašajući tako uzorak vodikovih veza β-nabranih ploča u prirodnim peptidima (27).

Kovačević i suradnici 2017. godine istraživali su začetnike okreta u kiralnim peptidima koji u svojem sastavu sadrže ferocen-1,1'-diamin. Proces je proveden tako da je pripremljen niz peptida koji sadrže homo- i heterokiralne Ala-Pro sekvence konjugirane s ferocen-1,1'-diaminom te su nosintetizirani peptidomimetici podvrgnuti konformacijskoj analizi. Primjenom različitih metoda (IR-, NMR- i CD-spektroskopijom) utvrđivao se utjecaj kiralnosti okosnice i N-terminalne skupine (Boc/Ac) nosintetiziranih peptidomimetika na njihova konformacijska svojstva (28). Praćen je utjecaj N-terminalnih Ac ili Boc skupina te kiralnosti aminokiselina na tvorbu IHB. Rezultati su pokazali kako homokiralni peptidi koji tvore 10- i 13-člane IHB-prstenove uspostavljaju najstabilniju konformaciju. Zanimljiva značajka koja je zajednička svim najstabilnijim heterokiralnim peptidima je mogućnost tvorbe sekundarne strukture nalik strukturi β-okreta. Takve strukture tvorile su 7- i 16-člane IHB-prstenove (28).

Zaključeno je kako je utjecaj zamjene dviju *N*-terminalnih skupina na preraspodjelu vodikovih veza izraženiji kod homokiralnih derivata (28).

Kovačević i suradnici su 2022. godine sintetizirali derivate ferocen-1,1'-diamina s različitim hidrofobnim aminokiselinama: **XI** (D-Leu), **XII** (L-Leu), **XIII** (D/L-Val), **XIV** (D/L-Phe), pri čemu su istraživali sekundarna strukturna svojstva (slika 10). Cilj istraživanja bio je istražiti može li konjugacija ferocen-1,1'-diamina s aminokiselinom inducirati β -okret te kako veličina i razgranatost bočnih lanaca iz Leu, Val i Phe utječu na obrazac vodikovih veza. Otkrili su kako ovi homokiralni konjugati formiraju stabilne strukture s dva 10-člana IHB-prstena, stvarajući dva β -okreta (29).



XI (D-Leu), **XII** (L-Leu), **XIII** (D/L-Val), **XIV** (D/L-Phe)

Slika 10. Intramolekulske vodikove veze u peptidima **XI-XIV** (dva 10-člana IHB prstena, odnosno dva β -okreta)

2.8. ALANIN

Alanin (Ala), 2-aminopropionska kiselina je jedna od neesencijalnih aminokiselina a igra ključnu ulogu u metabolizmu, gdje se može sintetizirati putem transaminacije piruvata ili iz razgradnje proteina u tijelu. Alanin sudjeluje u ključnim ciklusima kao što su ciklus limunske kiseline, glikoliza i glukoneogeneza. Zbog svoje građe koja uključuje nepolarnu metilnu skupinu (-CH₃) kao bočni ogranak, svrstana je u hidrofobne aminokiseline bez naboja. Uz to pripada grupi najmanjih i najjednostavnijih aminokiselina koje imaju najmanji utjecaj, odnosno smetnju u stvaranju IHB i uređenih konformacija.

Druge aminokiseline kao što su valin, leucin i izoleucin također se mogu prevesti u alanin. Prilikom razgradnje mišićnih proteina, velike količine alanina oslobađaju se u krvotok. Proteoliza rezultira povećanim koncentracijama alanina u krvi, koji se cirkulacijom prenosi do jetre, gdje se putem procesa glukoneogeneze pretvara u krajnji produkt glukozu koja dalje služi kao izvor energije prugastim mišićima (30). Uz to što je ključni energetski izvor za mišićno tkivo, mozak i centralni živčani sustav, alanin ima i značajnu ulogu u potpori imunosti sustavu

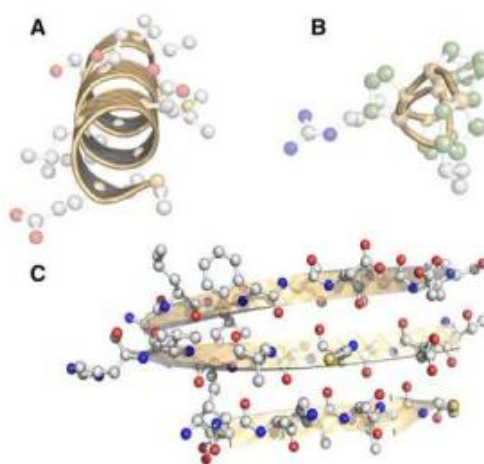
(putem proizvodnje antitijela) te je jedna od ključnih molekula koja sudjeluje u metabolizmu šećera i organskih kiselina (31).

Provedenim istraživanjima dokazano je kako se vodikove veze koje se stvaraju između peptida i molekula vode, natječu s vodikovim vezama unutar uzvojnica peptida što rezultira nepotpunom stabilnošću α -uzvojnica u vodi (32,33,34). Marqusee i suradnici promatrali su način formiranja α -uzvojnica unutar peptida koji sadrže samo alanin te nekolicinu drugih aminokiselina. Rezultati istraživanja pokazali su kako alanin ima ključnu ulogu u stabilizaciji kratkih uzvojnica, najvjerojatnije zbog velikog potencijala pojedinih alaninskih ostataka prilikom njihovog oblikovanja, bez interakcija pobočnih lanaca koji bi ih mogli dodatno stabilizirati (33).

Alanin je jedna od 20 proteinogenih aminokiselina koja je najpodložnija stvaranju sekundarne strukture proteina tvoreći α -uzvojnice. Prisutnost nepolarnog metilnog pobočnog ogranka u strukturi alanina, smanjuje konformacijsku slobodu nasumično istegnutog lanca (34). Peptidi koji u svojoj strukturi sadrže oko 10-ak alaninskih ostataka, koji im omogućuju stvaranje α -uzvojnica, nisu topljivi u vodi zbog manjka skupina koje se mogu sudjelovati u vodikovim vezama (35). Uvođenjem 3 ili više nabijenih ostataka, poput lizina ili glutaminske kiseline, moguće je povećati topljivost alaninskih peptida (34). Struktura peptida, odnosno količina nastalih uzvojnica, može se modificirati uvođenjem zamjenskih aminokiselina na mjesto alaninskih ostataka (32,36-38).

Supstitucijom alanina s glicinom može doći do destabilizacije α -uzvojnica, što ovisi o omjeru količine prisutnih aminokiselina alanina i glicina (39). Suprotno tome, istraživanja koja su se bazirala na konformaciji kratkolančanih alaninskih peptida pokazala su potpuno drugačije rezultate.

Rezultati istraživanja, koja su za uzorak koristila trialanin peptid, pokazali su mogućnost zauzimanja dviju različitih konformacija pri sobnoj temperaturi. Prva konformacija odnosi se na strukturu sličnu poliprolin II uzvojnici ($\geq 80\%$) a druga, manje zastupljena konformacija, α R-uzvojnica (slika 11) (40,41). Unatoč tome, provođenjem spektroskopskih mjerenja utvrđena je prisutnost 50 % poliprolin II uzvojnica i 50 % strukture slične β -nabranoj ploči (42,43). Prisutnost vode rezultira većim postotkom poliprolin II uzvojnica (44).



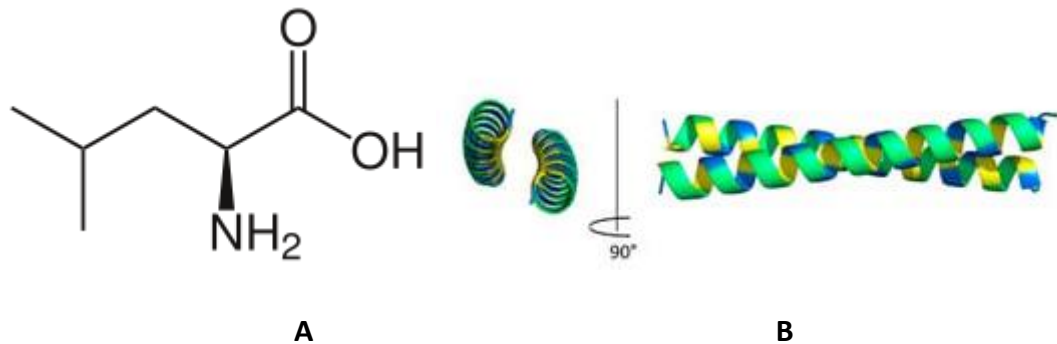
Slika 11. Usporedba sekundarnih struktura: A) α -uzvojnica B) poliprolin II uzvojnica i C) β -nabrana ploča (45)

Daljnijim istraživanjima, poliprolin II uzvojnica utvrđena je kao dominantnija konformacija alaninskih peptida, pri čemu se sklonost stvaranja iste povećava s brojem alaninskih ostataka (41,42). Istraživanje koje su proveli Graf i suradnici, pokazalo je kako okvirno 90 % trialanin peptida zauzima strukturu poliprolin II uzvojnice, oko 10 % zauzima strukturu β -nabrane ploče, dok struktura α -uzvojnice nije pronađena. Daljnijim proučavanjem strukture, utvrđeno je kako produljenje lanca s tri na sedam alaninskih ostataka nije rezultiralo promjenom u količinama zastupljenih konformacija (43).

2.9. LEUCIN

Leucin (Leu) jedna je od dvadeset standardnih aminokiselina koje čine proteine, a koje predstavljaju esencijalnu komponentu u biološkim sustavima zbog čega se ne može samostalno biosintetizirati u tijelu te ga je nužno unositi putem prehrane (46). Kemijski, Leu je nepolarna alifatska α -aminokiselina s izobutilnim bočnim lancem (slika 12A). Zbog razgranatosti bočnog lanca pripada skupini BCAA (engl. *Branched-Chain Amino Acid*) koje su ključne u sintezi proteina i procesu izlučivanja inzulina. Male promjene u metabolizmu BCAA mogu uzrokovati različite bolesti, poput dijabetesa, raka i zatajenja srca (47). S obzirom na postojanje izobutilne skupine kao bočnog ogranka i njegove hidrofobnosti, leucin se okreće prema unutrašnjosti proteina, tvoreći α -uzvojnica. α -uzvojnica je dodatno stabilizirana hidrofobnim interakcijama s ostalim aminokiselinskim ostatcima. Dodatni utjecaj leucina u strukturi proteina povezan je sa stvaranjem specifične strukture koja se naziva motiv

leucinskog „zippera“ (patent zatvarača) (48). Ova struktura okarakterizirana je ponavljajućim uzorkom leucinskih ostataka razmaknutih na određenim intervalima duž cijele α -uzvojnice. Leucin „zipper“ motiv potiče formiranje dimerne uzvojnice, gdje hidrofobne interakcije između leucinskih ostataka potiču povezivanje dviju α -uzvojnica (slika 12B). Ovakva strukturna organizacija ne samo da stabilizira proteine, već omogućuje i specifične protein-protein interakcije koje su ključne za različite stanične procese, uključujući transkripcijsku regulaciju i prijenos signala (48).



Slika 12. A) struktura molekule leucina B) gornji (*lijevo*) i bočni (*desno*) prikaz strukture „zipper“ motiva (49)

S obzirom da je leucin jedna od esencijalnih aminokiselina, njegova sinteza u organizmu odvija se preko različitih metaboličkih puteva, uključujući α -ketoglutarat i acetoacetat kao prekursore (46). Ovaj proces reguliran je nizom enzima i signalnih molekula koje osiguravaju ravnotežu između sinteze i razgradnje leucina, što je ključno za održavanje homeostaze unutar organizma.

Leucin igra ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima, uključujući regulaciju sinteze proteina i mišićne mase (50). Do sad provedena istraživanja pokazala su kako leucin može potaknuti sintezu proteina u mišićima, što može biti od koristi u prevenciji gubitka mišićne mase tijekom starenja ili bolesti (50). Osim toga, leucin može modulirati signalne puteve koji kontroliraju stanični rast i preživljavanje, uključujući mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) signalni put. mTOR je protein-kinaza, tj. enzim koji katalizira fosforilaciju drugih proteina, a igra ključnu ulogu u regulaciji različitih bioloških procesa, uključujući stanični rast, proliferaciju, metabolizam i autofagiju (50). Leucin također ima potencijalne koristi u regulaciji metabolizma, kontroliranju glikemije i inzulinske osjetljivosti te može imati pozitivan utjecaj na prevenciju metaboličkih poremećaja poput dijabetesa tipa 2 (51).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Sve korištene kemikalije u ovoj sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima (52). Tijek kemijskih reakcija praćen je koristeći tankoslojnu kromatografiju (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Kontrola čistoće sintetiziranih spojeva također je ispitivana pomoću TLC. Detekcija neferocenskih spojeva provedena je korištenjem tankoslojne kromatografije pomoću ultraljubičaste (UV) svjetlosti valne duljine 254 nm i ninhidrinom uz paralelno zagrijavanje. Sintetizirani produkti pročišćeni su pomoću smjese etil-acetata i diklormetana različitih omjera, koja je služila kao eluens u tankoslojnoj preparativnoj kromatografiji na silikagelu (Kieselgel 60 HF254, KGaA, Darmstadt, Njemačka).

Karakterizacija sintetiziranih spojeva izvedena je uporabom nuklearne magnetske rezonance (NMR), tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS) i infracrvene spektroskopije (IR). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

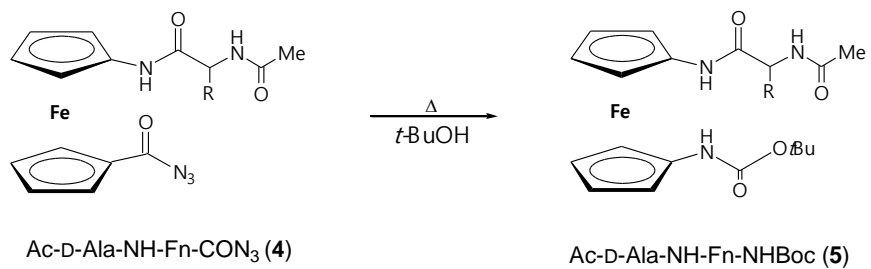
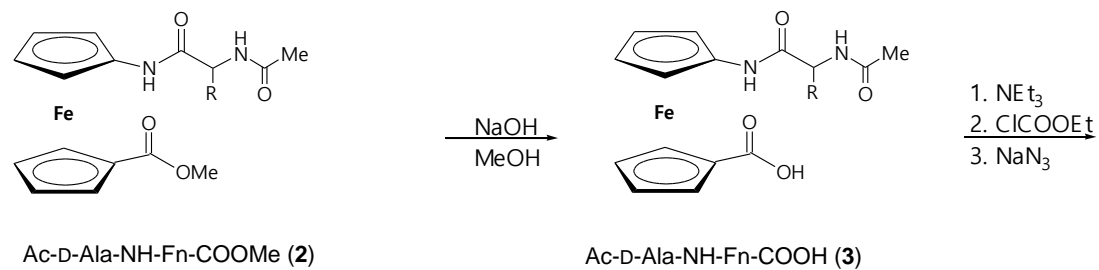
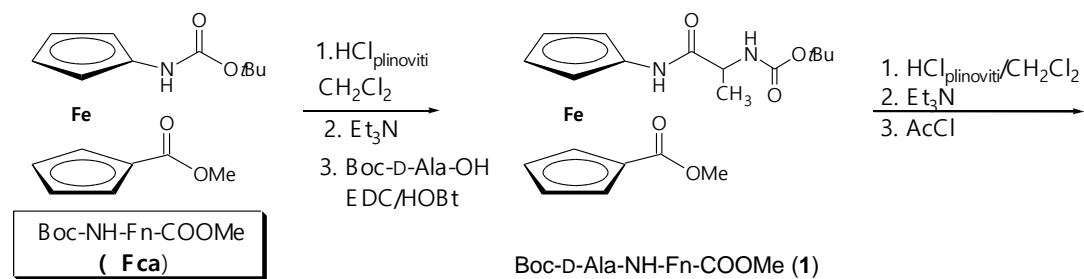
UV/Vis- i CD-spektri snimljeni su na CDspektrofotometru Jasco-810 (Jasco, Tokyo, Japan) u diklormetanu (CH_2Cl_2) i dimetil-sulfoksidu (DMSO). Na spektrofotometru Spectrum Two (PerkinElmer, Ujedinjeno Kraljevstvo) u CH_2Cl_2 snimljeni su IR-spektri (koncentracijski i temperaturni) uzoraka. Spektri masa dobiveni su ionizacijom elektroraspršenjem (ESI, *engl.*, *Electrospray ionization*) na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). ^{13}C -NMR- i ^1H -spektri određeni su u CDCl_3 na spektrometru Bruker AV600 (Bruker, Rheinstetten, Njemačka), uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u jedinici ppm.

Popis svih korištenih kemikalija u ovome radu:

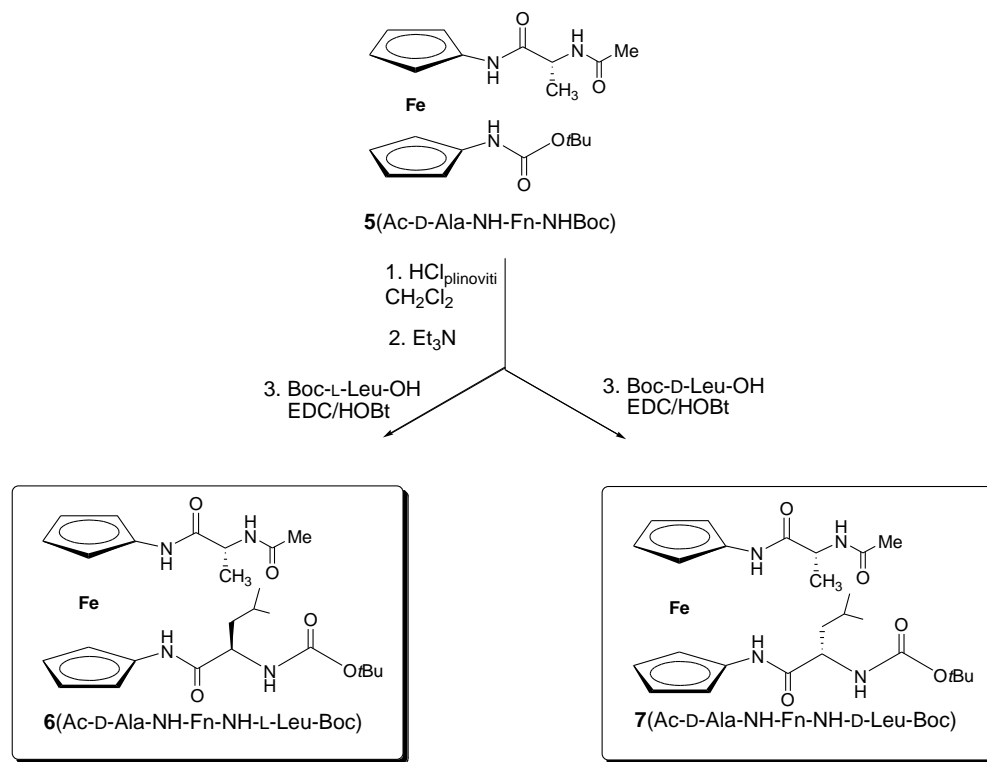
- diklormetan, CH_2Cl_2 (p.a., Kemika)
- natrijev klorid, NaCl (Aldrich)
- sulfatna kiselina, H_2SO_4 (Sigma-Aldrich)
- HOBt, 1-hidroksibenzotriazol-hidrat (Aldrich, Santa Clara, CA, USA)
- EDC, *N'*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid-hidroklorid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO_3 (Kemika)
- trietilamin, Et_3N (97%, Sigma-Aldrich)
- etil-acetat, EtOAc (Et-etil; Ac-acetil) (p.a., Kemika)
- metanol, CH_3OH (p.a., Kemika)
- acetil-klorid, CH_3COCl (98%, Alfa Aesar)
- bezvodni natrijev sulfat, Na_2SO_4 (Kemika)
- natrijev azid, NaN_3 (Kemika)
- natrijev hidroksid, NaOH (Kemika)
- aceton (propanon), CH_3COCH_3 (p.a., Kemika)
- etil-kloroformij, $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}_2$ (99%, Acros Organics)
- *tert*-butil-alkohol, $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ (Alfa Aesar)
- limunska kiselina (2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$ (Kemika)
- dimetil-sulfoksid, DMSO (Merck)

3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH PEPTIDA

Ferocenski peptidi (**2-7**) pripravljeni su postupcima koji su prikazani na shemama 1 i 2. Sinteza Boc-Fca (**V**) opisana je u literaturi te njezini spektroskopski podaci odgovaraju onima prikazanim u literaturi (53).



Shema 1. Priprava prekursora 2-5



Shema 2. Priprava ciljnih ferocenskih peptida **6** i **7**

3.2.1. Priprava peptida Boc–D–Ala–NH–Fn–COOMe (1)

Prvi korak je otapanje Boc-zaštićene ferocenske aminokiseline Fca **V** (1 g, 2,8 mmol) u diklormetanu, nakon čega se ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog klorovodika. Plinoviti klorovodik (HCl) pripravljen je *in situ* reakcijom koristeći natrijev klorid i sulfatnu kiselinu. Nakon 30 minuta miješanja u ledenoj kupelji te naknadnim otparavanjem na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastali se hidroklorid suspendira u CH₂Cl₂ i obrađuje sa suviškom trietilamina (Et₃N) (pH~9). Ferocenski amin, dobiven ovim postupkom, kopulira s Boc–D–Ala–OH (1,18 g, 5,5 mmol) koji je prethodno aktiviran primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon miješanja u trajanju od jednog sata pri sobnoj temperaturi (ili dok reakcija ne završi), dobivena reakcijska smjesa se ispire zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO₃) 10 %-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski sloj se zatim osuši bezvodnim natrijevim sulfatom (Na₂SO₄) i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, koristeći CH₂Cl₂:EtOAc = 5:1 kao eluens.

Pročišćavanje dobivenog sirovog produkta provodi se tankoslojnom kromatografijom, pri čemu se homogena smjesa uz pomoć kapalice s vatom nanese na staklenu ploču presvučenu silikagelom u obliku tanke linije. Potrebno je prethodno utvrditi optimalni sustav eluensa kako bi se postiglo optimalno pročišćavanje produkta. U eluens se stavlja pločica sa nanesenom smjesom, nakon čega je potrebno pričekati dok se spojevi iz smjese ne razdijele na temelju svojih različitih afiniteta za eluens kao mobilnu fazu i silikagel kao stacionarnu fazu. Nakon razvijanja kromatograma, promatra se mrlja koja po R_f vrijednosti odgovara vrijednosti produkta. Odredivši mrlju koja po R_f vrijednosti odgovara produktu, mrlja se špatulom sastruže te se prenese u sinter- lijevak i ispire otapalom sve dok se silikagel u lijevku ne obezboji. Otapalo je potrebno upariti kako bi se čisti produkt mogao prenijeti u izvaganu tikvicu. Od ukupne količine dobivenog produkta potrebno je izdvojiti količinu za snimanje koncentracijskih IR-spektara koja se odmah po završetku odvaja u epruvetu, dok se 100 mg čistog uzorka ostavlja za naknadno snimanje NMR spektara.

Boc–D–Ala–NH–Fn–COOMe (1)

t_r = 102-107°C; R_f = 0,49 (CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1)

IR (CH ₂ Cl ₂) ν _{max} /cm ⁻¹	3422 sr (NH _{slobodni}), 3316 sl (NH _{asocirani}), 1707 (C=O _{COOMe}), 1536, 1498, 1369 (amid II).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	7,63 [s, 1H, NH _{Fn}]; 5,14 [d, J = 6,93 Hz, 1H, NH _{Ala}]; 4,76 (m, 2H, 7-H, 10-H); 4,68 (s, 1H, 2-H); 4,57 (s, 1H, 5-H); 4,38 (m, 2H, 8-H, 9-H); 4,22 [m, 1H, CH _{Ala}]; 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,02

	(m, 1H, 3-H); 3,80 (s, 3H, CH ₃ COOMe); 1,48 [s, 22 9H, CH ₃ Boc]; 1,43 [d, <i>J</i> = 6.98 Hz, 3H, CH ₃ Ala]
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,88 [CO _{COOMe}]; 171,17 [CO _{Ala}]; 156,02 [CO _{Boc}]; 95,28 (C-1); 80,61 [Cq _{Boc}]; 72,70 (2C, C-8, C-9); 72,13 (C-6); 71,39 (C-10); 71,25 (C-7); 66,64 (C-4); 66,38 (C-3); 63,30 (C-2); 62,99 (C-5); 51,80 [2C, CH ₃ COOMe, CH _{Ala}], 28.51 [CH ₃ Boc]; 17,94 [CH ₃ Ala]

3.2.2. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

U prethodno pripravljenu suspenziju Boc-peptida **1** (800 mg; 1,52 mmol) i EtOAc, koja je ohlađena na 0 °C, uvodi se plinoviti HCl dobiven istim postupkom kao pri pripremi peptida **1**. Tankoslojnom kromatografijom utvrđuje se potpuno deprotektiranje peptida, nakon čega se otapalo upari, a dobiveni hidroklorid peptida **1** suspendira se u suhom diklormetanu (8mL) i otopi uz dodatak Et₃N (1,67 mL; 12,1 mmol). U pripravljenu otopinu, koja je prethodno ohlađena na 0 °C, dokapava se acetil-klorid (649 μL; 9,12 mmol) uz konstantno miješanje. Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, potrebno je smjesu izliti u vodu nakon čega slijedi višestruka ekstrakcija diklormetanom. Prethodno izdvojeni organski sloj ispire se zasićenom vodenom otopinom natrijevog klorida (NaCl), a zatim suši bezvodnim Na₂SO₄ i uparava do suhog. Nastali sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz eluens EtOAc.

Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

<i>t_r</i> = 127°C; <i>R_f</i> = 0,4 (EtOAc)	
IR (CH ₂ Cl ₂) <i>v</i> _{max} /cm ⁻¹	3422 sr (NH _{slobodni}), 3316 sl (NH _{asocirani}), 1707 (C=O _{COOMe}), 1536, 1498, 1369 (amid II).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	8,23 [s, 1H, NH _{Fn}]; 6,54 [d, <i>J</i> = 7,29 Hz, 1H, NH _{Ala}]; 4,75 (m, 1H, 7-H); 4,73 (m, 1H, 10-H); 4,67 (m, 1H, 2-H); 4,61 [m, 2H, CH _{Ala}]; 4,38 (m, 2H, 8-H, 9-H); 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,01 (m, 1H, 3-H); 3,79 (s, 3H, CH ₃ COOMe); 2,09 [s, 3H, CH ₃ Ac]; 1,45 [d, <i>J</i> = 6,96 Hz, 3H, CH ₃ Ala]
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,88 [CO _{COOMe}]; 170,86 [CO _{Ala}]; 170,63 [CO _{Ac}]; 95,32 (C-1); 72,61 (2C, C-8, C-9); 72,19 (C-6); 71,40 (C-10); 71,25 (C-7); 66,63 (C4); 66,31 (C-3); 63,34 (C-2); 63,04 (C-5); 51,80 [CH ₃ COOMe]; 49,41 [CH _{Ala}]; 23,43 [CH ₃ Ac]; 18,13 [CH ₃ Ala].

3.2.3. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)

U otopinu estera **2** (800 mg, 1,7 mmol) i 7 mL metanola, dodaje se 100 mg natrijevog hidroksida NaOH (1,7 mmol) i par kapi vode. Nakon dodavanja NaOH slijedi jednosatno refluksiranje, pri temperaturi od 65 °C, nakon čega se smjesa upari, ostatak zakiseli 20 %-tnom otopinom HCl-a te ekstrahira etilacetatom. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl-a, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari.

Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)

$t_r = 128-134^\circ\text{C}$; $R_f = 0,23$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 1)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$	3420 sl (NH _{slobodni}), 3296 sr (NH _{asocirani}), 3109-2800 (m, OH, COOH), 1710, 1697, 1653 (C=O _{COOH} , C=O _{CONH}), 1576 (amid II)
---	---

3.2.4. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-CON₃ (4)

Otopini kiseline **3** (1 g, 2,19 mmol) u 10 mL acetona dodaje se par kapi vode te se reakcijska smjesa hladi na 0 °C. Nakon hlađenja dokapava se otopina Et₃N (0,26 g, 2,49 mmol) u acetonu, te otopina etil-kloroformata ClCOOEt (0,052 g, 1,64 mmol) u acetonu, pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, dodaje se otopina NaN₃ (0,215 g, 3,29 mmol) u vodi. Reakcijska smjesa se zatim jedan sat miješa u ledenoj kupelji, nakon čega se razrjeđuje hladnom vodom hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, ispere 5 %-tnom zasićenom otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl-a, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha.

3.2.5. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5)

S obzirom da je pripremljena otopina azida nestabilna, pregradnja u karbamat vrši se *in situ*. Otopina azida **4** (400 mg) u 8 mL tert-butil-alkohola zagrijava se pri 65 °C, sve dok su na tankoslojnoj kromatografiji vidljivi tragovi reaktanata. Trajanje ovog postupka približno je 5 sati. Pri završetku reakcije, reakcijska smjesa se upari, a dobiveni produkt potrebno je pročistiti preparativnom kromatografijom ut EtOAc.

Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5)

$t_r = 142-145^\circ\text{C}$; $R_f = 0,33$ (EtOAc)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$	3428 j (NH _{slobodni}), 3313 sr (NH _{asocirani}), 1703, 1682, 1665 (C=O _{CONH}), 1530, 1513 (amid II)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	8,30 (s, 1H, NH _{F_n}); 6,58 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, NH _{Ala}); 6,23 (s, 1H, NH _{Boc}); 4,61–4,53 (m, 3H, H _{F_n} , CH _{Ala}); 4,35–4,30 (m, 2H, H _{F_n}); 4,13–4,01 (m, 4H, H _{F_n}); 2,05 (s, 3H, CH _{3Ac}); 1,50 [s, 9H, (CH ₃) _{3Boc}]; 1,44 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH _{3Ala}).

¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,20 (CO _{Fn}); 170,54 (CO _{Ac}); 80,54 (C _q _{Boc}); 65,93; 65,53; 65,47; 65,15; 62,95 (CH _{Fn}); 49,51 (CH _{Ala}); 28,55 [(CH ₃) ₃ Boc]; 23,37 (CH _{3Ac}); 18,43 (CH _{3Ala}).
---	--

3.2.6. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (6) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (7)

Boc-zaštićeni prekursor **5** (300 mg, 0,57 mmol) otopi se u EtOAc, zatim se ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30 minutnog 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-D/L-OH primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 satnog 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 = 1 : 5 ili 1 : 10 kao eluens.

Ac-D-Ala-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc (7)

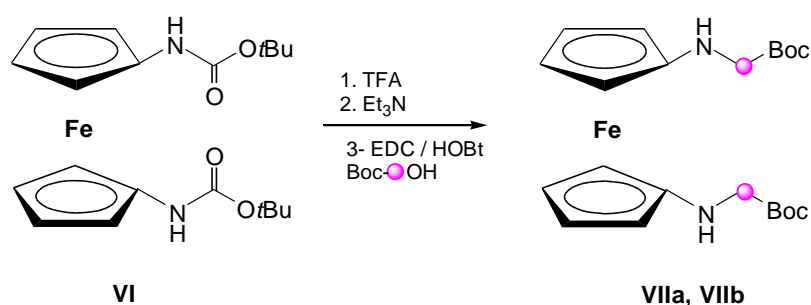
$t_r = 225-229^\circ\text{C}$; $R_f = 0,73$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 3)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$	3437 sr (NH _{slobodni}), 3301 j, 3239 sr (NH _{asocirani}), 1723, 1682, 1667 (C=O _{CONH}), 1572, 1567, 1505 (amid II)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	9,25 (s, 1H, NH ¹ _{Fn}); 9,15 (s, 1H, NH ² _{Fn}); 6,87 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H, NH _{Ala}); 5,38 (s, 1H, H-7); 5,37 (s, 1H, H-10); 5,34 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H, NH _{Leu}); 5,20 (dq, 1H, CH _{α-Ala}); 4,55 (pt, 1H, H-2); 4,22 (pt, 1H, H-5); 4,18 (q, 1H, CH _{α-Leu}); 4,00-3,98 (3, 4H, H-8, H-9, H-3, H-4); 2,07 (s, 3H, CH _{3-Ac}); 1,71-1,68 (m, 1H, CH _{γ-Leu}); 1,61-1,48 (m, 2H, CH _{2, β-Leu}); 1,46 [s, 9H, (CH ₃) ₃ Boc]; 1,39 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH _{3-Ala}); 0,94 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH _{3, γ-Leu}); 0,86 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH _{3, γ-Leu})
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,83 (CO _{Fn1}); 171,78 (CO _{Fn2}); 171,3 (CO _{Ac}); 157,05 (CO _{Boc}); 130,15 (C-1); 129,88 (C-6); 80,75 (C _q _{Boc}); 71,40 (C-8); 70,76 (C-9); 70,20 (C-3); 69,28 (C-4); 62,84 (C-7); 65,74 (C-10); 64,98 (C-2); 63,78 (C-5); 54,14 (CH _{Leu}); 50,43 (CH _{Ala}); 41,17 (CH _{2, β-Leu}); 28,45 [(CH ₃) ₃ Boc]; 24,78 (CH _{γ-Leu}); 22,83 (CH _{3-Ac}); 22,16 (CH _{3, γ-Leu}); 22,12 (CH _{3, γ-Leu}); 17,26 (CH _{3-Ala1})
ESI-MS	izračunato za C ₂₆ H ₃₈ N ₄ O ₅ Fe: 542,45; dobiveno [M+H] ⁺ na m/z 543,15

4. REZULTATI I RASPRAVA

Teorijski dio ovog Diplomskog rada obuhvatio je pregled priprave konformacijskih svojstava ferocenskih biokonjugata koji su pripremljeni kopulacijom Fcda (**VI**) s prirodnim aminokiselinama. S obzirom na strukturu ferocena (udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena iznosi 3,3 Å, čineći ga izuzetnim kalupom za stvaranje vodikovih veza) (54), njegovo umetanje unutar peptidnih lanaca omogućuje tvorbu različitih strukturnih elemenata (uzvojnice, ploče i okreti). Obrasci IHB-a, na kojima se temelji tvorba sekundarnih strukturnih elemenata u peptidima **I-III**, određeni su strukturom ferocenskog kalupa (**Fcd**, **Fca**, **Fcda**) te strukturom i apsolutnom konfiguracijom prirodnih aminokiselina.

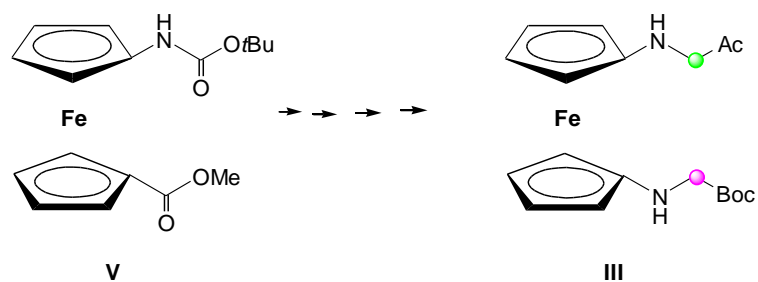
Kako je opisano u *Teorijskom dijelu* (poglavlje 2.7.), utjecaj ferocen-1,1'-diamina (Fcda) na kiralnu organizaciju izvedenih peptida **III** slabo je istražen. Naime, u jednoj od metoda Kraatz je opisao sintezu i konformacijska svojstva simetrično disupstituiranih peptida $\text{Fn}-(\text{NH-L-Ala-Boc})_2$ (**VIIa**) i $\text{Fn}-(\text{NH-D-Ala-Boc})_2$ (**VIIb**) izvedenih iz Boc-zaštićenog diamina Fcda (**VI**) koji je nakon deprotekcije s TFA *in situ* konjugiran s Boc-L-Ala-OH odnosno Boc-D-Ala-OH (shema 3) (55).



Shema 3. Općeniti prikaz priprave 'Kraatzovih' peptida

Kovačević i sur. 2015. godine, po prvi su put pripravili ferocenske peptide izvedene iz ferocen-1,1'-diamina i alanina pri čemu je osmišljena nova strategija za pripravu peptida tipa **III** (shema 4) (27). Za razliku od Kraatzove metode koja omogućava istodobno uvođenje identičnih aminokiselinskih sekvenci na oba ferocenska prstena, ovim je pristupom moguće pripremiti peptide **III** u kojima su različiti homo- i heterokiralni peptidi vezani na Fcda.

Daljnji tijek istraživanja bio je usmjeren prema ispitivanju utjecaja vrste i kiralnosti umetnutih aminokiselina na konformacijska svojstva sintetiziranih biokonjugata (28,29,56).



Shema 4. Općeniti prikaz pripreve peptida tipa **III**

Budući da su svi pripremljeni alaninski homolozi mimetika **III** ostvarili strukture β -okreta, a s obzirom da je poznato da bočni ogranci aminokiselina mogu različito utjecati na sekundarnu strukturu peptidomimetika, primjenom opisane strategije odlučili smo u sklopu ovog *Diplomskog rada* alaninsku podjedinicu na donjem ferocenskom lancu zamijeniti aminokiselinskom podjedinicom s razgranatim bočnim ogrankom, L-Leu odnosno D-Leu. Na taj način namjeravali smo utvrditi kako bočni ogranak i kiralnost spomenute aminokiseline utječe na tvorbu vodikovih veza između ili unutar podandnih peptidnih lanaca, te odrediti djeluje li ferocenski kalup kao začetnik okreta.

Stoga smo u sklopu ovog diplomskog rada opisali pripravu i konformacijska svojstva nižeg homologa peptida **III**, Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**7**), dok heterokiralni analog Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (**6**) nije pripremljen u količinama dostatnim za konformacijsku analizu. Konformacijska analiza pripremljenih spojeva provedena je spektroskopskim metodama (IR- i NMR-spektroskopija) te je uspoređena sa spektroskopskim podacima i rezultatima dobivenim za alaninski i leucinski analog (27,29).

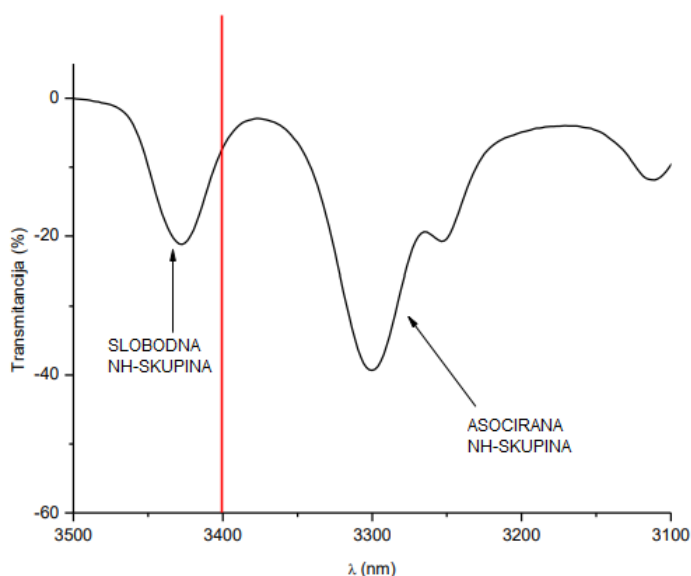
4.1. SINTEZA CILJNOG FEROCENSKOG PEPTIDA Ac-D-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc (**6**) i Ac-D-Ala-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc (**7**)

Derotekcijom terminalne Boc-zaštitne skupine peptida **5** te *in situ* kopulacijom nastalog amina s aktiviranim D-Leu pripremlja se 59 % dipeptida **7** (shema 2).

Uvođenje leucinske jedinice na N-terminus donjeg Cp-prstena peptida **5** registrirano je u ¹H-NMR-spekttru karakterističnim pomacima njegovih metinskih ($\delta=4,18$ i $1,71-1,68$ ppm), metilne ($1,61-1,48$ ppm) te metilenskih skupina ($\delta=0,94$ i $0,86$ ppm). Pomaci ugljikovih atoma spomenutih skupina očitani su pri $54,14$ ppm za CH_α te $24,78$ ppm za CH_γ; pri $41,17$ ppm za metilnu leucinsku skupinu te pri $22,16$ i $22,12$ ppm za metilenske skupine.

4.2. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

IR-spektroskopija je metoda kojom se istražuje konformacijski prostor peptida u otopini (15,57,58). Koristeći IR-spektroskopiju, moguće je odrediti sekundarnu strukturu prateći apsorpciju infracrvenog zračenja. Istezne frekvencije NH-skupina koje se nalaze 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. Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina koje su vidljive ispod 1730 cm^{-1} upućuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



Slika 13. Prikaz područja isteznih frekvencija NH-skupina (59)

Karakter vodikove veze (inter- ili intramolekulski) određuje se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara. Provodi se tako da se postupno razrjeđuje 50 mM otopina ferocenskog peptida u diklormetanu što će dovesti do cijepanja intermolekulskih vodikovih veza i uzrokovati znatno smanjenje intenziteta signala NH skupina u području ispod 3400 cm^{-1} . Ako su u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

U slučaju kada su N–H ili C=O skupine povezane vodikovim vezama, njihove se istežne frekvencije u IR-spektaru pomiču ispod 3400 cm^{-1} (red-shift). Područje signala NH skupina ($3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) u IR spektru prikazanom za uzorak sadrži tri različite apsorpcijske vrpce: jedne iznad 3400 cm^{-1} i dviju ispod 3400 cm^{-1} , što ukazuje na prisutnost slobodnih i asociranih NH skupina te tvorbu konformacija temeljenih na IHB. Nadalje, prisutnost vrpce na 1723 cm^{-1} , 1682 cm^{-1} , i 1667 cm^{-1} , karakterističnih za istežanje C=O skupina u amidima, kao

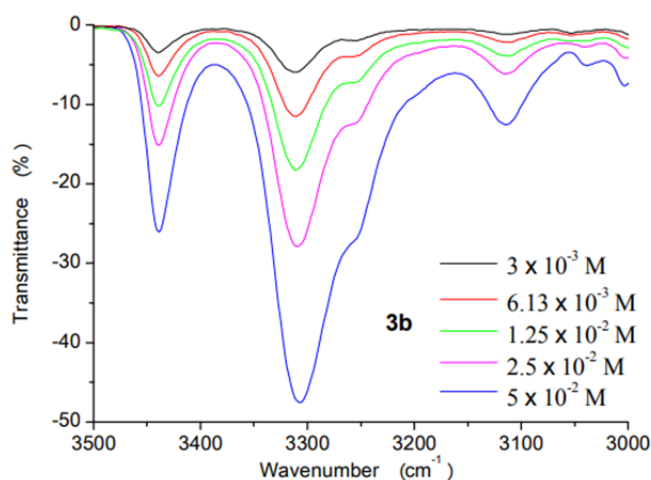
i amid II vrpci na 1572 cm^{-1} , 1567 cm^{-1} , i 1505 cm^{-1} , , dodatno potvrđuje prisutnost asociranih i slobodnih NH skupina u uzorku (tablica 1).

Tablica 1. Istezne vibracije^[a] NH- i CO-skupina dipeptida **7**

Spoj	Formula	νNH (slob.)	νNH (asoc.)	νCO (amid I)	νCO (amid II)
VIII	Ac-D-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Ala-Boc	3439 w	3310 m 3253 m	1684 1665	1571 1506
XI	Ac-D-Leu-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Leu-Boc	3434 m	3292 s	1733 1663	1492
7	Ac-D-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Leu-Boc	3437 sr	3301 j 3239 sr	1723 1682 1667	1572 1567 1505

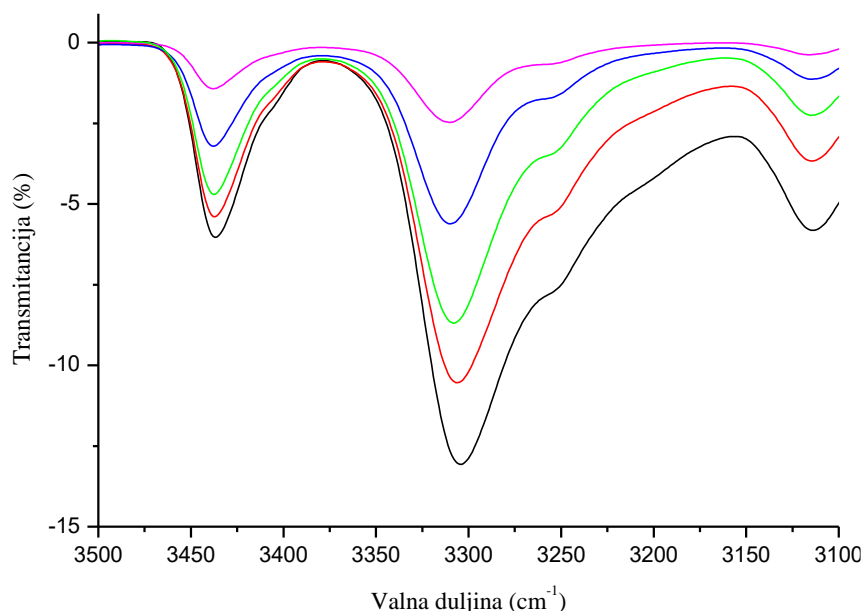
^[a] IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2 , $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$.

Kovačević i suradnici su u svome radu 2015. godine, proučavali Ac-Ala-NH¹-Fn-NH²-Ala-Boc (**VIII**) (27), analog ovdje opisanog peptida **7**. Pri tom su došli do zaključka kako je intenzitet slobodnih NH skupina ostao nepromijenjen tokom razrjeđivanja od $5 \times 10^{-2}\text{ M}$ do $1,25 \times 10^{-2}\text{ M}$, za razliku od signala asociranih NH skupina, čiji se intenzitet smanjio (slika 14). Iz priloženog se može zaključiti kako su ovom slučaju intramolekulske vodikove veze dominantnije u odnosu na intermolekulske vodikove veze. Omjer slobodnih NH skupina i onih uključenih u vodikove veze ostao je nepromijenjen tijekom daljnjeg razrjeđivanja. Dobiveni rezultati, potvrđuju dominaciju intramolekulskih vodikovih veza, ali i postojanje intermolekulski vezanih NH skupina.



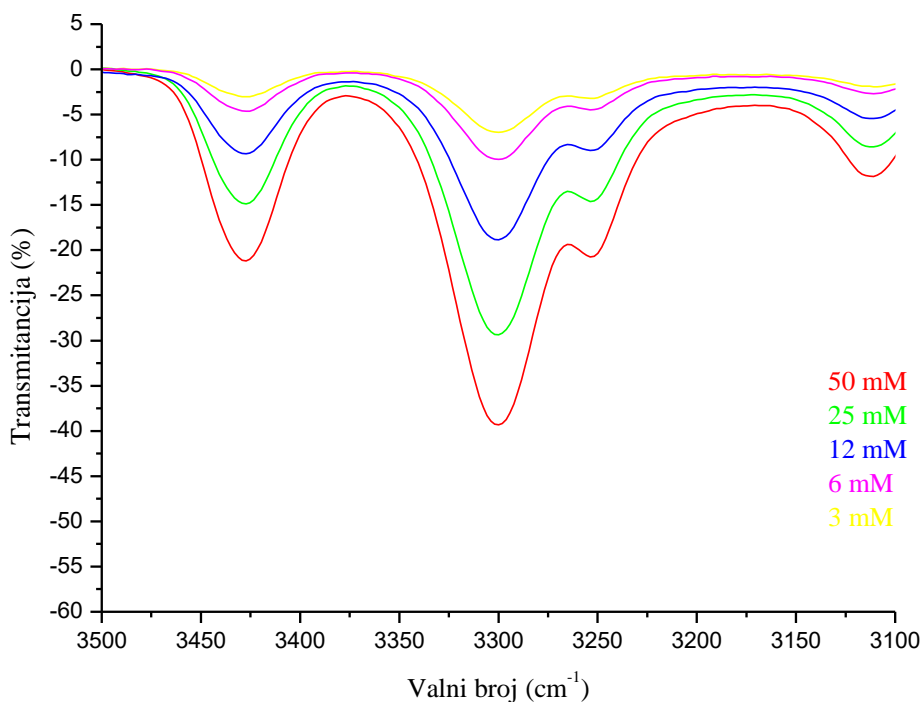
Slika 14. Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja Ac-Ala-NH¹-Fn-NH²-Ala-Boc (**VIII**) u području NH skupina (27)

Koncentracijski-ovisan IR spektar peptida **7** u području NH skupina prikazan je na slici 15. Iz prikazanog spektra može se uočiti kako su vrpce i intenzitet asociраних NH-skupina dominantni u odnosu na slobodne NH-skupine. Uz to, vidljivo je kako postepenim razrjeđivanjem diklormetanske otopine u koncentracijskom rasponu od 5×10^{-2} M do 3×10^{-3} M dolazi do proporcionalnog slabljenja intenziteta vrpce slobodnih i asociраних NH-skupina.



Slika 15. Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja **7** u području NH skupina (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].

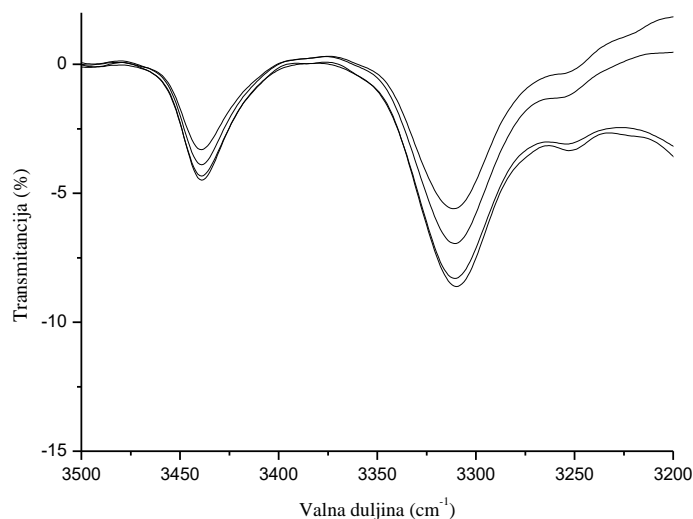
Kovačević i suradnici 2022. godine sintetizirali su spoj Ac-D-Leu-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc (**XI**) koji je analog spoju **7** (29). Proučavajući prikazani koncentracijski IR spektar moguće je zaključiti kako ne dolazi do značajnijih promjena omjera intenziteta slobodnih i asociраних NH skupina prilikom razrjeđivanja od 5×10^{-2} M do $1,25 \times 10^{-2}$ M (29). S obzirom da zamjenom metilnog alaninskog s voluminoznijim izobutilnim leucinskim bočnim ogrankomne dolazi do promjene omjera intenziteta slobodnih i asociраних NH vrpce, može se zaključiti da sterički voluminozniji leucin ne utječe na tvorbu IHB.



Slika 16. Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja Ac-D-Leu-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc (**XI**) u području NH skupina [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (----) $c = 2.5 \times 10^{-2}$ M, (· · ·) $c = 1.25 \times 10^{-2}$ M]

Temperaturno-ovisna IR spektroskopija koristi se u svrhu praćenja promjena vibracijskih svojstva molekule kao rezultat promjena temperature. Promjene u temperaturi imaju utjecaj na stabilnost IHB, posljedično i na konformaciju same molekule. Praćenjem promjena položaja i intenziteta apsorpcijskih vrpca NH skupina uslijed temperaturnih promjena može se steći uvid u jakost IHB odnosno stabilnosti ostvarenih konformacija.

Iz prikazanog temperaturno-ovisnog IR spektra spoja **7** (slika 17) može se zaključiti kako povećanjem temperature od 25 °C do 45 °C dolazi do promjene u intenzitetu vrpca koje su povezane s vibracijskim frekvencijama slobodnih i asociranih NH skupina, što ukazuje na utjecaj povećanja temperature na uspostavljene IHB. Povećanjem temperature intenzitet vrpca asociranih i slobodnih NH skupina podjednako slabi, pa ovi rezultati sugeriraju da su NH skupine uključene u jake IHB, s obzirom da zagrijavanje ne utječe značajno na promatrane IR signale.



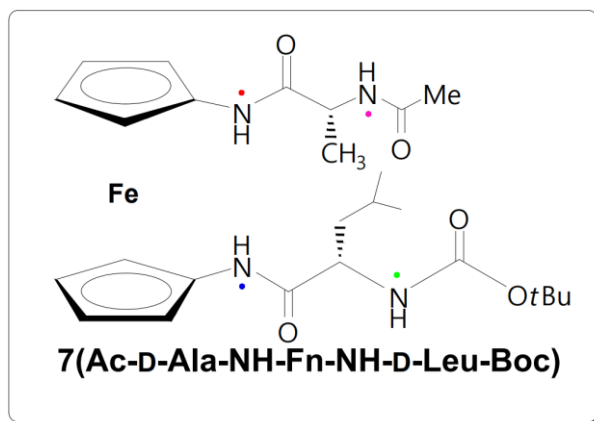
Slika 17. Temperaturno-ovisni IR-spektri spoja **7** u području NH skupina (CH_2Cl_2 , 25-45 °C).

4.3. SPEKTROSKOPIJA NUKLEARNE MAGNETSKE REZONANCIJE (NMR)

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) je spektroskopska analitička metoda koja se koristi u svrhu određivanja strukture organskih i anorganskih molekula (10). Osim molekulske strukture, NMR pruža uvid u 3D-strukturu proteina, odnosno prisutnost sekundarnih strukturnih elemenata.

NMR analiza omogućuje asignaciju različitih NH-skupina u molekuli prema njihovim kemijskim pomacima. Na temelju toga moguće je odrediti sudjeluju li pojedine NH-skupine u vodikovim vezama. NH-skupine koje su uključene u vodikove veze rezoniraju pri $\delta > 7$ ppm, dok se slobodne NH-skupine pojavljuju pri $\delta < 7$ ppm. Važno je za naglasiti kako su moguća odstupanja zbog različite kemijske okoline donorske NH-grupe (53).

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada određeni su koncentracijski- i temperaturni- ^1H NMR-spektri peptida **7**. Peptid **7** analiziran je pomoću ^1H NMR i ^{13}C -NMR spektrometrije te su različiti amidni protoni označeni različitim bojama radi lakšeg praćenja kemijskih pomaka (slika 18).



Slika 18. Amidni protoni dipeptida 7

Iz spektra je vidljivo kako su amidni protoni izravno vezani na ferocen (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) registrirani pri $\delta > 9$ ppm, što je jasni pokazatelj da sudjeluju u vodikovim vezama. Alaninski amidni proton (NH_{Ala}) zabilježen je pri $\delta = 6,87$ ppm, što ukazuje na smanjenu vjerojatnost sudjelovanja u vodikovim vezama. Suprotno tome, izuzetno nizak pomak ($\delta = 5,34$ ppm) NH-skupina D-Leu aminokiseline (NH_{Leu}) ukazuje na njihovu zasjenjenost, odnosno nesudjelovanje u vodikovim vezama.

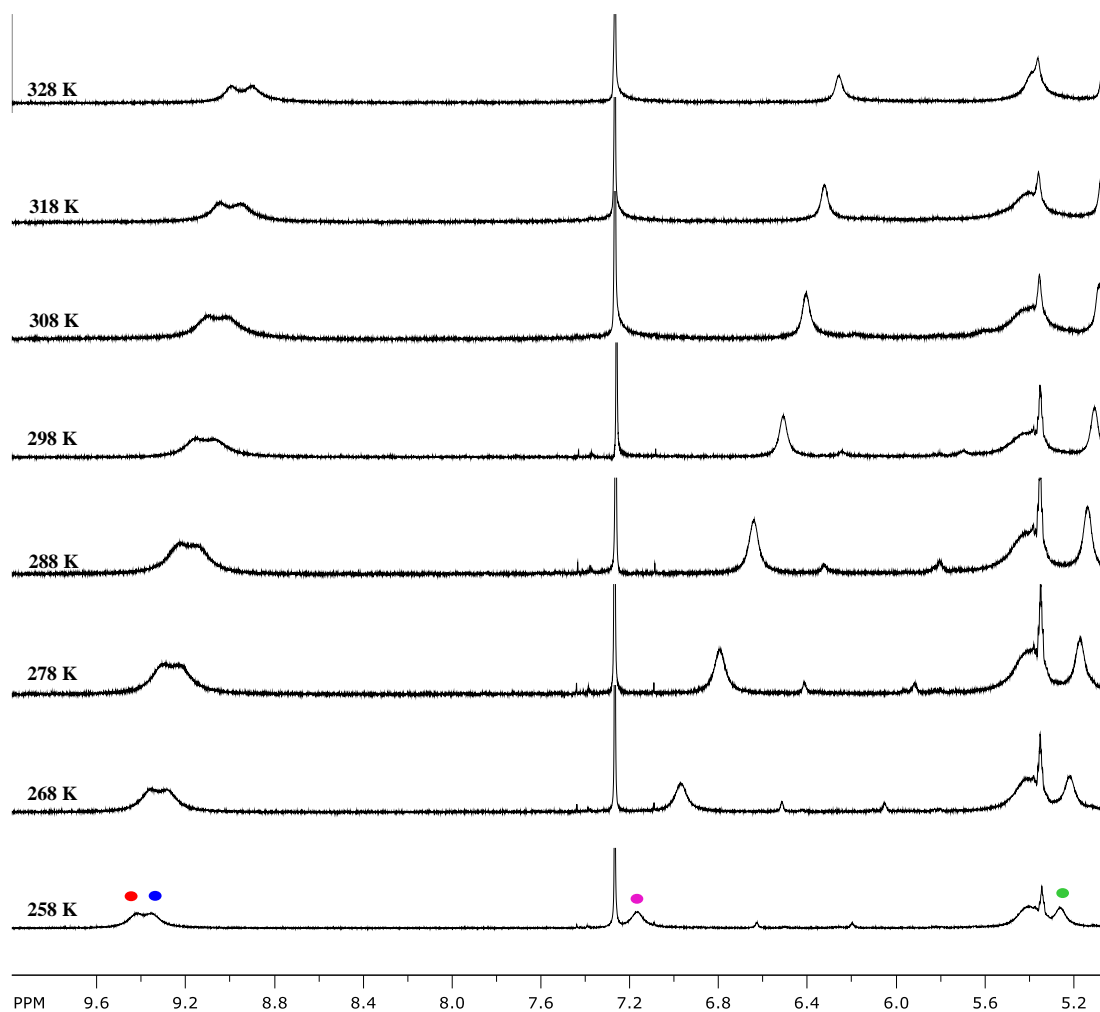
Kovačević i suradnici, 2015. godine dobili su slične rezultate prilikom analize spoja Ac-Ala-NH¹-Fn-NH²-Ala-Boc (**VIII**) (27). Sličnosti s peptidom 7 vidljive su kod praćenja pomaka amidnih protona izravno vezanih na ferocen i alaninskih amidnih protona. Alaninski amidni protoni spoja **VIII** također imaju kemijske pomake ispod 7 ppm što potvrđuje njihovo nesudjelovanje u vodikovim vezama. Isto tako, amidni protoni iz ferocenskog kalupa u oba slučaja rezoniraju oko 9 ppm što indicira njihovo sudjelovanje u IHB.

Uspoređujući dipeptid 7 sa spojem Ac-D-Leu-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc (**XI**), ponovno se može uočiti sličan obrazac kemijskih pomaka NH_{Fn} (~9 ppm) dipeptida **XI** što sugerira njihovo sudjelovanje u IHB. S druge strane, kemijski pomaci NH_{Boc} registrirani su oko 5 ppm, što indicira njihovo nesudjelovanje u IHB. S obzirom da se alaninska acetamidna (NH_{Ac}) skupina registrira pri višem polju ($\delta < 7$ ppm), upitan je donorski angažman u IHB. U cilju detaljnijeg uvida provedena su mjerenja NMR spektara ovisna o temperaturi i koncentraciji.

4.3.1. Temperaturni ¹H NMR-spektar spoja 7

Postepenim povećanjem temperature IHB slabe, rezultirajući kemijskim pomakom amidnog protona k višem polju. Da bi se potvrdio *intramolekulski karakter IHB* u peptidu 7 provedeno je temperaturno-ovisno mjerenje 25 mM otopine tog peptida u CDCl_3 u rasponu od 250-330 K (slika 19). U našim prethodnim istraživanjima utvrdili smo da zagrijavanjem otopina

peptida u navedenom rasponu kemijski pomaci slobodnih amidnih protona ili onih koji su uključeni u IHB ostaju jednaki ili se neznatno mijenjaju. Kod spojeva s jačim IHB i posljedično stabilnijom konformacijom, ne dolazi do velikih promjena kemijskog pomaka (δ). Kod NH_{Fn} signala zabilježeni su manji pomaci prema višem polju ($\Delta\delta < 0,5 \text{ ppm}$), potvrđujući pretpostavku da sudjeluju u jakim IHB. S druge strane, NH_{Ac} zabilježili su veću promjenu kemijskog pomaka prema nižem polju ($\Delta\delta > 1 \text{ ppm}$), pa je upitan njihov angažman u IHB.

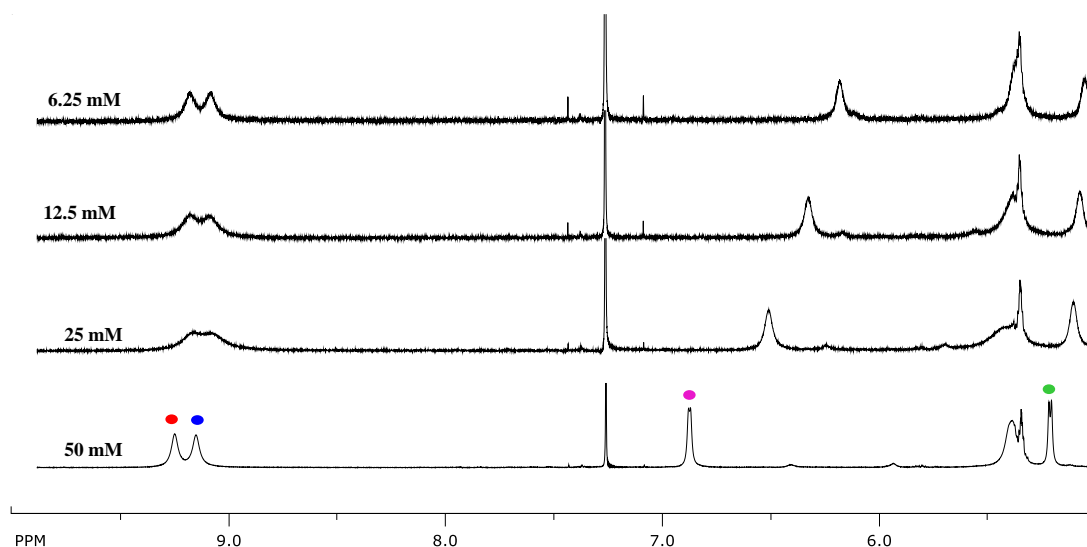


Slika 19. Temperaturni ^1H NMR-spektar spoja **7** ($c = 25\text{mM}$) u kloroformu

Uspoređujući rezultate prije opisanih spojeva (**VIII** i **XI**) s rezultatima dobivenim u ovome radu (peptid **7**), može se zaključiti kako je kod sva tri spoja prisutan sličan obrazac pomaka amidnih protona u više polje.

4.3.2. Koncentracijski ^1H NMR-spektar spoja 7

U prethodnom smo poglavlju na temelju koncentracijski-neovisnih IR-spektara pretpostavili *intramolekulski karakter IHB* u peptidu **7** koji se dodatno potvrdio temperaturno-neovisnim kemijskim pomacima NH skupina. Treba znati da se razrjeđivanjem (kao i prethodno spomenutim zagrijavanjem) cijepaju intermolekulske vodikove veze što uzrokuje pomak amidnih protona u više polje. Kovačević i suradnici utvrdili su kako nema značajnijih promjena kemijskih pomaka NH_{Fn} ($\Delta\delta = 0,06\text{--}0,13$ ppm) u koncentracijski ovisnim spektrima, potvrđujući njihovo sudjelovanje u IHB (27). Postupnim razrjeđivanjem nije se značajno utjecalo na kemijski pomak protona NH_{Boc} , dok su kod protona NH_{Ac} zabilježeni izraženiji pomaci prema višem polju. Zaključci doneseni u radu Kovačević i sur. (27), primjenjivi su i na analiziranom peptidu **7**. Iz koncentracijski neovisnog ^1H NMR-spektra spoja **7** u kloroformu vidljive su minimalne promjene u kemijskim pomacima NH_{Fn} , što je jasni pokazatelj njihovog sudjelovanja u IHB. Značajni pomaci prema višem polju vidljivi su kod amidnih protona NH_{Ac} , čime je indicirana mogućnost njihovog sudjelovanja u agregatima.



Slika 20. Koncentracijski ^1H NMR-spektar spoja **7** u kloroformu

4.4. TITRACIJA SPOJA 7 S DMSO

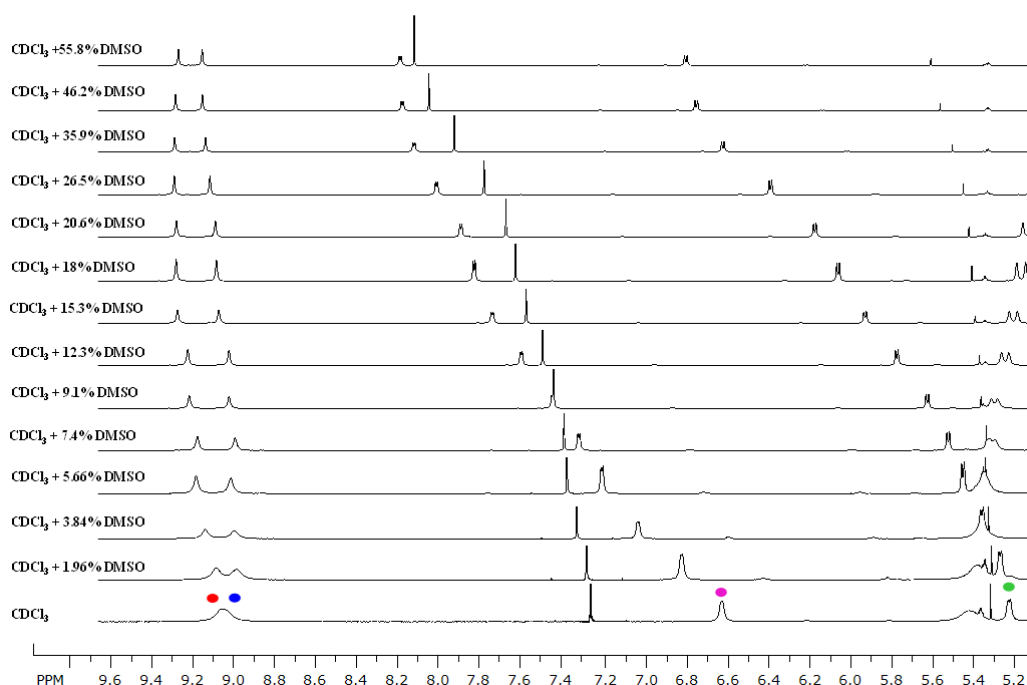
Važno strukturno i funkcijsko svojstvo peptidomimetika jest mogućnost nabiranja na jednak način kao i prirodni protein. Nabiranje proteina omogućeno je djelovanjem nekoliko nekovalentnih interakcija, uključujući hidrofobne, vodikove, Coulombove i van der Waalsove interakcije (61). Kako bi se odredila točna konformacija proteina i ispitala jakost IHB provodi

se titracija kloroformne otopine peptida s DMSO otapalom (61-65). DMSO je kompeticijsko otapalo koje akceptira i solvatira izložene NH protone, uzrokujući veliku promjenu njihovih kemijskih pomaka u niže polje. Ako su amidni protoni zaklonjeni vodikovim vezama, nedostupni su akceptorskom utjecaju DMSO-a pa neće doći do promjene njihovih kemijskih pomaka.

NMR titracija provodi se dodavanjem po 10 μL [d_6]-DMSO u 25 mM otopinu peptida u CDCl_3 sve do izostanka promjene u kemijskom pomaku promatranih NH skupina (spektri su baždareni prema TMS).

Nakon provedene titracije peptida **7** dobiveni su rezultati prikazani na slici 21. Vidljivo je kako tijekom titracije DMSO-om visoke vrijednosti kemijskih pomaka NH_{Fn} ostaju nepromijenjene ($\Delta\delta < 0,2$ ppm) što sugerira njihovo sudjelovanje u jakim IHB. Protoni NH_{Boc} i NH_{Ac} skupina pokazuju značajnije promjene kemijskih pomaka, što dodatno potvrđuje da NH_{Boc} skupina ne sudjeluje u stvaranju vodikovih veza, dok amidni proton NH_{Ac} skupine sudjeluje u tvorbi slabijih vodikovih veza.

Usporedimo li rezultate ispitivanog peptida **7** s spojevima **VIII** i **XI**, može se zaključiti kako sintetizirani spoj pokazuje podjednake rezultate onima prikazanim u navedenim radovima. Utvrđeno je kako NH_{Ac} sudjeluje u stvaranju slabih IHB, NH_{Fn} sudjeluje u jakim IHB, dok NH_{Boc} ne stupa u interakcije takvog tipa.



Slika 21. Titracija peptida **7** s DMSO.

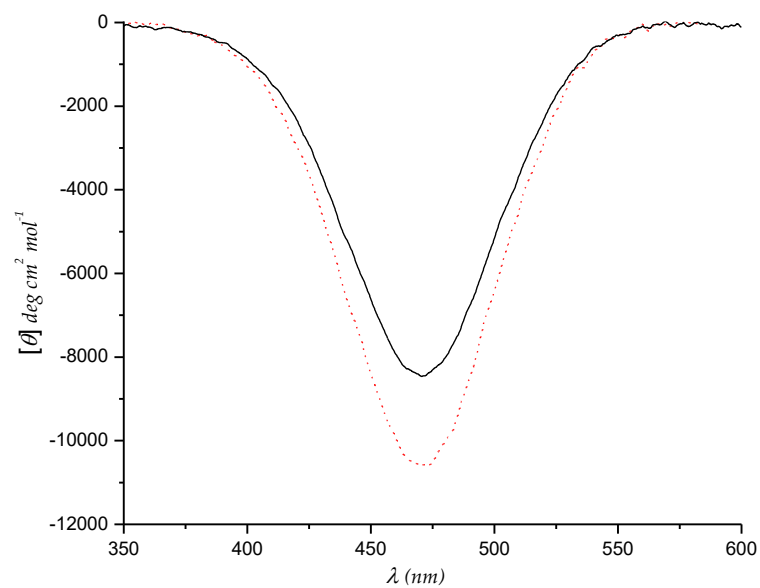
4.5. CD-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA SPOJA 7

CD spektroskopska analiza peptida i proteinapruga uvid u prisutnost α -uzvojnica i β -nabranih ploča. Međutim, važno je napomenuti da, iako ova metoda omogućuje određivanje udjela pojedinih sekundarnih struktura, nije moguće precizno odrediti koje aminokiseline sudjeluju u formiranju tih struktura. Za detaljniju analizu strukture potrebno je primijeniti NMR spektroskopiju.

Indukcijom jakih IHB u peptidima s umetnutim ferocenskim kalupom inducira se Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora ($\lambda \approx 480$ nm). Na predznak Cottonovog efekta utječu zaštitne skupine, otapalo te vrsta i slijed kovalentno vezanih prirodnih aminokiselina (53). Kada ferocenski peptidi zauzimaju konformacije poput okreta i β -nabranih ploča, koje su stabilizirane IHB, dolazi do ograničenja slobodne rotacije oko ferocenskog prstena. To rezultira heličnom kiralnošću ferocenske jezgre, što se odražava u Cottonovom efektu oko 470 nm. Intenzitet Cottonovog efekta proporcionalan je stabilnosti konformacije, dok predznak (pozitivan ili negativan) ovisi o kiralnosti ostvarene helične strukture (66).

U CD-spekttru analiziranog spoja **7** (slika 22) zabilježen je jak Cottonov efekt (~ 8000 deg cm² mol⁻¹), koji upućuje na postojanje visokouređenih struktura u otopini. U usporedbi s peptidima **VIII** (Ac-Ala-NH¹-Fn-NH²-Ala-Boc) i **XI** (Ac-D-Leu-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc), spoj **7** pokazuje slabiji (ali i dalje iznimno jak) Cottonov efekt, što upućuje na prisutnost uređenih struktura. Spoj **VIII** ima Cottonovog efekta (23000 deg cm² mol⁻¹) s pozitivnim predznakom, dok spoj **XI** ima viši intenzitet Cottonovog efekta (oko 27000 deg cm² mol⁻¹) s negativnim predznakom. Uzimajući u obzir da je jedina razlika između spoja **7** i **XI** u broju konstitutivnih Leu-podjedinica, očekivani je niži intenzitet Cottonovog efekta kod spoja **7** u odnosu na spoj **XI**, budući da je leucinski bočni ogranak voluminozniji od alaninskog, pa se može pretpostaviti da jače ometa tvorbu IHB i time smanjuje stupanj kiralnog uređenja.

IZ CD spektra (slika 22) je vidljivo kako dodatkom DMSO dolazi do 20 %-tnog povećanja intenziteta Cottonovog efekta spoja **7**. Povećanje intenziteta Cottonovog efekta nakon dodatka DMSOa sugerira da DMSO stabilizira specifične konformacije peptida **7**, doprinoseći njegovom kiralnom uređenju. Ovaj rezultat naglašava važnost razmatranja utjecaja otapala na sekundarne strukture peptida tijekom CD spektroskopskih mjerenja.



Slika 22. CD-spektri spoja **7** u diklormetanu [$c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$ (puna crna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crvena crta).

5. ZAKLJUČCI

1. Sinteza peptida Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**7**) uspješno je provedena u dobrom iskorištenju (59%).
2. IR-spektroskopijom detektirane su slobodne ($< 3400 \text{ cm}^{-1}$) i asocirane ($>3400 \text{ cm}^{-1}$) NH-skupine, dok se koncentracijski-neovisnom IR-spektrometrijom dokazala prevalencija IHB.
3. Temperaturno-ovisnom IR-spektroskopijom spoja **7** pokazalo se kako povećanjem temperature ne dolazi do značajnih promjena omjera intenziteta apsorpcijskih vrpca asociranih i slobodnih NH-skupina, ukazujući na postojanje jakih IHB.
4. NMR spektroskopijom pokazali smo kako NH protoni iz ferocenskog kalupa (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) imaju važnu ulogu u stvaranju IHB, dok NH skupina D-Leu (NH_{Ac}) ne sudjeluje u stvaranju vodikovih veza.
5. Titracijom NMR uzoraka spoja **7** s kompeticijskim otapalom DMSO testirana je jakost IHB. Neznatne promjene kemijskih pomaka NH skupina iz ferocenskog kalupa sugeriraju njihovo sudjelovanje u jakim IHB.
6. Jaki Cottonovi efekti spoja **7** u području ferocenskog kromofora dodatno induciraju prisutnost visokouređenih kiralnih struktura.

6. LITERATURA

1. Jaouen G, Beck W, McGlinchey, MJ (2006) A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles. U: Jaouen G (ured.) Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine, John Wiley & Sons, Weinheim, str. 1-37.
2. Rapić V, Kovačević M (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija - ferocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61**, 71-120. <https://hrcak.srce.hr/file/114513>
3. Simonneaux G, (ur.) (2006) Bioorganometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
4. Barišić L (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
5. Rehman I, Farooq M, Botelho S (2022) Biochemistry, Secondary Protein Structure. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470235/>
6. Majnarić D (2019) Analiza homeostaze proteina u primarnim staničnim linijama iz miševa divljeg tipa i sti-heterozigotnih miševa (završni rad), Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:801047>
7. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) Biokemija (preveli Weygand Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb.
8. Teparić R (2021) Biokemija 1 – interna skripta – radna verzija, nastavni materijali iz kolegija Biokemija 1. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5527921/mod_resource/content/1/Proteini%20-%20struktura%20i%20svojstva.pdf Pristupljeno 21. travnja 2024.
9. Liskamp RMJ, Rijkers DTS, Kruijter JA, Kemmink J (2011) Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics. *ChemBioChem* **12**, 1626-1653.

10. Kovačević M (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorska disertacija), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
<https://repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:261/datastream/PDF/view>
11. Reese HR, Shanahan CC, Proulx C, Menegatti S (2020) Peptide science: a "rule model" for new generations of peptidomimetics. *Acta Biomater* **102**, 35-74.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00136>
12. Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR (2006) Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotech* **17**, 638–642. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.002>
13. Jerić I (2004) Peptidnimimetici: zašto i kako? *Kemija u industriji* **53**, 495-504.
<http://fulir.irb.hr/1107/>
14. Zeeshan F, Tabbassum M, Kesharwani P (2019) Investigation on secondary structure alterations of protein drugs as an indicator of their biological activity upon thermal exposure. *Protein J* **38**, 551-564. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09837-4>
15. Pelton J, McLean L (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem* **277**, 167-176. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4320>
16. Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *BBA-Bioenergetics* **1767**, 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
17. Whitmore L, Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400.
18. Hinds MG, Norton RS (1997) NMR spectroscopy of peptides and proteins. *Molecular Biotechnology*, **7**, 315–331.
19. Metaloceni. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. Pristupljeno 16. travnja 2024.
<https://www.enciklopedija.hr/clanak/metaloceni>

20. Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija, *KUI* **60**, 61–79.
21. Ong YC, Gasser G (2019) Organometallic compounds in drug discovery: Past, present and future. *Drug Discov. Today Technol* **37**, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2019.06.001>
22. Sijongesonke P, Aderibigbe BA (2019) Ferrocene - Based Compounds with Antimalaria/Anticancer Activity. *Molecules* **24**, 3604. <https://doi.org/10.3390/molecules24193604>
23. Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>
24. Moriuchi T, Hirao T (2006) Ferrocene–Peptide Bioconjugates. U: Simonneaux G (ured.) *Bioorganometallic Chemistry. Topics in Organometallic Chemistry* 17.izd. Springer, Berlin, str. 143–175.
25. De Hatten X, Weyhermuller T, Metzler-Nolte N (2004) Ferrocenoyl peptides with sulfur-containing side chains: synthesis, solid state and solution structures. *J Organomet Chem* **689**, 4856-4867.
26. Chowdhury S, Schatte G, Kraatz H-B (2006) Rational design of bioorganometallic foldamers: A potential model for parallel β -helical peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 6882-6884. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>
27. Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M, i sur. (2015) The conjugate of β -turn-nucleating ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans* **44**, 16405–16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>
28. Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Adhikari B (2017) Helically chiral peptides that contain ferrocene-1,1'-diamine scaffolds as a turn inducer. *Chem Eur J* **23(43)**, 10372-10395. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>
29. Kovačević M, Markulin D, Zelenika M, Marjanović M, Lovrić M, Polančec D, i sur. (2022) Hydrogen bonding drives helical chirality via 10-membered rings in dipeptide

conjugates of ferrocene-1,1'-diamine. *Int J Mol Sci* **23**, 12233.
<https://doi.org/10.3390/ijms232012233>

30. Litwack G (2018) Human biochemistry, 2. izd., Academic Press, London/ San Diego/ Cambridge/ Oxford, str. 191-192.
31. Kralik G, Kralik Z, Gvozdanović K (2022) Karnozin – polifunkcionalan biološki aktivan sastojak. *Poljoprivreda* **28**, 81-88. <https://doi.org/10.18047/poljo.28.2.11>
32. O'Neil KT, DeGrado WF (1990) A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* **250**, 646-651.
<https://doi.org/10.1126/science.2237415>
33. Marqusee S, Robbins VH, Baldwin RL (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5286-5290.
34. Lotan N, Yaron A, Berger A (1966) The stabilization of the α -helix in aqueous solution by hydrophobic side-chain interaction. *Biopolymers* **4**, 365-368.
35. Scholtz JM, Baldwin RL (1992) The Mechanism of Alpha-Helix Formation by Peptides. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 95-118.
36. Padmanabhan S, Marqusee S, Ridgeway T, Laue T M, Baldwin RL (1990) Relative Helix-Forming Tendencies of Nonpolar Amino Acids. *Nature* **344**, 268-270.
37. Merutka G, Lipton W, Shalongo W, Park S-H, Stellwagen E (1990) Effect of Central-Residue Replacements on the Helical Stability of a Monomeric Peptide. *Biochem* **29**, 7511-7515.
38. Lyu PC, Liff MI, Marky LA, Kallenbach NR (1990) Side Chain Contributions to the Stability of Alpha-Helical Structure in Peptides. *Science* **250**, 669-673.
39. Chakrabarty A, Schellman JA, Baldwin RL (1991) Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature* **351**, 586-588.
40. Woutersen S, Pfister R, Hamm P, Mu Y, Kosov DS, Stock G (2002) Peptide conformational heterogeneity revealed from nonlinear vibrational spectroscopy and

moleculardynamics simulations. *J Chem Phys* **117**, 6833-6840.
<https://doi.org/10.1063/1.1506151>

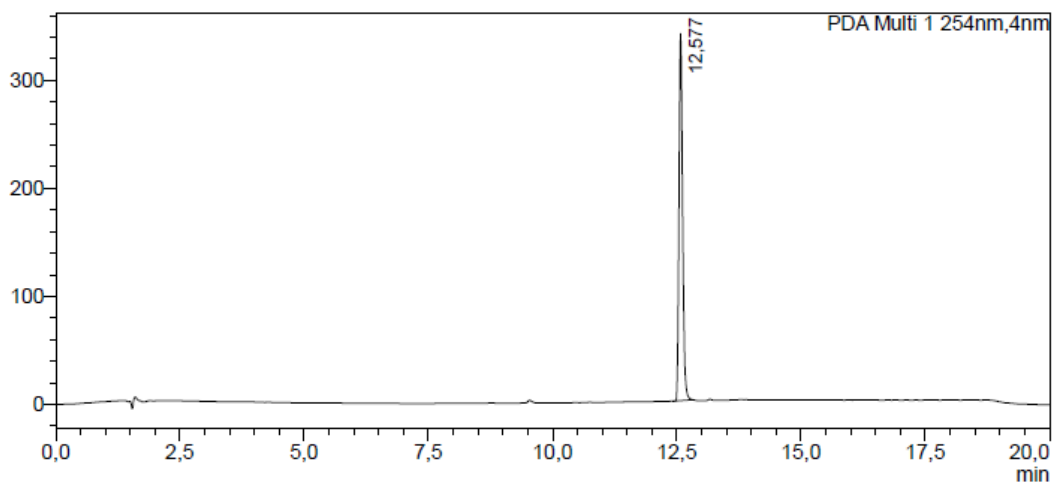
41. Shi Z, Olson CA, Rose GD, Baldwin RL, Kallenbach N. (2002) Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 9190- 9195.
42. McColl IH, Blanch EW, Hecht L, Kallenbach NR, Barron LD (2004) Vibrational raman optical activity characterization of poly(L-proline) II helix in alanine oligopeptides. *J Am Chem Soc* **126**, 5076–5077.
43. Graf J, Nguyen P, Stock G, Schwalbe H (2007) Structure and dynamics of the homologous series of alanine peptides: A Joint Molecular Dynamics/NMR Study. *J Am Chem Soc* **129**, 1179-1189.
44. Schweitzer-Stenner R, Eker F, Griebenow K, Cao X, Nafie LA (2004) The conformation of tetraalanine in water determined by polarized raman, FT-IR, and VCD Spectroscopy. *J Am Chem Soc* **126**, 2768-2776.
45. Narwani TJ, Santuz H, Shinada N, Melarkode Vattekatte A, Ghouzam Y, Srinivasan N, i sur. (2017) Recent advances on polyproline II. *Amino Acids* **49**, 705–713.
<https://doi.org/10.1007/s00726-017-2385-6>
46. Stryer L (2013) Biokemija(preveli Weygand Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb, str. 40-55.
47. Neinast M, Murashige D, Arany Z (2018) Branched chain amino acids. *Annu Rev Physiol* **81** (1), 139-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114455>
48. Landschulz WH, i sur. (1988) "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." *Science* **240**, 1759-1764.
49. Park WM (2020) Coiled-Coils: The molecular zippers that self-assemble protein nanostructures. *Int J Mol Sci* **21**, 3584. <https://doi.org/10.3390/ijms21103584>
50. Norton LE, Layman DK (2006) Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. *The Journal of nutrition* **136**, 533-537.
<https://doi.org/10.1093/jn/136.2.533S>

51. Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, i sur. (2005) Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity. *The Journal of nutrition* **135**, 2103-2108. <https://doi.org/10.1093/jn/135.9.2103>
52. Perrin DD, Armarego WLF (1988) Purification of laboratory chemicals, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/New York
53. Barišić L, Rapić V, Kovač V (2002) Ferrocene compounds. XXIX. Efficient syntheses of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid derivatives. *Croat Chem Acta* **75**, 199-210. <https://doi.org/10.3390/molecules190812852>
54. Karle IL (1999) Hydrogen bonds in molecular assemblies of natural, synthetic and 'designer' peptides. *J Mol Struct* **474**, 103–112.
55. Appoh FE, Sutherland TC, Kraatz H-B (2004), *J Organomet Chem* **689**, 4669–4677.
56. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Kodrin I, Roca S, Perica J, Mrvčić J, i sur. (2023) Biological evaluation and conformational preferences of ferrocene dipeptides with hydrophobic amino acids. *Inorganics* **11(1)**, 29. <https://doi.org/10.3390/inorganics11010029>
57. Ganesh S, Jayakumar R (2002) Role of N-t-Boc group in helix initiation in a novel tetrapeptide. *J Peptide Res* **59**, 249-256. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2002.02989.x>
58. Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta, Bioenerg* **1767**, 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>
59. Stipčić T (2020) Priprava i konformacijska analiza ferocenskih tripeptida Ala-Pro sekvence izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:063241>
60. Stevens ES, Sugawara N, Bonora GM, Toniolo C (1980) Conformational analysis of linear peptides. 3. Temperature dependence of NH chemical shifts in chloroform. *J Am Chem Soc* **102**, 7048–7050. <https://doi.org/10.1021/ja00543a025>

61. Curran TP, Marques KA, Silva MV (2005) Conformationally rigid cyclic tungsten bisalkyne complexes derived from 1,1'-dialkynylferrocenes, *Org Biomol Chem* **3**, 4134–4138. <https://doi.org/10.1039/B508608F>
62. Hanessian S, Papeo G, Fettis K, Therrien E, Viet MTP (2004) Left- and right- handed alphahelical turns in homo- and hetero- chiral helical scaffold. *J Org Chem* **69**, 4891–4899. <https://doi.org/10.1021/ja9065283>
63. Maji SK, Haldar D, Bhattacharyya D, Bannerjee A (2003) Conformational heterogeneity of a turn mimetic pseudo-peptide: comparison of crystal state, solution and theoretically derived structures. *J Mol Struct* **646**, 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00619-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00619-1)
64. Vijayalakshmi S, Rao RB, Karle IL, Balaram P (2000) Comparison of helix-stabilizing effects of alpha,alpha-dialkyl glycines with linear and cycloalkyl side chains. *Biopolymers* **53**, 84–98. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(200001\)53:13.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(200001)53:13.0.CO;2-W)
65. Herrick RS, Jarret RM, Curran TP, Dragoli DR, Flaherty MB, Lindyberg SE, i sur. (1996) Ordered conformations in bis (amino acid) derivatives of 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid. *Tetrahedron Lett* **37**, 5289–5292.
66. Kirin SI, Kraatz HB, Metzler-Nolte N (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1, n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chem Soc Rev* **35**, 348–354. <https://doi.org/10.1039/B511332F>

7. PRILOZI

7.1. Prilog 1. HPLC i ESI-MS-kromatogram spoja 7

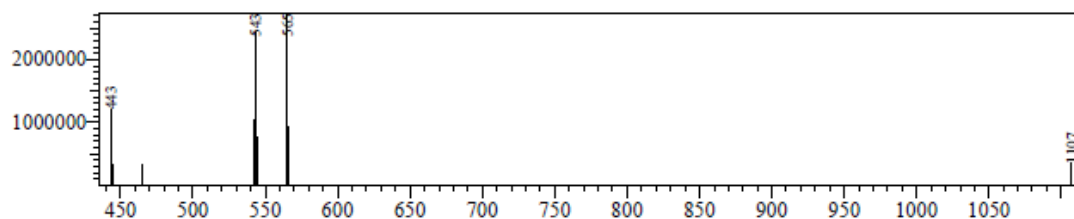


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	12,577	1679847	339761	100,000		M	
Total		1679847	339761				

MS Spectrum

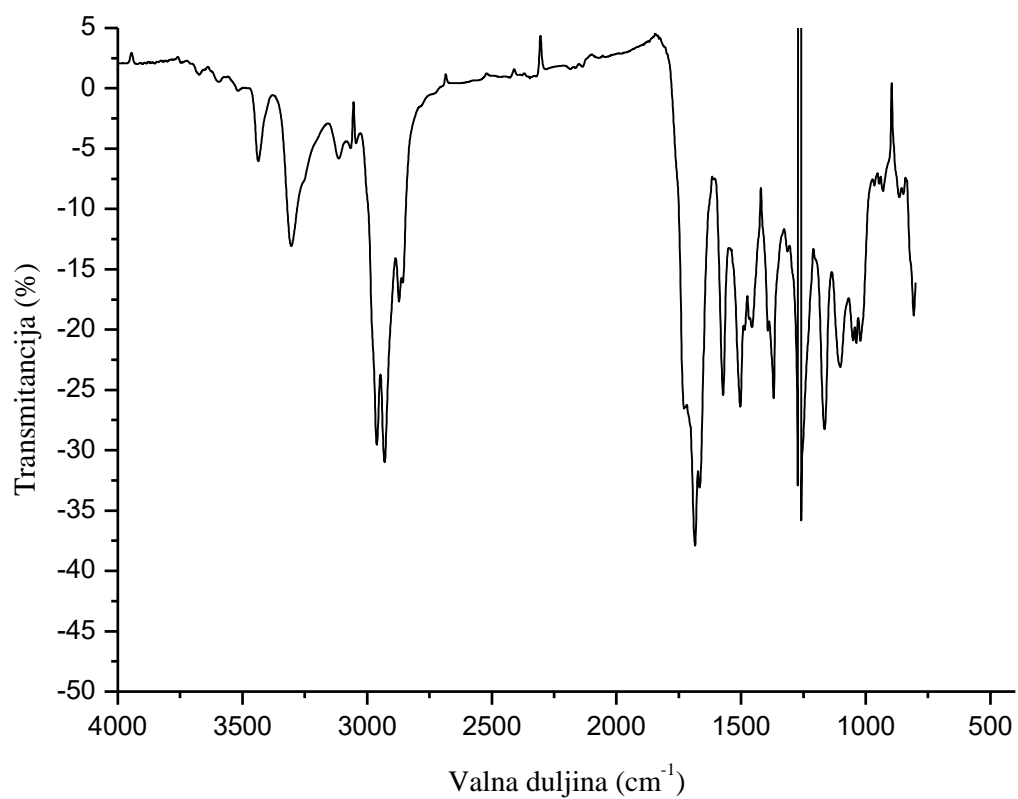
Line#1 R. Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:9
 Spectrum Mode:Averaged 12,567-12,633(755-759) Base Peak:565(2733765)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



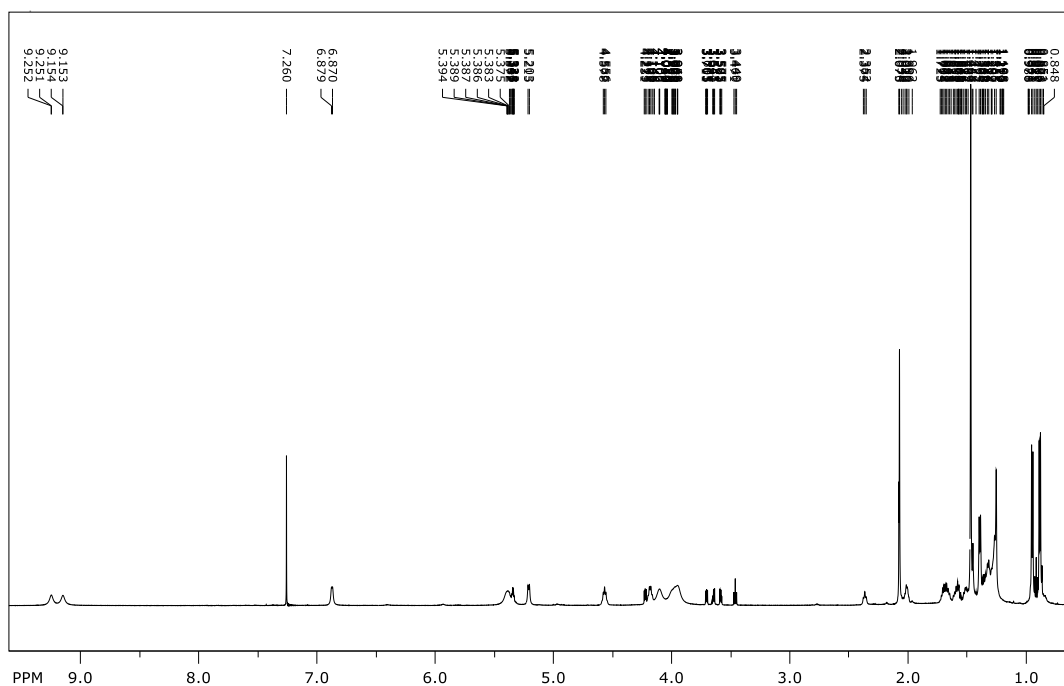
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

#	m/z	Relative Intensity	Relative Intensity	#	m/z	Relative Intensity	Relative Intensity	#	m/z	Relative Intensity	Relative Intensity
1	443,10	1204487	44,06	4	542,15	1046036	38,26	7	565,15	2733765	100,00
2	444,10	336021	12,29	5	543,15	2437058	89,15	8	566,15	927640	33,93
3	463,10	332841	12,18	6	544,15	774845	28,34	9	1107,15	345710	12,65

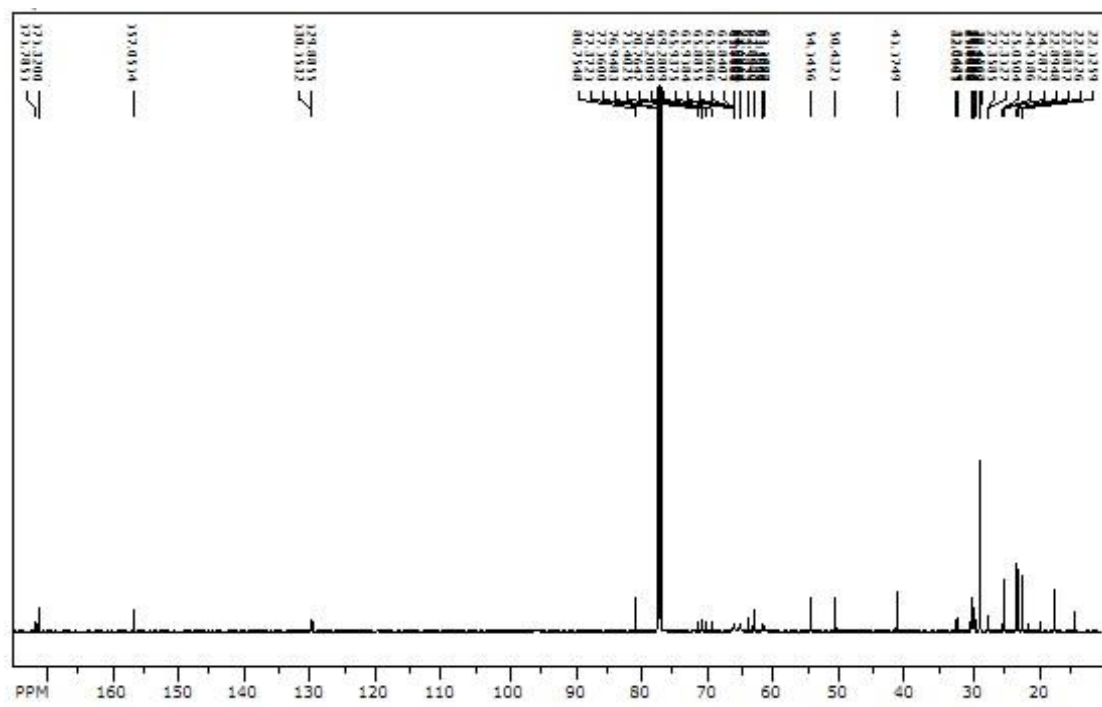
7.2. Prilog 2. IR-spektar spoja **7** snimljen u diklormetanu ($c = 50 \text{ mM}$)



7.3. Prilog 3. ^1H -NMR spektar spoja **7** snimljen u kloroformu ($c = 50 \text{ mM}$)



7.4. Prilog 4. ¹³C-NMR spektar spoja 7 snimljen u kloroformu (c = 50 mM)



IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MAJ MEZIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis