



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lea Pašalić

ADSORPCIJA KATIONSKE-HIDROFOBNIH PEPTIDA NA MODELNE EUKARIOTSKE I PROKARIOTSKE LIPIDNE MEMBRANE

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr.sc. Danijela Bakarić

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Lea Pašalić

**ADSORPTION OF CATIONIC-HYDROPHOBIC
PEPTIDES ON MODEL EUKARYOTIC AND
PROKARYOTIC LIPID MEMBRANES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Danijela Bakarić

Zagreb, 2025



Ova doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za Organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđera Boškovića pod vodstvom dr. sc. Danjele Bakarić u sklopu Poslijediplomskog studija kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2020-02-7669 „Model demijelinizacije na molekularnoj skali pri fiziološkim i patološkim uvjetima“ voditeljice dr. sc. Danjele Bakarić.

Predgovor

[npr. zahvale i sl.; može se nasloviti i drugačije]

SADRŽAJ

SADRŽAJ	IX
SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
1. UVOD.....	15
2. LITERATURNI PREGLED	18
2.1. Biološke membrane.....	18
2.2. Membranski lipidi.....	20
2.3. Membranski proteini	23
2.4. Asimetrija membrane	24
2.5. Modelne lipidne membrane.....	25
2.5.1. Modelne lipidne membrane u otopini	26
2.5.2. Modelne lipidne membrane na nosaču	28
2.6. Fazni prijelazi lipida	29
2.7. Membranski aktivni peptidi.....	32
2.7.1. Antimikrobni peptidi.....	32
2.7.2. Peptidi koji prodiru u stanicu.....	34
2.7.3. Utjecaj bočnih ogranaka arginina i lizina na učinkovitost peptida koji prodiru u stanicu	38
2.7.4. Odabir potencijalnih peptida koji prodiru u stanicu za istraživanje.....	39
2.7.5. Sinteza peptida	40
2.8. Instrumentne tehnike za proučavanje utjecaja peptida na modelne lipidne membrane	42
2.8.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija	42
2.8.2. UV-Vis temperaturno-ovisna spektroskopija.....	44
2.8.3. FTIR-ATR spektroskopija.....	46
2.8.3.1. Primjena FTIR spektroskopije za proučavanje faznih prijelaza lipida	49
2.9. Dinamičko raspršenje svjetlosti.....	51
3. EKSPERIMENTALNI DIO	52
3.1. Materijali	52
3.2. Automatizirana sinteza peptida na čvrstom nosaču	53
3.3. Karakterizacija peptida.....	55
3.3.1. Heptapeptid Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe (R5F2)	55
3.3.2. Heptapeptid Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Phe-Phe (K5F2)	57
3.3.3. Heptapeptid Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp (R5W2)	59

3.3.4. Heptapeptid Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Trp-Trp (K5W2)	60
3.3.5. Heptapeptid Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ile-Ile (R5I2)	61
3.3.6. Heptapeptid Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ile-Ile (K5I2)	62
3.4. Priprema liposoma	63
3.5. DLS i ELS	65
3.6. Razlikovno-pretražna kalorimetrija	65
3.7. Temperaturno-ovisna UV-Vis spektroskopija	66
3.8. FTIR-ATR spektroskopija	66
4. REZULTATI I RASPRAVA	68
4.1. DLS i ELS	68
4.2. Termotropna svojstva modelnih eukariotskih i prokariotskih membrana u prisutstvu kationsko-hidrofobnih peptida	70
4.2.1. Termotropna svojstva modelnih eukariotskih i prokariotskih membrana	71
4.2.2. Eukariotske i prokariotske membrane u prisutnosti R5F2 i K5F2 peptida	73
4.2.3. Eukariotske i prokariotske membrane u prisutnosti R5W2 i K5W2 peptida	75
4.2.4. Eukariotske i prokariotske membrane u prisutnosti R5I2 i K5I2 peptida	77
4.3. FTIR-ATR	79
4.3.1. Molekulska obilježja modelnih eukariotskih i prokariotskih membrana	80
4.3.2. Adsorpcija R5F2 i K5F2 peptida na modelne eukariotske i prokariotske membrane	83
4.3.3. Adsorpcija R5W2 i K5W2 peptida na modelne eukariotske i prokariotske membrane	87
4.3.4. Adsorpcija R5I2 i K5I2 peptida na modelne eukariotske i prokariotske membrane	90
4.4. Utjecaj adsorpcije različitih kationsko-hidrofobnih peptida na modelne eukariotske i prokariotske sustave	94
5. ZAKLJUČAK	97
6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	99
7. LITERATURNI IZVORI	101
8. DODATAK	XIV
8.1. Automatizirana sinteza na čvrstom nosaču (Dodatak poglavlju 3.2.)	XIV
8.2. DLS i ELS (Dodatak poglavlju 4.1.)	XX
8.3. FTIR-ATR (Dodatak poglavlju 4.3.)	XXIV
8.4. Biološka ispitivanja - Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ADSORPCIJA KATIONSKE-HIDROFOBNIH PEPTIDA NA MODELNE EUKARIOTSKE I PROKARIOTSKE LIPIDNE MEMBRANE

Lea Pašalić
Institut Ruđer Bošković

Stanične membrane, složene strukture građene pretežno od lipida i proteina organiziranih u dvosloj, ključne su za odvajanje unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora te za transport različitih tvari između njih. Među potonjima se posebno ističu peptidi kationsko-hidrofobnog karaktera koji unose teret u stanicu bez narušavanja njezine strukture. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati njihovu adsorpciju na modelne eukariotske i prokariotske membrane. Utjecaj peptida na termotropna svojstva membrana praćen je razlikovno-pretražnom kalorimetrijom i temperaturno-ovisnom UV-Vis spektroskopijom, dok je FTIR spektroskopijom ispitana promjena uređenosti lipidnog dvosloja uslijed adsorpcije peptida. Rezultati su pokazali da i kationske i hidrofobne aminokiseline značajno utječu na termotropna i molekulska svojstva membrana na način da doprinose stabilizaciji pojedine faze te da stvaranjem različitih interakcija s molekulama lipida (kao i između sebe) prodiru u lipidni dvosloj do različitih dubina i mijenjaju uređenje ugljikovodičnih lanaca. Ovi rezultati pružaju temelj za daljnji razvoj kationsko-hidrofobnih peptida optimiranih za biomedicinske primjene.

(109 + XXXI stranica, 35 + I slika, 5 + XXXIV tablica, 204 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: adsorpcija/ FTIR spektroskopija/ kationsko-hidrofobni peptidi/ lipidi/ razlikovno-pretražna kalorimetrija/ UV-Vis spektroskopija

Mentor: dr. sc. Danijela Bakarić

Rad prihvaćen: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Davor Kovačević
2. izv. prof. dr. sc. Tomislav Jednačak
3. dr. sc. Ivo Crnolatac, v. zn. sur.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ADSORPTION OF CATIONIC-HYDROPHOBIC PEPTIDES ON MODEL EUKARYOTIC AND PROKARYOTIC LIPID MEMEBRANES

Lea Pašalić
Ruđer Bošković Institute

Cell membranes, complex structures composed mainly of lipids and proteins in a bilayer, are essential for separating the intra- and extracellular environments and for the transport of various compounds between them. Among these, cationic–hydrophobic peptides stand out as they can deliver cargo into the cell without disrupting its structure. The aim of this study was to examine their adsorption onto model eukaryotic and prokaryotic membranes. The influence of peptides on the thermotropic properties of membranes was monitored using differential scanning calorimetry and temperature-dependent UV–Vis spectroscopy, while FTIR spectroscopy was used to investigate changes in lipid bilayer order upon peptide adsorption. The results showed that both cationic and hydrophobic amino acids significantly affect the thermotropic and molecular properties of membranes by stabilizing particular phases and, through various interactions with lipid molecules and each other, penetrate the bilayer to different depths, thereby altering the ordering of hydrocarbon chains. These results provide a basis for further biomedical applications.

(109 pages + XXXI, 35 + I figures, 5 + XXXIV tables, 204 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: adsorption/ cationic-hydrophobic peptides/ differential scanning calorimetry/ FTIR spectroscopy/ lipids/ UV-Vis spectroscopy

Supervisor: Dr. Danijela Bakarić

Thesis accepted: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Reviewers:

Dr. Davor Kovačević, Full Professor
Dr. Tomislav Jednačak, Associate Professor
Dr. Ivo Crnolatac, Senior Research Associate

1. UVOD

Stanične membrane su složene i heterogene, pretežno fluidne i u dvosloje uređene strukture koje su primarno sastavljene od lipida i proteina.¹ Unutar membrana lipidi su asimetrično raspodijeljeni između unutarstaničnog i izvanstaničnog sloja. Premda svi lipidi imaju istu osnovnu strukturu, tj. hidrofilnu polarnu glavu i hidrofobni rep, mogu se razlikovati u strukturi i naboju glave, kao i u duljini i zasićenosti ugljikovodičnih lanaca.² Dinamika i struktura lipida ovisi o nizu faktora kao što su pH, temperatura, tlak, te kemijski potencijal raznih iona.^{3,4} Utjecaj temperature na membranski lipidni dvosloj očituje se u promjeni faze lipidnih dvosloja koji se u membrani mogu naći u, primjerice, gel-fazi (L_{β}), kristaliničnoj fazi (L_c) i fluidnoj fazi (L_{α}), a koje se razlikuju po uređenosti lipidnog dvosloja.⁵ Različiti lipidi uspostavljaju razne vrste interakcija sa susjednim molekulama i mogu se samoorganizirati što dovodi do stvaranja njihovih domena.^{6,7} Lipidne domene definiraju se kao regije membrane koje se od okoline razlikuju po sastavu i fizikalno-kemijskim svojstvima⁸, a imaju važnu ulogu u brojnim staničnim procesima kao što su zakrivljenost membrane, fuzija, stanična signalizacija, te vezanje i interakcija s biomolekulama.^{9,10}

Zbog temeljne važnosti staničnih membrana i procesa koji se odvijaju na njima, kao i zbog izuzetne kompleksnosti i raznolikosti koja otežava izravno istraživanje dostupnim tehnikama, javlja se potreba za istraživanjem jednostavnijih modelnih sustava poput lipidnih dvosloja. Za razliku od eksperimentalnih mjerenja na iznimno strukturno kompleksnim staničnim membranama, njihova se svojstva mogu lakše okarakterizirati, a time i steći uvid u pojedina svojstva staničnih membrana na molekulskoj razini.^{11,12}

Budući da peptidi igraju važnu ulogu u prijenosu bioloških informacija poput signalizacije raznih genetičkih procesa i biokemijskih interakcija, njihova interakcija s lipidnim dvoslojima privlači veliku pažnju.¹³ Peptidi koji prodiru u stanicu (engl. *cell-penetrating peptides*, CPP) su relativno kratki peptidi koji sadrže manje od 30 aminokiselina, uglavnom kationskih i hidrofobnih, te imaju sposobnost prolaska kroz staničnu membranu.¹⁴ Prolazak ovisi o eksperimentalnim uvjetima kao što su temperatura, koncentracija, vrsta stanice, peptida i molekulski teret.¹⁵ Budući da prolazak kroz staničnu membranu predstavlja glavnu prepreku za učinkovitu dostavu nabijenih CPP-ova u stanicu (hidrofobna unutrašnjost membrane je praktički neprohodna za nabijene tvari), javlja se problem pojašnjenja translokacije nabijenih CPP-ova u stanicu. CPP-ovi s kovalentno i nekovalentno vezanim teretom imaju odličan

potencijal primjene u ciljanoj dostavi lijekova,¹⁶ a značajne prednosti CPP-ova kao nosača lijekova su sigurnost primjene, činjenica da nisu invazivni i, za razliku od antimikrobnih peptida (engl. *antimicrobial peptides*, AMP) koji se često koriste kao alternativa antibioticima, ne uništavaju membransku strukturu.¹⁷ Uz to, jednostavna sinteza i karakterizacija čine ih poželjnim kliničkim kandidatima u biomedicini. S obzirom na rastuću potrebu za alternativnim načinima transporta lijekova u stanicu, sve je više istraživanja usmjereno na CPP-ove. Međutim, i dalje postoje prepreke njihovoj biomedicinskoj primjeni. Iako je prošlo 30-tak godina od otkrića CPP-ova, mehanizam njihova ulaska u stanicu još uvijek nije razjašnjen. Predložena su dva glavna modela: (1) endocitoza (aktivan prijenos koji je energetski ovisan o ATP-u) i (2) translokacija peptida kroz membranu (pasivan prijenos koji je energetski neovisan) kojima je oboma zajednički prvi korak, adsorpcija peptida na staničnu membranu.^{18,19} Iako se posljednjih desetljeća provode intenzivna istraživanja na membranama, dublje razumijevanje njihove strukturne organizacije, međusobne interakcije sastavnih dijelova membrana na molekulskoj razini, kao i interakcija lipidnih membrana s peptidima, i dalje je nedovoljno razjašnjeno, posebice na molekulskoj razini. Zbog potencijalne mogućnosti primjene CPP-ova u biomedicinske svrhe, nužno je rasvijetliti njihov mehanizam prodiranja kroz membrane u kojem je prvi korak adsorpcija CPP-ova na membranu. Radi utvrđivanja utjecaja CPP-ova na termička i općenito fizikalno-kemijska svojstva lipidnih membrana, odnosno u karakterizaciji njihovih interakcija na molekulskoj razini, moguće je primijeniti različite kalorimetrijske te spektroskopske tehnike.²⁰

Cilj ovog rada bio je okarakterizirati interakciju modelnih eukariotskih (EU) i prokariotskih (PRO) lipidnih membrana s kratkim potencijalnim CPP-ovima kationsko-hidrofobnog karaktera i rasvijetliti prvi korak njihovog mehanizma prolaska kroz staničnu membranu, odnosno adsorpciju. Pritom su korišteni heptapeptidi načinjeni od bazičnih aminokiselina lizina (K) i arginina (R) te hidrofobnih aminokiselina fenilalanina (F), triptofana (W) i izoleucina (I). Dio korištenih peptida, uključujući R5F2, R5W2 i R5I2, prethodno je opisan u literaturi, gdje je pokazana njihova sposobnost vezanja na membranu, lokalizacije RNA i prolaska kroz lipidni dvosloj.²¹ Njihovi lizinski analozi (K5F2, K5W2 i K5I2) uključeni su u istraživanje s ciljem dodatnog ispitivanja utjecaja vrste kationske skupine i hidrofobne komponente na interakcije s modelnim membranama. U skladu s definiranim ciljem, postavljene su hipoteze da će se adsorpcija peptida razlikovati ovisno o vrsti kationske skupine, odnosno da će peptidi obogaćeni argininom pokazivati drugačiji obrazac adsorpcije u odnosu

na peptide obogaćene lizinom, kao i da će adsorpcija ovisiti o vrsti modelne membrane, tj. razlikovati se između EU i PRO lipidnih sustava.

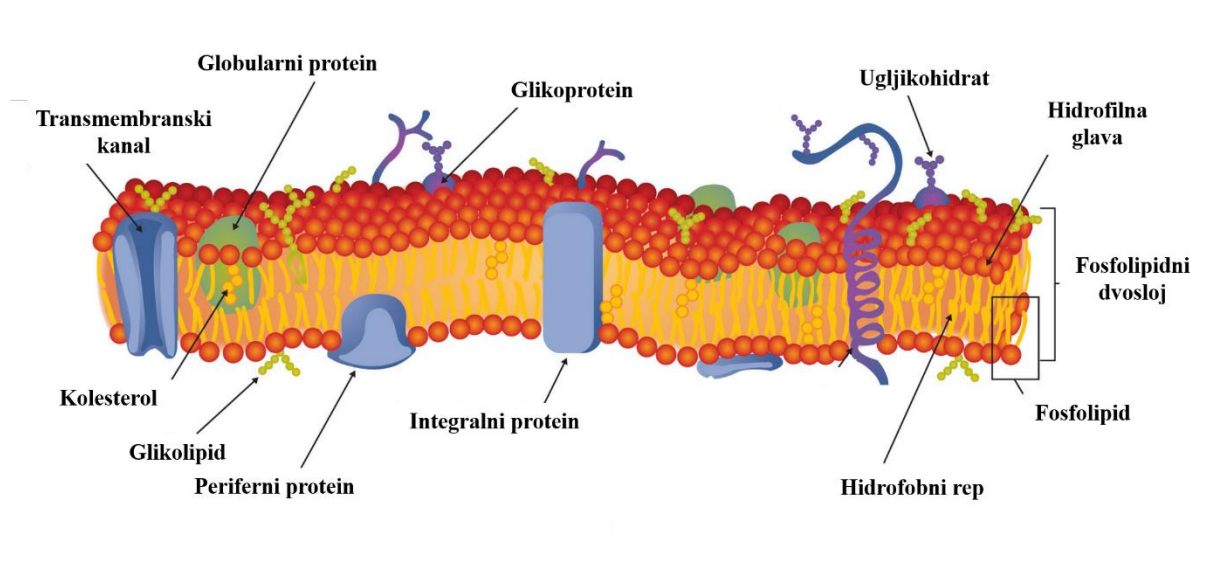
Razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) i temperaturno ovisna UV-Vis spektroskopija koristit će se za ispitivanje termotropnih svojstava svih lipidnih suspenzija, odnosno praćenje promjena termotropnih svojstava lipidnih membrana uzrokovanih dodatkom peptida. FTIR spektroskopija će dati uvid u promjene uređenja lipidnog dvosloja uslijed adsorpcije peptida na površinu membrane. Veličine liposoma i mjerenje zeta-potencijala će se odrediti metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS, and *electrophoretic light scattering*, ELS).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biološke membrane

Biološke membrane predstavljaju temeljne strukturne komponente stanica koje djeluju kao barijere, odvajajući stanični sadržaj od izvanstaničnog prostora. Iako imaju ulogu barijere, membrane nisu potpuno nepropusne i, zahvaljujući svojoj selektivnoj permeabilnosti, omogućuju regulirani ulazak specifičnih molekula potrebnih za stanične funkcije te odstranjivanje neželjenih tvari.³

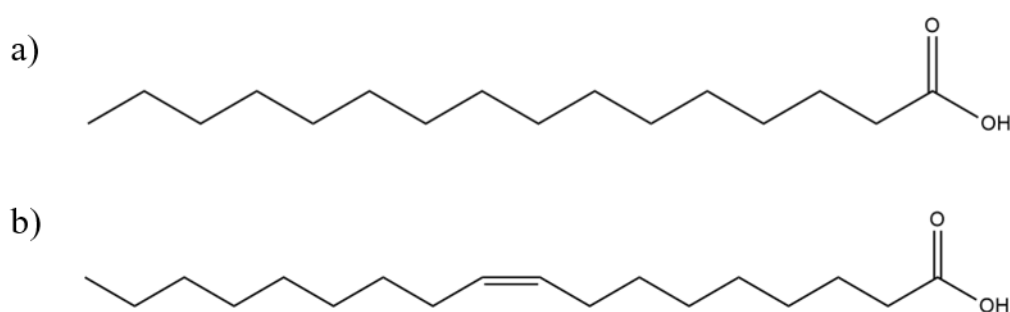
Godine 1972. Singer i Nicolson predložili su revolucionarni koncept poznat kao *model tekućeg mozaika* po kojemu je biološka membrana fleksibilna i dinamička struktura koja primarno sadrži lipide, proteine te manju količinu ugljikohidrata (slika 1).²² Njihov omjer varira ovisno o tipu stanice, no temeljna obilježja su ista: fosfolipidi tvore dvostruki sloj, poznat kao lipidni dvosloj, koji predstavlja osnovni strukturni element membrane; proteini su smješteni unutar lipidnog dvosloja ili vezani na površinu, sudjeluju u različitim staničnim procesima poput transporta, signalizacije i strukturne potpore;⁵ ugljikohidrati se najčešće nalaze na vanjskoj strani membrane gdje su kovalentno vezani za lipide i proteine te imaju ključnu ulogu u prepoznavanju stanica i međustaničnoj komunikaciji.²³ Model tekućeg mozaika implicira da membrana može dinamički prilagoditi svoj sastav i oblik u skladu sa staničnim uvjetima i potrebama.²⁴



Slika 1. Shematski prikaz *modela tekućeg mozaika* (slika preuzeta i modificirana)²⁵

Lipidni dvosloj posjeduje dva ključna svojstva. Prvo, njegova hidrofobna jezgra djeluje kao nepropusna barijera koja sprječava pasivnu difuziju molekula topljivih u vodi, odnosno hidrofilnih tvari, kroz membranu. Međutim, ta osnovna barijerna funkcija značajno se modulira prisutnošću membranskih proteina, koji omogućuju selektivan i reguliran transport specifičnih molekula kroz inače nepropusni lipidni dvosloj.²⁶ Drugo ključno svojstvo je stabilnost dvoslojne strukture. U vodenoj sredini lipidi spontano formiraju lipidni dvosloj, strukturu u kojoj su hidrofobni ugljikovodični repovi masnih kiselina usmjereni prema unutrašnjosti, dok su polarne glave okrenute prema vodi.²⁷ Stabilnost dvoslojne strukture održava se prvenstveno hidrofobnim interakcijama i van der Waalsovima silama među ugljikovodičnim lancima lipida. Za hidrofobnost lipida zaslužni su lanci masnih kiselina.⁴

Masne kiseline su spojevi s dugim ugljikovodičnim lancima koji na kraju nose karboksilnu skupinu. One mogu biti zasićene ili nezasićene, ovisno o prisutnosti (i broju) dvostrukih veza u ugljikovodičnom lancu. Zasićene masne kiseline sadrže isključivo jednostruke veze, dok nezasićene mogu imati jednu ili više dvostrukih veza (slika 2). Nezasićene masne kiseline imaju niža tališta od zasićenih masnih kiselina s jednakim brojem C-atoma. Nezasićenost se dodatno razlikuje prema *cis* i *trans* konfiguraciji, a većina prirodnih nezasićenih masnih kiselina ima *cis* konfiguraciju. Duljina alkilnog lanca te stupanj zasićenosti masnih kiselina značajno utječu na fizikalno-kemijska svojstva lipida, a time i na fluidnost, debljinu i stabilnost membrana.²⁸ U živim organizmima masne kiseline obično sadrže između 14 i 24 ugljikova atoma, pri čemu su najzastupljenije one sa 16 i 18 atoma ugljika.^{29,30}

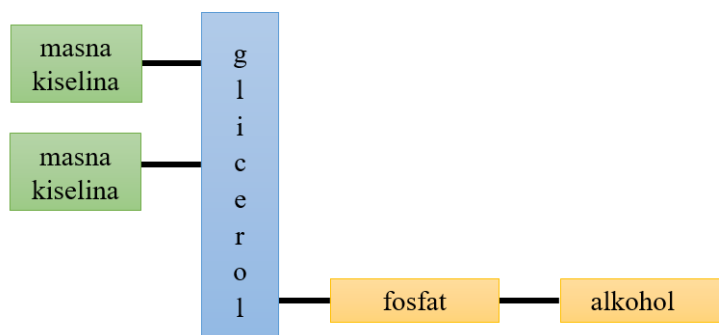


Slika 2. Struktura zasićene, odnosno nezasićene masne kiseline: a) palmitinska, b) oleinska kiselina

2.2. Membranski lipidi

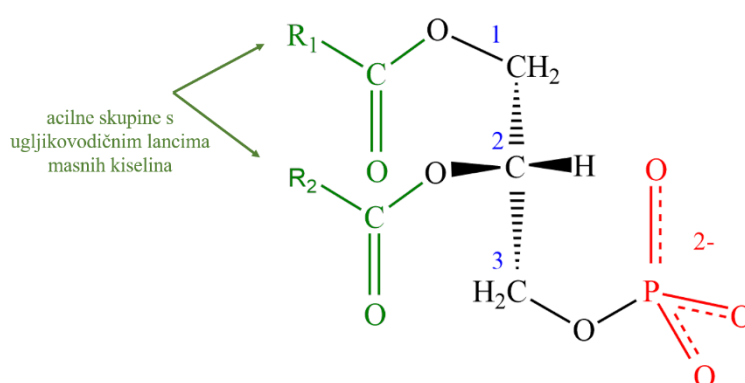
Tri glavne skupine membranskih lipida jesu: fosfolipidi, glikolipidi i kolesterol.

Prva glavna skupina membranskih lipida su fosfolipidi. Molekula fosfolipida je sastavljena od četiri komponente: jedne ili više masnih kiselina, glicerolne okosnice, fosfata te polarne alkoholne skupine vezane na fosfat (slika 3).³¹



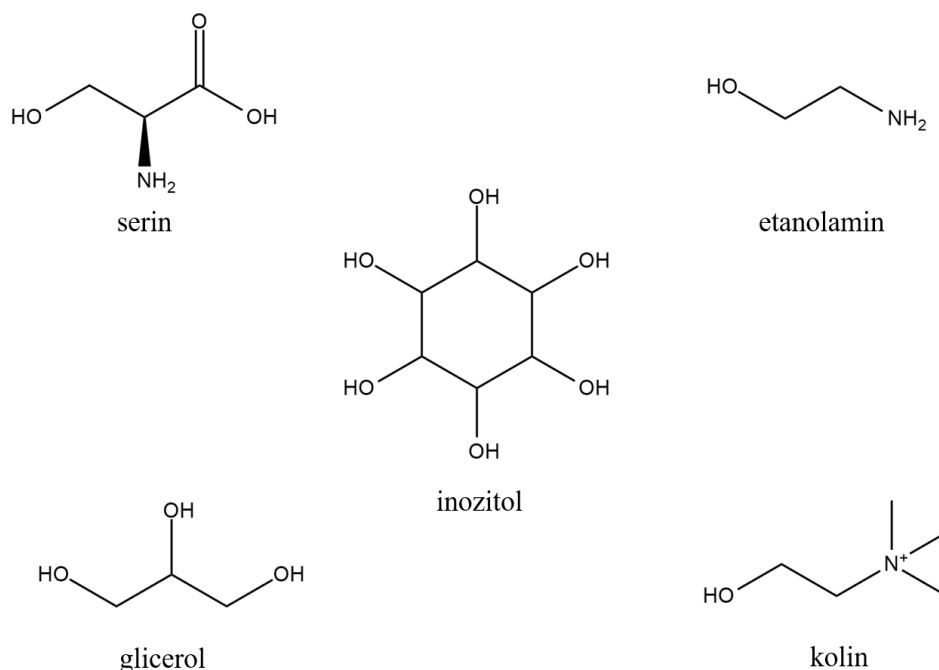
Slika 3. Shematski prikaz molekule fosfolipida

Masna kiselina osigurava hidrofobnu barijeru, dok ostatak molekule ima hidrofilna svojstva. U molekulama fosfoglicerida, hidroksilne skupine na C-1 i C-2 položajima glicerola esterificirane su karboksilnim skupinama dviju masnih kiselina. Hidroksilna skupina na položaju C-3 esterificirana je s fosfornom kiselinom.³² Najjednostavniji predstavnik ove skupine je fosfatidat (diacilglicerol-3-fosfat) (slika 4).



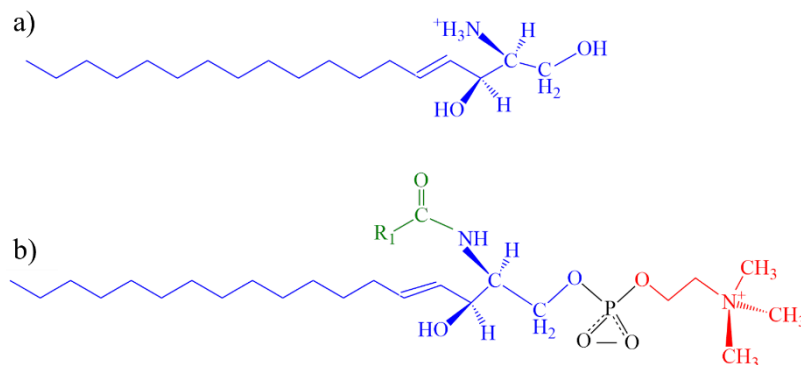
Slika 4. Strukturna formula fosfatidata (diacilglicerol-3-fosfat)

Većina biološki značajnih fosfoglicerolipida nastaje derivatizacijom fosfatidata, pri čemu se stvara esterska veza između fosfatne skupine i hidroksilne skupine nekog alkohola, uključujući aminokiselinu serin, kao i etanolamin, kolin, glicerol i inozitol (slika 5).^{2,33}



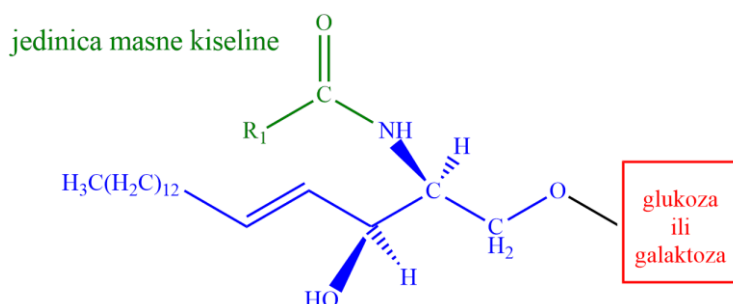
Slika 5. Strukture: serina, etanolamina, inozitola, glicerola i kolina

Sfingomijelin je membranski lipid koji, za razliku od fosfoglicerida, nije derivat glicerola, već se temelji na sfingozinu, dugolančanom, nezasićenom aminoalkoholu (slika 6). U njegovoj strukturi, amino-skupina sfingozinske okosnice tvori amidnu vezu s masnom kiselinom, dok je primarna hidroksilna skupina sfingozina esterificirana fosforilkolinom.³⁴



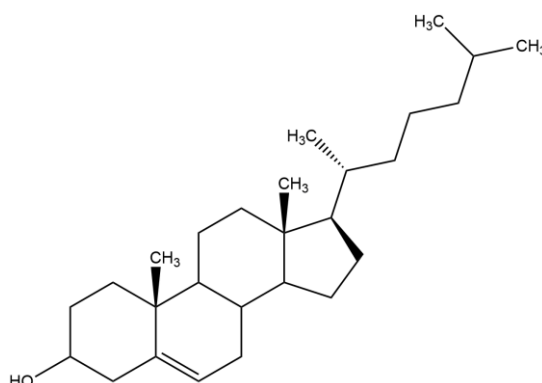
Slika 6. Strukture: a) sfingozina i b) sfingomijelina

Osim lipida koji sadrže fosfatne skupine, biološke membrane također uključuju lipide s ugljikohidratnim komponentama, poznate kao glikolipidi. Poput sfingomijelina, i glikolipidi su derivati sfingozina, pri čemu je aminoskupina sfingozinske okosnice acilirana masnom kiselinom.³⁵ Ono što ih razlikuje od sfingomijelina je struktura vezana na primarnu hidroksilnu skupinu sfingozina; kod glikolipida to su jedan ili više šećernih ostataka. Najjednostavniji predstavnik ove skupine je cerebrozid (slika 7).³⁶



Slika 7. Struktura cerebrozida

Kolesterol pripada trećoj glavnoj skupini membranskih lipida te spada u steroide, koje karakterizira jezgra sastavljena od četiri međusobno spojena ugljikovodična prstena (slika 8). Na jednom je kraju molekule prisutan hidrofobni ugljikovodični lanac, dok se na suprotnom nalazi hidroksilna skupina. U strukturi membrane, kolesterol se usmjerava paralelno s masnim kiselinama fosfolipida, pri čemu njegova hidroksilna skupina interagira s polarnim glavama fosfolipidnih molekula.³⁷ Kolesterol je prisutan u većini životinjskih membrana, dok u bakterijskim staničnim membranama izostaje.³⁸

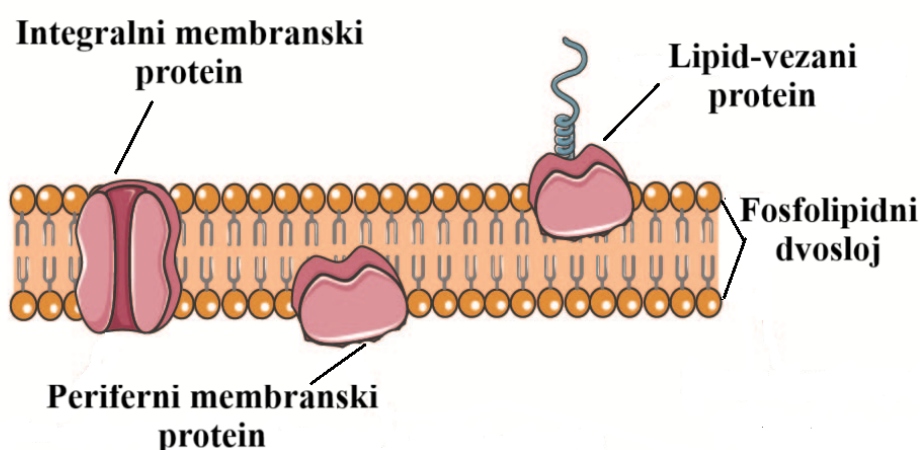


Slika 8. Struktura kolesterola

2.3. Membranski proteini

Membranski proteini su odgovorni za većinu procesa u membranama, uključujući transport molekula³⁹, staničnu signalizaciju⁴⁰, enzimske reakcije te interakcije s drugim stanicama.⁴¹ Sadržaj proteina u membranama značajno varira ovisno o tipu membrane i njezinoj funkciji; primjerice, u mijelinskoj ovojnici ih ima manje od 25 %, dok ih u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani ima više od 70 %.^{42,43} Podijeljeni su na integralne ili transmembranske i periferne proteine, ovisno o tome nalaze li se u membrani ili na površini (slika 9).⁴⁴

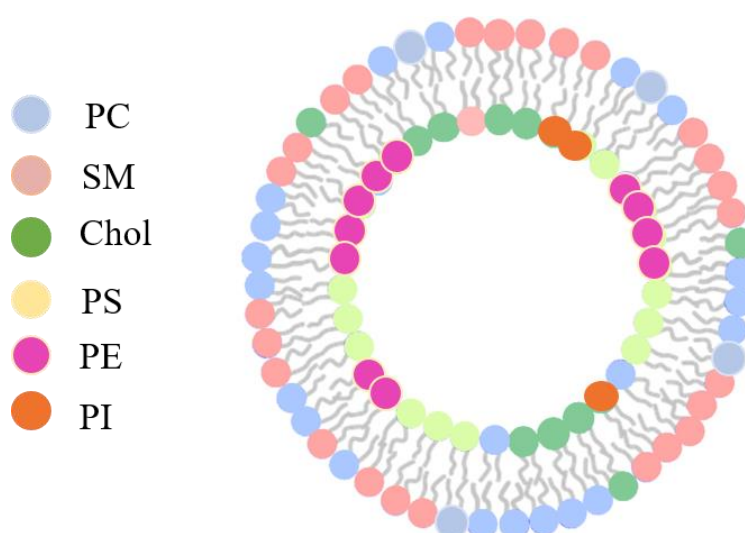
Integralni proteini su amfipatske molekule koje se svojim hidrofobnim dijelovima vežu na hidrofobne ugljikovodične lance masnih kiselina i većinom se protežu kroz čitav presjek membrane. Brojni integralni proteini djeluju kao ionski kanali i proteinske pumpe te su ključni u prijenosu tvari kroz membranu.⁴⁵ Nasuprot njima, periferni proteini vezani su na membranu pretežno elektrostatskim i vodikovim vezama s polarnim glavama lipida. Zaduženi su za staničnu signalizaciju, strukturnu stabilnost, ali i povezivanje membrane s citoskeletom.⁴⁶ Brojni periferni proteini su vezani na integralne proteine, bilo na citoplazmatskoj ili vanjskoj strani membrane, a neki su pak usidreni u lipidni dvosloj svojim kovalentno vezanim hidrofobnim lancem.⁴⁷ Integralni i periferni proteini su zaduženi za gotovo sve funkcije membrane osim za selektivnu propusnost za koju su zaduženi lipidi.



Slika 9. Shematski prikaz lipidnog dvosloja s membranskim proteinima (slika preuzeta i modificirana)⁴⁸

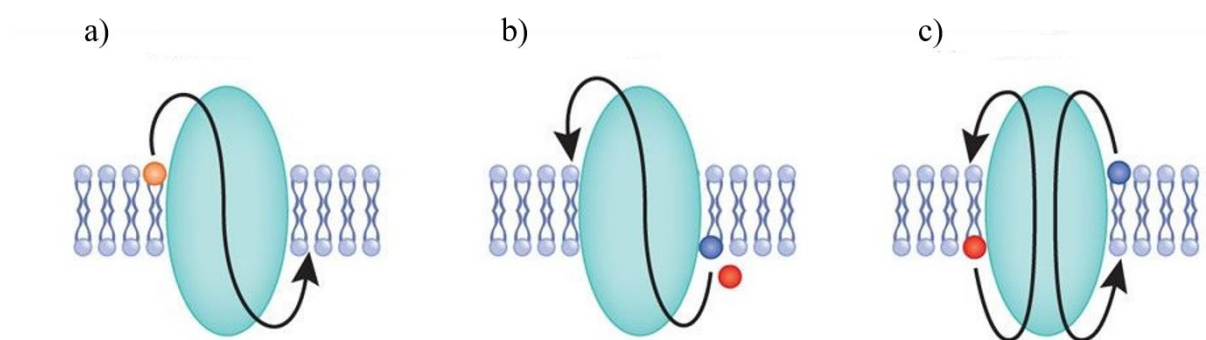
2.4. Asimetrija membrane

Jedno od karakterističnih obilježja svih bioloških membrana jest asimetrija u sastavu lipida između slojeva lipidnog dvosloja. Iako se većina fosfolipida nalazi u oba sloja membrane, njihova je raspodjela neravnomjerna, određeni fosfolipidi češće su zastupljeni u jednom sloju nego u drugom (slika 10). U eukariotskim stanicama vanjski sloj sadrži: sfingomijelin (engl. *sphingomyelin*, SM) i fosfatidilkolin (engl. *phosphatidylcholine*, PC) dok se u unutarnjem sloju nalaze: fosfatidiletanolamin (engl. *phosphatidylethanolamine*, PE) te negativno nabijeni fosfatidilserin (engl. *phosphatidylserine*, PS) i fosfatidilinozitol (engl. *phosphatidylinositol*, PI).^{49,50} Kolesterol (engl. *cholesterol*, Chol) raspoređen je u oba sloja iako je dominantniji u unutarnjem sloju.⁵¹ Asimetrija je primjećena i u membranama bakterija iako je kvantificiranje znatno složenije nego u eukariota. U unutarnjem sloju nalaze se PI i PE, dok je fosfatidilglicerol (engl. *phosphatidylglycerol*, PG) dominantan u vanjskom sloju. Kardiolipin (engl. *cardiolipin*, Cl), ravnomjereno je raspoređen između dva sloja.⁵² Asimetrija membrane utječe na brojna svojstva lipidnog dvosloja, uključujući membranski potencijal⁵³, površinski naboj, permeabilnost⁵⁴, kao i oblik membrane i stabilnost.⁵⁵ Gubitak asimetrije dovodi do fizioloških posljedica. Na primjer, pojava PS-a u vanjskom sloju znak je apoptoze stanice⁵⁶, povezana je i s koagulacijom krvi i adhezijom eritrocita^{57,58}, a nedavno je zabilježena i kod stanica raka.⁵⁹



Slika 10. Shematski prikaz asimetrije u sastavu lipida između slojeva lipidnog dvosloja (slika preuzeta i modificirana)⁶⁰

Asimetrična membrana predstavlja sustav koji nije u termodinamičkoj ravnoteži i stoga je održavanje asimetrije aktivan proces koji zahtjeva adenosin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*, ATP). Taj se proces odvija uz pomoć membranskih proteina, poznatih kao flipaze (engl. *flippases*) i flopaze (engl. *floppases*).^{5,61} Flopaze kataliziraju translokaciju lipida iz unutarnjeg u vanjski sloj, a flipaze su zadužene za translokaciju iz vanjskog u unutarnji sloj (slika 11).⁶² Skramblaze (engl. *scramblases*) također sudjeluju u regulaciji sastava lipidnog dvosloja putem nespecifičnog transporta lipida između slojeva membrane.⁶³



Slika 11. Shematski prikaz mehanizma djelovanja: a) flipaza, b) flopaza i c) skramblaza (slika preuzeta i modificirana)⁶³

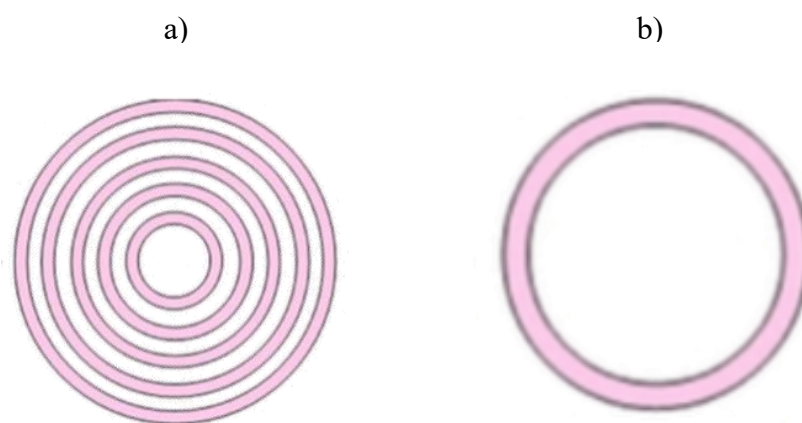
2.5. Modelne lipidne membrane

Stanične membrane predstavljaju izrazito složene sustave, čak i kada se u obzir uzmu isključivo njihove lipidne komponente. Zbog visoke kompleksnosti sastava i otežane izolacije, biološke membrane često su nepogodne za izravnu karakterizaciju biokemijskim i biofizikalnim metodama.¹²

Sklonost fosfolipida da se spontano organiziraju u dvoslojne strukture iskorištena je za razvoj pojednostavljenih sustava, tzv. modelnih lipidnih membrana, koje se široko primjenjuju u eksperimentalne i istraživačke svrhe. Takvi sustavi omogućili su stjecanje uvida u različita svojstva lipidnih dvosloja, uključujući fazne prijelaze, organizaciju membrane, utjecaj kolesterola na strukturu i dinamiku, kao i interakcije lipida s proteinima, peptidima i farmakološkim spojevima.⁵² Biomimetičke lipidne membrane dijele se u dvije kategorije: i) membrane u otopini i ii) membrane na nosaču.⁶⁴

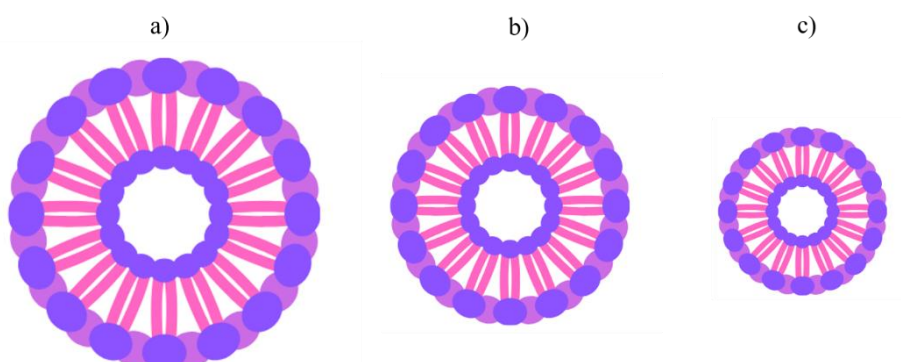
2.5.1. Modelne lipidne membrane u otopini

Liposomi (lipidne vezikule) su sferične strukture sastavljene od jednog ili više lipidnih dvosloja koji okružuju jedan ili više vodenih odjeljaka. Svaki lipidni dvosloj omeđen je vodenim okolišem s unutarnje i vanjske strane liposoma. Ovisno o broju dvosloja, liposomi se dijele na unilamelarne (engl. *unilamellar vesicles*, UV), koje sadržavaju samo jedan dvosloj te na multilamelarne (engl. *multilamellar vesicles*, MLV), koje sadrže više koncentričnih dvosloja (slika 12).¹¹ (U nastavku teksta će se liposomi i vezikule koristiti kao sinonimi).



Slika 12. Shematski prikaz: a) multilamelarne vezikule (MLV)
b) unilamelarne vezikule (UV)

S obzirom na veličinu, liposomi se klasificiraju na male (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV) (<100 nm), velike (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV) (>100 nm) i gigantske (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUV) (≥ 1000 nm) vezikule (slika 13).¹¹



Slika 13. Shematski prikaz: a) GUV, b) LUV i c) SUV

Zbog strukturne sličnosti s fosfolipidnim dvoslojem staničnih membrana, liposomi imaju široku primjenu u različitim aspektima bioloških istraživanja, ponajprije kao modelni sustavi bioloških membrana. Osim toga, koriste se kao nosači lijekova jer mogu enkapsulirati hidrofilne spojeve unutar vodenog odjeljka te hidrofobne unutar lipidne domene, čime omogućuju učinkovitu dostavu različitih bioaktivnih molekula.⁶⁵ Izvan biomedicinskih primjena, liposomi nalaze primjenu i u kozmetičkoj industriji⁶⁶, kao i u istraživanjima interakcija lipida s proteinima, peptidima i drugim biološki relevantnim molekulama. Njihova veličina, lamelarnost, površinski naboj i kemijski sastav mogu se precizno kontrolirati, što omogućuje njihovu prilagodbu specifičnim eksperimentalnim i terapijskim zahtjevima.

Proces pripreme liposoma započinje otapanjem odabranog lipida u odgovarajućem organskom otapalu, nakon čega slijedi uparavanje otapala pri čemu se formira tanki lipidni film. Odabir otapala ovisi o topljivosti lipida; najčešće se koriste kloroform, metanol ili njihova mješavina, dok dodatak male količine vode može poboljšati otapanje, osobito u slučaju glikoziliranih lipida. Nastali lipidni film se hidratizira u puferu, pri čemu se spontano formiraju MLV-ovi. Kako bi se dobili LUV-ovi, suspenzija MLV-ova se podvrgava ekstruziji kroz polikarbonatne membrane definiranog promjera pora, obično uz višestruko (najmanje 31 puta) protiskivanje kroz ekstruder. Ekstrudiranje se odvija na grijaćem bloku, pri temperaturi višoj od temperature glavnog faznog prijelaza (T_m) lipida od kojeg se suspenzija sastoji. Za pripremu SUV-ova, lipidna suspenzija se sonificira, čime se razbijaju višeslojne strukture i omogućuje formiranje manjih, ujednačenijih unilamelarnih vezikula.⁶⁷

GUV-ovi se mogu pripremiti metodom pasivnog bubrenja (engl. *natural swelling*) ili elektroformacijom.⁶⁸ Metoda pasivnog bubrenja podrazumijeva nanošenje lipidne otopine na površinu agaroznog ili polivinil alkoholnog (engl. *polyvinyl alcohol*, PVA) gela, nakon čega slijedi sušenje (uobičajeno u vakuumu) i rehidratacija. Rehidratacijom dolazi do spontanog formiranja GUV-ova uslijed bubrenja lipidnog filma u prisutnosti vode.⁶⁹ S druge strane, metoda elektroformacije uključuje nanošenje lipidnog filma na vodljivu površinu elektroda, najčešće na staklo obloženo indij–kositrenim oksidom (engl. *indium tin oxide*, ITO).⁷⁰ Nakon toga se lipidni film suši u vakuumu kako bi se uklonilo otapalo. Dvije takve elektrode s lipidnim filmom postavljaju se paralelno, jedna nasuprot drugoj, a između se dodaje vodena otopina. Primjenom izmjeničnog električnog polja potiče se rehidratacija lipidnog filma i olakšava proces stvaranja GUV-ova.

2.5.2. Modelne lipidne membrane na nosaču

Lipidni dvosloj na nosaču (engl. *supported lipid bilayer*, SLB) je jednostavni model stanične membrane koji se sastoji od jednog lipidnog dvosloja fiksiranog na hidrofobnom nosaču. Jedna od glavnih prednosti SLB sustava jest njihova kompatibilnost s brojnim površinski osjetljivim tehnikama, kao što su fluorescencijska mikroskopija i mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM).⁷¹ Uobičajeni materijali koji se koriste kao nosači su: staklo, silicijev dioksid (silika) i tinjac.⁷² Vezanje lipidnog dvosloja na podlogu može se ostvariti različitim mehanizmima, uključujući izravnu adsorpciju, formiranje kovalentnih veza i vezanje ionskim mostovima. Lipidni dvosloj ne mora nužno biti u izravnom kontaktu s podlogom, već može biti fizički odvojen tankim slojem vode ili hidratiziranog polimera.⁷³

Za pripremu SLB-ova razvijene su brojne tehnike od kojih su najčešće korištene Langmuir-Blodgettova depozicija i raspad liposoma. Langmuir-Blodgettova depozicija postiže se prijenosom molekula lipida iz međupovršinskog prostora na granici faza zrak/voda na čvrsti nosač. Formiranje slojeva na podlozi odvija se u vertikalnom smjeru, a ukupan broj slojeva ovisi o kemijskom sastavu lipida i podloge te o broju uranjanja, pri čemu svako uranjanje rezultira taloženjem homogenog lipidnog sloja.⁷⁴ Kada je riječ o pripremi SLB-ova metodom raspada liposoma, postupak uključuje adsorpciju lipidnih vezikula na čvrstu podlogu, nakon čega slijedi njihovo spontano pucanje. Predloženo je nekoliko mehanizama stvaranja lipidnog dvosloja na nosaču koji uključuju pucanje liposoma, a to su: spontano pucanje individualnih liposoma, spajanje susjednih liposoma, interakcija liposoma s adsorbiranim dvoslojem i kooperativna interakcija susjednih liposoma.⁷¹ Od svih dostupnih metoda raspad liposoma smatra se najjednostavnijim, najpristupačnijim i široko primjenjivim pristupom u pripravi SLB sustava, budući da ne zahtijeva sofisticiranu opremu, a omogućuje visoku ponovljivost i kontrolu nad formiranjem membrane.⁷⁵

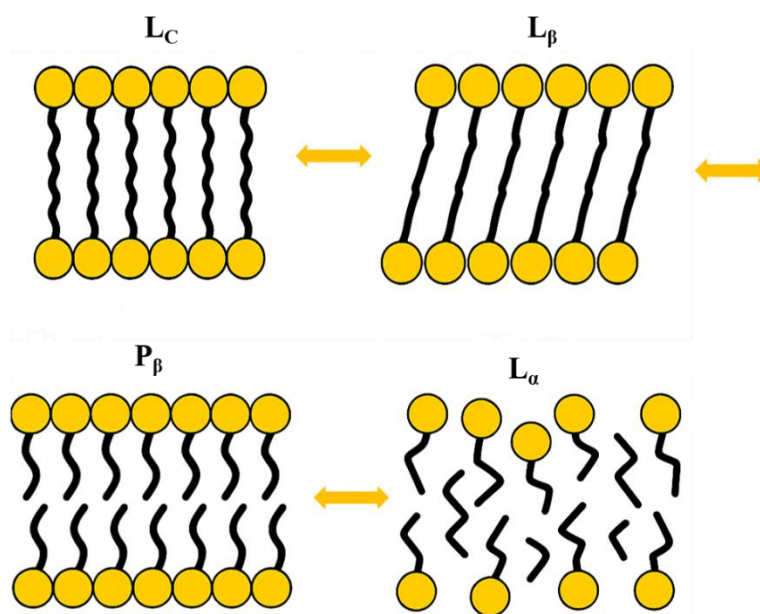
2.6. Fazni prijelazi lipida

Sposobnost lipida da se lateralno kreću unutar lipidnog dvosloja ukazuje na njihovu fluidnu prirodu.³ Stupanj fluidnosti membrane ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući pH⁷⁶, temperaturu⁷⁷, tlak⁷⁸ te kemijski potencijal prisutnih iona.⁷⁹ Van der Waalsove sile i hidrofobni učinak potiču agregaciju nepolarnih repova fosfolipida unutar dvosloja.⁸⁰ U vodenom mediju lipidi mogu, ovisno o koncentraciji, tvoriti različite agregatne strukture, uključujući monomere, micle, lamelarnu fazu (dvosloj), kao i kubičnu i inverznu heksagonsku fazu. U fiziološkim uvjetima, pri višim koncentracijama lipida, najčešće prevladava lamelarna faza, karakteristična za biološke membrane. Ovisno o temperaturi, lipidni dvosloj može postojati u više različitih strukturnih organizacija.³

Pri nižim temperaturama, lipidni dvosloj se nalazi u kristaliničnoj (L_c) fazi. U toj fazi lipidni je dvosloj čvrsta, uređena struktura, a svi lanci masnih kiselina nalaze se u *trans* konformaciji.⁸¹ S porastom temperature, lipidni dvosloj prelazi iz L_c u gel-fazu ($L_{\beta'}$). U gel-fazi lanci masnih kiselina uglavnom su u *trans*-konformaciji kao i u L_c fazi. Oznaka u indeksu (') označava da lipidi mogu biti pod određenim nagibom, koji ovisi o fosfatnoj glavi određenog lipida. Na primjer, određeni fosfokolini (PC) su u ovoj fazi nagnuti pod kutem od 30° u odnosu na normalu membrane, dok kod npr. fosfatidiletanolamina (PE) nema nagiba (L_{β}).⁸² Daljnjim porastom temperature određeni PC lipidi prelaze u valovitu fazu ($P_{\beta'}$) (engl. *ripple phase*) koja je karakteristična po pojavi valova na površini dvosloja. Oko uzroka pojave valova na površini lipidnog dvosloja još uvijek ne postoji suglasje i na snazi su dvije hipoteze.⁸³ Prema prvoj hipotezi valove uzrokuje postojanje lipida koji se nalaze u $L_{\beta'}$ i L_{α} fazama.^{84,85} Prema drugoj hipotezi lipidi se nalaze i dalje u $L_{\beta'}$ fazi, no pojavu valova mogu uzrokovati sljedeće pojave: longitudinalno pomicanje pojedinih molekula lipida uslijed hidratacije površine lipidnog dvosloja⁸⁶, promjene u njihovom okruženju/orijentaciji pojedinih djelova lipidnih molekula, promjene u nagibu⁸⁷, kao i moguća interdigitacija⁸⁸ koja dovodi do lokalnih razlika u debljini domena. Prema Cevcovoju teoriji, do pojave valovite faze dolazi uslijed povećane solvatacije polarnih skupina te parcijalne interdigitacije ugljikovodičnih lanaca uzrokovane njihovim longitudinalnim pomakom.^{89,90} Ova faza nastaje prije glavnog faznog prijelaza pri temperaturi pretprijelaza (engl. *pretransition*, T_p), karakterizira je manji stupanj uređenosti nego prijašnje faze, ali i dalje je većina lipida u ovoj fazi u *trans*-konformaciji.⁸⁶ Pojava ove faze primarno ovisi o polarnoj skupini lipida pa se tako javlja kod lipida s kolinskom skupinom (PC, SM) te kod fosfatidilglicerola, a sekundarno ovisi i o duljini lipidnog lanca.⁹¹ Premda se kod

fosfatidiletanolamina valovita faza ne pojavljuje,⁹² nedavna istraživanja multilamelarnih agregata načinjenih od 1,2-dipalmitoil-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamina pokazala su da se desetak stupnjeva prije glavnog faznog prijelaza javljaju intenzivne fluktuacije u zakrivljenosti na površini lipidnog dvosloja.⁹³ Iako se većina istraživanja ove faze provodi na MLV-ovima, određeni radovi upućuju na to da se valovi mogu pojaviti i na površini LUV-ova. U potonjem slučaju, uočen je značajno slabiji prijelaz koji se nerijetko uočava tek kao mali pomak od bazne linije u DSC krivulji.^{82,94} Kod MLV-ova, prisutnost valovite faze moguće je relativno jednostavno detektirati primjenom difrakcijskih metoda, dok je u slučaju LUV-ova to znatno otežano zbog prisutnosti nekoherentnog raspršenja zračenja.⁹⁵

Temperatura pri kojoj nastupa glavni fazni prijelaz naziva se temperatura taljenja ili mekšanja (T_m) te označava pojavu fluidne faze (L_α). U ovoj fazi smanjena je uređenost lanaca te dolazi do gubitka (najčešće) uređene heksagonske slagaline, a zbog slabljenja van der Waalsovih interakcija među ugljikovodičnim lancima dolazi do promjene konformacije metilenskih skupina ($-\text{CH}_2$) iz *trans* u *gauche*. Temperatura taljenja ovisi o duljini i stupnju zasićenosti acilnih lanaca; specifično, dulji i potpuno zasićeni lanci omogućuju jače međulančane interakcije te rezultiraju višom T_m .



Slika 14. Shematski prikaz faznih prijelaza lipida u lipidnom dvosloju (preuzeto i prilagođeno)⁹⁶

Specifično, ravni, linearni, zasićeni ugljikovodični lanci omogućuju gusto pakiranje i snažne međulančane interakcije. Nasuprot tome, *cis*-dvostruke veze u nezasićenim masnim kiselinama uvode pregib u lanac, što narušava uredno međusobno slaganje lanaca i rezultira smanjenjem T_m . Uz stupanj zasićenosti, i duljina acilnog lanca utječe na T_m , dulji lanci omogućuju veće područje za međulančanu interakciju i stoga pridonose višoj temperaturi prijelaza.^{97,98} Osim acilnih lanaca, na T_m utječe i polarna glava lipida zbog međumolekulskih interakcija koje može stvarati s okruženjem, bilo da su u pitanju druge molekule lipida ili molekule vode. U potonjem slučaju svakako su najvažnije za istaknuti vodikove veze.⁹⁹

Kolesterol je jedan od ključnih regulatora fluidnosti staničnih membrana kod sisavaca. Molekula kolesterola sastoji se od krute steroidne jezgre s hidroksilnom skupinom na jednom kraju i fleksibilnog ugljikovodičnog repa na drugom. U lipidni dvosloj kolesterol se umeće tako da mu je glavna os okomita na ravninu membrane. Hidroksilna skupina kolesterola usmjerena je prema površini dvosloja, gdje može tvoriti vodikove veze s polarnim glavama fosfolipida, dok se rep uranja u hidrofobnu jezgru membrane. Zahvaljujući svojoj strukturi, kolesterol ostvaruje specifične interakcije s fosfolipidima. Ove interakcije dovode do smanjenja ukupne fluidnosti membrane i smanjuju njezinu podložnost faznim prijelazima. Na taj način, kolesterol djeluje kao stabilizator membranske strukture, osobito pri promjenama temperature.¹⁰⁰

2.7. Membranski aktivni peptidi

Peptidi koji u interakciji s membranom narušavaju njezinu strukturu, prolaze kroz nju ili se usidre na njezinoj površini i uzrokuju fuziju poznati su kao membranski aktivni peptidi. Dijelev se na dvije glavne skupine: antimikrobni peptidi (engl. *antimicrobial peptides*, AMP) i peptidi koji prodiru u stanicu (engl. *cell penetrating peptides*, CPPs).¹⁰¹

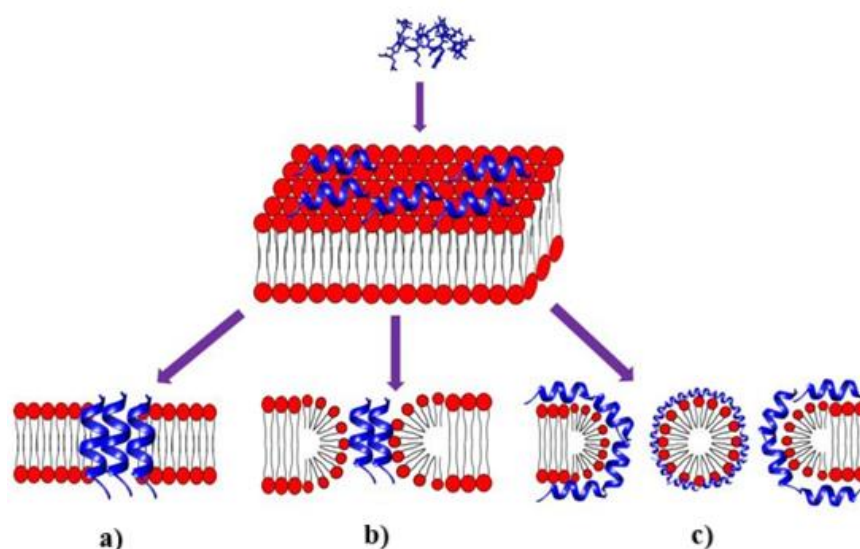
2.7.1. Antimikrobni peptidi

Antimikrobni peptidi pokazali su se iznimno važnima u borbi protiv bakterija, virusa, gljivica i parazita zahvaljujući sposobnosti da djeluju direktno na mikrobne membrane ili da inhibiraju ključne stanične funkcije.¹⁰² Otkriće prvog antimikrobnog peptida, gramicidina, 1939. godine označilo je početak sustavnog istraživanja AMP-ova, koji od tada privlače sve veću pažnju zbog globalnog problema porasta antimikrobne rezistencije.¹⁰³ AMP-ovi pokazuju široki spektar antimikrobne aktivnosti prema: Gram-pozitivnim bakterijama, Gram-negativnim bakterijama, virusima i gljivicama.¹⁰⁴

Većina AMP-ova su kationski oligopeptidi koji sadrže između 5 i 100 aminokiselina te, budući da sadrže hidrofilne i hidrofobne domene, imaju amfipatska svojstva.¹⁰⁵ Pozitivni naboj AMP-ova ključan je za njihovu selektivnu interakciju s negativno nabijenom površinom membrana, što dovodi do nakupljanja peptida na površini membrane putem elektrostatskih privlačnih sila.^{106,107} S druge strane, hidrofobni segmenti peptida omogućuju dodatnu interakciju s hidrofobnim unutarnjim dijelovima lipidnog dvosloja. Ova složena interakcija s membranom može uzrokovati značajnu strukturnu reorganizaciju koja proizlazi iz specifičnih interakcija između peptida i lipida.¹⁰⁸

S obzirom na strukturne karakteristike, antimikrobni peptidi mogu se podijeliti u četiri osnovne skupine. Prvu skupinu čine linearni peptidi koji u prisutnosti membrane poprime konformaciju α -uzvojnice, dok drugu skupinu čine peptidi s β -pločom, čiju strukturu stabiliziraju disulfidne veze. Treću skupinu čine linearni peptidi izdužene, nestrukturirane konformacije, koji često djeluju putem mehanizama ovisnih o fleksibilnosti njihove strukture. Četvrtu skupinu predstavljaju kombinirane strukture koje sadrže i α -uzvojnice i β -ploče, pri čemu takva konformacija može doprinijeti povećanoj stabilnosti i većoj specifičnosti djelovanja.^{107,108}

Postoji nekoliko modela koji objašnjavaju mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida na fosfolipidni dvosloj (slika 15). Prema modelu bačvastog kanala (engl. *barrel-stave model*), peptidi se ugrađuju u membranu tako da se njihovi hidrofobni dijelovi usmjeravaju prema lipidnoj jezgri, ostvarujući stabilne interakcije s lancima masnih kiselina fosfolipida, dok su hidrofilni dijelovi orijentirani prema unutrašnjosti pore koja se formira unutar dvosloja. Time dolazi do stvaranja transmembranskog kanala kroz koji može doći do curenja staničnog sadržaja.¹⁰⁹ Model toroidalnog kanala (engl. *toroidal pore model*) opisuje mehanizam u kojem peptid inducira kontinuiranu zakrivljenost membrane, pri čemu se polarne glave fosfolipida zakreću prema unutrašnjosti pore, zajedno s peptidima.¹¹⁰ Model tepiha (engl. *carpet model*) temelji se na konceptu nakupljanja peptida na površini membrane, pri čemu dolazi do narušavanja integriteta membrane. Kod modela tepiha, AMP agregira paralelno s membranom i djeluje kao deterdžent te „otapa“ membranu formirajući micle u njoj.¹¹¹



Slika 15. Mehanizmi djelovanja AMP-a na membranu bakterija: a) Model bačvastog kanala, b) Model toroidalnog kanala, c) Model tepiha¹¹²

2.7.2. Peptidi koji prodiru u stanicu

Peptidi koji prodiru u stanicu su kratki peptidi koji sadrže manje od 30 aminokiselina, a karakterizira ih sposobnost prolaska kroz staničnu membranu, bilo samostalno ili s teretom. Budući da plazmatska membrana predstavlja učinkovitu biokemijsku barijeru, sposobnost prolaska CPP kroz nju ima veliku važnost za biomedicinsku primjenu, npr. učinkovitu dostavu lijekova u stanicu.^{18,113} Prvi istraženi CPP potječe od TAT (engl. *Trans-Activator of Transcription*) proteina virusa humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV), a identificiran je kasnih 1980-tih godina.¹¹⁴ Inicijalno je pokazano da cijeli protein prodire kroz plazmatsku membranu dok je kasnije utvrđeno da i manji fragmenti tog proteina imaju sposobnost prolaska kroz membranu. Točnije, sekvenca od 11 aminokiselina bogata argininom i lizinom (GRKKRRQRRRC) pokazala se učinkovitijom u odnosu na slijed cijelog peptida.¹⁶

Prema podrijetlu CPP se dijele na: CPP iz proteina, sintetičke CPP i kimerične peptide (engl. *chimeric peptides*). Peptidi koji su izvedeni iz proteina, poput TAT proteina, mogu prodrijeti u stanicu zahvaljujući specifičnim motivima ili helikalnoj strukturi. Sintetički peptidi, predstavljaju skupinu umjetno sintetiziranih peptida. U ovoj skupini, poliargininski peptidi koji sadrže između 8 i 10 aminokiselina, najviše su proučavani zbog njihove izražene sposobnosti prolaska kroz staničnu membranu. Kimerični peptidi čine prijelaznu kategoriju između prirodnih i sintetskih CPP jer sadrže sljedove iz dva ili više različitih prirodnih proteina.^{17,115}

Na temelju konformacije, CPP su podijeljeni na linearne i cikličke. Linearni CPP predstavljaju najčešći oblik i karakterizirani su slobodnim N- i C-terminalnim krajevima. U vodenom okolišu najčešće su nestrukturirani, no pri kontaktu s lipidnim membranama mogu poprimiti sekundarnu strukturu poput α -uzvojnice.¹¹⁶ S druge strane, ciklički CPP imaju zatvorenu strukturu postignutu povezivanjem terminalnih krajeva ili stvaranjem disulfidnih mostova, što ih čini otpornijim na proteolizu, manje toksičnim te učinkovitijim u dostavi tereta u stanicu.¹¹⁷

Osim prema podrijetlu i konformaciji, CPP se mogu klasificirati i na temelju fizikalno-kemijskih svojstava. Prema toj podjeli razlikuju se kationski, amfipatski i hidrofobni CPP.¹¹⁶ Kationski CPP, zbog pozitivnog naboja, pri fiziološkom pH imaju visok afinitet prema citoplazmatskoj membrani. Stoga se elektrostatskim interakcijama vežu na negativno nabijene glikoproteine stanične membrane, nakon čega ulaze u stanicu mehanizmom koji je neovisan o receptorima. Broj i položaj pozitivno nabijenih arginina u strukturi CPP ključan je čimbenik za

njihovu aktivnost. Većina kationskih CPP sadrži više od pet arginina u strukturi.¹¹⁸ Najzastupljeniji među CPP su amfipatski peptidi koji sadrže regije sastavljene od polarnih i nepolarnih aminokiselina, pri čemu su nepolarne regije bogate hidrofobnim aminokiselinama poput fenilalanina, triptofana i izoleucina.¹¹⁹ Dosadašnja istraživanja su pokazala da isti amfipatski CPP mogu imati različitu sekundarnu strukturu i da se njihova sposobnost vezanja na hidrofobno/hidrofilno područje može mijenjati ovisno o uvjetima.¹¹⁶ Hidrofobnih CPP je do sada poznato relativno malo. Njihova struktura sadrži velik broj nepolarnih kiselina i tek par nabijenih aminokiselina (manje od 20 % od cijelog slijeda). Do sada je utvrđeno da slijed hidrofobnih peptida ne utječe značajno na njihov prolazak kroz stanicu.¹²⁰

Dokazano je da CPP mogu poslužiti kao učinkoviti vektori za unutarstaničnu dostavu različitih tereta, koji se na njih mogu vezati kovalentno ili nekovalentno. Ipak, točan mehanizam njihova unosa još uvijek nije potpuno razjašnjen, što se pripisuje brojnim varijablama koje mogu utjecati na proces internalizacije.¹²¹ Među njima se ističu svojstva CPP i transportiranog tereta¹²², tip stanice (npr. sastav membranskih lipida)¹²³ te eksperimentalni uvjeti, poput pH i temperature.¹²⁴

Mehanizmi ulaska CPP sa i bez tereta u stanicu dijele se u dvije glavne skupine, ovisno o tome je li proces energetski ovisan ili neovisan.¹²⁵ Direktna translokacija je energetski neovisan mehanizam ulaska koji započinje uspostavljanjem elektrostatskih interakcija ili stvaranjem vodikovih veza između fosfolipidnog dvosloja i CPP. Ta interakcija je popraćena ulaskom CPP/CPP s teretom stvaranjem pora ili destabilizacijom membrane. Prema različitim mehanizmima translokacije, izravna translokacija dijeli se na tri modela: i) model bačvastog kanala, ii) model tepiha i iii) model inverzne micle.¹²⁶

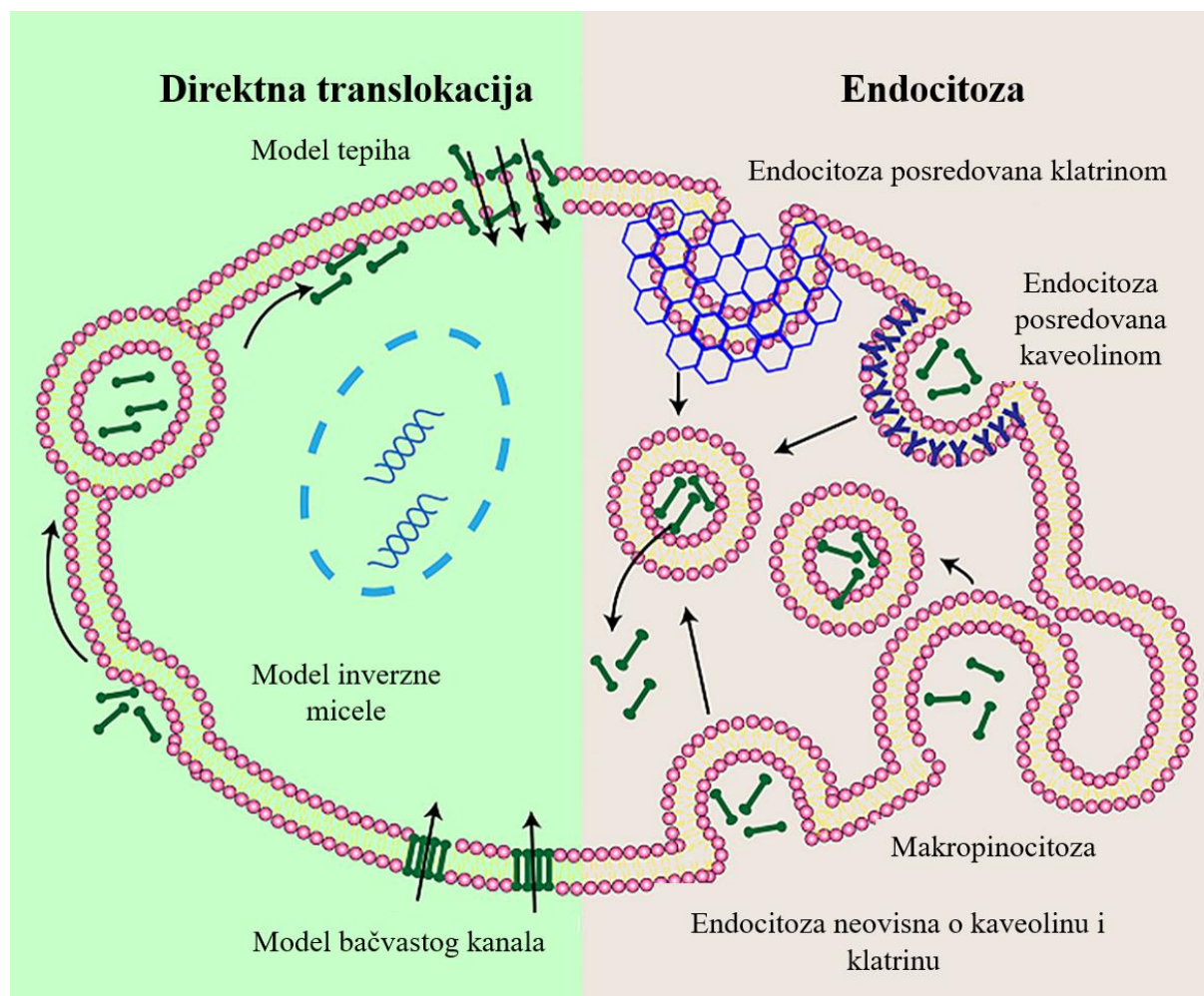
Prema modelu bačvastog kanala, amfipatski CPP-ovi ili njihovi kompleksi s teretom ugrade se u lipidni dvosloj tako da se hidrofobna područja CPP usmjeravaju prema unutrašnjosti membrane i ostvaruju interakcije s fosfolipidnim repovima, dok se hidrofilne regije orijentiraju prema hidrofilnim glavama fosfolipida. Time se u membrani stvara struktura nalik bačvi kroz koju se CPP-ovi mogu translocirati u citoplazmu, čime se povećava propusnost membrane.¹²⁷

Model inverzne micle uključuje invaginaciju lipidnog dvosloja i formiranje inverznih micela. Nabijeni CPP-ovi se elektrostatski vežu na fosfolipide površine membrane, a njihove hidrofobne regije ostvaruju interakcije s unutrašnjim dijelom membrane, što dovodi do stvaranja inverzne micle. Teret se zatim prenosi unutar te strukture u stanicu. Ovaj je model osobito primjenjiv za CPP koji sadrže značajan udio hidrofobnih aminokiselina.¹²⁸

U modelu tepiha, CPP se adsorbiraju na površinu membrane u obliku „tepiha“, gdje pozitivno nabijeni peptidi ostvaruju elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfolipidima. Hidrofobne regije CPP dodatno ostvaruju interakciju s hidrofobnom jezgrom membrane. Kada koncentracija CPP postane dovoljno visoka, dolazi do narušavanja strukture membrane, povećanja njene fluidnosti te u konačnici do destabilizacije membrane i ulaska CPP u stanicu.¹²⁶

Mehanizmi izravne translokacije su prikladniji za CPP i komplekse CPP s teretom male molekulske mase, dok je za veće molekulske mase prikladniji mehanizam endocitoze, koji je energetski ovisan.¹²⁷ Do sada su opisana 4 puta endocitoze: makropinocitoza, endocitoza posredovana kaveolinom, endocitoza posredovana klatrinom i endocitoza neovisna o kaveolinu i klatrinu.¹⁹ Makropinocitoza ne ovisi o receptoru i smatra se najvažnijim endocitoznim putem za CPP s teretom velike molekulske mase. U prisutnosti čimbenika rasta i aktivacije aktinskog sustava, dolazi do stvaranja membranskih protruzija i zrelih vezikula koje unose CPP s vezanim teretom u stanicu. Proces uključuje vezanje CPP na stanične proteoglikane, aktivaciju Rac proteina i reorganizaciju F-aktina, što dovodi do invaginacije membrane i endocitoze.¹²⁹ Endocitoza posredovana klatrinom, poznata kao receptorski posredovana endocitoza, uključuje specifično vezanje CPP sa ili bez tereta na receptore na membrani, nakon čega dolazi do zakrivljenja membrane zbog interakcije između proteina epsina i stanične membrane. Nakon toga dolazi do stvaranja udubine na membrani, formiraju se vezikule obložene klatrinom koje sadrže CPP sa ili bez tereta koje se potom odvajanjem unose u stanicu. Endocitoza posredovana kaveolinom ima vrlo sličan mehanizam kao i ona posredovana klatrinom, ali uključuje kaveolin umjesto klatrina.¹³⁰

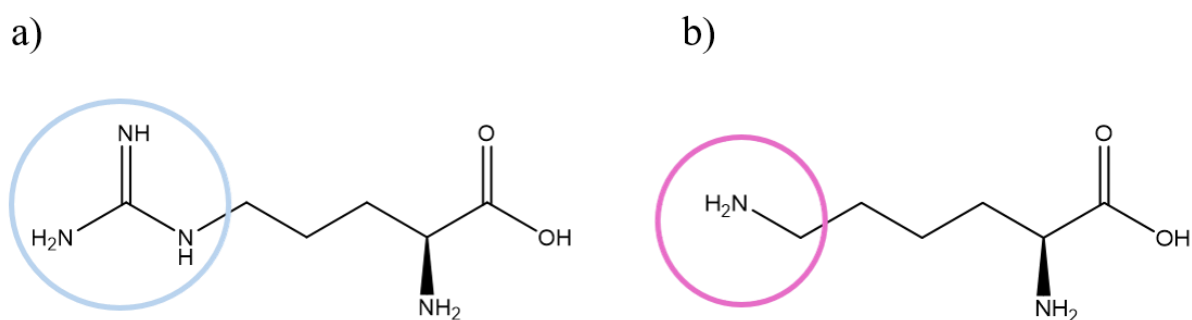
S druge strane, endocitoza neovisna o klatrinu i kaveolinu odvija se u specijaliziranim stanicama kao što su makrofagi. Pritom se CPP sa ili bez tereta mogu označiti opsoninima. Nakon toga se vežu na Fc receptor na staničnoj membrani, čime se potiče reorganizacija aktinske citoskeletne mreže. Kao rezultat toga dolazi do stvaranja vezikula obloženih membranom koje sadrže CPP sa ili bez tereta, koji se potom translociraju u citoplazmu.¹³¹



Slika 16. Shematski prikaz mogućih mehanizama ulaska CPP u stanicu (preuzeto i prilagođeno)¹³²

2.7.3. Utjecaj bočnih ogranka arginina i lizina na učinkovitost peptida koji prodiru u stanicu

Kao što je prethodno spomenuto, većina CPP bogata je argininom i lizinom. Iako su obje aminokiseline pozitivno nabijene i omogućuju elektrostatske interakcije sa staničnom membranom, brojna su istraživanja pokazala da CPP obogaćeni argininom imaju veću učinkovitost prolaska kroz membranu u odnosu na lizinske analoge.¹³³ Ipak, poznato je da i peptidi s lizinom ostvaruju elektrostatske i hidrofobne interakcije s lipidnim membranama.¹³⁴ Objašnjenje za veću učinkovitost argininskih peptida proizlazi iz kemijskih svojstava njihove bočne skupine. Arginin sadrži gvanidinsku skupinu (Gdm^+) koja može tvoriti bidentatne vodikove veze s negativno nabijenim skupinama membrane, poput fosfatnih skupina fosfolipida.^{133,135,136} Time se smanjuje polarnost Gdm^+ , što olakšava interakciju s hidrofobnim dijelovima membrane. Nasuprot tome, bočna skupina lizina sadrži protoniranu amino-skupinu koja može tvoriti samo jednu vodikovu vezu s anionskim komponentama membrane, što rezultira slabijim međudjelovanjem i time manje učinkovitom interakcijom. Brojne eksperimentalne i računalne studije pokazale su da peptidi s argininom ostvaruju jače i stabilnije vezanje na anionske membrane u odnosu na peptide s lizinom.^{134,137, 138} Robison i suradnici su u svom istraživanju ispitali termodinamiku vezanja nona-lizinskog (K9) i nona-argininskog (R9) peptida s modelnim membranama koje sadrže fosfatidilglicerol (PG). Pokazano je da R9 pokazuje znatno jači afinitet vezanja u odnosu na K9, s disocijacijskom konstantom nižom za približno dva reda veličine. Osim jačeg vezanja, R9 pokazuje slabiju antikooperativnost u interakciji s membranom, dok su lizinski peptidi pokazali izraženo antikooperativno ponašanje.¹³⁹



Slika 17. Strukture a) arginina (R) i b) lizina (K) sa zaokruženom gvanidinskom, odnosno amino-skupinom

2.7.4. Odabir potencijalnih peptida koji prodiru u stanicu za istraživanje

Osim literaturnih saznanja o CPP bogatih aminokiselinama argininom i lizinom, istraživanje koje su proveli Kamat i suradnici²¹ predstavlja jedan od ključnih radova koji je poslužio kao temelj za izbor peptida korištenih u ovom istraživanju. Navedeni znanstvenici su istražili mogućnost elektrostatske lokalizacije RNA na površinu modelnih protoplazmatskih membrana uz pomoć kratkih kationsko-hidrofobnih peptida. Pokazali su da jednostavni amfipatski peptidi, dugi svega nekoliko aminokiselina, mogu učinkovito potaknuti vezanje RNA za membrane sastavljene od neutralnih fosfolipida 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolina (engl. *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, POPC) i anionskih masnih kiselina (oleinska kiselina).

Istraživanje je obuhvatilo sintezu niza peptida s varijabilnim brojem ostataka argininskih aminokiselina i različitim hidrofobnim aminokiselinama (između ostalih i fenilalanin, triptofan i izoleucin), pri čemu su pomoću FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) tehnike procijenili sposobnost peptida da posreduju lokalizaciju fluorescentno označenih oligonukleotida na membrane. Među ispitivanim peptidima, R5F2, R5W2 i R5I2 pokazali su posebno snažnu sposobnost vezanja RNA na fosfolipidne membrane, a u manjoj mjeri i na membrane masnih kiselina. Štoviše, u nekim je slučajevima zabilježen i ulazak peptida u membranu.

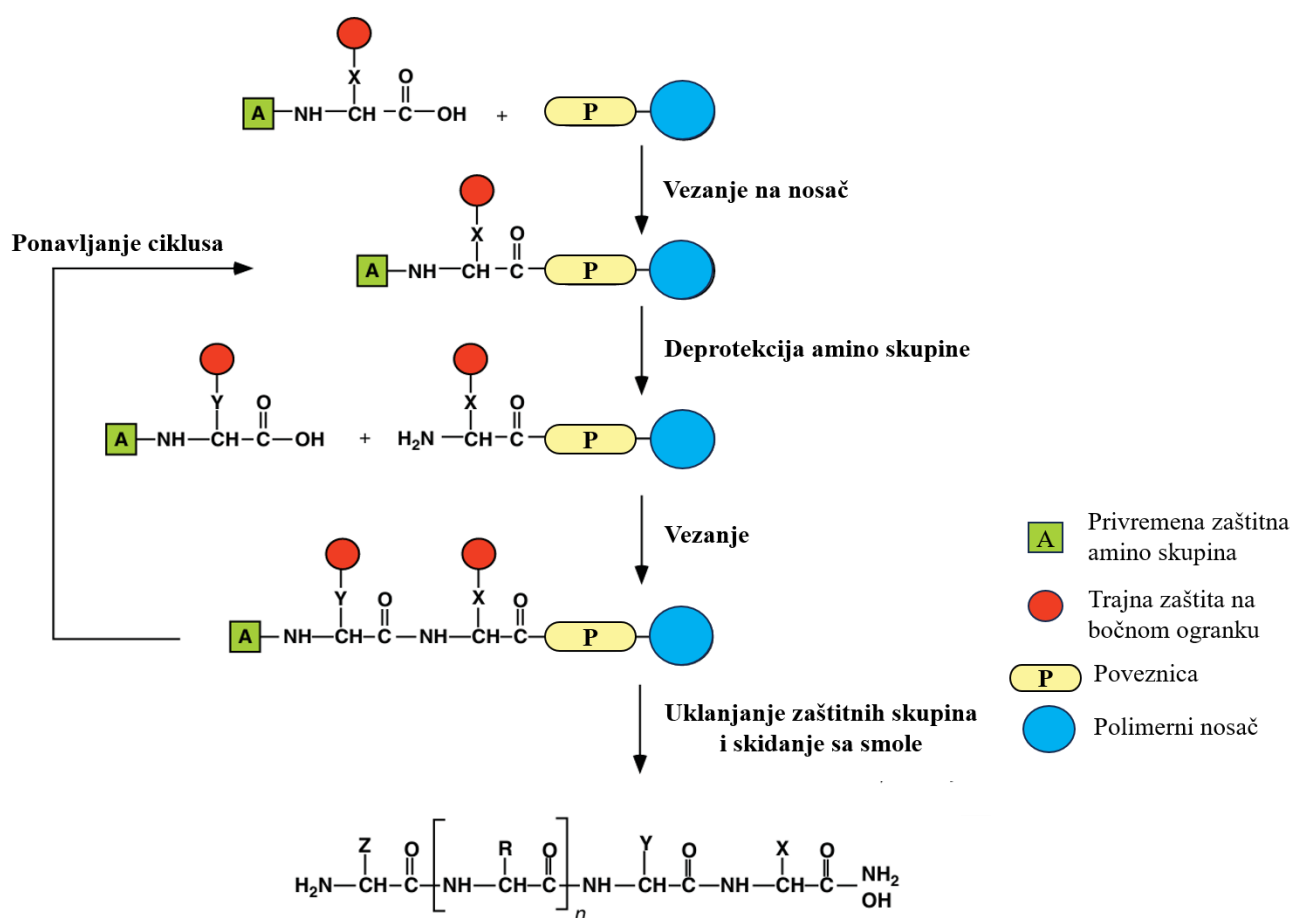
Rezultati ovog istraživanja pokazali su da kombinacija pozitivnog naboja (putem Gdm⁺ skupine arginina) i hidrofobnosti omogućuje učinkovitu interakciju peptida s lipidnim dvoslojem te posljedično lokalizaciju nukleinskih kiselina na membranu. Peptidi R5F2, R5W2 i R5I2 su stoga prepoznati kao optimalni kandidati za daljnje biokemijske i biofizikalne karakterizacije interakcija peptida s lipidnim membranama, što predstavlja osnovu eksperimentalnog dijela ovog rada. Njihovi K-analozi (K5F2, K5W2 i K5I2) uključeni su u istraživanje s ciljem dodatnog ispitivanja utjecaja vrste kationske skupine.²¹

2.7.5. Sinteza peptida

Peptidi imaju ključnu ulogu u brojnim biološkim procesima, uključujući regulaciju genske ekspresije, interakcije s lipidnim dvoslojem, antimikrobno djelovanje te prijenos lijekova u stanicu.¹⁴⁰ Za razumijevanje njihove uloge, načina djelovanja i mehanizama ulaska u stanicu, nužno je raspolagati pouzdanim i učinkovitim metodama njihove pripreme. Kemijska sinteza peptida omogućuje dizajn aminokiselinskog slijeda, potpunu kontrolu njegove duljine i eventualne kemijske modifikacije, čime se mogu dobiti molekule sa specifičnim strukturnim i funkcionalnim svojstvima.¹⁴¹

Postoje dvije vrste metoda sinteze peptida: i) sinteza u otopini i ii) sinteza na čvrstom nosaču (engl. *solid phase peptide synthesis*, SPPS). Sinteza peptida na čvrstom nosaču ima brojne prednosti u odnosu na sintezu u otopini koja uključuje pripremu potpuno zaštićenih peptida i njihovu kondenzaciju u organskom otapalu, a ističe se po automatiziranoj elongacijskoj reakciji te minimiziranom nastajanju nusprodukata.^{142,143}

Sintaza peptida na čvrstom nosaču prvi puta je predstavljena u radu R. B. Merrifielda 1963. godine.¹⁴⁴ Metoda se temelji na korištenju čvrstog nosača od netopljivog polimera na koji su vezane funkcijske poveznice. Tijekom sinteze, peptidni lanac je kovalentnom vezom vezan na čvrsti nosač što omogućava ispiranje suviška reagensa, nevezanih nusprodukata te uklanjanje zaštitnih skupina nakon svakog stupnja sinteze. Prvi korak u sintezi je vezanje N-zaštićene aminokiseline na netopljivi čvrsti nosač preko poveznice. Aminokiselina može imati tert-butiloksi karbonilnu (Boc) skupinu ili 9-fluorenilmetiloksikarbonilnu (Fmoc) skupinu za zaštitu. Nakon prvog koraka, N-zaštitna skupina se uklanja te se dobiveni produkt ispere s otapalom. Nakon uklanjanja N-zaštitne skupine, sljedeća aminokiselina se dodaje ili u prethodno aktiviranom obliku ili se aktivira *in situ* u prisutnosti odgovarajućeg aktivatora. Ciklus deprotekcije i kondenzacije ponavlja se onoliko puta koliko je potrebno da se izgradi željeni slijed aminokiselina. Kada je sinteza dovršena, peptid se u kiselim uvjetima uklanja s čvrstog nosača.¹⁴⁵ Tijek sinteze prikazan je na slici 18.

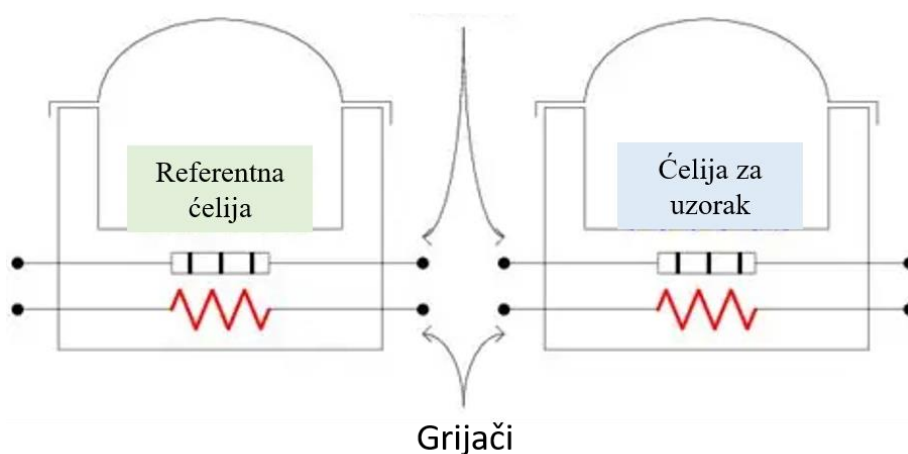


Slika 18. Shematski prikaz tijeka sinteze na čvrstom nosaču (preuzeto i prilagođeno)¹⁴⁵

2.8. Instrumentne tehnike za proučavanje utjecaja peptida na modelne lipidne membrane

2.8.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija

Razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je jednostavna termoanalitička tehnika koja se primjenjuje za detekciju i termodinamičku karakterizaciju termotropnih prijelaza u modelnim i biološkim membranama. Tehnika DSC temelji se na mjerenju energija koju uzorak apsorbira ili oslobađa tijekom zagrijavanja ili hlađenja.¹⁴⁶ Kalorimetar se sastoji od dvije ćelije jednakog volumena: jedna ćelija je za uzorak a druga za inertni referentni uzorak, najčešće vodu ili pufer (slika 19), koji ne pokazuje termotropne događaje unutar temperaturnog raspona od interesa. Obje ćelije se zagrijavaju Peltierovim grijačima konstantnom brzinom skeniranja. Uzorak i referentna tvar zagrijavaju se konstantnom, unaprijed definiranom brzinom, dok se istovremeno mjeri razlika u protoku topline između uzorka i referentne tvari.¹⁴⁷



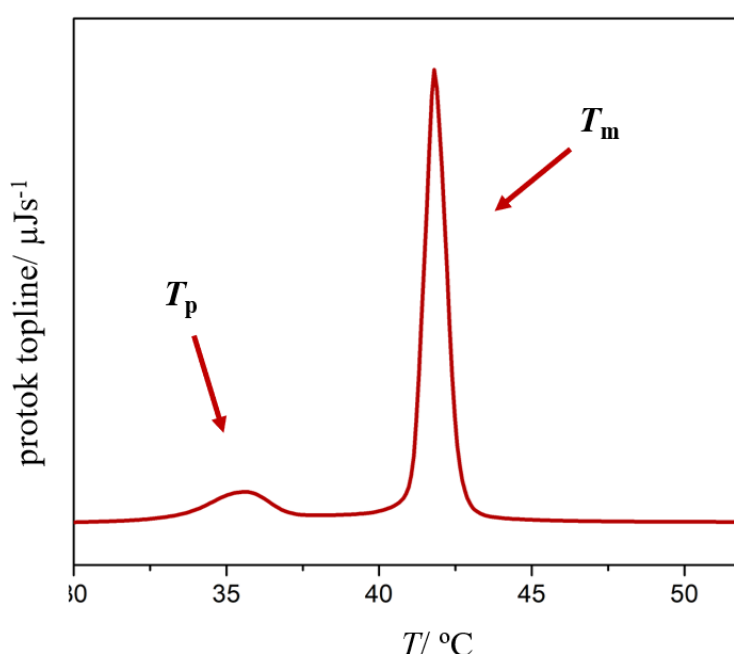
Slika 19. Shematski prikaz kalorimetra DSC (preuzeto i prilagođeno)¹⁴⁹

U uređaju DSC, uzorak i referentna tvar zagrijavaju se neovisno kako bi se održala jednaka temperatura u obje ćelije. U tim uvjetima, DSC uređaj registrira konstantan protok topline između ćelije s uzorkom i referentne ćelije, što se u idealnom slučaju očituje kao ravna, vodoravna bazna linija. U temperaturnom području u kojem ne dolazi do termotropnih događaja, temperature obje ćelije rastu linearno s vremenom, a razlika između njih ostaje konstantna. Pojava termotropnog događaja uzrokuje temperaturnu razliku između uzorka i referentne tvari, pri čemu instrument reagira ovisno o vrsti kalorimetra. Kod kalorimetrije koja

funkcionira prema principu kompenzacije snage, instrument aktivno mijenja ulaznu snagu u ćeliju kako bi uklonio temperaturnu razliku, a kod kalorimetrije s određivanjem protoka topline, kalorimetar bilježi promjene u brzini protoka topline u ćeliji s uzorkom sve dok se temperature u konačnici ne izjednače. Rezultat razlike u brzini protoka topline u ćeliji za uzorak i referentnoj ćeliji je pojava endotermnog ili egzotermnog odstupanja od bazne linije.¹⁴⁹

Tehnika DSC se primarno koristi za praćenje promjena fizikalnog stanja u polimorfnim lipidima te za karakterizaciju poremećaja u čistim lipidima izazvanih interakcijama s drugim tvarima, poput proteina, peptida ili malih hidrofobnih molekula.¹⁵⁰ Pomoću tehnike DSC možemo dobiti sljedeće parametre^{3,146}:

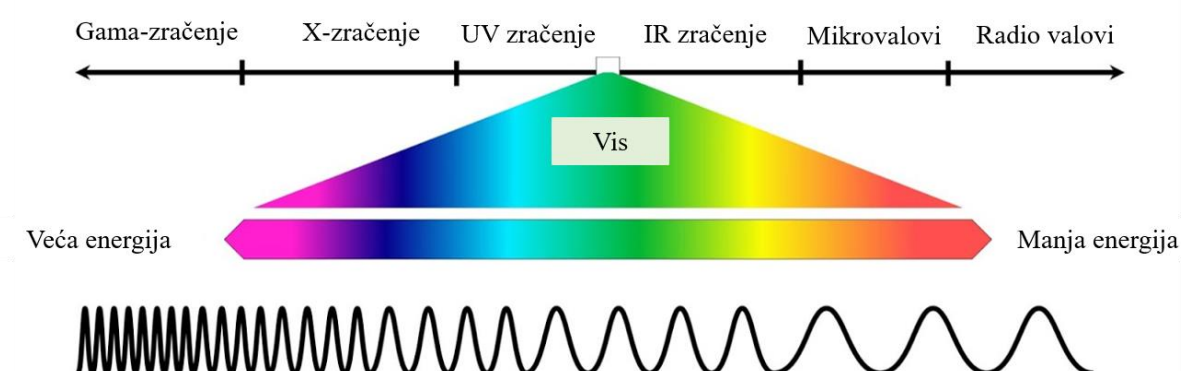
- T_m ili T_p faznog prijelaza koji (dogovorno) označava maksimum signala kada je 50% molekula lipida prešlo u drugu fazu
- Entalpiju prijelaza, ΔH , stvarnu količinu topline potrebne za potpuni prijelaz, normirane po molu ili po jedinici mase
- Toplinski kapacitet, C_p : količinu topline (izraženu po gramu kao specifični toplinski kapacitet ili po molu kao molarni toplinski kapacitet) potrebnu za povećanje temperature uzorka



Slika 20. DSC krivulja 1,2 dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-kolina (DPPC) s naznačenim T_p i T_m faznim prijelazima

2.8.2. Temperaturno ovisna UV-Vis spektroskopija

Spektroskopija UV-Vis je tehnika apsorpcijske spektroskopije koja se temelji na interakciji uzorka sa zračenjem u ultraljubičastom (engl. *ultraviolet*, UV) i vidljivom (engl. *visible*, Vis) području spektra (slika 21). Molekule koje posjeduju kromofore apsorbiraju dio zračenja, ovisno o svojoj kemijskoj strukturi, dok ostatak svjetlosti prolazi kroz uzorak. Intenzitet propuštene svjetlosti mjeri se kao funkcija valne duljine pomoću odgovarajućeg detektora, pri čemu se dobiva karakterističan spektar UV-Vis analizirane tvari.^{151,152}



Slika 21. Spektar elektromagnetnog zračenja s istaknutim UV-Vis područjem (preuzeto i prilagođeno)¹⁵³

Količina apsorbirane svjetlosti izražava se pomoću apsorbancije (A), koja je logaritam omjera intenziteta upadne (I_0) i propuštene (I) svjetlosti:

$$A = -\log \frac{I_0}{I} \quad (2.1)$$

Apsorbancija analita izravno je proporcionalna njegovoj koncentraciji, što se opisuje Lambert–Beerovim zakonom

$$A = \epsilon bc \quad (2.2)$$

gdje je ϵ molarni apsorpcijski koeficijent, b duljina puta zračenja i c koncentracija tvari koja apsorpira zračenje.¹⁵⁴

Temperaturno ovisna UV-Vis spektroskopija jednostavna je i neinvazivna metoda koja se sve češće koristi za praćenje faznih prijelaza u modelnim lipidnim sustavima. Premda se rutinski koristi za istraživanje otpuštanja lijekova inkorporiranih u liposome, osobito kada ti spojevi sadrže kromoforne skupine koje apsorbiraju u području UV-Vis spektra, odnedavno se temperaturno-ovisnom UV-Vis spektroskopijom karakteriziraju fazni prijelazi lipidnih suspenzija i to na temelju temperaturno-ovisne promjene njihovog turbiditeta.^{94,155,156} Premda UV-Vis spektri lipidnih suspenzija ne pokazuju signale usporedive s onima kromofornih skupina (jer ih nemaju), uz pomoć kemometrijskih metoda moguće je određivati temperature faznih prijelaza lipida. Detaljnije, izmjereni spektri se podvrgavaju multivarijatnoj analizi metodom izmjeničnih najmanjih kvadrata uz analizu promjenjivih faktora (engl. *multivariate curve resolution with alternating least squares and evolving factor analysis*, MCR-ALS with EFA).⁸³ Uz pretpostavku broja komponenti kojima se može opisati varijabilnost spektara s temperaturom (jedna komponenta u slučaju UV-Vis spektara lipidnih suspenzija bez kromofora), skup izmjerenih temperaturno-ovisnih spektara (**D**) može se prikazati kao produkt koncentracijskih (**C**) i spektralnih (**S**) profila komponenti (jedne komponente u slučaju UV-Vis spektara):

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad (2.3)$$

pri čemu **E** predstavlja dio varijable koji nije objašnjen umnoškom $\mathbf{CS}^T$.

Koncentracijski profil (pretpostavljene) jedne komponente je sigmoidalnog karaktera i iz njega se mogu odrediti točke infleksije koje se za DPPC lipid podudaraju s vrijednostima T_p i T_m dobivenima tehnikom DSC.¹⁵⁶

2.8.3. FTIR-ATR spektroskopija

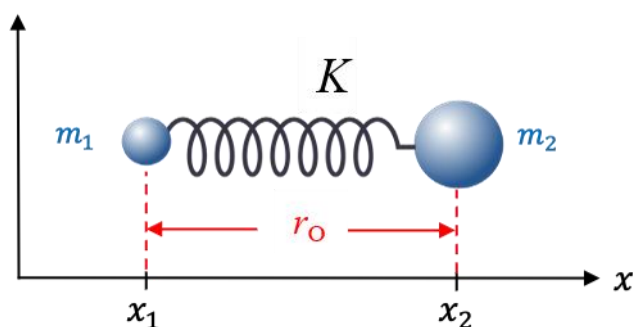
Molekulske vibracije i rotacije mogu se pobuditi apsorpcijom elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području (engl. *infrared*, IR). Vibracije molekula mogu se mjeriti na dva načina: (i) izravno, kao apsorpcija u IR spektru, ili (ii) neizravno, kao apsorbirano i ponovno emitirano zračenje u Ramanovoj spektroskopiji. Područje infracrvenog zračenja uobičajeno se dijeli na blisko (NIR), srednje (MIR) i daleko infracrveno (FIR) (Tablica 1). U bliskom IR području javljaju se elektronski prijelazi viših energija, uz pojavu kombinacijskih vrpce i viših tonova. Srednje IR područje ima posebno analitičko značenje jer obuhvaća većinu vibracijsko-rotacijskih prijelaza molekula te sadrži karakteristične apsorpcijske vrpce funkcijskih skupina. U dalekom IR području opažaju se vrpce koje potječu od vibracija težih molekula odnosno funkcijskih skupina, kompleksnih spojeva te vibracije vodikovih veza.^{157,158}

Tablica 1. Glavna područja IR spektra

Područje	$\lambda / \mu\text{m}$	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$
blisko	0,7 – 2,8	14000 – 3600
srednje	2,8 – 50	3600 – 200
daleko	50 – 500	200 – 20

Najčešće mjereni IR spektri obuhvaćaju područje valnih brojeva između približno 4000 i 400 cm^{-1} (MIR). Funkcijske skupine organskih molekula pokazuju karakteristične vibracijske vrpce u točno određenim dijelovima IR spektra.¹⁵⁷

Za razumijevanje osnovnih načela koja dovode do nastanka IR spektra može se koristiti model klasičnog harmoničnog oscilatora. Ako se atomi smatraju točkastim masama, vibracija dvoatomne molekule može se opisati kao sustav dviju masa (m_1 i m_2) povezanih elastičnom oprugom (slika 22). Produženje ravnotežne udaljenosti r_0 između masa za iznos $x_1 + x_2$ stvara povratnu silu K , koja nakon prestanka vanjskog istezanja uzrokuje titranje sustava oko ravnotežnog položaja.¹⁵⁸

Slika 22. Mehanički model titranja dvoatomne molekule¹⁵⁹

Prema Hookeovu zakonu, povratna sila K u prvoj aproksimaciji proporcionalna je produljenju Δr :

$$K = -k \cdot \Delta r \quad (2.4)$$

Negativni predznak označava da povratna sila K djeluje suprotno od sile istezanja ($k \cdot \Delta r$). U mehaničkom modelu faktor k predstavlja konstantu elastičnosti opruge, dok na molekulskoj razini odgovara tzv. konstanti sile (engl. *force constant*) koja izravno korelira s jačinom kemijske veze između atoma i izražava se u $[\text{N} \cdot \text{cm}^{-1}]$.¹⁶⁰

Potencijalna energija $V(r)$ harmoničnog oscilatora ovisi o udaljenosti između oscilirajućih masa m_1 i m_2 te je kvantizirana za molekularne vibracije:

$$V(\Delta r) = \frac{1}{2} k \cdot \Delta r^2 = 2\pi \cdot \mu \cdot v_{\text{osc}}^2 \cdot \Delta r^2 \quad (2.5)$$

gdje je μ reducirana masa oscilatora, a v_{osc} frekvencija osciliranja:

$$v_{\text{osc}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.6)$$

Frekvencija vibracije raste s konstantom sile ili jačinom veze, a opada s porastom reducirane mase oscilatora. Zamjenom valnog broja i reduciranih masa u izrazu dobiva se oblik koristan za izračun konstante sile.

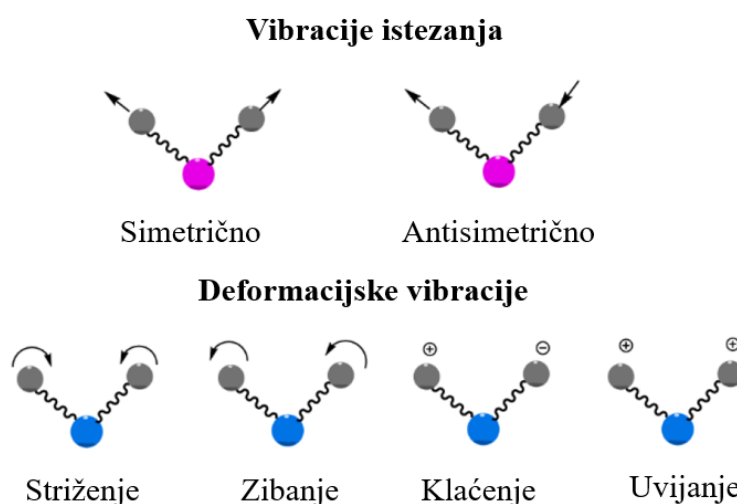
U idealnom harmoničnom oscilatoru molekularne vibracije imaju diskretne energijske razine E_n , pri čemu vrijedi:

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2} \right) h\nu \quad (2.7)$$

gdje je E_n kvantni broj vibracijskog stanja. Prijelazi između razina uvjetovani su kvantno-mehaničkim izbornim pravilima te za harmonični oscilator rezultiraju jednom osnovnom apsorpcijskom vrpcom.

Detaljan opis molekulskih vibracija ne može se dobiti pomoću modela klasičnog harmoničnog oscilatora pa se u tu svrhu koristi model anharmoničnog oscilatora, koji uzima u obzir slabiju silu vezanja pri većim udaljenostima jezgara ($r > r_0$) i jače odbojne sile pri znatnom približavanju atoma ($r < r_0$). Potencijalna energija takvog oscilatora pokazuje da se pri većim energijama udaljenost između energetske razine smanjuje.¹⁵⁹

Vibracije molekula mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: vibracije istezanja i vibracije deformacije (slika 23). Vibracije istezanja (engl. *stretching*) podrazumijevaju promjenu duljine kemijske veze između dva atoma, a mogu biti simetrične (oba se atoma istovremeno približavaju ili udaljavaju od ravnotežnog položaja) ili antisimetrične (dok se jedan atom približava centru mase sustava, drugi se istodobno udaljava). Deformacijske (engl. *bending*) vibracije obuhvaćaju promjene kuta između veza, uključujući njihovo svijanje, njihanje i uvijanje te nose važne informacije o molekulskoj strukturi i međumolekulskim interakcijama.^{161,162}



Slika 23. Primjeri vibracija istezanja i deformacijskih vibracija¹⁶³

2.8.3.1. Primjena FTIR spektroskopije za proučavanje faznih prijelaza lipida

FTIR spektroskopija je kao osjetljiva i neinvazivna analitička tehnika vrlo korisna za istraživanje interakcija lipida i proteina, kao i njihovog utjecaja na termotropna svojstva i organizaciju lipidnog dvosloja.¹⁶⁴ Prijelaz iz faze $L_{\beta'}$ u fazu L_{α} dovodi do znatnog smanjenja molekulske uređenosti te povećanja konformacijske slobode i dinamike lipida.^{164–166} Ako se fazni prijelaz odvija iz još uređenije, npr. faze L_c u fazu $L_{\beta'}$, promjene u dinamici i konformaciji lipida postaju još izraženije.

Takve strukturne i dinamičke promjene koje prate fazne prijelaze lipida očituju se u FTIR spektrima kao promjene frekvencija i oblika vrpce aktivnih u IR spektru te smanjenje njihovog intenziteta. Iako se promjene u intenzitetu i širini IR vrpce mogu koristiti kao indikatori faznih prijelaza, one nisu dovoljne za detaljnu karakterizaciju strukture lipidnih faza. Budući da se tijekom faznog prijelaza mijenja konformacija $-\text{CH}_2-$ skupina alkilnih lanaca iz *trans* u *gauche*, posebna se pažnja posvećuje promjenama u položaju i apsorbanciji vrpce koje odgovaraju simetričnom (ν_s) i antisimetričnom (ν_{as}) istezanju CH_2 skupina¹⁶⁷, kao i deformacijama CH_2 skupine, poput zibanja, klaćenja, njihanja te strižnih deformacija.

Simetrično i antisimetrično istezanje CH_2 skupine ($\nu_s\text{CH}_2$ i $\nu_{as}\text{CH}_2$)

Vrpce koje odgovaraju simetričnom i antisimetričnom istezanju CH_2 skupine pojavljuju se približno pri 2850 cm^{-1} , odnosno 2920 cm^{-1} . Povećanje broja *gauche*-konformera u odnosu na *trans*-konformer očituje se pomakom maksimuma IR vrpce ν_s i ν_{as} istezanja prema višim valnim brojevima za $2\text{--}3\text{ cm}^{-1}$, odnosno $5\text{--}7\text{ cm}^{-1}$.^{166,168} Iako se obje apsorpcijske vrpce mogu koristiti za praćenje faznih prijelaza povezanih s konformacijskim promjenama alkilnih lanaca, u praksi se vrpca pri 2920 cm^{-1} rjeđe koristi jer postoji mogućnost značajnog preklapanja s vrpcom istezanja CH_3 skupine ($\nu_s\text{CH}_3$). Budući da kod $\nu_s\text{CH}_2$ pri 2850 cm^{-1} ne dolazi do značajnih preklapanja s drugim vrpcom, ova vibracija se smatra pouzdanijim pokazateljem faznih prijelaza u modelnim i biološkim membranama.¹⁶⁹ U lipidnim dvoslojima koji sadrže ugrađene proteine i peptide, treba uzeti u obzir da i njihove CH_2 skupine mogu doprinijeti CH_2 apsorpcijskim vrpcom, a što može utjecati na točnost praćenja i karakterizacije faznog prijelaza alkilnih lanaca lipida. Ipak, ako je ukupni doprinos proteina i/ili peptida ukupnoj populaciji CH_2 skupina malen i/ili ako se konformacijske promjene u membranskom proteinu ne događaju unutar temperaturnog raspona faznog prijelaza lipida, proces faznog prijelaza alkilnih lanaca lipida i dalje se može pratiti.¹⁷⁰ Spektroskopska istraživanja metodom FTIR

pokazala su da ugradnja integralnih membranskih proteina i peptida u modelne lipidne dvoslojeve izrazito narušava uređenost faze L_{β} , dok su učinci na konformaciju i dinamiku faze fluida znatno manji.^{171,172}

Deformacija CH_2 skupine, strižne vibracije i vibracije njihanja (γCH_2 , ωCH_2)

Deformacija CH_2 skupine, odnosno strižne vibracije i vibracije njihanja, primarno su određene lateralnim interakcijama između ugljikovodičnih lanaca te ne ovise izravno o udjelu *trans*-i *gauche*-konformera. Vibracije zibanja CH_2 skupina ugljikovodičnih lanaca se također mogu koristiti za određivanje faznog prijelaza s obzirom da intenzitet ovih vrpca u fazi L_{β} ovisi o duljini lanca. Uslijed povećanja udjela *gauche*-konformera, smanjuje se duljina segmenata lanaca koji su u *trans*-konformaciji. Samim time, smanjuje se i intenzitet vrpca te postoji mogućnost nestajanja vrpce nakon faznog prijelaza lipida. S obzirom na to da se slabe vrpce zibanja CH_2 skupine nalaze u području između intenzivnijih vrpca otapala ili skupina polarne glave s vrpcama u IR spektru, trebaju se interpretirati s posebnim oprezom.^{169,173}

Interakcije između polarnih glava lipida

Uz signale koji potječu od ugljikovodičnih lanaca, i vrpce proizašle iz vibriranja polarnih glava lipida predstavljaju vrijedan izvor informacija koje mogu doprinijeti boljem razumijevanju faznih prijelaza.¹⁷⁴ Unatoč tome, karakterizacija vibracijskih značajki polarnih glava lipida dosad je bila vrlo ograničena. Djelomično se to može pripisati činjenici da je njihovo proučavanje otežano zbog toga što su apsorpcijske vrpce tih skupina često vrlo široke, smještene unutar područja spektra u kojima dolazi do preklapanja s drugim vrpcama, ili su prekrivene signalima koji potječu od otapala. Naposljetku, dodatni izazov predstavlja prisutnost vodenog medija koji snažno apsorbira IR zračenje i pokriva velik dio spektra, osobito u području $3920\text{ cm}^{-1} - 3280\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{as}}\text{OH}$) te $1750 - 1400\text{ cm}^{-1}$ (δHOH).¹⁷⁵ U prvom se području javljaju vibracije simetričnog i antisimetričnog istezanja molekule vode ($\nu_{\text{s}}\text{OH}$ i $\nu_{\text{as}}\text{OH}$), koje se djelomično preklapaju s vrpcama simetričnog i antisimetričnog rastezanja metilnih i metilenskih skupina ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$, $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$), a u drugom području se javlja vrpca koja potječe od δHOH . Navedeno dodatno otežava interpretaciju spektara i pouzdanu karakterizaciju faznih prijelaza u modelnim membranskim sustavima. Jedan od načina za smanjenje signala otapala jest primjena FTIR tehnike temeljene na prigušenoj totalnoj refleksiji (engl. *attenuated total reflection*, ATR), kod koje su, zbog značajno manje duljine puta, vrpce

vode manje intenzivne (vidjeti Lambert-Beerov zakon, formula 2.2). Međutim, pritom se proporcionalno smanjuje i intenzitet apsorpcijskih vrpca uzorka, što može predstavljati ograničenje kod detekcije slabijih signala.¹⁷⁶

2.9. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS) je neinvazivna analitička tehnika koja se široko primjenjuje za određivanje veličine i raspodjele veličina nanočestica, liposoma, micela, proteinskih agregata i drugih koloidnih sustava u otopini. Metoda se temelji na analizi fluktuacija intenziteta raspršene svjetlosti koje nastaju kao posljedica Brownovog gibanja čestica u suspenziji.¹⁷⁷

Brownovo gibanje opisuje nasumično, toplinski inducirano kretanje čestica koje nastaje zbog njihovih sudara s molekulama otapala. Brzina kojom se čestice gibaju ovisi o nekoliko fizikalnih parametara: njihovoj veličini, viskoznosti medija te apsolutnoj temperaturi sustava. Manje čestice gibaju se brže, dok se veće čestice gibaju sporije. Porast temperature dodatno povećava kinetičku energiju sustava, što dovodi do ubrzanja Brownovog gibanja.¹⁷⁸

DLS mjerenja temelje se na Stokes–Einsteinovoj relaciji, kojom se iz izmjerene difuzijskog koeficijenta (D) može izračunati hidrodinamički promjer (D_H) čestice, odnosno efektivna veličina čestice u otopini, uzimajući u obzir hidratacijsku ovojnicu i moguće interakcije s medijem:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (2.8.)$$

gdje je R_H hidrodinamički radijus, k_B Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, η viskoznost medija i D difuzijski koeficijent.¹⁷⁹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U radu su korištenje sljedeće kemikalije:

- DPPC – 1,2 dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-kolin ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
- DPPS – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoserin ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
- DPPG – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
- CHCl_3 – kloroform (p.a., Carlo Erba Reagents)
- Na_2HPO_4 – natrijev hidrogenfosfat ($> 99\%$ čistoće, Alfa Aesar)
- NaH_2PO_4 – natrijev dihidrogenfosfat (p.a., Fluka)
- NMM – *N*-metilmorfolin (p.a., Merck)
- HBTU – (*O*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat ($\geq 98\%$ čistoće, Fluka)
- HOBt – 1-hidroksibenzotriazol ($\geq 97\%$ čistoće, Aldrich)
- DMF – *N,N*-dimetilformamid (p.a., Carlo Erba)
- Piperidin (p.a., Carlo Erba)
- TFA – trifluoroctena kiselina (Carlo Erba)
- TIS – triizopropilsilan (Merck)
- EtOH – etanol (Carlo Erba)
- MeOH – metanol (p.a., Sigma Aldrich)
- Diizopropileter – (p.a., Carlo Erba)
- Fmoc-Arg(Pbf)-OH – Novabiochem
- Fmoc-Ile-OH – Novabiochem
- Fmoc-Lys(Boc)-OH – Novabiochem
- Fmoc-Phe-OH – Novabiochem
- Fmoc-Trp-OH – Novabiochem
- Fmoc-Phe-Wang resin – Novabiochem
- Fmoc-Trp(Boc)-Wang resin – Novabiochem
- Fmoc-Ile-Wang resin – Novabiochem

3.2. Automatizirana sinteza peptida na čvrstom nosaču

Automatizirana sinteza provedena je na instrumentu za sintezu na čvrstom nosaču (Protein Technologies Inc., Tucson, Arizona, SAD).

Karakterizacija sintetiziranih peptida provedena je pomoću nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrije masa visoke rezolucije (HRMS).

NMR spektri su snimljeni na spektrometrima Bruker AV 300 i AV 600, pri frekvencijama 150,91 MHz za ^{13}C i 600,13 MHz za ^1H jezgre. Spektri su snimljeni u DMSO- d_6 pri temperaturi od 25 °C. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm, dok su konstante sprege (J) izražene u Hz. Kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS) a od otapala dimetilsulfoksid- d_6 . Asignacija je provedena na temelju jednodimenzijskih ^1H , ^{13}C i APT (engl. *Attached Proton Test*) spektara te dvodimenzijskih homonuklearnih (COSY) i heteronuklearnih (HMQC i HMBC) eksperimenata.

Spektri masa visoke rezolucije snimljeni su na instrumentu Agilent 6546 LC/Q-TOF (Santa Clara, CA, USA) uz ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *Electron Spray Ionisation*, ESI). Pročišćavanje peptida provedeno je pomoću tekućinske kromatografije s obrnutim fazama na sustavu 1260 Infinity II (Agilent Technologies), koristeći preparativnu kolonu ZORBAX Extend-C18 Prep. (5 μm , 21.2 $\times$ 150 mm, protok 10 mL/min). Čistoća produkata praćena je na RP-HPLC sustavu serije 1200 (Agilent Technologies) na analitičkoj koloni ZORBAX Extend-C18 (5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm, protok 1,0 mL/min), pri valnim duljinama od 215 i 254 nm.

Za analizu HPLC s obrnutim fazama korišteni su sljedeći eluensi i gradijent:

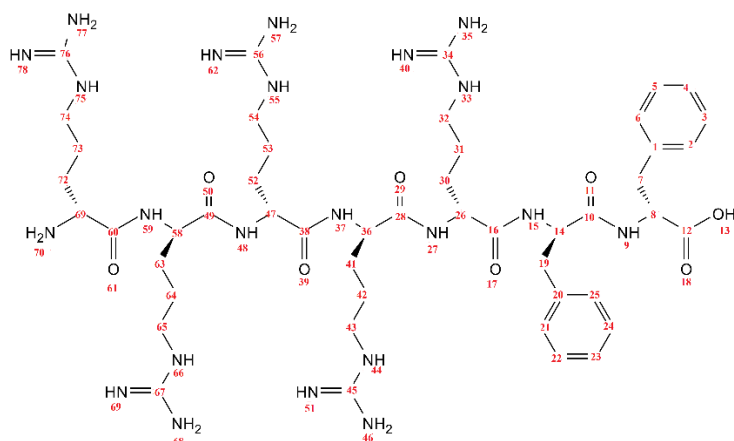
A gradijent: 0 $\rightarrow$ 30 min, 100 % 0,1 % TFA $\rightarrow$ 100 % MeOH; 30 $\rightarrow$ 35 min, 100 % MeOH; 35 $\rightarrow$ 35.01 min, 100 % MeOH $\rightarrow$ 0,1 % TFA; 35.01 $\rightarrow$ 40 min, 100 % 0,1 % TFA.

Tijek sinteze:

U bočicu je odvagana po jedna Fmoc *N*-terminalno zaštićena aminokiselina te reagensi: (O-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat (HBTU) i 1-hidroksibenzotriazol (HOBt), nakon čega je bočica postavljena na odgovarajuće mjesto u instrumentu. Prva aminokiselina vezana na Wang smolu (Fmoc-Phe-Wang/Fmoc-Trp-Wang/Fmoc-Ile-Wang) postavlja se u reakcijsku posudu na instrumentu te se pokreće program za bubrenje/deprotekciju (20% piperidin/DMF). Druga aminokiselina aktivira se uz pomoć HBTU i HOBt u DMF-u te se uvlači u reakcijsku posudu. Vezanje aminokiselina se odvija 1 h nakon čega slijedi deprotekcija Fmoc zaštitne skupine. Postupak vezanja/deprotekcije (HBTU, HOBt/20% piperidin) ponavlja se za svaku sljedeću aminokiselinu i završava deprotekcijom Fmoc zaštitne skupine zadnje aminokiseline. Svaki stupanj automatske sinteze peptida regulira se određenim programom. Čvrsti nosač se iz reakcijske posude uz ispiranje s diklormetanom prebaci u reakcijsku posudu (špricu) opremljenu sinterom i pipcem za ispuštanje tekućine. Uklanjanje sintetiziranog peptida sa smole i deprotekcija bočnih lanaca aminokiselina provodi se smjesom otapala (TFA : TIS : H₂O = 95 : 2,5 : 2,5 v/v/v) na sobnoj temperaturi kroz 3 sata. Reakcijska smjesa se filtrira preko sintera na dnu reakcijske posude (ili šprice), filtrat ispusti u hladni diizopropil-eter, ostavi taložiti preko noći u hladnjaku, te se centrifugira i ispire dva puta sa diizopropil-eterom. Ovako dobiveni sirovi produkti čišćeni su na preparativnoj RP-HPLC koloni (ZORBAX Extend-C18 Prep), a čistoća je provjerena na analitičkoj koloni (ZORBAX Extend-C18). Dobiveni produkti nakon sinteze se odsoljavaju propuštanjem kroz C18 kolonu koja funkcionira na principu ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*, SPE) s vezanim oktadecilsilicijevim (C18) sorbensom visoke hidrofobnosti. Ova vrsta sorbensa, zahvaljujući širokom spektru retencije nepolarnijih organskih molekula, omogućuje učinkovito zadržavanje peptida dok se soli i ostale polarne nečistoće ispiru, čime se postiže njihovo uklanjanje iz uzorka. Nakon eluiranja s metanolom, peptidi su liofilizirani do suhog praha.

3.3. Karakterizacija peptida

3.3.1. Heptapeptid Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe (R5F2)



Iskorištenje: 78%

$C_{48}H_{80}N_{22}O_8$

$M_r = 1093,6608$

$[M + H]^+$. HRMS: m/z 1093,6608 $[M + H]^+$ (kalk. 1093,6608)

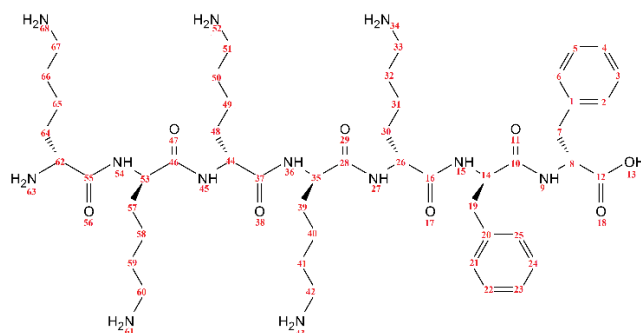
t_R (gradijent A) = 17,2

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,36 (br s, 2 H, 31), 1,40 - 1,46 (m, 2 H, 42), 1,46 - 1,50 (m, 2 H, 53), 1,50 - 1,56 (m, 6 H, 73, 64, 30), 1,58 (br s, 2 H, 41), 1,62 (br s, 2 H, 52), 1,69 (br s, 4 H, 72, 63), 2,75 (br dd, J = 13,9; 9,2 Hz, 1 H, 19''), 2,92 (dd, J = 13,9; 8,8 Hz, 1 H, 7''), 3,00 (dd, J = 13,6, 4,0 Hz, 1 H, 19'), 3,02 - 3,05 (m, 4 H, 43, 32), 3,05 - 3,07 (m, 3 H, 54, 7'), 3,09 (br d, J = 6,6 Hz, 2 H, 65), 3,11 (br s, 2 H, 74), 3,84 (dt, J = 7,0, 6,0 Hz, 1 H, 69), 4,16 - 4,20 (m, 1 H, 26), 4,22 (br d, J = 7,0 Hz, 1 H, 36), 4,23 - 4,26 (m, 1 H, 47), 4,33 (dt, J = 8,0, 6,0 Hz, 1 H, 58), 4,44 (td, J = 8,2, 5,7 Hz, 1 H, 8), 4,54 (td, J = 8,6, 4,8 Hz, 1 H, 14), 7,14 - 7,18 (m, 1 H, 23), 7,18 - 7,21 (m, 5 H, 21, 22, 24, 25, 4), 7,22 (br d, J = 8,4 Hz, 2 H, 2, 6), 7,26 (t, J = 7,0 Hz, 2 H, 3, 5), 7,29 - 7,53 (m, 15 H, 78, 77, 62, 40, 35, 57, 68, 46, 71, 51), 7,65 (br t, J = 5,0 Hz, 1 H, 33), 7,70 (br t, J = 5,1 Hz, 1 H, 44), 7,79 (br t, J = 5,5 Hz, 1 H, 55), 7,85 (br t, J = 5,9 Hz, 1 H, 75), 7,86 (t, J = 6,2 Hz, 1 H, 66), 7,95 (br d, J = 8,1 Hz, 1 H, 15), 8,02 (d, J = 7,7 Hz, 1 H, 27), 8,03 (d, J = 7,0 Hz, 1 H, 37), 8,19 (br d, J = 7,7 Hz, 1 H, 48), 8,22 (br d, J = 3,7 Hz, 2 H, 70), 8,44 (br d, J = 7,7 Hz, 1 H, 9), 8,60 (br d, J = 7,3 Hz, 1 H, 59) ppm

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6): δ = 24,0 (73), 24,8 (31), 24,9 (64), 25,0 (53, 42), 28,4 (72), 29,1 (30), 29,2 (52, 41), 29,3 (63), 36,7 (7), 37,6 (19), 40,1 (74), 40,4 (65, 54, 43, 32), 51,7

(69), 52,1 (36, 26), 52,2 (47), 52,4 (58), 53,3 (14), 53,6 (8), 126,2 (23), 126,4 (4), 127,9 (22, 24), 128,1 (3, 5), 129,1 (2, 6), 129,2 (21, 25), 137,3 (20, 1), 156,8 (76, 67, 56, 45, 34), 168,4 (60), 170,9 (49, 28), 171,0 (16), 171,1 (10), 171,3 (38), 172,6 (12) ppm.

3.3.2. Heptapeptid Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Phe-Phe (K5F2)



Iskorištenje: 75%

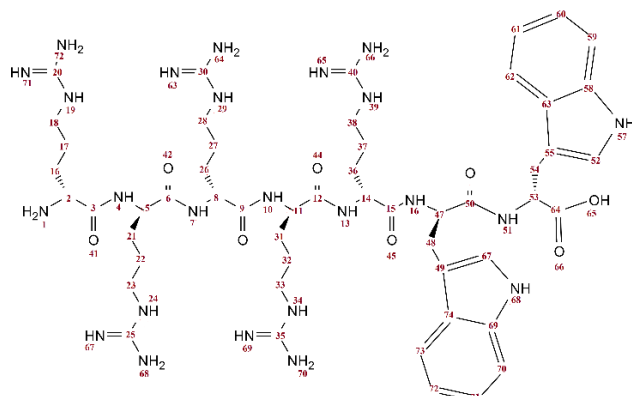
 $C_{48}H_{80}N_{12}O_8$ $M_w = 953,6300$ [M + H]⁺. HRMS: m/z 953,6298 [M + H]⁺ (kalk. 953,6300) t_R (gradijent A) = 17,1

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,11 - 1,18 (m, 2 H, 31), 1,18 - 1,22 (m, 2 H, 40), 1,24 - 1,28 (m, 2 H, 49), 1,28 - 1,33 (m, 2 H, 58), 1,33 - 1,38 (m, 2 H, 65), 1,43 - 1,49 (m, 3 H, 48", 39", 30"), 1,49 - 1,55 (m, 12 H, 66, 57", 59, 50, 41, 30', 32), 1,56 - 1,61 (m, 1 H, 39'), 1,60 - 1,66 (m, 2 H, 57', 48'), 1,66 - 1,74 (m, 2 H, 64), 2,65 - 2,80 (m, 11 H, 67, 60, 51, 42, 33, 19"), 2,92 (dd, J = 14,1, 8,6 Hz, 1 H, 7"), 2,99 (dd, J = 13,8, 4,2 Hz, 1 H, 19'), 3,07 (dd, J = 14,1, 5,3 Hz, 1 H, 7'), 3,81 (br dd, J = 11,7, 5,9 Hz, 1 H, 62), 4,15 (td, J = 7,8, 5,0 Hz, 1 H, 26), 4,17 - 4,20 (m, 1 H, 35), 4,20 - 4,25 (m, 1 H, 44), 4,29 (td, J = 8,2, 5,3 Hz, 1 H, 53), 4,45 (td, J = 8,3, 5,3 Hz, 1 H, 8), 4,53 (td, J = 8,8, 4,4 Hz, 1 H, 14), 7,16 - 7,18 (m, 1 H, 23), 7,18 - 7,20 (m, 1 H, 4), 7,19 - 7,23 (m, J = 2,2 Hz, 4 H, 21, 22, 24, 25), 7,23 (d, J = 7,7 Hz, 2 H, 2, 6), 7,27 (t, J = 7,3 Hz, 2 H, 3, 5), 7,81 - 7,91 (m, 10 H, 68, 61, 52, 43, 34), 7,88 - 7,91 (m, 1 H, 15), 7,96 (br d, J = 8,1 Hz, 1 H, 27), 7,96 (br d, J = 7,3 Hz, 1 H, 36), 8,15 (br d, J = 7,7 Hz, 1 H, 45), 8,22 (br d, J = 3,7 Hz, 2 H, 63), 8,36 (d, J = 8,1 Hz, 1 H, 9), 8,59 (br d, J = 7,3 Hz, 1 H, 54) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,11 - 1,18 (m, 2 H, 31), 1,18 - 1,22 (m, 2 H, 40), 1,24 - 1,28 (m, 2 H, 49), 1,28 - 1,33 (m, 2 H, 58), 1,33 - 1,38 (m, 2 H, 65), 1,43 - 1,49 (m, 3 H, 48", 39", 30"), 1,49 - 1,55 (m, 12 H, 66, 57", 59, 50, 41, 30', 32), 1,56 - 1,61 (m, 1 H, 39'), 1,60 - 1,66 (m, 2 H, 57', 48'), 1,66 - 1,74 (m, 2 H, 64), 2,65 - 2,80 (m, 11 H, 67, 60, 51, 42, 33, 19"), 2,92 (dd, J = 14,1, 8,6 Hz, 1 H, 7"), 2,99 (dd, J = 13,8, 4,2 Hz, 1 H, 19'),

3,07 (dd, $J = 14,1, 5,3$ Hz, 1 H, 7'), 3,81 (br dd, $J = 11,7, 5,9$ Hz, 1 H, 62), 4,15 (td, $J = 7,8, 5,0$ Hz, 1 H, 26), 4,17 - 4,20 (m, 1 H, 35), 4,20 - 4,25 (m, 1 H, 44), 4,29 (td, $J = 8,2, 5,3$ Hz, 1 H, 53), 4,45 (td, $J = 8,3, 5,3$ Hz, 1 H, 8), 4,53 (td, $J = 8,8, 4,4$ Hz, 1 H, 14), 7,16 - 7,18 (m, 1 H, 23), 7,18 - 7,20 (m, 1 H, 4), 7,19 - 7,23 (m, $J = 2,2$ Hz, 4 H, 21, 22, 24, 25), 7,23 (d, $J = 7,7$ Hz, 2 H, 2, 6), 7,27 (t, $J = 7,3$ Hz, 2 H, 3, 5), 7,81 - 7,91 (m, 10 H, 68, 61, 52, 43, 34), 7,88 - 7,91 (m, 1 H, 15), 7,96 (br d, $J = 8,1$ Hz, 1 H, 27), 7,96 (br d, $J = 7,3$ Hz, 1 H, 36), 8,15 (br d, $J = 7,7$ Hz, 1 H, 45), 8,22 (br d, $J = 3,7$ Hz, 2 H, 63), 8,36 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H, 9), 8,59 (br d, $J = 7,3$ Hz, 1 H, 54) ppm.

3.3.3. Heptapeptid Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp (R5W2)



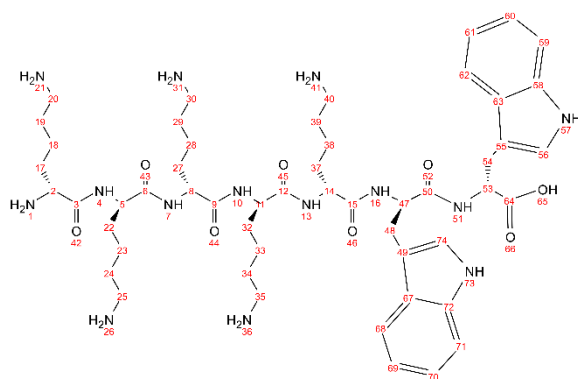
Iskorištenje: 68 %

 $C_{52}H_{82}N_{24}O_8$ $M_w = 1171,6820$ [M + H]⁺. HRMS: m/z 1171,6816 [M + H]⁺ (calc. 1171,6820) t_R (gradient A) = 17,3

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,85 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 57), 10,79 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 68), 8,60 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 4), 8,32 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, 51), 8,20 (s, 2H, 1, 7), 8,10 8,00 (m, 2H, 10, 13), 7,97 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 16), 7,88 – 7,61 (m, 5H, 19, 24, 29, 34, 39), 7,57 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 73), 7,51 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 62), 7,34 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 59), 7,31 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 70), 7,14 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, 56), 7,12 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, 67), 7,10 – 7,01 (m, 2H, 60, 71), 7,01 – 6,90 (m, 2H, 61, 72), 4,59 (q, $J = 7,5$ Hz, 1H, 47), 4,47 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H, 53), 4,33 (q, $J = 6,0$ Hz, 1H, 5), 4,31 – 4,15 (m, 3H, 8, 11, 14), 3,83 (s, 1H, 2), 3,22 – 3,15 (m, 1H, 54'), 3,15 – 3,11 (m, 1H, 48'), 3,08 – 2,99 (m, 11H, 18, 23, 28, 33, 38, 54''), 2,99 – 2,88 (m, 1H, 48''), 1,76 – 1,68 (m, 2H, 16), 1,66 – 1,58 (m, 4H, 21', 26', 31', 36'), 1,51 (d, $J = 2985,4$ Hz, 14H, 17, 21'', 22, 26'', 27, 31'', 32, 36'', 37) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173,15 (64), 171,35 (9, 50), 171,18 (12), 171,08 (6), 170,95 (15), 168,41 (3), 156,83 (20, 25, 30, 35, 40), 136,02 (d, $J = 4,1$ Hz, 58, 69), 127,36 (74), 127,24 (63), 123,68 (56, 67), 120,93 (60, 71), 118,41 (61, 72), 118,25 (73), 118,18 (62), 111,38 (59, 70), 111,24 (59, 70), 109,60 (d, $J = 7,9$ Hz, 49, 55), 53,27 (53), 53,16 (47), 52,38 (5), 52,15 (8, 11, 14), 51,73 (2), 40,45 (18, 23, 28, 33, 38), 29,23 (21, 26, 31, 36), 28,42 (16), 27,93 (48), 27,15 (54), 25,01 (22, 27, 32, 37), 24,08 (17) ppm.

3.3.4. Heptapeptid Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Trp-Trp (K5W2)



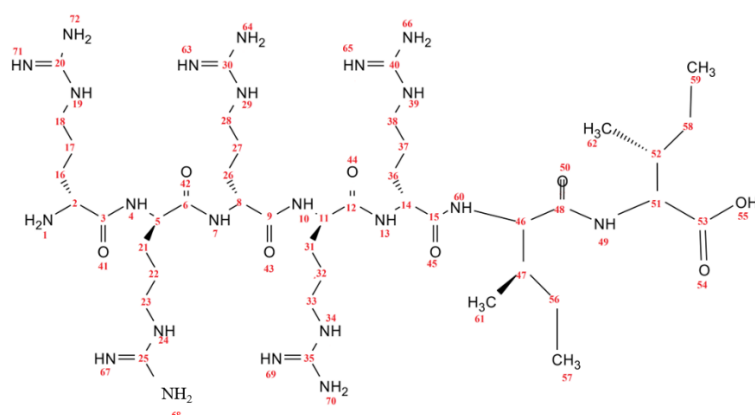
Iskorištenje: 62 %

 $C_{52}H_{82}N_{14}O_8$ $M_w = 1031,6513$ [M + H]⁺. HRMS: m/z 1031,6514 [M + H]⁺ (kalk. 1031,6513) t_R (gradient A) = 17,2

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,85 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 57), 10,81 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 68), 8,58 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, 4), 8,16 (d, $J = 7,9$ Hz, 4H, 7, 51), 8,00 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, 13), 7,95 (s, 0H, 10), 7,93 (s, 0H, 16), 7,56 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 73), 7,51 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 62), 7,34 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 59), 7,32 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 70), 7,12 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 56), 7,10 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 67), 7,08 – 7,03 (m, 2H, 60, 71), 6,99 – 6,94 (m, 2H, 61, 72), 4,56 (q, $J = 4,7$ Hz, 1H, 47), 4,45 (s, 1H, 53), 4,33–4,26 (m, 1H, 5), 4,25 – 4,21 (m, 1H, 8), 4,21 – 4,18 (m, 1H, 14), 4,18 – 4,15 (m, 1H, 11, 14), 3,79 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H, 2), 3,16 (dd, $J = 14,7, 6,0$ Hz, 1H, 54'), 3,12 (dd, $J = 14,4, 3,3$ Hz, 1H, 48'), 3,07 (dd, $J = 14,7, 7,0$ Hz, 1H, 54''), 2,95 (dd, $J = 14,9, 8,4$ Hz, 1H, 48''), 2,79 – 2,64 (m, 10H, 20, 25, 30, 35, 40), 1,70 – 1,65 (m, 2H, 17', 17''), 1,66 – 1,60 (m, 4H, 22', 27', 32', 37), 1,58 – 1,47 (m, 10H, 19, 24, 29, 34, 39), 1,49 – 1,42 (m, 4H, 22'', 27'', 32'', 38'), 1,40 – 1,33 (m, 2H, 18', 18''), 1,31 – 1,12 (m, 8H, 23, 28, 33, 38', 38'') ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173,21 (64), 171,45 (9), 171,27 (15), 171,21 (12), 171,14 (15, 50), 171,11 (6), 168,56 (3), 136,03 (d, $J = 4,4$ Hz, 58, 69), 127,37 (63, 74), 123,64 (56, 67), 120,87 (d, $J = 5,0$ Hz, 60, 71), 118,36 (61, 72), 118,24 (73), 118,15 (62), 111,31 (d, $J = 14,6$ Hz, 59, 70), 109,77 (49, 55), 53,33 (47, 53), 52,49 (5), 52,43 (11), 52,34 (14), 52,23 (8), 51,84 (2), 38,54 (d, $J = 23,2$ Hz, 20, 25, 30, 35, 40), 31,35 (22, 27, 32, 37), 30,55 (17), 27,84 (48), 27,19 (54), 26,86 – 26,16 (m, 19, 24, 29, 34, 39), 22,17 (d, $J = 25,2$ Hz, 23, 28, 33, 38), 21,08 (18) ppm.

3.3.5. Heptapeptid Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ile-Ile (R5I2)



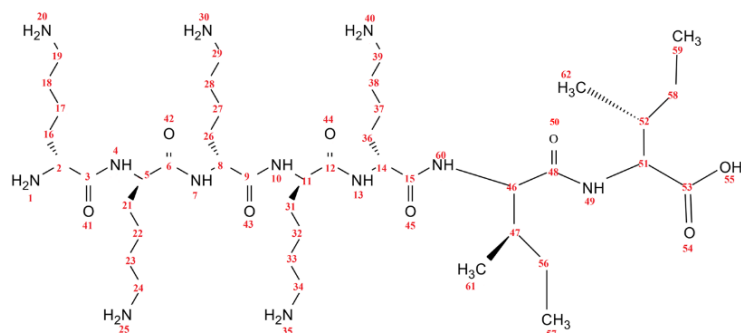
Iskorištenje: 69 %

 $C_{42}H_{84}N_{22}O_8$ $M_w = 1025,6915$ [M + H]⁺. HRMS: m/z 1025,6915 [M + H]⁺ (calc. 1025,6915) t_R (gradijent A) = 17,4

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,58 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, 4), 8,15 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 7), 8,05 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 13), 8,02 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, 10), 7,90 (s, 1H, 49), 7,86 (s, 1H, 60), 4,32 – 4,29 (m, 1H, 5), 4,28 – 4,26 (m, 1H, 14), 4,26 – 4,23 (m, 1H, 11), 4,24 – 4,18 (m, 2H, 8, 46), 4,10 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 51), 3,78 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H, 2), 2,80 – 2,68 (m, 10H, 19, 24, 29, 34, 39), 1,81 – 1,75 (m, 1H, 52), 1,76 – 1,70 (m, 1H, 47), 1,71 – 1,66 (m, 2H, 16), 1,66 – 1,59 (m, 4H, 21', 26', 31', 36'), 1,57 – 1,49 (m, 10H, 18, 23, 28, 33, 38), 1,50 – 1,45 (m, 4H, 21'', 26'', 31'', 36''), 1,45 – 1,37 (m, 2H, 56'', 58''), 1,38 – 1,33 (m, 2H, 17', 17''), 1,36 – 1,21 (m, 8H, 22', 22'', 27', 27'', 32', 32'', 37', 37''), 1,21 – 1,12 (m, 1H, 58'), 1,11 – 1,02 (m, 1H, 56'), 0,86 – 0,83 (m, 6H, 61, 62), 0,83 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, 59), 0,80 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, 57) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171,25 (12), 171,22 (9), 171,13 (15), 170,95 (6), 168,40 (3), 156,88 (d, $J = 5,4$ Hz, 20, 25, 30, 35, 40), 56,84 (46), 56,60 (51), 52,48 – 51,99 (m, 5, 8, 11, 14), 51,76 (2), 40,50 (18, 23, 28, 33, 38), 36,78 (47), 36,29 (52), 29,20 (d, $J = 18,7$ Hz, 21, 26, 31, 36), 28,46 (16), 25,43 – 24,60 (m, 22, 27, 32, 37), 24,10 (17, 56, 58), 15,52 (62), 15,22 (61), 11,34 (59), 10,98 (57) ppm.

3.3.6. Heptapeptid Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ile-Ile (K5I2)



Iskorištenje: 65 %

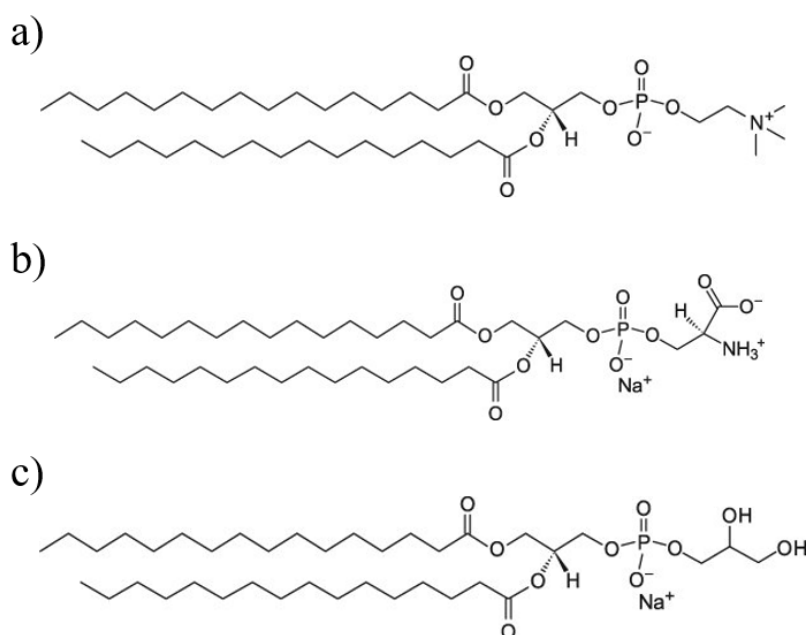
 $C_{42}H_{84}N_{12}O_8$ $M_w = 885,6608$ [M + H]⁺. HRMS: m/z 885,6608 [M + H]⁺ (calc. 885,6608) t_R (gradient A) = 17,3

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,58 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, 4), 8,15 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 7), 8,05 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 13), 8,02 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, 10), 7,90 (s, 1H, 49), 7,86 (s, 1H, 60), 4,32 – 4,29 (m, 1H, 5), 4,28 – 4,26 (m, 1H, 14), 4,26 – 4,23 (m, 1H, 11), 4,24 – 4,18 (m, 2H, 8, 46), 4,10 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 51), 3,78 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H, 2), 2,80 – 2,68 (m, 10H, 19, 24, 29, 34, 39), 1,81 – 1,75 (m, 1H, 52), 1,76 – 1,70 (m, 1H, 47), 1,71 1,66 (m, 2H, 16), 1,66 – 1,59 (m, 4H, 21', 26', 31', 36'), 1,57 – 1,49 (m, 10H, 18, 23, 28, 33, 38), 1,50 – 1,45 (m, 4H, 21'', 26'', 31'', 36''), 1,45 – 1,37 (m, 2H, 56'', 58''), 1,38 – 1,33 (m, 2H, 17', 17''), 1,36 – 1,21 (m, 8H, 22', 22'', 27', 27'', 32', 32'', 37', 37''), 1,21 – 1,12 (m, 1H, 58'), 1,11 – 1,02 (m, 1H, 56'), 0,86 – 0,83 (m, 6H, 61, 62), 0,83 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, 59), 0,80 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, 57) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,94 (53), 171,39 (15), 171,30 (9), 171,16 (12), 171,13 (6, 12), 170,90 (48), 168,70 (3), 56,82 (46), 56,66 (51), 52,49 (5), 52,37 (8, 14), 52,21 (11), 51,91 (2), 38,63 (d, $J = 5,5$ Hz, 24, 29, 34, 39), 38,48 (19), 36,70 (47, 52), 36,39 (52), 31,47 (d, $J = 27,3$ Hz, 21, 26, 31, 36), 30,64 (16), 27,08 – 26,05 (m, 18, 23, 28, 33, 38), 24,68 (58), 24,11 (56), 22,48 – 22,05 (m, 22, 27, 32, 37), 21,11 (17), 15,56(62), 15,27 (61), 11,32 (59), 10,98 (57) ppm.

3.4. Priprema liposoma

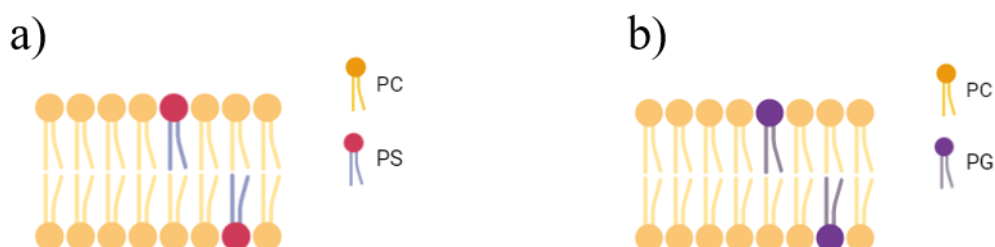
Za pripremu liposoma korištena su tri strukturno različita lipida: 1,2-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serin (DPPS) i 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG) (Slika 24). Ishodišne otopine lipida pripremljene su otapanjem 100 mg svakog lipida u 10 mL kloroforma ($\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$; $c(\text{DPPC}) = 0,0135 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{DPPS}) = 0,0132 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{DPPG}) = 0,0134 \text{ mol dm}^{-3}$), te su korištene za daljnju pripremu liposoma.



Slika 24. Strukture: a) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC), b) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoserin (DPPS) i c) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG)

Liposomi su pripremljeni metodom hidratacije tankog lipidnog filma. Odgovarajuća količina ishodišne otopine pipetirana je u okrugle tikvice, a kloroform je uklonjen isparavanjem pomoću rotacijskog isparivača. Na stijenkama tikvice formirao se tanki lipidni film koji je zatim resuspendiran u fosfatnom puferu (PB). Vodena otopina PB-a ionske jakosti $I_C = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pripremljena je iz komercijalno dostupnih soli – dinatrijevog hidrogenfosfata, bezvodnog (Na_2HPO_4 , $\geq 99 \%$, Kemika, Zagreb, Hrvatska) i natrijevog dihidrogenfosfata (NaH_2PO_4 , p.a., Kemika) – otopljenih u Milli-Q vodi, te titrirana svježe pripremljenom otopinom natrijeva hidroksida (NaOH , T.T.T., p.a.) iste ionske jakosti ($I_C = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$) do postizanja $\text{pH} = 7,4$.

Suspenzije liposoma pripremljene su u ciklusima od tri koraka: mehaničkim miješanjem na vorteks miješalici te naizmjeničnim uranjanjem tikvica u vruću i ledenu kupelj.¹⁸⁰ Pripremljena su dva različita modelna sustava liposoma: eukariotski (EU; DPPC + DPPS, 90:10 množinski omjer) i prokariotski model (PRO; DPPC + DPPG, 90:10 množinski omjer), koji predstavljaju modele eukariotskih i prokariotskih plazmatskih membrana (slika 25). Nakon toga, u lipidne suspenzije dodani su sintetizirani peptidi (R5F2, K5F2, R5W2, K5W2, R5I2, K5I2) u molarnom omjeru 1:30 (peptid:lipid).²¹ Tako dobiveni multilamelarni liposomi sa i bez peptida najmanje su 31 put potisnuti kroz ekstruder s grijaćim blokom (Avanti® Mini Extruder) kroz polikarbonatne membrane veličine pora 100 nm i uz pomoć potpornih filtera od 10 mm, pri temperaturi višoj od temperature glavnog faznog prijelaza korištenih lipida, kako bi se dobili unilamelarni liposomi.



Slika 25. Shematski prikaz modelnih plazma membrana: a) eukariota i b) prokariota

3.5. DLS i ELS

Raspodjela veličina LUV-ova određena je tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) pomoću spektrofotometra za korelaciju fotona (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) opremljenog zelenim laserom valne duljine 532 nm. Prosječni hidrodinamički promjer (d_H) definiran je kao vrijednost na maksimumu vrha signala raspodjele volumena čestica. Svi navedeni rezultati predstavljaju prosjek šest mjerenja provedenih pri temperaturi od 25 °C.

Zeta-(ζ -) potencijal određen je metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) koristeći preklopnu kapilarnu ćeliju za mjerenje ζ -potencijala (Panalytical Folded Capillary Zeta Cell, Malvern). Vrijednosti ζ -potencijala izračunate su iz izmjerene elektroforetske mobilnosti prema Henryjevoj jednadžbi primjenom Smoluchowskijeve aproksimacije. Mjerenja su ponovljena tri puta. DLS i ELS podaci obrađeni su pomoću softvera Zetasizer, verzija 7.13 (Malvern Instruments). Sve suspenzije analizirane su pri koncentraciji od 5 mg mL⁻¹.

3.6. Razlikovno-pretražna kalorimetrija

Eksperimenti razlikovno-pretražne kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) provedeni su na mikrokalorimetru Nano-DSC (TA Instruments, New Castle, DE, SAD). Koncentracija liposoma s/bez peptida korištena za mjerenja iznosila je 5 mg mL⁻¹. Sve suspenzije bile su prethodno degazirane pod vakuumom (0,64 bara; 10 minuta). Mjerenja su provedena pri brzini zagrijavanja od 1 °C min⁻¹, u duplikatima, kroz dva ponovljena ciklusa zagrijavanja i hlađenja, u temperaturnom rasponu od 20 do 60 °C. Fosfatni pufer (PB), koji je korišten kao referenca, ispitan je u temperaturnom rasponu od 10 do 90 °C. Analiza podataka dobivenih tijekom drugog ciklusa zagrijavanja (bez utjecaja toplinske povijesti)⁸³ provedena je korištenjem softverskog paketa Nano Analyze (TA Instruments). Nakon oduzimanja referentne DSC krivulje (PB) od krivulja uzoraka (drugo zagrijavanje), dobivene krivulje su korigirane u odnosu na baznu liniju i analizirane u temperaturnom području od 30 do 52 °C. Temperature faznih prijelaza – pretprijelaz (T_p) i glavni fazni prijelaz (T_m) – određene su iz maksimuma odgovarajućih krivulja ($T_{p,m}$ i $T_{m,m}$). DSC krivulje peptida R5F2/K5F2/R5W2/K5W2/R5I2/K5I2 u PB zabilježene su pod istim eksperimentalnim

uvjetima kako bi se potvrdilo da peptidi ne pokazuju termotropna zbivanja u ispitivanom temperaturnom rasponu.

3.7. Temperaturno-ovisna UV-Vis spektroskopija

Temperaturno-ovisni UV-Vis spektri izmjereni su pomoću UV-Vis spektrofotometra Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD) u spektralnom rasponu od 250 do 500 nm. Uzorci koncentracije $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ su pipetirani u kvarcne kivete volumena 1 mL, začepljeni i postavljeni u temperaturno kontrolirani držač kiveta. Spektri lipidnih suspenzija u odsutnosti/prisutnosti peptida snimljeni su najmanje dva puta u temperaturnom rasponu od 30 do 52 °C. Dobiveni spektri izglacani su metodom najmanjih kvadrata, Savitzky-Golay metodom (polinom 3. stupnja i 10 točaka)¹⁸¹ te analizirani u spektralnom području od 250 do 300 nm primjenom višedimenzionalne analize krivulja (eng. *multivariate curve analysis*, MCA), korištenjem javno dostupnog Matlab koda.¹⁸² Prikupljeni spektri mogu se prikazati u obliku matrice (**D**) kao umnožak dviju matrica: jedne koja predstavlja koncentracijski profil (**C**) komponente koja obuhvaća svu temperaturno-ovisnu varijabilnost u spektrima, i druge koja predstavlja njezin spektralni profil (**S**): $\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E}$, pri čemu **E** predstavlja matricu reziduala koji nisu objašnjeni $\mathbf{CS}^T$ umnoškom.^{94,156}

3.8. FTIR-ATR spektroskopija

FTIR spektri snimani su za sljedeće uzorke: suspenzije EU i PRO modelnih sustava u odsutnosti i prisutnosti kationsko-hidrofobnih peptida R5F2, K5F2, R5W2, K5W2, R5I2 i K5I2, za čiste peptide te za pufer (PB). Snimani su pomoću FTIR spektrometra Invenio-S (Bruker), opremljenog fotonaponskim LN-MCT detektorom i jedinicom BioATR II. Riječ je o kružnoj ATR jedinici radijusa 2 mm, koja se temelji na tehnologiji dvostrukog kristala, pri čemu je gornji ATR kristal izrađen od silicija (Si), a donji od cinkovog selenida (ZnSe). Unutrašnjost ATR ćelije kontinuirano se propuhuje dušikom (N₂) iz vanjskog spremnika, a temperatura ćelije kontrolira se pomoću vanjske cirkulirajuće vodene kupelji (Huber Ministat 125).

Suspenzije PRO i EU sustava sa i bez peptida snimane su pri koncentraciji od 5 mg mL⁻¹, dok su spektri čistih peptida snimani pri koncentraciji od 1 mg mL⁻¹. Za svako mjerenje, 30 µL uzorka pipetirano je izravno na ATR kristal. Za svaku suspenziju provedena su najmanje tri neovisna punjenja ATR ćelije, dok je za referentnu otopinu (pufer) provedeno jedno mjerenje. Sva mjerenja provedena su na dvije temperature, 30 i 50 °C, kako bi se suspenzije

snimile u $L_{\beta'}$ i u L_{α} . U svim mjerenjima korišten je zrak kao pozadinski spektar. Svi spektri prikupljeni su pri nominalnoj razlučivosti od 2 cm^{-1} , uz 256 snimaka, korištenjem programa OPUS 8.5 SPI (20200710). Spektri su obrađeni u programu Spectragryph.¹⁸¹

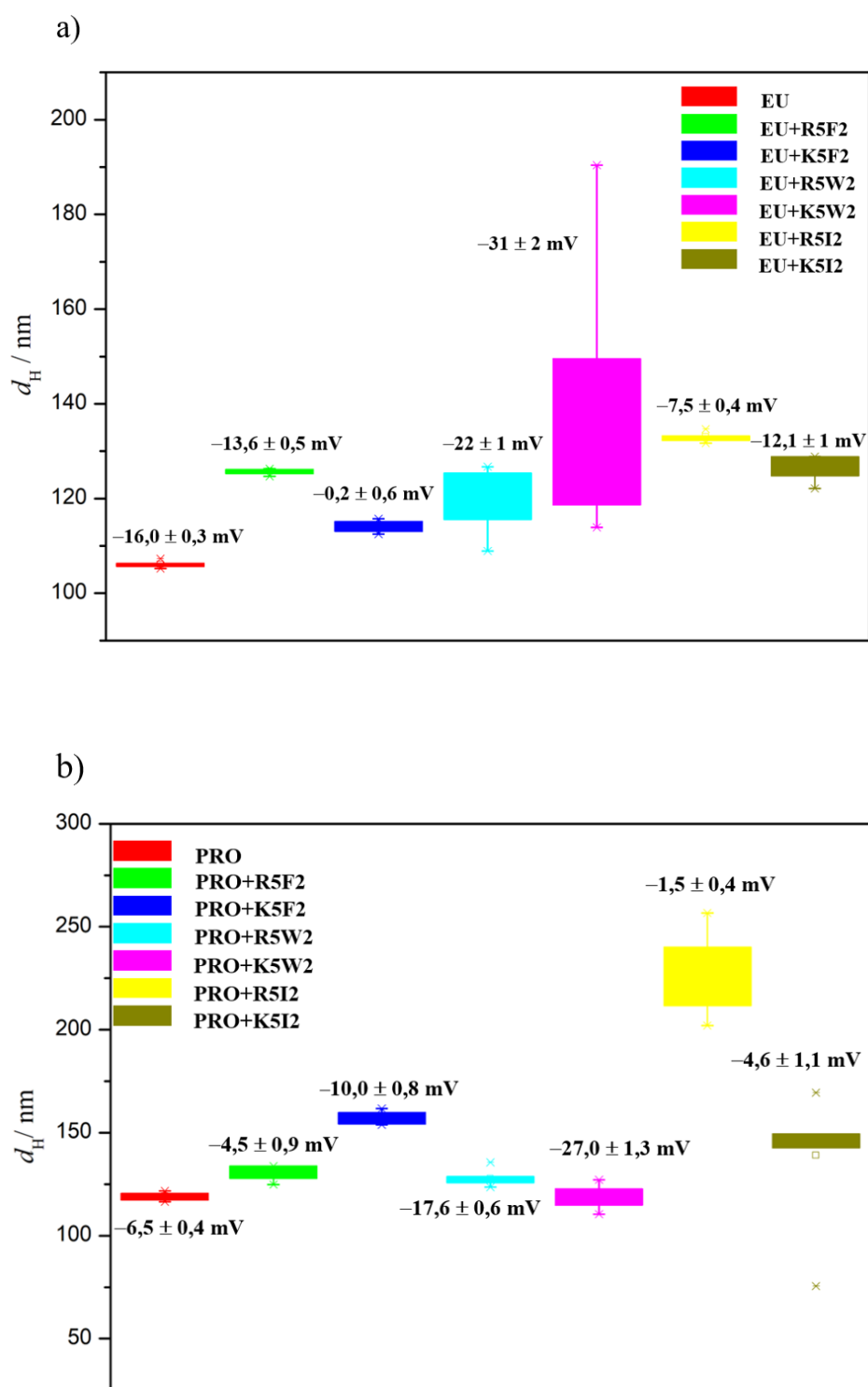
Osim navedenih tehnika koje su se koristile za karakterizaciju interakcije peptida s modelnim membranama, provedena su i preliminarna biološka ispitivanja antimikrobne aktivnosti. Minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *minimal inhibitory concentration*, MIC) sintetiziranih kationsko-hidrofobnih heptapeptida određena je standardnom metodom serijskog razrjeđenja u bujonu u mikrotitarskim pločama.¹⁸³ Rezultati preliminarnih ispitivanja se nalaze u Dodatku 8.4.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. DLS i ELS

Rezultati DLS mjerenja (slika 26) pokazuju da sustavi DPPC+DPPS (EU) i DPPC+DPPG (PRO) formiraju stabilne i relativno homogene LUV-ove, pri čemu su LUV-ovi EU sustava nešto manjih dimenzija i s izraženijim negativnim ζ -potencijalom u odnosu na LUV-ove PRO sustava. Dodavanje peptida rezultiralo je različitim promjenama u veličini čestica i površinskom naboju, ovisno o vrsti peptida i sastavu membrane. U EU sustavu svi peptidi osim R5I2 kreću se u rasponu do ≈ 130 nm, dok su u PRO sustavu veći promjeri (>150 nm) zabilježeni kod K5F2, K5I2 i posebno R5I2, kod kojeg je prosjek veći od 220 nm, uz visoku PdI (od engl. *polydispersity index*) vrijednost, što upućuje na smanjenu homogenost populacije vezikula. Većina sustava imala je $PdI < 0,20$, što ukazuje na homogenu populaciju, s iznimkom K5W2 u EU i R5I2, K5I2 u PRO sustavu, kod kojih su vrijednosti PdI bile znatno povišene.

ζ -potencijali potvrdili su negativan površinski naboj svih sustava. U EU sustavu dodavanje kationskih peptida u većini je slučajeva dovelo do smanjenja negativnog naboja, pri čemu je učinak bio izraženiji kod K-peptida. Izuzetak su peptidi koji sadrže triptofan (R5W2 i K5W2) koji su uzrokovali znatno negativnije vrijednosti u odnosu na kontrolu, što sugerira da je riječ o znatno stabilnijim sustavima. Nasuprot tome, u PRO sustavu većina peptida uzrokovala je porast negativnog naboja u odnosu na kontrolnu membranu, pri čemu je taj učinak bio posebno izražen kod peptida s triptofanom. Iznimke su R5F2 i R5I2, kod kojih je negativni naboj bio smanjen ili gotovo neutraliziran. Rezultati mjerenja svih sustava nalaze se u dodatku 8.2.

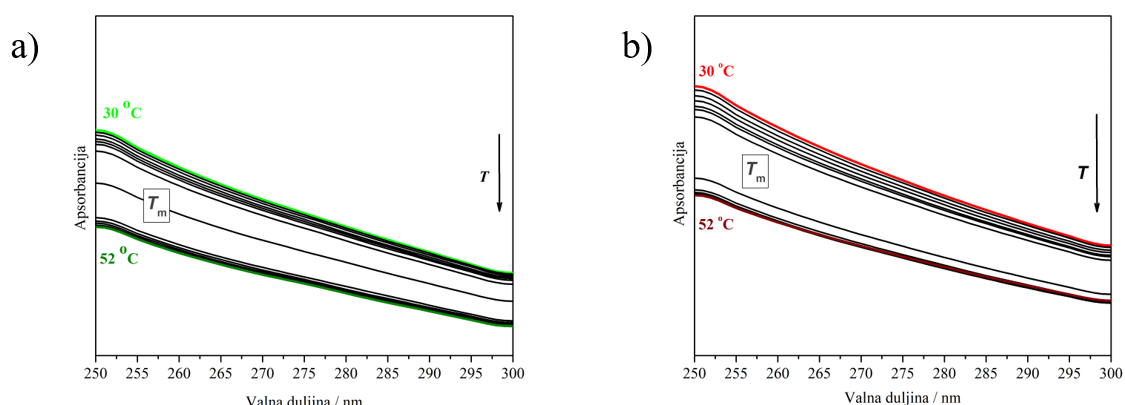


Slika 26. Veličina LUV-ova iskazana kao d_H i ζ -potencijal: a) EU $\pm$ R5F2/K5F2/R5W2/K5W2/R5I2/K5I2 i b) PRO $\pm$ R5F2/K5F2/R5W2/K5W2/R5I2/K5I2

4.2. Termotropna svojstva modelnih eukariotskih i prokariotskih membrana u prisutstvu kationsko-hidrofobnih peptida

Termotropna svojstva modelnih membrana EU i PRO sustava ispitana su razlikovno-pretražnom kalorimetrijom i temperaturno-ovisnom UV-Vis spektroskopijom. Spomenute lipidne smjese su istražene u odsutnosti i prisutnosti kationsko-hidrofobnih heptapeptida R5F2, K5F2, R5W2, K5W2, R5I2 i K5I2. Budući da sve lipidne suspenzije pokazuju zamućenje ovisno o temperaturi, UV-Vis spektri snimani su kao funkcija temperature (slika 27). Temperature glavnog faznog prijelaza (T_m) i pretprijelaza (T_p) određene UV-Vis tehnikom uspoređene su s vrijednostima dobivenima pomoću DSC.

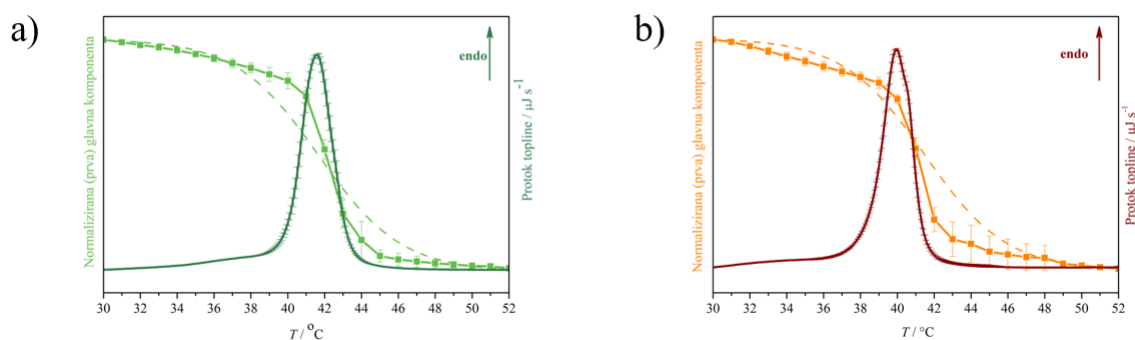
Cilj je bio ispitati na koji način razlike u kemijskoj prirodi pozitivno nabijenih bočnih lanaca (arginin/lizin), kao i vrsta hidrofobne aminokiseline (fenilalanin, triptofan ili izoleucin) u kombinaciji s vrstom anionskog lipida (DPPG/DPPS), utječu na termotropna svojstva membranskog dvosloja.



Slika 27. Primjer temperaturno-ovisnih UV-Vis spektara a) EU sustav (svijetlozeleni/maslinasto zeleni spektar za 30/52 °C) i b) PRO sustav (svijetlocrveni/tamnocrveni spektar za 30/52 °C)

4.2.1. Termotropna svojstva modelnih eukariotskih i prokariotskih membrana

Najprije su izmjereni sustavi EU i PRO modelnih membrana bez dodatka peptida. Ovi sustavi korišteni su kao reference s ciljem praćenja promjene u faznim prijelazima izazvane prisutnošću različitih peptida.



Slika 28. DSC krivulje i koncentracijski profili normirane (prve) glavne komponente dobiveni temperaturno ovisnom UV-Vis spektroskopijom, prikazani zajedno s dvostrukim Boltzmannovim sigmoidalnim prijelazom: a) EU sustav (tamnozeleno prikazuje DSC trag, a svijetlozeleno prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija), b) PRO sustav (smeđa prikazuje DSC trag, a narančasto projekciju UV-Vis podataka pomoću MCA (puna linija) s odgovarajućim dvostrukim Boltzmannovim profilom (isprekidana linija))

Iz DSC mjerenja u oba sustava uočen je glavni fazni prijelaz pri temperaturi (T_m) između 40 i 42 °C¹⁸⁴, dok se T_p očituje tek kao blago odstupanje od bazne linije.⁹⁴ Prema prijašnjim saznanjima, ovakav oblik DSC krivulje očekivan je za LUV-ove sastavljene pretežno od PC-lipida, koji tijekom zagrijavanja prolaze kroz valovitu fazu.^{94,185,186} Konkretno, u LUV sustavima priređenima od DPPC uz dodatak lipida DPPG u molarnom udjelu od 5 %, pretprijelaz je jedva primjetan, dok se glavni prijelaz pojavljuje kao široki signal s dva preklapajuća maksimuma ($T_{m, 1/2}$), što je objašnjeno kao razdvajanja promjene u zakrivljenosti (prvi maksimum; $T_{m,1}$) i stanjenja lipidnog dvosloja (drugi maksimum; $T_{m,2}$). U modelnom PRO sustavu T_m je blago niži u odnosu na EU sustav, što upućuje na to da različiti anionski lipidi doprinose različitoj stabilnosti lipidnog dvosloja. Eksperimentalno određene temperature faznih prijelaza (T_p i T_m) za EU i PRO sustave prikazane su u Tablici 2. Stabilizacija u modelnom EU sustavu vjerojatno proizlazi iz jačih međulipidnih interakcija, pri čemu serinska skupina lipida

DPPS omogućuje dodatnu stabilizaciju kroz uspostavu vodikovih veza i elektrostatskih interakcija¹⁸⁷, a čega nema kod lipida DPPG.

Temperaturno-ovisna UV-Vis mjerenja analizirana MCA metodom pokazala su da koncentracijski profili oba sustava bez peptida imaju karakterističan sigmoidalni oblik s jednom točkom infleksije. Dobivene vrijednosti T_m za EU i PRO sustave praktički su identične, što ukazuje na to da s aspekta promjene zamućenosti lipidnog dvosloja ne postoje značajne razlike između ta dva sustava.

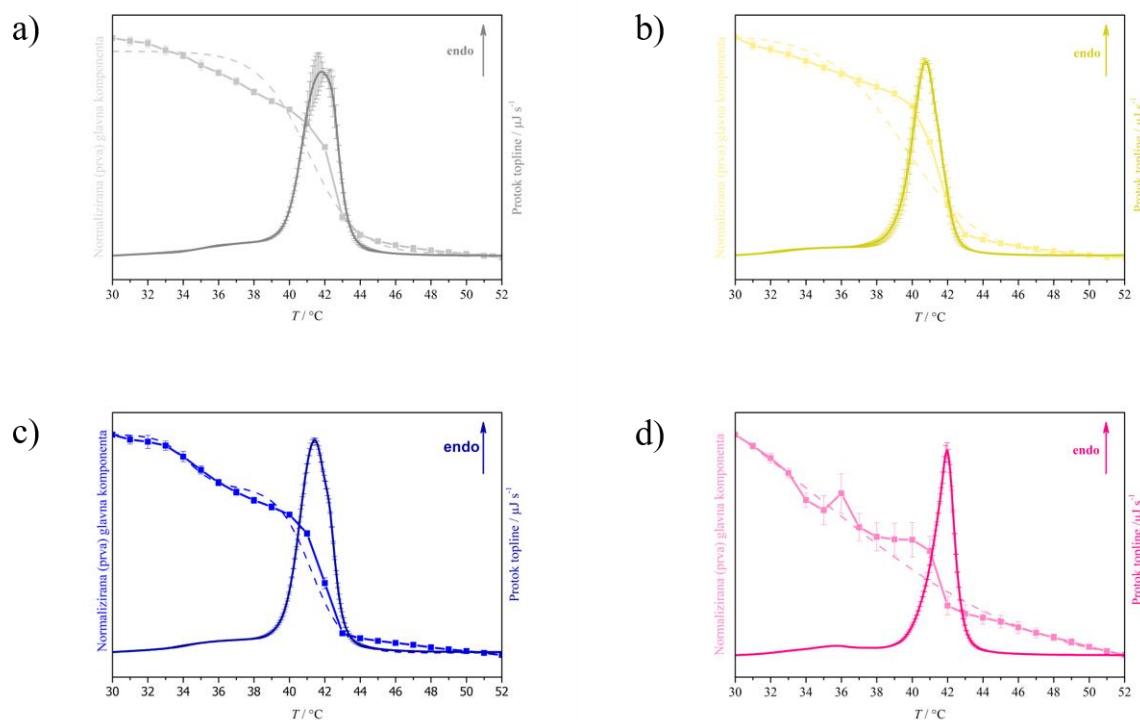
Tablica 2. Temperature faznih prijelaza EU i PRO sustava određene iz maksimuma DSC krivulja (T_p i T_m za pretprijelaz i glavni fazni prijelaz), te iz točaka infleksije koncentracijskih profila dobivenih multivarijatnom analizom krivulja (MCA; T_p i T_m)

Sustav	DSC		UV-Vis	
	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_{m, 1(2)} / ^\circ\text{C}$	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_{m, 1(2)} / ^\circ\text{C}$
EU	≈ 37	$41,6 \pm 0,1$	n.o.	$41,7 \pm 0,4$
PRO	$\approx 33,2$	$40,0 \pm 0,1$ $40,6 \pm 0,1$	n.o.	$41,5 \pm 0,3$

n.o. obilježava da nije opaženo, $\approx$ odnosi se na procjenu odstupanja od bazne linije

4.2.2. Eukariotske i prokariotske membrane u prisutnosti R5F2 i K5F2 peptida

Dodavanje peptida R5F2 i K5F2 mijenja termotropna svojstva modelnih EU i PRO sustava, ovisno o prirodi kationske skupine (arginin/lizin) i tipu anionskog lipida (DPPS/DPPG). Odgovarajuće temperature faznih prijelaza dobivene iz DSC i UV-Vis mjerenja prikazane su u Tablici 3.



Slika 29. DSC krivulje i koncentracijski profili (prve) glavne komponente dobiveni temperaturno ovisnom UV-Vis spektroskopijom, prikazani zajedno s dvostrukim Boltzmannovim sigmoidalnim prijelazom: a) EU + R5F2 (tamnosiva krivulja prikazuje DSC trag, svijetlosiva krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući jednostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija); b) PRO + R5F2 (tamnožuta krivulja prikazuje DSC trag, a svijetložuta krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući jednostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija); c) EU + K5F2 (tamnoplava krivulja prikazuje DSC trag, a svijetloplava krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija); d) PRO + K5F2 (tamnoružičasta krivulja prikazuje DSC trag, a svijetloružičasta krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka pomoću MCA (puna linija) uz odgovarajući jednostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija)

U modelnom EU sustavu DSC krivulja u prisutnosti peptida R5F2 pokazuje slabije izražen signal na položaju očekivanog T_p te široki signal koji odgovara glavnom faznom prijelazu LUV-ova sastavljenih od DPPC i DPPS lipida. Prisutnost R5F2 očituje se sniženjem T_p i T_m vrijednosti te širenjem glavnog prijelaza, što ukazuje na stabilizaciju fluidne faze lipidnog dvosloja.^{109,188} MCA primijenjena na temperaturno-ovisnim UV-Vis spektrima bilježi diskontinuiranu promjenu zamućenosti pri temperaturi koja se podudara s T_m vrijednošću utvrđenom pomoću tehnike DSC (slika 29 a).

U modelnom PRO sustavu, R5F2 također dovodi do sniženja T_m i stabilizacije fluidne faze, dok pretprijelaz nije vidljiv iz podataka dobivenih DSC i UV-Vis tehnikama (slika 29 b).

Za razliku od R5F2, dodatak peptida K5F2 u oba sustava rezultira izraženijim pretprijelazom, što je vidljivo u rezultatima dobivenim tehnikama DSC te UV-Vis spektroskopije. Glavni fazni prijelaz pritom pokazuje razlike između sustava: u PRO modelu T_m je moguće odrediti samo vizualnom procjenom točke infleksije koncentracijskog profila jedne komponente na koju su projicirani temperaturno-ovisni UV-Vis spektri (slika 29 d), dok se u EU modelu na DSC krivulji uočavaju dva nerazlučena maksimuma (slika 29 c). Sličnost T_m vrijednosti dobivenih DSC-om i onih procijenjenih UV-Vis tehnikom sugerira da K5F2 djeluje na dva načina: i) pojačava amplitudu površinskih valova, što je povezano s izraženijim T_p signalom, te ii) povećava krutost membrane, što se očituje u povišenju T_m u odnosu na čiste sustave. Iako DSC sam po sebi ne mjeri mehanička svojstva membrane, poznato je da više T_m vrijednosti koreliraju s povećanom krutošću lipidnog dvosloja.¹⁸⁹

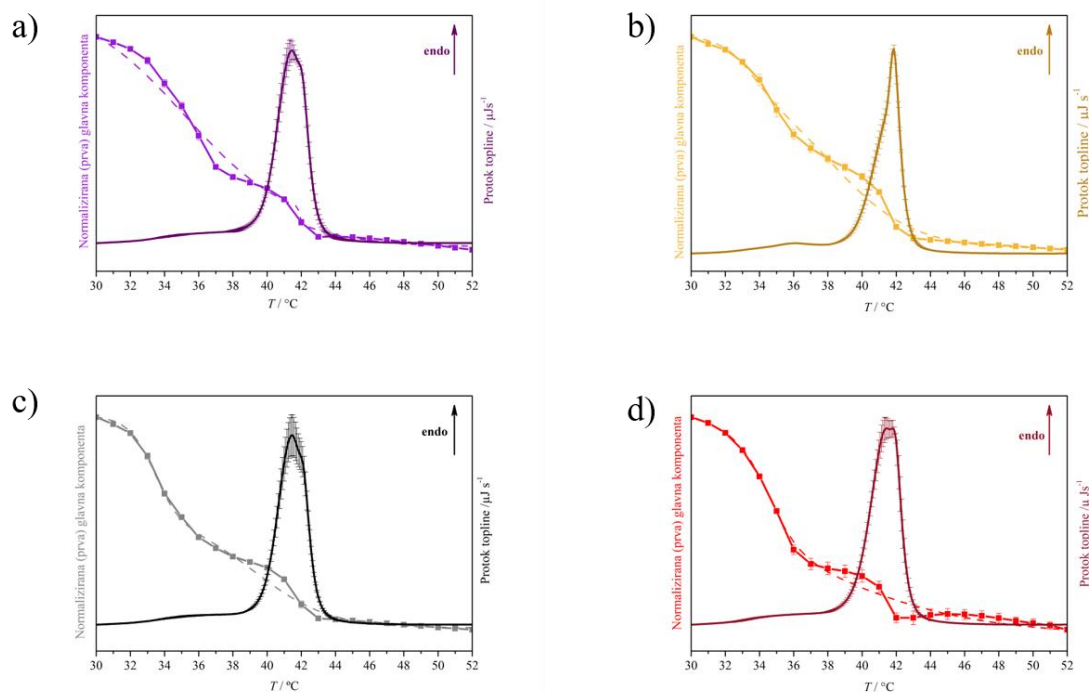
Tablica 3. Temperature faznih prijelaza EU/PRO + R5F2/K5F2 sustava određene iz maksimuma DSC krivulja (T_p i T_m za pretprijelaz i glavni fazni prijelaz), te iz točaka infleksije koncentracijskih profila dobivenih multivarijatnom analizom krivulja (MCA; T_p i T_m)

Sustav	DSC		UV-Vis	
	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_m, 1/(2) / ^\circ\text{C}$	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_m, 1/(2) / ^\circ\text{C}$
EU + R5F2	$\approx 34,0$	$40,8 \pm 0,1$	n. o.	$39,5 \pm 0,4$
EU + K5F2	$35,6 \pm 0,1$	$42,0 \pm 0,1$	$35,0 \pm 1,0$	$\approx 41,5$
PRO + R5F2	$35,9 \pm 0,1$	$41,8 \pm 0,1$	n. o.	$41,0 \pm 0,3$
PRO + K5F2	$36,0 \pm 0,1$	$41,4 \pm 0,1$ $42,2 \pm 0,1$	$34,0 \pm 2,0$	$41,2 \pm 0,4$

n.o. - nije opaženo, $\approx$ odnosi se na procjenu odstupanja od bazne linije

4.2.3. Eukariotske i prokariotske membrane u prisutnosti R5W2 i K5W2 peptida

Dodavanje R5W2 i K5W2 peptida dovodi do promjena u termotropnim svojstvima modelnih EU i PRO membrana, no ti su učinci općenito manji u odnosu na R5F2 i K5F2 peptide.



Slika 30. DSC krivulje i koncentracijski profili (prve) glavne komponente dobiveni temperaturno ovisnom UV-Vis spektroskopijom, prikazani zajedno s jednostrukim ili dvostrukim Boltzmannovim sigmoidalnim prijelazom: a) EU + R5W2 (tamnoljubičasta krivulja prikazuje DSC trag, a svijetloljubičasta krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija) ; b) PRO + R5W2 (tamnonarančasta krivulja prikazuje DSC trag, a svijetlonarančasta krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija); c) EU + K5W2 (crna krivulja prikazuje DSC trag, a siva krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija)); d) PRO + K5W2 (tamnocrvena krivulja prikazuje DSC trag, a svijetlocrvena krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka pomoću MCA (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija))

Prisutnost R5W2 peptida u modelnom EU sustavu očituje se malim sniženjem temperature pretprijelaza (T_p), dok je temperatura glavnog prijelaza (T_m) gotovo ista kao i u sustavu bez peptida. Promjene zabilježene UV-Vis spektroskopijom također su vrlo slabe, što

ukazuje na ograničen utjecaj peptida na termotropna svojstva membrane (slika 30 a). K5W2 pokazuje sličan učinak, pretprijelaz ostaje izražen, a glavni prijelaz stabilan (slika 30 c). UV-Vis podaci upućuju na nešto izraženiju promjenu u prisutnosti K5W2 u odnosu na R5W2.

U modelnom PRO sustavu, prisutnost R5W2 peptida rezultira malim sniženjem T_p i T_m vrijednosti. UV-Vis spektroskopija pokazuje diskretne promjene u odnosu na čisti sustav, što dodatno potvrđuje ograničen učinak peptida na stabilnost membrane (slika 30 b). K5W2 uzrokuje izraženije sniženje T_p u usporedbi s R5W2, dok ostali parametri ostaju relativno stabilni (slika 30 d).

Slabiji utjecaj peptida koji sadrže triptofan u odnosu na njihove fenilalaninske analoge u skladu je s dosadašnjim literaturnim spoznajama. Triptofan se preferencijalno lokalizira između vodenog okoliša i lipidnog dvosloja, gdje ostvaruje π -kationske i vodikove veze s fosfatnim glavama lipida, ali ne prodire dublje u hidrofobnu jezgru membrane.¹⁹⁰ Ovakvo površinsko usidrenje omogućuje adsorpciju peptida uz očuvanje strukturne organizacije dvosloja, što može objasniti minimalan utjecaj R5W2 i K5W2 peptida na termotropna svojstva modelnih EU i PRO membrana.

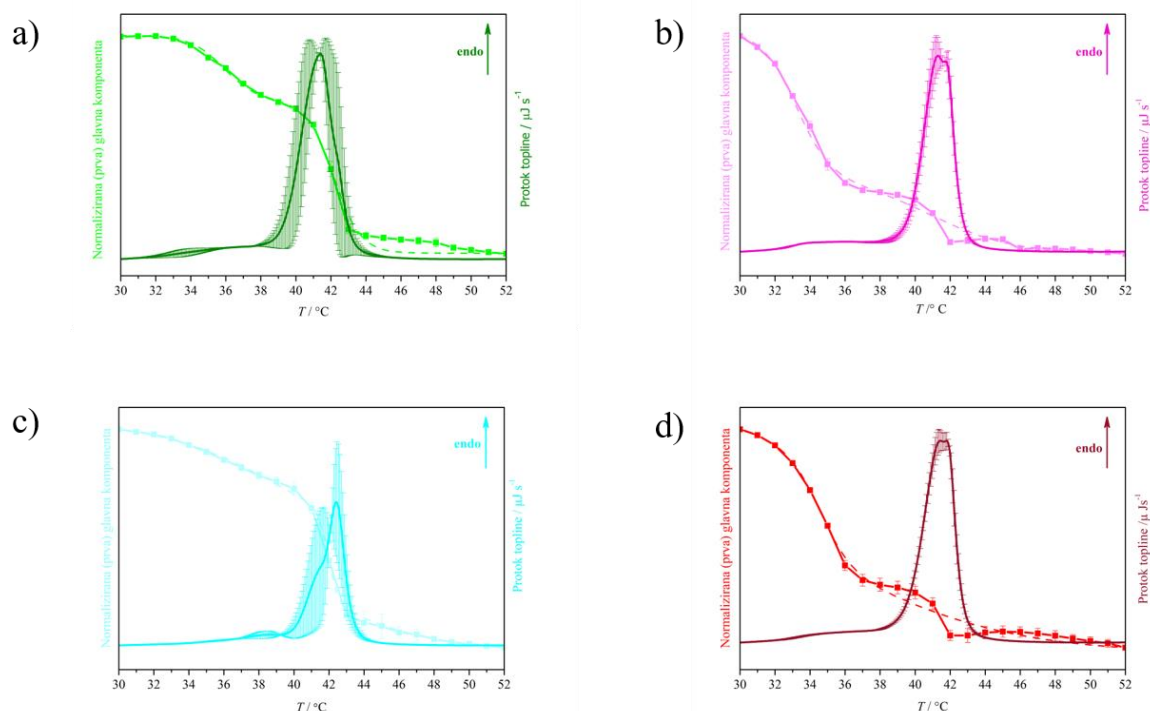
Tablica 4. Temperature faznih prijelaza EU/PRO + R5W2/K5W2 sustava određene iz maksimuma DSC krivulja (T_p i T_m za pretprijelaz i glavni fazni prijelaz), te iz točaka infleksije koncentracijskih profila dobivenih multivarijatnom analizom krivulja (MCA; T_p i T_m)

Sustav	DSC		UV-Vis	
	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_{m, 1(2)} / ^\circ\text{C}$	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_{m, 1(2)} / ^\circ\text{C}$
EU + R5W2	$\approx 35,2$	$41,2 \pm 0,1$ $42,0 \pm 0,1$	$35,2 \pm 0,9$	$\approx 41,8$
EU + K5W2	$\approx 35, 2$	$41,5 \pm 0,1$ $42,0 \pm 0,1$	$33,4 \pm 0,5$	$39,0 \pm 1,0$
PRO + R5W2	$36,0 \pm 0,1$	$41,1 \pm 0,1$ $41,9 \pm 0,1$	$34,0 \pm 2,0$	$\approx 41,6$
PRO + K5W2	$\approx 34,3$	$41,4 \pm 0,1$ $41,9 \pm 0,1$	$31,6 \pm 0,2$	$\approx 41,5$

$\approx$ odnosi se na procjenu odstupanja od bazne linije

4.2.4. Eukariotske i prokariotske membrane u prisutnosti R5I2 i K5I2 peptida

Dodavanje R5I2 i K5I2 peptida uzrokuje određene promjene u termotropnim svojstvima EU i PRO modelnih sustava, pri čemu su učinci izraženiji u usporedbi s triptofanskim analogima, ali i dalje manji u odnosu na peptide s fenilalaninom. Odgovarajuće temperature faznih prijelaza dobivene iz DSC i UV-Vis mjerenja prikazane su u Tablici 5.



Slika 31. DSC krivulje i koncentracijski profili (prve) glavne komponente dobiveni temperaturno ovisnom UV-Vis spektroskopijom, prikazani zajedno s jednostrukim ili dvostrukim Boltzmannovim sigmoidnim prijelazom: a) EU + R5I2 (maslinasto zelena krivulja prikazuje DSC trag, a zelena krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija) ; b) PRO + R5I2 (ružičasta krivulja prikazuje DSC trag, a svjetloružičasta krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija); c) EU + K5I2 (tirkizna krivulja prikazuje DSC trag, a svjetlotirkizna krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija); d) PRO + K5I2 (tamnocrvena krivulja prikazuje DSC trag, a svjetlocrvena krivulja prikazuje projekciju UV-Vis podataka pomoću MCA (puna linija) uz odgovarajući dvostruki Boltzmannov profil (isprekidana linija).

U modelnom EU sustavu prisutnost peptida R5I2 uzrokuje malo sniženje temperature pretprijelaza (T_p), dok je glavni prijelaz (T_m) nepromijenjen. UV-Vis podaci potvrđuju sniženje T_p i T_m vrijednosti (slika 31 a); K5I2 pokazuje nešto izraženiji učinak: pretprijelaz u DSC-u i UV-Vis-u zadržava se, ali dolazi do manjeg pomaka T_m vrijednosti te pojave dvostrukog maksimuma u DSC-u, što može ukazivati na očuvanje razdvajanja promjene u zakrivljenosti (prvi maksimum) i stanjenja lipidnog dvosloja (drugi maksimum). Unatoč tim promjenama, ukupna strukturna stabilnost dvosloja ostaje očuvana (slika 31 c).

U PRO sustavu R5I2 peptid uzrokuje lagano sniženje T_p i T_m vrijednosti u odnosu na čisti sustav, pri čemu se podaci dobiveni iz UV-Vis mjerenja podudaraju s DSC rezultatima (slika 31 b). K5I2 pokazuje sličan obrazac djelovanja: malo sniženje T_p te zadržavanje glavnog prijelaza, ali uz nešto izraženiji učinak na zamućenost membrane, što može ukazivati na povećanu interakciju s površinskim slojevima dvosloja (slika 31 d).

Tablica 5. Temperature faznih prijelaza EU/PRO + R5I2/K5I2 sustava određene iz maksimuma DSC krivulja (T_p i T_m za pretprijelaz i glavni fazni prijelaz), te iz točaka infleksije koncentracijskih profila dobivenih multivarijantnom analizom krivulja (MCA; T_p i T_m)

Sustav	DSC		UV-Vis	
	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_{m, 1(2)} / ^\circ\text{C}$	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_{m, 1(2)} / ^\circ\text{C}$
EU + R5I2	$\approx 35,7$	$41,2 \pm 0,1$	$35,9 \pm 0,3$	$42,2 \pm 0,2$
EU + K5I2	$\approx 38,5$	$41,3 \pm 0,1$ $42,3 \pm 0,1$	$39,8 \pm 0,2$	$42,0 \pm 0,2$
PRO + R5I2	$\approx 33,5$	$41,2 \pm 0,1$ $41,7 \pm 0,1$	$33,2 \pm 0,3$	$41,0 \pm 1,0$
PRO + K5I2	$\approx 33,8$	$41,1 \pm 0,1$ $41,7 \pm 0,1$	$34,2 \pm 0,3$	$37,6 \pm 0,7$

$\approx$ odnosi se na procjenu odstupanja od bazne linije

4.3. FTIR-ATR

Osim proučavanja utjecaja peptida na termotropna svojstva modelnih EU i PRO membrana, ispitivana je i interakcija peptida s lipidnim membranama na molekulskoj razini koristeći FTIR-ATR spektroskopiju kako bi se dobio uvid u promjene uređenja. Cilj je bio utvrditi eventualne promjene u uređenju lipidnog dvosloja uslijed adsorpcije peptida na njihovu površinu te način na koji se mehanizam adsorpcije peptida na lipidne membrane mijenja kao funkcija pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka (arginina/lizina) te različitih hidrofobnih segmenata (fenilalanin/triptofan/izoleucin). Kao i kod istraživanja termotropnih svojstava, najprije su istraženi modelni EU i PRO sustavi u odsutnosti peptida, a potom u njihovoj prisutnosti.

U analizi utjecaja peptida na lipidne membrane FTIR spektroskopijom obrađena su sljedeća područja spektra:

- 1) Područje $2980\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$ – antisimetrično i simetrično istezanje metilenskih skupina ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$), informacije o pakiranju i konformaciji ugljikovodičnih lanaca¹⁶⁷ (*Napomena:* Radi kratkoće, oznaka $\nu_{(\text{a})\text{s}}\text{CH}_2$ će se koristiti dalje u tekstu za antisimetrično i simetrično istezanje metilenskih skupina kad se u pojedinoj rečenici pojavi potreba da se oba normalna moda zajedno spomenu).
- 2) Područje $1800\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ – signali potječu od istezanja karbonilne skupine glicerolne okosnice ($\nu\text{C}=\text{O}$) koja je ili nije uključena u stvaranje vodikovih veza s okolnim molekulama vode te drugim akceptorima ili donorima vodikovih veza¹⁶⁷ (engl. *non-hydrogen bonded*, non-HB i engl. *hydrogen bonded*, HB) ($\nu\text{C}=\text{O}_{(\text{non-})\text{HB}}$)
- 3) Područje $1515\text{--}1395\text{ cm}^{-1}$ – signali u ovom području potječu od striženja (engl. *scissoring*) metilenske skupine ugljikovodičnih lanaca (γCH_2)¹⁶⁸
- 4) Područje $1395\text{--}1325\text{ cm}^{-1}$ – u ovom području vrpce potječu od tzv. kišobran (engl. *umbrella*) vibracija metilnih skupina (γCH_3) i njihovanja (engl. *wagging*) ugljikovodičnih lanaca metilenske skupine (ωCH_2)¹⁶⁷
- 5) Područje $1275\text{--}1130\text{ cm}^{-1}$ – signali potječu od antisimetričnog istezanja fosfatnih skupina ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$) lipidnih molekula, koje, kao i C=O skupine, mogu biti non-HB ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{\text{nonHB}}$) i HB ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{\text{HB}}$) te od simetričnog ($\nu_{\text{s}}\text{C}-\text{O}$) i antisimetričnog ($\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}$) istezanja C–O skupine¹⁶⁷

U odabranim područjima, spektri su izglacani metodom Savitzky–Golay uz polinom trećeg stupnja kroz 30 točaka, provedena je korekcija bazne linije pomoću dvije odabrane točke te normalizacija.¹⁸¹ Spektri peptida u PB izmjereni su i pri 30 °C, odnosno 50 °C (nominalne

koncentracije $c=0,01$ M). Međutim, njihovi signali su značajno slabiji od signala lipida. Dio spektara peptida koji pokazuje karakteristične peptidne vrpce (Amid I i Amid II) obrađeni su analogno spektrima lipidnih suspenzija i prikazani u Dodatku 8.3.

4.3.1. Molekulska obilježja modelnih eukariotskih i prokariotskih membrana

1) Područje $2980\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$

Analiza modelnih sustava pomoću FTIR-ATR u području $2980\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$ (slika 32 a i b) pokazuje pomak $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ vrpce s 2919 cm^{-1} ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) prema višim valnim brojevima 2924 cm^{-1} ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Slično, $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ vrpca se pomiče s 2851 cm^{-1} ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) na 2854 cm^{-1} ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ovi pomaci ukazuju na povećanje udjela *gauche*-konformera i smanjenje uređenosti lanaca pri prijelazu iz faze $L_{\beta'}$ u L_{α} kao posljedica slabljenja van der Waalsovih interakcija između alkilnih lanaca, a što je u skladu s literaturnim podacima objavljenima za fosfolipidne dvosloje sličnog sastava.^{138,167}

2) Područje $1800\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$

Najvažnija vrpca u ovom spektralnom području je $\nu\text{C=O}$ vrpca nastala kao rezultat superponiranja signala dviju populacija karbonilnih skupina glicerolne okosnice; preciznije, onih koje jesu (HB) i koje nisu (non-HB) uključene u stvaranje vodikovih veza s okolnim molekulama vode te drugim akceptorima ili donorima vodikovih veza.^{191,192} U PRO sustavu ne dolazi do pomaka maksimuma vrpce uslijed faznog prijelaza te položaj maksimuma vrpce ostaje na 1741 cm^{-1} (na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) (slika 32 d). Primjetna je promjena oblika vrpce uz asimetričnost na niskofrekvencijskoj strani koja ukazuje na porast C=O_{HB} populacije.^{192,193} U EU sustavu opaža se blagi pomak maksimuma pri prijelazu iz faze L_{β} u L_{α} , s 1739 cm^{-1} na 1735 cm^{-1} (slika 32 c).

3) Područje $1515\text{--}1395\text{ cm}^{-1}$

Ovo spektralno područje obilježavaju signali koji potječu od γCH_2 vrpce i koji su osjetljivi na lateralne interakcije između lipidnih molekula. U PRO sustavu maksimum je na 1470 cm^{-1} na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ što sugerira zadržavanje sličnog tipa pakiranja lipida kroz fazni prijelaz, vjerojatno ortorompskog uređenja (slika 32 f).^{167,193} Nasuprot tome, u EU sustavu opaža se izraženiji pomak s 1470 cm^{-1} ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) na 1463 cm^{-1} ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) (slika 32 e), što ukazuje na prijelaz iz uređenijeg (heksagonalnog) pakiranja u fazu L_{α} praćenu gubitkom periodične uređenosti.¹⁶⁷

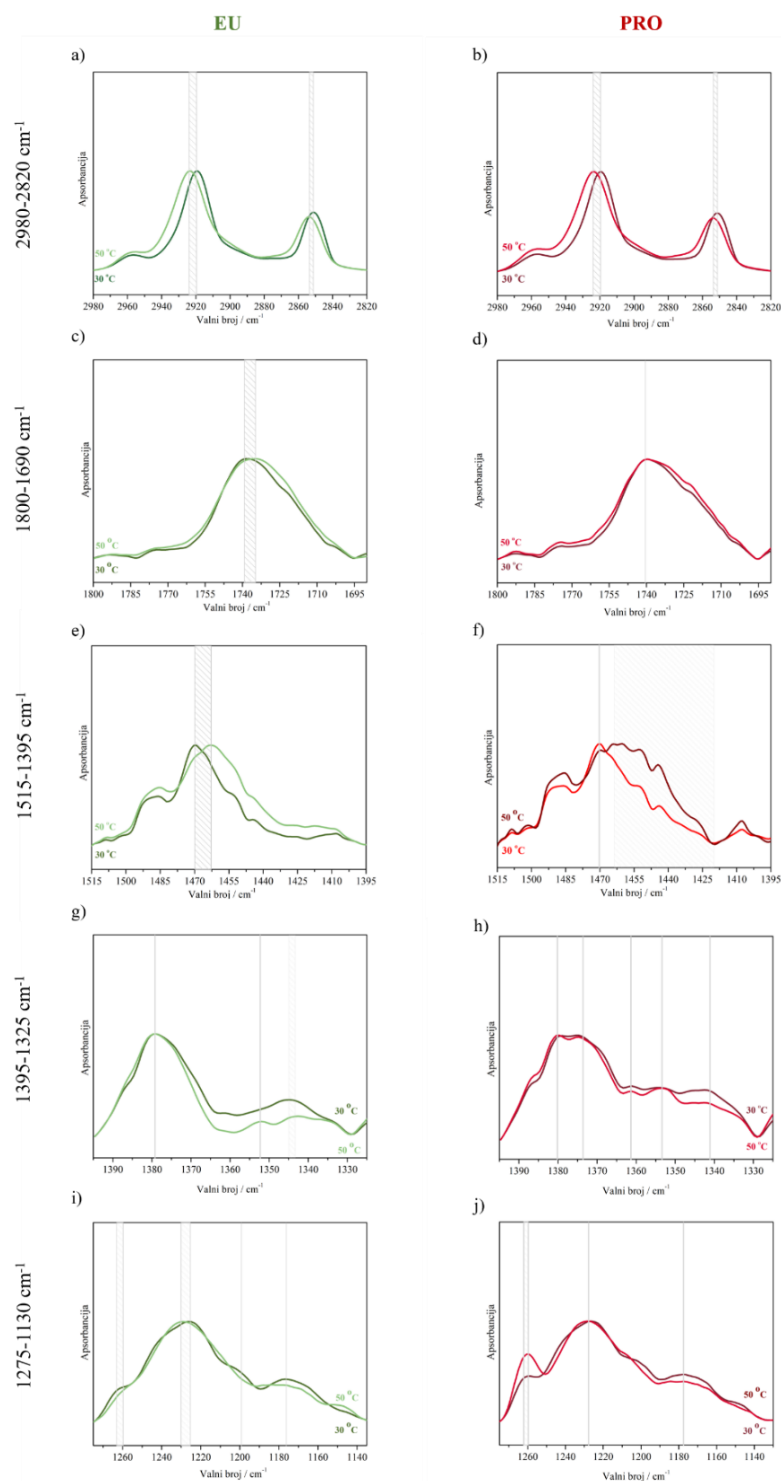
4) Područje 1395–1325 cm^{-1}

Najintenzivnija vrpca u četvrtom spektralnom području je γCH_3 . U oba sustava, položaj maksimuma vrpce ostaje isti prije i poslije faznog prijelaza: u PRO sustavu na 1380 cm^{-1} a u EU sustavu na 1379 cm^{-1} . Osim tog signala, u ovom području javljaju se ωCH_2 vrpce, čiji intenzitet i položaj može biti povezan s određenim tipom *gauche*-konformacije.^{166,194} Kod PRO sustava maksimumi vrpce koji se pripisuju njihovoj *kink*-konformera (engl. *kink conformers*) opaženi su na 1373 cm^{-1} (pri 30 °C i 50 °C) te na 1361 cm^{-1} (pri 30 °C i 50 °C), dok se oni koji odgovaraju njihovoj dvostrukih *gauche*-konformera (engl. *double gauche conformers*) pojavljuju na 1354 cm^{-1} (pri 30 °C i 50 °C). Maksimum vrpce koja se pripisuje end *gauche*-konformerima nalazi se na 1342 cm^{-1} (pri 30 °C i 50 °C) (slika 32 h).

U EU sustavu maksimumi vrpca koji se pripisuju *double gauche*-konformerima nalaze se na 1352 cm^{-1} (pri 30 °C i 50 °C), dok se oni koji odgovaraju end *gauche*-konformerima pomiču s 1345 cm^{-1} (pri 30 °C) na 1343 cm^{-1} (pri 50 °C) (slika 32 g).

5) Područje 1275–1130 cm^{-1}

U navedenom spektralnom području dominira $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpca koja, analogno $\nu\text{C}=\text{O}$ vrpce, nastaje kao posljedica superponiranja signala fosfatnih skupina koje mogu biti non-HB ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{\text{nonHB}}$) i HB ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{\text{HB}}$).¹⁹⁵ U PRO sustavu $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{\text{nonHB/HB}}$ ima maksimum na 1227 cm^{-1} neovisno o temperaturi (slika 32 j). Nasuprot tome, kod EU sustava dolazi do pomaka maksimuma vrpce s 1255 cm^{-1} (30 °C) na 1231 cm^{-1} (50 °C), što sugerira porast non-HB skupina u EU sustavu uslijed faznog prijelaza (slika 32 i). Osim $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$, u ovom području pojavljuju se vrpce od simetričnog ($\nu_s\text{C}-\text{O}$) i antisimetričnog ($\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}$) istezanja C–O skupine. Za EU sustav $\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}$ vrpca pokazuje maksimum na 1263 cm^{-1} (30 °C) i 1260 (50 °C) te za $\nu_s\text{C}-\text{O}$ vrpce na 1176 cm^{-1} (30 °C i 50 °C) (slika 32 i). Kod PRO $\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}$ vrpca smještena je na 1261 cm^{-1} (30 °C) i 1260 cm^{-1} (50 °C), a $\nu_s\text{C}-\text{O}$ vrpca ima maksimum na položaju 1178 cm^{-1} pri obje temperature (slika 32 j).



Slika 32. FTIR spektri sustava EU (DPPC+DPPS) i PRO (DPPC+DPPG) koji prikazuju sljedeće vrpce: a) i b) $\nu_{(a)s}CH_2$; c) i d) $\nu C=O_{(non-HB)}$; e) i f) γCH_2 ; g) i h) γCH_3 i ωCH_2 ; i) i j) $\nu_{(a)s}C-O$ i $\nu_{(a)s}PO_2^-$. EU spektri pri 30/50 °C su tamnozeleni/svijetlozeleni boje, dok je kod PRO tamnocrveni/crveni za 30/50 °C. Pomaci između $L_{\beta'}$ u L_{α} označeni su svijetlosivim osjenčanim pravokutnicima, a vrpce koje zadržavaju svoj položaj uslijed promjene faze označene su punim crtama svijetlosive boje

4.3.2. Adsorpcija R5F2 i K5F2 peptida na modelne eukariotske i prokariotske membrane

1) Područje 2980–2820 cm⁻¹

U sustavima EU+R5F2/K5F2 i PRO+R5F2/K5F2, prisutnost peptida ne mijenja osnovni trend u ovom području. Kod zagrijavanja dolazi do pomaka $\nu_{as}CH_2$ s 2919 cm⁻¹ (30 °C) na 2924 cm⁻¹ (50 °C), dok se vrpca koja potječe od ν_sCH_2 pomiče s 2851 cm⁻¹ (30 °C) na 2854 cm⁻¹ (50 °C). Ovi pomaci upućuju na smanjenje uređenosti alkilnih lanaca i povećanje udjela *gauche*-konformacija pri prijelazu u L_α fazu¹⁶⁷, bez značajnih razlika između R5F2 i K5F2 peptida (slika 33 a i b).

2) Područje 1800–1690 cm⁻¹

U EU sustavu u prisutnosti R5F2 dolazi do pomaka maksimuma s 1740 cm⁻¹ (30 °C) na 1735 cm⁻¹ (50 °C), dok se s K5F2 pomiče s 1737 cm⁻¹ (30 °C) na 1735 cm⁻¹ (50 °C). Razlika među peptidima u L_β fazi (1740 cm⁻¹ za R5F2 i 1737 cm⁻¹ za K5F2) sugerira da R5F2 može smanjiti hidrataciju C=O skupina u odnosu na K5F2 (slika 33 c).

U PRO sustavu pomaci su veći: povišenjem temperature u PRO sustavu u prisutnosti R5F2 peptida dolazi do pomaka maksimuma široke vrpce s 1738 cm⁻¹ (30 °C) na 1731 cm⁻¹ (50 °C), što upućuje na porast C=O_{HB} na račun C=O_{non-HB}.^{191,196} Kod PRO sustava u prisutnosti K5F2 peptida povećanje populacije C=O_{HB} još je izraženije s obzirom da široka vrpca ima maksimum na 1739 cm⁻¹ (30 °C) koji je popraćen s dodatnom vrpcom od $\nu C=O_{HB}$ s maksimumom na 1722 cm⁻¹ (50 °C). Drukčiji izgled spektara PRO sustava u navedenom području, ovisno o prisutnosti R5F2 ili K5F2 peptida, sugerira različiti način interakcije tih dvaju peptida s glicerolnom okosnicom (slika 33 d).

3) Područje 1515–1395 cm⁻¹

U EU sustavu primjetan je pomak γCH_2 vrpce s 1468 cm⁻¹ (30 °C) na 1465 cm⁻¹ (50 °C) s R52F peptidom u sustavu, a u prisutnosti K5F2 opaža se pomak s 1469 cm⁻¹ (30 °C) na 1465 cm⁻¹ (50 °C) (slika 33 e). Veličina pomaka ukazuje da, uslijed promjene faze, nestaje heksagonalno uređenje lipida u EU sustavu.¹⁶⁷ Kod PRO sustava u prisutnosti R5F2 dolazi do pomaka maksimuma vrpce s 1468 (30 °C) na 1470 cm⁻¹ (50 °C), što sugerira prijelaz iz heksagonalnog uređenja u neuređeno. Nasuprot tome, u prisutnosti K5F2 maksimum vrpce se neznatno miče s 1470 (30 °C) na 1471 cm⁻¹ (50 °C) (slika 33 f), što upućuje ili na zadržavanje ortorompske slagaline ili eventualno prijelaz u triklinsku slagalinu¹⁹⁷ (zbog iznimno malog pomaka teško je sa sigurnošću interpretirati opaženu pojavu).

4) Područje $1395\text{--}1325\text{ cm}^{-1}$

U četvrtom spektralnom području, koje obuhvaća γCH_3 te ωCH_2 vrpce, promjene položaja i intenziteta signala odražavaju promjene u konformacijama lanaca masnih kiselina.

U EU sustavu u prisutnosti peptida R5F2 zabilježen je mali pomak γCH_3 vrpce s 1378 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) na 1379 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$). S druge strane u prisutnosti peptida K5F2 nema pomaka pa se maksimum pri obje temperature nalazi na 1380 cm^{-1} . Kod PRO sustava u prisutnosti R5F2 peptida pomak maksimuma γCH_3 vrpce događa se s 1378 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) na 1379 cm^{-1} , a u prisutstvu K5F2 položaj maksimuma γCH_3 vrpce ostaje isti, na 1380 cm^{-1} (slika 33 g i h).

U EU sustavu s R5F2, maksimum vrpce koji potječe od njihanja double *gauche*-konformera pojavljuje se na 1355 cm^{-1} (pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ i $50\text{ }^\circ\text{C}$), dok se maksimum *end gauche*-konformera pomiče s 1345 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) na 1342 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$). Prijelaz iz L_β u L_α praćen je očekivanom preraspodjelom intenziteta ovih dviju vrpki; konkretno, povećanjem intenziteta vrpce *end gauche*-konformera na račun double *gauche*-konformera (slika 33 g).¹⁶⁵

U EU sustavu s K5F2 spektralna obilježja dviju glavnih vrpki (*double gauche* i *end gauche*) u velikoj su mjeri slična onima zabilježenima za R5F2. Vrpca double *gauche*-konformera nalazi se na 1352 cm^{-1} (pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ i $50\text{ }^\circ\text{C}$), dok *end gauche*-konformeri pokazuju pomak maksimuma s 1345 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) na 1342 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$). Osim toga, uočljive su i dodatne slabe vrpce pri 1373 cm^{-1} i 1366 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$), koje potječu od *kink*-konformera. Prijelaz u L_α fazu također popraćen je porastom udjela double *gauche* konformera (slika 33 g).¹⁶⁶

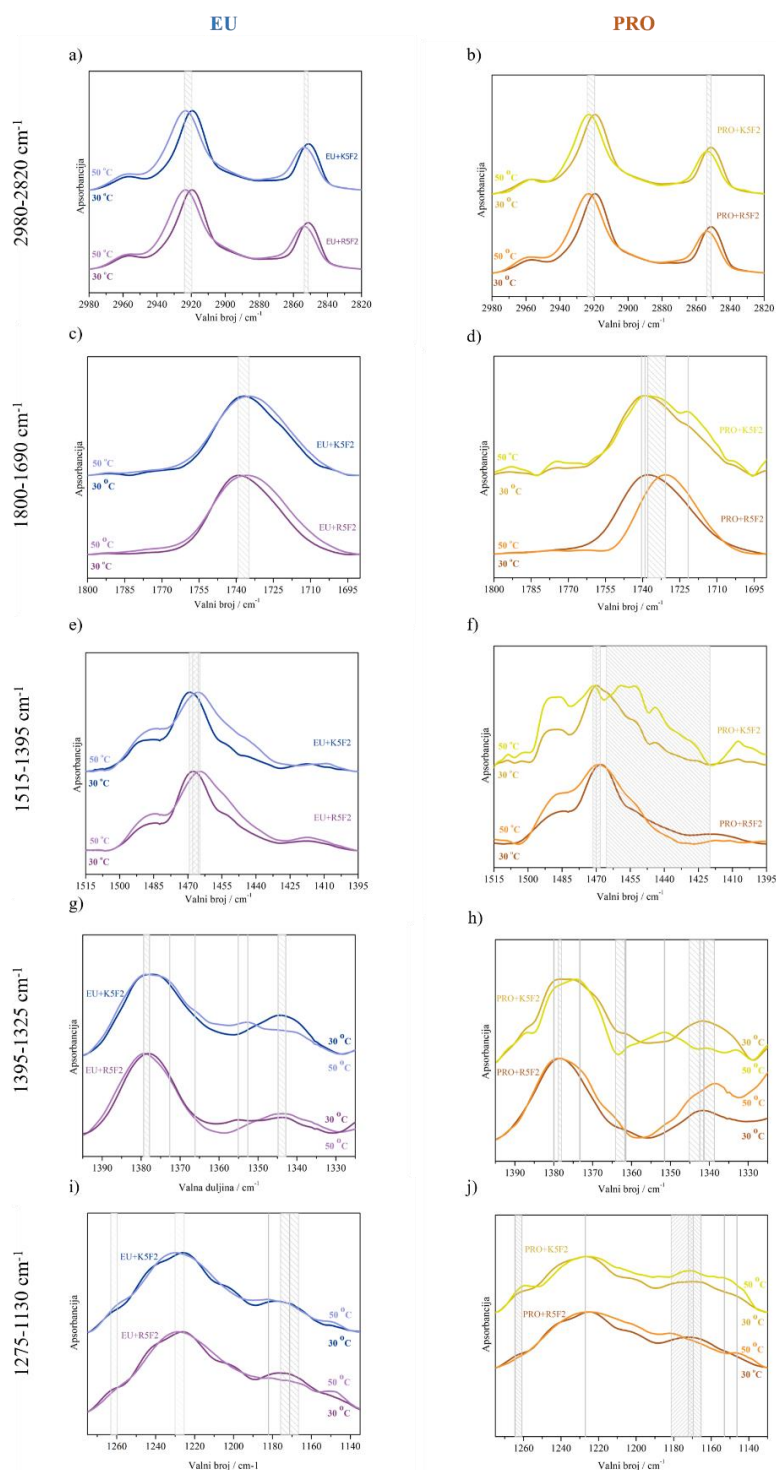
U PRO sustavu s R5F2, vrpce *kink*-konformera javljaju se na 1373 cm^{-1} (pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ i $50\text{ }^\circ\text{C}$) te na 1364 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) s pomakom na 1361 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$). Vrpca double *gauche*-konformera očituje se na 1352 cm^{-1} (pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ i $50\text{ }^\circ\text{C}$), dok se vrpca od *end gauche*-konformera na položaju 1342 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) pri prijelazu u L_α fazu širi približno od 1345 do 1338 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$). U PRO sustavu s K5F2, vrpce *kink*-konformera bilježe se na 1374 cm^{-1} i 1361 cm^{-1} (pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ i $50\text{ }^\circ\text{C}$). Double *gauche*-konformeri javljaju se samo u L_α fazi (1352 cm^{-1} pri $50\text{ }^\circ\text{C}$), dok *end gauche*-konformeri pokazuju vrpce maksimuma na 1341 cm^{-1} (pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ i $50\text{ }^\circ\text{C}$). Za razliku od R5F2, K5F2 u gel-fazi potiskuje signal double *gauche*-konformera, no u L_α fazi njihov se intenzitet povećava na račun smanjenja intenziteta vrpce *end gauche*-konformera (slika 33 h).¹⁹⁸

5) Područje $1275\text{--}1130\text{ cm}^{-1}$

U EU sustavu položaj maksimuma $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpce ostaje gotovo jednak u prisutnosti peptida, premda se uočava isti pomak kao i u sustavu bez peptida, s 1225 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) na 1231 cm^{-1}

(50 °C). Navedeno ukazuje na porast non-HB fosfatnih skupina što sugerira smanjenu hidrataciju fosfatnih skupina pri faznom prijelazu.¹⁶⁴ Kod vrpce koje potječu od istezanja C–O skupina, u prisutnosti R5F2 maksimum vrpce $\nu_{\text{s}}\text{C–O}$ pomiče s 1176 cm^{-1} (30 °C) na 1166 cm^{-1} (50 °C), dok se kod K5F2 pomiče s 1173 cm^{-1} (30 °C) na 1182 cm^{-1} (50 °C) (slika 33 i). Vrpca koja potječe od $\nu_{\text{as}}\text{C–O}$ je preslaba za jednoznačnu detekciju maksimuma.

U PRO sustavu (DPPC+DPPG) maksimum $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpce ostaje nepromijenjen u prisutnosti R5F2 ili K5F2 (1227 cm^{-1} pri 30 °C i 50 °C). Kod vrpce koje potječu od istezanja C–O skupina, u prisutnosti R5F2 maksimum $\nu_{\text{s}}\text{C–O}$ pomiče s 1170 cm^{-1} (30 °C) na 1182 cm^{-1} (50 °C), dok se kod K5F2 događa pomak s 1166 cm^{-1} (30 °C) na 1172 cm^{-1} (50 °C) (slika 33 j).¹⁹⁹



Slika 33. FTIR spektri sustava EU (DPPC+DPPS) i PRO (DPPC+DPPG) + R5F2/K5F2 koji prikazuju sljedeće vrpce: a) i b) $\nu_{(a)s}CH_2$; c) i d) $\nu C=O_{(non-HB)}$; e) i f) γCH_2 ; g) i h) γCH_3 i ωCH_2 ; i) i j) $\nu_{(a)s}C-O$ i $\nu_{(a)s}PO_2^-$. EU+R5F2 spektri pri 30/50 °C su tamnoljubičaste/svijetloljubičaste boje, EU+K5F2 spektri pri 30/50 °C su tamnoplave/svijetloplave boje dok je kod PRO+R5F2 tamnonarančasta/svijetlonarančasta za spektre pri 30/50 °C a kod PRO+K5FW tamnožuta/svijetložuta pri 30/50 °C. Pomaci između faza $L_{\beta'}$ i L_{α} označeni su svijetlosivim

osjenčanim pravokutnicima, a vrpce koje zadržavaju svoj položaj uslijed promjene faze označene su punim crtama svijetlosive boje.

4.3.3. Adsorpcija R5W2 i K5W2 peptida na modelne eukariotske i prokariotske membrane

1) Područje 2980–2820 cm^{-1}

Analiza spektralnog područja od 2980 do 2820 cm^{-1} za EU i PRO sustave s R5W2 i K5W2 peptidima pokazuje analogan odziv kao i prethodno ispitivani sustavi; EU sustav neovisno o prisutnosti R5W2 ili K5W2 peptida pokazuje pomak $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ vrpce s 2920 cm^{-1} (30 °C) na 2923 cm^{-1} (50 °C), a za $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ pomak je zabilježen s 2851 na 2853 cm^{-1} (slika 34 a).

Kod PRO sustava, kao i kod EU, jednaki pomaci se događaju u prisutnosti R5W2 i K5W2 peptida (slika 34 b). U slučaju $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ pomak maksimuma je s 2919 cm^{-1} (30 °C) na 2923 cm^{-1} (50 °C), a kod $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ s 2851 cm^{-1} na 2853 cm^{-1} (slika 33 a i b). Ovakvi pomaci slažu se sa dosadašnjim literaturnim saznanjima i potvrđuju prijelaz iz faze $L_{\beta'}$ u L_{α} , popraćenu povećanim udjelom *gauche*-konformacije i narušavanjem uređenosti lanaca.¹⁶⁷

2) Područje 1800–1690 cm^{-1}

U EU sustavima obrazac promjene položaja vrpce koja potječe od $\nu\text{C=O}$ gotovo je jednak u prisutnosti R5W2 i K5W2 peptida. U prisutnosti R5W2 maksimum vrpce se pomiče s 1740 cm^{-1} (30 °C) na 1733 cm^{-1} (50 °C), dok je u kod K5W2 peptida zabilježen pomak s 1739 cm^{-1} (30 °C) na 1733 cm^{-1} (50 °C) (slika 34 c). Ovakvi su rezultati u skladu s literaturnim podacima, pri čemu pomaci prema nižim valnim brojevima ukazuju na povećanu hidrataciju karbonilnih skupina, odnosno porast C=O_{HB} .^{191,196} U PRO sustavima, pomaci su znatno manji u odnosu na EU sustave. PRO sustav s R5W2 bilježi pomak maksimuma s 1736 cm^{-1} (30 °C) na 1738 cm^{-1} (50 °C), dok u prisutnosti K5W2 nema pomaka maksimuma vrpce pri prelasku iz faze $L_{\beta'}$ u L_{α} (1736 cm^{-1}) (slika 34 d).

3) Područje 1515–1395 cm^{-1}

U ovom spektralnom području, vrpca koja potječe od γCH_2 ostaje nepromijenjena pri prijelazu iz $L_{\beta'}$ u L_{α} , neovisno koji je peptid prisutan u sustavu: maksimum vrpce u prisutnosti R5W2 kod EU sustava na 1467 cm^{-1} a u prisutnosti K5W2 na 1468 cm^{-1} (slika 34e). Navedeno ukazuje na činjenicu da pri prijelazu lipida iz faze $L_{\beta'}$ u L_{α} nije došlo do promjene u slaganju lipida, odnosno zadržava se ortorompsko uređenje. Kod PRO sustava uočava se drugačiji odziv; u prisutnosti R5W2 peptida događa se pomak s 1468 cm^{-1} (30 °C) na 1464 cm^{-1} (50 °C), a u prisutnosti K5W2 s 1469 cm^{-1} (30 °C) na 1465 cm^{-1} (50 °C) (slika 34 f). Takvi pomaci kod

PRO sustava upućuju na narušavanje heksagonskog pakiranja lipida tijekom prijelaza iz gel faze u fluidnu fazu.¹⁹³

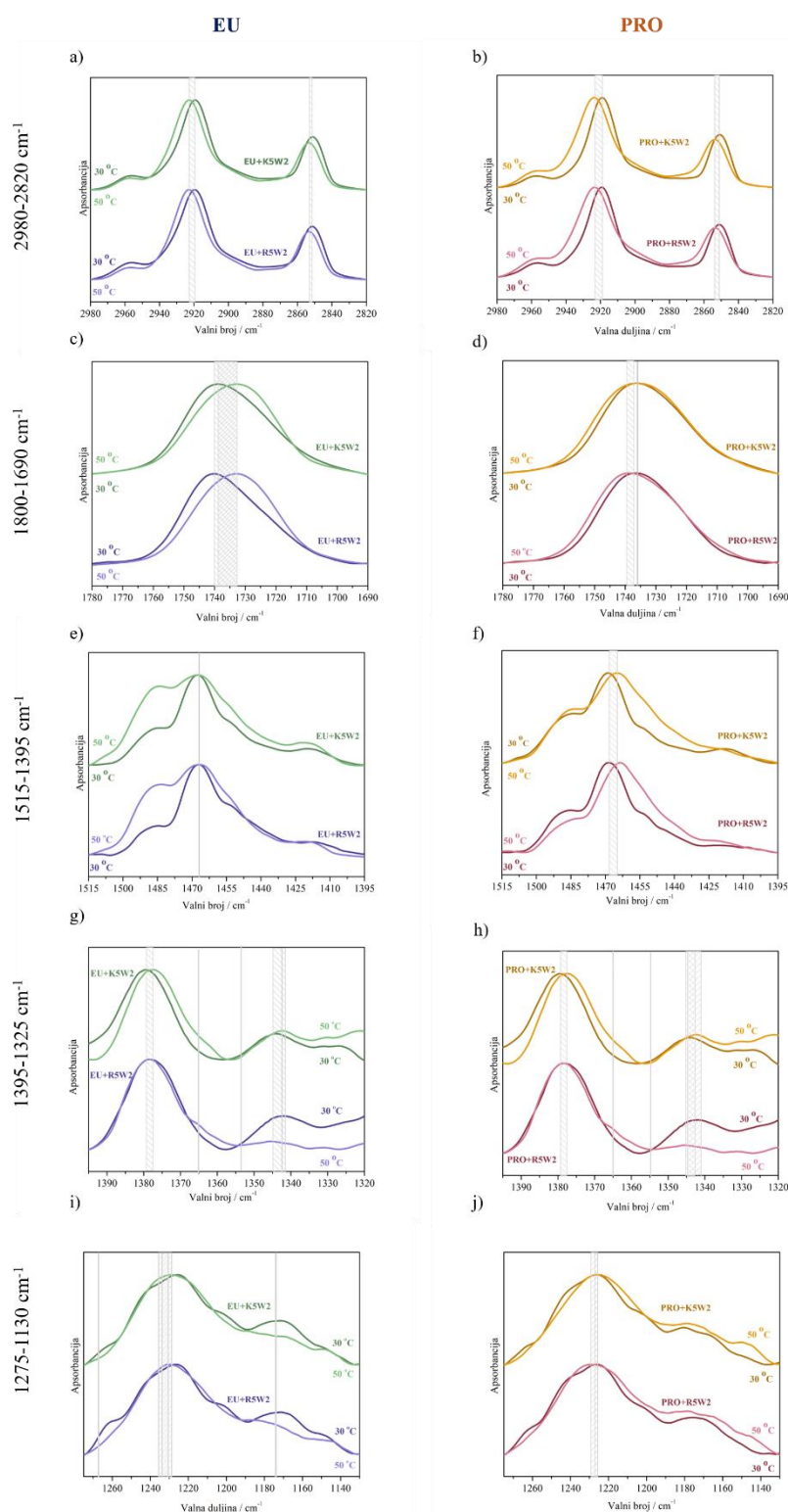
4) Područje 1395–1320 cm⁻¹

U navedenom spektralnom području vrpce koje potječu od γCH_3 vibracija opažaju se kod EU sustava neovisno o prisutnosti R5W2 ili K5W2 peptida: u fazi $L_{\beta'}$ su na 1379 cm⁻¹, a u fazi L_{α} na 1378 cm⁻¹ (slika 34 g). Kod PRO sustava u prisutnosti R5W2 peptida položaj vrpce ostaje isti prije i nakon faznog prijelaza (1378 cm⁻¹), dok u prisutnosti K5W2 postoji mali pomak s 1379 cm⁻¹ (30 °C) na 1378 cm⁻¹ (50 °C) (slika 34 h).

U ovom području opaženi su i signali koji potječu od ωCH_2 vrpce. U EU sustavu za oba peptida maksimum vrpce koji potječe od double *gauche*-konformera pojavljuje se na 1354 cm⁻¹ (pri 30 °C i 50 °C). Maksimum vrpce koja potječe od end *gauche*-konformera u EU sustavu s R5W2 peptidom ostaje na 1343 cm⁻¹ (pri 30 °C i 50 °C), dok se u prisutnosti K5W2 pomiče s 1345 cm⁻¹ (30 °C) na 1343 cm⁻¹ (50 °C). Prijelaz iz faze $L_{\beta'}$ u L_{α} popraćen je povećanjem vrpce end *gauche*- na račun double *gauche*-konformera. Uočene su i vrpce na 1366 cm⁻¹ kod EU+R5W2/K5W2 sustava (pri 30 °C i 50 °C) koje potječu od *kink*-konformera (slika 34 g). U PRO sustavu vrpca koja potječe od double *gauche*-konformera javlja se na 1356 cm⁻¹ (pri 30 °C i 50 °C), a vrpca end *gauche*-konformera pomiče se s 1343 cm⁻¹ (30 °C) na 1346 cm⁻¹ (50 °C). U prisutnosti K5W2 peptida vrpca koja potječe od double *gauche*-konformera je na 1357 cm⁻¹, a ona od end *gauche*- pokazuje pomak s 1343 cm⁻¹ na 1345 cm⁻¹ (slika 34 h).

5) Područje 1275–1130 cm⁻¹

U EU sustavu u prisutnosti R5W2 maksimum $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpce se pomiče s 1227 cm⁻¹ (30 °C) na 1230 cm⁻¹ (50 °C), a u prisutnosti K5W2 peptida pomak se bilježi s 1226 cm⁻¹ (30 °C) na 1229 cm⁻¹ (50 °C) (slika 34 i). Takav porast prema literaturnim spoznajama ukazuje na smanjenu hidrataciju fosfatnih skupina pri faznom prijelazu.¹⁶⁶ Kod vrpce koje potječu od istezanja C–O skupina, u prisutnosti R5W2 i K5W2 $\nu_{\text{s}}\text{C–O}$ maksimum se nalazi na 1175 cm⁻¹ (30 °C i 50 °C), a onaj od $\nu_{\text{as}}\text{C–O}$ na 1264 cm⁻¹ (30 °C i 50 °C). Položaj maksimuma $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpce kod PRO sustava u prisutnosti R5W2 se pomiče s 1226 cm⁻¹ na 1229 cm⁻¹ (prijelaz s 30 na 50 °C), a u prisutnosti K5W2 peptida s 1226 cm⁻¹ na 1225 cm⁻¹ (slika 34 j).



Slika 34. FTIR spektri sustava EU (DPPC+DPPS) i PRO (DPPC+DPPG) + R5W2/K5W2 koji prikazuju sljedeće vrpce: a) i b) $\nu_{(a)}\text{CH}_2$; c) i d) $\nu\text{C}=\text{O}_{(\text{non-HB})}$; e) i f) γCH_2 ; g) i h) γCH_3 i ωCH_2 ; i) i j) $\nu_{(a)}\text{sC}-\text{O}$ i $\nu_{(a)}\text{sPO}_2^-$. EU+R5W2 spektri pri 30/50 °C su tamnoplave/svijetloplave boje, EU+K5W2 spektri pri 30/50 °C su tamnozeleni/svijetlozeleni boje dok je kod PRO+R5W2

tamno/ružičasto-crvena za spektre pri 30/50 °C a kod PRO+K5W2 zlatna/svijetložuta pri 30/50 °C. Pomaci između faza $L_{\beta'}$ i L_{α} su označeni svijetlosivim osjenčanim pravokutnicima, a vrpce koje zadržavaju svoj položaj uslijed promjene faze označene su punim crtama svijetlosive boje.

4.3.4. Adsorpcija R5I2 i K5I2 peptida na modelne eukariotske i prokariotske membrane

1) Područje 2980–2820 cm^{-1}

EU i PRO sustavi u prisutnosti R5I2 i K5I2 peptida u ovom spektralnom području ponašaju se u skladu s očekivanim uslijed faznog prijelaza iz $L_{\beta'}$ u L_{α} . U EU sustavu kod zagrijavanja dolazi do pomaka maksimuma $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ vrpce u prisutnosti R5I2 odnosno K5I2 s 2919 cm^{-1} (30 °C) na 2922 cm^{-1} , odnosno 2919 cm^{-1} (30 °C) na 2924 cm^{-1} (50 °C). Kod $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ vrpce pomak je jednak, neovisno o kojem se peptidu radi, s 2851 cm^{-1} (30 °C) na 2853 cm^{-1} (50 °C) (slika 35 a). U PRO sustavu, neovisno o R5I2/K5I2 peptidu, maksimum $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ vrpce se pomiče s 2919 cm^{-1} na 2923 cm^{-1} , a $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ s 2851 cm^{-1} na 2854 cm^{-1} (slika 35 b).

2) Područje 1800–1690 cm^{-1}

U EU sustavima vrpce koje potječu od $\nu\text{C}=\text{O}$ pokazuju male pomake prema višim valnim brojevima pri prijelazu iz faze $L_{\beta'}$ u L_{α} u prisutnosti oba peptida. U prisutnosti R5I2 peptida maksimum $\nu\text{C}=\text{O}$ vrpce pomiče se s 1734 cm^{-1} (30 °C) na 1736 cm^{-1} (50 °C), dok je u prisutnosti K5I2 peptida zabilježen pomak s 1737 cm^{-1} (30 °C) na 1739 cm^{-1} (50 °C) (slika 35 c). Pomaci prema višim valnim brojevima, uslijed promjene faze, ukazuju na smanjenje $\text{C}=\text{O}_{\text{HB}}$ populacije što ukazuje na smanjenu hidrataciju međupovršinskog područja lipidnog dvosloja^{168,191}. Slično ponašanje uočeno je i kod R5F2 i K5F2 peptida u EU sustavima. U PRO sustavima odziv je drukčiji ovisno o peptidu (R5I2 ili K5I2). U prisutnosti R5I2 maksimum $\nu\text{C}=\text{O}$ vrpce uočen je na 1740 cm^{-1} (pri 30 °C), dok maksimum ove vrpce na 50 °C nije vidljiv. Uz dodatak K5I2 peptida zabilježen je pomak s 1738 cm^{-1} (30 °C) na 1743 cm^{-1} (50 °C) što upućuje na smanjenje hidratacije (slika 35 d).

3) Područje 1515–1395 cm^{-1}

U EU sustavima vrpce koje potječu od γCH_2 u ovom području odražavaju promjene u lateralnim interakcijama i pakiranju lipidnih lanaca.¹⁶⁴ U prisutnosti R5I2 peptida maksimum vrpce se neznatno pomiče s 1468 cm^{-1} (30 °C) na 1467 cm^{-1} (50 °C), što upućuje na minimalnu reorganizaciju slaganja lanaca pri prijelazu iz faze $L_{\beta'}$ u L_{α} . Nasuprot tome, adsorpcija K5I2 u EU sustavima uzrokuje izraženiji pomak vrpce prema nižim valnim brojevima, s 1468 cm^{-1} (30

°C) na 1460 cm^{-1} (50 °C), što sugerira značajnije narušavanje ortorompskog uređenja i prijelaz prema manje uređenom fluidnom stanju (slika 35 e).

U PRO sustavima oba peptida uzrokuju pomake prema nižim valnim brojevima, što ukazuje na smanjenje uređenosti lipidnih lanaca uslijed faznog prijelaza. Prisutnost R5I2 uzrokuje pomak maksimuma vrpce s 1467 cm^{-1} (30 °C) na 1465 cm^{-1} , a K5I2 s 1468 cm^{-1} (30 °C) na 1462 cm^{-1} (50 °C) (slika 35 f).

4) Područje $1395\text{--}1325\text{ cm}^{-1}$

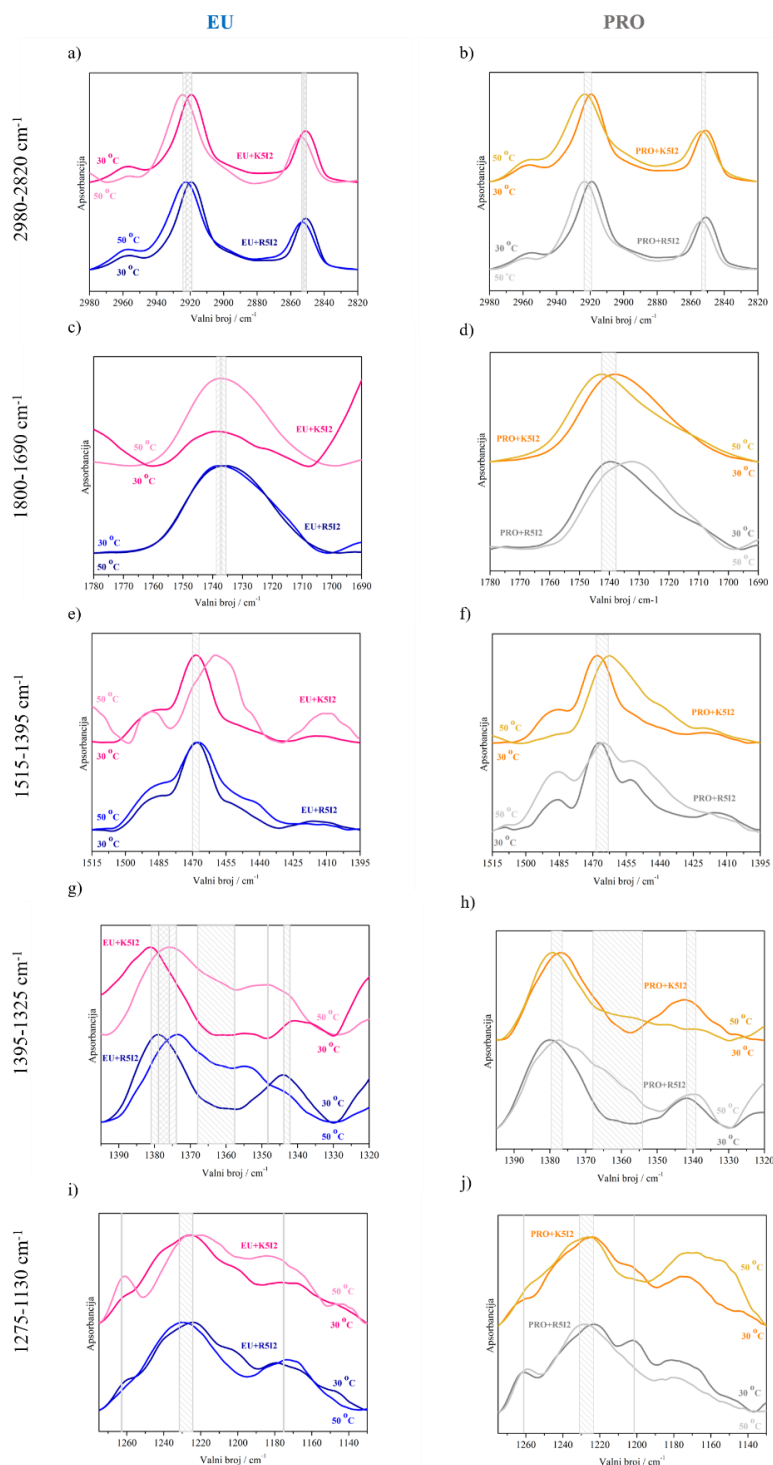
Maksimum γCH_3 vrpce dominantne u ovom spektralnom području u EU s sustavu s R5I2 javlja se na 1379 cm^{-1} pri 30 °C , a na 1374 cm^{-1} pri 50 °C . U prisutnosti K5I2 peptida pomak maksimuma vrpce je s 1376 cm^{-1} (30 °C) na 1381 cm^{-1} (50 °C) (slika 35 g). Kod PRO sustava u prisutnosti R5I2 peptida maksimum vrpce se pomiče s 1380 cm^{-1} na 1378 cm^{-1} , a u prisutnosti K5I2 s 1377 cm^{-1} na 1379 cm^{-1} (slika 35 h).

Vibracije koje potječu od ωCH_2 vrpce ukazuju na povećanu količinu *kink*-konformera u odnosu na do sada ispitivane sustave. U EU sustavu intenzitet *kink*-konformera izrazito je jak, te se ne može sa sigurnošću reći prekriva li vrpcu double *gauche*-konformera. U području između 1358 cm^{-1} i 1368 cm^{-1} , u prisutnosti oba peptida, opaža se vrpca koja potječe od *kink*-konformera. Maksimum vrpce koja potječe od double *gauche*-konformera u EU sustavu s R5I2 i K5I2 peptidima nalazi se na 1348 cm^{-1} . End *gauche*-konformeri pokazuju vrpcu maksimuma na 1344 cm^{-1} (slika 35g). U PRO sustavima je također povećan udio *kink*-konformera, no ipak manje nego kod EU sustava. Udio *kink*-konformera je u PRO sustavu s R5I2 peptidom veći nego kod PRO sustava s K5I2 peptidom. U PRO sustavu s R5I2 vrpca end *gauche*-konformera pokazuje pomak s 1339 cm^{-1} (30 °C) na 1341 cm^{-1} (50 °C), dok je kod K5I2 peptida na 1340 cm^{-1} bez pomaka uslijed promjene faze (slika 35h).

5) Područje $1275\text{--}1130\text{ cm}^{-1}$

U EU sustavu maksimum $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpce u prisutnosti R5I2 peptida pomiče se s 1224 cm^{-1} (30 °C) na 1230 cm^{-1} (50 °C), sugerirajući porast non-HB fosfatnih skupina. U prisutnosti K5I2 peptida nema promjene u položaju vrpce prilikom prijelaza iz L_α u L_β , maksimum je na 1226 cm^{-1} . Kod vrpce koja potječe od istezanja C–O skupina, u prisutnosti R5I2 i K5I2 peptida u EU sustavu, vrpca koja potječe od $\nu_{\text{S}}\text{C–O}$ zadržava položaj maksimuma na 1202 cm^{-1} pri 30 i 50 °C . Isto tako, $\nu_{\text{as}}\text{C–O}$ zadržava položaj maksimuma uslijed promjene faze na 1260 cm^{-1} (slika 35 i).

U PRO sustavu s R5I2 peptidom $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpca pokazuje pomak maksimuma s 1222 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) na 1228 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$), a u prisutnosti K5I2 peptida pomak maksimuma je s 1223 cm^{-1} ($30\text{ }^\circ\text{C}$) na 1226 cm^{-1} ($50\text{ }^\circ\text{C}$). Takvo ponašanje sugerira smanjenu hidrataciju fosfatnih skupina odnosno porast non-HB fosfatnih skupina uslijed faznog prijelaza. Vrpce koje potječu od $\nu_{\text{s}}\text{C}-\text{O}$ i $\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}$ normalnih modova, u prisutnosti oba peptida kod PRO sustava zadržavaju položaj maksimuma uslijed faznog prijelaza na 1202 cm^{-1} , odnosno 1260 cm^{-1} (slika 35 j).



Slika 35. FTIR spektri sustava EU (DPPC+DPPS) i PRO (DPPC+DPPG) + R5I2/K5I2 koji prikazuju sljedeće vrpce: a) i b) $\nu_{(a)s}CH_2$; c) i d) $\nu C=O_{(non-HB)}$; e) i f) γCH_2 ; g) i h) γCH_3 i ωCH_2 ; i) i j) $\nu_{(a)s}C-O$ i $\nu_{(a)s}PO_2^-$. EU+R5I2 spektri pri 30/50 °C su tamnoplave/svijetloplave boje, EU+K5W2 spektri pri 30/50 °C su tamnoružičaste/svijetloružičaste boje dok je kod PRO+R5W2 tamnosiva/svijetlosiva za spektre pri 30/50 °C a kod PRO+K5W2 tamnonarančasta/svijetlonarančasta pri 30/50 °C. Pomaci između faze $L_{\beta'}$ i L_{α} su označeni

svjetlosivim osjenčanim pravokutnicima, a vrpce koje zadržavaju svoj položaj uslijed promjene faze označene su punim crtama svjetlosive boje.

4.4. Utjecaj adsorpcije različitih kationsko-hidrofobnih peptida na modelne eukariotske i prokariotske sustave

Poznato je da određeni kationsko-hidrofobni peptidi pokazuju svojstva CPP, no mehanizam njihove adsorpcije i prolaska kroz membranu još uvijek nije razjašnjen.²¹ Prema našim najboljim saznanjima, o drugim malim peptidima koji pokazuju svojstva CPP zasad nema jasnih spoznaja. Od malih peptida dobro su istraženi R9 i K9 peptidi, posebice računalnim studijama. Robison i sur. su u istraživanju provedenom pomoću računalnih simulacija pokazali da je adsorpcija pozitivno nabijenih R9 peptida na *zwitterionski* lipid sastavljen od POPC-a znatno učinkovitija nego jednako nabijenih K9 peptida.¹³⁹ Ta se pojava može objasniti činjenicom da R sadrži Gdm⁺ skupinu koja može tvoriti višestruke vodikove veze s negativno nabijenim vrstama u membrani (fosfatne skupine). S druge strane, lizin sadrži skupinu –NH₃⁺ koja tvori isključivo jednostruke veze s negativno nabijenim funkcijskim skupinama membrane, što nije jednako učinkovito kao višestruko vezanje za fosfatne grupe.^{134,136,139}

Osim razlike u sposobnosti vezanja na površinu membrane, uočena je i sklonost oligoarginina agregaciji. Tesei i sur. pokazali su da R10 peptid u otopini tvori dimere i oligomere, dok se K10 zadržava u monomernom obliku.¹³⁷ Agregacija R10 peptida rezultat je specifičnih interakcija Gdm⁺ skupina, koje uključuju vodikove veze i ionske veze. Ove spoznaje dodatno potvrđuju veću sposobnost destabilizacije membrane i učinkovitiji prolaz u stanicu R-peptida u odnosu na K-peptide. Osim toga, u našem su istraživanju provedene i simulacije molekulske dinamike (MD) koje su pokazale određeni stupanj agregacije peptida koji sadrže W.*

Poznato je da anionski lipidi poput DPPG i DPPS različito doprinose pakiranju u dvosloju, što se odražava u njihovim termotropnim svojstvima. DPPG, zahvaljujući fosfoglicerolnoj glavi, ostvaruje dodatne vodikove veze s molekulama vode te povećava hidrataciju međupovršinskog područja, dok istodobno elektrostatsko odbijanje negativno nabijenih glavnih skupina rezultira labavijim pakiranjem i smanjenom kooperativnošću faznih prijelaza.²⁰¹ Upravo se zbog tog svojstva DPPG lipidi koriste u stabilizaciji LUV-ova načinjenih od DPPC lipida, gdje mali udio DPPG sprječava agregaciju i lamelarizaciju, čime se omogućuje njihova dugotrajnija stabilnost.⁹⁴ Nasuprot tome, u našem radu pokazano je da DPPS, zbog

intermolekulskih interakcija između karboksilnih i amino skupina, ima rigidniju strukturu u području polarnih glava u odnosu na neutralne lipide poput DPPC.²⁰ Takva organizacija rezultira kompaktnijim pakiranjem molekula i stabilizacijom faze $L_{\beta'}$ (dominantno zastupljenog DPPC lipida), što se očituje povišenom temperaturom prijelaza. Iako oba lipida u našim modelnim membranama čine samo 10 % udjela, razlike u njihovom načinu pakiranja i međudjelovanju s peptidom DPPC imaju značajan utjecaj na ukupna termotropna svojstva, što objašnjava različito ponašanje modelnih PRO i EU membrana već i u odsutnosti peptida (slika 28). Termotropna svojstva dobivena DSC mjerenjima pokazuju da adsorpcija peptida može dovesti do stabilizacije faze $L_{\beta'}$ ili L_{α} , ovisno o vrsti modelnog sustava i samom peptidu.²⁰¹ U EU sustavu peptidi R5F2 i R5I2 uzrokuju sniženje T_m vrijednosti, što upućuje na stabilizaciju faze L_{α} . Nasuprot tome, peptidi K5F2, R5W2, K5W2 i K5I2 povišuju T_m , čime doprinose stabilizaciji $L_{\beta'}$ faze. U PRO sustavu svi ispitani peptidi povišuju T_m vrijednosti, što ukazuje na njihovu stabilizaciju faze $L_{\beta'}$. Razlike u djelovanju istih peptida između EU i PRO sustava, poput onog R5F2 peptida, ukazuju na važnost tipa anionskog lipida. Promjene od približno 1 °C uočene u T_m vrijednostima mogu se objasniti razlikama u hidrataciji polarnih glava lipida na glicerolnoj okosnici u prisutnosti peptida, što posljedično vodi do (de)stabilizacije pojedine faze.

Međusobne interakcije kationskih i hidrofobnih aminokiselina na specifičan način reguliraju adsorpciju peptida na lipidne membrane. Kao što je pokazano u našem radu, Gdm^+ i NH_3^+ skupine ostvaruju kvalitativno različite interakcije s različito nabijenim glavama lipida.¹³⁶ Dok oba kationa interagiraju s karbonilnim skupinama glicerolne okosnice, njihove interakcije s fosfatnim skupinama pokazuju bitne razlike: u prisutnosti Gdm^+ fosfatno okruženje DPPC lipida postaje heterogenije tijekom prijelaza u fazu L_{α} , dok NH_4^+ pokazuje suprotan učinak. MD simulacije potvrdile su veću selektivnost DPPC-a za Gdm^+ , zbog njegovog planarnog oblika i višestrukih donora vodikovih veza, dok prisutnost karboksilne skupine u DPPS lipidima pogoduje vezanju NH_4^+ i omogućuje prijenos protona. Takve razlike objašnjavaju zašto R-peptidi češće pokazuju veću sposobnost adsorpcije i prolaska kroz membranu od njihovih K-analoga. Dodatno, kasnija istraživanja pokazala su da mogućnost prijenosa protona nije ograničena samo na pojedinačne aminokiseline, već se pojavljuje i na razini peptida, pri čemu se priroda i intenzitet protonskog prijenosa razlikuju ovisno o neposrednom okruženju peptida.¹³⁸ Konkretno, FTIR mjerenja sugerirala su prijenos protona kod peptida R5F2 i K5F2 ovisno o okruženju u kojem se nalaze (u otopini ili na površini lipidnog dvosloja), pri čemu se

R5F2 zadržava adsorbiran na dvosloju, dok K5F2 pokazuje veću sklonost desorpcije s lipidnog dvosloja. Dobiveni rezultati potvrđuju da međusobne interakcije kationskih skupina (R/K) i hidrofobnih aminokiselina, zajedno s mogućnošću protonskog prijenosa, presudno određuju obrazac adsorpcije peptida i stabilnost njihovog vezanja na membrane, a time i njihov potencijalni ulazak u stanicu.

Rezultati naših istraživanja pokazali su da kationsko-hidrofobni peptidi, iako svi ostvaruju vezanje na membranu, imaju različite obrasce interakcije ovisno o njihovom sastavu i vrsti lipidne membrane. Primjerice, R5F2 ima veći afinitet te izraženiju sposobnost ostvarivanja interakcija s polarnim skupinama i formiranja vodikovih veza pa se vjerojatno nalazi dublje u membrani, dok K5F2 ostaje površinski vezan. FTIR mjerenja pokazala su da prisutnost izoleucina značajno povećava populaciju *kink*-konformera pri čemu dolazi do narušavanja linearnosti lanca i slabljenja van der Waalsovih sila, dok peptidi s triptofanom nemaju takav učinak na EU i PRO membrane. Ovi rezultati ukazuju da: i) razgranati bočni lanci izoleucina ostvaruju jaču interakciju s hidrofobnim dijelovima dvosloja i dovode do povećane populacije *kink*-konformera te posljedično uzrokuju promjenu turbiditeta lipidnih suspenzija (UV-Vis spektri) u području detekcije T_m ; ii) za razliku od njih W-peptidi, za koje je općenito poznata sklonost agregaciji^{202,203,204} (što je potvrđeno i našim MD simulacijama*), imaju planarno orijentirane bočne lance i manje narušavaju slaganje ugljikovodičnih lanaca lipidnih membrana. Potonje je dodatno potvrđeno i temperaturno-ovisnim UV-Vis spektroskopskim mjerenjima jer najviše utječu na područje pretprijelaza. Stoga se može zaključiti da vrsta hidrofobne aminokiseline presudno određuje stupanj i način preraspodjele konformera ugljikovodičnih lanaca, a time i stabilnost lipidnog dvosloja, dok kationski segment regulira jačinu i dubinu vezanja putem elektrostatskih interakcija i vodikovih veza.

*MD simulacije je provela dr.sc. Barbara Pem

5. ZAKLJUČAK

U sklopu doktorske disertacije istražena je interakcija sintetiziranih, kratkih peptida kationsko-hidrofobnog karaktera s modelnim eukariotskim (EU) i prokariotskim (PRO) lipidnim membranama. Rezultati su pokazali da ne samo pozitivno nabijena aminokiselina (arginin ili lizin), već i ona hidrofobna (fenilalanin, triptofan ili izoleucin), utječu na promjene u termotropnim svojstvima i uređenosti lipidnih lanaca. Analiza utjecaja peptida na termotropna svojstva lipidnih membrana provedena metodama DSC i temperaturno-ovisne UV-Vis spektroskopije pokazala je da kationsko-hidrofobni peptidi različito utječu na fazne prijelaze modelnih EU i PRO membrana, ovisno o prisutnosti pozitivno nabijenih (arginin ili lizin), odnosno hidrofobnih aminokiselina (fenilalanin, triptofan ili izoleucin). Pokazano je da su peptidi s fenilalaninom (R5F2, K5F2) imali najsnažniji učinak; prisutnost R5F2 je uglavnom uzrokovala sniženje temperature prijelaza (T_p i T_m) i smanjenje kooperativnosti, dok je prisutnost K5F2 povećala izraženost prijelaza T_p i u nekim slučajevima uzrokovala povišenje T_m . Peptidi s triptofanom (R5W2, K5W2) pokazali su minimalan utjecaj na T_m lipidnih dvosloja i stabilnost strukture, što je u skladu s njihovom sklonosti površinskom usidrenju. Analizi s izoleucinom (R5I2, K5I2) uzrokovali su umjerene promjene; njihova prisutnost uzrokovala je malo sniženje T_p i T_m te djelomično smanjenje kooperativnosti, bez značajne destabilizacije dvosloja. Razlike između EU i PRO modelnog sustava naglašavaju ulogu sastava lipidne komponente u moduliranju učinka peptida na termotropna svojstva membrane.

Analiza FTIR-ATR mjerenja pokazala je da učinak peptida na lipidne membrane ovisi o sastavu modelnog sustava i vrsti peptida. Promjene u položaju $\nu\text{C=O}$ vrpce ukazale su da peptidi s fenilalaninom i peptidi s triptofanom u EU sustavima uglavnom uzrokuju pomake prema nižim valnim brojevima, što sugerira povećanu hidrataciju karbonilnih skupina, dok peptidi s izoleucinom pretežno utječu na pomak prema višim frekvencijama, što upućuje na smanjenu hidrataciju. U PRO sustavima uočeni su i pomaci prema višim i prema nižim vrijednostima, ovisno o peptidu. Analiza γCH_2 vrpce pokazala je da pojedini peptidi, posebno analozi s triptofanom i izoleucinom, mogu smanjiti uređenost lipidnih lanaca u PRO sustavima, dok je u EU membranama učinak bio manji. U spektralnom području $\nu_{\text{asPO}_2^-}$ promjene su bile izraženije u EU sustavima, dok su u PRO sustavima položaji vrpce ostali gotovo nepromijenjeni, uz iznimke kod I-peptida. Ovi rezultati ukazuju da peptidi moduliraju hidrataciju polarnih glava

i pakiranje lipidnih lanaca na način koji ovisi o vrsti kationske i hidrofobne aminokiseline te o sastavu membrane.

Različite hidrofobne aminokiseline u peptidima moduliraju raspodjelu *gauche*- i *kink*-konformera, što predstavlja izravan dokaz njihovog utjecaja na adsorpciju, ugradnju i pakiranje lanaca u membrani te posljedično na jačinu van der Waalsovih interakcija. Posebno se ističu I-peptidi, kod kojih razgranata struktura bočnih ogranaka I pogoduje pojavi većeg broja *kink*-konformera. Takvi strukturni poremećaji narušavaju linearnost i gusto pakiranje lipidnih lanaca u većoj mjeri nego što to čine planarne hidrofobne aminokiseline (npr. fenilalanin ili triptofan). Time se potvrđuje da topologija bočnih lanaca, a ne samo kationski naboj i njihova sposobnost stvaranja vodikovih veza, određuje način interakcije peptida s membranom.

U spektralnom području gdje vibracije potječu od $\nu_{as}PO_2^-$ zabilježene su interakcije peptida s lipidnim glavama, no one ne upućuju na postojanje značajnijih promjena u organizaciji dvosloja. Stoga se u ovom području može tek potvrditi prisutnost interakcije, ali bez mogućnosti donošenja daljnjih zaključaka o njihovoj ulozi u stabilizaciji ili destabilizaciji membranskih sustava.

Dobiveni rezultati potvrđuju da relativno male promjene u strukturi peptida, poput zamjene kationske ili hidrofobne aminokiseline, značajno utječu na prirodu interakcije peptida s lipidnom membranom. Rezultati su u skladu s postavljenim hipotezama. Pokazano je da se adsorpcija peptida razlikuje ovisno o vrsti kationske aminokiseline, pri čemu su argininski peptidi pokazali izraženiju sposobnost adsorpcije i veću destabilizaciju lipidnih dvosloja u usporedbi s njihovim lizinskim analogima. Nadalje, potvrđeno je da se adsorpcija razlikuje između modelnih EU i PRO membrana, što upućuje na važnost sastava lipidne komponente. Time su obje početne hipoteze potvrđene, čime se dodatno doprinosi razumijevanju mehanizma prvog koraka interakcije CPP s membranama. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem, posebice u kontekstu adsorpcije CPP kao prvog koraka njihove interakcije s membranama, pružaju vrijedan temelj za daljnji razvoj peptida optimiziranih za biomedicinske primjene.

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFM	mikroskopija atomskih sila (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
AMP	antimikrobni peptidi (engl. <i>antimicrobial peptides</i>)
APT	engl. <i>attached proton test</i>
Arg	arginin
ATP	adenozin trifosfat
ATR	prigušena totalna refleksija (engl. <i>attenuated total reflection</i>)
Boc	tert-butiloksikarbonilna skupina
CH ₂	metilenska skupina
CH ₃	metilna skupina
Cl	kardiolipin (engl. <i>cardiolipin</i>)
C _p	toplinski kapacitet
CPP	peptidi koji prodiru u stanicu (engl. <i>cell-penetrating peptides</i>)
d _H	hidrodinamički promjer
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfokolin
DPPG	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
DPPS	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serin
DSC	razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
EFA	analiza promjenjivih faktora (engl. <i>evolving factor analysis</i>)
ELS	elektroforetičko raspršenje svjetlosti (engl. <i>electrophoretic light scattering</i>)
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>Electron Spray Ionisation</i>)
EtOH	etanol
EU	eukariotski
F	fenilalanin
Fmoc	9-fluorenilmetiloksikarbonil
GUV	gigantski liposomi (engl. <i>giant unilamellar vesicles</i>)
HBTU	<i>O</i> -benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HMBC	engl. <i>heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	engl. <i>heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HRMS	masena spektroskopija visoke rezolucije (engl. <i>high resolution mass spectroscopy</i>)
I	izoleucin
Ile	izoleucin
IR	infracrveno (engl. <i>infrared</i>)
ITO	indij-kositreni oksid (engl. <i>indium tin oxide</i>)
J	konstanta sprege
K	lizin
L _c	kristalinična faza
LUV	veliki liposomi (engl. <i>large unilamellar vesicles</i>)
Lys	lizin
L _α	fluidna faza
L _β (')	gel-faza
MCR-ALS	multivarijantna analiza metodom izmjeničnih najmanjih kvadrata (engl. <i>multivariate curve resolution with alternating least squares</i>)

MeOH	metanol
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (engl. <i>minimum inhibitory concentration</i>)
MV	multilamelarni liposomi (engl. <i>multilamellar vesicles</i>)
Na ₂ HPO ₄	natrijev hidrogenfosfat
NaH ₂ PO ₄	natrijev dihidrogenfosfat
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PB	fosfatni pufer
PC	fosfatidilkolin (engl. <i>phosphatidylcholine</i>)
PE	fosfatidiletanolamin (engl. <i>phosphatidylethanolamine</i>)
PG	fosfatidilglicerol (engl. <i>phosphatidylglycerol</i>)
Phe	fenilalanin
PI	fosfatidilinozitol (engl. <i>phosphatidylinositol</i>)
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilkolin
PRO	prokariotska
PS	fosfatidilserin (engl. <i>phosphatidylserine</i>)
PVA	polivinil alkohol
R	arginin
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
Si	silicij
SLB	lipidni dvosloj na nosaču (engl. <i>supported lipid bilayer</i>)
SM	sfingomijelin
SPE	ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. <i>solid-phase extraction</i>)
SPSS	sinteza na čvrstom nosaču (engl. <i>solid phase synthesis</i>)
SUV	mali liposomi (engl. <i>small unilamellar vesicles</i>)
<i>T</i>	apsolutna temperatura
TFA	trifluoroctena kiselina
TIS	triizopropilsilan
<i>T_m</i>	temperatura taljenja ili mekšanja
TMS	tetrametilsilan
<i>T_p</i>	temperatura pretprijelaza
Trp	triptofan
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i>)
UV	unilamelarni liposomi (engl. <i>unilamellar vesicles</i>)
Vis	vidljivo (engl. <i>visible</i>)
W	triptofan
ZnSe	cink selenid
γCH ₂	strižna vibracija CH ₂ skupine
γCH ₃	strižna vibracija CH ₃ skupine
ζ	zeta-potencijal
ν _{as} CH ₂	antisimetrično istezanje CH ₂ skupine
ν _{as} CH ₃	antisimetrično istezanje CH ₃ skupine
ν _s CH ₂	simetrično istezanje CH ₂ skupine
ν _s CH ₃	antisimetrično istezanje CH ₃ skupine
ωCH ₂	njihanje CH ₂ skupine
δ	kemijski pomak

7. LITERATURNI IZVORI

1. S.J. Marrink, V. Corradi, P. C.T. Souza, H. I. Ingólfsson, D. P. Tieleman, M. S.P. Sansom, *Chem. Rev.* **119** (2019) 6184–6226.
2. T. Harayama i H. Riezman, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **19** (2018) 281–296.
3. T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007, str. 30-70.
4. J. F. Nagle i S. Tristram-Nagle, *BBA – Rev. Biomembr.* **1469** (2000) 159–195.
5. G. van Meer, D.R. Voelker i G.W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2008) 112–124.
6. M. Cebecauer, M. Amaro, P. Jurkiewicz, M. J. Sarmiento, R. Šachl, L. Cwiklik, M. Hof, *Chem. Rev.* **118** (2018) 11259–11297.
7. A. Bochicchio, A.F. Brandner, O. Engberg, D. Huster i R.A. Böckmann, *Front. Cell Dev. Biol.* **8** (2020) 601145.
8. E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor i C. Eggeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **18** (2018) 361–374.
9. F.C. Azimi, T.T. Dean, K. Minari, L. G. M. Basso, T. D. R. Vance, V. H. B. Serrão, *Biomol.* **13** (2023) 1130.
10. C. Has, P. Sivadas i S. L. Das, *J. Membr. Biol.* **255** (2022) 237–259.
11. E. Rideau, R. Dimova, P. Schwille, F.R. Wurm i K. Landfester, *Chem. Soc. Rev.* **47** (2018) 8572–8610.
12. A. Luchini i G. Vitiello, *Biomimetics* **6** (2021) 18.
13. L. I. Fedoreyeva, I.I. Kireev, V. Khavinson i B.F.Vanyushin, *Biochem.* **76** (2011) 1210–1219.
14. D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste i Ü. Langel, *ACS Nano* **8** (2014) 1972–1994.
15. M. T. H. Nguyen, D. Biriukov, C. Tempra, K. Baxova, H. Martinez-Seara, H. Evci, V. Singh, R. Šachl, M. Hof, P. Jungwirth, M. Javanainen, M. Vazdar, *Langmuir* **38** (2022) 11284–11295.
16. E. Vivès, P. Brodin i B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 16010–16017.
17. R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel i R. Brock, *Chem. Bio. Chem.* **6** (2005) 2126–2142.
18. K. M. Stewart, K. L. Horton i S.O. Kelley, *Org. Biomol. Chem.* **6** (2008) 2242–2255.
19. M. P. Stewart, R. Langer i K. F. Jensen, *Chem. Rev.* **118** (2018) 7409–7531.
20. L. Pašalić, B. Pem i D. Bakarić, *Membr.* **13** (2023) 12.
21. N. P. Kamat, S. Tobé, I.T. Hill i J.W. Szostak, *Angew. Chem.* **127** (2015) 11901–11905.

22. S.J. Singer i G. L. Nicolson, *Science* **175** (1972) 720–731.
23. J. Chen, G. Jing, M. Zhang, M. Cai, H. Xu, J. Jiang, Z. Tian i H. Wang, *Sci Rep* **6** (2016) 30247.
24. A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28** (2012) 215–250.
25. <https://chem.libretexts.org> (preuzeto 10. lipnja 2025.)
26. J. L. Robertson, *J. Gen. Physiol.* **150** (2018) 1472–1483.
27. F. Debeaufort, *J. Memb. Sci.* **180** (2000) 47–55.
28. T.J. McIntosh i S.A. Simon, *Biophys. J.* **91** (10) (2006) 3924–3931.
29. J. Frallicciardi, J. Melcr, P. Siginou, S.J. Marrink i B. Poolman, *Nat. Commun.* **13** (2022) 1605.
30. S. E. Feller, K. Gawrisch i A. D. MacKerell, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 318–326.
31. T. Osawa, K. Fujikawa i K. Shimamoto, *Front Chem.* **12** (2024) 1353688.
32. D.E. Vance i J.E. Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, vol 16, Elsevier, Amsterdam, 2019, str. 123–145.
33. D. Casares, P.V. Escribá i C.A. Rosselló, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 2167.
34. R. Martínez-Beamonte, J. Lou-Bonafonte, M. Martínez-Gracia i J. Osada, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 7716–7741.
35. H. E. Carter, F.J. Glick, W. P. Norris i G. E. Phillips, *J. Biol. Chem.* **170** (1947) 285–294.
36. A. B. Daku, S. B. AL-Mhanna, R. Abu Bakar i A. A. Nurul, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **45** (2022) 165–173.
37. M. R. Krause i S. L. Regen, *Acc. Chem. Res.* **47** (2014) 3512–3521.
38. W.K. Subczynski, M. Pasenkiewicz-Gierula, J. Widomska, L. Mainali i M. Raguz, *Cell Biochem. Biophys.* **75** (2017) 369–385.
39. W. Neupert, *Clin. Investig.* **72** (1994) 251–261.
40. W. Cho i R. V. Stahelin, *Biophys. Biomol. Struct.* **34** (2005) 119–151.
41. Y. Senju i S. Suetsugu, *Membranes* **13** (2023) 904, 3.
42. M. Schlame, *BBA - Bioenergetics* **1862** (2021) 148305, 5.
43. L. Montani, *Semin. Cell. Dev. Biol.* **112** (2021) 114–122.
44. H. Ryu, A. Fuwad, S. Yoon, H. Jang, J. C. Lee, S. M. Kim i T.J. Jeon, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 1437, 30.
45. R. S. Hegde i R. J. Keenan, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **23** (2022) 107–124.

46. A. M. Whited i A. Johs, *Chem. Phys. Lipids* **192** (2015) 51–59.
47. M. G. Paulick i C. R. Bertozzi, *Biochem.* **47** (2008) 6991–7000.
48. A. Talevi i C. L. Bellera, Drug Absorption. in *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences*, Springer International Publishing, Cham, 2018, str. 11–31.
49. P.F. Devaux, *Biochem.* **30** (1991) 1163–1173.
50. A.J. Verkleij, R. F. A. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn, L.L.M van Deenen *BBA- Biomembranes* **323** (1973) 178–193.
51. W. Gibson Wood, U. Igbavboa, W. E. Müller i G. P. Eckert, *J. Neurochem.* **116** (2011) 684–689.
52. H. T. Cheng, Megha i E. London, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 6079–6092.
53. A. A. Gurtovenko i I. Vattulainen, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) 4629–4634.
54. A. N. Filippov, R. Kh. Iksanov, N.A. Kononenko, N.P. Berezina i I. V. Falina, *Colloid J.* **72** (2010) 243–254.
55. S. Chiantia i E. London, *Encyclopedia of Biophysics*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2013, str. 1250–1253.
56. V. A. Fadok i P. M. Henson, *Curr. Biol.* **8** (1998) R693–R695.
57. B. R. Lentz, *Prog. Lipid Res.* **42** (2003) 423–438.
58. J. L. Wautier, M. P. Wautier, *J. Thromb. Hem.* **9** (2011) 1049–1055.
59. S. Riedl, B. Rinner, M. Asslaber, H. Schaidler, S. Walzer, A. Novak, K. Lohner, D. Zweglick BBA - *Biomembranes* 1808 (2011) 2638–2645.
60. D. Marquardt, B. Geier i G. Pabst, *Membranes (Basel)* **5** (2015) 180–196.
61. T. Lhermister, H. Chap i B. Payrastre, *J. Thromb. and Hem.* **9** (2011) 1883–1891.
62. G. van Meer, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **3** (2011) a004671–a004671.
63. Q. Zhou, J. Zhao, J. G. Stout, R. A. Luhm, T. Wiedmer, P. J. Sims, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 18240–18244.
64. Y. Shen, P. O. Saboe, I. T. Sines, M. Erbakan i M. Kumar, *J. Memb. Sci.* **454** (2014) 359–381.
65. G. Gregoriadis i Y. Perrie, *Liposomes in Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, Chichester, 2010.
66. Z. Huang, H. Meng, L. Xu, X. Pei, J. Xiong, Y. Wang, X. Zhan, S. Li, Y. He, *J. Liposome Res.* **34** (2024) 715–727.
67. L. Šturm i N. Poklar Ulrih, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 6547, 20.

68. R. Dimova i C. M. Marques, *The Giant Vesicle Book*. CRC Press, Boca Raton, 2020, str. 676.
69. A. Moga, N. Yandrapalli, R. Dimova i T. Robinson, *ChemBioChem* **20** (2019) 2674–2682.
70. Y. Okumura i Y. Iwata, *Membranes (Basel)* **1** (2011) 109–118.
71. J. A. Jackman i N.J. Cho, *Langmuir* **36** (2020) 1387–1400.
72. M. Chabanon, J.C. Stachowiak i P. Rangamani, *WIREs Systems Biology and Medicine* **9** (2017) e1386.
73. V. Kiessling, M. K. Domanska, D. Murray, C. Wan i L. K. Tamm, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* 1–12, Wiley, 2008.
74. J. Kurniawan, J. F. Ventrici de Souza, A. T. Dang, G. Liu i T. L. Kuhl, *Langmuir* **34** (2018) 15622–15639.
75. G. J. Hardy, R. Nayak i S. Zauscher, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **18** (2013) 448–458.
76. M. I. Angelova, A.-F. Bitbol, M. Seigneuret, G. Staneva, A. Kodama, Y. Sakuma, T. Kawakatsu, M. Imai, N. Puff, *BBA - Biomembranes* **1860** (2018) 2042–2063.
77. M. Kranenburg i B. Smit, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 6553–6563.
78. R. Winter i C. Jeworrek, *Soft Matter* **5** (2009) 3157–3173.
79. G. M. Geise, H. J. Cassady, D. R. Paul, B. E. Logan i M. A. Hickner, *Chem. Phys.* **16** (2014) 21673–21681.
80. S. J. Marrink, E. Lindahl, O. Edholm i A.E. Mark, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 8638–8639.
81. R. Koynova i B. Tenchov, *Encyclopedia of Biophysics*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013, str. 1841–1854.
82. D. Marsh i T. Páli, *Chem. Phys. Lipids* **141** (2006) 48–65.
83. P. Maleš, Z. Brkljača, I. Crnolatac, D. Bakarić, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **201** (2021) 111645.
84. H. Ebel, P. Grabitz i T. Heimburg, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 7353–7360.
85. T. Heimburg, *Biophys. J* **78** (2000) 1154–1165.
86. D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir i T. Isac, *BBA*, **311** (1973) 330–348.
87. M.P. Hentschel i F. Rustichelli, *Phys. Rev. Lett.* **66** (1991) 903–906.
88. A.H. de Vries, S. Yefimov, A.E. Mark i S.J. Marrink, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102** (2005) 5392–5396.
89. G. Cevc, *BBA - Biomembranes* **1062** (1991) 59–69.
90. B. Pem, Z. Brkljača, A. Philippe, G. Schaumann, M. Vazdar, D. Bakarić, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **322** (2024) 124773.

91. B.R. Lentz, *Biophys. J.* **65**(5) (1993) 1752-1765.
92. K. Sengupta, V. A. Raghunathan i J. Katsaras, *Phys. Rev. E* **68** (2003) 031710, 12.
93. P. Maleš, M. Butumović, I. Erceg, Z. Brkljača i D. Bakarić, *BBA - Biomembranes* **1865** (2023) 8725–8733.
94. P. Maleš, B. Pem, D. Petrov, D. Domazet Jurašin i D. Bakarić, *Soft Matter* **18** (2022) 6703-6715.
95. K. Akabori, *Ripple Phase*, Springer International Publishing, Cham, 2015, str. 65-153.
96. O. Yu. Selyutina, V. E. Koshman, M. V. Zelikma i S. P. Babailov, *BioMetals* **35** (2022) 629–637.
97. M. Zein i R. Winter, *PCCP* **2** (2000) 4545–4551.
98. H. Zhang i D. A. Selke, *BBA – Biomembranes* **1768**(1) (2007) 99-106.
99. S. Garcia-Manyes, G. Oncins i F. Sanz, *Biophys. J.* **89** (2005) 1812–1826.
100. L. Redondo-Morata, M. I. Giannotti i F. Sanz, *Langmuir* **28** (2012) 12851–12860.
101. S. Troeira Henriques, M. Nuno Melo i M. A. R. B. Castanho, *Mol. Membr. Biol.* **24** (2007) 173–184.
102. R. J. Dubos, *J. Exp. Med.* **70** (1939) 1–10.
103. K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **3** (2005) 238–250.
104. J. Talapko, T. Meštrović, M. Juzbašić, M. Tomas, S. Erić, L. Horvat Aleksijević, S. Bekić, D. Schwarz, S. Matic, M. Neuberg, I. Škrlec, *Antibiot.* **11** (2022) 1417, 17.
105. A. Bin Hafeez, X. Jiang, P. J. Bergen i Y. Zhu, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 11691, 52.
106. S. Kim, J. Lee, S. Lee, H. Kim, J.-Y. Sim, B. Pak, K. Kim i J. K., *Commun. Biol.* **5** (2022) 1199, 13.
107. X. Ma, Q. Wang, K. Ren, T. Xu, Z. Zhang, M. Xu, Z. Rao, X. Zhang, *Ferment.* **10** (2024) 20.
108. R. Zhang, L. Xu i C. Dong, *Protein. Pept. Lett.* **29** (2022) 641–650.
109. W. C. Wimley, *ACS Chem. Biol.* **5** (2010) 905–917.
110. D. Sengupta, H. Leontiadou, A. E. Mark i S. J. Marrink, *BBA - Biomembranes* **1778** (2008) 2308–2317.
111. Y. Sun, T. L. Sun i H. W. Huang, *Biophys. J.* **110** (2016) 28a.
112. M. D. Manniello, A. Moretta, R. Salvia, C. Scieuzo, D. Lucchetti, H. Vogel, A. Sgambato i P. Falabella, *Cell. Mol. Life Sci.* **78** (2021) 4259–4282.
113. C. Bechara i S. Sagan, *FEBS Lett.* **587** (2013) 1693–1702.
114. A. D. Frankel i C. O. Pabo, *Cell* **55** (1988) 1189–1193.

115. M. Mäe i Ü. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.* **6** (2006) 509–514.
116. A. Kerkis, M. A. F. Hayashi, T. Yamane i I. Kerkis, *IUBMB Life* **58** (2006) 7–13.
117. S. E. Park, M. I. Sajid, K. Parang i R. K. Tiwari, *Mol. Pharm.* **16** (2019) 3727–3743.
118. G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees i Temsamani., *JBC* **278** (2003) 31192–31201.
119. S. Pujals i E. Giralt, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60** (2008) 473–484.
120. S. Schmidt, M. J. W. Adjobo-Hermans, R. Kohze, T. Enderle, R. Brock i F. Milletti, *Bioconjug. Chem.* **28** (2017) 382–389.
121. E. Böhmová, *Physiol. Res.* **67** (2018) s267–s279.
122. A. Weinberger, V. Walter, S. R. MacEwan, T. Schmatko, P. Muller, A. P. Schroder, A. Chilkoti i C. M. Marque, *Sci. Rep.* **7** (2017) 43963, 9.
123. F. Zakany, I. M. Mándity, Z. Varga, G. Panyi, P. Nagy, T. Kovacs, *Cells* **12** (2023) 1700, 29.
124. J. Ouyang, Y. Sheng i W. Wang, *Cells* **11** (2022) 4016, 31.
125. F. Madani, S. Lindberg, Ü. Langel, S. Futaki i A. Gräslund, *J. Biophys.* **2011**, 1-10.
126. M. Di Pisa, G. Chassaing i J. M. Swiecicki, *Biochem.* **54** (2015) 194–207.
127. I. Ruseska i A. Zimmer, *J. Nanotechnol.* **11** (2020) 101–123.
128. K. Matsuzaki, S. Yoneyama, O. Murase i K. Miyajima, *Biochem.* **35** (1996) 8450–8456.
129. A. T. Jones, *J. Cell. Mol. Med.* **11** (2007) 670–684.
130. W. Lohcharoenkal, L. Wang, Y. C. Chen i Y. Rojanasakul, *Biomed. Res. Int.* **2014** (2014) 1–12.
131. J. Ye, E. Liu, Z. Yu, X. Pei, S. Chen, P. Zhang, M.C. Shin, J. Gong, H. He, V. C. Yang, *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2016) 1892, 16.
132. J. Xie, Y. Bi, H. Zhang, S. Dong, L. Teng, R. J. Lee, Z. Yang, *Front. Pharmacol.* **11** (2020) 697, 23.
133. C. Allolio, A. Magarkar, P. Jurkiewicz, K. Baxová, M. Javanainen, P. E. Mason, R. Šachl, M. Cebecauer, M. Hof, D. Horinek, V. Heinz, C. M. Ziegler, A. Schröfel i P. Jungwirth, *PNAS* **115** (2018) 11923–11928.
134. L. Li, I. Vorobyov, T. W. Allen, *J. Phys. Chem. B* **117** (2013) 11906–11920.
135. N. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai i G. C. L. Wong, *FEBS Letters* **584** (2010) 1806–1813.
136. L. Pašalić, D. Domazet Jurašin, B. Pem, M. Vazdar i D. Bakarić, *BBA - Biomembranes*, **1865** (2023) 12.
137. G. Tesei, M. Vazdar, R. Jensen, C. Cragnell, P. Mason, J. Heyda, M. Skepö, S. Skepö, P. Jungwirth i M. Lund, *PNAS* **114**, (2017) 11428-11433.

138. L. Pašalić, A. Jakas, B. Pem i D. Bakarić, *Antibiotics* **12** (2023) 1216, 17.
139. A. D. Robison, S. Sun, M. Poyton, G. Johnson, J. Pellois, P. Jungwirth, M. Vazdar, P. Cremer, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 9287–9296.
140. V. Apostolopoulos, J. Bojarska, T. Chai, S. Elnagdy, K. Kaczmarek, J. Matsoukas, R. New, K. Parang, O. Lopez, H. Parhiz, C. Perera, M. Pickholz, M. Remko, M. Saviano, M. Skwarczynski, Y. Tang, W. M. Wolf, T. Yoshiya, J. Zabrocki, *Mol.* **26** (2021) 430.
141. C. Petrou i Y. Sarigiannis, *Protein J.*, 2018, str. 1–21.
142. I. Coin, M. Beyermann i M. Bienert, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 3247–3256.
143. Y. Okada, *Curr. Org. Chem.* **5** (2001) 1–43.
144. R. B. Merrifield, *Science* (1979) **150** (1965) 178–185.
145. M. Cudic i G. B. Fields, *Solid-Phase Peptide Synthesis* (2008) 515–546.
146. C. Demetzos, *J. Liposome Res.* **18** (2008) 159–173.
147. C. H. Spink, *Methods Mol. Biol.* **84** (2008) 115–141.
148. J. F. Ribeiro, *et al. Scanning Probe Microscopy in Nanoscience and Nanotechnology 3. NanoScience and Technology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2012, str. 575–619.
149. J. D. Menczel, R. Bruce Prime, *Thermal Analysis of Polymers*. Wiley, Hoboken, 2009, str. 9–239.
150. K. Lohner i E. J. Prenner, *BBA - Biomembranes* **1462** (1999) 141–156.
151. Z. Chen, T. Deutsch, H. Dinh, K. Domen, K. Emery, A. Forman, N. Gaillard, R. Garland, C. Heske, T. Jaramillo, A. Kleiman - Schwarstein, E. Miller, K. Takanabe, J. Turner, *UV-Vis Spectroscopy*, Springer, New York, 2013, str. 49–62.
152. M. Picollo, M. Aceto, T. Vitorino, *Phys. Sci. Rev.* **4**, (2019) 14.
153. D.C. Watts, *Frontiers in Dental Medicine* **4**, (2023) 1108316, 11.
154. M. Nurjayadi, F. Romundza i M. Moersilah, *AIP Conf. Proc.* (2021) 7.
155. D. Bakaric, J. Alerić, T. Parlić-Risović, J. Spanget-Larsen, *Spectrochim. Acta A* **209** (2019) 288–294.
156. P. Maleš, Z. Brkljača, D. Domazet Jurašin i D. Bakarić, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **272** (2022) 121013.
157. J.M. Thompson, *Infrared Spectroscopy*, Jenny Stanford Publishing, 2018, str. 442.
158. H. Kavak, S. Eker i A. Mamedov, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **86**, 223–229 (2004).
159. S. Bienz, L. Bigler, T. Fox i H. Meier, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2021, str. 428.

160. J.T. IR. Burke, *J. Chem. Educ.* **74** (1997) 1213, 365-369.
161. Y. Ozaki, *Anal. Sci.* **37** (2021) 1193–1212.
162. L. D. S. Yadav, Infrared (IR) Spectroscopy. in *Organic Spectroscopy*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2005, str 52–106.
163. E. Mendes i N. Duarte, *Foods* **10** (2021) 477.
164. R. N. A. H. Lewis i R. N. McElhaney, *BBA - Biomembranes* **1828** (2013) 2347–2358.
165. A. M. Dopico, *Methods in Membrane Lipids*. **400**, Humana Press, Totowa, NJ, 2007, str 621.
166. R. N. A. H. Lewis i R. N. McElhaney, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Griffiths, P. R., Wiley, 2001, str. 403-413.
167. S. Pfeiffer i D. Marsh, *BBA - Biomembranes* **1422(3)** (1999) 405-421.
168. S. V. Adishchev, T.A. Duda, Y. V. Zaitseva, V. A. Zyкова, A. G. Milekhin, K. A. Okotrub, N. V. Surovtsev, *Optoelectron. Instrum. Data Process.* **54** (2018) 538–545.
169. R. N. A. H. Lewis i R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **96** (1998) 9–21.
170. Z. D. Schultz i I. W. Levin, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **4** (2011) 343–366.
171. C. Paré, M. Lafleur, F. Liu, R. N. A. H. Lewis i R. N. McElhaney, *BBA - Biomembranes* **1511** (2001) 60–73.
172. R. N. A. H. Lewis, E. Prenner, L. Kondejewski, C. Flach, R. Mendeksohn, R. Hodges, R. McElhaney, *Biochemistry* **38** (1999) 15193–15203.
173. L. Senak, M. A. Davies i R. Mendelsohn, *J. Phys. Chem.* **95** (1991) 2565–2571.
174. B. Faramarzi, M. Moggio, N. Diano, M. Portaccio i M. Lepore, *Biophys.* **3** (2023) 158–180.
175. A. J. Lock i H. J. Bakker, *J. Chem. Phys.* **117** (2002) 1708–1713.
176. C. Molina, D. Kim, L. Mehndiratta, J. Lee, C. K. Madawala, J.H. Slade, A. V. Tivanski, V. H. Grassian, *ACS Meas. Sci. Au* **5** (2025) 74–86.
177. S. Hupfeld, A. M. Holsæter, M. Skar, C. B. Frantzen i M. Brandl, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6** (2006) 3025–3031.
178. P. A. Hassan, S. Rana i G. Verma, *Langmuir* **31** (2015) 3–12.
179. S. Bhattacharjee, *J. of Control. Release* **235** (2016) 337–351.
180. J. D. Castile i K. M. G. Taylor, *Int. J. Pharm.* **188** (1999) 87–95.
181. F. Menges. Spectragryph - optical spectroscopy software. Preprint at (2016).
182. J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan i R. Tauler, *Chemometr. and Intell. Lab. Syst.* **76** (2005) 101–110.
183. I. Wiegand, K. Hilpert i R. E. W. Hancock, *Nat. Protoc.* **3** (2008) 163–175.

184. Z. V. Leonenko, E. Finot, H. Ma, T. E. S. Dahms i D. T. Cramb, *Biophys. J.* **86** (2004) 3783–3793.
185. M. Rappolt, G. Pabst, G. Rapp, M. Kriechbaum, H. Amenitsch, C. Krenn, B. Sigrid, P. Laggner, *Eur. Biophys. J.* **29** (2000) 125–133.
186. E. Evans i D. Needham, *J. Phys. Chem.* **91** (1987) 4219–4228.
187. S. A. Pandit i M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* **82** (2002) 1818–1827.
188. K. Matsuzaki, *Biochem. Soc. Trans.* **29** (2001) 598–601.
189. W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham i E. Evans, *Biophys. J.* **79** (2000) 328–339.
190. S. Khemaissa, A. Walrant i S. Sagan, *Q. Rev. Biophys.* **55** (2022) 12.
191. R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, W. Pohle i H. H. Mantsch, *Biophys. J.* **67** (1994) 2367–2375.
192. R. N. A. H. Lewis i R. N. McElhaney, *Biophys. J.* **61** (1992) 63–77.
193. M. Boncheva, F. Damien i V. Normand, *BBA - Biomembranes* **1778** (2008) 1344–1355.
194. H. L. Casal i R. N. McElhaney, *Biochemistry* **29** (1990) 5423–5427.
195. U. P. Fringeli i H. Günthard, *Infrared Membrane Spectroscopy*, Academic Press, London, 1981, str. 270–332.
196. A. Blume, W. Huebner i G. Messner, *Biochemistry* **27** (1988) 8239–8249.
197. R. N. A. H. i R. N. McElhaney, *Biophys. J.* **79** (2000) 2043–2055.
198. A. Blume, *Chem. Phys. Lipids* **64** (1993) 45–57.
199. D. Bakarić, D. Carić, K. Vazdar i M. Vazdar, *Chem. Phys. Lipids* **225** (2019) 104793.
200. F. Severcan, D. O. Dorohoi, *J. Mol. Struct.* **887** (2008) 117–121.
201. T. B. Pedersen, T. Kaasgaard, M. Jensen, S. Frokjaer, O. G. Mouritsen i K. Jørgensen, *Biophys. J.* **89** (2005) 2494–2503.
202. A. R. Ferreira, M. Ferreira, C. Nunes, S. Reis, C. Teixeira, P. Gomes, P. Gameiro, *Membranes* **13** (2023) 138.
203. S. Clark, T. A. Jowitt, L. K. Harris, C. G. Knight i C. B. Dobson, *Commun. Biol.* **4** (2021) 605.
204. L. Pašalić, B. Pem, A. Jakas, A. Čikoš, N. Groznica, T. Mlinarić, M. Accorsi, A. Mangiarotti, R. Dimova, D. Bakarić, *J. Liposome Res.*, prihvaćeno za objavljivanje

8. DODATAK

8.1. Automatizirana sinteza na čvrstom nosaču (Dodatak poglavlju 3.2.)

Tablica A1. Sinteza R5F2 peptida

	Aminokiselina	$M / \text{g mol}^{-1}$	m / mg
	Fmoc-Phe-OH-Wang resin (ide u reakcijsku posudu)	0,4-0,8 mmol/g	250
1	Fmoc-Phe-OH HOBt HBTU	387,4 135,1 379,3	154,96 54,04 151,72
2	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
3	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
4	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
5	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
6	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
7	Deprotekcija Fmoc		

Tablica A2. Sinteza K5F2 peptida

	Aminokiselina	$M / \text{g mol}^{-1}$	m / mg
	Fmoc-Phe-OH Wang resin (ide u reakcijsku posudu)	0,4-0,8 mmol/g	250
1	Fmoc-Phe-OH HOBt HBTU	387,4 135,1 379,3	154,96 54,04 151,72
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
3	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
4	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
5	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
7	Deprotekcija Fmoc		

Tablica A3. Sinteza R5W2 peptida

	Aminokiselina	$M / \text{g mol}^{-1}$	m / mg
	Fmoc-D-Trp-Wang resin (ide u reakcijsku posudu)	0,4-0,8 mmol/g	250
1	Fmoc-Trp-Boc-OH HOBt HBTU	426,5 135,1 379,3	170,60 54,04 151,72
2	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
3	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
4	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
5	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
6	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
7	Deprotekcija Fmoc		

Tablica A4. Sinteza K5W2 peptida

	Aminokiselina	$M / \text{g mol}^{-1}$	m / mg
	Fmoc-Trp-Wang resin (ide u reakcijsku posudu)	0,4-0,8 mmol/g	250
1	Fmoc-Trp-Boc-OH HOBt HBTU	526,6 135,1 379,3	210,74 54,04 151,72
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
3	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
4	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
5	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
7	Deprotekcija Fmoc		

Tablica A5. Sinteza R5I2 peptida

	Aminokiselina	$M / \text{g mol}^{-1}$	m / mg
	Fmoc-D-Ile-Wang resin (ide u reakcijsku posudu)	0,4-0,8 mmol/g	250
1	Fmoc-Ile-OH HOBt HBTU	353,4 135,1 379,3	141,36 54,04 151,72
2	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
3	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
4	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
5	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
6	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH HOBt HBTU	648,8 135,1 379,3	259,51 54,04 151,72
7	Deprotekcija Fmoc		

Tablica A6. Sinteza K5I2 peptida

	Aminokiselina	$M / \text{g mol}^{-1}$	m / mg
	Fmoc-Ile-Wang resin (ide u reakcijsku posudu)	0,4-0,8 mmol/g	250
1	Fmoc-Ile-OH HOBt HBTU	353,4 135,1 379,3	141,36 54,04 151,72
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
3	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
4	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
5	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
6	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	468,6 135,1 379,3	187,44 54,04 151,72
7	Deprotekcija Fmoc		

8.2. DLS i ELS (Dodatak poglavlju 4.1.)

Tablica B1. DPPC+DPPS

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	105,7	100	0,085	-15,9
2	105,2	100	0,073	-16,4
3	106,3	100	0,089	-15,8
4	106,2	100	0,075	
5	106,0	100	0,058	
6	107,3	100	0,079	
Srednja vrijednost	106,1	100	0,080	-16,0
Nesigurnost	$\pm 0,7$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 0,3$

Tablica B2. DPPC+DPPS+R5F2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	124,7	100	0,070	-13,8
2	125,3	100	0,077	-13,0
3	126,1	100	0,091	-13,9
4	126,0	100	0,088	
5	126,3	100	0,106	
6	126,1	100	0,100	
Srednja vrijednost	125,8	100	0,090	-13,6
Nesigurnost	$\pm 0,6$	± 0	$\pm 0,014$	$\pm 0,5$

Tablica B3. DPPC+DPPS+K5F2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	115,1	100	0,072	0,247
2	114,5	100	0,066	-0,002
3	114,9	100	0,082	-0,903
4	112,5	100	0,061	
5	113,1	100	0,068	
6	115,7	100	0,093	
Srednja vrijednost	114,0	100	0,074	-0,2
Nesigurnost	$\pm 1,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 0,6$

Tablica B4. DPPC+DPPS+R5W2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	108,9	100	0,189	-23,0
2	120,0	100	0,181	-21,7
3	125,4	100	0,184	-20,6
4	118,5	100	0,171	
5	126,7	100	0,168	
6	115,6	100	0,183	
Srednja vrijednost	119,0	100	0,180	-22,0
Nesigurnost	$\pm 7,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 1,0$

Tablica B5. DPPC+DPPS+K5W2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	129,0	100	0,357	-29,7
2	113,9	100	0,347	-29,3
3	190,4	100	0,346	-32,8
4	118,7	100	0,361	
5	149,5	100	0,312	
6	126,9	100	0,341	
Srednja vrijednost	138,0	100	0,340	-30,6
Nesigurnost	$\pm 28,0$	± 0	$\pm 0,020$	$\pm 2,0$

Tablica B6. DPPC+DPPS+R5I2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	133,2	100	0,096	-7,9
2	133,2	100	0,094	-7,4
3	132,3	100	0,085	-7,1
4	133,0	100	0,099	
5	131,7	100	0,082	
6	134,7	100	0,107	
Srednja vrijednost	133,0	100	0,090	-7,5
Nesigurnost	$\pm 1,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 0,4$

Tablica B7. DPPC+DPPS+K5I2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	122,1	100	0,067	-10,9
2	124,8	100	0,073	-12,7
3	128,8	100	0,102	-12,6
4	126,0	100	0,097	
5	128,9	100	0,101	
6	126,8	100	0,094	
Srednja vrijednost	126,0	100	0,090	-12,1
Nesigurnost	$\pm 3,0$	± 0	$\pm 0,020$	$\pm 1,0$

Tablica B8. DPPC+DPPG

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	117,4	100	0,072	-6,9
2	116,5	100	0,06	-6,4
3	118,9	100	0,076	-6,2
4	120,5	100	0,085	
5	120,1	100	0,067	
6	121,8	100	0,084	
Srednja vrijednost	119,0	100	0,070	-6,5
Nesigurnost	$\pm 2,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 0,4$

Tablica B9. DPPC+DPPG+R5F2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	133,8	100	0,142	-3,7
2	132,4	100	0,137	-4,5
3	132,6	100	0,140	-5,4
4	127,9	100	0,154	
5	133,7	100	0,161	
6	124,8	100	0,168	
Srednja vrijednost	131,0	100	0,150	-4,5
Nesigurnost	$\pm 4,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 1,0$

Tablica B10. DPPC+DPPG+K5F2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	153,8	100	0,098	-9,6
2	159,7	100	0,113	-9,6
3	161,7	100	0,119	-10,9
4	154,6	100	0,125	
5	156,5	100	0,119	
6	154,3	100	0,111	
Srednja vrijednost	157,0	100	0,110	-10,0
Nesigurnost	$\pm 3,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 0,8$

Tablica B11. DPPC+DPPG+R5W2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	135,6	100	0,128	-17,7
2	127,1	100	0,120	-17,0
3	125,7	100	0,150	-18,1
4	126,0	100	0,123	
5	128,6	100	0,126	
6	123,6	100	0,120	
Srednja vrijednost	128,0	100	0,130	-17,6
Nesigurnost	$\pm 4,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 0,6$

Tablica B12. DPPC+DPPG+K5W2

Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	122,6	100	0,182	-25,8
2	118,2	100	0,180	-27,0
3	115,5	100	0,185	-28,3
4	110,5	100	0,173	
5	127,1	100	0,173	
6	115,0	100	0,185	
Srednja vrijednost	118,0	100	0,180	-27,0
Nesigurnost	$\pm 6,0$	± 0	$\pm 0,010$	$\pm 1,0$

Tablica B13. DPPC+DPPG+R5I2

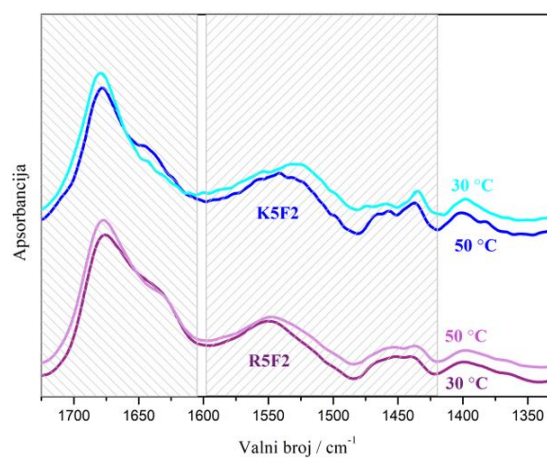
Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	202,1	100	0,299	1,8
2	211,7	100	0,321	1,1
3	240,0	100	0,354	1,5
4	256,7	100	0,355	
5	232,5	100	0,355	
6	221,6	100	0,400	
Srednja vrijednost	227,0	100	0,350	1,5
Nesigurnost	$\pm 20,0$	± 0	$\pm 0,040$	$\pm 0,4$

Tablica B14. DPPC+DPPG+K5I2

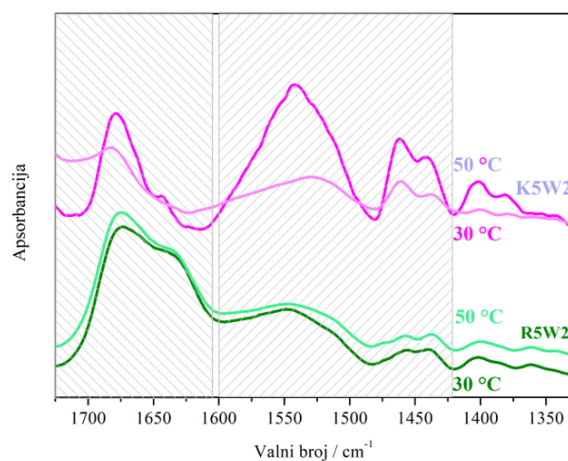
Mjerenje	d_H / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	75,5	100	1,000	-3,4
2	149,2	100	0,969	-5,2
3	142,7	100	0,229	-5,23
4	149,3	100	0,230	
5	169,5	100	0,222	
6	147,9	100	0,237	
Srednja vrijednost	139,0	100	0,500	-5,0
Nesigurnost	$\pm 33,0$	± 0	$\pm 0,400$	$\pm 1,0$

8.1. FTIR-ATR (Dodatak poglavlju 4.3.)

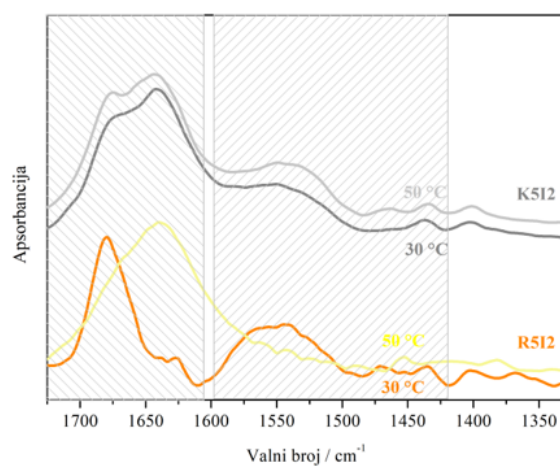
a)



b)



c)



Slika C1. FTIR spektar heptapeptida (1 mM pri 30 °C i 50 °C): a) R5F2/K5F2, b) R5W2/K5W2, c) R5I2/K5I2

8.2. Biološka ispitivanja - Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Vrijednost MIC se definira kao najniža koncentracija antimikrobne tvari koja potpuno inhibira rast mikroorganizama nakon inkubacije u standardiziranim uvjetima. U ovom radu vrijednost MIC je određena metodom serijskog razrjeđenja u bujonu korištenjem mikrotitarskih ploča.

Kao testni sojevi korišteni su *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Bacillus subtilis*, a za medij Mueller–Hinton bujon II (MHBII). Bakterije su najprije uzgojene na MHBII agar pločama (37 °C, preko noći), a zatim inokulirane u tekuću podlogu i uzgojene do faze eksponencijalnog rasta. Nakon mjerenja optičke gustoće (OD₆₀₀) i pripreme inokuluma standardizirane gustoće (10⁶ CFU/mL), po 90 µL bakterijske suspenzije dodano je u jažice mikrotitarske ploče. U svaku jažicu zatim je dodano 10 µL odgovarajuće razrijeđene otopine peptida. Paralelno su pripremljene kontrolne jažice s medijem bez stanica (negativna kontrola) i sa stanicama bez dodatka peptida (pozitivna kontrola). Kao dodatni referentni standard korišten je peptid melitin, čije su poznate antimikrobne osobine poslužile za validaciju ispitivanja.

Mikrotitarske ploče inkubirane su statički pri 37 °C tijekom 20 sati. Nakon inkubacije, rast bakterija evaluiran je vizualno te mjerenjem apsorbancije na 600 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Glomax, Promega). MIC vrijednost definirana je kao najniža koncentracija peptida pri kojoj nije zabilježen vidljivi mikrobni porast.

Dobivene vrijednosti MIC-a za ispitivane peptide prikazane su u tablicama u nastavku. U tablicama su prikazana tri nezavisna mjerenja (1, 2 i 3). Radi preglednosti, vrijednosti MIC₅₀ istaknute su zelenom, a vrijednosti MIC₉₀ žutom bojom. Koncentracija (c) je izražena u mol dm⁻³.

Tablica D1. Vrijednosti MIC peptida R5F2 određene na: a) *Escherichia coli* b) *Bacillus subtilis*

a)

c(R5F2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	96,74	98,42	103,78
12,8	98,63	103,09	110,06
25,6	102,93	107,31	112,18
51,2	107,04	111,39	114,96
102,4	109,06	113,68	117,43
204,8	96,46	106,51	120,52
409,6	100,34	107,11	128,03

b)

c(R5F2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	64,65	88,87	72,83
12,8	63,53	79,20	61,21
25,6	85,53	85,50	80,70
51,2	85,71	68,46	85,21
102,4	0,87	1,66	6,85
204,8	5,85	-0,29	1,27
409,6	4,22	1,40	1,29

Tablica D2. Vrijednosti MIC peptida K5F2 određene na: a) *Escherichia coli*, b) *Bacillus subtilis*

a)

c(K5F2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	92,83	93,79	95,11
12,8	94,57	98,15	98,98
25,6	96,09	98,90	102,25
51,2	96,00	102,10	104,63
102,4	98,52	105,28	108,12
204,8	100,13	105,85	107,25
409,6	110,14	120,10	121,21

b)

c(K5F2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	63,49	50,96	61,07
12,8	43,52	46,52	50,27
25,6	52,70	51,51	57,66
51,2	51,71	50,98	61,54
102,4	53,80	53,27	55,96
204,8	71,75	57,26	70,11
409,6	96,25	80,21	99,66

Tablica D3. Vrijednost MIC peptida R5W2 određene na: a) *Escherichia coli*, b) *Bacillus subtilis*

a)

c(R5W2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	101,10	101,10	103,2889
12,8	116,28	116,28	119,1467
25,6	109,18	109,18	112,7822
51,2	102,80	102,80	102,6
102,4	87,75	87,75	83,16118
204,8	1,03	1,03	-0,24
409,6	-0,04	-0,04	0,77

b)

c(R5W2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	89,01	129,43	107,23
12,8	1,59	-7,39	7,92
25,6	7,26	-18,01	1,15
51,2	8,32	6,91	5,72
102,4	0,80	-0,42	3,33
204,8	4,40	7,47	4,01
409,6	6,29	1,85	5,44

Tablica D4. Vrijednost MIC peptida K5W2 određene na: a) *Escherichia coli*, b) *Bacillus subtilis*

a)

c(K5W2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	102,59	104,12	100,14
12,8	102,54	105,72	102,92
25,6	107,89	109,73	106,07
51,2	111,16	118,49	107,80
102,4	111,29	122,87	114,86
204,8	105,02	119,95	105,54
409,6	109,05	125,81	109,13

b)

c(K5W2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	73,06	99,53	56,10
12,8	66,48	126,31	67,49
25,6	89,44	177,59	74,56
51,2	110,87	1,08	95,60
102,4	-2,67	-10,90	-8,34
204,8	-0,57	-4,72	-8,03
409,6	-2,11	-10,31	-8,28

Tablica D5. Vrijednost MIC peptida R5I2 određene na: a) *Escherichia coli*, b) *Bacillus subtilis*

a)

c(R5I2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	94,68	89,81	92,00
12,8	96,88	92,66	94,38
25,6	96,85	90,70	93,72
51,2	98,88	90,92	94,15
102,4	102,49	97,66	100,71
204,8	104,82	103,33	105,97
409,6	113,50	116,44	119,21

b)

c(R5I2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	45,32	45,41	57,36
12,8	37,65	47,80	52,90
25,6	51,54	39,83	59,84
51,2	52,58	39,33	58,37
102,4	45,42	45,81	63,47
204,8	54,05	49,09	71,99
409,6	78,80	69,12	86,72

Tablica D6. Vrijednost MIC peptida K5I2 određene na: a) *Escherichia coli*, b) *Bacillus subtilis*

a)

c(K5I2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	89,39	91,40	92,71
12,8	92,92	93,00	94,74
25,6	91,22	91,64	93,27
51,2	91,02	92,16	94,28
102,4	96,54	96,45	95,88
204,8	97,18	92,86	95,25
409,6	107,92	100,23	101,73

b)

c(K5I2)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
6,4	49,85	47,15	59,33
12,8	41,84	51,78	49,33
25,6	48,56	43,68	44,86
51,2	48,90	45,43	40,24
102,4	44,93	45,76	54,47
204,8	59,35	47,45	57,35
409,6	82,01	67,97	83,96

Tablica D7. Vrijednost MIC melitin peptida određene na: a) *Escherichia coli*, b) *Bacillus subtilis*

a)

c(Melitin)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
0,8	88,31	95,37	91,26
1,6	86,33	92,31	85,71
3,2	87,74	105,05	96,62
6,4	-0,66	-0,59	2,85
12,8	0,62	0,71	1,97
25,6	0,65	2,75	3,54
51,2	-0,27	3,38	5,61

b)

c(Melitin)	1.	2.	3.
0	100,00	100,00	100,00
0,8	43,90	65,31	58,98
1,6	50,17	16,98	3,03
3,2	8,23	6,09	9,51
6,4	3,73	-1,09	9,64
12,8	7,17	-2,01	3,36
25,6	9,30	6,92	11,45
51,2	5,00	-0,99	9,96

Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Lea Pašalić

Datum rođenja: 14.7.1994.

Mjesto rođenja: Osijek

Obrazovanje:

2021.- Poslijediplomski studij kemije – smjer fizikalna kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2016.-2019. Diplomski studij kemije – smjer analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2013.-2016. Preddiplomski studij kemije, Odjel za Kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Zaposlenje:

2022.- Asistent, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković

Dodatna usavršavanja:

2025. The University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (bilateralna suradnja MZO i OeAD) (1 tjedan)

2024. Institute for Molecular Biosciences, Graz, Austrija (stipendija ravnatelja IRB-a) (4 tjedna)

2024. The University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (bilateralna suradnja MZO i OeAD) (1 tjedan)

2024. Max Planck Institute, Potsdam, Njemačka (bilateralna suradnja MZO i DAAD) (3 tjedna)

2024. J. Heyrovsky Institute of Physical chemistry, Češka Republika (HrZZ MOBDOK stipendija) (3 mjeseca)

2023. Max Planck Institute, Potsdam, Njemačka (bilateralna suradnja MZO i DAAD) (3 tjedna)

2022. Institut des Molécules et Matériaux du Mans, Université du Mans, Francuska (stipendija ravnatelja IRB-a) (4 tjedna)

2020. Medical University of Graz, Division of Molecular Biology and Biochemistry, Graz, Austrija (8 mjeseci)*

*Prije zaposlenja na IRB-u

Objavljeni znanstveni radovi:

1. Pašalić, Lea; Pem, Barbara; Jakas, Andreja; Čikoš, Ana; Groznica, Nikolina; Mlinarić, Tihana; Accorsi, Matilde; Mangiarotti, Agustin; Dimova, Rumiana; Bakarić, Danijela*, *Journal of Liposome Research* (prihvaćeno 10.10.2025).
2. Vukosav, Petra; Matijević Glavan, Tanja; Komazec, Bruno; Peharec Štefanić, Petra; **Pašalić, Lea**; Bakarić, Danijela; Muharemović, Hasan; Mišić Radić, Tea*, *European Journal of Phycology*, **1** (2025), 1; 1-12.
3. Belovari, Mateja[#]; **Pašalić, Lea**[#]; Pem, Barbara; Jurković, Marta; Topolovčan, Nikola; Gredičak, Matija; Piantanida, Ivo*; Bakarić, Danijela*, *Microchemical Journal*, **208** (2025), 112335
4. Pem, Barbara; Liu, Qiqian; **Pašalić, Lea**; Edely, Mathieu; de la Chapelle, Marc Lamy; Bakarić, Danijela*, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, **243** (2024), 114158
5. **Pašalić, Lea**[#]; Maleš, Petra[#]; Čikoš, Ana; Pem, Barbara; Bakarić, Danijela*, *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **305** (2024), 123488
6. **Pašalić, Lea**; Liu, Qiqian; Vukosav, Petra; Mišić Radić, Tea; Azziz, Aicha; Majdinasab, Marjan; Edely, Mathieu; de la Chapelle, Marc Lamy; Bakarić, Danijela*, *Journal of Liposome Research*, **34** (2024), 1; 113-123
7. Maleš, Petra; Munivrana, Jana; **Pašalić, Lea**; Pem, Barbara; Bakarić, Danijela*, *Chemistry and Physics of Lipids*, **264** (2024), 105434
8. **Pašalić, Lea**; Pem, Barbara; Domazet Jurašin, Darija; Vazdar, Mario; Bakarić, Danijela*, *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, **1865** (2023), 4; 184122
9. **Pašalić, Lea**; Jakas, Andreja; Pem, Barbara; Bakarić, Danijela, *Antibiotics*, **12** (2023), 7; 1216,
10. Vukosav, Petra; **Pašalić, Lea**; Bakarić, Danijela; Domazet Jurašin, Darija; Mišić Radić, Tea*, *Water*, **15** (2023), 3; 159-159.
11. **Pašalić, Lea**; Pem, Barbara; Bakarić, Danijela*, *Membranes*, **13** (2023), 83.

[#] Dijeljeno prvo autorstvo

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

1. Pašalić, Lea; Jakas, Andreja; Bakarić, Danijela

Cationic-hydrophobic peptides and their impact on model eukaryotic and prokaryotic lipid membranes // Peptide Chemistry Day, Zagreb, Hrvatska, 21.5.2025.

2. Pašalić, Lea; Štastny, David; Bakarić, Danijela

Asymmetric phospholipid vesicles as cell membrane models // 27th Congress of the Society of Chemists and Technologists of Macedonia (SCTM) Ohrid, Sjeverna Makedonija, 25.09.2024-28.09.2024

3. Pašalić, Lea; Mangiarotti, Agustin; Jakas, Andreja; Bakarić, Danijela

Potential cell penetrating peptides in interaction with lipid bilayers // 7th Mini Symposium of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry: Book of Abstracts / Gabelica Marković, Vesna; Rimac, Hrvoje (ur.).

Zagreb: HKD - sekcija za medicinsku i farmaceutsku kemiju, 2023. str. 3.-3.

4. Pašalić, Lea; Jakas, Andreja; Mangiarotti, Agustin; Bakarić, Danijela

Influence of cationic peptides on the properties of unilamellar phosphatidylcholine vesicles // Peptide chemistry day 2023: Book of Abstracts / Frkanec, Ruža; Namjesnik, Danijel (ur.).

Zagreb: Hrvatsko kemijsko društvo; Sveučilište u Zagrebu, 2023. str. 15.-15.

5. Pašalić, Lea; Bakarić, Danijela; Liu, Qiqian; Lamy de la Chapelle, Marc

Physical-chemical properties of DPPC liposomes in the presence of gold nanoparticles aggregates // 28HSKIKI Book of Abstracts. 2023. str. 112-112

6. Pašalić, Lea; Bakarić, Danijela; Jakas, Andreja

Arginine-rich peptides vs. Lysine-rich peptides: impact on differently charged lipid bilayers // Book of Abstracts. 2023. str. 51-51

7. Pašalić, Lea; Bakarić, Danijela

Impact of different cations on thermal properties of DPPS and DPPC lipid bilayers // 18th European Student Colloid Conference: Programme & Book of Abstracts.

Szeged: Hungarian Chemical Society, 2022. str. 92-92

8. Pašalić, Lea; Bakarić, Danijela

Impact of NH_4^+ and Gdm^+ cations on thermal properties of DPPS lipid membranes // 6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a: knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD student symposium: Book of Abstracts.

Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 148-149

9. Pašalić, Lea; Bakarić, Danijela

Thermotropic properties of unilamellar and multilamellar DPPS bilayers // V. simpozij supramolekulske kemije: knjiga sažetaka = Supramolecular Chemistry 2022: Book of Abstract.

Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2022. str. 32-32

10. Pašalić, Lea; Jakas, Andreja; Pem, Barbara; Bakarić, Danijela
Contribution of Proton Transfer to the Adsorption of Cationic Hydrophobic Peptides on
Zwitterionic Lipid Membranes // Book of Abstracts, Peptide Chemistry Day / Frkanec, Ruža;
Namjesnik, Danijel (ur.).

Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, 2023. str. 8-8

Članstva u društvima:

- Hrvatsko kemijsko društvo
- Hrvatsko biofizičko društvo