



BIOLÓGIAILAG AKTÍV HIDROXÁMSAVAK ÉS MODELLJEIK
KÖLCSÖNHATÁSA
KÉTÉRTÉKŰ FÉMIONOKKAL

doktori (PhD) értekezés tézisei

Enyedy Éva Anna

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2002.

BIOLÓGIAILAG AKTÍV HIDROXÁMSAVAK ÉS MODELLJEIK
KÖLCSÖNHATÁSA
KÉTÉRTÉKŰ FÉMIONOKKAL

doktori (PhD) értekezés tézisei

Enyedy Éva Anna

Témavezető: Dr. Farkas Etelka egyetemi tanár

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2002.

I. Bevezetés és célkitűzések

Jól ismert, hogy a vas létfontosságú elem szinte minden biológiai rendszerben. A mikroorganizmusok által termelt sziderofórok funkciója a vas megfelelő koncentrációban való felvétele és szállítása. A *hidroxámsav típusú sziderofórok*ban általában három kelátképző csoport van, és a vas(III) oktaéderes koordinációs szféráját teljesen telíteni tudják igen nagy stabilitású 1:1 fém-ligandum arányú komplexeket képezve. Számos faj esetében azt találták, hogy a trihidroxámsavval képzett komplexben kötött vas(III) redukciója igen fontos szerepet játszik a vas metabolizmusában, mert a redukcióval képződő jóval kisebb stabilitású és labilisabb vas(II)komplexből a vashoz a sejt már könnyebben hozzájuthat. Gyakorlatilag azonban eddig még nem vizsgálták a sziderofórok ill. modelljeik vas(II)ionnal való kölcsönhatását, pedig a fent említett redukció révén érdekesek lehetnek ezek az eredmények. Ezért *célul tűztük ki a vas(II)ion természetes sziderofórokkal, valamint modell hidroxámsavakkal való kölcsönhatásának tanulmányozását.* A vas(II) esetén kapott eredményeket célszerű összevetni egyrészt a megfelelő vas(III)komplexekre vonatkozó adatokkal, másrészt a meghatározott állandók reális voltának megítélése érdekében a többi $3d^{5-10} + 2$ töltésű fémion állandóival. Ha hiányoztak az irodalomból ezek az összehasonlító adatok, akkor azokat is meg kellett határoznunk.

A hidroxámsavaknak nem csupán a sziderofórok kapcsán van fontos biológiai vonatkozása. Jól ismert az antibiotikus, antitumor, és sejtnövekedésre, sejtosztódásra kifejtett hatásuk, valamint számos hidroxámsav és aminosav hidroxámsav származékai hatásos inhibitorai bizonyos metalloenzimeknek (mint pl. ureáz, kollagenáz, 5-lipogénáz). Ezen enzimek aktív centrumában különböző kétértékű átmenetifém-ion található, pl. nikkell(II), cink(II), kobalt(II), réz(II), mangán(II). Az inhibíciós hatás alapja sokszor a hidroxámsav és a fémion közvetlen kölcsönhatása. Ennek a kölcsönhatásnak a modellezéséhez és megértéséhez információt adhat a fémion(II)–hidroxámsav rendszerek szisztematikus oldategyensúlyi vizsgálata. Ezért tanulmányoztuk egyrészt azt, hogy a hidroxámsavcsoporthoz kapcsolódó funkciós csoportoknak milyen hatása van a hidroxamát-komplexek stabilitására, másrészt azt, hogy a fémion környezete hogyan befolyásolja ezt a kölcsönhatást. Munkánk során *különböző szubsztituenseket tartalmazó monohidroxámsavak, és aminosav hidroxámsavak kölcsönhatását tanulmányoztuk a fent említett kétértékű fémionokkal.* A hidroxámsavak biológiai hatásának a megértéséhez vegyes ligandumú rendszerek jobb

modellként szolgálhatnak. Mivel hidroxámsavak vegyes ligandumú komplexképzésére vonatkozólag csak elvétve található irodalmi adat, ezért *részletes vizsgálatokat végeztünk monohidroxámsavakat és különböző (B) ligandumokat, valamint nikkel(II), réz(II), vagy cink(II)ionokat tartalmazó rendszerek esetén.*

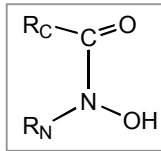
II. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Az egyensúlyi vizsgálatok során a ligandumok savi disszociációs állandóit, a képződő törzs ill. vegyes ligandumú komplexek összetételét és stabilitási állandóit a legtöbb esetben *pH-potenciometriás* módszerrel ($t = 25\text{ °C}$; $I = 0,2\text{ mol/dm}^3$ (KCl)) határoztuk meg. A titrálási görbék értékelését, a stabilitási állandók számítását a PSEQUAD számítógépes programmal végeztük. Számos vas(III)komplex képződése már a pH-metriásan vizsgálható pH-tartomány alatt befejeződik. A $\text{pH} = 0,7\text{-}2,0$ tartományban képződő komplexek összetételét és stabilitási szorzatát a vas(III)-hidroxamátokra jellemző töltésátviteli sávok alapján a különböző pH-kon felvett spektrumok segítségével számoltuk. Ezeket a számításokat is a PSEQUAD programmal végeztük. A komplexekben megvalósuló kötőmódok meghatározására UV-látható spektrofotometriás, ESR és kalorimetriás módszereket használtunk.

A vas(II)–hidroxámsav rendszerek oldategyensúlyi tanulmányozásához szükséges volt egy teljesen zárt rendszer megépítése, és a vas(II) trihidroxámsavakkal való kölcsönhatásának feltárása érdekében oxigénmentes körülmények közötti pH-potenciometriás, pH-stat és UV-látható spektrofotometriás méréseket végeztünk, valamint gázkromatográfiás, kapilláris elektroforézis módszereket alkalmaztunk.

A felhasznált ligandumok egy részét a Debreceni, a Dublini, illetve a Liszaboni Egyetemen szintetizálták, a többi ligandum pedig a Fluka, Sigma, Aldrich és a CIBA GEIGY cégektől származott. A vizsgált hidroxámsavak képlete a következő oldalon látható.

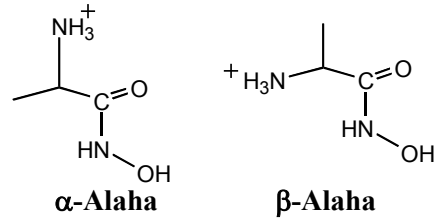
Monohidroxámsavak és analóg vegyületek:



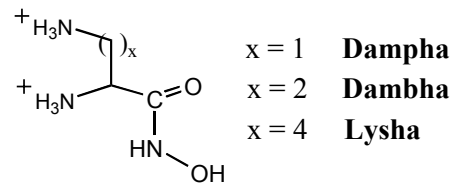
R_C :	R_N :	név:
-CH ₃	-H	Aha
-CH ₂ -CH ₃	-H	Pha
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	-H	Hha
	-H	Bha
-CH ₃	-CH ₃	MAha
-CH ₃		PhAha
		PYRha

Aminohidroxámsavak:

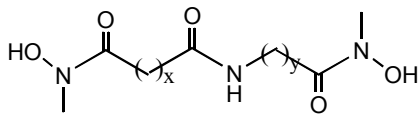
a. monoaminohidroxámsavak:



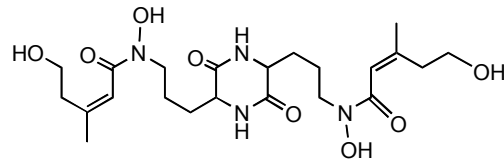
b. diaminohidroxámsavak:



Dihidroxámsavak:

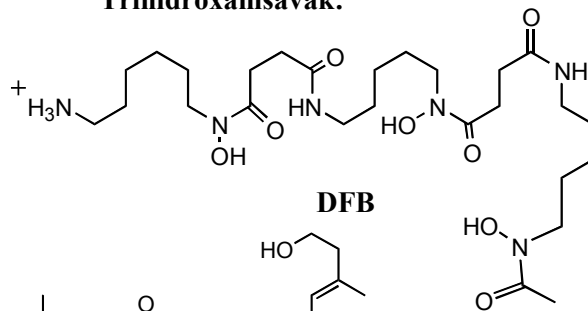


$x = 2, y = 5$ **2,5-DIHA**
 $x = 3, y = 4$ **3,4-DIHA**
 $x = 3, y = 3$ **3,3-DIHA**

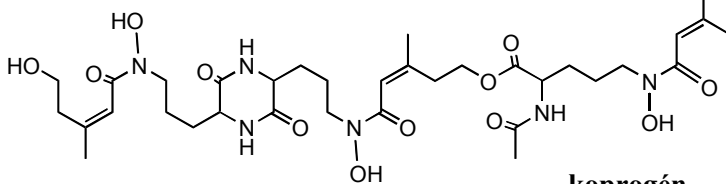


dimerumsav

Trihidroxámsavak:



DFB



koprogén

A vizsgált hidroxámsavak képlete

III. Új tudományos eredmények

Munkánk során 50 törzrendszer és 22 vegyes ligandumú rendszert tanulmányoztunk. A vizsgált ligandumok: mono-, di-, tri-, amino-, és diaminohidroxámsavak; vizsgált fémionok: elsősorban vas(II), továbbá mangán(II), kobalt(II), nikkel(II), réz(II), cink(II) ill. néhány esetben vas(III).

1. A ligandumok sav-bázis tulajdonságai

Elsőként határoztuk meg a természetes dimerumsav, koprogén és a szintetikus 2,5-DIHA, 3,4-DIHA, és 3,3-DIHA dihidroxámsavak protondiszociációs állandóit, melyek megfelelnek analóg vegyületekre vonatkozóknak, és egy adott di-, ill. trihidroxámsav esetén a lépcsőzetes pK értékek közötti különbségek azt mutatták, hogy kismértékű kölcsönhatás fellép a hidroxámsavcsoportok között, tekintve a donorcsoportokat összekötő lánc hosszát, ami valószínűleg nem a láncon keresztül valósul meg, hanem inkább szterikus kölcsönhatás.

2. Fémion – hidroxámsav kölcsönhatások

2.1. Monohidroxámsavak

Nikkel(II)–, réz(II)–, cink(II)–monohidroxámsav rendszerek vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a hidroxámsavcsoportokhoz kapcsolódó szubsztituensek komplexstabilitásra gyakorolt hatása a nagyobb stabilitású komplexeket képező vas(III)ion esetén tapasztalttól jóval kisebb, ugyanis a komplexek stabilitási állandói követik a ligandumok bázicitásának megfelelő sorrendet. Egyedüli kivétel a heterociklusos PYRha, mely a protonkomplexekhez képest stabilisabb fémkomplexeket képez, melynek legvalószínűbb oka az, hogy a π -elektronok révén kedvezőbb elektroneloszlás alakul ki a kelátban.

Megállapítottuk, hogy a réz(II)–Pha rendszerben pH = 11 felett a biszkomplexben koordinált hidroxamát deprotonálódásával nagyobb stabilitású hidroximáto-kelát jön létre, úgy ahogyan azt már az irodalomban ESR mérésekkel bizonyították más primer hidroxámsavak kapcsán.

2.2. Vegyes ligandumú komplexek képződése monohidroxámsavakkal

Nikkel(II), réz(II), és cink(II), monohidroxámsavak és két donoratomot tartalmazó B ligandumok vegyes ligandumú komplexeinek tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a fémionokhoz a különböző kémiai minőségű donoratombok koordinációja kedvező.

Hidroxámsavak vegyes ligandumú komplexképzése a nitrogén donoratomokat tartalmazó ligandumokkal pl. etilén-diamin(en), 2,2'-bipiridin(bipy) kedvezményezett, a glicinnel közel statisztikus mértékű, az oxigén donoratomokat tartalmazó Tironnal nem kedvező.

Spektrofotometriás és ESR mérésekkel kimutattuk, hogy en és bipy jelenlétében a réz(II) primer monohidroxamátokkal képzett vegyes ligandumú komplexekben is nagy pH-n kialakul a hidroximáto-kelát.

A háromfogú dietilén-triamin (dien), ill. 2,2':6',2''-terpiridin (terpy) B ligandumok a [CuB] összetételű komplexeikben a réz(II) három ekvatoriális kötőhelyét már elfoglalják. A réz(II)–dien/ill. terpy–monohidroxámsav rendszerekben a pH = 7,0-10,5 tartományban képződő [CuAB] összetételű vegyes ligandumú komplexekben a spektrofotometriás és ESR mérések szerint a réz(II) koordinációs száma 5. Vagyis a réz(II) egyik axiális kötőhelyén is koordinálódik egy donoratom, amit jól alátámaszt az, hogy a [CuAB] komplex képződésével párhuzamosan az abszorpciós maximum a nagyobb hullámhosszak irányába tolódik. A vegyes ligandumú komplexekből azonban pH = 9 felett a hidroxid fokozatosan kiszorítja a monohidroxamátot. Érdekes eredmény, hogy a réz(II)–Aha–terpy rendszerben pH = 11 felett a hidroxámsav visszakerül a koordinációs szférába, a terpy-t kiszorítva $[Cu(AhaH_1)_2]^{2-}$ összetételű bisz-hidroximáto komplex képződik. A szekunder hidroxámsavak (R-CO(R'')NOH) és a flexibilisebb dien esetén ez a folyamat nem játszódik le.

2.3. Aminohidroxámsavak

Eredményeinket értékelve arra a következtetésre jutottunk, hogy a mangán(II), vas(II) és kobalt(II) esetén nem, vagy csak alig játszik szerepet a koordinációban a hidroxámsavak oldalláncában lévő aminocsoportja. A vizsgált monoamino-, ill. diaminohidroxámsavak hidroxamát-oxigéneken keresztüli koordinálódása valószínűsíthető. Az aminocsoport elektronszívó hatása a kialakuló hidroxamát-kelátok stabilitásának csökkenésében nyilvánul meg.

Egyértelműen kimutattuk, hogy a nitrogén donoratomokat is kedvelő nikkell(II) ill. réz(II) esetén tényleges donorcsoportként viselkedik a diaminohidroxámsavak β - vagy γ - helyzetben lévő aminocsoportja. A nikkell(II) az aminohidroxámsavak körében meglepő módon a Dampha-val kizárólag oktaédes komplexeket képez, és a $[Ni(Dambha)_2]$ komplex szintén oktaédes geometriájú, ami a ligandumok háromfogúként való koordinációját mutatja. A réz(II)ionhoz is koordinálódhat a Dampha és Dambha háromfogúként úgy, hogy az egyik donoratom axiálisan koordinálódik, ill. kétfogúként oly módon, hogy oldalláncbeli amino–N

és az α -amino-N ekvatoriálisan kötődik, a hidroxamát pedig kiszorul a koordinációs szférából. Kimutattuk, hogy pl. a Dampha jobb komplexképzője szélesebb pH-tartományban ezeknek a fémionnak, mint a vas(III)ionnak.

2.4. Vas(II) és vas(III) mono-, és dihidroxámsavakkal való kölcsönhatásának összehasonlítása

Sikerült reprodukálhatóan anaerob körülmények mellett tanulmányoznunk vas(II)–hidroxámsav rendszereket. Meghatároztuk a vas(II)–Aha, $-\alpha$ -Alaha, $-\beta$ -Alaha, –Dampha, –Dambha, –dimerumsav, –2,5-DIHA, –3,4-DIHA, –3,3-DIHA rendszerekben képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóit. A stabilitási állandók jól beillenek a többi $3d^{5-10} +2$ töltésű fémionokkal képzett komplexek állandóinak sorába az *Irving-Williams* féle tendenciának megfelelően. A vas(II)–monohidroxámsav/ill. dihidroxámsav rendszerek esetén a komplexek stabilitási állandóinak logaritmusai hidroxamát-kelátonként kb. hattal kisebbek a vas(III)komplexeihez hasonlítva.

A munka során a dimerumsav, 2,5-DIHA, 3,4-DIHA és 3,3-DIHA dihidroxámsavak vas(III)ionnal való komplexképzését is tanulmányoztuk. A 2,5-DIHA-ban lévő összekötő lánc szerkezete a DFB-ben lévővel egyezik meg, a 3,4-DIHA-ban a peptidkötés helyzete más, a 3,3-DIHA összekötő láncában pedig egy metilén-csoporttal kevesebb van. A vas(II) és vas(III) kölcsönhatását ezen szintetikus dihidroxámsavakkal vizsgálva megállapítottuk, hogy a természetes DFB analógiájában, a 2,5-DIHA-ban helyezkednek el legideálisabban a kelátképző csoportok ahhoz, hogy a ligandum mindkét hidroxámsavcsoportja ugyanahhoz a vasionhoz koordinálódjon, ugyanis ezzel a ligandummal számottevően stabilisabb komplexek képződnek.

A természetes dimerumsav vasionokkal való komplexképzésének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a hidroxámsavcsoport mellett β -helyzetben lévő kettős kötés stabilizáló hatása csak a koordinációs szférában egy hidroxamátot tartalmazó komplexek esetén érvényesül, míg a bisz-, ill. triszhidroxamátó komplexekben ezt a hatást ellensúlyozza a diketo-piperazin-gyűrű szterikus hatása.

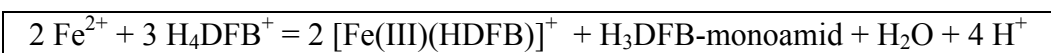
2.5. A koprogén kölcsönhatása néhány átmeneti fémionnal

A munka során megvizsgáltuk a koprogén komplexképzését vas(III), nikkel(II), réz(II) és cink(II)ionokkal, és a kapott eredményeket összevetettük a DFB-re vonatkozókkal is. Megállapítottuk, hogy ezen két természetes trihidroxámsav szerkezetében meglévő számos

eltérés ellenére, a komplexeikben megvalósuló kötéspódotokban és a komplexeik stabilitásában nincs számottevő különbség. Valószínűsítettük, hogy a koprogén β -keto kötéseinek a képződő kelátok stabilitását növelő hatását a diketo-piperazin-gyűrű szterikus hatása lecsökkenti, a dimerumsav esetén tapasztaltaknak megfelelően, és így összességében a koprogén komplexképző sajátsága a DFB-hoz hasonló.

2.6. Vas(II) kölcsönhatása trihidroxámsavakkal

Elsőként írtuk le, hogy anaerob körülmények között a DFB és koprogén oxidálja a vas(II)iont vas(III)ionná miközben a trihidroxámsav redukálódik. Gázkromatográfiás mérésekkel kizártuk a víz általi oxidáció lehetőségét. A DFB esetén megadtuk a pH ~ 6-n lejátszódó reakció egyenletét pH-stat és spektrofotometriás mérések segítségével.



A reakció sztöchiometriájának meghatározása mellett tanulmányoztuk a reakció sebességének pH-függését is. Ezen kinetikai mérések azt mutatták, hogy a redoxi reakció csak egy adott pH-tartományban megy végbe (pH ~ 5,5–8,5) és fiziológiás pH-n a leggyorsabb. Valószínűsítettük, hogy a reakcióban az egy koordinált hidroxamátot tartalmazó $[\text{Fe(II)H}_3\text{DFB}]^{2+}$ komplex az aktív részecske.

IV. Az eredmények várható hasznosítási lehetőségei

Vizsgálataink olyan, eddig gyakorlatilag még nem tanulmányozott hidroxámsav–fémion kölcsönhatások feltárására irányultak, melyeknek valamilyen biológiai vonatkozása van. Gyakorlatilag bármilyen alkalmazását is tekintjük a hidroxámsavaknak, az többnyire a fémkomplexeikkel van kapcsolatban. A fő célunk ugyan a képződő komplexek összetételének és stabilitásának a meghatározása, vagyis alapkutatójellegű, viszont vizsgálataink segíthetik bizonyos biológiai folyamatok megértését, vagy új szintetikus ligandumok tervezését. A hidroxámsavcsoporthoz kapcsolódó szubsztituensek, ill. a diaminohidroxámsavak oldalláncában lévő aminocsoport hatásának vizsgálati eredményi segíthetik az alkalmas metalloenzim inhibáló ligandum megtalálását.

Az irodalomból szinte teljesen hiányzó vas(II)–sziderofór kölcsönhatások tanulmányozása alapján feltételezzük, hogy a lejátszódó redoxi reakciónak fontos szerepe lehet a mikroorganizmusok anaerob körülmények közötti vasfelvételében.

V. Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények

1. E.Farkas, É.A.Enyedy, H.Csóka
A comparison between the chelating properties of some dihydroxamic acids, desferrioxamine B and acetohydroxamic acid
Polyhedron, 18 (1999) 2391
2. E.Farkas, É.A.Enyedy, H.Csóka
Some effects modifying metal – ion monohydroxamate interaction in aqueous solution
J. Inorg. Biochem., 79 (2000) 205
3. E.Farkas, É.A.Enyedy, G.Micera, E.Garibba
Coordination modes of hydroxamic acids in copper(II), nickel(II) and zinc(II) mixed-ligand complexes in aqueous solution
Polyhedron, 19 (2000) 1727
4. E.Farkas, É.A.Enyedy, L.Zékány, Gy. Deák
Interaction between iron(II) and hydroxamic acids: oxidation of iron(II) to iron(III) under anaerobic conditions by desferrioxamine B
J. Inorg. Biochem., 83 (2001) 107
5. E.Farkas, P.Buglyó, É.A.Enyedy, V.Gerlei, A.M.Santos
Factors affecting the metal ion - hydroxamate interaction: Effects of the position of the peptide function in the connecting chain on the Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids
Inorg. Chim. Acta, (2002) (nyomdában)
6. É. A.Enyedy, H.Csóka, I.Lázár, G.Micera, E.Garibba and E.Farkas
Effects of side chain amino nitrogen donor atoms on metal complexation of aminohydroxamic acids: New aminohydroxamates chelating more strongly Ni(II) than Fe(III)
J. Chem. Soc. Dalton Trans., (2002) (beküldve)

VI. Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások, poszterek

13. É. A. Enyedy, E. Farkas, I. Pócsi (poszter)

Complexation of a natural siderophore, coprogen produced by *Penicillium chrysogenum* fungus

10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2001.08.31-26., Firenze, Olaszország

12. E. Farkas, P. Buglyó, É. A. Enyedy, V. Gerlei and A.M.Santos (poszter)

Syntheses and metal ion binding strength of desferrioxamine B model dihydroxamic acids

10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2001.08.31-26., Firenze, Olaszország

11. É.A.Enyedy, E.Farkas (előadás)

A *Penicillium chrysogenum* gomba által szintetizált természetes sziderofór, a koprogén fémmegkötő sajátságának vizsgálata

XXXVI. Komplexkémiái Kollokvium, 2001.05.23-25, Pécs

10. É.A.Enyedy, E.Farkas (poszter)

Effects of side chain imidazole and amino nitrogen donor atoms on complexation of aminohydroxamic acids with 3d bivalent metal ions

COST D8 Final Meeting, 2001.03.29.-04.01., Dublin, Írország

9. É.A.Enyedy, E.Farkas (poszter)

Interaction between iron(II) and hydroxamic acids, oxidation of iron(II) by desferrioxamine B under anaerobic conditions

Hungarian COST Chemistry Day, 2000.10.22., Budapest

8. E.Farkas, É.A.Enyedy (előadás)

Ternary systems as models of metalloenzyme inhibition by hydroxamic acids in copper(II), nickel(II) and zinc(II) mixed-ligand complexes in aqueous solution

Hungarian COST Chemistry Day, 2000.10.22., Budapest

7. E.Farkas, É.A.Enyedy (poszter)

Iron(II) Complexation by Hydroxamic Acids

34th International Conference on Coordination Chemistry, 2000.07.9-14., Edinburgh, Skócia

6. E.Farkas, É.A.Enyedy (előadás)

A vas(II) kölcsönhatása hidroxámsavakkal

XXXV. Komplexkémiái Kollokvium, 2000.05.26-28, Kecskemét

5. É.A.Enyedy, E. Farkas (előadás)
A nikkell(II)-hidroxámsav kölcsönhatások oldategyensúlyi vizsgálata: az ureáz hidroxámsavak általi inhibíciójának modellezése
MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottsági ülése, 1999.04.26., Debrecen
4. É.A.Enyedy, E. Farkas (előadás)
A hidroxamát-kelát képződésének lehetőségei egyéb ligandumok jelenlétében
XXI. Kémiai Előadói napok, 1998.10.26-28., Szeged
3. E. Farkas, É.A.Enyedy (poszter)
Equilibrium Studies on Metal Complexes of Hydroxamates
33rd Equilibrium Studies on Coordination Chemistry, 1998.08.30.-09.04., Firenze, Olaszország
2. É.A.Enyedy, E. Farkas (előadás)
Vegyes ligandumú komplexek képződése átmenetifém-monohidroxámsav-B ligandum rendszerekben
XXXIII. Komplexkémiai Kollokvium, 1998.05.4-6., Paks
1. É. A. Enyedy, E.Farkas (előadás)
Kalcium(II)- és magnézium(II)ionok kölcsönhatásának vizsgálata hidroxámsavakkal
XXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémiai és Vegyipari Szekció, 1997.04.2-4., Pécs