Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lucija Otmačić

KOMPLEKSIRANJE ANIONA METILNIM ESTEROM PENTAFENILALANINA U ACETONITRILU

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Gordana Horvata i komentorstvom Matije Modrušana, mag. chem. uz potporu Hrvatske zaklade za znanost, projekt IP-2019-04-9560 (Macrosol), i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

Sadržaj

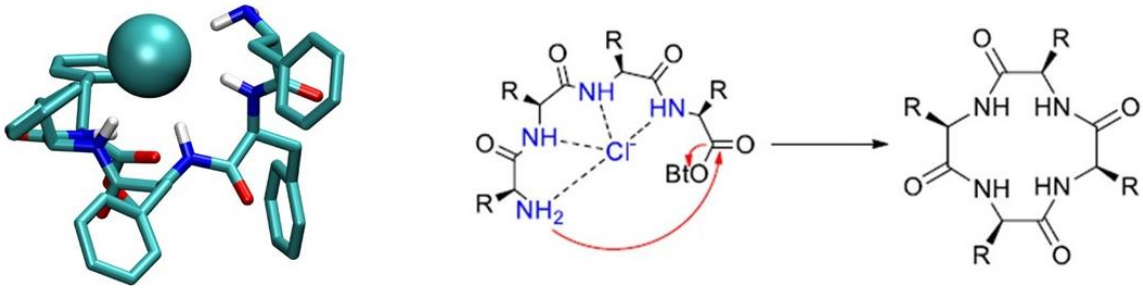
§ 1. UVOD 1
§ 2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Ciklopeptidi 3
2.2. Sinteza ciklopeptida 4
2.3. Fluorescentni senzori 6
2.4. Eksperimentalno određivanje konstanti stabilnosti 7
2.4.1. ^{1}H NMR titracije 8
2.4.2. Fluorimetrijske titracije 11
2.4.3. CD titracije 12
2.4.4. Simulacije molekulske dinamike 14
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 17
3.1. Materijali 17
3.2. Priprava otopina 17
3.2.1. ^{1}H NMR titracije 17
3.2.2. Fluorimetrijske titracije 17
3.2.3. CD titracije 17
3.3. NMR titracije 18
3.4. Fluorimetrijske titracije 18
3.5. CD titracije 18
3.6. Molekulska dinamika 19
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 20
4.1. Kompleksiranje peptida L s kloridom 21
4.2. Kompleksiranje peptida L s bromidom 23
4.3. Kompleksiranje peptida L s jodidom 27
4.4. Kompleksiranje peptida L s dihidrogenfosfatom 28
4.5. Kompleksi peptida L s hidrogensulfatom 31
4.6. Kompleksiranje peptida L s tiocijanatom 33
4.7. Kompleksiranje peptida L s nitratom 35
4.8. Usporedba molarnih CD spektara 36
§ 5. ZAKLJUČAK 38
§ 6. LITERATURNI PREGLED 40
§ 7. SAŽETAK XLIV

§ 8. SUMMARY XLV
§ 9. ZAHVALE XLVI
§ 10. ŽIVOTOPIS XLVII

§ 1. UVOD

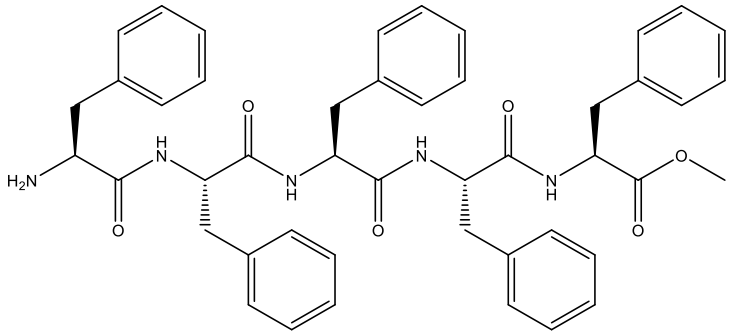
Linearni peptidi sastoje se od aminokiselina povezanih peptidnim vezama u lanac. Prekursori su u sintezi biološki aktivnih ciklopeptida,[1,2] koji se mogu koristiti i kao modeli za razumijevanje kompleksnih bioloških sustava poput protein-protein interakcija[3–5] i općenito gost-domaćin interakcija.[6,7] Ciklički peptidi, za razliku od svojih fleksibilnijih linearnih prekursora, pokazuju povećanu metaboličku stabilnost i bioraspoloživost te povećani afinitet i selektivnost prema receptorima.[8,9]

Najizazovniji korak u sintezi ciklopeptida je ciklizacija.[10] Faktor koji najviše utječe na uspješnost ciklizacije je konformacijska preorganizacija, to jest mogućnost linearnog prekursora da približi svoje reaktivne krajeve. Takva povoljnija konformacija, koja olakšava proces ciklizacije, može se postići korištenjem templata poput metalnih iona.[8] Pristup se temelji na sposobnosti ciklopeptida da se ponašaju kao ionofori vežući metalne ione *in vivo* i u otopini.[11] Osim metalnih iona poznato je da ciklopeptidi vežu i anione koji pospješuju ciklizaciju linearnih peptida.[10] Na slici 1 prikazan je templatni efekt kloridnog aniona u sintezi ciklopeptida. Njegovo vezanje olakšava glava-rep ciklizaciju do koje dolazi povezivanjem N i C–terminalne aminokiseline.



Slika 1. Kloridni anion kao templatni reagens u sintezi ciklopeptida. (Preuzeto i uređeno iz [10])

U ovom radu je kao linearni peptid korišten metilni ester pentafenilalanina (**L**) koji se sastoji od pet fenilalaninskih podjedinica povezanih peptidnom vezom (slika 2). Linearni peptid **L** ima slobodnu N-terminalnu amino skupinu, a C-terminalna karboksilna skupina zaštićena je metilnim esterom.



Slika 2. Struktura linearnog polipeptida **L**.

Cilj rada bio je istražiti afinitet metilnog estera pentafenilalanina (**L)** prema više potencijalnih anionskih templata (Cl^-, Br^-, I^-, HSO_4^-, $H_2PO_4^-$, NO_3^-, SCN^-) u acetonitrilu pomoću spektroskopija ^1H NMR, fluorimetrije i cirkularnog dikroizma (CD) te računalnim simulacijama molekulske dinamike. S obzirom da je fenilalanin jedna od tri fluorescentne aminokiseline, vezanje aniona bilo je moguće pratiti fluorimetrijom, jednom od najosjetljivijih metoda detekcije kemijskih vrsta u otopini. Svim eksperimentalnim metodama određene su konstante stabilnosti anionskih kompleksa receptora **L**. Provedene su i simulacije molekulske dinamike (MD) kojima su dobivene strukturne karakteristike nastalih kompleksa, odnosno detaljan uvid u templatni efekt aniona na glava-rep ciklizaciju. Iz struktura dobivenih tim simulacijama izračunati su CD spektri slobodnog i kompleksiranog receptora **L** koji su uspoređeni s eksperimentalno dobivenim rezultatima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ciklopeptidi

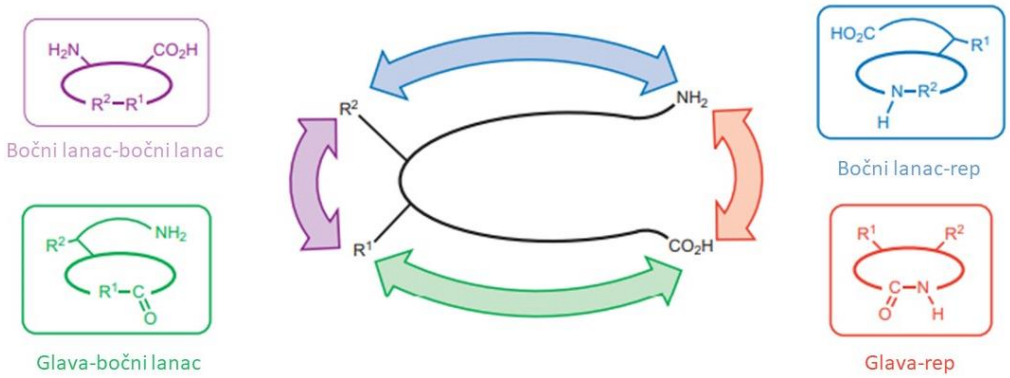
Novija povijest cikličkih peptida započinje otkrićem Gramidicina S 1944. godine, a od tada pa do danas ciklički peptidi se sve više istražuju[12]. Poznato je oko tisuću različitih derivata od kojih se mnogi koriste u terapeutske svrhe.[13] Nadalje, peptidne strukture mogu vrlo specifično reagirati sa svojim biološkim metama što ih čini dobrim izborom prilikom dizajna kontrastnih sredstava.[14]

Linearni peptidi osjetljivi su na proteolitičke enzime, osobito one u bolesnim tkivima koja su bogata tim enzimima. To je potaknulo razvoj alternativnih kemijskih struktura koja imaju mogućnost molekulskog prepoznavanja kao i peptidi, ali im je povećana kemijska stabilnost.[15,16] Takve strukture mogu se dobiti umetanjem neprirodnih aminokiselina u peptidni slijed[17,18] ili ciklizacijom linearnih peptida.

Ciklički peptidi su sveprisutni u prirodnim proizvodima, od kompleksnih makrocikla do malih ciklodipeptida. Mali ciklodipeptidi izrazito su kompaktne i stabilne vrste, koje mogu tvoriti nekovalentne samoorganizirane strukture koje onda mogu poslužiti kao materijali za raznovrsne biotehnološke i biomedicinske svrhe.[19] Ciklički peptidi zbog reducirane konformacijske slobode pokazuju veću otpornost na kemijsku i enzimsku hidrolizu, lakše ulaze u stanice i vežu se za njihove biološke mete većim afinitetom i selektivnošću zbog čega se koriste u terapeutskim i biokemijskim istraživanjima.[19,20] Fluorescentni ciklički peptidi mogu se primijeniti u različitim biološkim eksperimentima, od bojanja živih stanica do *in vivo* detekcije stanica raka.[21] Mnogi znanstvenici koji se bave fluorescentnim cikličkim peptidima istražuju biološke receptore koji imaju povećanu ekspresiju u tumorskim tkivima.[22] Fluorescentni ciklički peptidi mogu se koristiti i za bojanje stanica na temelju različitih svojstava bolesnih i zdravih stanica[23] i mogu se usmjeravati u specifične kompartimente stanice.[24,25] Također, poznati su i ciklički fluorescentni peptidi kojima je meta liposom.[26]

2.2. Sinteza ciklopeptida

Ovisno o funkcijskoj skupini, peptid se može ciklizirati na četiri različita načina: glava-rep ciklizacijom (od C-kraja do N-kraja), glava-bočni lanac, bočni lanac-rep ili bočni lanac-bočni lanac (slika 3). Bez obzira na vrstu ciklizacije, zadnji korak zatvaranja prstena je najčešće laktamizacija,[27] laktonizacija[28] ili nastajanje disulfidnog mosta.



Slika 3. Glavni načini makrociklizacije peptida.[8]

Najvažniji faktor koji utječe na uspješnost zatvaranja prstena je veličina prstena. Ciklizacija peptida s više od sedam aminokiselina je jednostavna, dok je ciklizacija manjih peptida zahtjevna, a nekad gotovo i nemoguća. Problemi ciklizacije malih peptida prikazani su u radu Schmidta i Langnera[29] gdje su autori pokušali sintetizirati različite cikličke tetra- i pentapeptide koji se pojavljuju u prirodi metodom glava-rep ciklizacije. Sinteza ciklotetrapeptida nije bila uspješna zbog nastanka produkata ciklodimerizacije, trimerizacije i C-terminalne epimerizacije, dok je sinteza ciklopentapeptida donekle bila uspješna. Iskorištenje se može povećati ako mjesto na kojem dolazi do makrociklizacije nije sterički ograničeno N-alkilom, α,α-supstituiranom ili β-razgranatom aminokiselinom (Val ili Ile) ili ako se makrociklizacija odvija između dvije aminokiseline obrnutih stereokemijskih konfiguracija. Nadalje, dodatak strukturnih elemenata u linearne prekursore koji potiču zakretanje može poboljšati efikasnost makrociklizacije. Uspješnost makrociklizacije ovisi o mogućnosti linearnog prekursora da približi svoje reaktivne krajeve prije nego što dođe do zatvaranja prstena. Na taj način se dobiva više ciljanog produkta, a manje nusprodukata intermolekulskih reakcija.[30] Makrociklizacija svih L i D peptida predstavlja izazov zbog molekulske konformacije linearnog prekursora u otopini. Takvi peptidi poprimaju izduženu konformaciju kako bi smanjili napetost strukture[31] uslijed čega dolazi do udaljavanja reaktivnih krajeva. U zadnjih par godina razvijene su različite strategije za usmjeravanje makrociklizacije korištenjem konformacijske preorganizacije[11] koje

se mogu podijeliti na dvije kategorije. U prvoj kategoriji se koriste ‘unutrašnji’ konformacijski elementi, odnosno kovalentne modifikacije peptidnog lanca kako bi se olakšalo spajanje krajeva. Kod druge kategorije je naglasak stavljen na ‘vanjske’ konformacijske elemente korištenjem molekulskih skupina koje nisu kovalentno vezane za peptid. ‘Vanjski’ konformacijski elementi osnova su templatno potpomognute makrociklizacije i aktivno su područje kemijske sinteze.

U slučaju makrociklizacije peptida, zatvaranje prstena biti će favorizirano kada se različiti strukturni elementi linearnog prekursora u prijelaznom stanju međusobno orijentiraju pod povoljnim kutovima u konformaciju smanjene napetosti okosnice linearnog peptida.[32] Kako bi pronašli način kako približiti krajeve linearnog peptida, istraživači su promatrali sekundarne strukture proteina, posebice β-zavoje.[33] Elegantan način za postizanje što kraće udaljenosti između krajeva linearnog peptida jest uvođenje *cis*-amidne veze u sredini peptidnog lanca, odnosno formiranje motiva analognog β-zavoju. Takva veza može se dobiti uvođenjem heterokiralnog diprolina,[34] uvođenjem D-aminokiseline u L-aminokiselinske peptide[35,36] ili *N*-metiliranjem amino kiseline u linearnom peptidu.[37,38,39]

Vanjski konformacijski elementi, odnosno templati, rade na principu mjesno-izolacijskog mehanizma. Polimerne strukture mogu tvoriti reakcijske šupljine veličine jedne molekule linearnog peptida koja se ciklizira nakon ulaska. Na taj način se peptid izolira iz ostatka otopine zbog čega dolazi do značajnog smanjenja vjerojatnosti ciklooligomerizacije.[40] Mnogi makrociklički peptidi u prirodi su produkti ne-ribosomske biosinteze. Ne-ribosomske sintetaze poznate su po tome da privezuju aktivirane linearne intermedijere tioesterskom vezom, na način analogan onom u sintezi u čvrstoj fazi.[41] Walsh i suradnici opisali su metodu u kojoj izolirane tioesteraze potiču makrociklizaciju linearnih peptida imobiliziranih na čvrstoj sintetskoj podlozi.[42]

Još jedna strategija makrociklizacije peptida koja se temelji na ‘vanjskim’ konformacijskim elementima jest ciklizacija pomoću metalnih iona. Inspirirana je cikličkim peptidima koji se pojavljuju u prirodi, poput gramicidina, valinomicina i anatamanida koji su potencijalni ionofori i tvore stabilne komplekse s metalnim ionima *in vivo*. Jedan od prvih primjera preorganizacije peptida pomoću metalnih iona opisan je u radu Beck-a i suradnika.[43] Poznato je i da različiti alkalijski metali također potiču ciklizaciju peptida.[44,45] Ye i koautori su temeljem računalnih istraživanja pomoću molekulske mehanike predložili da alkalijski metalni ioni potiču makrociklizaciju na način da se vežu na karbonilne i amidne skupine na C-kraju

peptida. Dodatnom koordinacijom amidnih atoma kisika duž lanca, ti ioni induciraju snažno zakretanje strukture linearnog peptida koje dovodi u blizinu N- i C-kraj što olakšava ciklizaciju.[44]

Vidović i suradnici[10] pokazali su da se osim metalnih iona, kao templati za ciklizaciju peptida mogu koristiti i anioni. Kao najbolji templatni ion pokazao se kloridni anion, čiji je izvor bila sol tetraetilamonijevog klorida, čime je postignuto najveće iskorištenje u reakcijama ciklizacije. Kada su kao izvor klorida korišteni litijev i natrijev klorid templatni efekt bio je manji, vjerojatno zbog ionskog sparivanja aniona i protuiona. Uočeno je da je za kompleksiranje aniona bio ključan entropijski doprinos Gibbsovoj energiji budući da su sve reakcije kompleksiranja klorida s linearnim peptidima bile blago endotermne. Pretpostavljeno je da je razlog povoljnog entropijskog efekta entropijski povoljna desolvatacija aniona tijekom koordinacije amidnim skupinama okosnice peptida.[10]

2.3. Fluorescentni senzori

Kemijski senzori su uređaji za mjerenje koji imaju sposobnost detekcije specifičnih kemijskih jedinki ili praćenja promjena okoline na način da određeni kemijski događaj prevode u nešto mjerljivo, tzv. *readout*.[46] Metode koje koriste fluorescentne senzore jedne su od najatraktivnijih zbog njihove niske cijene, brzog odgovora, izvrsne osjetljivosti i visoke modularnosti. Fluorescentni senzori koji koriste principe supramolekulske kemije za detekciju, počeli su privlačiti posebnu pažnju zbog jednostavne uporabe i prilagodljivosti. Takozvani "supramolekulski fluorescentni senzori" su sintetski sustavi koji su dizajnirani radi vezanja ciljnih analita nekovalentnim interakcijama (supramolekulskim, odnosno gost-domaćin interakcijama) u svrhu dobivanja primjetne promjene u emisijskom profilu uklopljenog fluorofora. Dizajn supramolekulskih fluorescentnih senzora zahtjeva poznavanje gost-domaćin kemije, odnosno molekulskog prepoznavanja, sintetske kemije i fluorescentnih skupina te njihovih fotofizikalnih svojstava. Tipični supramolekulski fluorescentni senzor ima dizajn receptor-razmaknica-fluorofor. Skupina koja je u mogućnosti emitirati svijetlost nakon ekscitacije naziva se fluorofor ili signalna jedinica, a skupina koja prepoznaje odgovarajući analit naziva se receptor ili vezujuća jedinica. Te dvije skupine povezane su poveznicom kako bi fluorofor mogao davati detektabilne signale prilikom interacije receptora i analita[47–49], a u nekim slučajevima i sam fluorofor može biti receptor[50]. Kako bi se postigle selektivne

interakcije između sintetskog receptora i analita potrebno je poznavati afinitete vezanja i njihovu specifičnost.

Ovisno o promjeni emisijskog profila fluorofora s dodatkom analita, fluorescentni senzori mogu se podijeliti na tri klase: „*turn-on*“, „*turn-off*“ i „*ratiometric*“. Dodatkom analita, intenzitet fluorescencije klase „*turn-on*“ i „*turn-off*“ se povećava ili smanjuje. Smatra se da je vezanje između receptora i analita te način kako taj proces utječe na promjene u intenzitetu emisije ono što određuje performanse danog sustava. Također je važno napomenuti da do „*turn-on*“ i „*turn-off*“ efekata može doći i zbog promjena u kvantnim iskorištenjima i poluvremenima fluorofora u odgovoru na analite. „*Turn-on*“ senzori se preferiraju u odnosu na „*turn-off*“ senzore, zato što potonji mogu dati lažno pozitivne rezultate.

2.4. Eksperimentalno određivanje konstanti stabilnosti

Supramolekulski kompleksi, poput peptid-anion kompleksa, nastaju udruživanjem kemijskih vrsta intermolekulskim nekovalentnim interakcijama. Termodinamički parametri nastajanja supramolekulskih kompleksa, poput standardne konstante ravnoteže, standardne reakcijske Gibbsove energije, reakcijske entalpije i entropije najvažnije su karakteristike stabilnosti supramolekulskih sustava koje su direktno povezane s njihovom praktičnom primjenom.[51]

Afinitet receptora prema molekulama i ionima kvantitativno se izražava pomoću konstante stabilnosti kompleksa. U slučaju ravnoteže nastanka kompleksa stehiometrije 1:1 između liganda **L** i aniona A^- jednadžba se može zapisati na sljedeći način:

$$\mathbf{L}(\text{sln}) + A^-(\text{sln}) \rightleftharpoons \mathbf{L}A^-(\text{sln}) \tag{1}$$

Standardna konstanta ravnoteže definirana je preko aktiviteta svih vrsta koje sudjeluju u reakciji:

$$K^\circ = \Pi\, a_i^{\nu_i} \tag{2}$$

Gdje je a_i aktivitet pojedine vrste, a ν_i stehiometrijski koeficijent te vrste. U slučaju ravnoteže (1) može se pisati:

$$K^\circ = \frac{a(\mathbf{LA}^-)}{a(A^-)a(\mathbf{L})} = \frac{\gamma_{\mathbf{AL}^-}[\mathbf{LA}^-]c^\circ}{\gamma_{A^-}[A^-]\gamma_{\mathbf{L}}[\mathbf{L}]} \tag{3}$$

gdje je γ_i koeficijent aktiviteta pojedine vrste, c° označava standardnu koncentraciju, a uglate zagrade ravnotežnu koncentraciju. U slučaju razrijeđenih otopina može se pretpostaviti da su koeficijenti aktiviteta svih ionskih vrsta približno jednaki te da koeficijenti aktiviteta nenabijenih vrsta približno iznose 1. Tada relacija (3) poprima oblik:

$$K^\circ \approx \frac{[\mathbf{L}\mathrm{A}^-]c^\circ}{[\mathrm{A}^-][\mathbf{L}]} = K_c \cdot c^\circ \tag{4}$$

pri čemu K_c označava koncentracijsku konstantu ravnoteže. Kada se u tu jednadžbu uvrste jednadžbe bilance masa:

$$c_{\mathrm{A}^-} = [\mathrm{A}^-] + [\mathbf{L}\mathrm{A}^-] \tag{5}$$

$$c_{\mathbf{L}} = [\mathbf{L}] + [\mathbf{L}\mathrm{A}^-] \tag{6}$$

gdje su c_{A^-} i $c_{\mathbf{L}}$ analitičke koncentracije vrsta A^- i **L**, dobiva se jednadžba u kojoj koncentracijska konstanta ravnoteže ovisi samo o analitičkim koncentracijama vrsta A^- i **L** i o ravnotežnoj koncentraciji **L**A^-:

$$K_c = \frac{[\mathbf{L}\mathrm{A}^-]}{(c_{\mathrm{A}^-}[+\mathbf{L}\mathrm{A}^-])(c_{\mathbf{L}}-[\mathbf{L}\mathrm{A}^-])} \tag{7}$$

Konstante stabilnosti mogu se odrediti mjerenjem nekog svojstva sustava koje ovisi o koncentraciji iz kojeg se zatim određuju ravnotežne koncentracije sudionika reakcije. ^{1}H NMR titracijama mjeri se kemijski pomak, fluorimetrijskim titracijama intenzitet fluorescencije, a CD titracijama razlika u apsorpciji lijevo i desno cirkularno polariziranog zračenja. Za svaku metodu postoji minimalna količina analita za pouzdanu detekciju koja definira granice pouzdanosti i preciznosti određivanja konstante stabilnosti. NMR spektroskopija pogodna je za određivanje konstanti stabilnosti do reda veličine $\approx 10^4$, a fluorimetrija do reda veličine 10^8.

2.4.1. ^{1}H NMR titracije

NMR spektroskopija koristi se za jezgre koje posjeduju magnetski moment, primjerice ^{1}H, ^{31}P i ^{19}F. Ukoliko se mjeri signal jezgre ^{1}H tada se ta metoda naziva ^{1}H NMR spektroskopija. Proton koji se nalazi u vanjskom magnetskom polju B može se orijentirati na $2I+1$ načina gdje je I

kvantni broj nuklearnog spina koji za proton iznosi ½. Proton se prema tome može orijentirati na 2 načina, u smjeru polja *B* koje je niže energije i suprotno smjeru polja *B* koje je više energije. Razlika u energijama tih dvaju stanja ovisi o vanjskom magnetskom polju. Kada se molekula koja sadrži vodikove atome izloži radiofrekventnom zračenju čija energija odgovara razlici energija između navedenih spinskih stanja jezgre prelaze u stanje više energije. Nakon toga dolazi do relaksacije jezgara u niže energetsko stanje uz emisiju elekromagnetskog zračenja koje predstavlja signal u NMR spektru.

Tijekom ^{1}H NMR titracija, uslijed nastanka kompleksa često dolazi do promjene u kemijskom pomaku protona u vrstama koje tvore kompleks, posebice kod onih protona koji se nalaze blizu skupina koje ostvaruju interakcije. Brzina reakcije nastanka i nestanka kompleksa u ravnoteži povezana je s kemijskom izmjenom. Kemijska izmjena predstavlja mjeru koliko će dugo gost odnosno anion biti u kompleksu s domaćinom, odnosno peptidom, prije nego kompleks disocira. Izmjena može biti spora, srednja i brza.

Kod spore izmjene razlika između kemijskih pomaka protona slobodnog peptida i peptida u kompleksu je puno veća od brzine asocijacije i disocijacije kompleksa u ravnoteži ($\Delta\delta >> k$). Tada će se vidjeti dva signala u spektru, jedan za vrstu **L** na kemijskom pomaku $\delta_{\mathbf{L}}$, jedan za kompleks **L**A$^-$ na kemijskom pomaku $\delta_{\mathbf{L}A^-}$.[52] Omjer njihovih množinskih udjela biti će jednak omjeru površina pripadajućih signala.

$$\mathbf{L} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathbf{L}A^-$$

$$\Delta\delta = \delta_{\mathbf{L}} - \delta_{\mathbf{L}A^-} \quad (8)$$

$$k = k_1 + k_{-1} \quad (9)$$

Ako je brzina asocijacije i disocijacije kompleksa u ravnoteži usporediva s promjenom kemijskog pomaka ($k \approx \Delta\delta$) tada kod takvih reakcija neće biti moguće odrediti konstantu stabilnosti spektroskopijom NMR.

Ako je brzina nastajanja kompleksa i disocijacije u ravnoteži veća od razlike signala slobodnog peptida i peptida u kompleksu ($k >> \Delta\delta$), riječ je o brzoj izmjeni. Tada će molekule tijekom pulsnog slijeda biti u slobodnom stanju kao i u kompleksu što će rezultirati jednim oštrim, visokim maksimumom na prosječnom kemijskom pomaku između ta dva stanja. Opaženi kemijski pomak nekog protona liganda za reakciju vezanja u omjeru 1:1 tada će biti

jednak množinski uteženom prosjeku kemijskih pomaka protona prisutnih na svim oblicima tog liganda u otopini:

$$\delta_{\mathrm{obs}} = x_{\mathbf{L}}\delta_{\mathbf{L}} + x_{\mathbf{LA}^-}\delta_{\mathbf{LA}^-} \tag{10}$$

gdje je δ_{obs} opaženi kemijski pomak, $x_{\mathbf{L}}$ i $x_{\mathbf{LA}^-}$ udjeli vrsta **L** i **L**A$^-$, a $\delta_{\mathbf{L}}$ i $\delta_{\mathbf{LA}^-}$ su kemijski pomaci spektroskopski aktivnih vrsta. Uvrštavanjem jednadžbi bilance masa (5) i (6) u jednadžbu (10) može se izvesti ovisnost opaženog kemijskog pomaka o množinskim koncentracijama aniona A$^-$ i slobodnog liganda **L**:

$$\delta_{\mathrm{obs}} = \delta_{\mathrm{A}-}c_{\mathrm{A}-} - (\delta_{\mathrm{A}-} - \delta_{\mathbf{LA}-})\frac{x_{\mathrm{A}-}+x_{\mathbf{L}}+\frac{1}{K}-\sqrt{(x_{\mathrm{A}-}+x_{\mathrm{L}}+\frac{1}{K})^2-4x_{A-}x_{\mathrm{L}}}}{2} \tag{11}$$

Nelinearnom regresijskom analizom ovisnosti δ_{obs} o c_{A^-} i $c_{\mathbf{L}}$ moguće je odrediti iznose konstanti stabilnosti, kao i kemijske pomake svih spektralno aktivnih vrsta u otopini. Za što točnije i pouzdanije određivanje parametara potrebno je koristiti pomake signala nekoliko jezgara prisutnih u spektru, a podatke u tom slučaju obraditi multivarijatnom analizom spektralnih podataka. Jedan od računskih programa kojim se može provesti takva analiza je HypSpec.[53]

Ako se tijekom titracije promatraju kemijski pomaci više protona, moguće je regresijsku analizu provesti matrično u postupku u kojem se iterativno određuju vrijednosti konstante ravnoteže reakcije i pomaci protona u vrstama **L** i **L**A$^-$:

$$\boldsymbol{J}_{\mathrm{obs}} = \boldsymbol{JX} \tag{12}$$

gdje $\boldsymbol{J}_{\mathrm{obs}}$ označava matricu izmjerenih kemijskih pomaka, a $\boldsymbol{J}$ se odnosi na matricu pomaka protona **L** i **L**A$^-$ za pojedinu vrstu protona unutar retka. U stupcima matrice $\boldsymbol{X}$ nalaze se ravnotežni množinski udjeli A$^-$ i **L**A$^-$ za svako pojedino mjerenje. Optimalna vrijednost konstante stabilnosti određuje se iterativno, pri čemu se u prvom koraku pretpostavi iznos konstante stabilnosti te se pomoću nje određuje matrica ravnotežnih udjela ($\boldsymbol{X}$). Zatim se matrica pomaka množi s desnom pseudoinverzom matrice množinskih udjela (13) čime se dobiva matrica izračunatih vrijednosti kemijskih pomaka $\boldsymbol{J}'_{\mathrm{obs}}$. Iz matrica $\boldsymbol{J}_{\mathrm{obs}}$ i $\boldsymbol{J}'_{\mathrm{obs}}$ se zatim računa suma kvadrata odstupanja *SS* (14). Postupak se ponavlja variranjem početne vrijednosti konstante ravnoteže sve dok suma kvadrata odstupanja ne postigne minimalnu vrijednost.

$$\boldsymbol{J'}_{\text{obs}} = \boldsymbol{J'X} \tag{13}$$

$$SS = \Sigma_i \Sigma_j (\boldsymbol{J}_{\text{obs},ij}' - \boldsymbol{J}_{\text{obs,ij}})^2 \tag{14}$$

2.4.2. Fluorimetrijske titracije

Fluorescencija je pojava emisije zračenja svjetlosti iz tvari koje mogu apsorbirati svjetlost ili neke vrste ionizirajućeg zračenja. Određuje se pomoću spektrofluorimetra mjerenjem intenziteta fluorescencije uzorka u sadržanog u ćeliji točno određene duljine optičkog puta kroz koji se propušta pobudno zračenje određene valne duljine. Pri niskim koncentracijama ispitivane tvari intenzitet fluorescencije F proporcionalan je koncentraciji uzorka prema jednadžbi:

$$F = kI_0\phi\varepsilon_X l[\text{X}] \tag{15}$$

gdje je k konstanta proporcionalnosti koja ovisi o instrumentu, I_0 intenzitet upadnog zračenja, ϕ kvantno iskorištenje fluorescencije (omjer broja molekula koje fluoresciraju i ukupnog broja pobuđenih molekula), ε_x molarni apsorpcijski koeficijent vrste X, a l duljina optičkog puta i [X] ravnotežna koncentracija fluorescentne vrste X. Pri većim koncentracijama dolazi do odstupanja od linearne ovisnosti intenziteta o koncentraciji fluorescentne vrste. U mjerenjima je također potrebno pripaziti da ne dođe do fotoraspada fluorescentno aktivne vrste tijekom titracije.

Fluorimetrija je izvedbom slična spekrofotometriji, no zbog načina rada instrumenta i izravnog mjerenja intenziteta svjetlosti fluorimetrijskim metodama mogu se detektirati puno manje koncentracije kemijskih vrsta u otopini. Posljedica toga je da se fluorimetrijskim titracijama mogu odrediti konstante stabilnosti koje su za jedan do dva, a ponekad i više redova veličine veće nego u slučaju spektrofotometrijskih titracija. Ukoliko se prati intenzitet fluorescencije pri nekoliko valnih duljina provodi se matrična regresijska analiza kao što je opisano u poglavlju 1.2.1.

2.4.3. CD titracije

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) esencijalna je analitička tehnika koja se koristi za analizu kiralnosti optički aktivnih molekula. Cirkularno polarizirano zračenje može apsorbirati optički aktivna molekula koja sadržava i kromofor. CD spektroskopijom mjeri se razlika apsorpcije lijevo i desno polariziranog zračenja u optički aktivnom uzorku. Kiralnost se također može i inducirati kovalentnim vezanjem za kiralni kromofor ili kada se kromofor nalazi u asimetričnom okruženju.[54] CD spektroskopijom mogu se dobiti strukturne informacije o konformacijama proteina. Koristi se i za određivanje sekundarnih struktura proteina na temelju elektronskih prijelaza u dalekom ultraljubičastom (UV) području (~240 do 170 nm) i za proučavanje tercijarne strukture područja oko aromatskih aminokiselina u bliskom UV području (~300 do 260 nm) koja ovisi o okolini, sastavu aminokiselina i intermolekulskim interakcijama. CD spektroskopijom moguće je dobiti informaciju o dinamičnim promjenama u otopini ili okolini poput membrana ili filmova, koja je često komplementarna informaciji dobivenoj drugim biofizikalnim, komputacijskim ili kemijskim metodama poput kristalografije, krio-elektronske mikroskopije, NMR spektroskopije, FTIR spektroskopije i simulacija molekulske dinamike.[55]

Apsorpcija zračenja ovisi o koncentraciji uzorka prema Lambert-Beerovu zakonu:

$$A = \varepsilon l c \tag{16}$$

gdje je A absorbancija, ε molarni apsorpcijski koeficijent, l optički put uzorka, a c koncentracija kromofora. Razlika u apsorpciji lijevo A_L i desno A_D polarizirajućeg zračenja dana je izrazom:

$$\Delta A = A_L - A_D \tag{17}$$

Iz jednadžbe (16) i (17) može se dobiti sljedeća jednadžba:

$$\Delta A = (\varepsilon_L - \varepsilon_D) l c = \Delta \varepsilon l c \tag{18}$$

pri čemu je c koncentracija optički aktivne vrste, l duljina optičkog puta, ε_L molarni apsorpcijski koeficijent lijevo polariziranog zračenja, a ε_D molarni apsorpcijski koeficijent desno

polariziranog zračenja. Iako se mjeri ΔA, CD spektar se prikazuje preko eliptičnosti (θ) čiji je tangens dan izrazom:

$$\tan\theta = \frac{E_\mathrm{L} - E_\mathrm{D}}{E_\mathrm{L} + E_\mathrm{D}} \tag{19}$$

gdje je E_L iznos vektora električnog polja lijevo polariziranog zračenja, a E_D iznos desnog. Ako se uzme u obzir da je iznos cirkularnog dikroizma relativno mali, može se pretpostaviti da je $\tan\theta \approx \theta$, te da je kvadrat vektora E_D i E_L proporcionalan intenzitetu zračenja pri čemu se dobiva sljedeći izraz za eliptičnost:

$$\theta = \Delta A \left(\frac{\ln 10}{4}\right) \mathrm{deg} \tag{20}$$

koja je dana u stupnjevima kuta (deg). Rezultati CD titracija često se prikazuju u jedinicama molarne eliptičnosti $[\theta]$ koja je dana izrazom:

$$[\theta] = 100 \Delta\varepsilon \left(\frac{\ln 10}{4}\right) \mathrm{deg} \tag{21}$$

Molarna apsorptivnost ($\Delta\varepsilon$) predstavlja vrijednost cirkularnog dikroizma normaliziranu na temelju koncentracije i optičkog puta:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r = \frac{\Delta A}{cl} = \frac{\theta}{cl \cdot 3298} \tag{22}$$

gdje je $\varepsilon_\mathrm{l} - \varepsilon_\mathrm{r}$ razlika lijevo i desno polariziranog zračenja koje je apsorbirano pri određenoj valnoj duljini, ΔA je razlika u apsorbanciji, c koncentracija (mol dm^{-3}), a l duljina optičkog puta (cm). Ukoliko se prati apsorpcija zračenja pri nekoliko valnih duljina tada se provodi matrična regresijska analiza, kao što je opisano u poglavlju 1.2.1.

Na temelju poznate geometrije proteina mogu se izračunati CD spektri pomoću dostupnih web servera kao što je DichroCalc[56] koji koristi ab initio kvantno-mehaničke izračune za predikciju CD spektra iz poznatih struktura proteina. Na temelju izračunatog i eksperimentalno dobivenog spektra može se usporediti homologija između proteina, odrediti strukturni efekt učinak vezanja liganda na protein ili pratiti smatanje proteina.[57,58]

2.4.4. Simulacije molekulske dinamike

Molekulska dinamika je računalna metoda koja simulira ponašanje nekog sustava na molekulskoj razini kroz određeni vremenski period. Pomoću molekulske dinamike mogu se proučavati različiti kemijski sustavi kako bi se na temelju njihovih strukturnih značajki i interakcija koje ostvaruju bolje razumjela svojstva sustava.[59,60]

Simulacije molekulske dinamike temelje se na uzastopnom numeričkom rješavanju klasičnih jednadžbi gibanja:

$$m_i \frac{\mathrm{d}^2 \boldsymbol{r}_i}{\mathrm{d}t^2} = \boldsymbol{f}_i \tag{23}$$

Prvo je potrebno je izračunati sile koje djeluju na pojedine atome, što se najčešće određuje iz potencijalne energije sustava prema jednadžbi:

$$\boldsymbol{f}_i = \frac{\partial}{\partial \boldsymbol{r}_i} U(r_1, r_2, r_3, \ldots, r_N) \tag{24}$$

Interakcije između čestica računaju se metodom molekulske mehanike, a parametri za izračun tih interakcija sadržani su u polju sila. Često korišteno polje sila je OPLS-AA[61] kojim se potencijalna energija sustava $U(\mathbf{r}_N)$ računa kao suma veznih i neveznih doprinosa:

$$U(\boldsymbol{r}_N) = \sum_{veze} K_r\,(r_i - r_{eq})^2 + \sum_{kutevi} K_\varphi\,(\theta_i - \theta_{eq})^2 + E_{torzije} + \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1,j\neq i}^{N} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 d_{ij}} + \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1,j\neq i}^{N} 4\varepsilon_{ij}\left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{d_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{d_{ij}}\right)^{6}\right) \tag{25}$$

$$E_{torzije}(\phi) = \sum_i \frac{V_1^i}{2}[1 + \cos(\phi_i + f_i 1)] + \frac{V_2^i}{2}[1 + \cos(2\phi_i + f_i 2)] + \frac{V_3^i}{2}[1 + \cos(3\phi_i + f_i 3)] \tag{26}$$

gdje su indeksi *i* i *j* numeratori, $\boldsymbol{r}$ duljina kovalente veze, $\boldsymbol{\theta}$ vrijednost međuveznog kuta, $\boldsymbol{\phi}$ vrijednost torzijskog kuta, r_{eq} i θ_{eq} ravnotežne vrijednosti duljine kovalentne veze i vrijednosti međuveznog kuta, q parcijalni naboj atoma, $d_{i,j}$ udaljenost i-tog i j-tog atoma, $\boldsymbol{r}_N$ vektor geometrije molekule, ε_0 permitivnost vakuuma. Ostale veličine su odnose se na specifične parametre polja sila.[61]

Za provedbu simulacija molekulske dinamike prvo je potrebno odrediti početne položaje atoma, mase atoma i dodijeliti im početne brzine. Početne brzine se atomima dodjeljuju nasumično prema Maxwell-Boltzmannovoj raspodjeli pri temperaturi T i trenutku t_0:

$$\rho(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_\mathrm{B} T}} e^{\frac{-mv_i^2}{2k_B T}} \tag{27}$$

pri čemu je ρ funkcija raspodjele iznosa brzine, v_i iznos vektora brzine i-te jezgre, m_i masa i-te jezgre, k_B Boltzmannova konstanta, a T je termodinamička temperatura. Pri dodjeljivanju početnih brzina ukupna kinetička energija sustava mora zadovoljavati ekviparticijski teorem:

$$\langle E_\mathrm{k} \rangle = \frac{3}{2} k_\mathrm{B} T \tag{28}$$

Simulacija molekulske dinamike započinje izračunom sila koje djeluju na atome na temelju potencijalne energije koja je određena poljem sila prema jednadžbi (17). Iz tih sila se prema drugom Newtonovom zakonu računaju ubrzanja atoma:

$$\boldsymbol{a}_\mathrm{i}(t) = \frac{f_\mathrm{i}(t)}{m_\mathrm{i}}. \tag{29}$$

Kada su poznati početni položaji i brzine atoma moguće je izračunati položaje i ubrzanja atoma nakon nekog kratkog vremenskog intervala (npr. 1 fs). Novi početni položaji i akceleracije se zapisuju, a nakon toga se ponovno računaju sile. Daljnji postupak je iterativan te obuhvaća numeričko rješavanje Newtonovih jednadžbi gibanja i dobivanje trajektorije nekim od propagacijskih algoritama.

Najčešće korišten algoritam je *velocity Verlet*[62], u sklopu kojeg se položaj i-te jezgre, r_i u trenutku $t+\Delta t$ računa iz položaja, brzine i akceleracije te jezgre u trenutku t:

$$\boldsymbol{r}_i(t + \Delta t) = \boldsymbol{r}_i(t) + \boldsymbol{v}_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}\boldsymbol{a}_i(t)\Delta t^2 \tag{30}$$

Brzina svakog od atoma u sustavu računa se kao:

$$\boldsymbol{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \boldsymbol{v}_i(t) + \frac{1}{2}\boldsymbol{a}_i(t)\Delta t \tag{31}$$

Rezultat provedene simulacije je trajektorija, odnosno koordinate atoma kao funkcija vremena. Analizom trajektorije moguće je odrediti pripadajuće makroskopske fizikalne veličine. Simulacije molekulske dinamike kao rezultat daju i vremenske ovisnosti drugih fizikalnih svojstava sustava, poput potencijalne i kinetičke energije, volumena ili tlaka. Budući da se tijekom simulacije sustavu mijenja energija te da dolazi do promjene kinetičke energije u potencijalnu, mijenja se i temperatura sustava. Kako bi temperatura kroz simulaciju bila približno konstantna potrebno je koristiti termostat, dodatan algoritam za regulaciju kinetičke energije čestica u sustavu. Zbog promjena sila koje djeluju na atome mijenja se tlak, a za njegovu kontrolu koristi se dodatan algoritam, barostat.[63–65]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U eksperimentalnom dijelu korišten je metilni ester pentafenilalanina **(L)** čija je struktura prikazana na slici 2. Za pripremu otopina korištene su soli: tetraetilamonijev klorid (Sigma-Aldrich, ≥98%), tetrabutilamonijev bromid (Sigma-Aldrich, ≥99%), tetrabutilamonijev jodid (Sigma-Aldrich, ≥99%), tetrabutilamonijev hidrogensulfat (Sigma-Aldrich, ≥99%), tetrabutilamonijev dihidrogenfosfat (Sigma-Aldrich, ≥99,0%), tetrabutilamonijev nitrat (Sigma-Aldrich, ≥98%) i tetrabutilamonijev tiocijanat (Sigma-Aldrich, ≥98%). Kao otapalo za fluorimetrijske i CD titracije korišten je acetonitril (CH_3CN, Sigma-Aldrich, ≥99,0%), a za NMR analize korišten je deuterirani acetonitril (CD_3CN-d_3, Euriso-top, ≥99,8%).

3.2. Priprava otopina

Otopine u acetonitrilu pripremljene su vaganjem odgovarajućih krutina.

3.2.1. ^1H NMR titracije

Za ^1H NMR titracije u deuteriranom acetonitrilu pripremljene su otopine liganda **L** u rasponu koncentracija 5×10^{-4} mol dm^{-3} do $6{,}4 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} i otopine odgovarajućih soli u rasponu koncentracija 0,051 mol dm^{-3} do 0,4 mol dm^{-3}.

3.2.2. Fluorimetrijske titracije

Za fluorimetijske titracije pripravljene su otopine liganda **L** u acetonitrilu u rasponu koncentracija $4{,}5 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} do $6{,}3 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} i otopine odgovarajućih soli u rasponu koncentracija $4{,}8 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} do 0,4 mol dm^{-3}.

3.2.3. CD titracije

Za CD titracije pripravljene su otopine liganda **L** u acetonitrilu koncentracije 5×10^{-4} mol dm^{-3} i otopine odgovarajućih soli koncentracije 0,1 mol dm^{-3}.

3.3. NMR titracije

^{1}H NMR spektri snimani su pomoću spektrometra Bruker Avance III HD 600 MHz. U svim titracijama u otopinu liganda **L** u NMR cjevčici dodavana je otopina soli aniona i liganda **L**. Koncentracija **L** u otopinama titranda i titransa bila je jednaka. Titracije su provedene pri 25°C u deuteriranom acetonitrilu čiji je signal korišten kao standard za kemijske pomake protona. ^{1}H NMR spektri za sve titracije snimljeni su s 32 pulsa. ^{1}H NMR spektri vizualizirani su pomoću programa MestReNova.[53] Regresijskom analizom određene su konstante ravnoteže za nastajanje kompleksa korištenjem programa HypNMR 4.0 (Protonic Software, Leeds, UK) unutar programskog paketa Hyperquad.[53] Pri određivanju konstante stabilnosti kompleksa **L**$H_2PO_4^-$, u obzir je uzeta i dimerizacija dihidrogenfosfatnog aniona u otopini.[66]

3.4. Fluorimetrijske titracije

Fluorimetrijska mjerenja provedena su pomoću spektrofluorimetra Varian Cary Eclipse. Titracije su izvedene dodavanjem titransa izravno u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm. Sva mjerenja provedena su na temperaturi 25 °C. Ekscitacijska valna duljina korištena pri svim fluorimetrijskim titracijama bila je 260 nm. Spektri su snimljeni s korakom od 2 nm i integracijskim vremenom od 0,4 s, dok su ekscitacijski i emisijski prorezi bili širine od 10 nm. Sve titracije napravljene su tri puta. Eksperimenti su provedeni na način da je otopina liganda **L** volumena 2 mL titrirana otopinom soli. Apsorpcijski spektri obrađeni su multivarijatnom regresijskom analizom implementiranom u HypSpec 1.1.50 program (Protonic Software, Leeds, UK).[53] Pri određivanju konstante stabilnosti kompleksa **L**$H_2PO_4^-$, dimerizacija dihidrogenfosfatnog aniona je uzeta u obzir.[66]

3.5. CD titracije

CD spektri snimamljeni su pomoću spektrofotometra JASCO J815. CD titracije je izveo dr. sc. Ivo Crnolatac, dok je planiranje titracija i obradu eksperimentalnih provela Lucija Otmačić. Spektri su snimljeni u rasponu valnih duljina od 200 do 300 nm sa 0,2 nm *data pitch* i brzinom skeniranja od 200 nm/min; za svaki spektar prikupljena su 2 snimka. Titracije su provedene dodavanjem titransa izravno u kvarcnu kivetu optičkog puta 1 cm, početnog volumena titranda 2,0 mL. Apsorpcijski spektri obrađeni su multivarijatnom regresijskom analizom implementiranom u HypSpec 1.1.50 program (Protonis Software, Leeds, UK)[53]. Pri određivanju konstante stabilnosti kompleksa **L**$H_2PO_4^-$, dimerizacija aniona je uzeta u obzir.[66]

Ti su spektri također izračunati pomoću DichroCalc[56,67] webservera iz struktura slobodnog i kompleksiranog linearnog peptida **L** koje su dobivene MD simulacijama. Iz MD trajektorija uzeta je svaka pedeseta struktura kompleksa **L**-anion, ukupno 1000 struktura po sustavu. CD spektar izračunat je za svaku strukturu, a kao reprezentativni spektar uzet je prosjek svih spektara.

3.6. Molekulska dinamika

Simulacije molekulske dinamike provedene su pomoću programskog paketa GROMACS (verzija 2019.5, University of Groningen; Stockholm Royal Institute of Technology; Uppsala University).[68–74] Intramolekulske i nevezne interakcije opisane su korištenjem polja sila OPLS-AA (*Optimized parameters for Liquid Simulations-All Atoms*).[61] U simulacijama kompleksa **L** s anionima dodan je tetrametilamonijev ion na fiksiranom položaju uz rub kutije kako bi se očuvala elektroneutralnost sustava. Nakon provedene solvatacije, provedena je optimizacije geometrije sustava. Simulacija molekulske dinamike provedena je u *NpT* uvjetima u trajanju od 50,5 ns, pri čemu prvih 0,5 ns nije uzeto u obzir u analizi. Kao numerički integrator korišten je Verletov algoritam[75] s vremenskim razmakom od 1 fs. Radijus u kojem su računate nevezne van der Waalsove i Coulombove interakcije kratkog dometa bio je 16 Å. Coulombove interakcije dugog dometa računate su pomoću Ewaldove metode implemetirane u PME (*Particle Mesh Ewald*) proceduru.[76] Temperatura tijekom simulacije održavana je na 298 K pomoću Nose-Hooverovog algoritma[63,64] s vremenskom konstantom od 1 ps dok je tlak održavan na prosječnoj vrijednosti od 1 bara korištenjem Martyna-Tuckerman-Tobias-Kleinovog[65] algoritma uz vremensku konstantu od 1 ps. Prosječne strukture kompleksa linearnog peptida **L** s anionima u acetonitrilu dobivene su PCA (*Principal Component Analysis*) analiznom udaljenosti i kutova između halogenidnih iona, odnosno kisikovih atoma oksoaniona i amidnih te aminskih protona linearnog peptida **L**. Kao reprezentativne strukture uzete su one koje pripadaju centroidu klastera koji sadrži najveći broj molekulskih struktura. Slike molekulskih struktura dobivene simulacijama molekulske dinamike izrađene su pomoću programa VMD, a rezultati analize udaljenosti i kutova provedene su u programu OriginPro 2015.[77]

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Afinitet vezanja linearnog peptida **L** s halogenidnim anionima, oksoanionima, te tiocijanatnim i nitratnim anionima određen je fluorimetrijskim, ^{1}H NMR i titracijama cirkularnog dikroizma (tablica 1).

Tablica 1. Konstante stabilnosti nastajanja kompleksa **L**-anion u acetonitrilu pri $\vartheta = 25$ °C. SE = standardna pogreška aritmetičke sredine ($N = 3$), [a] ^{1}H NMR spektroskopija, [b] cirkularni dikroizam, [c] fluorimetrija.

anion	$\log\left(\frac{K}{\mathrm{dm^3\ mol^{-1}}}\right) \pm \mathrm{SE}$
Cl^-	2,60[a] 2,21[b] 2,79±0,08[c]
Br^-	1,76[a] 0,95[b] 1,83±0,02[c]
I^-	0,98[a] 3,87±0,01[c]
HSO_4^-	2,82(1:1)[a] 2,57(1:1)[b] 2,67 ±0,03 (1:1)[c]
$H_2PO_4^-$	4,39(1:1)[a] 8,25(1:2)[a] 5,16(1:1)[b] 8,43(1:2)[b] 4,08±0,02 (1:1)[c] 8,06±0,03 (1:2)[c]
NO_3^-	1,02[a] 1,40±0,02[c]
SCN^-	0,91[a] 1,88±0,01[c]

Iz tablice 1 vidljivo je da peptid **L** veže halogenidne ione te da stabilnost kompleksa opada sljedećim redoslijedom: $Cl^- > Br^- > I^-$. Također se vežu i oksoanioni HSO_4^-, $H_2PO_4^-$ i NO_3^- te SCN^-. Kod dihidrogenfosfatnog aniona uz 1:1 kompleks uočeno je i nastajanje kompleksa više stehiometrije (1:2) u kojem su dva dihidrogenfosfatna aniona vezana na peptid **L**. Kod fluorimetrijske titracije peptida **L** s jodidom i tiocijanatom došlo je do jakog utišavanja fluorescencije te su tako određene konstante stabilnosti nepouzdane.

Kako bi se dodatno potvrdila struktura kompleksa **L**-anion$^-$ u acetonitrilu, MD simulacijama su određeni su prosječni koordinacijski brojevi aniona. Iz tablice 2 može se vidjeti da su anioni u prosjeku koordinirani s 4 amidna protona i jednim aminskim protonom, kao što sugeriraju i slike struktura kompleksa dobivene MD simulacijama prikazane dalje u tekstu.

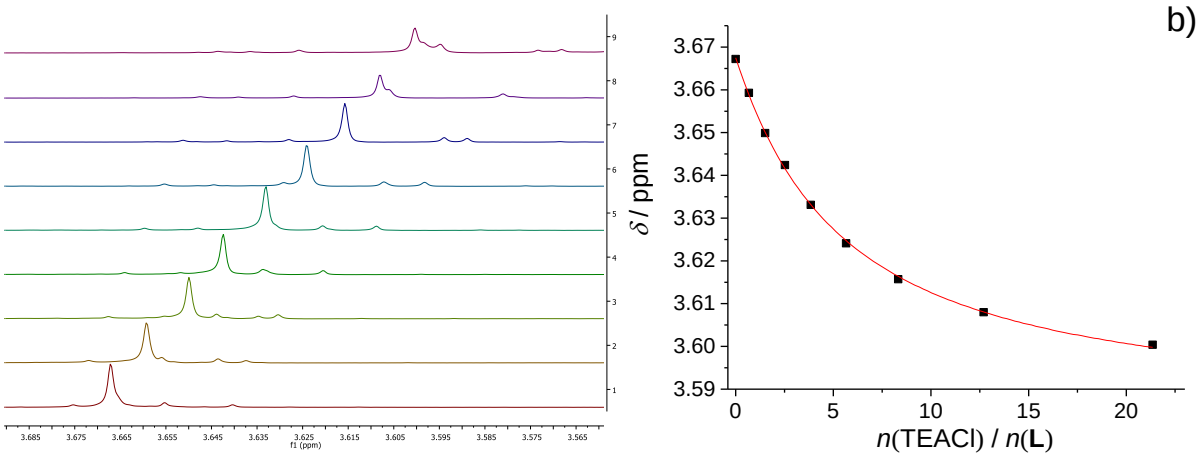
Tablica 2. Prosječan broj koordiniranih amidnih i aminskih protona spoja **L** na vezani anion u kompleksu s **L** tijekom MD simulacija u acetonitrilu pri 25 °C i t_{sim} = 50,5 ns.

	N(koordinirano)		
anion	N(–H) ukupno	N(–H) amin	N(–H) amid
Cl^-	4,69	0,86	3,83
Br^-	4,51	0,77	3,74
HSO_4^-	4,67	1,37	3,31
$H_2PO_4^-$	5,25	1,14	4,11

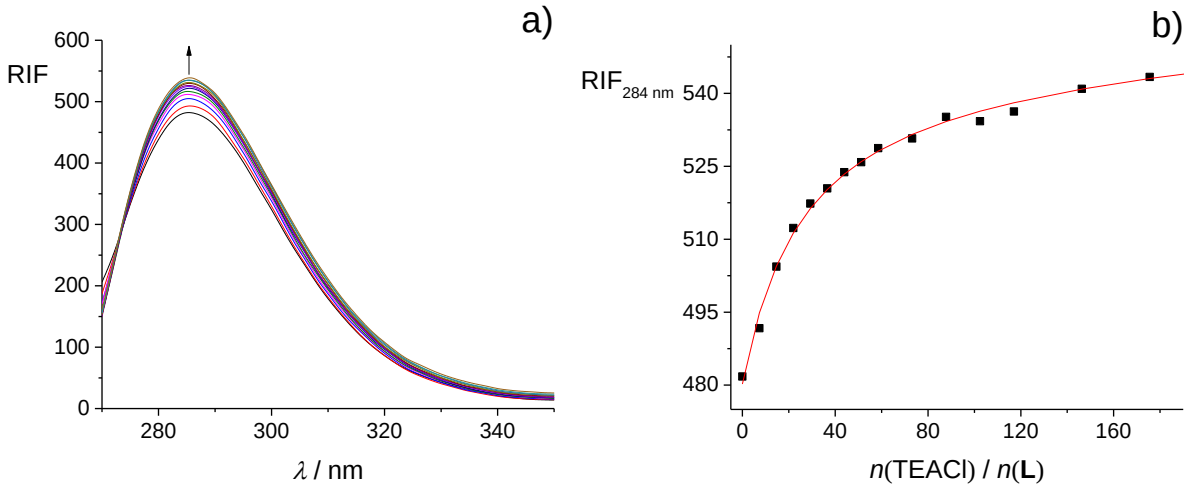
4.1. Kompleksiranje peptida L s kloridom

Afinitet peptida **L** prema kloridnom anionu uspješno je određen pomoću svih korištenih metoda. Na slici 4a prikazana je ^{1}H NMR titracija u kojoj se vide promjene u pomaku protona metoksi skupine. Iz tih promjena određena je konstanta stabilnosti kompleksa (slika 4b) čija vrijednost iznosi log*K* = 2,60. Tijekom fluorimetrijskih titracija, dodatkom kloridnog aniona peptidu **L** došlo je do povećanja relativnog intenziteta fluorescencije (slika 5a). Najveće povećanje primijećeno je u području oko 280 nm (slika 5b). Tako dobivena konstanta stabilnosti iznosila je log*K* = 2,21. Promjene su uočene i u CD spektru (slika 6a) uslijed nastanka kompleksa oko 230 nm koje odgovaraju prijelaznoj vrpci n-π^* bočnih ogranaka. Nakon dodatka

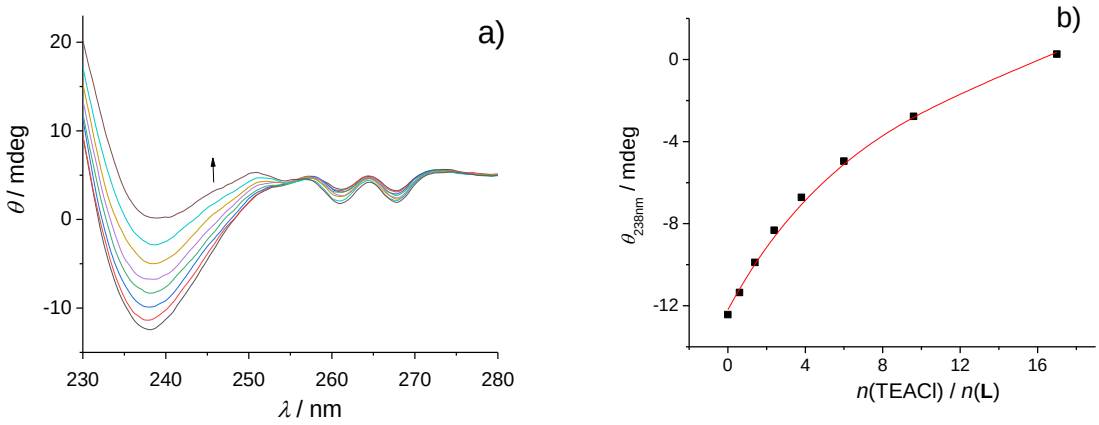
aniona u otopinu dolazi do pojave negativnog signal. Iz tih promjena (slika 6b) određena je konstanta stabilnosti kompleksa log$K$ = 2,79. Konstante dobivene svim korištenim metodama u dobrom su slaganju. MD simulacijama dobivena je reprezentativna struktura kompleksa (slika 7). Rezultati MD simulacija upućuju na to da je u kompleksu **L**Cl^- anion u prosjeku vezan s 4 amidna protona te s jednim aminskim protonom (tablica 2) te da je struktura peptida **L** u kompleksu kvazi-ciklička, odnosno da kloridni anion djeluje kao templat.



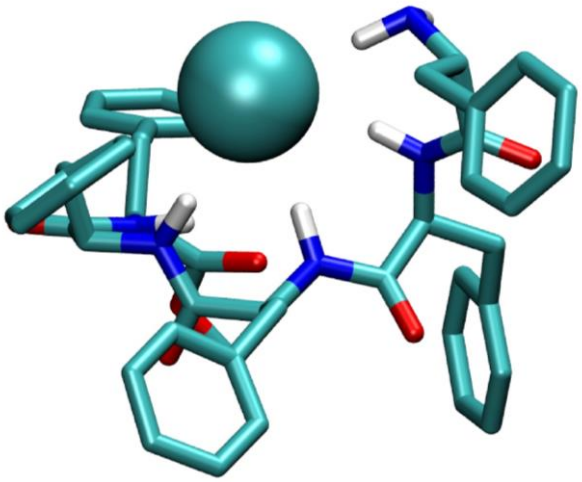
Slika 4. **a)** ^{1}H NMR titracija spoja **L** (c = 5,01 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s TEACl (c = 0,052 mol dm^{-3}) u CD_3CN pri 25 °C. **b)** Ovisnost kemijskog pomaka protona o omjeru množina dodanog TEACl i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



Slika 5. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** (c = 4,53 × 10^{-5} mol dm^{-3}, V = 2,2 cm^3) s TEACl (c = 0,029 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25 °C. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o omjeru množina dodanog TEACl i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



Slika 6. a) CD titracija **L** (c = 5,00 × 10^{-4} mol dm^{-3}, V = 2,0 cm^3) s TEACl (c = 0,10 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25°C. **b)** Ovisnost eliptičnosti o omjeru množina dodanog TEACl i spoja **L** ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.

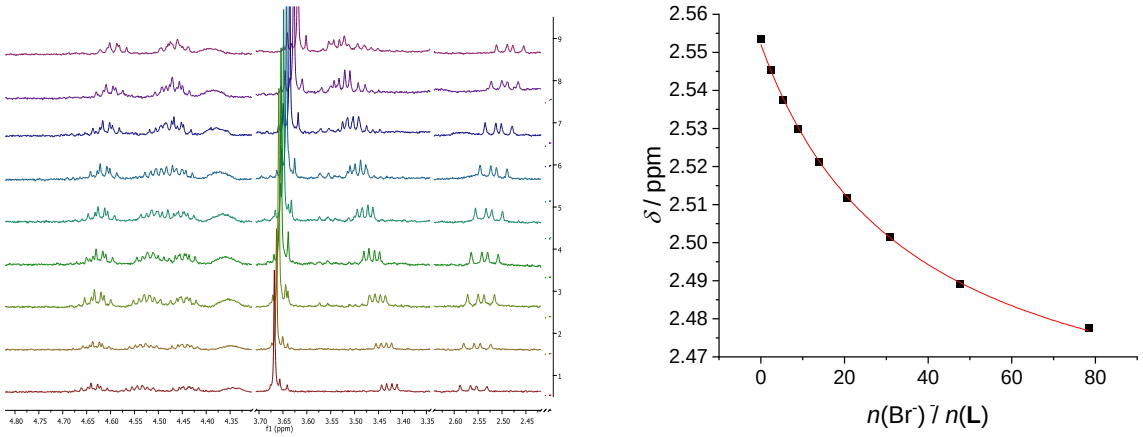


Slika 7. Struktura kompleksa linearnog polipeptida **L** s kloridnim anionom dobivena MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi vezani na ugljikove atome izostavljeni su radi preglednosti.

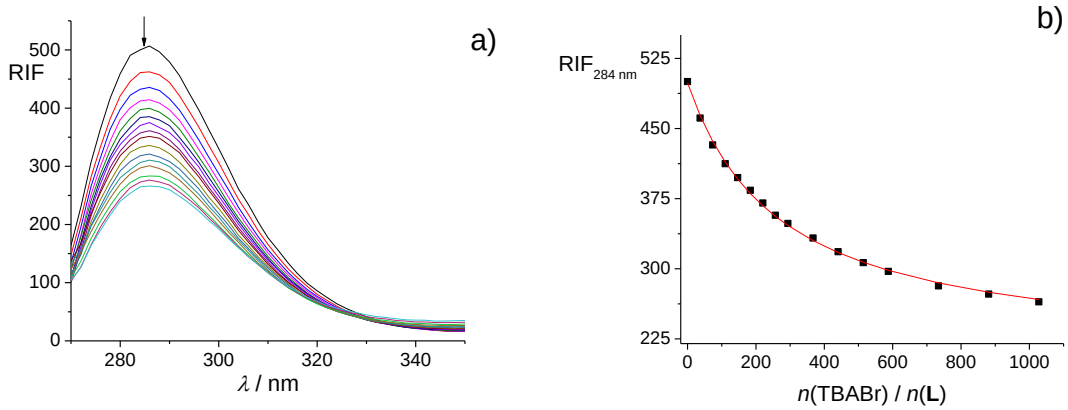
4.2. Kompleksiranje peptida L s bromidom

Receptor **L** veže i bromidni anion, što je eksperimentalno potvrđeno svim korištenim metodama. Na slici 8a prikazana je ^{1}H NMR titracija peptida s bromidom u kojoj se vide promjene C-α i C-β protona. Iz tih promjena određena je konstanta stabilnosti čija je vrijednost log$K$ = 1,76 (slika 8b). Tijekom fluorimetrijske titracije, koja je prikazana na slici 9a, uslijed

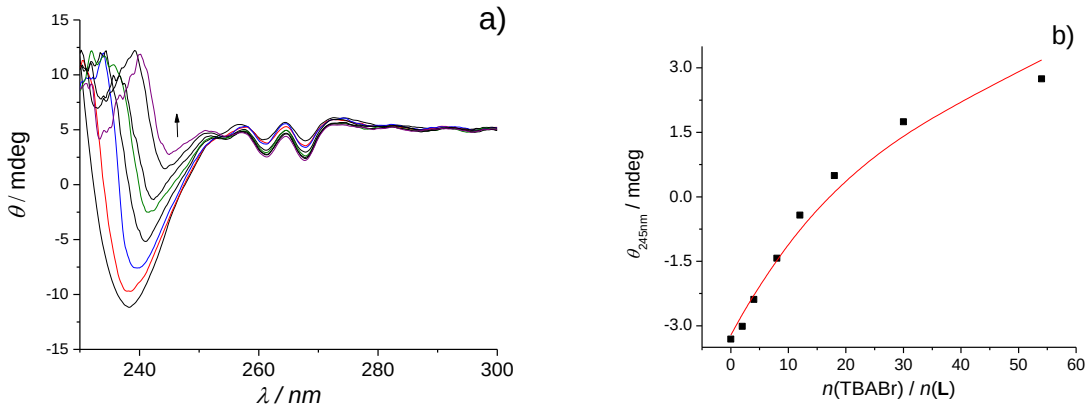
dodatka bromidnog aniona dolazi do smanjenja relativnog intenziteta fluorescencije. Najveće promjene uočene su oko 280 nm (slika 9b). Do promjena je došlo i tijekom CD titracije koja je prikazana na slici 10a. Dodatkom aniona otopini peptida **L** signal je iz negativnog prelazio u pozitivni elipticitet pri čemu su najveće promjene uočene oko 240 nm (slika 10b). Konstanta stabilnosti određena CD titracijom (log$K$ = 0,95) razlikuje se za gotovo red veličine od onih dobivenih fluorimetrijskim (log$K$ = 1,83) i ^{1}H NMR (log$K$ = 1,76) titracijama pri čemu razlog odstupanja nije očit. MD simulacijama dobivena je reprezentativna struktura kompleksa u kojoj je bromidni anion koordiniran s 4 amidna protona i jednim aminskim protonom (slika 11, tablica 2). Kao i kod kloridnog kompleksa, peptid **L** u **L**Br$^-$ kompleksu poprima kvazicikličku strukturu što upućuje na potencijalni templatni efekt bromidnog aniona.



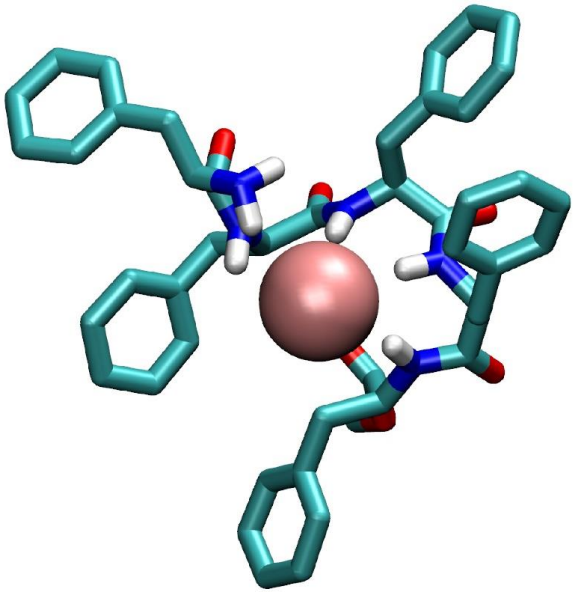
Slika 8. **a)** ^{1}H NMR titracija spoja **L** (c = 4,95 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s TEABr (c = 0,083 mol dm^{-3}) u CD_3CN pri 25 °C. **b)** Ovisnost kemijskog pomaka protona o omjeru množina dodanog TEABr i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



Slika 9. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** (c = 4,53 × 10^{-5} mol dm^{-3}, V = 2,2 cm^3) s TBABr (c = 0,15 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25 °C. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o omjeru množina dodanog TBABr i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



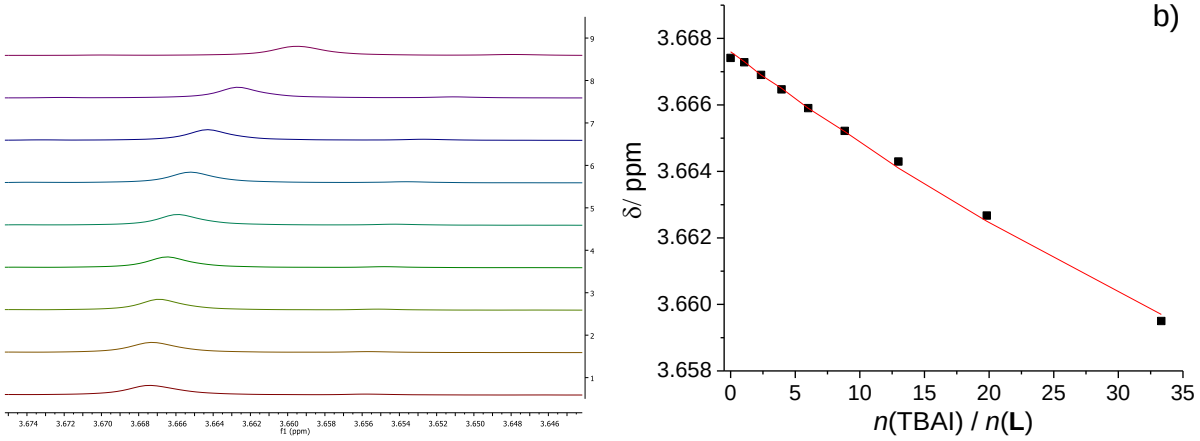
Slika 10. a) CD titracija **L** (c = 5,00 × 10^{-4} mol dm^{-3}, V = 2,0 cm^3) sa TBABr (c = 0,10 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25°C. **b)** Ovisnost eliptičnosti o omjeru množina dodanog TBABr i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



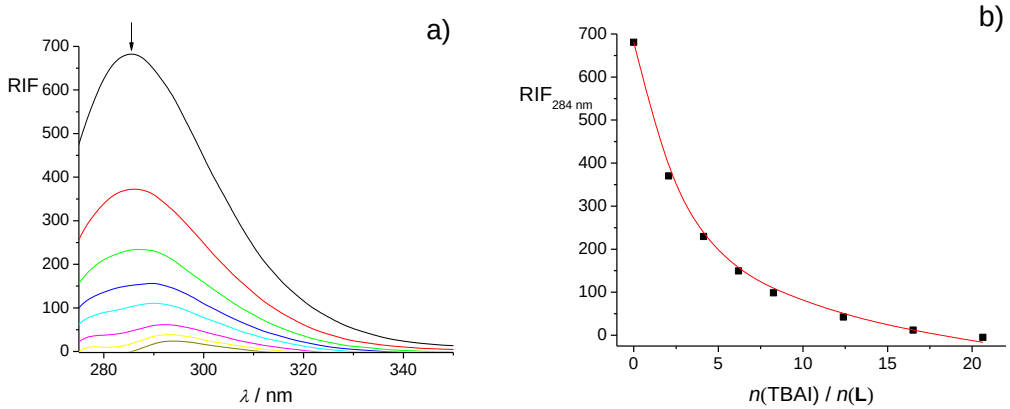
Slika 11. Struktura kompleksa linearnog polipeptida **L** s bromidnim anionom dobivena MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi vezani na ugljikove atome izostavljeni su radi preglednosti.

4.3. Kompleksiranje peptida L s jodidom

Eksperimentalnim metodama opaženo je i nastajanje kompleksa **L**I^- u otopini. Na slici 12a prikazana je ^{1}H NMR titracija peptida s jodidom u kojoj se vide blage promjene u pomaku protona metoksi skupine. Tijekom cijele titracije pomak protona je bio vrlo slab, što upućuje na slabo vezanje jodida (slika 12b). Potvrda tog slabog vezanja je i određena konstanta stabilnosti koja iznosi log$K$ = 0,98. Tijekom fluorimetrijskih titracija prikazanih na slici 13a došlo je do snažnog gašenja fluorescencije peptida oko 280 nm uslijed dodatka jodida (slika 13b). Efekt gašenja fluorescencije sličan je onom opisanom u radu *Pezos et al* za fluorimetrijsku titraciju p-cijanofenilalanina s jodidom.[78] Fluorimetrijskim titracijama određena je konstanta stabilnosti log$K$ = 3,87 koja se jako razlikuje od one dobivene ^{1}H NMR titracijama. Prethodna istraživanja kompleksiranja aniona i pentafenilalanina[79], koji je ciklički analog peptida **L**, upućuju na to da se afinitet receptora prema halogenidnim ionima smanjuje povećanjem radijusa aniona. Uslijed toga može se u slučaju stabilnosti kompleksa **L**I^- zaključiti da je pouzdanija konstanta stabilnosti ona određena ^{1}H NMR titracijom. Zbog slabog vezanja jodida, te zbog razdvajanja jodida od receptora **L** tijekom simulacija nije bilo moguće pouzdano provesti simulacije molekulske dinamike za kompleks **L**I^-.



Slika 12. a) ^{1}H NMR titracija spoja **L** (c = 6,64 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s TBAI (c = 0,11 mol dm^{-3}) u CD_3CN pri 25 °C. **b)** Ovisnost kemijskog pomaka protona o omjeru množina dodanog TBAI i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.

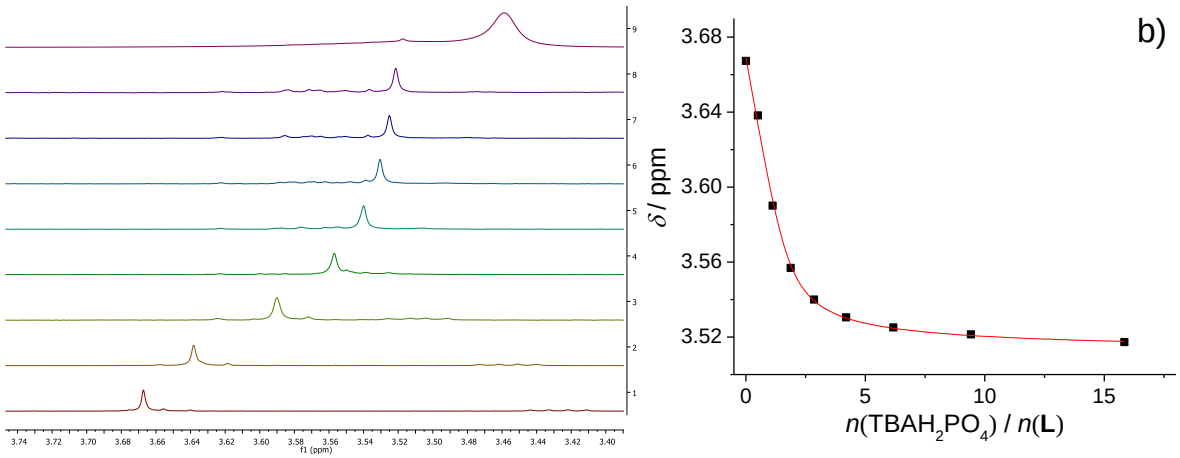


Slika 13. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** (c = 6,27 × 10^{-5} mol dm^{-3}, V = 2,2 cm^3) s TBAI (c = 5,70× 10^{-3} mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25 °C. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o omjeru množina dodanog TBAI i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.

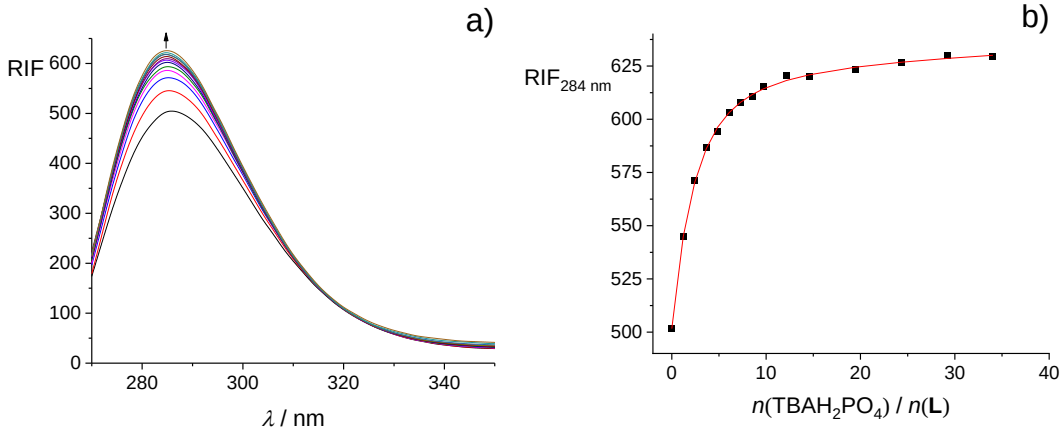
4.4. Kompleksiranje peptida L s dihidrogenfosfatom

Receptor **L** u acetonitrilu tvori stabilne komplekse s dihidrogenfosfatom. Na slici 14a prikazana je ^{1}H NMR titracija peptida s dihidrogenfosfatom u kojoj se vide promjene protona metoksi skupine. Iz tih promjena (slika 14b) dobivene su konstante za nastajanje kompleksa 1:1 kao i onog više stehiometrije (1:2) u kojem su dva dihidrogenfosfata vezana na peptid **L**, što je uočeno i kod kompleksiranja cikličkog analoga peptida **L** s H_2PO4^-.[79] Konstante kompleksiranja iznosile su log$K$ = 4,39 (1:1), log$K$ = 8,25 (1:2). Konstanta nastanka 1:2 kompleksa iz kompleksa stehiometrije 1:1 usporediva je s nastankom kompleksa 1:1 iz slobodnih reaktanata što upućuje na neutralni alosterički efekt. Tijekom fluorimetrijskih titracija relativni intenzitet fluorescencije pojačavao se dodatkom H_2PO4^-, a konstante dobivene iz izmjerenih podataka iznosile su log$K$ = 4,08 (1:1), log$K$ = 8,06 (1:2) (slika 15a i 15b) što je u vrlo dobrom slaganju s onima dobivenim ^{1}H NMR titracijama. Tijekom titracije cirkularnog dikroizma došlo je do promjena u spektru pri otprilike 230 nm (slika 16a i 16b), odnosno do pojave se negativnog signala nakon dodatka aniona, koji je upućuje na strukturne promjene okosnice linearnog peptida tijekom nastanka kompleksa. Pritom su konstante ravnoteže dobivene CD titracijom iznosile log$K$ = 5,16 (1:1), log$K$ = 8,43 (1:2) što je u dobrom slaganju s onima dobivenim fluorimetrijskim i ^{1}H NMR titracijama. Simulacijama molekulske

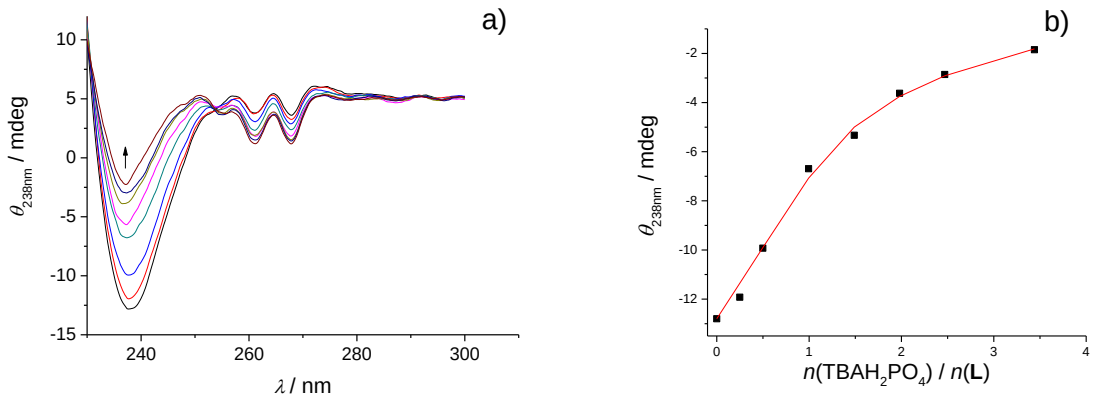
dinamike dobivena je struktura 1:1 kompleksa peptida **L** s H_2PO4^- (slika 17) u kojoj je anion koordiniran s četiri amidna i jednim aminskim protonom pentapeptida u kvazicikličkom okruženju. Pokušaji provedbe simulacije kompleksa 1:2 nisu bili uspješni, mogući razlog je parametrizacija dihidrogenfosfatnog aniona koja nije predviđena za opis dimerizacije tog aniona.



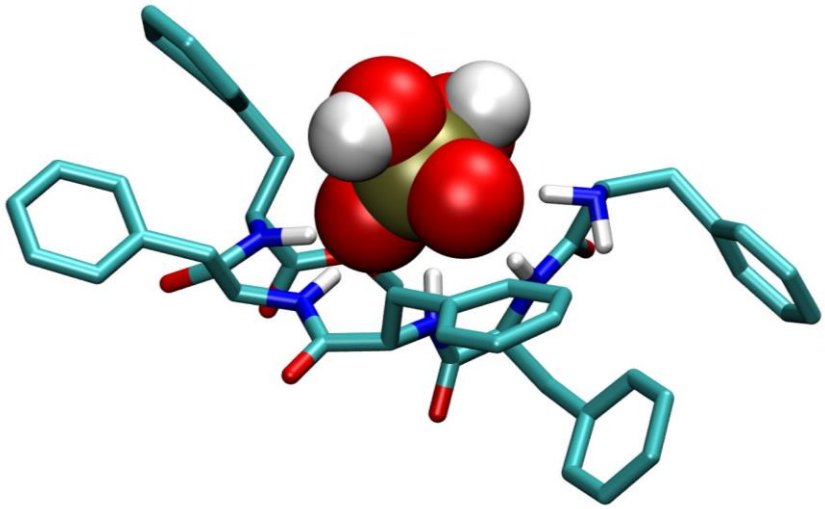
Slika 14. a) ^{1}H NMR titracija spoja **L** (c = 6,64 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s $TBAH_2PO_4$ (c = 0,051 mol dm^{-3}) u CD_3CN pri 25 °C. **b)** Ovisnost kemijskog pomaka protona o omjeru množina dodanog $TBAH_2PO_4$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



Slika 15. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** (c = 4,53 × 10^{-5} mol dm^{-3}, V = 2,2 cm^3) s $TBAH_2PO_4$ (c = 4,84 × 10^{-3} mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25 °C. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o omjeru množina dodanog $TBAH_2PO_4$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



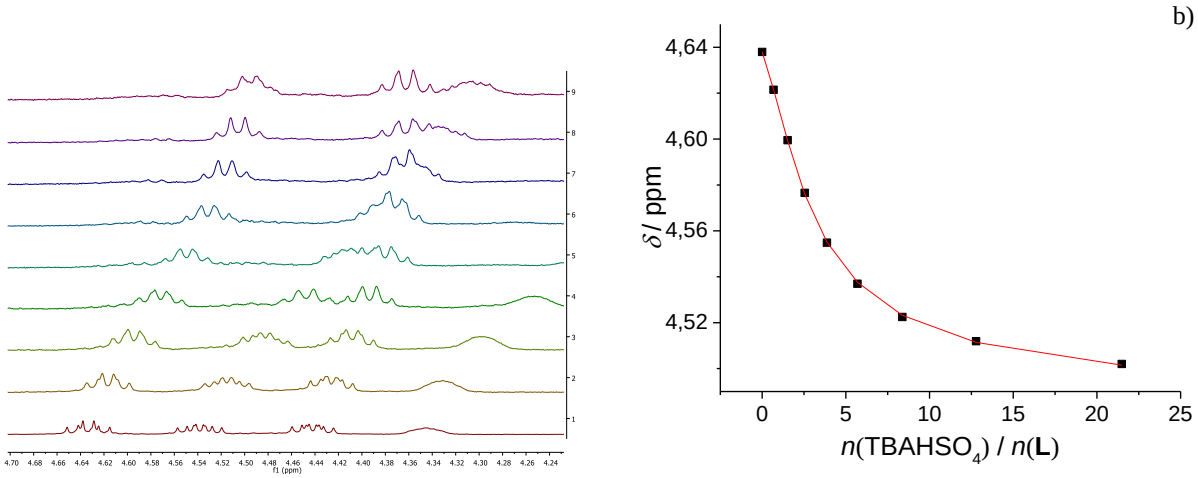
Slika 16. a) CD titracija **L** (c = 5,00 × 10^{-4} mol dm^{-3}, V = 2,0 cm^3) s $TBAH_2PO_4$ (c = 0,10 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25°C. **b)** Ovisnost eliptičnosti o omjeru množina dodanog $TBAH_2PO_4$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



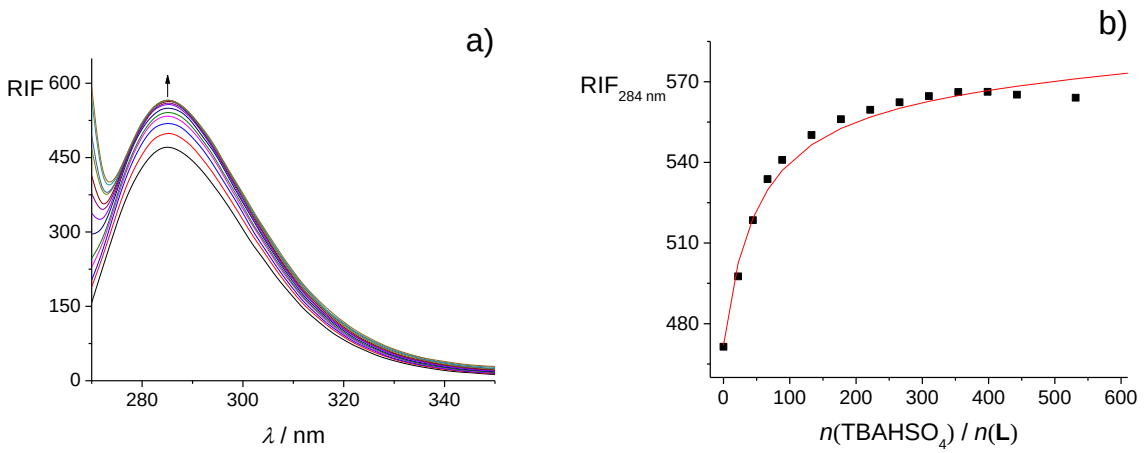
Slika 17. Struktura kompleksa linearnog polipeptida **L** s dihidrogenfosfatnim anionom dobivena MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi vezani na ugljikove atome izostavljeni su radi preglednosti.

4.5. Kompleksi peptida L s hidrogensulfatom

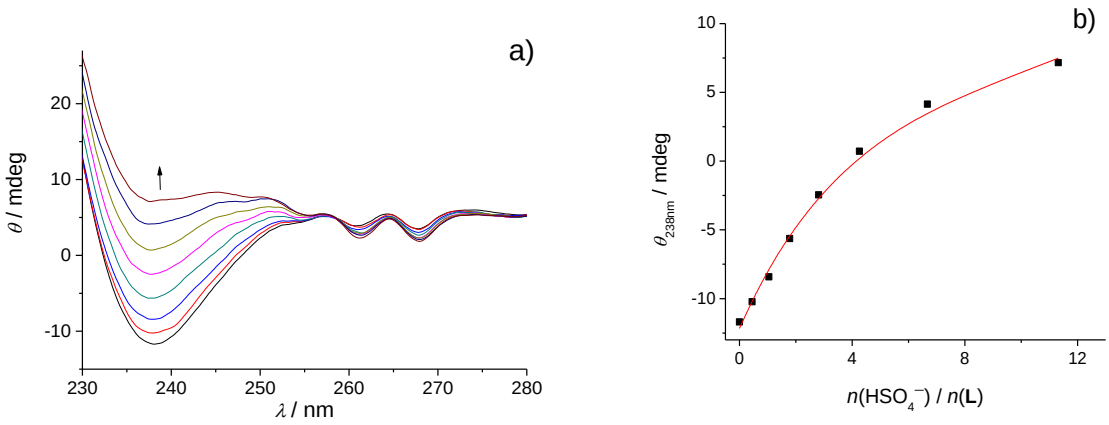
Nastajanje kompleksa **L**HSO_4^- opaženo je svim korištenim eksperimentalnim metodama, kao i simulacijama molekulske dinamike. Na slici 18a prikazana je ^{1}H NMR titracija peptida s hidrogensulfatom u kojoj su vidljive promjene u kemijskom pomaku protona vezanih na C-α atome (slika 18.b). Iz tih promjena određena je konstanta stabilnosti (log$K$ = 2,82). Tijekom fluorimetrijskih titracija prikazanih na slici 19a vidljivo je da se relativni intenzitet fluorescencije pojačava dodatkom HSO_4^- u promatranom dijelu spektra. Iz tih podataka dobivena je konstanta stabilnosti kompleksa (log$K$ = 2,67, slika 19b). U CD titraciji peptida s anionom (slika 20a) došlo je do povećanja signala oko 240 nm (slika 20b). Obradom spektara određena je konstanta stabilnosti (log$K$ = 2,57) koja je u vrlo dobrom s onim dobivenim ostalim metodama. Simulacijama molekulske dinamike određena je reprezantativna struktura kompleksa (slika 21) u kojoj je anion HSO_4^- koordiniran preko s četiri amidna i jednim aminskim protonom pentapeptida (tablica 2) dok okosnica pentapeptida poprima kvazicikličkl oblik.



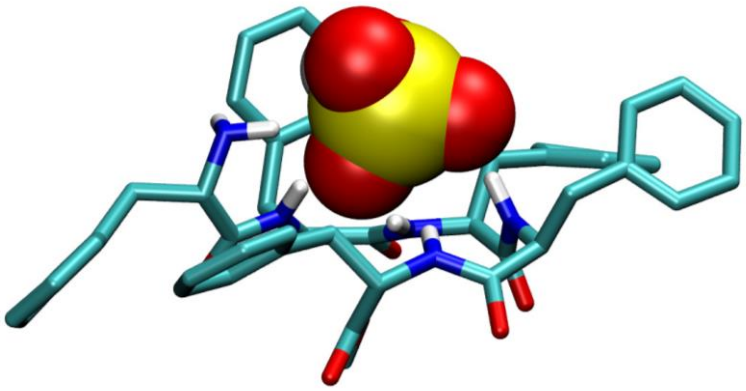
Slika 18. a) ^{1}H NMR titracija spoja **L** (c = 5,01 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s $TBAHSO_4$ (c = 0,052 mol dm^{-3}) u CD_3CN pri 25 °C. **b)** Ovisnost kemijskog pomaka protona o omjeru množina dodanog $TBAHSO_4$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



Slika 19. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** (c = 4,48 × 10^{-5} mol dm^{-3}, V = 2,2 cm^3) s $TBAHSO_4$ (c = 0,087 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25 °C. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o omjeru množina dodanog $TBAHSO_4$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



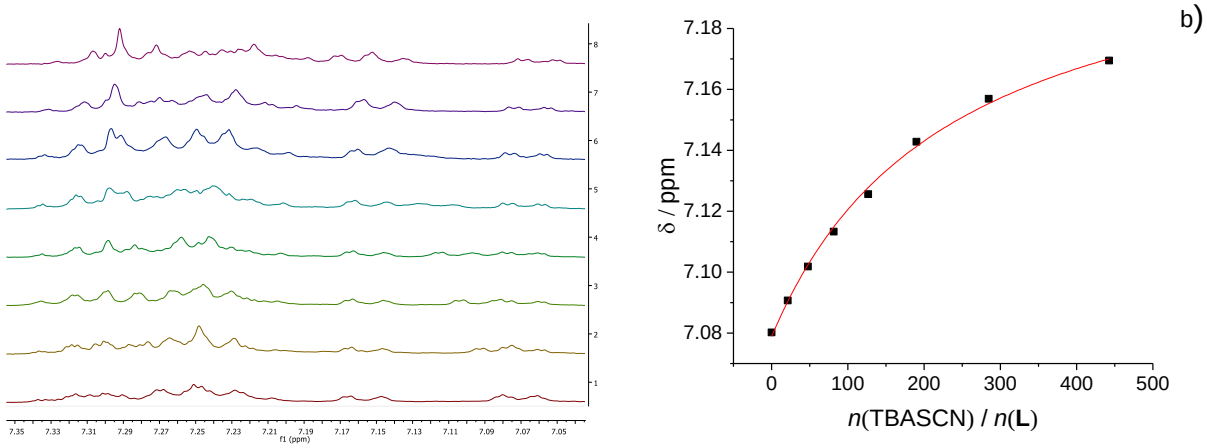
Slika 20. **a)** CD titracija **L** (c = 5,00 × 10^{-4} mol dm^{-3}, V = 2,0 cm^3) sa $TBAHSO_4$ (c = 0,10 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25°C. **b)** Ovisnost eliptičnosti o omjeru množina dodanog $TBAHSO_4$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



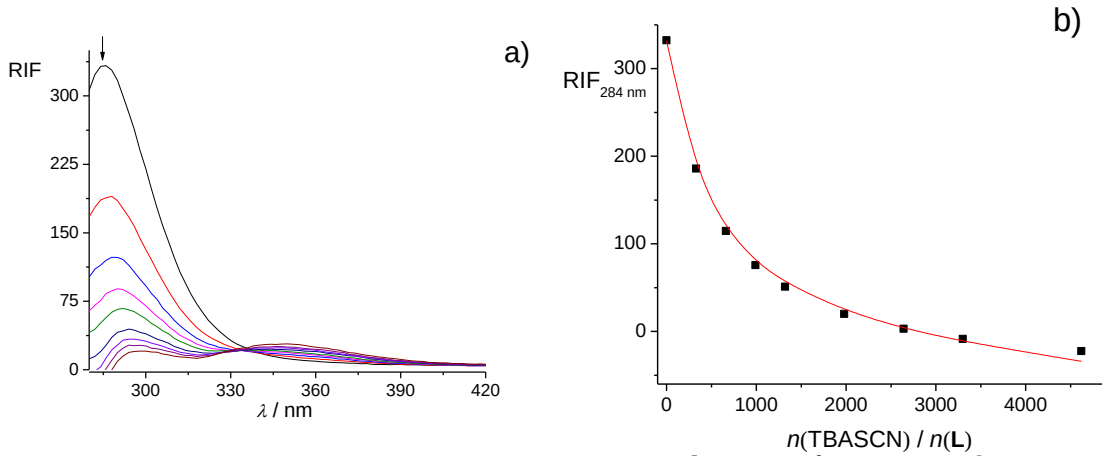
Slika 21. Struktura kompleksa linearnog polipeptida **L** s hidrogensulfatnim anionom dobivena MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi vezani na ugljikove atome izostavljeni su radi preglednosti.

4.6. Kompleksiranje peptida L s tiocijanatom

Uz vezanje halogenidnih i oksoaniona, opaženo je i kompleksiranje **L** s tiocijanatnim ionom. Na slici 22a prikazana je ^{1}H NMR titracija peptida s tiocijanatom u kojoj se vide promjene u kemijskom pomaku amidnih protona. Iz tih promjena određena je konstanta stabilnosti kompleksa koja iznosi log$K$ = 0,91 (slika 22b). Tijekom fluorimetrijskih titracija (slika 23a) došlo je do snažnog utišavanja relativnog intenziteta fluorescencije, najveće promjene javljale su se oko 280 nm (slika 23b). Konstanta stabilnosti određena fluorimetrijskim titracijama iznosi log$K$ = 1,88 te se razlikuje za red veličine u odnosu na onu određenu 1H NMR titracijom. Razlog takvog odstupanja najvjerojatnije leži u pojavi jakog utišavanja fluorescencije koja je bila opažena i u fluorimetrijskim titracijama s jodidnim anionom (slika 13a).



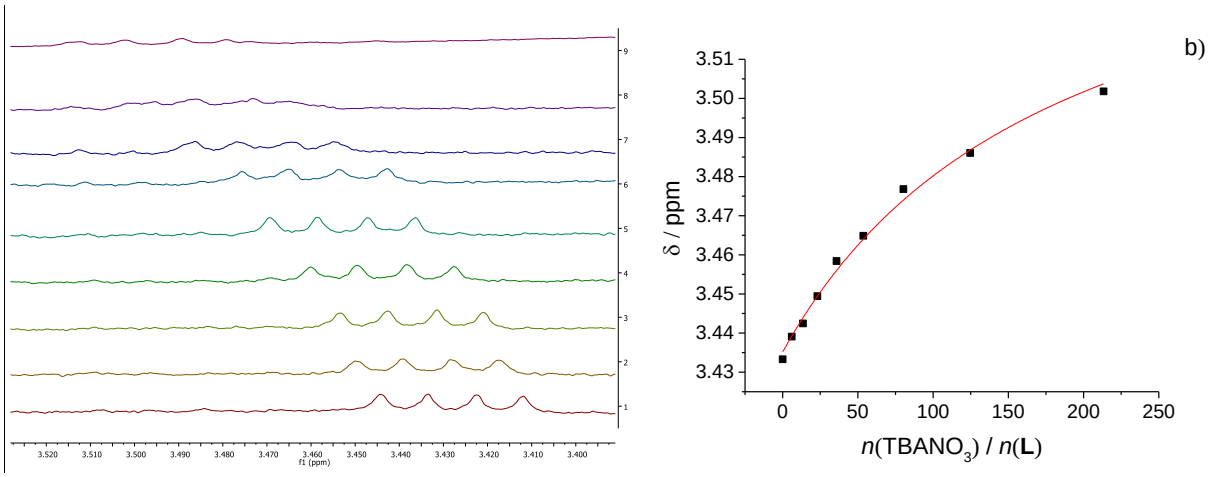
Slika 22. a) ^{1}H NMR titracija spoja **L** (c = 5.21 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s TBASCN (c = 0,40 mol dm^{-3}) u CD_3CN pri 25 °C. **b)** Ovisnost kemijskog pomaka protona o omjeru množina dodanog TBASCN i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



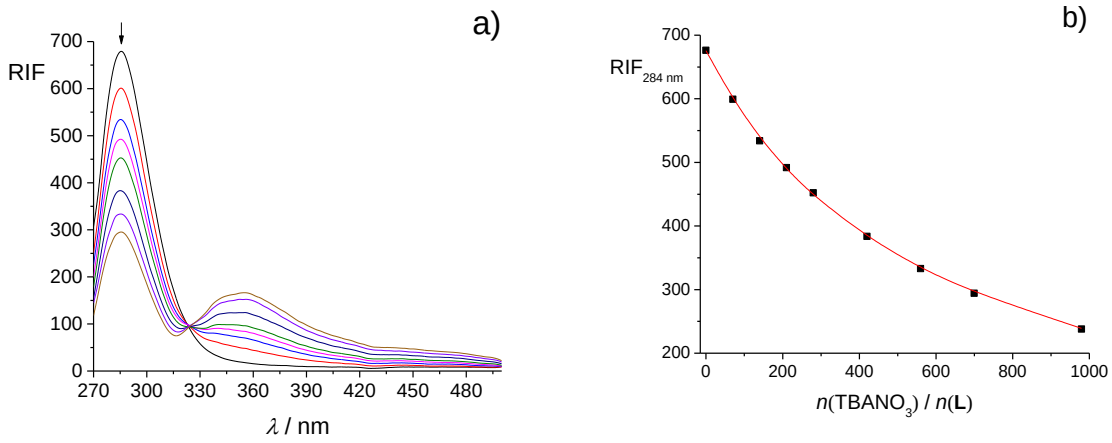
Slika 23. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** (c = 2,67 × 10^{-5} mol dm^{-3}, V = 2,2 cm^3) s TBASCN (c = 0,39 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25 °C. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o omjeru množina dodanog TBASCN i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.

4.7. Kompleksiranje peptida L s nitratom

Eskperimentalnim i komputacijskim metodama istražen je i nastanak kompleksa **L**NO_3^-. Na slici 24a prikazana je ^{1}H NMR titracija peptida s nitratom u kojoj se vide promjene u pomaku protona vezanih na C-α atome (slika 24b). Iz tih promjena određena je konstanta stabilnosti nitratnog kompleksa s receptorom **L** (log*K* = 1,02). Tijekom fluorimetrijskih titracija prikazanih na slici 25a uslijed dodatka NO_3^- iona došlo je do smanjenja relativnog intenziteta fluorescencije u području oko 280 nm (slike 25 a i b). Također, došlo je do pojave novog signala oko 360 nm koji se povećavao dodatkom NO_3^- (slika 25a). Iz tih titracija određena je konstanta stabilnosti (log*K* = 1,40) koja je u dobrom slaganju s onom određenom ^{1}H NMR titracijom. Za kompleks **L**NO_3^- nisu provedene simulacije molekulske dinamike.



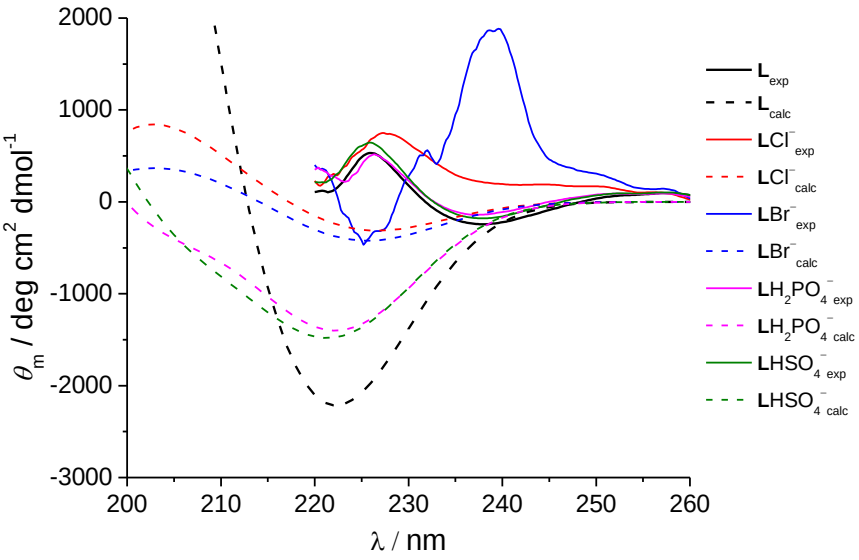
Slika 24. a) ^{1}H NMR titracija spoja **L** (c = 5,21 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s $TBANO_3$ (c = 0,18 mol dm^{-3}) u CD_3CN pri 25 °C. **b)** Ovisnost kemijskog pomaka protona o omjeru množina dodanog $TBANO_3$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.



Slika 25. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** (c = 6,27× 10^{-5} mol dm^{-3}, V = 2,2 cm^3) s $TBANO_3$ (c = 0,19 mol dm^{-3}) u acetonitrilu pri 25 °C. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o omjeru množina dodanog $TBANO_3$ i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; ─ izračunane vrijednosti.

4.8. Usporedba molarnih CD spektara

CD titracijama dobivena je indikacija strukturnih promjena koje se odvijaju prilikom reakcija kompleksiranja. Kako bi se došlo do detaljnog opisa tih promjena provedene su i simulacije molekulske dinamike iz kojih su izračunati CD spektri slobodnog liganda **L** kao njegovih kompleksa s anionima uz korištenje mrežnog servera DichroCalc (slika 25).[56] Izračunati i eksperimentalno dobiveni spektri su u kvalitativnom slaganju pri čemu je vidljivo da su izračunati spektri u odnosu na eksperimentalne plavo pomaknuti (eng. *blue shifted*) i razlikuju se u intenzitetu. Ta razlika je vjerojatno posljedica korištenja parametara koji se koriste za vodene otopine. Također, CD spektri su izračunati samo iz strukture **L**, bez uzimanja u obzir molekula otapala i aniona. Ipak, opaženo kvalitativno slaganje je potvrda struktura kompleksa dobivenih MD simulacijama, to jest da dolazi do strukturne preorganizacije amidnih i aminskih skupina tijekom vezanja aniona u kvazi-cikličku strukturu pogodnu za glava-rep ciklizaciju.



Slika 26. Usporedba molarnih CD spektara slobodnog i kompleksiranog receptora **L** u acetonitrilu određenih CD titracijama (puna linija) i izračunatih iz rezultata MD simulacija (iscrtkana linija).

§ 5. ZAKLJUČAK

Eksperimentalnim metodama ^{1}H NMR spektroskopije, spektrofluorimetrije i spektroskopije cirikularnog dikroizma u acetonitrilu je opaženo kompleksiranje pentapeptida **L** s kloridnim, bromidnim i jodidnim anionima te s dihidrogenfosfatom, hidrogensulfatom, tiocijanatom i nitratom.

^{1}H NMR titracijama određene su konstante stabilnosti kompleksiranja linearnog peptida **L** s kloridnim, jodidnim, hidrogensulfatnim, dihidrogensulfatnim, tiocijanatnim i nitratnim anionom u deuteriranom acetonitrilu (tablica 1). Prilikom vezanja svih aniona opaženi su kompleksi stehiometrije 1:1, osim kod vezanja dihidrogenfosfata kod kojeg je uočena i stehiometrija 1:2 (dva dihidrogenfosfata vezana na peptid).

Fluorimetrijskim titracijama određene su konstante stabilnosti kompleksiranja linearnog peptida **L** s kloridnim, bromidnim, jodidnim, hidrogensulfatnim, dihidrogensulfatnim, tiocijanatnim i nitratnim anionom u acetonitrilu (tablica 1). Također, kao i kod ^{1}H NMR titracija svi opaženi kompleksi bili su stehiometrije 1:1, osim u slučaju kompleksiranja s dihidrogenfosfatom gdje je uz 1:1 kompleks uočen i kompleks stehiometrija 1:2 za koji je određena i pripadna konstanta stabilnosti. Tijekom fluorimetrijskih titracija s jodidnim i tiocijanatnim ionom uočen je snažno smanjene intenziteta fluorescencije uslijed dodatka aniona što je najvjerojatnije utjecalo na pouzdanost određivanja konstante ravnoteže s tim anionima pri čemu se fluorimetrijski dobivene konstante znatno razlikuju od konstanti dobivenih ^{1}H NMR titracijama.

Cirkularnim diokroizmom određene su konstante stabilnosti kompleksiranja linearnog peptida **L** s kloridnim, bromidnim, hidrogensulfatnim i dihidrogensulfatnim anionom (tablica 1). Konstante stabilnosti su u dobrom slaganju s onima dobivenim fluorimetrijskim i ^{1}H NMR titracijama.

Simulacijama molekulske dinamike potvrđeno je da dolazi do preorganizacije u strukturi linearnog peptida **L** uslijed nastanka kompleksa s anionima u acetonitrilu. Analizom udaljenosti i kuteva između atoma halogenida i atoma kisika oksoaniona i amidnih i aminskih protona peptida **L** pokazano je da su svi atomi u prosjeku koordinirani s četiri amidna protona i jednim aminskim protonom (tablica 2). Is struktura dobivenih MD simulacijama izračunati su CD spektri slobodnog peptida i kompleksa s kloridom, bromidom, dihidrogenfosfatom i hidrogensulfatom koji su uspoređeni s eksperimentalno određenim spektrima (slika 25). Spektri

su dobrom kvalitativnom slaganju što je dodatna potvrda kvazicikličke preorganizacije liganda oko aniona uočene u MD simulacijama anionskim kompleksa peptida **L**.

Daljnjim istraživanjem potrebno je odrediti i ostale termodinamičke parametre kompleksiranja te utvrditi točan razlog značajnog odstupanja konstanti stabilnosti određenim fluorimetrijskim titracijama s jodidnim i tiocijanatnim ionima u odnosu na vrijednosti dobivene ^{1}H NMR titracijama. U svrhu utjecaja otapala na ravnotežu trebalo bi ispitati i kompleksiranje aniona s peptidom **L** u drugim otapalima, poput dimetilformamida, dimetilsulfoksida ili metanola.

§ 6. LITERATURNI PREGLED

1. R. Y. Zhang, P. Thapa, M. J. Espiritu, V. Menon, J. P. Bingham, *Bioorg. Med. Chem.* **26** (2018) 1135–1150.
2. C. Fagundez, D. Sellanes, G. Serra, *ACS Comb. Sci.* **20** (2018) 212–219.
3. T. A. F. Cardote, A. Ciulli, *Chem. Med. Chem.* **11** (2016) 787–94.
4. M. Delaunay, T. Ha-Duong, *Biophys. Chem.* **296** (2023) 106987.
5. R. González-Muñiz, M. Á. Bonache, M. J. Pérez de Vega, *Molecules* **26** (2021).
6. J. Sanchez-Quesada, M. R. Ghadiri, H. Bayley, O. Braha, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 11757–11766.
7. Q. Song, J. Yang, J. Y. Rho, S. Perrier, *Chem. Comm.* **55** (2019) 5291–5294.
8. C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **3** (2011) 509–524.
9. D. Mungalpara, A. Valkonen, K. Rissanen, S. Kubik, *Chem. Sci.* **8** (2017) 6005–6013.
10. N. Vidović, G. Horvat, D. Riva, T. Rinkovec, N. Cindro, V. Tomišić, G. Speranza, *Org. Lett.* **22** (2020) 2129–2134.
11. J. Blankenstein, J. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.* **2005** (2005) 1949–1964.
12. G. F. Gause, M. G. Brazhnikova, *Nature* **154** (1944) 703–703.
13. N. Sewald, H. D. Jakube, *Peptides: Chemistry and Biology*, 2009.
14. M. L. James, S. S. Gambhir, *Physiol. Rev.* **92** (2012) 897–965.
15. M. Erak, K. Bellmann-Sickert, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger, *Bioorg. Med. Chem.* **26** (2018) 2759–2765.
16. D. A. Guarracino, J. A. Riordan, G. M. Barreto, A. L. Oldfield, C. M. Kouba, D. Agrinsoni, *Chem. Rev.* **119** (2019) 9915–9949.
17. A. Molero, M. Vendrell, J. Bonaventura, J. Zachmann, L. López, L. Pardo, C. Lluis, A. Cortés, F. Albericio, V. Casadó, M. Royo, *Eur. J. Med. Chem.* **97** (2015) 173–180.
18. M. Vendrell, A. Molero, S. González, K. Pérez-Capote, C. Lluis, P. J. McCormick, R. Franco, A. Cortés, V. Casadó, F. Albericio, M. Royo, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 1080–1090.
19. J. S. Choi, S. H. Joo, *Biomol. Ther. (Seoul)* **28** (2020) 18–24.

20. X. Jing, K. Jin, *Med. Res. Rev.* **40** (2020) 753–810.
21. L. Mendive-Tapia, J. Wang, M. Vendrell, *Peptide Sci.* **113** (2021).
22. F. Zhang, G. Niu, X. Lin, O. Jacobson, Y. Ma, H. S. Eden, Y. He, G. Lu, X. Chen, *Amino Acids* **42** (2012) 2343–2351.
23. Y. Raghuwanshi, H. Etayash, R. Soudy, I. Paiva, A. Lavasanifar, K. Kaur, *J. Med. Chem.* **60** (2017) 4893–4903.
24. L. Mendive-Tapia, C. Zhao, A. R. Akram, S. Preciado, F. Albericio, M. Lee, A. Serrels, N. Kielland, N. D. Read, R. Lavilla, M. Vendrell, *Nat. Commun.* **7** (2016) 10940.
25. R. Subiros-Funosas, L. Mendive-Tapia, J. Sot, J. D. Pound, N. Barth, Y. Varela, F. M. Goñi, M. Paterson, C. D. Gregory, F. Albericio, I. Dransfield, R. Lavilla, M. Vendrell, *Chem.l Comm.* **53** (2017) 945–948.
26. A. H. Negussie, J. L. Miller, G. Reddy, S. K. Drake, B. J. Wood, M. R. Dreher, *J. Control. Release* **143** (2010) 265–273.
27. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10852.
28. A. Parenty, X. Moreau, J. M. Campagne, *Chem. Rev.* **106** (2006) 911–939.
29. U. Schmidt, J. Langer, *J. Pept. Res.* **49** (2009) 67–73.
30. P. M. Hardy, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, *Tetrahedron* **19** (1963) 95–105.
31. R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31** (1992) 1124–1134.
32. F. Cavelier-Frontin, G. Pepe, J. Verducci, D. Siri, R. Jacquier, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 8885–8890.
33. J. A. Smith, L. G. Pease, K. D. Kopple, *Crit. Rev. Biochem.* **8** (1980) 315–399.
34. M. Favre, K. Moehle, L. Jiang, B. Pfeiffer, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 2679–2685.
35. H. Kessler, B. Haase, *Int. J. Pept. Protein Res.* **39** (1992) 36–40.
36. M. Tamaki, S. Akabori, I. Muramatsu, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 10492–10496.
37. Y. Takeuchi, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 5363–5372.
38. J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 15164–15172.
39. J. Chatterjee, D. F. Mierke, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **14** (2008) 1508–1517.
40. A. Amore, R. van Heerbeek, N. Zeep, J. van Esch, J. N. H. Reek, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 1851–1860.

41. E. A. Felnagle, E. E. Jackson, Y. A. Chan, A. M. Podevels, A. D. Berti, M. D. McMahon, M. G. Thomas, *Mol. Pharm.* **5** (2008) 191–211.
42. R. M. Kohli, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Nature* **418** (2002) 658–661.
43. K. Haas, W. Ponikwar, H. Nöth, W. Beck, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37** (1998) 1086–1089.
44. Y. Yep, X. Gao, M. Liu, Y. Tang, G. Tian, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **10** (2003) 571–579.
45. M. Liu, Y. C. Tang, K. Q. Fan, X. Jiang, L. H. Lai, Y. H. Ye, *J. Pept. Res.* **65** (2005) 55–64.
46. C. Guo, A. C. Sedgwick, T. Hirao, J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **427** (2021).
47. A. P. de Silva, S. A. de Silva, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1986) 1709–1710.
48. R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, *Nature* **373** (1995) 663–4.
49. T. Koike, T. Watanabe, S. Aoki, E. Kimura, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 12696–12703.
50. M. T. Bakić, D. Jadreško, T. Hrenar, G. Horvat, J. Požar, N. Galić, V. Sokol, R. Tomaš, S. Alihodžić, M. Žinić, L. Frkanec, V. Tomišić, *RSC Adv.* **5** (2015) 23900–23914.
51. V. P. Solov'ev, A. Yu. Tsivadze, *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* **51** (2015) 1–35.
52. R. S. Macomber, *J. Chem. Educ.* **69** (1992) 375.
53. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **43** (1996) 1739–53.
54. https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/circular-dichroism-spectroscopy/ (datum pristupa 24.10.2022.)
55. A. J. Miles, R. W. Janes, B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.* **50** (2021) 8400–8413.
56. B. M. Bulheller, J. D. Hirst, *Bioinformatics* **25** (2009) 539–540.
57. F. Greco, D. Musumeci, N. Borbone, A. P. Falanga, S. D'Errico, M. Terracciano, I. Piccialli, G. N. Roviello, G. Oliviero, *Molecules* **27** (2022).
58. C. Louis-Jeune, M. A. Andrade-Navarro, C. Perez-Iratxeta, *Proteins* **80** (2012) 374–81.
59. M. J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, *GROMACS User Manual, 5.0,* 2014.
60. B. Bertoša, N. Mrnjavac, *Upute Za Vježbe Iz Računalne Biofizike*, 2015.

61. W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 11225–11236.
62. W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, K. R. Wilson, *J. Chem. Phys.* **76** (1982) 637–649.
63. W. Hoover, *Phys. Rev. A. Gen. Phys.* **31** (1985) 1695–1697.
64. S. Nosé, *Mol. Phys.* **52** (1984) 255–268.
65. G. J. Martyna, M. E. Tuckerman, D. J. Tobias, M. L. Klein, *Mol. Phys.* **87** (1996) 1117–1157.
66. N. Bregović, N. Cindro, L. Frkanec, K. Užarević, V. Tomišić, *Chem. Eur. J.* **20** (2014) 15863–15871.
67. N. A. Besley, J. D. Hirst, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 9636–9644.
68. H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comput. Phys. Commun.* **91** (1995) 43–56.
69. E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model.* **7** (2001) 306–317.
70. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Chem.* **26** (2005) 1701–18.
71. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Compu.t* **4** (2008) 435–47.
72. S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P.M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, *Bioinformatics* **29** (2013) 845–854.
73. M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, *SoftwareX* **1–2** (2015) 19–25.
74. S. Páll, M. J. Abraham, C. Kutzner, B. Hess, E. Lindahl, *Lect. Notes Comput. Sci*. (2015) 3–27.
75. W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, K. R. Wilson, *J. Chem. Phys.* **76** (1982) 637–649.
76. T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 10089–10092.
77. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–8, 27–8.
78. I. M. Pazos, R. M. Roesch, F. Gai, *Chem. Phy.s Lett.* **563** (2013) 93–96.
79. I. Petters, M. Modrušan, N. Vidović, I. Crnolatac, N. Cindro, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Molecules* **27** (2022).

§ 7. SAŽETAK

KOMPLEKSIRANJE ANIONA S METILNIM ESTEROM PENTAFENILALANINA U ACETONITRILU

Lucija Otmačić

Tijekom zadnjih par desetljeća, ciklički peptidi privukli su veliki interes zbog svojih jedinstvenih kemijskih i bioloških svojstava. Sinteza cikličkih peptida i dalje je zahtjevan postupak, posebice u zadnjem koraku u kojem dolazi do ciklizacije linearnog peptida. Neovisno o načinu ciklizacije, na uspješnost tog koraka najviše utječe konformacijska preorganizacija peptida, odnosno sposobnost linearnog prekursora da približi svoje N i C reaktivne krajeve. Ta konformacijska preorganizacija može se postići korištenjem pogodnih templatnih iona. U sklopu ovog rada istražen je afinitet vezanja pentafenilalaninskog metilnog estera (**L**) prema različitim anionima u acetonitrilu pomoću fluorimetrijskih, ^{1}H NMR i CD titracijama kao i simulacijama klasične molekulske dinamike. Opaženo je da je afinitet receptora **L** prema ispitanim anionima bio umjeren. Strukturna analiza kompleksa dobivena računalnim simulacijama upućuje na to da anionski kompleksi peptida **L** poprimaju kvazi-ciklički oblik te da korišteni anioni mogu poslužiti kao efikasni templatni agensi za intramolekulsku glava-rep ciklizaciju peptida. Rezultati također upućuju na to da metilni ester pentafenilalanina može poslužiti služiti i kao senzor aniona zbog svojih fluorescentnih svojstava.

Ključne riječi: linearni peptidi, fluorimetrija, cirkularni dikroizam, ^{1}H NMR, MD simulacije
Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat
Neposredni voditelj: Matija Modrušan, mag. Chem.

§ 8. SUMMARY

ANION COMPLEXATION BY PENTAPHENYLALANINE METHYL ESTER IN ACETONITRILE

Lucija Otmačić

Over the past few decades cyclic peptides have attracted an increasing interest due to their unique chemical and biological properties. The synthesis of cyclic peptides continues to represent a significant synthetic challenge, especially the late-stage cyclization step. Regardless of the macrocyclization strategy, the main factor influencing the success of a ring closure is the conformational preorganization, that is the ability of a linear precursor to bring its N and C reactive termini in close spatial proximity. This conformational preorganization can be achieved by using favourable template ions. In the scope of this work, the binding affinities of pentaphenylalanine methyl ester (**L**) towards several anions in acetonitrile were studied by means of fluorimetric, ^{1}H NMR and CD titrations as well as classical molecular dynamics simulations. It was observed that the affinity of receptor **L** towards examined anions was moderate. The structural analysis of complexes that were given by computational simulations shows that the anion complexes of peptide **L** have quasi-cyclic shape and that used anions can act as efficient template agents for intermolecular head to tail peptide cyclization. The results also showed that pentaphenylalanine methyl ester can serve as an anion sensor due to its fluorescence properties.

Key words: linear peptides, fluorimetry, circular dichroism, ^{1}H NMR, MD simulations
Mentor: Assoc. Prof. Gordan Horvat
Cosupervisor: Matija Modrušan, mag. chem.

§ 9. ZAHVALE

Htjela bih se zahvaliti svom mentoru izv. prof. dr. sc. Gordanu Horvatu na pruženoj prilici pisanja rada za Rektorovu nagradu te na ukazanom povjerenju. Hvala na svim savjetima, strpljenju, prenesenom znanju i vještinama!

Veliko hvala komentoru Matiji Modrušanu, mag. chem. na beskrajnom strpljenju i savjetima te pomoći pri obradi podataka i u labosu.

Hvala i svim djelatnicima Zavoda za fizikalnu kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala i dr.sc. Ivi Crnolatcu na izvedbi CD titracija.

Hvala Luki koji je moja najveća podrška tijekom cijelog studija. Hvala ti što si vjerovao u mene više nego što sam ja sama vjerovala!

§ 10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Lucija Otmačić

Datum rođenja: 29.10.1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje:

2005 – 2013. Osnovna škola Milana Langa, Bregana

2013 – 2017. Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Samobor

2017 – 2021. Prediplomski studij kemije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2021. – danas Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grana Fizikalna kemija i biokemija, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanje u popularizaciji znanosti:

2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

Sudjelovanje u znanstvenim i istraživačkim projektima:

1. L. Otmačić, M. Modrušan, N. Vidović, N. Cindro, I. Crnolatac, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Anion Complexation by Linear Pentaphenylalanine in Acetonitrile,* 7. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, 2022, Knjiga sažetaka str. 62
2. M. Modrušan, L. Otmačić, L. Glazer, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Anion Binding by Linear Penta–Homopeptides Comprised of Amino Acids with Nonpolar Side Chains,* Magnetic Moments in Central Europe, Primošten, 2022, knjiga sažetaka str. 95
3. M. Modrušan, L. Otmačić, N. Vidović, N. Cindro, I. Crnolatac, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Thermodynamics of Anion Binding by Pentaphenylalanine in Acetonitrile*, Solutions in Chemistry, Sveti Martin na Muri, 2022, knjiga sažetaka str. 107