

Istraživanje supramolekulskih struktura tripeptida Phe-Phe-Ala infracrvenom spektroskopijom

Paradžik, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:280465>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ivana Paradžik

**ISTRAŽIVANJE SUPRAMOLEKULSKIH STRUKTURA
TRIPEPTIDA Phe-Phe-Ala INFRACRVENOM
SPEKTROSKOPIJOM**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za supramolekularnu kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković i Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Lea Frkanca, zn. savj. IRB i nasl. red. prof. UniRi, i izv. prof. dr. sc. Snežane Miljanić te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Tihomira Pospišila i dr. sc. Adriane Kendel.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ) pod nazivom *Supramolekulska sinteza samo-organizirajućih funkcionalnih nanomaterijala i kompleksnih kemijskih sustava* (IP-11-2013-7387).

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Snežani Miljanić i mentoru dr. sc. Leu Frkancu, zn. savj. i nasl. prof, na iskazanom povjerenju za izradu ovog rada. Veliko hvala na pruženom znanju, ljubaznosti, strpljenju i pomoći oko formalnih stvari vezanih za samu obranu.

Zahvaljujem se neposrednim voditeljima dr. sc. Adriani Kendel i dr. sc. Tihomiru Pospišilu na pomoći i savjetima tokom eksperimentalog dijela ovog rada. Hvala vam na korisnim savjetima, susretljivosti i suradnji.

Zahvaljujem se svim mojim prijateljima koji su mi uvijek bili oslonac. Hvala vam na zajedničkim trenucima, iskustvima i razgovorima.

Hvala i Robertu koji je bio tu za mene i pružio mi razumijevanje, pomoć i potporu kada mi je bila potrebna.

A najviše se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i bratu. Hvala što ste bili uz mene, i u dobrim i onim manje dobrim trenucima. Hvala na pruženoj ljubavi, potpori i svim odricanjima. Bez vas ne bih bila ovdje gdje jesam niti bih bila osoba kakva sam postala uz vas. Volim vas puno!

Sadržaj

SAŽETAK	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Gelirajući sustavi	3
2.2. Peptidi	5
2.2.1. <i>Amiloid β peptidi</i>	7
2.2.2. <i>Gelirajuća svojstva peptida</i>	9
2.3. Infracrvena spektroskopija	12
2.3.1. <i>Prigušena totalna refleksija</i>	14
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Kemikalije	15
3.2. Mjerni uređaj	16
3.3. Sinteza acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskim slijedom Phe-Phe-Ala (FFA)	17
3.3.1. <i>Boc-L-Phe-OSu (1)</i>	17
3.3.2. <i>Boc-L-Phe-L-Ala-OMe (2)</i>	18
3.3.3. <i>L-Phe-L-Ala-OMe (3)</i>	19
3.3.4. <i>Boc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (4)</i>	20
3.3.5. <i>H₂N-L-Phe-L-Phe L-Ala-OMe (5)</i>	21
3.3.6. <i>Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (6)</i>	22
3.3.7. <i>Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ (7)</i>	23
3.4. Priprava mjernih uzoraka	24
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Sinteza acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskim slijedom Phe-Phe-Ala (FFA)	25
4.2. Gelirajuća svojstva tripeptida	30
4.3. TEM mikroskopija	31
4.4. Istraživanje supramolekulskih struktura ATR spektroskopijom	35
4.4.1. <i>ATR spektri spojeva 6 i 7 u čvrstom stanju</i>	37
4.4.2. <i>ATR spektri otopina i gelskih struktura tripeptida 6 u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi</i>	40
4.4.3. <i>ATR spektri otopina i gelskih struktura tripeptida 7 u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi</i>	46
§ 5. ZAKLJUČAK	52
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	53
§ 7. LITERATURNI IZVORI	54

§ 8. DODATAK	VIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	X



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ISTRAŽIVANJE SUPRAMOLEKULSKIH STRUKTURA TRIPEPTIDA Phe-Phe-Ala INFRACRVENOM SPEKTROSKOPIJOM

Ivana Paradžik

U ovom diplomskom radu sintetizirani su metilni ester i amid, *N*-acetiltripeptidi aminokiselinskog slijeda L-fenilalanin-L-fenilalanin-L-alanin, koji se razlikuju prema funkcijskoj skupini na C kraju peptida. Aminokiselinski slijed FFA je dio amiloida β za koji je dokazano kako se nalazi u plakovima u mozgu pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti. Kao model samoorganiziranja molekula amiloida, oba tripeptida su upotrijebljena za pripremu gelova u tri različita otapala, acetonitrilu, vodi i teškoj vodi. Infracrvenom spektroskopijom istražile su se sekundarne strukture tripeptida u pripremljenim gelovima, ponajprije analizom vrpce amid I u spektrima. Osim sekundarnih struktura, proučavana je i morfologija niti gelskih struktura pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa.

(56 stranica, 37 slika, 10 tablica, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, amiloid β , infracrvena spektroskopija, samo-udruživanje u gelovima, supramolekulski gelovi, sekundarna struktura proteina, TEM

Mentori: dr. sc. Leo Frkanec, zn. savj., dr. sc. Snežana Miljanić
Neposredni voditelji: dr. sc. Tihomir Pospišil i dr. sc. Adriana Kendel

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr.sc. Snežana Miljanić
2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
3. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin

Zamjena: prof. dr. sc. Nives Galić

Datum diplomskog ispita: 02. 07. 2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

STUDY OF SUPRAMOLECULAR STRUCTURES OF Phe-Phe-Ala TRIPETIDES BY INFRARED SPECTROSCOPY

Ivana Paradžik

In this graduate thesis, methyl ester and amide were synthesised, *N*-acetyltripeptides with L-Phenylalanine-L-Phenylalanine-L-Alanine sequence which differ depending on functional group at the C end of the peptide. The amino acid sequence FFA is part of the amyloid β in the brain plaques of patients with Alzheimer's disease. As a model of self-organization of the amyloid molecule, both tripeptides were used for the gels preparation in three solvents, acetonitrile, water and heavy water. Infrared spectroscopy was used to investigate the secondary structures of the tripeptide in prepared gels, mainly by analysis of amide I band. Also, gel morphology was studied using transmission electron microscopy.

(56 pages, 37 figures, 10 tables, 50 references, original in croatian language)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid β , infrared spectroscopy, protein secondary structure, self-assembled gels, supramolecular gels, TEM

Mentors: Dr. Leo Frkanec, Scientific Adviser IRB, and Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Assistant mentors: Dr. Tihomir Pospíšil and Dr. Adriana Kendel

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor
2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
3. Dr. Željka Soldin, Associate Professor

Substitute: Dr. Nives Galić, Professor

Date of exam: 02. 07. 2018.

§ 1. UVOD

Proteini amiloid β ($A\beta$) su slijedovi od 40 do 42 aminokiseline koji se u obliku amiloidnih vlakna nakupljaju u moždanom tkivu osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti.¹ U literaturi su eksperimentalno opisane minimalne jezgre nukleacije mutanta $A\beta$ peptida, $Ac^{-16}KLVFFA22Q-NH_2$, koje iz antiparalelnih β -niti potpuno prelaze u vlakna s paralelnim nitima zbog elektrostatskog odbijanja između bočnih lanaca lizina kod antiparalelne orijentacije peptida.² Dokazano je kako je slijed $A\beta(16-20)$, KLVFF, ključan za fibrilizaciju, a hidrofobno okruženje je odgovorno za nastanak β -nabranih ploča.³ Filamenti amiloida β su istraženi i na atomskoj razini pokazujući značaj međumolekulskih interakcija u nastanku vlakana.⁴ Značajan broj peptida ili proteina može se samoorganizirati u amiloidna vlakna te takve strukture obično imaju promjer od 100 do 200 Å, a sastavljene su od β -ploča paralelnih s dugim osima vlakana.⁵

Samoorganizacija $A\beta$ -proteina nekovalentnim interakcijama u amiloidna vlakna nalikuje supramolekulskom samoudruživanju kraćih peptidnih molekula u trodimenzijske gelske mreže.⁶ Iako još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni uvjeti za stvaranje amiloidnih vlakana, u literaturi je opisano kako peptidi koji se sastoje od tri do četiri aminokiseline mogu stvarati vlakna zbog elektrostatskih interakcije u otopinama uz nastanak β -niti.⁷ Tako peptidi sa slijedom fenilalanin-fenilalanin-alanin (FFA), lizin-fenilalanin-fenilalanin-glutaminska kiselina (KFFE) i lizin-valin-valin-glutaminska kiselina (KVVE) mogu poslužiti kao model za proučavanje nastanka i strukture amiloidnih vlakana zbog morfološke sličnosti amiloidnih niti s gelskim nitima malih peptidnih gelatora.⁸

Spektroskopska metoda koja se široko primjenjuje za strukturnu karakterizaciju proteina i peptida je infracrvena (IR) spektroskopija.⁹ Od devet karakterističnih vibracijskih vrpca proteina (amid A, B, I-VII), najčešće se analizira vrpca amid I, kojoj najvećim dijelom doprinosi istezanje veze C=O amidne skupine, a manjim dijelom svijanje skupine NH te istezanje veze C–N. Vrpca amid I je najintenzivnija vrpca u spektru peptida, a njezin položaj ovisi o strukturi peptidne okosnice te upućuje na sekundarnu strukturu, poput α -uzvojnice ili β -nabrane ploče.

U okviru ovog diplomskog rada istražiti će se gelske strukture malih tripeptidnih gelatora IR spektroskopijom. U tu svrhu sintetizirat će se dva *N*-acetil tripeptida aminokiselinskog slijeda L-fenilalanin-L-fenilalanin-L-alanin (L-Phe-L-Phe-L-Ala), koji će se razlikovati prema funkcijskoj skupini na C kraju peptida. Oba će tripeptida na *N* kraju sadržavati acetilnu skupinu, dok će s obzirom na C kraj peptida biti pripremljeni metilni esterski i amidni derivat. Sintetizirani spojevi bit će karakterizirani ¹H NMR spektroskopijom.

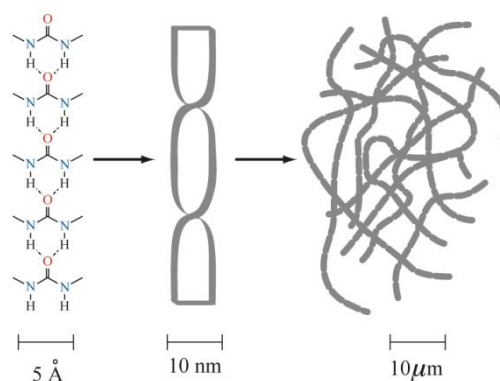
Nadalje, istražiti će se gelirajuća svojstva i pripremiti gelovi oba acetilna tripeptida u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi. Infracrveni spektri pripremljenih gelova snimit će se tehnikom prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR). Uparavanjem otapala na zraku iz uzoraka gela na refleksijskom kristalu pratit će se nastajanje kserogela. ATR spektri gelova i kserogelova detaljno će se analizirati i interpretirati s obzirom na međumolekulske interakcije odgovorne za nastajanje gelske mreže i strukturu pripremljenih supramolekulskih sustava. Morfologija gelske mreže odredit će se transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Gelirajući sustavi

Posljednjih godina, interes za proučavanje molekularnih gelova u stalnom je porastu.¹⁰ Razlog tomu nije samo želja za proučavanjem udruženih struktura u gelovima nego i razne mogućnosti primjene gelova u budućnosti. Općenito, gelovi su viskoznoelastični materijali nalik krutini sastavljeni od elastične isprepletene mreže i otapala.¹¹ Zahvaljujući „zarobljavanju“ i adheziji tekućine u čvrste površinske trodimenzionalne matrice, gel se doima kao da je u čvrstom stanju. Matrica je rezultat umrežavanja polimernih niti molekula kemijskim ili fizikalnim vezama.¹²

Gelovi se mogu klasificirati prema podrijetlu, konstituciji te tipu umrežavanja čime nastaju trodimenzionalne mreže. Mnogi se od njih temelje na polimerima koji su isprepleteni u čvrstu mrežu, iako su danas sve više prisutni gelovi pripremljeni od spojeva male molekulske mase koji se nazivaju supramolekularni gelovi.¹³ Takvi gelovi nastaju samoudruživanjem malih molekula gelatora u isprepletene nitaste mreže putem nekovalentnih interakcija poput vodikovih veza, π - π interakcija, donor-akceptor interakcija, van der Waalsovih interakcija te solvofobnih efekata (slika 1). Gelatorima se obično nazivaju organski spojevi čija je molekulska masa manja od 2000 Da.



Slika 1. Primarna, sekundarna i tercijarna struktura supramolekularnih gelova¹⁴

Supramolekularni gelovi rezultat su slabih interakcija pa na njih velik utjecaj imaju vanjski faktori poput svjetlosti, pH, temperature, otapala ili prisutnosti enzima.¹⁵

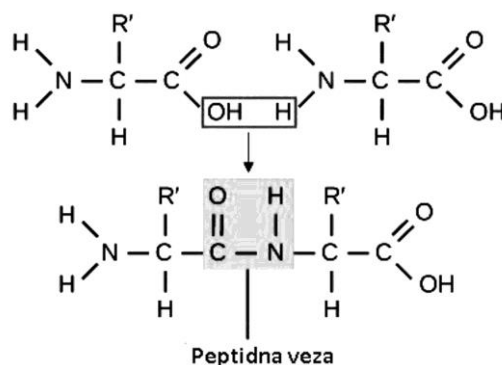
Gelovi molekula malih molekulskih masa obično se pripremaju otapanjem gelatora u odgovarajućem otapalugrijanjem do vrenja i zatim hlađenjem nastale otopine na sobnu temperaturu. Hlađenjem vruće otopine molekule se prepoznaju i povezuju nekovalentnim interakcijama te se udružuju, pri čemu mogu nastati kristali kristalizacijom, amorfni talog slučajnom agregacijom ili gel agregiranjem između ta dva slučaja. Proces geliranja uključuje samoudruživanje molekula gelatora čime nastaju dugi nitasti agregati nalik polimeru, koji bivaju isprepleteni u vlakna koja u konačnici tvore trodimenzionalnu gelsku mrežu tijekom agregacije, što u konačnici stvara matricu koja zadržava otapalo uslijed površinske napetosti.¹⁶ Takav proces sprječava istjecanje otapala pa se čini kako je sustav u čvrstom stanju.

Zbog samog procesa agregacije, veličina niti koje tvore strukturu matrice je heterogena i reda je veličine od nanometra do mikrometra. Na mikroskopskom nivou, struktura i morfologija supramolekularnih gelova se istražuje transmisivnim (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) i skenirajućim elektronskim mikroskopom (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) te mikroskopijom atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM).

Iako još uvijek u potpunosti nije objašnjen način na koji gelatori agregiraju kao niti struktura gelskih agregata, prepoznate su funkcijske skupine odgovorne za geliranje, poput onih u peptidima, ugljikohidratima i urei, te dugi alifatski lanci i aromatske skupine. Ako se na molekulu gelatora veže primjerice kromofor ili molekula receptora, supramolekularni gelovi mogu biti osnova za razvoj foto- ili kemijskih senzora.

2.2. Peptidi

Peptidi su molekule ili makromolekule sastavljene od dvije ili više aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnom vezom (–CONH–). Peptidna veza nastaje reakcijom karboksilne skupine jedne aminokiseline s amino-skupinom druge aminokiseline pri čemu se gubi molekula vode (slika 2).



Slika 2. Nastanak peptidne veze u proteinu¹⁷

Kao početak polipeptidnog lanca obično se uzima amino-kraj, aminokiseline na kraju lanca kojoj je slobodna amino-skupina, a kao kraj polipeptidnog lanca karboksilni kraj, aminokiseline na drugom kraju lanca kojoj je slobodna karboksilna skupina. Polipeptidni se lanac sastoji od dijela koji se ponavlja (okosnice) i promjenjivog dijela koji sadrži različite aminokiselinske ogranke. Obično se niz aminokiselina do 100 peptidnih veza naziva peptid, a preko 100 protein. Redoslijed aminokiselina u određenom peptidu uvjetuje njegovu strukturu i biološku aktivnost.¹⁸

Aminokiseline su građevne jedinice proteina i peptida u čijoj su strukturi na središnji ugljikov atom vezane karboksilna i amino-skupina, vodikov atom i bočni ogranak, tzv. specifična skupina R. Upravo zbog četiri različite skupine koje su vezane na ugljikov atom, aminokiseline su kiralne molekule, sve osim glicina. Glicin je akiralna molekula kojoj je bočni ogranak atom vodika. Upravo zbog toga aminokiseline postoje u dva zrcalno simetrična oblika, kao L-izomer i D-izomer. Svi su proteini i peptidi sastavljeni od L-aminokiselina. Aminokiseline imaju ukupno dvadeset vrsta bočnih ogranaka koji se međusobno razlikuju prema obliku, naboju, sposobnosti stvaranja vodikove veze, kemijskoj reaktivnosti te hidrofobnosti. Jedan od načina podjele aminokiselina temelji se na vrsti bočnih ogranaka:

a) alifatski bočni ogranaci: alanin, glicin, valin, leucin, izoleucin, metionin i prolin

- b) aromatski bočni ogranci: fenilalanin, triptofan i tirozin
- c) bočni ogranci s hidroksilnom skupinom: treonin i serin
- d) ogranci s amidnom skupinom: glutamin i asparagin
- e) cistein s tiolnom skupinom
- f) bazni bočni ogranci: histidin, lizin i arginin
- g) kiseli bočni ogranci: asparaginska i glutaminska kiselina.

Upravo zbog raznolikosti bočnih ogranaka, mogu se javiti interakcije među aminokiselinama. Tako se na primjer mogu javiti hidrofobne interakcije između alifatskih bočnih ogranaka, elektrostatske interakcije između pozitivno ili negativno nabijenih bočnih ogranaka te aromatske π - π interakcije između aromatskih bočnih ogranaka. Osim što određuju vrste interakcija, aminokiseline utječu i na fleksibilnost peptidnog lanca. Tako primjerice glicin, zbog nedostatka bočnog ogranka, omogućuje veću fleksibilnost lanca, za razliku od prolina kojem je bočni lanac vezan za amino-skupinu čime peptidni lanac postaje rigidniji.¹⁹

Proteini su peptidi duži od 100 aminokiselina, a razlikuju se prema svojoj duljini i kompleksnosti. Općenito, proteini se mogu podijeliti u dvije skupine: jednostavni (izgrađeni samo od aminokiselina) i složeni (sadrže prostetičke skupine poput lipida, šećera, nukleotida ili razne metale poput željeza, bakra ili cinka).

Slijed aminokiselina povezanih peptidnim vezama u proteinu čini njegovu primarnu strukturu. Međusobnim interakcijama aminokiselina u peptidnim lancima nastaju sekundarne i tercijarne strukture proteina. Sekundarne strukture nastaju uslijed interakcije kisika karbonilne skupine jedne peptidne veze s vodikom iz amidne skupine druge peptidne veze. Ukoliko se dvije amidne veze nađu na udaljenosti od 0,28 nm, ostvaruju se vodikove veze koje stabiliziraju nastalu sekundarnu strukturu proteina.²⁰

Sekundarne strukture proteina su α -uzvojnica i β -nabrana ploča. Kod α -uzvojnice, peptidni lanac se smota i kao takav ima oblik opruge, a svi bočni ogranci aminokiselina su orijentirani prema van. Karboksilne i amino-skupine međusobno su udaljene 0,28 nm, a jedan uvoj sadrži otprilike 3,6 aminokiselina. Uzvojnica može biti desno ili lijevo orijentirana, iako su dosada nađene uzvojnice u proteinima sve desno orijentirane. Smatra se da je tako jer je desna uzvojnica energijski povoljnija od lijeve zbog manjih steričkih smetnji između bočnih ogranaka aminokiselina i peptidnoglanca.

β -nabrana ploča nastaje povezivanjem dva ili više istegnuta peptidna lanca vodikovim vezama. Dijelovi lanaca zovu se β -niti. Ovisno o smjeru lanaca, razlikuju se paralelne (lanci u

istom smjeru) i antiparalelne (lanci orijentirani u suprotnim smjerovima) nabrane ploče. U ljudskim bolestima poput Alzheimerove bolesti dolazi do supramolekularnih udruživanja β -niti u proteinske nakupine.

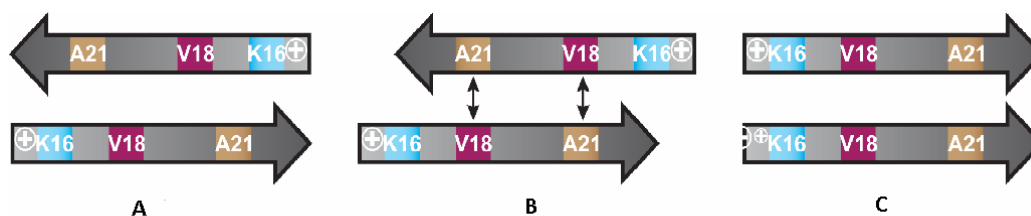
2.2.1. Amiloid β peptidi

Amiloidi su netopive nakupine proteina nastale uslijed pogrešnog smatanja proteina. Smatra se kako 18 proteina daje strukturno sličan produkt, intereagiraju te nastaju amiloidi. Općenito, amiloidi nastaju fibrilizacijom peptida koji poprimaju strukturu β -ploča tako da se β -niti slažu okomito na dugačke niti vlakana. Na taj način amiloid β peptid ($A\beta$) *in vivo* fibrilizira i stvara nakupine amiloida.⁶ $A\beta$ -peptid je izgrađen od 40 ($A\beta_{40}$) do 42 ($A\beta_{42}$) aminokiselinska ostatka i ima *N*-terminalnu hidrofilnu i *C*-terminalnu hidrofobnu domenu. Nastaje cijepanjem amiloidnog prekursornog proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP) koji je transmembranska prekursorna molekula.²¹

Tijekom godina, istraživani su brojni segmenti $A\beta$ -peptida te je utvrđeno kako je slijed $A\beta(16-20)$, KLVFF, ključan za fibrilizaciju, a upravo je hidrofobno okruženje oko slijeda LVFF odgovorno za nastanak β -nabranih ploča.²² U literaturi je opisano kako zamjena hidrofobnih aminokiselina s hidrofilnima dovodi do značajno manjeg nastanka amiloida. Osim toga, proučavano je vezanje fragmenata veličine od 3 do 10 aminokiselina na peptid $A\beta_{40}$. Došlo se do zaključka kako su se samo pentapeptidi i veći peptidi vezali na fragment $A\beta_{40}$, a segment KLVFF bio je prisutan u svim snažno vezujućim slijedovima.²³ Nakon pripreme raznih varijanti ovog pentapeptida, vidjelo se kako su drugi, treći i peti segment (K, L i F) najvažniji za vezanje fragmenta KLVFF na $A\beta_{40}$.²⁴

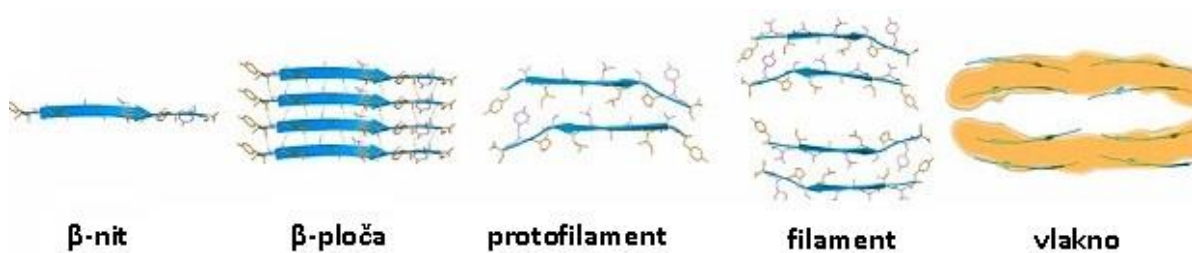
U literaturi je opisano kako je otkriveno da je najkraći slijed koji može stvarati filamente slijed $A\beta(14-23)$, HQKLVFFAED, što znači da slijed KLVFF sam ne može stvarati filamente.²⁵ Kasnije su proučavane i varijante slijedova KLVFF i KLVFFAE, u kojima su amidne skupine bile zamijenjene s *N*-metilnim skupinama. Takvi fragmenti stvaraju β -niti na drugačiji način: vodikovim vezama između izmijenjene nepolarne metilne skupine i neizmijenjenih skupina. Smatralo se da su se na taj način mogle poremetiti strukture β -nabranih ploča u $A\beta$ -peptidu nastalih uslijed vodikovih veza.

U literaturi je opisano kako se peptidi A β samoorganiziraju u antiparalelne i paralelne β -niti (slika 3), ali upravo zbog bočnih lanaca prisutnih aminokiseline prevladavaju paralelne β -nabrane ploče.²



Slika 3. Orijentacija niti A β (16-22)E22L peptida gdje su plavo označeni položaji pozitivno nabijenih bočnih lanaca lizina: antiparalelno (A), antiparalelno gdje dolazi do interakcije valina i alanina (B) i paralelno (C) (preuzeto i prilagođeno iz 2)

Strukture vlakana u filamentima su vrlo uređene, razlikuju se duljinom na razini mikrona, a mehanička im se svojstva mogu usporediti s onima čelika ili svile.⁴ U literaturi je otkrivena strukturna osnova za hijerarhijsku organizaciju amiloida prikazanu na slici 4.²⁶ Tako je dokazano da na atomskoj razini struktura amiloidnih vlakana nije potpuno ovisna o slijedu aminokiselina jer su β -niti unutar jezgre vlakana međusobno povezane vodikovim vezama što je zajedničko svim polipeptidima. Međutim, priroda bočnih lanaca određuje koji će se dijelovi slijedova povezati kako bi se oblikovale sekundarne strukture β -listova jezgre vlakana. Tako bočni lanci aminokiselina utječu na strukturu protofilamenata.²⁶



Slika 4. Hijerarhija motiva uključenih u samoorganizaciju vlakana amiloida na atomskoj razini (preuzeto i prilagođeno iz 26)

Nema specifičnih peptidnih slijedova za koje se može reći da se samoorganiziraju u vlakna. Pretpostavlja se kako će se svaki protein iznad svoje kritične koncentracije u otopini

samoorganizirati u vlaknaste nakupine. Kada je protein iznad kritične koncentracije u otopini, stabilno stanje proteina je njegova prirodna struktura pa nastanak vlaknastih nakupina može biti proces dug od nekoliko minuta do nekoliko godina.²⁷

U tijelu čovjeka, amiloidi su povezani s različitim bolestima. Tako u Alzheimerovoj bolesti agregacijom A β -peptida nastaju amiloidni fibrili.²⁸ To je progresivna bolest stanica moždane ovojnice i okolnih struktura, a nastaje zbog mutacije određenih gena. Mutacije na genima, među njima i u genu za prekursor proteina amiloid- β (APP) koji se nalazi na 21. kromosomu, dovode do prekomjernog taloženja β -amiloidnog proteina (A β) u mozgu te nastanka senilnih plakova.²⁹ Istraživanja su ukazala kako su amiloidne niti u plakovima rezultat samoudruživanja i molekuskog prepoznavanja putem slabih nekovalentnih supramolekularnih interakcija.

Supramolekularne interakcije gelskih niti određenih tripeptida mogu poslužiti kao model za proučavanje interakcija amiloidnih vlakana. Proučavanje samoudruživanja gelskih niti kratkih peptida, koji se nazivaju gelatori, dio je supramolekularne kemije. Dokazano je da se molekule gelatora organiziraju u nitaste strukture koje u određenim otapalima tvore trodimenzionalnu mrežu. Na taj način nastaje fizikalni gel jer mreža kapilarnim silama zadržava otapalo.¹³

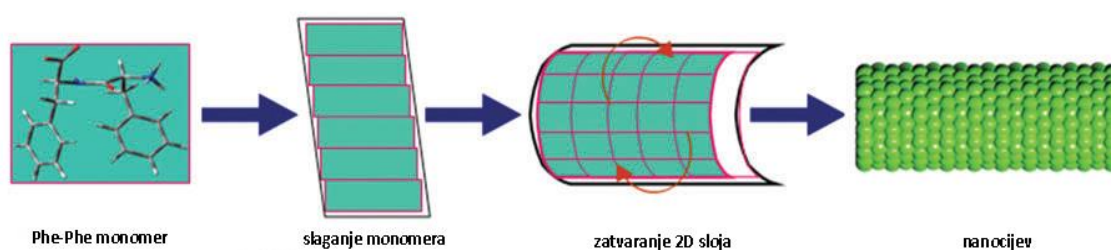
2.2.2. Gelirajuća svojstva peptida

U posljednje vrijeme povećava se interes za istraživanjem peptida kao mogućih gelatora, prvenstveno njihovog samoudruživanja i molekuskog prepoznavanja. Di- i tripeptidi ubrajaju se u skupinu gelatora s malom molekulskom masom (engl. *low molecular weight gelators*, LMWGs) te u odgovarajućim uvjetima tvore nitaste nanostrukture, čijim se organiziranjem stvaraju strukture većih redova veličina.³⁰ Tako se kao minimalni gelatorski slijed peptida smatra tripeptid FFA.⁸

Kada je riječ o hidrogelovima, oni obično sadrže više od 99 % vode i upravo zbog toga nalaze široku primjenu. U literaturi je opisan hidrogelator koji se temelji na FFA peptidu s Boc zaštitnom skupinom.³¹ Hidrogel temeljen na Boc-FFA-OH smatra se osnovom za razvoj materijala s različitim svojstvima koji bi se temeljili na hibridima hidrogela poput hidrogelova s nanočesticama srebra. Također, hidrogel peptida FFA je našao primjenu i u tkivnom inženjstvu kroz proučavanje preživljavanja i proliferaciju stanica HEK293T *in*

vitro.³² Tripeptid FFA je našao primjenu i u biotehnologiji za skladištenje i kontrolirano otpuštanje lijekova poput ibuprofena.³³ Istražen je i lipofilni derivat peptida FFA koji sadrži ferocene, a može gelirati toluen te na taj način stvara organogelove.³⁴

Difenilalaninski peptid, L-Phe-L-Phe je najmanja jedinica u procesu samoorganizacije peptida u različite strukture nano-dimenzija uključujući i proces samoudruživanja peptida A β u amiloidna vlakna.³⁵ Tako se dipeptid aromatskim π - π interakcijama i vodikovim vezama samoorganizira u vodi u nanocijevi duljine do 100 nm.³⁶ Na taj način se različiti kratki peptidi koji u svojoj strukturi imaju dipeptid L-Phe-L-Phe samoorganiziraju u različite strukture nano-dimenzija poput traka, vezikula, vlakana ili cijevi (slika 5).



Slika 5. Ilustracija nastanka nanocijevi temeljenih na dipeptidu L-Phe-L-Phe (preuzeto i prilagođeno iz 37)

Osim dipeptida L-Phe-L-Phe, dokazano je kako se aminokiselina fenilalanin, L-Phe-OH, u vodi pri točno određenom pH samoorganizira u niti slične amiloidnima upravo zbog aromatskih interakcija između fenilnih prstenova.³⁸ Time je pokazano kako, osim vodikovih i elektrostatskih interakcija, važnu ulogu u samoorganiziranju peptida u nanostrukture imaju i aromatske interakcije.

U gelovima peptidi ne polimeriziraju uobičajeno nego se drže na okupu zahvaljujući vodikovim vezama, hidrofobnim interakcijama te π - π slaganju.³⁹ Peptidi kao gelatori male molekulske mase mogu poslužiti kao jednostavni modelni sustav za proučavanje kompleksnog problema samoorganizacije peptida općenito. U literaturi su kao model proučavanja nastanka i strukture amiloidnih vlakana opisani peptidi KFFE i KVVE.⁷ Zajednička karakteristika nastanka amiloidnih vlakana i sekundarnih struktura peptida KFFE i KVVE je upravo β -nabrana ploča.

Većina se peptida u gelu samoorganizira u nitaste mreže.⁴⁰ Infracrvenom spektroskopijom moguće je, osim struktura gelskih mreža, proučavati i sekundarne strukture proteina.⁴¹ Karakterističan položaj vrpce amid I u IR spektru ukazuje na sekundarnu strukturu

proteina. Tako vrpce pri valnim brojevima manjim od 1660 cm^{-1} upućuju na strukture koje ne odgovaraju niti α - niti β -strukturama, vrpce pri valnim brojevima između 1660 i 1640 cm^{-1} posljedica su vibracija amidnih skupina u α -uzvojnica, a vrpce pri valnim brojevima između 1640 i 1620 cm^{-1} u β -nabranim pločama.

2.3. Infracrvena spektroskopija

Spektroskopija se temelji na interakciji elektromagnetskog zračenja i tvari, i kao takva nalazi primjenu u mnogim područjima znanosti.⁴² Infracrvenom spektroskopijom najčešće se analiziraju organske tvari, ali i brojni spojevi i uzorci, ne samo organskog, već i anorganskog sastava.

Infracrveno zračenje je elektromagnetsko zračenje koje obuhvaća zračenje valnih duljina od 0,7 do 500 μm , te se dijeli na blisko (0,7 do 2,5 μm), srednje (2,5 do 25 μm) i daleko (25 do 500 μm) infracrveno područje. Apsorpcija zračenja u infracrvenom području odgovara prijelazima između rotacijskih i vibracijskih stanja u molekuli, pri čemu se dipolni moment molekule mijenja. Apsorpcijom IR zračenja pobuđuju se molekulske vibracije koje se dijele u dvije skupine: vibracije istezanja, tijekom kojih se mijenja duljina veze, i vibracije deformacije, tijekom kojih se mijenja kut između veza. Vibracije istezanja odgovaraju promjenama uzduž međunuklearne osi te mogu biti simetrične i antisimetrične. Simetrične vibracije su rezultat istovremenog približavanja i udaljavanja dviju jezgara centru mase, dok se antisimetrično istezanje događa kada se jedna jezgra udaljava, a druga približava centru mase. Vibracije deformacije su gibanja jezgara koja uzrokuju promjenu kuta između dvije veze tako da skupina mora imati najmanje tri atoma. Za skupine u kojima su na središnji atom jedne vrste vezana dva atoma druge vrste, vibracije deformacije su njihanje, striženje, uvijanje i klaćenje. Za atom vezan na veći dio molekule, poput benzenskog prstena, razlikuju se deformacije u ravnini i izvan ravnine.

Položaj vibracijske vrpce u IR spektru ovisi o relativnoj masi atoma i jakosti veze među atomima. Primjerice, što je veća masa atoma, niža je frekvencija vibracije, a time i valni broj odgovarajuće vrpce u spektru. Nadalje, što je veza slabija, frekvencija vibracije je manja, pa se vrpca istezanja jednostruke veze opaža pri manjim valnim brojevima od vrpce istezanja dvostruke veze s istim atomima sa svake strane veze. Intenzitet vrpce ovisi o dipolnom momentu skupine atoma te je to veći što je razlika elektronegativnosti između atoma u skupini veća. Na širinu vibracijske vrpce utječe okruženje u kojem se molekula nalazi, što je posljedica međumolekulskih interakcija, poput vodikovih veza koje uzrokuju širenje apsorpcijske vrpce.

Instrument koji se koristi u IR spektroskopiji je spektrometar koji mjeri propusnost uzorka za infracrveno zračenje u ovisnosti o valnom broju. Osnovne karakteristike

spektrometara su razlučivanje i mjerno područje. Spektrometar s Fourierovom transformacijom (FT spektrometar) se od disperzijskih spektrometara razlikuje po tome što sadrži interferometer. Interferometar se sastoji od djelitelja zrake koji ulaznu infracrvenu zraku dijeli na dvije. Jedna zraka se reflektira od nepomičnog zrcala, a druga zraka od pomičnog zrcala. Kako je put jedne zrake konstantne duljine, a druge se mijenja ovisno o pomaku zrcala, signal iz interferometra je rezultat interferencije tih dviju zraka. Rezultirajući signal je interferogram, koji prikazuje ovisnost intenziteta signala o pomaku zrcala, pri čemu svaki pomak zrcala odgovara određenoj valnoj duljini, odnosno valnom broju. Primjenom Fourierovih transformacija interferogram se prevodi u spektar.

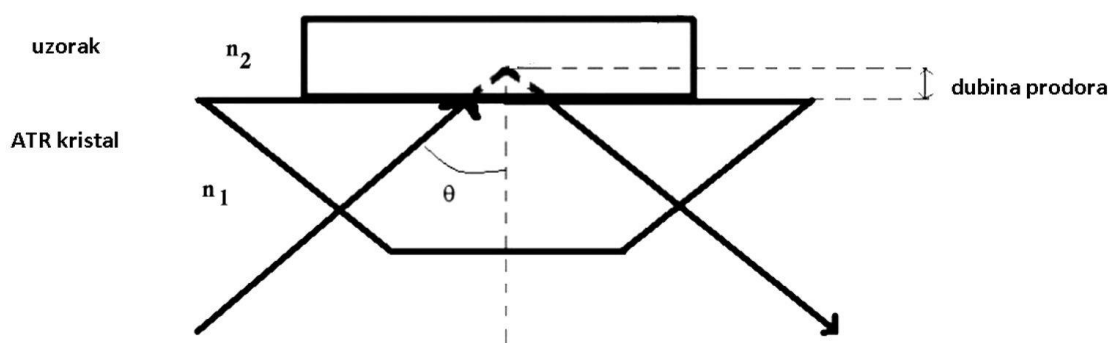
Mjerenjem apsorpcije, transmisije ili refleksije infracrvenog zračenja nastaje infracrveni spektar. Na osi x spektra nalazi se valni broj, a na osi y transmitancija (za kvalitativnu analizu) ili apsorbanacija (za kvantitativnu analizu). IR spektar u cjelini karakterističan je za molekulu, a obuhvaća dva područja: područje vibracija funkcijskih skupina (od 4000 do 1100 cm^{-1}) i područje „otiska prsta“ (ispod 1100 cm^{-1}). S obzirom da je apsorpcija zračenja funkcijske skupine neovisna o ostatku molekule te ima približno stalnu vrijednost valnog broja, IR vrpca u području skupinskih vibracija u spektru ukazuje na prisutnost odgovarajuće funkcijske skupine u istraživanom spoju. U području otiska prsta javljaju se vrpce koje su posljedica sprezanja vibracija i karakteristične su za vibracije većeg dijela molekula. Analizu spektara mogu otežati viši tonovi, kombinacijske vrpce, Fermijeva rezonancija te vodikove veze.

Tehnike u IR spektroskopiji se dijele na transmisijske, refleksijske i emisijske. Najšire korištena je transmisijska IR spektroskopija koja se temelji na apsorpciji infracrvenog zračenja određene valne duljine pri prolasku zračenja kroz uzorak. Čvrsti uzorak za mjerenje transmisije pripravlja se miješanjem sa sredstvom koje ne apsorbira IR zračenje (halogenidi alkalijskih metala, parafinsko ulje), dok se uzorcima u tekućem i plinskom stanju pune odgovarajuće kivete napravljene od materijala propusnih za IR zračenje. Zahvaljujući jednostavnosti mjerenja sve se više koriste tehnike refleksije koje se temelje na mjerenju unutarnje i vanjske refleksije. Unutarnja refleksija odvija se na granici uzorka i tvari većeg indeksa loma, dok se vanjska refleksija događa osvjetljavanjem optički gušćeg uzorka iz optički rjeđeg medija. Vanjska refleksija dijeli se na zrcalnu i difuznu refleksiju.

2.3.1. Prigušena totalna refleksija

Prigušena totalna refleksija (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) temelji se na unutarnjoj totalnoj refleksiji. Nosač za mjerenje prigušene totalne refleksije sastoji se od refleksijskog kristala koji ima visoki indeks loma i malu topljivost u vodi.⁴³ Kao materijali za refleksijski element najčešće se koriste ZnSe ($n = 2,4$), Ge ($n = 4$) i KRS-5 ($n = 2,4$). Uzorak za mjerenje, bilo kruti bilo tekući, nanosi se na površinu refleksijskog kristala, pri čemu se mora osigurati optimalan kontakt uzorka s površinom kristala.

Zračenje iz izvora upada na granicu uzorka i kristala pod kutem većim od kritičnog kuta (slika 6). Pri tome se totalno ne reflektira, već dijelom prodire u uzorak koji se nalazi na kristalu. Ako pritom uzorak selektivno apsorbira zračenje, zraka slabi pri valnoj duljini zračenja koje uzorak apsorbira. Rezultat toga je prigušeno zračenje i infracrveni apsorpcijski spektar uzorka.



Slika 6. Princip ATR spektroskopije (preuzeto i prilagođeno iz 44)

Dubina prodora (d_p) zračenja u uzorak veličine je mikrometra, a ovisi o valnoj duljini zračenja (λ), kutu upadnog zračenja (θ), te indeksima loma refleksijskog elementa (n_1) i uzorka (n_2):

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 (\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2)^{1/2}}$$

ATR tehnikom moguće je jednostavno i brzo snimiti IR spektre brojnih čvrstih i tekućih uzoraka. S obzirom da se temelji na refleksiji, a ne na apsorpciji zračenja, pogodna je za mjerenja debljih uzoraka, kao i onih koji jako apsorbiraju zračenje, poput vodenih otopina.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Boc-L-fenilalanin (Boc-L-Phe), 99 %, Sigma-Aldrich

N-hidroksisukcinimid (HO-Su), p.a., Fluka AG

N,N'-dicikloheksilkarbodiimid (DCC), 99 %, Sigma-Aldrich

Dioksan, 99,8 %, Carlo Erba Reagents

Diklormetan (CH₂Cl₂), p.a., Kemika

Natrijev sulfat (Na₂SO₄), p.a., Kemika

Hidroklorid metilnog estera *L*-alanina (Ala-OMe-HCl), 99 %, Sigma-Aldrich

Trietilamin (Et₃N), p.a., Sigma-Aldrich

Kalijev hidrogensulfat (KHSO₄), p.a., Kemika

Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃), p.a., Kemika

Trifluoroctena kiselina (TFA), p.a., Sigma-Aldrich

Boc-L-fenilalanin-*N*-hidroksisukcinimidni ester (Boc-Phe-OSu), 99 %, Sigma-Aldrich

Etil-acetat (EtOAc), p.a., Sigma-Aldrich

Acetil-klorid (Ac-Cl), p.a., Fluka

Klorovodična kiselina (HCl), p.a., Kemika

Amonijak (NH₃), p.a., Kemika

Metanol (MeOH), 99 %, Sigma Aldrich

Teška voda (D₂O), p.a., Cambridge Isotope Laboratories

3.2. Mjerni uređaj

Za snimanje infracrvenih spektara korišten je FT-IR spektrometar EQUINOX 55 tvrtke Bruker. IR spektri uzoraka snimani su ATR tehnikom pomoću MIRacle ATR nosača tvrtke Pike Technologies, na refleksijskom elementu od dijamanta i ZnSe. Čvrsti uzorci snimani su na refleksijskom kristalu pod pritiskom spone nosača, dok su uzorci gelova snimani bez dodatnog pritiska nakon nanošenja spatulom na refleksijski element. Za snimanje spektara otapala i otopina nanescna je kap tekućeg uzorka na refleksijski element. Kao pozadina pri snimanju IR spektara čvrstih uzoraka i kserogelovate vremenski ovisnih IR spektara gelova korišten je spektar zraka, dok je spektar odgovarajućeg otapala korišten kao spektar pozadine pri snimanju IR spektara otopina i gelova. Vremenski ovisni IR spektri gelova snimani su svake 2 minute (koliko je potrebno za snimanje jednog spektra, odnosno 128 snimaka), dok svo otapalo nije ishlapilo na zraku. Struktura zaostala na refleksijskom elementu sušenjem gela na zraku odgovarala je kserogelu. Svi spektri snimani su jednostrukom refleksijom zračenja u području između 4000 i 600 cm^{-1} uz razlučivanje od 4 cm^{-1} , a rezultat su uprosječivanja 128 snimaka. Spektri su korigirani ATR algoritmom, s obzirom na kut upada zrake i materijal refleksijskog elementa.

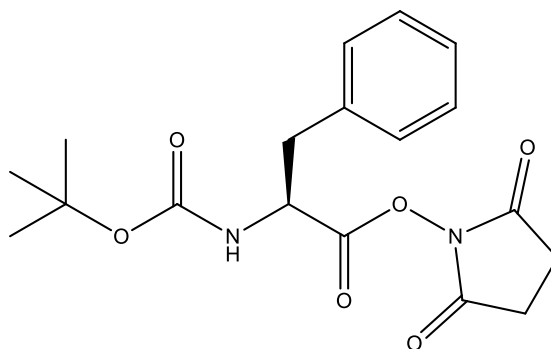
^1H NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance DPX spektrometru pri 300 MHz. Kemijski pomaci (δ) su izraženi u ppm u odnosu na DMSO- d_6 kao unutrašnji standard, a konstante sprege (J) u hercima (Hz).

Morfologija gelskih niti je određena transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM, Zeiss EM 10 A, napon ubrzanja 60 kV i HRTEM JEOL 2100, napon ubrzanja 200 kV). Uzorci gelova su kontrastirani s 2% vodenom otopinom kalijeve soli fosfovolframske kiseline (pWk) ili su sjenčani paladijem, odnosno platinom.

3.3. Sinteza acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskim slijedom Phe-Phe-Ala (FFA)

Spojevi su priređeni prema ranije opisanom postupku, a $^1\text{HNMR}$ i IR spektri odgovaraju spektrima ranije opisanim u literaturi.^{13,32}

3.3.1. Boc-L-Phe-OSu (**1**)



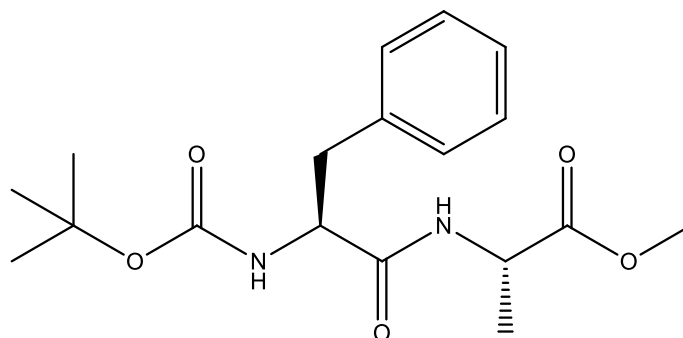
1

Reaktanti Boc-L-Phe (3 g, 0,0113 mol) i *N*-hidroksisukcinimid (1,3014 g, 0,0113 mol) pomiješani su i otopljeni u dioksanu (113 cm³) pomoću ultrazvučne kupelji. U otopinu je dodan *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (2,3315 g, 0,0113 mol), pri čemu je nastao bijeli talog. Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj mješalici preko noći pri sobnoj temperaturi.

Idući dan reakcijska smjesa koja je sadržavala bijeli talog, ureu, profiltrirana je te je talog ispran dioksanom. Potom je filtrat uparen, a uljasti produkt otopljen u CH₂Cl₂ i ekstrahiran tri puta s vodom. Vodeni ekstrakti također isprani su s CH₂Cl₂. Svi organski ekstrakti su spojeni, osušeni na bezvodnom Na₂SO₄, profiltrirani i upareni do polovice prvotnog volumena. Nakon uparavanja, smjesa je hlađena pri –18 °C tijekom dva sata, kako bi se uklonila preostala urea. Urea je potom odfiltrirana te je dodan CH₂Cl₂. Smjesa je potom ponovo hlađena pri –18 °C sat vremena. Nastali talog je odfiltriran, a matičnica uparena do suha. Na tikvici je zaostalo žuto ulje koje je s vremenom kristaliziralo. Dobiveno je 3,964 g (96 %) bijelog kristaliničnog produkta Boc-L-Phe-OSu. Spoj **1** je okarakteriziran prema literaturi.⁵⁰

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,35–7,23 (m, 5H, Ph), 4,66 (bs, 1H, NHC*H), 3,35–3,13 (m, 2H, CH₂Ph), 2,8 (s, 2H, NH₂) 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃)

3.3.2. Boc-L-Phe-L-Ala-OMe (2)

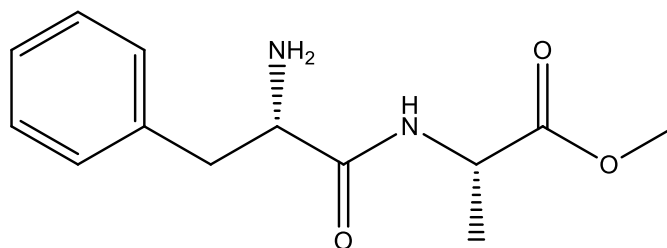


2

Reaktanti Boc-L-Phe-OSu (2 g, 0,00552 mol) i hidroklorid metilnog estera L-alanina (0,77085 g, 0,00552 mol) pomiješani su u okrugloj tikvici, u koju je dodan CH_2Cl_2 (20 cm^3). Smjesa je otopljena pomoću ultrazvučne kupelji, a potom miješana na magnetskoj mješalici. Nakon toga je dodan Et_3N ($7,7 \times 10^{-4} \text{cm}^3$) i smjesa miješana na magnetskoj mješalici preko noći pri sobnoj temperaturi.

Idući dan zamućena reakcijska smjesa ekstrahirana je redom s $\text{KHSO}_4(\text{aq})$ ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$), H_2O , $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ ($w = 10 \%$) i H_2O . Smjesa je osušena na bezvodnom Na_2SO_4 i profiltrirana, a filtrat je uparen. Nakon uparavanja zaostali uljasti produkt sušen je na vakuum pumpi. Nakon sušenja dobiveno je 1,601 g (82 %) produkta Boc-L-Phe-L-Ala-OMe. Spoj 2 je okarakteriziran prema literaturi.¹³

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,32–7,19 (m, 5H, Ph), 6,42 (d, 1H, $J = 6,8 \text{ Hz}$, $\text{NH}^*\text{C}^*\text{H}$), 4,99 (bs, 1H, $\text{NH}^*\text{C}^*\text{H}$), 4,52 (dt, 1H, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2,0 Hz, 14,0 Hz, 0 Hz, $\text{C}^*\text{H}^*\text{Phe}$), 4,35 (q, 1H, $J = 6,4 \text{ Hz}$, $\text{C}^*\text{H}^*\text{Ala}$), 3,71 (s, 3H, OCH_3), 3,13–3,00 (m, 2H, CH_2Ph), 1,41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,35 (d, 3H, $J = 7,1 \text{ Hz}$, CH_3Ala).

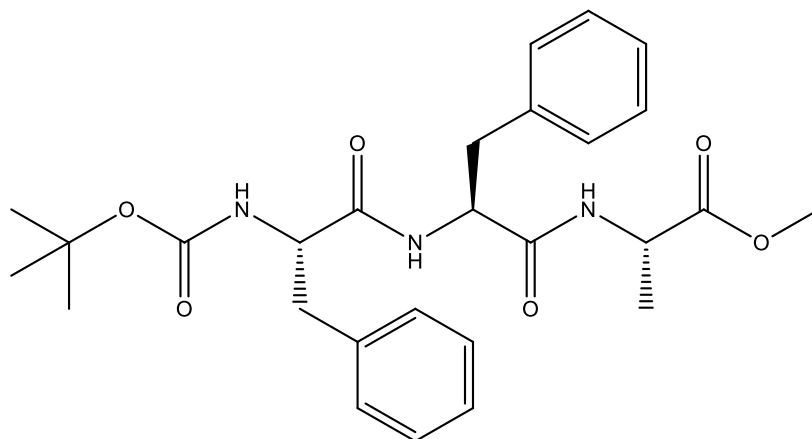
3.3.3. *L*-Phe-*L*-Ala-OMe (**3**)**3**

Spoj Boc-*L*-Phe-*L*-Ala-OMe (0,5 g, 0,001426 mol) otopljen je u suhom CH₂Cl₂ (10 cm³) u ledenoj kupelji, pri čemu je nastala bezbojna otopina. Dodana je TFA (1,4 cm³) te je smjesa miješana na magnetskoj mješalici preko noći u ledenoj kupelji.

Idući je dan smjesa uparena do svijetlo žućkastog ulja. U ledenoj kupelji dodan je CH₂Cl₂ te je smjesa zaljučena s NaHCO₃(aq) (*w* = 10 %) do pH 10, što je provjereno indikatorskim papirom. Organski sloj je ekstrahiran, ispran s vodom te je osušen na bezvodnom Na₂SO₄. Smjesa je uparena do suha. Dobiveno je 0,265 g (74 %) žutog uljastog produkta *L*-Phe-*L*-Ala-OMe. Spoj **3** je okarakteriziran prema literaturi.¹³

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,79 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz, NHC*H), 7,33–7,21 (m, 5H, Ph), 4,62 (q, 1H, *J* = 7,4 Hz, C*H Ala), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,66 (dd, 1H, *J* = 3,8 Hz, 0 Hz, 9,2 Hz, 2 Hz, C*H Phe), 3,27 (dd, 1H, *J* = 3,8 Hz, 9,8 Hz, 13,5 Hz, 7,0 Hz, CH₂ Ph), 2,74 (dd, 1H, *J* = 9,1 Hz, 4,3 Hz, 13,8 Hz, 7,0 Hz, CH₂ Ph), 1,47 (s, 2H, NH₂), 1,41 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃ Ala).

3.3.4. Boc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (4)

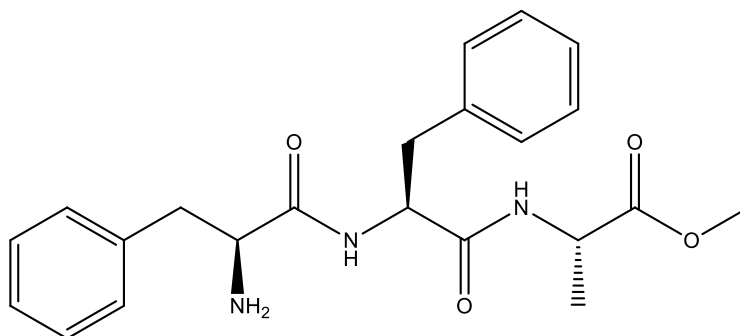


4

U tikvicu s L-Phe-L-Ala-OMe (0,619 g, 0,00247 mol) dodana je smjesa dioksana i CH_2Cl_2 (1:1,35 cm^3). Spoj se nije u potpunosti otopio te je nastala bijela suspenzija. U smjesu je dodan ester Boc-L-Phe-OSu (0,8945 g, 0,00247 mol) i ista je miješana dva dana na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi.

Nakon dva dana, smjesa je uparena do suha te je bijeli talog otopljen u EtOAc (25 cm^3). Talog se nije u potpunosti otopio pa je smjesa profiltrirana. Dobiveni bistri filtrat je ispran vodom, $\text{KHSO}_4(\text{aq})$ (1 mol dm^{-3}), $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ (10 %) i vodom. Organski je sloj osušen na bezvodnom Na_2SO_4 i uparen do suha. Dobiveno je 1,042 g (84 %) bijelog kristaliničnog spoja Boc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe. Spoj 4 je okarakteriziran prema literaturi.¹³

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,33–7,13 (m, 10H, 2 x Ph), 6,44 (bs, 2H, 2 x NHC^*H), 4,84 (bs, 1H, NHC^*H), 4,63 (dd, 1H, $J = 7,0$ Hz, 1,0 Hz, 13,2 Hz, 7,2 Hz, C^*H Phe), 4,44 (q, 1H, $J = 7,2$ Hz, C^*H Phe), 4,30 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, C^*H Ala), 3,70 (s, 3H, O CH_3), 3,18–2,88 (m, 4H, 2 x CH_2 Ph), 1,33 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,31 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3 Ala).

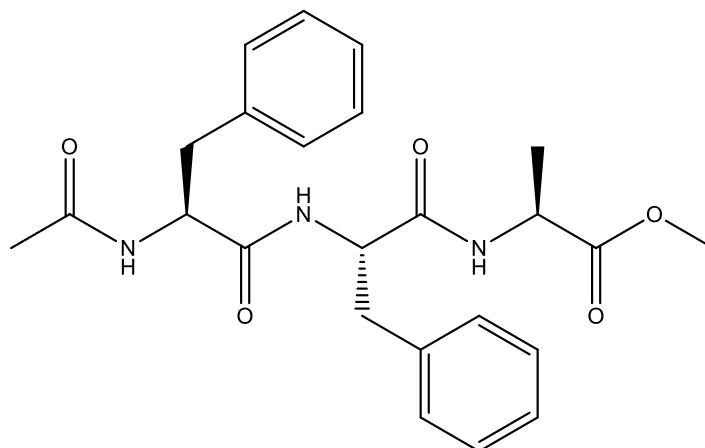
3.3.5. H_2N -L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (5)

5

Boc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe otopljen je u CH_2Cl_2 (10 cm^3) uz miješanje na magnetskoj mješalici u ledenoj kupelji. Pomoću lijevka za dokapavanje dodana je TFA ($2,1\text{ cm}^3$), nakon čega smjesa dalje miješana na magnetskoj mješalici preko noći u ledenoj kupelji.

Idućeg je dana smjesa uparena do žućkastog ulja, dodan je CH_2Cl_2 (15 cm^3) te je založena do pH 10 s $NaHCO_3(aq)$ ($w = 10\%$). Organski sloj je ispran s vodom, a vodeni sloj s CH_2Cl_2 te su organski slojevi spojeni. Isti su potom osušeni na bezvodnom Na_2SO_4 . Nakon sušenja, reakcijska smjesa uparena je do suha, pri čemu je zaostalo žućkasto ulje. Sušenjem na vakuum pumpi dobiveno je $0,677\text{ g}$ (81%) spoja H_2N -L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe. Spoj 5 je okarakteriziran prema literaturi.¹³

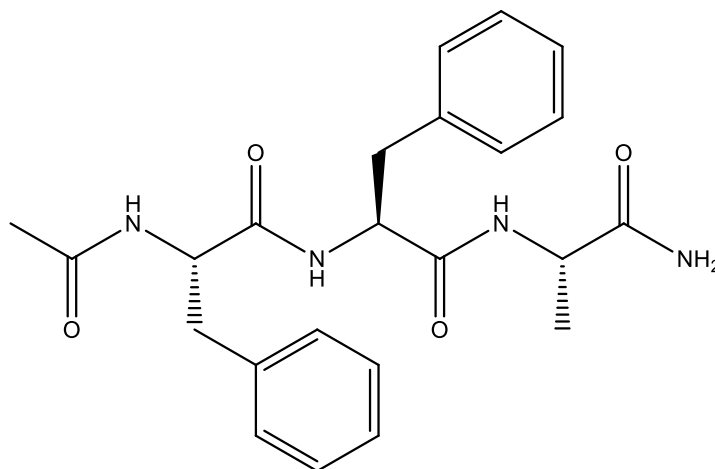
1H NMR (300 MHz, DMSO) δ/ppm : 8,51 (d, 1H, $J = 7,0\text{ Hz}$, NHC*H), 8,03 (d, 1H, $J = 8,6\text{ Hz}$, NHC*H), 7,28–7,11 (m, 10H, 2 x Ph), 4,61 (dd, 1H, $J = 8,0\text{ Hz}$, 4,7 Hz, 13,0 Hz, 2,0 Hz, C*H Phe), 4,29 (q, 1H, $J = 7,2\text{ Hz}$, C*H Ala), 3,62 (s, 3H, OCH_3), 3,03–2,83 (m, 4H, 2 x CH_2 Ph), 1,60 (bs, 2H, NH_2), 1,29 (d, 3H, $J = 7,3\text{ Hz}$, CH_3 Ala).

3.3.6. *Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe* (**6**)**6**

Spoj **5** otopljen je u suhom CH_2Cl_2 (12 cm^3) u ledenoj kupelji te su dodani Et_3N ($0,238 \text{ cm}^3$) i Ac-Cl ($0,121 \text{ cm}^3$). Smjesa je ostavljena preko noći na magnetskoj mješalici uz miješanje na ledenoj kupelji.

Idućeg dana od reakcijske smjese nastao je gel bijele boje. Gel je otopljen u CH_2Cl_2 , a nastaloj otopini dodana voda. Organski sloj je odijeljen i ispran s HCl(aq) ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$), $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ ($w = 10 \%$) i vodom. Organski su slojevi spojeni i osušeni na bezvodnom Na_2SO_4 . Smjesa je zatim uparena do suha, pri čemu je zaostao talog. Dobiveno je $0,700 \text{ g}$ (94%) produkta *Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe*. Spoj **6** je okarakteriziran prema literaturi.¹³

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, DMSO) δ/ppm : 7,95 (d, 1H, $J = 7,0 \text{ Hz}$, NHC^*H), 7,64–7,51 (m, 2H, 2 x NHC^*H), 6,86–6,68 (m, 10H, 2 x Ph), 4,08 (dt, 1H, $J = 4,4 \text{ Hz}$, 7,0 Hz, 8,3 Hz, 9,1 Hz, $\text{C}^*\text{H Phe}$), 4,14–3,94 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H Phe}$), 3,99 (dt, 1H, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2,9 Hz, $\text{C}^*\text{H Ala}$), 3,17 (s, 3H, OCH_3), 2,87 (s, 3H, CH_3), 2,59 (dd, 1H, $J = 4,2 \text{ Hz}$, 5,8 Hz, 14,0 Hz, 0 Hz, 2 x $\text{CH}_2 \text{ Ph}$), 2,47 (dd, 1H, $J = 4,2 \text{ Hz}$, 5,0 Hz, 14,0 Hz, 10,1 Hz, 2 x $\text{CH}_2 \text{ Ph}$), 2,35 (dd, 1H, $J = 9,3 \text{ Hz}$, 4,4 Hz, 14,0 Hz, 0 Hz, 2 x $\text{CH}_2 \text{ Ph}$), 2,19 (dd, 1H, $J = 9,9 \text{ Hz}$, 0 Hz, 13,6 Hz, 8,9 Hz, 2 x $\text{CH}_2 \text{ Ph}$), 1,76 (s, 3H, COCH_3), 0,84 (d, 3H, $J = 7,4 \text{ Hz}$, CH_3)

3.3.7. *Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂* (**7**)**7**

Acetilirani tripeptid **6** (0,685 g, 0,001558 mol) otopljen je u NH₃/MeOH (80 cm³) i CH₂Cl₂ (5 cm³) u ledenoj ultrazvučnoj kupelji. Reakcijska smjesa hlađena je u hladnjaku tjedan dana kako bi istaložila. S obzirom da se nakon tjedan dana nije pojavio talog, smjesa je hlađena tjedan dana uz miješanje u ledenici.

Nakon dva tjedna, reakcijska smjesa je profiltrirana te je matičnica uparena do suha. U tikvici je zaostao bijeli talog. Produkt je ispran nekoliko puta s MeOH. Nakon uparavanja otapala, talog je otopljen u NH₃/MeOH i hlađen u ledenici uz miješanje tjedan dana.

Nakon tjedan dana, reakcijska smjesa je profiltrirana, a matičnica uparena do suha, pri čemu je u tikvici zaostao žućkasti talog. Talog je ispran nekoliko puta s MeOH, pri čemu je nastao bijeli talog. Nastali talog ponovo je otopljen u NH₃/MeOH te hlađen u ledenici uz miješanje dva tjedna. Nakon dva tjedna, smjesa je hlađena u hladnjaku.

Reakcijska smjesa je profiltrirana, a matičnica uparena do suha. Ustanovljeno je kako je i bijeli talog nakon filtriranja i talog nakon uparavanja matičnice isti spoj, *Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂*. Dobiveno je 0,1347 g (20,4%) spoja *Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂*. Spoj **7** je okarakteriziran prema literaturi.¹³

¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ /ppm: 8,10 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, NHC*H), 8,02 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, NHC*H), 7,96 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz, NHC*H), 7,28–7,12 (m, 11H, 2 × Ph + NH(NH₂)), 7,02 (bs, 1H, NH(NH₂)), 4,54–4,39 (m, 2H, 2 × C*H Phe), 4,19 (p, 1H, $J = 7,4$ Hz, C*H Ala), 3,10–2,59 (m, 4H, 2 × CH₂ Ph), 1,71 (s, 3H, COCH₃), 1,21 (d, 3H, $J = 7,1$, CH₃ Ala)

3.4. Priprava mjernih uzoraka

Pripravljene su otopine, gelovi i kserogelovi spojeva **6** i **7** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi.

Gelovi su pripravljani otapanjem 10 mg čvrstog uzorka u odgovarajućem volumenu otapala u ultrazvučnoj kupelji i uz zagrijavanje do vrenja te hlađenjem vruće bistre otopine na sobnu temperaturu (tablica 1).

Kserogelovi su pripravljani sušenjem na zraku uzoraka gelova nanesenih na refleksijski element ATR nosača.

Otopina spoja **7** u acetonitrilu pripravljena je razrjeđivanjem uzorka odgovarajućeg gela acetonitrilom do bistre otopine ($6,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). S obzirom na već nižu koncentraciju gelatora u gelovima spoja **7** u vodi i teškoj vodi te spoja **6** u svim istraživanim otapalima, razrjeđivanjem odgovarajućih gelova otapalom nisu opaženi IR spektri spojeva. U tom su slučaju otopine spoja **6** i **7** pripravljene mehaničkim potresanjem odgovarajućih gelova, čime je struktura gela narušena i prevedena u tekuće stanje (otopina).

Tablica 1. Koncentracije gelova spojeva **6** i **7** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi

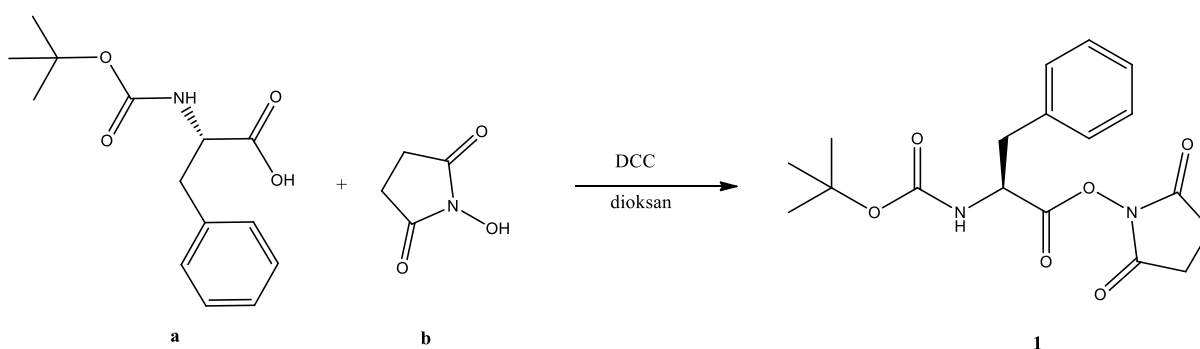
Spoj	$c / \text{mol dm}^{-3}$		
	MeCN	H ₂ O	D ₂ O
6	$5,0 \times 10^{-3}$	$7,0 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$
7	$5,0 \times 10^{-2}$	$7,2 \times 10^{-3}$	$7,3 \times 10^{-3}$

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskim slijedom Phe-Phe-Ala (FFA)

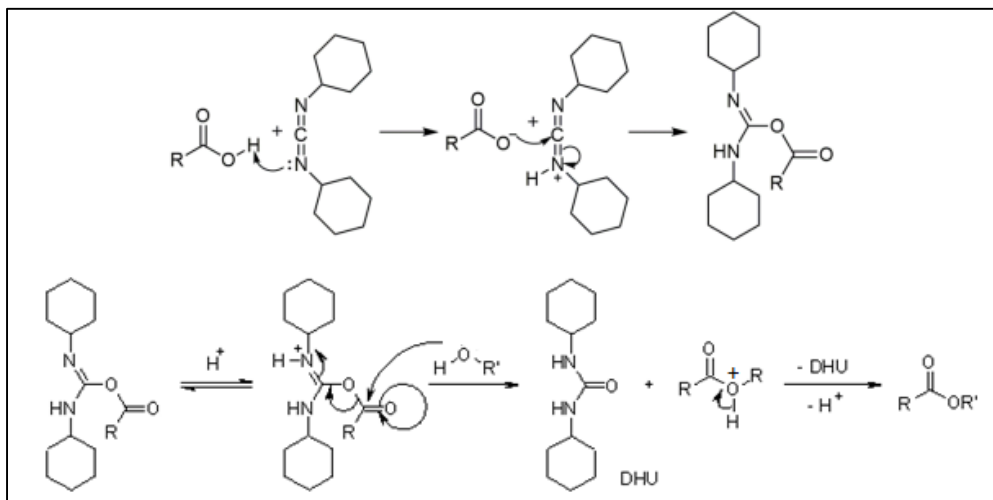
Tripeptidi **6** i **7** pripremljeni su sintezom koja uključuje 6, odnosno 7 stupnjeva.

Sinteza je počela pripravom Boc-zaštićenog sukcinimidnog estera Boc-L-Phe-OSu (**1**). Prvi reaktant, Boc-L-fenilalanin (**a**), aminokiselina fenilalanin zaštićena s *tert*-butiloksikarbonilnom skupinom (Boc) u reakciji esterifikacije kondenzira s *N*-hidroksisukcinimidom (**b**) uz karbodiimidni reagens *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) (slika 7).



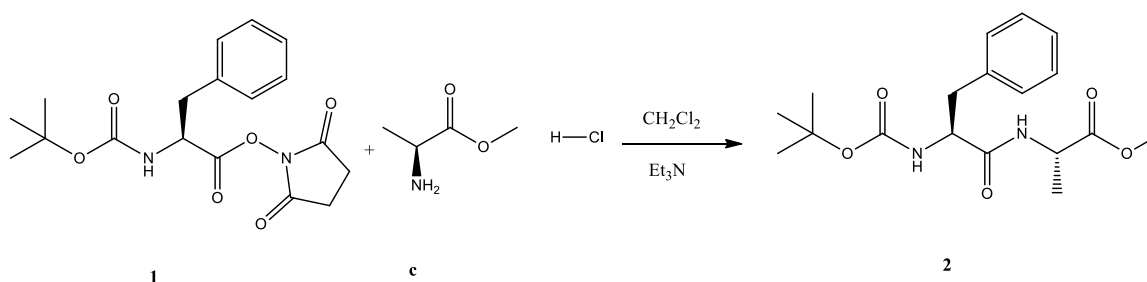
Slika 7. Sinteza Boc-L-Phe-OSu reakcijom Boc-L-fenilalanina i *N*-hidroksisukcinimida

Ovaj tip esterifikacije naziva se Steglichova esterifikacija. Općenito, u prvom koraku reakcije, karboksilna kiselina i DCC daju *O*-acilizoureu, međuprodukt koji ima sličnu reaktivnost kao i odgovarajući anhidrid karboksilne kiseline. *O*-acilizourea potom reagira s hidroksilnom skupinom alkohola pri čemu nastaje dicikloheksilurea (DCHU) i odgovarajući ester (slika 8).



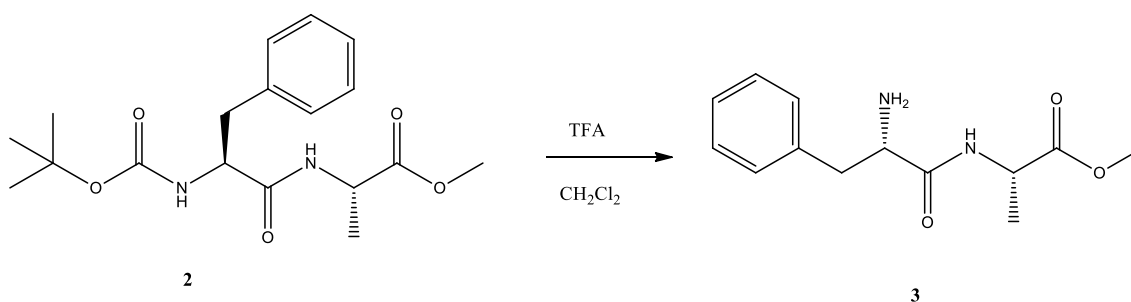
Slika 8. Mehanizam Steglichove esterifikacije (preuzeto i prilagođeno iz 45)

Drugi stupanj sinteze (slika 9) je priprava dipeptida Boc-L-Phe-L-Ala-OMe (**2**):

Slika 9. Sintaza Boc-L-Phe-L-Ala-OMe reakcijom *N-tert*-butiloksikarbonil fenilalanina i metilnog estera alanina

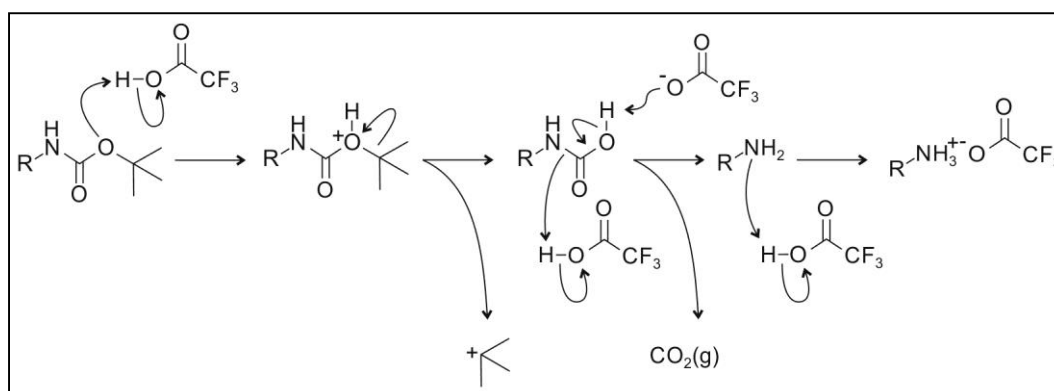
Kondenzacijom *N-tert*-butiloksikarbonil fenilalanina (**1**) i metilnog estera alanina (**c**) nastaje dipeptid Boc-L-Phe-L-Ala-OMe (**2**) sa zaštitnom Boc skupinom.

Zaštitna Boc skupina uklonjena je u trećem stupnju sinteze (slika 10):



Slika 10. Uklanjanje Boc zaštitne skupine

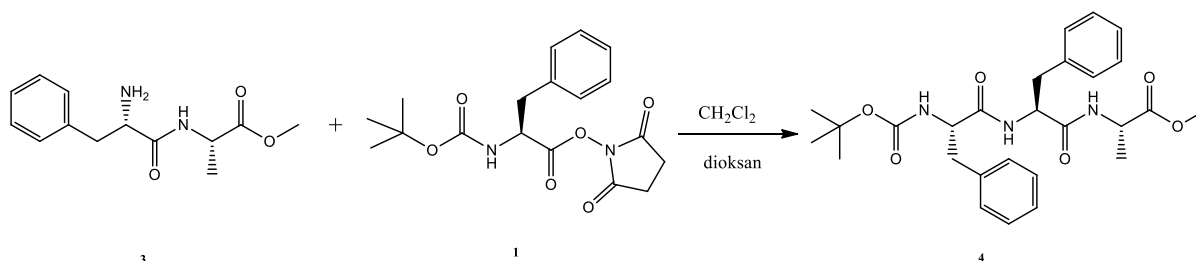
Općenito, uklanjanje zaštitne skupine trifluoroctenom kiselinom (TFA) odvija se u nekoliko stupnjeva prikazanih na slici 11:



Slika 11. Mehanizam uklanjanja Boc zaštitne skupine (preuzeto i prilagođeno iz 46)

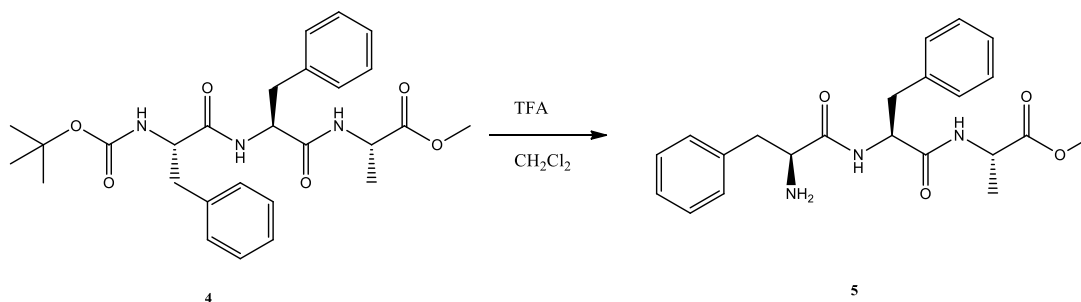
Tert-butilkarbamat se protonira vodikom iz trifluoroctene kiseline, nakon čega gubitkom *tert*-butilnog kationa nastaje karbamatna kiselina. Dekarboksilacijom karbamatne kiseline nastaje slobodni amin, koji protoniranjem u kiselim uvjetima daje sol trifluoroctene kiseline.

Nakon uklanjanja Boc zaštitne skupine trifluoroctenom kiselinom, dipeptid L-Phe-L-Ala-OMe (**3**) kondenziran je s Boc zaštićenim aktivnim sukcinimidnim esterom fenilalanina (**1**) pri čemu nastaje tripeptid Boc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (**4**) (slika 9):



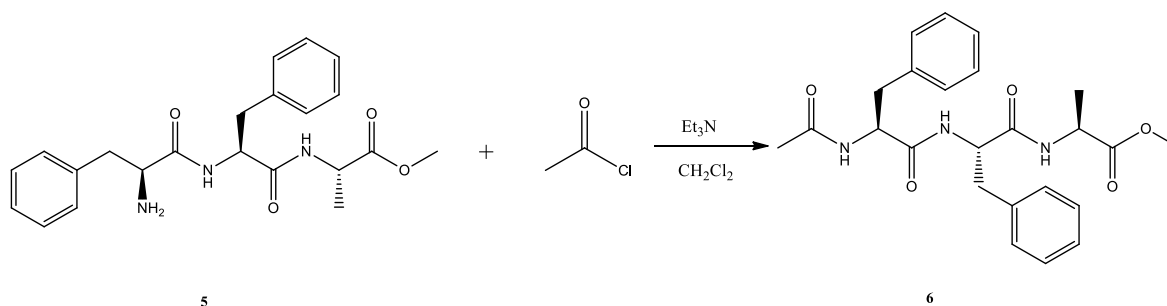
Slika 12. Dobivanje Boc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe reakcijom L-Phe-L-Ala-OMe i Boc-L-Phe-OSu

U petom koraku sinteze (slika 13) uklanja se zaštitna Boc skupina trifluoroctenom kiselinom te nastaje tripeptid L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (**5**):



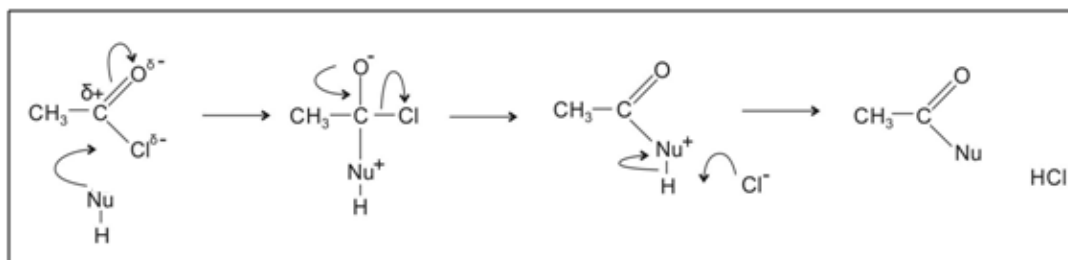
Slika 13. Uklanjanje Boc skupine s Boc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe

U idućem koraku (slika 14) tripeptid **5** acetiliran je s acetil-kloridom, pri čemu nastaje acetilirani metilni ester Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (**6**):



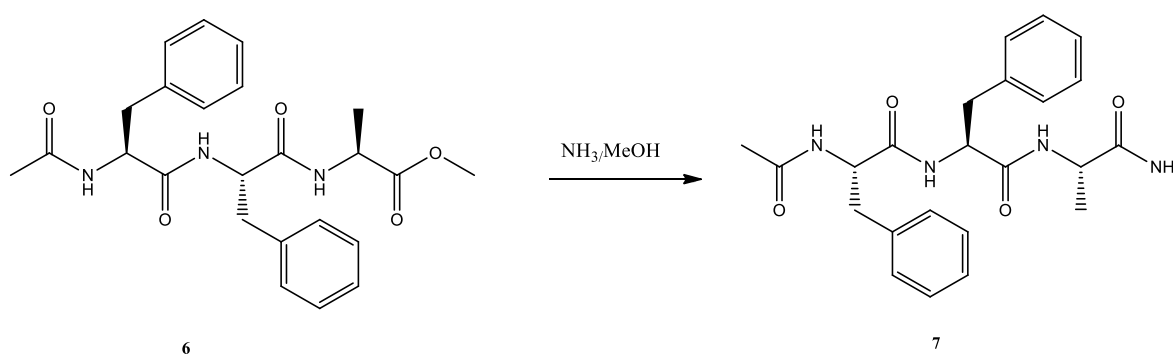
Slika 14. Sinteza Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe reakcijom L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe i acetil-klorida

Acetil-klorid, CH_3COCl , je vrlo reaktivna molekula jer su na atom ugljika vezana dva elektronegativna atoma, kisik i klor. Upravo zbog toga nukleofil može „napasti“ ugljikov atom. U ovome je slučaju nukleofil primarni amin (**5**) te dolazi do nukleofilne supstitucije. Mehanizam reakcije odvija se u dva koraka. Prvi je korak adicija, u kojem nukleofil „napada“ ugljikov atom, pri čemu se elektronski par iz veze $\text{C}=\text{O}$ premješta na kisik pa on postaje negativno nabijen. Drugi je korak eliminacija, tijekom kojeg nastaje veza $\text{C}=\text{O}$, a elektroni iz veze $\text{C}-\text{Cl}$ premještaju se na atom klora i otpušta se kloridni ion. Konačno, kloridni ion privlači vodik s nukleofila, te nastaje klorovodična kiselina i acetilirani produkt. S trietilaminom (Et_3N) nastala HCl daje sol (slika 15).



Slika 15. Mehanizam reakcije acetiliranja (preuzeto i prilagođeno iz 47)

U zadnjem stupnju sinteze (slika 16) metilni ester (**6**) otopljen je u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu, pri čemu reakcijom amonolize nastaje spoj Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ (**7**):

Slika 16. Sinteza Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ reakcijom Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe i NH₃/MeOH

Amonoliza je reakcija estera s amonijakom, u kojoj je amonijak nukleofil koji „napada“ karboksilni ugljikov atom estera zbog polarizirane C–O veze.

4.2. Gelirajuća svojstva tripeptida

Minimalna koncentracija gelatora je najmanja koncentracija gelatora u otopini pri kojoj nastaje gel. Učinkovitost gelatora izražava se kao maksimalni volumen (V_{\max} / cm^3) otapala ili smjese otapala koji može izgelistati 10 mg određenog spoja (tablica 2).

Tablica 2. Efikasnost geliranja otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{\max}) izgelistanog otapala s 10 mg tripeptida **6** i **7**

Otapalo	V_{\max} / cm^3	
	6	7
MeCN	1,85	3,15
H ₂ O	2,44	4,31
D ₂ O	2,32	2,35

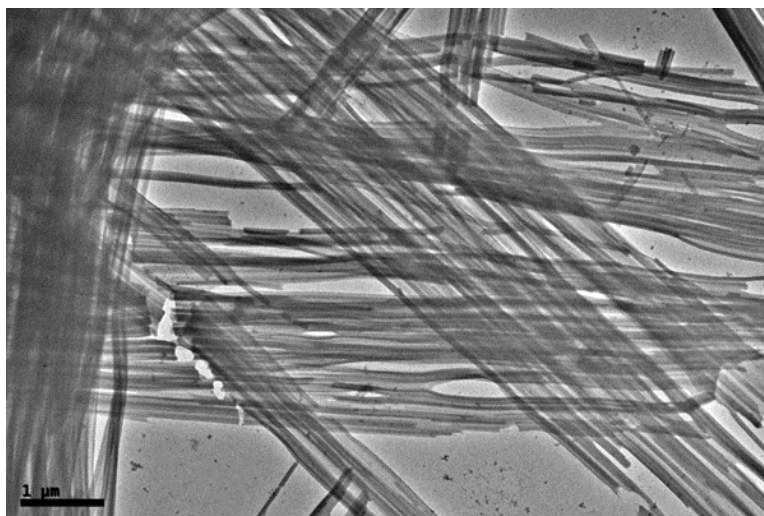
S organskim otapalom, ali i s vodom i teškom vodom oba su spoja dala čvrste i prozirne gelove. Oba tripeptida bolje geliraju vodu nego organsko otapalo, pri čemu je tripeptid **7** učinkovitiji gelator navedenih otapala od tripeptida **6**. I metilni esterski (**6**) i amidni derivat (**7**) tripeptida L-Phe-L-Phe-L-Ala podjednako geliraju teško vodu.

4.3. TEM mikroskopija

Morfologija gelskih niti istražena je transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Elektronski mikroskopi imaju puno veće povećanje od svjetlosnog mikroskopa te se njima može se postići razlučivanje do 0,1 nm i povećanje do 10^6 . TEM mikroskopijom slika nastaje uslijed prolaska elektrona kroz uzorak. Kako organski spojevi slabo zaustavljaju ili otklanjaju elektrone, uzorci su tretirani s kontrastnim reagensom pWk (kalijeva sol polivolframfosforne kiseline) ili sjenčani s paladijem ili platinom.¹³

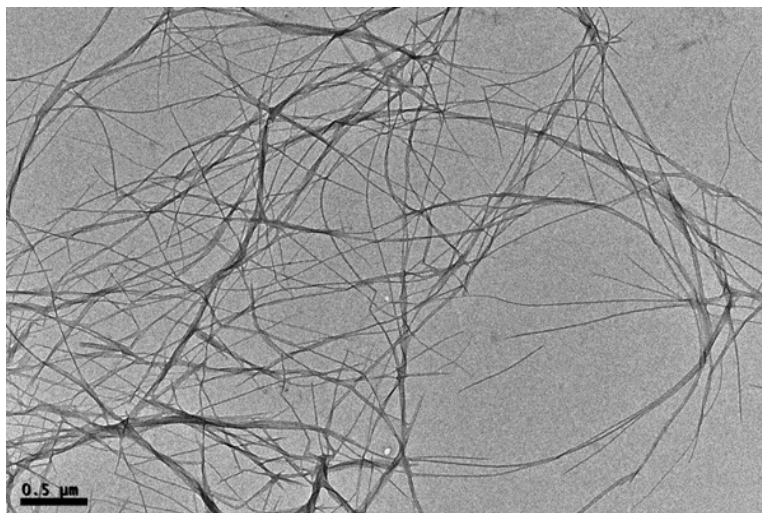
Gelsku mrežu mogu činiti niti, trake i tubuli, a često i nakupine niti. Niti ili trake su najčešće široke od 10 do 100 nanometara, a prema obliku mogu biti ravne, uvinute, međusobno isprepletene ili račvaste. Morfologija gelske mreže ovisi o strukturi gelatora i otapalu, a ima veliki utjecaj na samu čvrstoću i stabilnost gela.

Na slici 17 je prikazan TEM fotografija gela metilnog estera **6** u acetonitrilu. Vidljivo je kako je gelska mreže sastavljena od ravnih, slijepljenih niti višeslojne strukture promjera 30–50 nm.



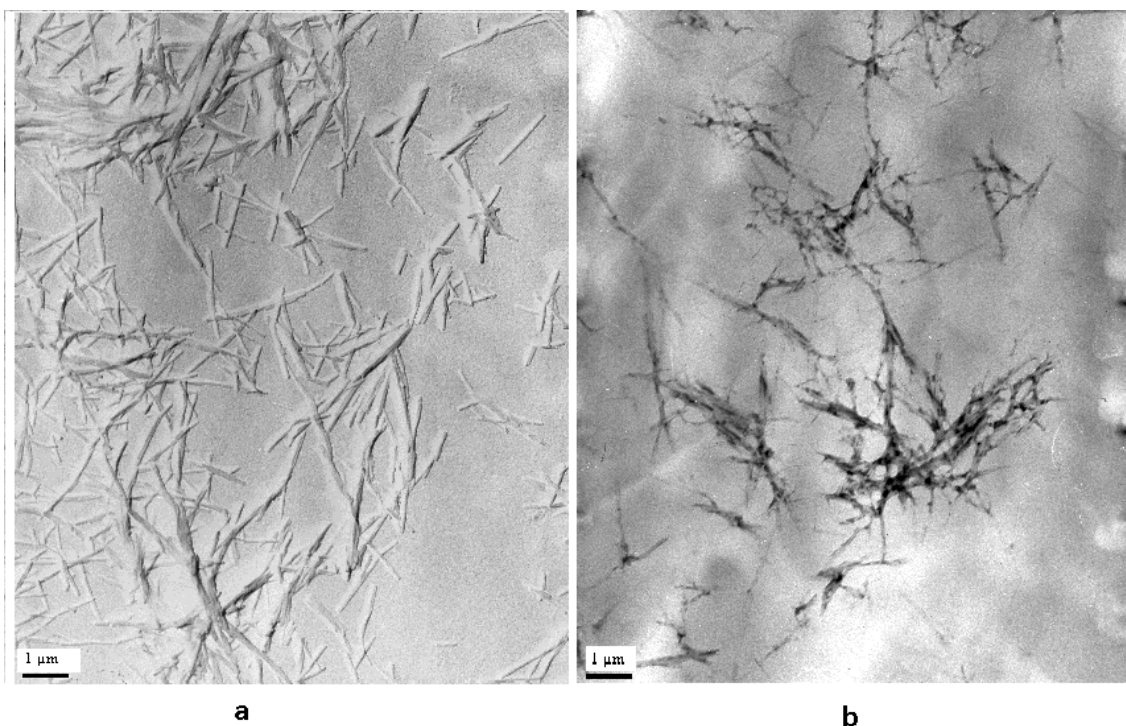
Slika 17. TEM mikrografija gela spoja **6** u acetonitrilu, kontrastirano s pWk (preuzeto iz 13)

Gelska mreža hidrogela metilnog estera se sastoji od isprepletanih i savijenih tankih niti promjera 5–20 nm (slika 18).



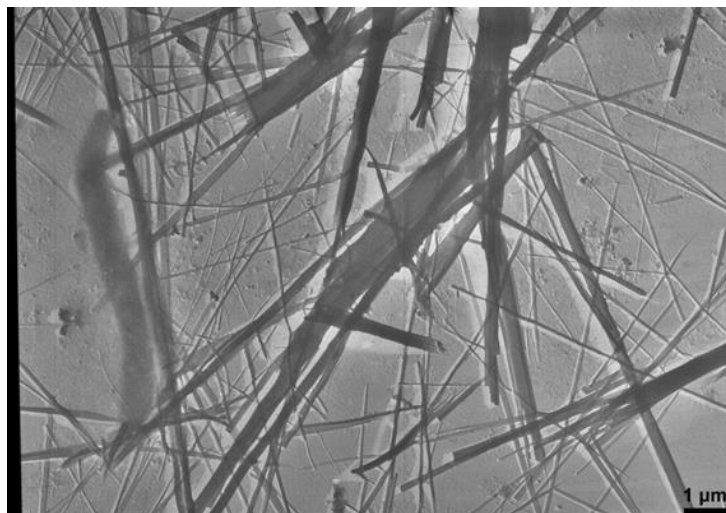
Slika 18. TEM mikrografija hidrogela spoja **6**, sjenčano platinom (preuzeto iz 13)

Gelska mreža metilnog estera **6** u teškoj vodi sastoji se od ravnih traka i niti dužine desetak mikrometara (slika 19).



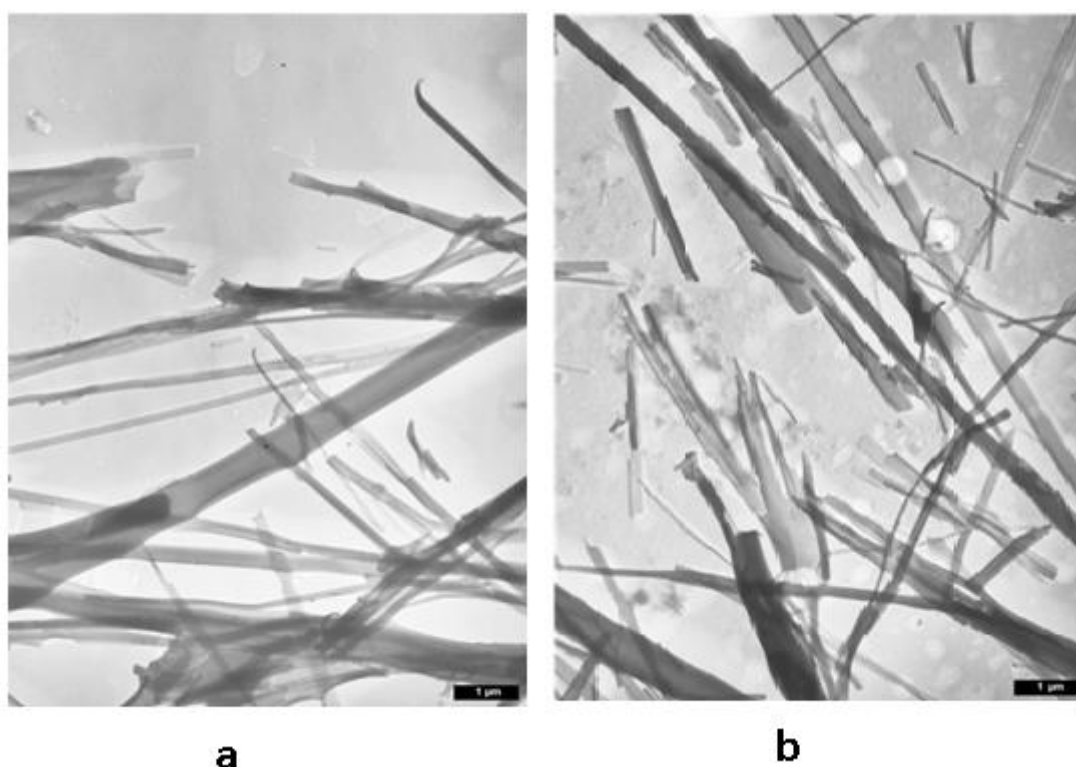
Slika 19. TEM mikrografije gela spoja **6** u teškoj vodi: a) sjenčanog paladijem, b) kontrastiranog s pWk

Gelska mreža amida **7** u acetonitrilu sastoji se od ravnih traka i niti promjera 60–250 nm što je vidljivo na slici 20.



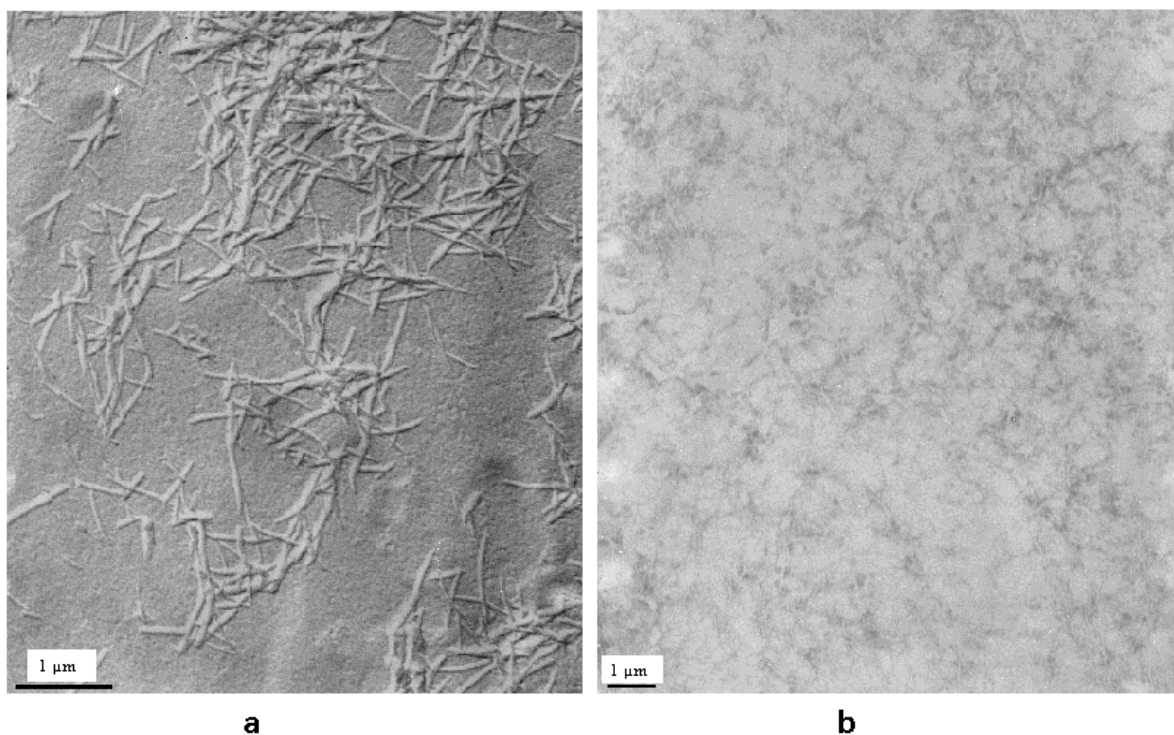
Slika 20. TEM mikrografija gela spoja **7** u acetonitrilu, sjenčano paladijem (preuzeto iz 13)

TEM mikrografija gelske mreže amida **7** u vodi (slika 21) ukazuje na smjesu ravnih niti i traka promjera 50–500 nm i duljine desetak mikrometara.



Slika 21. TEM mikrografije hidrogela spoja **7**: a) kontrastiranog s pWk, b) sjenčanog paladijem (preuzeto iz 13)

TEM mikrografija gelske mreže amida **7** u teškoj vodi sastoji se od smjese traka i niti duljine nekoliko mikrometara (slika 22).



Slika 22. TEM mikrografije gela spoja **7** u teškoj vodi: a) sjenčanog paladijem, b) kontrastiranog s pWk

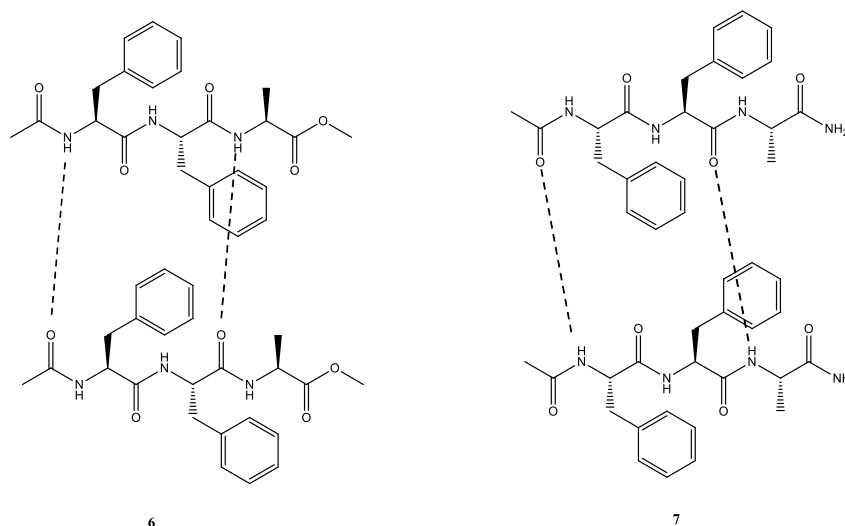
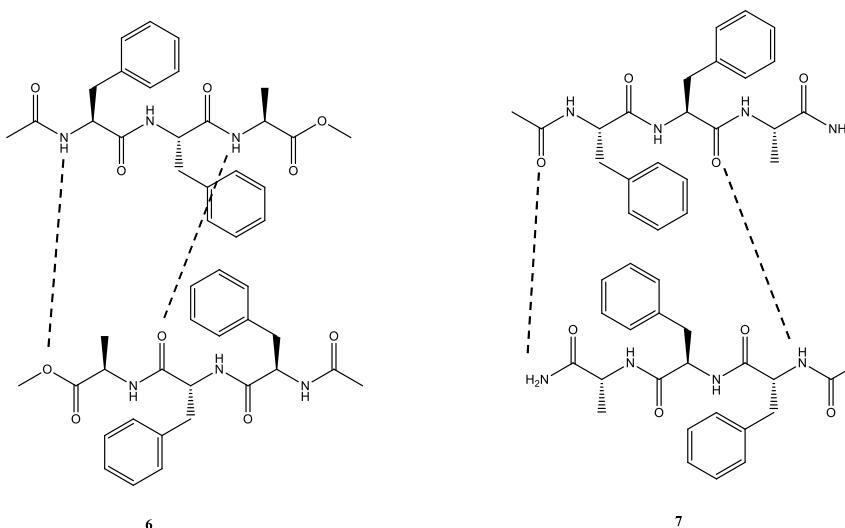
4.4. Istraživanje supramolekulskih struktura ATR spektroskopijom

Molekule proteina karakteriziraju brojne vibracije pri različitim frekvencijama, no devet vrpce u IR spektru karakteristično je za peptidnu skupinu: amid A ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$), amid B ($\sim 3100\text{ cm}^{-1}$), amid I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$), amid II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$), amid III ($\sim 1300\text{ cm}^{-1}$), amid IV ($\sim 735\text{ cm}^{-1}$), amid V ($\sim 635\text{ cm}^{-1}$), amid VI ($\sim 600\text{ cm}^{-1}$) i amid VII ($\sim 200\text{ cm}^{-1}$).⁴⁸ Ove se vrpce pripisuju vibracijama u ravnini (istezanje veze C=O, istežanje veze C–N, istežanje veze N–H, svijanje skupine OCN, svijanje skupine CNH) i izvan ravnine (svijanje skupina CN, C=O i NH). Različito vodikovo vezanje i geometrijska orijentacija amidnih veza u α -zavojnica, β -pločama, β -okretima i nasumičnim zavojnicama rezultiraju različitim frekvencijama vibracija koje su svojstvene pojedinim sekundarnim strukturama (tablica 3). Vrpce amid I i amid II su najintenzivnije vrpce u IR spektru proteina. Vrpca amid I potječe od vibracije istežanja veze C=O (80 %) amidne skupine, spregnute sa svijanjem u ravnini skupine NH (10 %) i istežanjem veze C–N (10 %), dok vrpce amid II doprinose svijanje skupine NH u ravnini (60 %) i istežanje veze C–N (40 %). Dio spektra na koji najviše utječe sekundarna struktura proteina je područje između 1700 i 1600 cm^{-1} u kojem se nalazi vrpca amid I, a čiji položaj, odnosno valni broj, neposredno upućuje na sekundarnu strukturu proteina. Položaj vrpce amid II također ovisi o konformaciji proteina, no ne koristi se u tolikoj mjeri za određivanje sekundarne strukture. Ostale vrpce zasada nisu toliko analizirane u svrhu određivanja sekundarne strukture proteina zbog svoje složenosti te utjecaja bočnih lanaca i vodikovih veza.

Tablica 3. Položaj vrpce amid I u IR spektru i pripadajuće sekundarne strukture proteina (preuzeto i prilagođeno iz 49)

Valni broj / cm^{-1}		Sekundarna struktura
H ₂ O	D ₂ O	
1624±1	1624±4	β-ploča
1627±2	1631±3	β-ploča
1633±2	1637±3	β-ploča
1638±2		β-ploča
	1641±2	α-zavojnica
1642±1		β-ploča
1648±2	1645±4	nasumična
1656±2	1653±4	α-zavojnica
	1663±4	β-okret
1663±3		α-zavojnica
1667±1	1671±3	β-okret
	1675±5	β-ploča
1675±1	1683±2	β-okret
1680±2	1689±2	β-okret
1685±2	1694±2	β-okret
1691±2		β-ploča
1696±2		β-ploča

U svrhu istraživanja načina samoudruživanja sintetiziranih tripeptida u gelske strukture i nastalih sekundarnih struktura, snimljeni su ATR spektri gelova i kserogelova. Naime, utvrđeno je da slijedovi amiloid β proteina formiraju paralelne i antiparalelne β-nabrane ploče, koje se mogu razlikovati prema položaju vrpce amid I u IR spektru.⁴⁸ Za proteine sa strukturom antiparalelne β-ploče u spektralnom područje vrpce amid I opažaju se dvije vrpce: intenzivna vrpca pri približno 1630 cm^{-1} i vrpca pet puta slabijeg intenziteta pri približno 1695 cm^{-1} .²⁸ Smatra se da je omjer intenziteta vrpce pri 1695 cm^{-1} i 1630 cm^{-1} proporcionalan udjelu antiparalelnih β-niti u β-ploči. Strukture paralelnih β-ploča karakterizirane su samo vrpcom pri približno 1630 cm^{-1} .

Slika 23. Shema paralelnog slaganja tripeptida **6** i **7**Slika 24. Shema antiparalelnog slaganja tripeptida **6** i **7**

4.4.1. ATR spektri spojeva **6** i **7** u čvrstom stanju

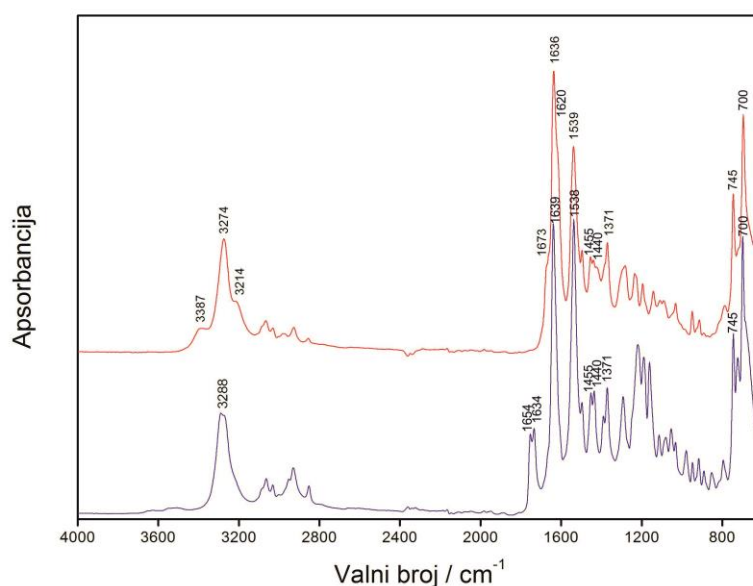
Spojevi **6** i **7** su tripeptidi aminokiselinskog slijeda L-fenilalanin-L-fenilalanin-L-alanin, koji oba na *N* kraju sadrže acetilnu skupinu, a razlikuju se prema funkcionalnoj skupini na C kraju peptida. Spoj **6** na C kraju peptida sadrži metil estersku skupinu, a spoj **7** amidnu skupinu.

IR spektri odraz su njihove molekulske strukture (slika 25). U spektrima oba spoja najintenzivnije su vrpce amidnih skupina peptidne okosnice, pri čemu se za spoj **6** vrpca amid I opaža pri 1639 cm^{-1} , a vrpca amid II pri 1538 cm^{-1} , dok se za spoj **7** vrpca amid I uočava pri 1636 cm^{-1} , a vrpca amid II pri 1539 cm^{-1} (tablica 4).⁴² Istezanje veze N–H odgovarajuće

amidne skupine doprinosi vrpce pri 3288 cm^{-1} u spektru spoja **6**, odnosno vrpce pri 3274 cm^{-1} u spektru spoja **7**.⁴² Vrpce slabog intenziteta u području $3100\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju istežanjima veza C–H benzenskih prstenova, dok se vrpce u području $3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ pripisuju antisimetričnim i simetričnim istežanjima veza C–H metilnih i metilenskih skupina.⁴² Deformacije odgovarajućih alifatskih skupina rezultiraju vrpcama pri približno 1455 cm^{-1} (antisimetrična deformacija skupine CH_3) i 1371 cm^{-1} (simetrična deformacija skupine CH_3) te vrpcama pri približno 1440 cm^{-1} (striženje skupine CH_2).⁴² Intenzivne vrpce u spektralnom području nižih valnih brojeva, pri približno 745 cm^{-1} i 700 cm^{-1} , odgovaraju svijanjinama izvan ravnine aromatskih skupina CH i upućuju na monosupstituirane fenilne jezgre fenilalanina.⁴²

Za razliku od spoja **7**, u IR spektru spoja **6** opažaju se vrpce pri 1754 cm^{-1} i 1734 cm^{-1} , koje se pripisuju istežanju veze C=O u esterskoj skupini na kraju ovog tripeptida.⁴² Vrpca pri nižem valnom broju upućuje na sudjelovanje karbonilne skupine u intermolekularnoj vodikovoj vezi.

S obzirom na prisutnost primarne amidne skupine u strukturi spoja **7**, u IR spektru ovog tripeptida opažaju se vrpce pri 3387 cm^{-1} i 3214 cm^{-1} , koje odgovaraju antisimetričnom i simetričnom istežanju primarne amino skupine.⁴² Uz vrpce amid I i amid II peptidnih skupina, odgovarajuće vrpce amidne skupine na kraju tripeptida **7** uočavaju se pri 1673 cm^{-1} i 1620 cm^{-1} .⁴²



Slika 25. ATR spektri čvrstih uzoraka **6** (plavo) i **7** (crveno)

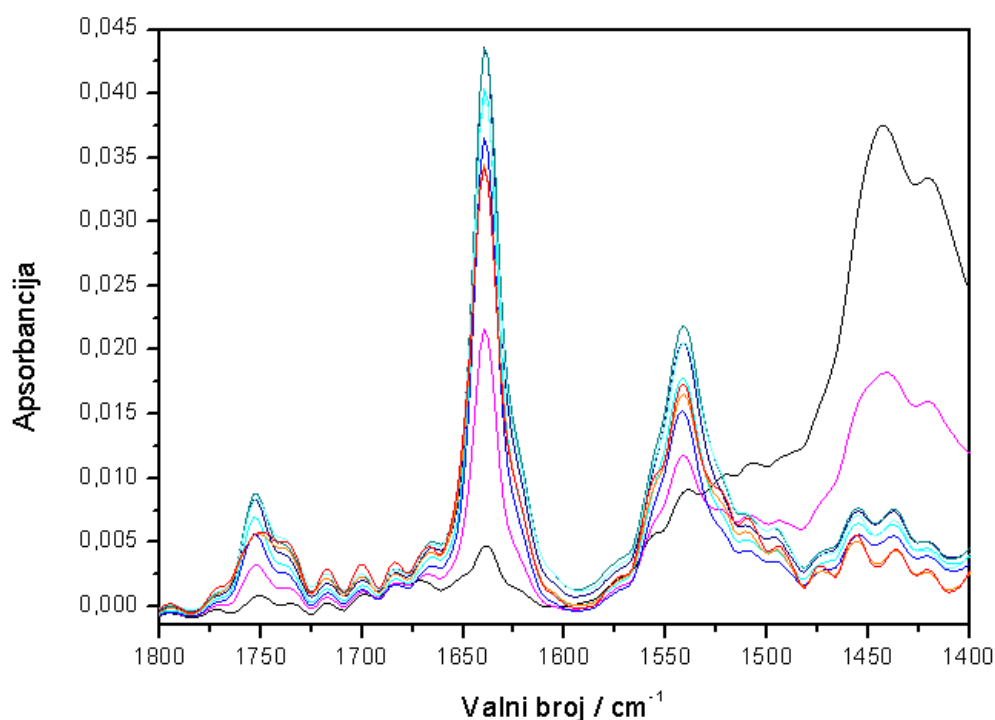
Tablica 4. Asignacija karakterističnih vibracijskih vrpca u IR spektrima čvrstih uzoraka 6 i 7

Valni broj / cm^{-1}		Vibracija
6	7	
	3387	ν_{as} N–H (NH_2) primarni amid
3288	3274	ν N–H sekundarni amid
	3214	ν_{s} N–H (NH_2) primarni amid
3063	3065	ν =C–H (ar)
3031	3030	ν =C–H (ar)
	2971	ν_{as} C–H (CH_3)
2929	2927	ν_{as} C–H (CH_2)
2852	2855	ν_{s} C–H (CH_2), ν_{s} C–H (CH_3)
1754		ν C=O ($-\text{COOCH}_3$)
1734		ν C=O ($-\text{COOCH}_3$)
	1673	ν C=O ($-\text{CONH}_2$) amid I
1663	1661	ν C=O ($\text{CH}_3\text{CONH}-$)
1639	1636	ν C=O ($-\text{CONH}-$) amid I
	1620	δ NH + ν N–C=O ($-\text{CONH}_2$) amid II
1538	1539	δ NH + ν N–C=O ($-\text{CONH}-$) amid II
1497	1497	ν CC (ar)
1453	1455	δ_{as} CH_3
1436	1440	δ_{sc} CH_2
1391		δ_{s} CH_3 ($-\text{COOCH}_3$)
1371	1371	δ_{s} CH_3
1292	1284	δ_{ip} =C–H (ar)
1188	1195	δ_{ip} =C–H (ar)
1162		ν C–O ($-\text{COOCH}_3$)
745	746	δ_{oop} =C–H (ar)
699	697	δ_{oop} =C–H (ar)

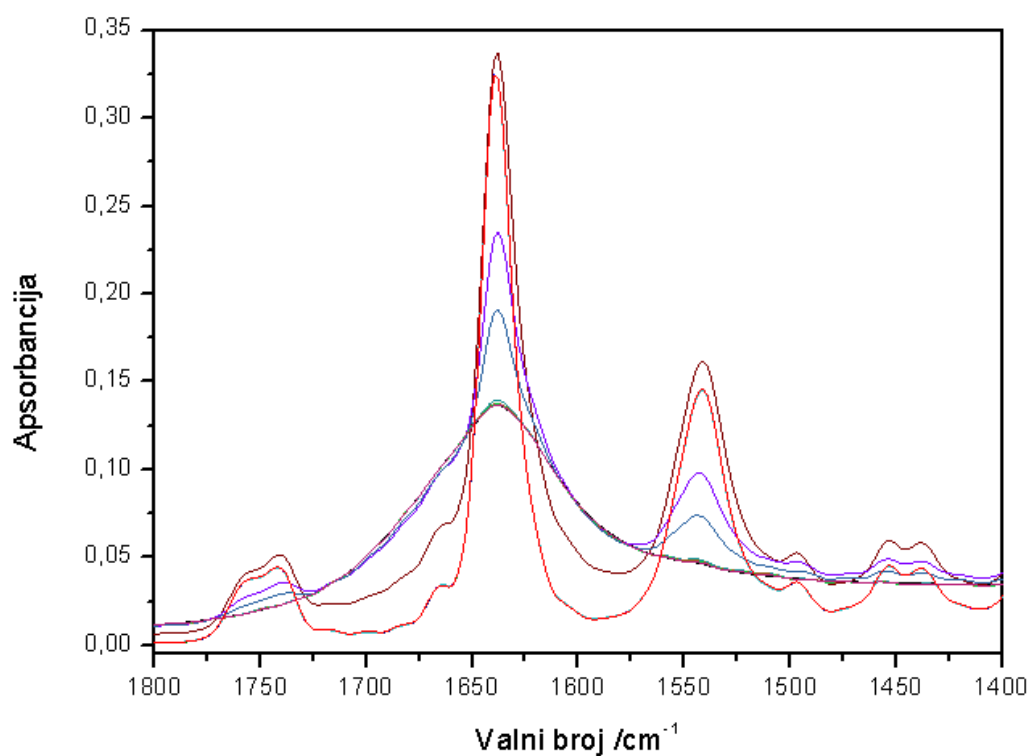
4.4.2. ATR spektri otopina i gelskih struktura tripeptida **6** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi

Snimljeni su ATR spektri gelova, kserogelova i otopina tripeptida **6** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi. Kserogelovi su pripremljeni stajanjem uzoraka gelova na zraku na refleksijskom elementu ATR nosača. Tijekom sušenja na zraku snimani su IR spektri sve dok više nisu ukazivali na prisutnost otapala, a spektar strukture zaostale nakon gubitka otapala odgovarao je kserogelu.

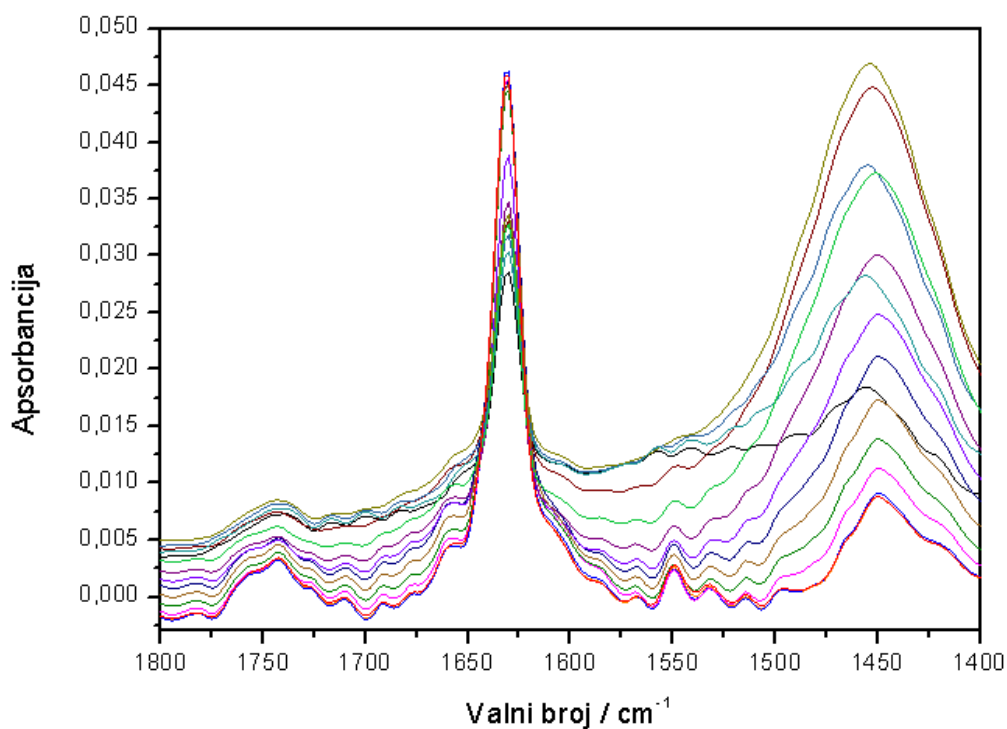
U vremenski ovisnim spektrima gelova spoja **6** uočava se nestajanje vrpce koje potječu od otapala, što ukazuje na isparavanje otapala tijekom vremena. Primjerice, smanjenje intenziteta vrpce deformacija metilne skupine u području od 1470 cm^{-1} do 1370 cm^{-1} u IR spektru gela u acetonitrilu ukazuju na potpuni gubitak acetonitrila iz strukture gela nakon 40. minute snimanja (slika 26), dok gubitak široke vrpce deformacije molekule vode pri približno 1640 cm^{-1} u IR spektru gela u vodi upućuje na strukturu bez vode nakon 130. minute (slika 27). Spektri gelske strukture spoja **6** u teškoj vodi nisu se mijenjali nakon 215. minute (slika 28).



Slika 26. ATR spektri tijekom isparavanja otapala iz gela spoja **6** u acetonitrilu (prikazani su spektri snimljeni svake dvije minute u periodu od 1. do 41. minute)



Slika 27. ATR spektri tijekom isparavanja otapala iz gela spoja **6** u vodi (prikazani su spektri u 1., 20., 40., 60., 80., 100., 110., 112., 114., 116., 118., 120., 140. i 160. minuti)



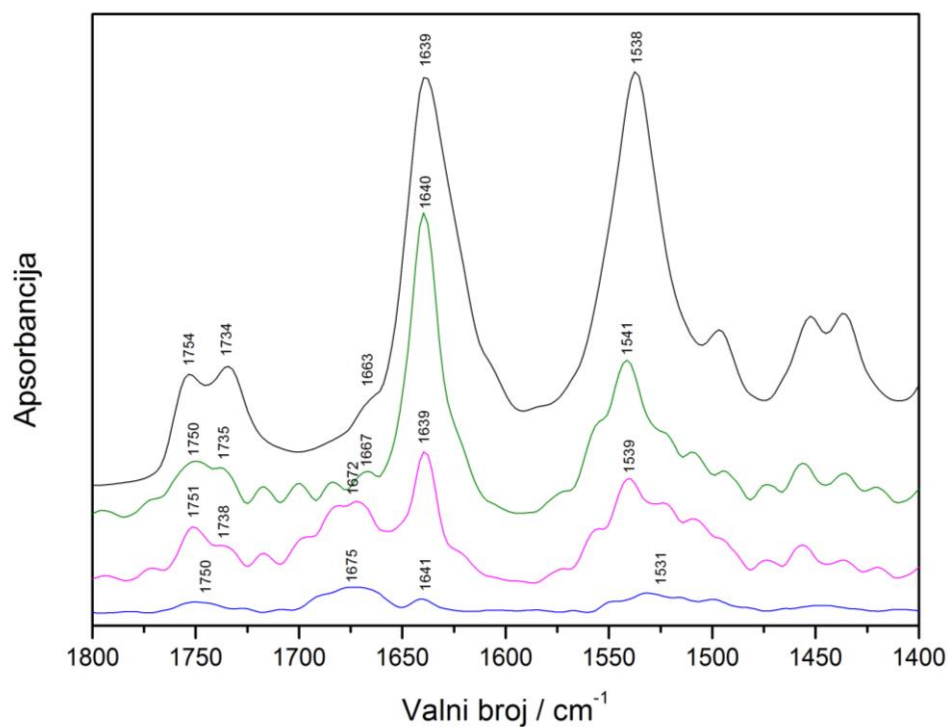
Slika 28. ATR spektri tijekom isparavanja otapala iz gela spoja **6** u teškoj vodi (prikazani su spektri u 1., 20., 40., 60., 80., 100., 120., 140., 160., 166., 170., 180., 200. i 220. minuti)

S obzirom na nisku koncentraciju uzoraka (5×10^{-3} – $1,4 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³), u IR spektrima gelova, kserogelova i otopina dominirale su vibracijske vrpce otapala te je svim snimljenim spektrima značajno doprinio šum. Štoviše, IR spektre vodenih otopina nije bilo moguće snimiti, odnosno snimljeni spektri otopina tripeptida **6** u vodi i teškoj vodi odgovarali su spektrima otapala. Spektri kserogelova, pripremljeni sušenjem gelova na zraku, većinom su nalikovali spektru čvrstog uzorka.

Ako se uspoređi položaj vrpce istezanja veze C=O iz esterske, amidne i acetilne skupine u čvrstom uzorku, kserogelu, gelu i otopini spoja **6** u acetonitrilu (slika 29, tablica 5), uočava se pomak vrpce prema većim valnim brojevima, koji ukazuje na slabljenje vodikovih veza u otopini u odnosu na čvrsto stanje. Naime, veza C=O karbonilne skupine koja ne sudjeluje u vodikovoj vezi je jača, pa je i energija vibracije istezanja veća. U skladu s time, položaj amid II vrpce, kojoj najvećim dijelom doprinosi deformacija skupine NH, pomiče se prema manjem valnom broju, s obzirom na manju energiju svijanja skupine koja ne sudjeluje u vodikovoj vezi, koja inače otežava deformacijsku vibraciju.

Pri usporedbi IR spektara gelova i kserogelova spoja **6** u vodi i teškoj vodi uočava se razlika u položajima amidnih vrpce (slike 30 i 31, tablice 6 i 7). Uslijed izmjene vodikovog atoma iz NH skupina s deuterijem, mijenja se masa atoma s jedne strane veze, pri čemu se vrpce vibracijskih modova amidne skupine u teškoj vodi javljaju pri nižim valnim brojevima. Zamjena vodikovih atoma deuterijem može utjecati na jačinu i duljinu vodikovih veza, što može rezultirati različitom sekundarnom strukturom proteina u vodi i teškoj vodi.

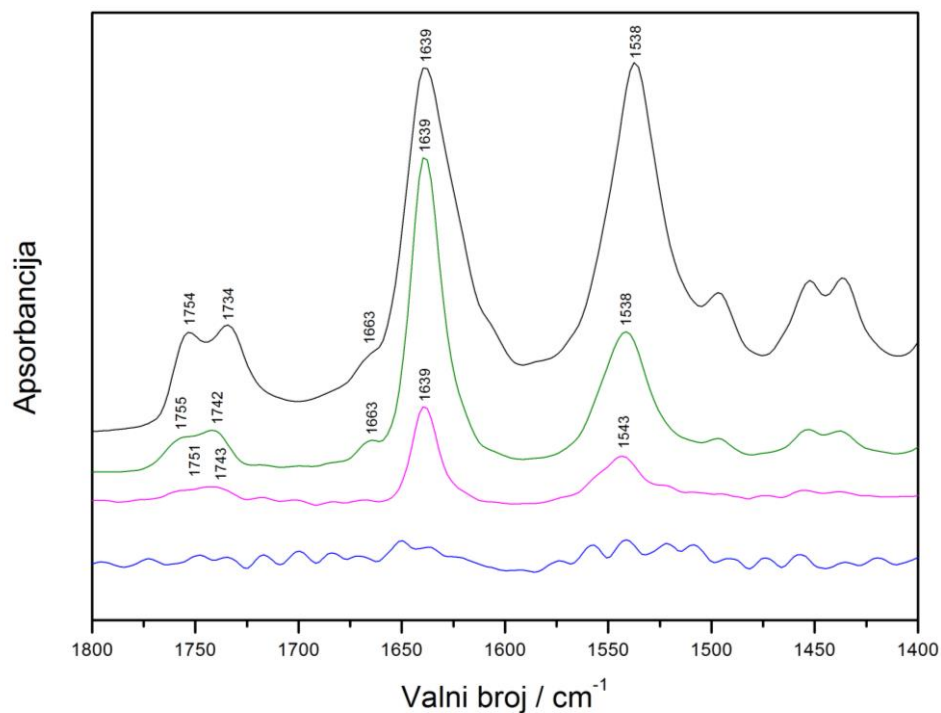
Vrpca amid I u spektrima gelova i kserogelova spoja **6** u svim istraživanim otapalima nalazi se u području između 1642 cm^{-1} i 1624 cm^{-1} . Ovaj položaj vrpce amid I u IR spektrima vodenih gelova tripeptida **6** upućuje na sekundarnu strukturu β -nabrane ploča.⁴⁸ S obzirom da nije uočena vrpca pri približno 1695 cm^{-1} , može se pretpostaviti da tripeptid **6** formira paralelne β -ploče u vodi i teškoj vodi.



Slika 29. ATR spektri čvrstog uzorka (crno), kserogela (zeleno), gela (ružičasto) i otopine (plavo) spoja **6** u acetonitrilu

Tablica 5. Asignacija vrpci u ATR spektrima čvrstog uzorka, kserogela, gela i otopine spoja **6** u acetonitrilu u području 1800–1400 cm^{-1}

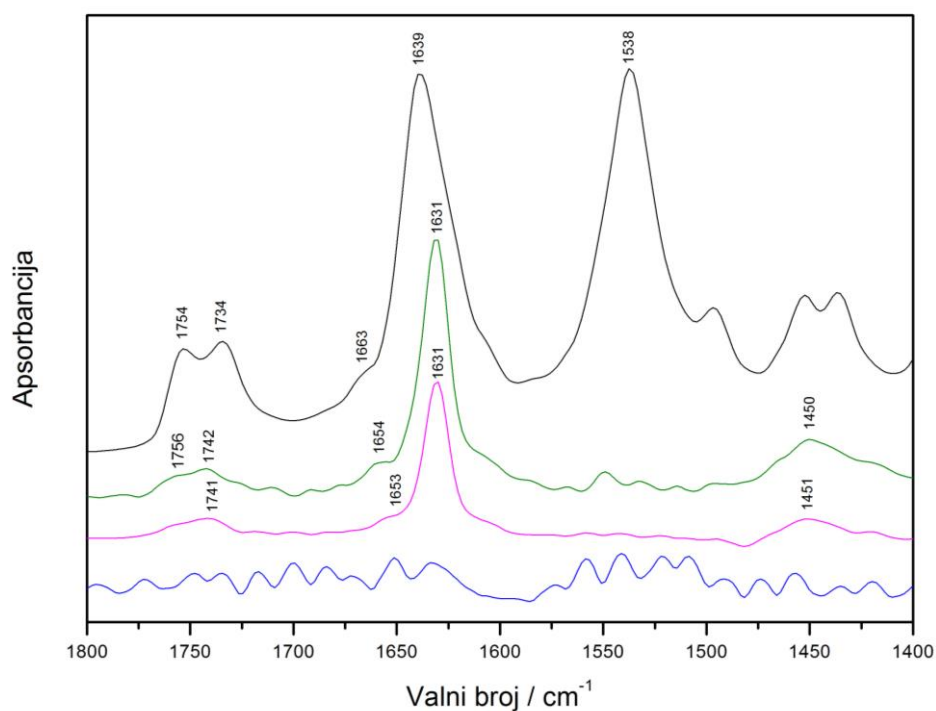
Valni broj / cm^{-1}				Vibracija
Čvrsti uzorak	Kserogel	Gel	Otopina	
1754	1750	1751	1750	ν C=O (–COOCH ₃)
1734	1735	1738	1750	ν C=O (–COOCH ₃)
1663	1667	1672	1675	ν C=O (CH ₃ CONH–)
1639	1640	1639	1641	ν C=O (–CONH–) amid I
1538	1541	1539	1531	δ NH + ν N–C=O(–CONH–) amid II



Slika 30. ATR spektri čvrstog uzorka (crno), kserogela (zeleno), gela (ružičasto) i otopine (plavo) spoja **6** u vodi

Tablica 6. Asignacija vrpca u ATR spektrima čvrstog uzorka, kserogela i gela spoja **6** u vodi u području 1800–1400 cm^{-1}

Valni broj / cm^{-1}			Vibracija
Čvrsti uzorak	Kserogel	Gel	
1754	1755	1751	ν C=O (–COOCH ₃)
1734	1742	1743	ν C=O (–COOCH ₃)
1663	1663		ν C=O (CH ₃ CONH–)
1639	1639	1639	ν C=O (–CONH–) amid I
1538	1538	1543	δ NH + ν N–C=O(–CONH–) amid II



Slika 31. ATR spektri čvrstog uzorka (crno), kserogela (zeleno), gela (ružičasto) i otopine (plavo) spoja **6** u teškoj vodi

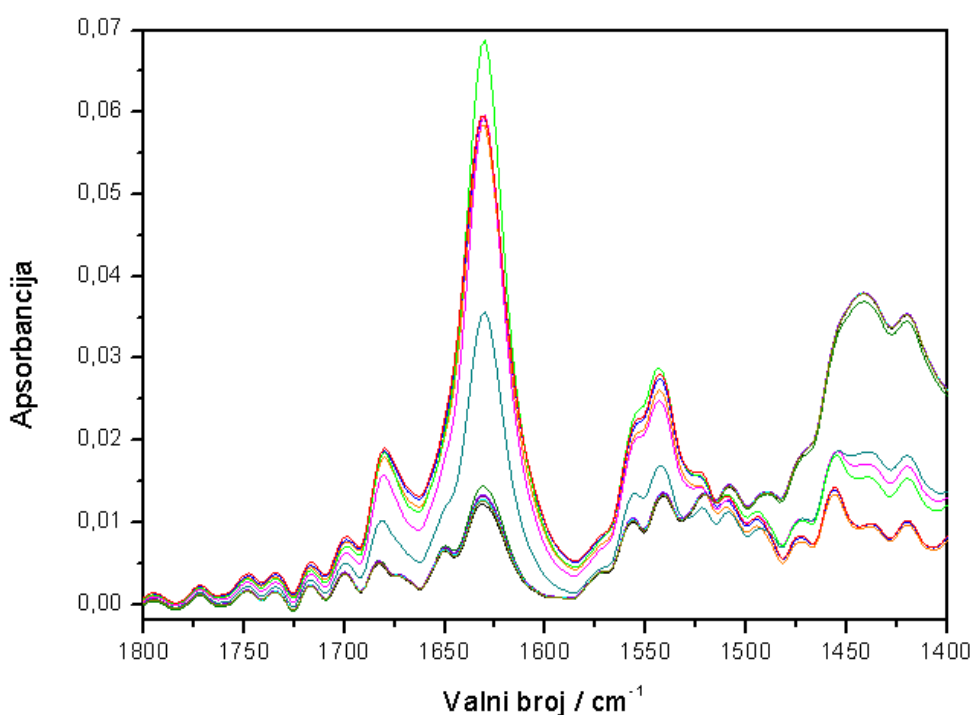
Tablica 7. Asignacija vrpci u ATR spektrima čvrstog uzorka, kserogela i gela spoja **6** u teškoj vodi u području 1800–1400 cm^{-1}

Valni broj / cm^{-1}			Vibracija
Čvrsti uzorak	Kserogel	Gel	
1754	1756		ν C=O (–COOCH ₃)
1734	1742	1741	ν C=O (–COOCH ₃)
1663	1654	1653	ν C=O (CH ₃ CONH–)
1639	1631	1631	ν C=O (–CONH–) amid I
1538	1450	1451	δ NH + ν N–C=O(–CONH–) amid II

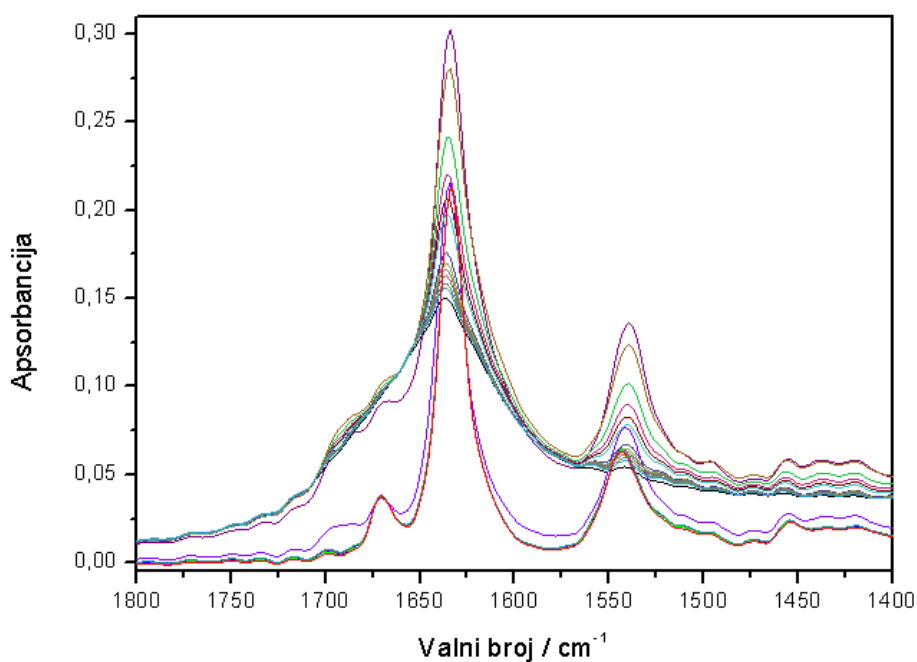
4.4.3. ATR spektri otopina i gelskih struktura tripeptida **7** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi

Kao i za tripepid **6**, snimljeni su ATR spektri gelova, kserogelova i otopina tripeptida **7** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi. Kserogelovi su pripremljeni na isti način, sušenjem uzorka na zraku na refleksijskom elementu ATR nosača uslijed isparavanja otapala. IR spektri su snimani dok god spektar nastale strukture više nije ukazivao na prisutnost otapala.

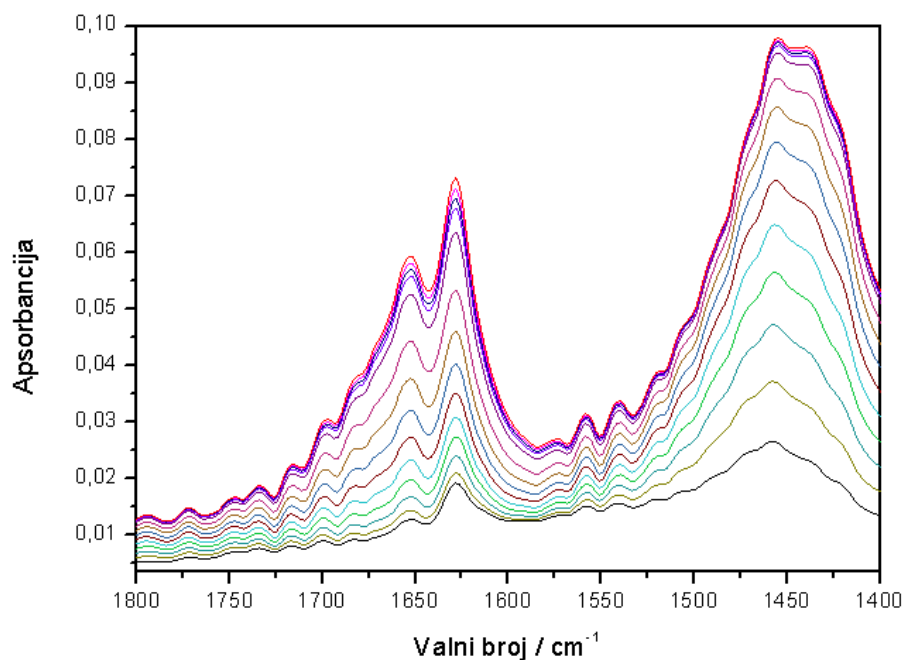
U vremenski ovisnim spektrima gelova spoja **7** uočava se nestajanje vrpce koje potječu od otapala, što ukazuje na isparavanje otapala tijekom vremena. U spektrima gela u kojem je otapalo bilo acetonitril, tijekom vremena se smanjuje intenzitet vrpce deformacija metilne skupine u području od 1470 cm^{-1} do 1370 cm^{-1} te vrpce acetonitrila potpuno izostaju nakon 41. minute snimanja (slika 32). U IR spektrima gela u vodi postepeno nestaju vrpce deformacije molekule vode pri približno 1640 cm^{-1} te se spektar strukture bez vode opaža nakon 173. minute (slika 33). U spektrima gelova u teškoj vodi nisu uočene promjene nakon 227. minute (slika 34).



Slika 32. ATR spektri tijekom isparavanja otapala iz gela spoja **7** u acetonitrilu (prikazani su spektri snimljeni svake dvije minute u periodu od 1. do 41. minute)



Slika 33. ATR spektri tijekom isparavanja otapala iz gela spoja **7** u vodi (prikazani su spektri u 1., 20., 40., 60., 80., 100., 120., 138., 140., 142., 144., 146., 148, 150., 152., 154.,156., 158., 160., 180. i 200. minuti)



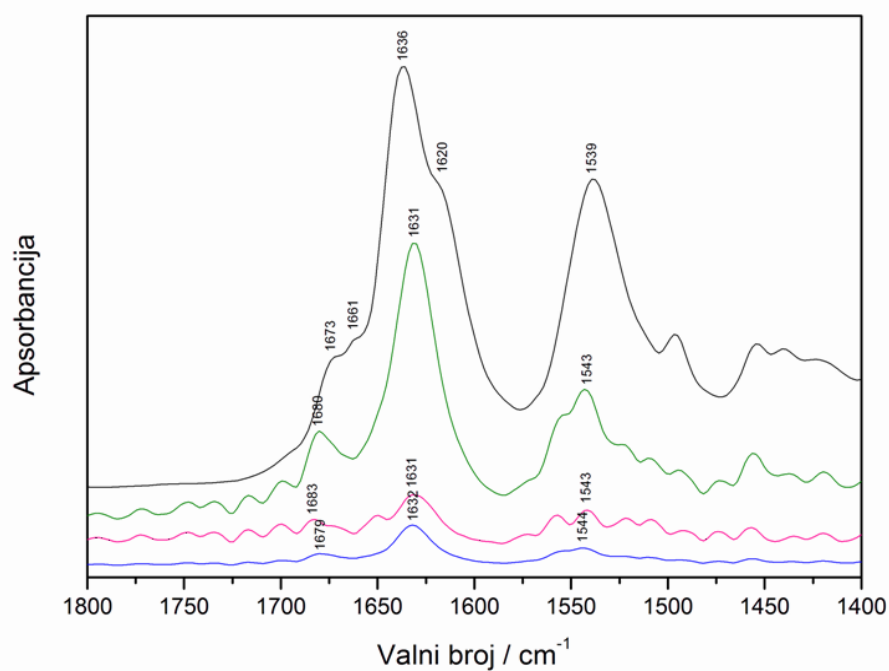
Slika 34. ATR spektri tijekom isparavanja otapala iz gela spoja **7** u teškoj vodi (prikazani su spektri u 20., 40., 60., 80., 100., 120., 140., 160., 180., 200., 206., 208., 210. i 218. minuti)

Usljed niske koncentracije uzoraka ($7,2 \times 10^{-3}$ – 5×10^{-2} mol dm⁻³) u IR spektrima gelova, kserogelova i otopina tripeptida **7** prevladavale su vibracijske vrpce otapala i svim je snimljenim spektrima značajno doprinosa šum. IR spektri vodenih otopina tripeptida **7** odgovarali su spektrima otapala, odnosno vodi i teškoj vodi.

Dok se u IR spektru čvrstog uzorka spoja **7** mogu jasno razaznati vrpce amid I i amid II koje potječu od sekundarne amidne skupine (peptidne skupine) i one koje potječu od primarne amidne skupine na kraju peptidnog lanca (slika 25), u spektrima kserogela, gela i otopine u acetonitrilu uočavaju se vrpce pri približno 1631 i 1543 cm⁻¹, koje se mogu pripisati peptidnoj skupini, te vrpca pri približno 1680 cm⁻¹, koja najvjerojatnije odgovara istezanju veze C=O iz krajnje amidne skupine (slika 35, tablica 8). S obzirom da nisu dostupni literaturni podaci o istraživanju sekundarne strukture proteina u acetonitrilu IR spektroskopijom, nije moguće utvrditi ukazuje li vrpca pri većem valnom broju na antiparalelnu orijentaciju peptida u β-nabranim pločama.

U IR spektrima kserogela i gela spoja **7** u vodi vrpce pri 1633 cm⁻¹ i 1636 cm⁻¹ te 1544 cm⁻¹ i 1540 cm⁻¹ pripisane su vrpce amid I, odnosno amid II peptidne skupine (slika 36, tablica 9). Položaj vrpce amid I u spektrima obje strukture upućuje na prisutnost β-nabranih ploča.⁴⁹ Međutim, za razliku od spektra kserogela u kojem je jasno definirana vrpca pri 1670 cm⁻¹ pripisana vrpce amid I krajnje amidne skupine, u odgovarajućem spektralnom području gela opažena je široka vrpca s dva ramena. Rame pri 1688 cm⁻¹ najvjerojatnije odgovara vrpce amid I primarne amidne skupine, dok rame pri 1696 cm⁻¹ može potjecati od vibracija peptidne skupine i upućivati na antiparalelne β-ploče.⁶

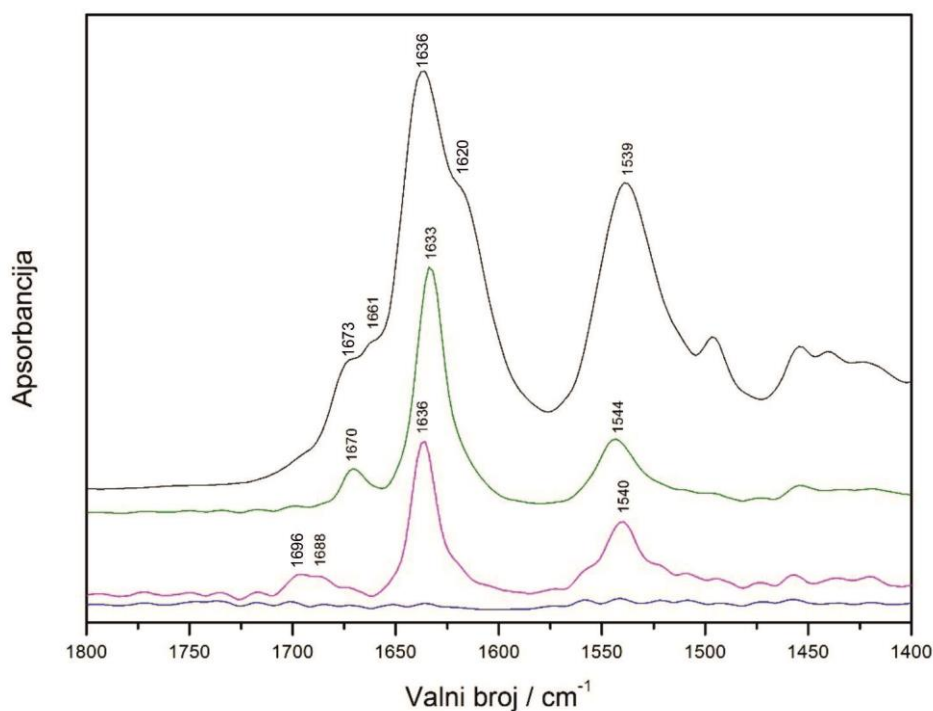
Usljed zamjene vodika deuterijem u amidnim skupinama, vrpce amid I i amid II u spektrima kserogela i gela spoja **7** u teškoj vodi nalaze se pri nižim valnim brojevima od odgovarajućih vrpce gelskih struktura u vodi (slika 37, tablica 10). Položaj vrpce amid I pri 1627 cm⁻¹ i 1628 cm⁻¹ upućuje na sekundarnu strukturu β-nabranih ploča.⁴⁸ Nisu uočene nove vrpce niti cijepanje vrpce pri višim valnim brojevima koje bi ukazalo na postojanje antiparalelnih β-ploča.



Slika 35. ATR spektri čvrstog uzorka (crno), kserogela (zeleno), gela (ružičasto) i otopine (plavo) spoja 7 u acetonitrilu

Tablica 8. Asignacija vrpce u ATR spektrima čvrstog uzorka, kserogela, gela i otopine spoja 7 u acetonitrilu u području 1800–1400 cm^{-1}

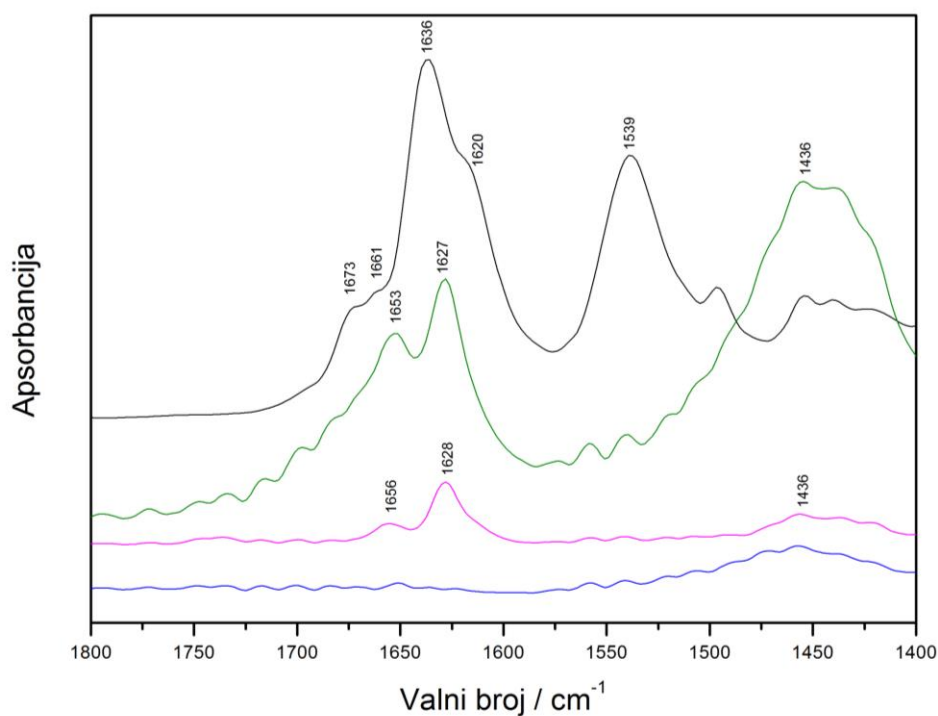
Valni broj / cm^{-1}				Vibracija
Čvrsti uzorak	Kserogel	Gel	Otopina	
1673	1680	1683	1679	ν C=O ($-\text{CONH}_2$) amid I
1661				ν C=O ($\text{CH}_3\text{CONH}-$)
1636	1631	1631	1632	ν C=O ($-\text{CONH}-$) amid I
1620				δ NH + ν N-C=O ($-\text{CONH}_2$) amid II
1539	1543	1543	1544	δ NH + ν N-C=O ($-\text{CONH}-$) amid II



Slika 36. ATR spektar čvrstog uzorka (crno), kserogela (zeleno), gela (ružičasto) i otopine (plavo) spoja **7** u vodi

Tablica 9. Asignacija vrpci u ATR spektrima čvrstog uzorka, kserogela i gela spoja **7** u vodi u području 1800–1400 cm^{-1}

Valni broj / cm^{-1}			Vibracija
Čvrsti uzorak	Kserogel	Gel	
1673	1670	1696	ν C=O (–CONH ₂) amid I
1661		1688	ν C=O (CH ₃ CONH–)
1636	1633	1636	ν C=O (–CONH–) amid I
1620			δ NH + ν N–C=O (–CONH ₂) amid II
1539	1544	1540	δ NH + ν N–C=O (–CONH–) amid II



Slika 37. ATR spektri čvrstog uzorka (crno), kserogela (zeleno), gela (ružičasto) i otopine (plavo) spoja **7** u teškoj vodi

Tablica 10. Asignacija vrpci u ATR spektrima čvrstog uzorka, kserogela i gela spoja **7** u teškoj vodi u području 1800–1400 cm^{-1}

Valni broj / cm^{-1}			Vibracija
Čvrsti uzorak	Kserogel	Gel	
1673	1653	1656	ν C=O (–CONH ₂) amid I
1661			ν C=O (CH ₃ CONH–)
1636	1627	1628	ν C=O (–CONH–) amid I
1620			δ NH + ν N–C=O (–CONH ₂) amid II
1539	1436	1456	δ NH + ν N–C=O (–CONH–) amid II

§ 5. ZAKLJUČAK

Sintezom koja je obuhvatila sedam stupnjeva pripravljena su dva tripeptida aminokiselinskog slijeda L-fenilalanin-L-fenilalanin-L-alanin (L-Phe-L-Phe-L-Ala), spojevi **6** i **7**. Oba tripeptida su u svojoj strukturi na *N*-kraju peptida sadržavala acetilnu skupinu, a razlikovala su se prema skupini na *C*-kraju peptida. Na *C*-kraju tripeptida **6** nalazila se metilna esterska skupina, a tripeptida **7** amidna skupina. Produkti svih reakcija tijekom sinteze karakterizirani su spektroskopijom ^1H NMR i odgovaraju spektrima ranije opisanim u literaturi.

Istražena su gelirajuća svojstva tripeptida **6** i **7** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi. Oba tripeptida učinkovitije geliraju vodu od acetonitrila, što se, osim interakcijama između tripeptida, može pripisati i vodikovim vezama s molekulama otapala. Iako podjednako geliraju tešku vodu (D_2O), veća sposobnost geliranja sva tri otapala uočena je za tripeptid **7**, najvjerojatnije zahvaljujući amidnoj skupini na kraju tripeptidnog lanca.

Morfologija gelskih struktura tripeptida **6** i **7** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi istražena je transmisivskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Gelske mreže oba spoja sastoje se od isprepletenih niti ili traka nanometarskih dimenzija.

Tehnikom prigušene totalne refleksije (ATR) snimljeni su IR spektri čvrstih uzoraka tripeptida **6** i **7** te gelova, kserogelova i otopina pripremljenih u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi. Spektri čvrstih uzoraka detaljno su analizirani i asignirani, dok su u spektrima otopina, uslijed niskih koncentracija tripeptida, dominirale vrpce otapala te su spektri opaženi samo za otopine pripravljene u acetonitrilu.

Na temelju IR spektara gelova i kserogelova, pripremljenih sušenjem gelova na zraku, istražena je sekundarna struktura gelskih mreža tripeptida **6** i **7** u acetonitrilu, vodi i teškoj vodi. Položaj vrpce amid I ($\sim 1630\text{ cm}^{-1}$) u IR spektrima gelova i kserogelova oba tripeptida u sva tri istraživana otapala upućuje na strukturu β -nabrane ploče. Vrpca amid I pri višim valnim brojevima ($\sim 1695\text{ cm}^{-1}$), koja ukazuje na antiparalelnu orijentaciju tripeptida u β -pločama, uočena je samo u spektru gela tripeptida **7** u vodi. Može se pretpostaviti da tripeptid **7** u vodi formira paralelne i antiparalelne β -nabrane ploče.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – alanin

A β – amiloid- β protein

Ac – acetilna skupina

Boc – *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina

d – dublet u NMR spektroskopiji

DCC – *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

dd – dublet dubleta u NMR spektroskopiji

DMSO – dimetilsulfoksid

dt – dublet tripleta u NMR spektroskopiji

E – glutaminska kiselina

F – fenilalanin

K – lizin

L – leucin

NMR – eng. *NuclearMagneticResonance* (nuklearna magnetska rezonancija)

pWk – kalijeva sol fosfowolframske kiseline

q – kvartet u NMR spektroskopiji

s – singlet u NMR spektroskopiji

t – triplet u NMR spektroskopiji

V – valin

δ – oznaka za kemijski pomak u NMR spektroskopiji

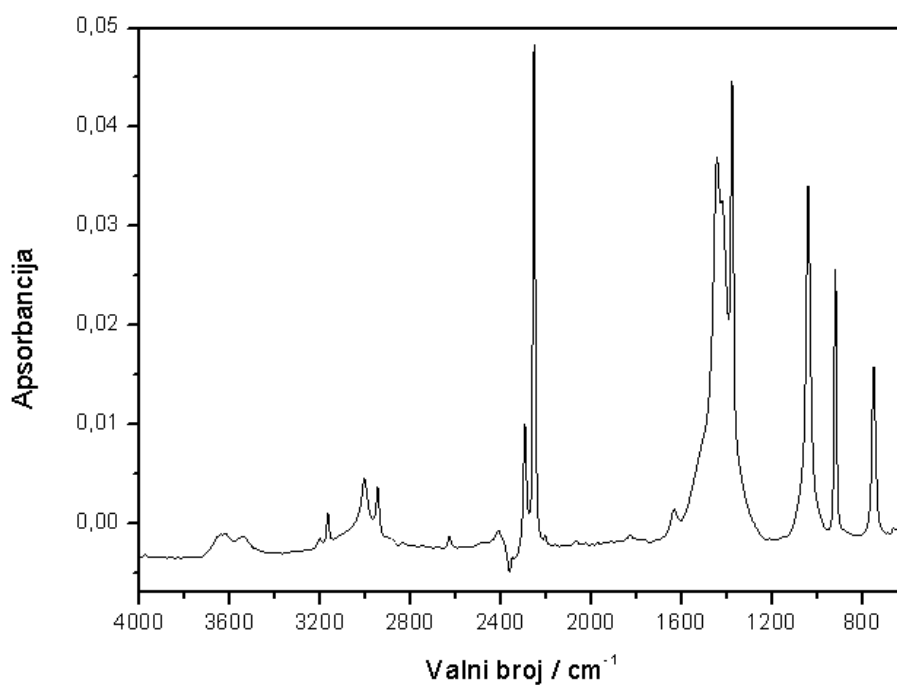
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. C. Paul, P. H. Axelsen, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 5754–5755.
2. C. Liang, R. Ni, J. E. Smith, W. S. Childers, A. K. Metha, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 15146–15149.
3. G. G. Glenner, C. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122** (1984) 1131–1135.
4. A. J. Baldwin i dr., *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 14160–14163.
5. M. Sunde i dr., *J. Mol. Biol.* **273** (1997) 729–739.
6. Z. Szabo, K. Jost, K. Soos, M. Zarandi, J. T. Kiss, B. Penke, *J. Mol. Struct.* **480** (1999) 481–487.
7. L. Tyenber, W. Hosia, N. Bark, J. Thyberg, J. Johansson, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 43243–43246.
8. E. Gazit, *FEBS J.* **272** (2005) 5971–5978.
9. H. Fabian, W. Mäntele, *Infrared Spectroscopy of Proteins*, u J. M. Chalmers, P. R. Griffiths (ur.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Vol. 5, John Wiley & Sons Ltd, New York, 2002.
10. N. M. Sangeetha, U. Maitra, *Chem. Soc. Rev.* **34** (2005) 821–836.
11. M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, *Biotechnol. Bioeng.* **103** (2009) 655–663.
12. A. Noro, M. Hayashi, Y. Matsushita, *Soft Matter* **8** (2012) 6416–6429.
13. T. Pospišil, *Sinteza, karakterizacija i samoudruživanje malih peptidnih gelatora temeljenih na proteinu amiloid- β* , Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2017.
14. <https://www.brighthub.com/science/genetics/articles/21915.aspx> (datum pristupa 20. veljače 2018.)
15. Y. Huang, Z. Qiu, Y. Xu, J. Shi, H. Lin, Y. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **9** (2011) 2149–2155.
16. C. Mendes, E. T. Baran, R. L. Reis, H. S. Azevedo, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **5** (2013) 582–612.
17. <https://biologydictionary.net/peptide-bond/> (datum pristupa 20. veljače 2018.)

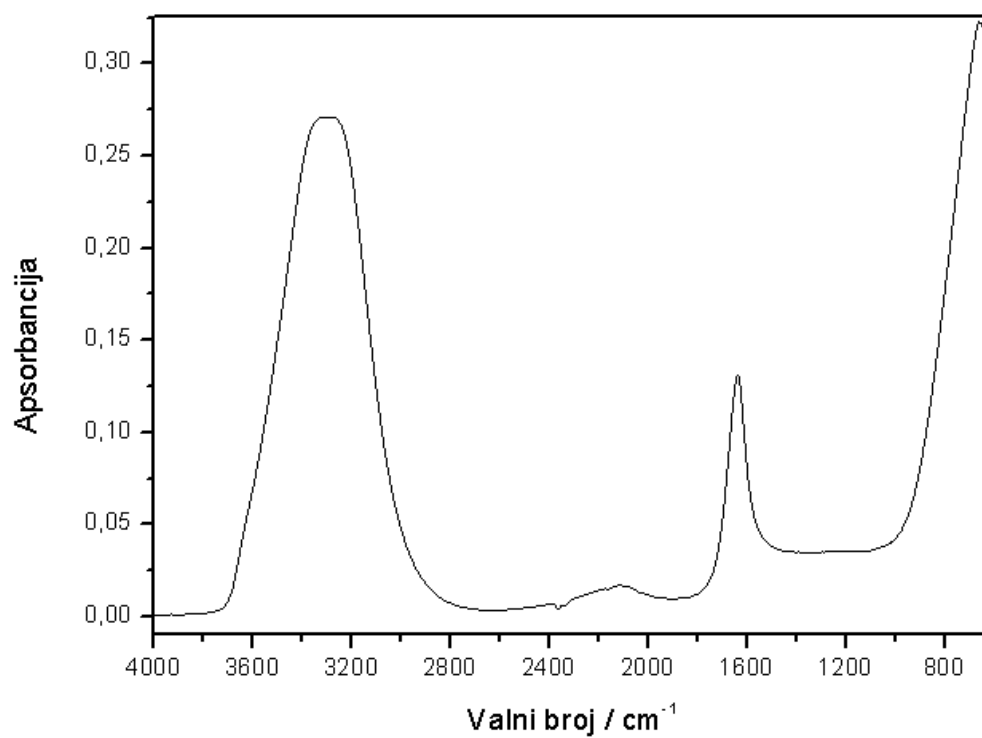
18. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 27–37.
19. M. Vendruscolo, T. P. J. Knowles, C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (2014) 384–396.
20. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard, C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **247** (1995) 536–540.
21. G. G. Glenner, C. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122** (1984) 1131–1135.
22. M. M. Pallitto, J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **38** (1999) 3570–3578.
23. J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, A. J. Grodzinsky, *PNAS.* **99** (2002) 9996–10001.
24. X. Hu, S. L. Crick, G. Bu, C. Frieden, R. V. Pappu, J. Lee, *PNAS.* **106** (2009) 20324–20329.
25. E. K. Johnson, D. J. Adams, P. J. Cameron, *J. Mat. Chem.* **21** (2011) 2024–2027.
26. A. W. P. Fitzpatrick, G. T. Debelouchina, M. J. Bayro, D. K. Clare, M. A. Caporini, *PNAS.* **110** (2013) 5468–5473.
27. A. J. Baldwin, T. P. J. Knowles, G. G. Tartaglia, A.W. Fitzpatrick, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 14160–14163.
28. E. Cerf, R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, L. Breydo, *Biochem. J.* **421** (2009) 415–423.
29. M. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, *Nature* **349** (1991) 704–706.
30. S. Kiyonaka, K. Sada, I. Yoshimura, S. Shinkai, N. Kato, I. Hamachi, *Nature Materials* **3** (2004) 58–64.
31. J. Nanda, B. Adhikari, S. Basak, A. Banerjee, *J. Phys. Chem. B.* **116** (2012) 12235–12244.
32. T. Pospišil, L. Ferhatović Hamzić, L. Brkić Ahmed, M. Lovrić, S. Gajović, L. Frkanec, *Biomater. Sci.* **4** (2016) 1412–1416.
33. M.Knežević, *Sinteza i karakterizacija supramolekulskih hidrogelova za prijenos i kontrolirano otpuštanje lijekova*, Diplomski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2017.
34. B. Adhikari, C. Singh, A. Shah, A. J. Lough, H. B. Kraatz, *Chem. Eur. J.* **21** (2015) 11560–11572.

35. I. Cherny, E. Gazit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 4062–4069.
36. E. Gazit, *FASEB.* **16** (2002) 77–83.
37. X. Yan, P. Zhua, J. Li, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 1877–1890.
38. V. Singh, R. K. Rai, A. Arora, N. Sinha, A. K. Thakur, *Sci. Rep.* **4** (2014) 1–8.
39. M. Suzuki, Y. Nakajima, M. Yumoto, M. Kimura, H. Shirai, K. Hanabusa, *Langmuir* **21** (2003) 8622–8624.
40. N. Javid, S. Roy, M. Zelzer, Z. Yang, J. Sefcik, R. V. Ulijn, *Biomacromolecules* **14** (2013) 4368–4376.
41. F. Dousseau, M. Pezolet, *Biochemistry* **37** (1990) 8771–8779.
42. H. Giinzler, H. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006, str. 13–14.
43. N. Biliškov, *Kem. Ind.* **59** (2010) 11–18.
44. M. L. Larramendy, S. Soloneski, *Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications*, InTech, 2012, poglavlje 8.
45. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm> (datum pristupa 12. ožujak 2018.)
46. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech.htm (datum pristupa 12. ožujak 2018.)
47. <https://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/whatis.html> (datum pristupa 20. ožujka 2018.)
48. J. Kong, S. Yu, *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* **39** (2007) 549–559.
49. H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, *Nature protocols* **10** (2015) 382–396.
50. B. Siddique, J. Duhamel, *Langmuir* **27** (2011) 6639–6650.

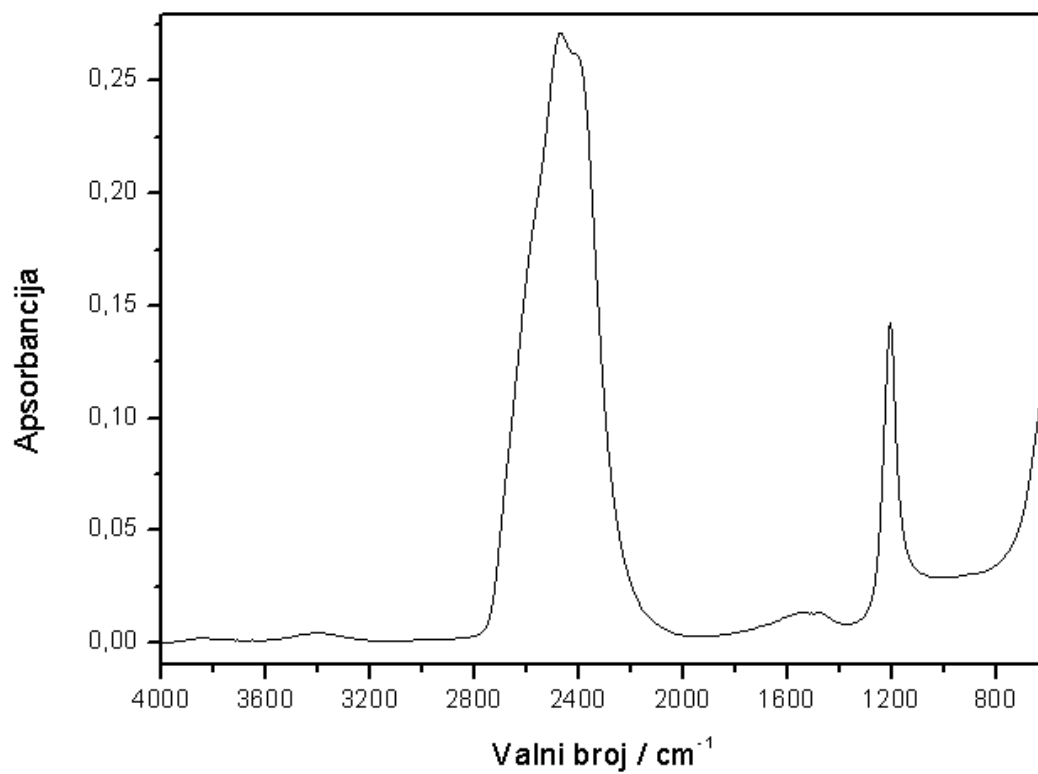
§ 8. DODATAK



Slika D1. ATR spektar acetonitrila



Slika D2. ATR spektar vode



Slika D3. ATR spektar teške vode

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivana Paradžik

Datum rođenja: 07.06.1992.

Mjesto rođenja: Đakovo

Obrazovanje

1999.–2007. Osnovna škola Josipa Kozarca, Semeljci

2007.–2011. Srednja škola Opća Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Đakovo

2011.–2014. Preddiplomski studij Odjel za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2014.–2018. Diplomski studij Analitičke kemije i biokemije, Prirodoslovni-matematički fakultet u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2011. Nagrada pročelnika za najboljeg studenta godine

2013. Nagrada LC Osijek za najboljeg studenta na Odjelu za kemiju