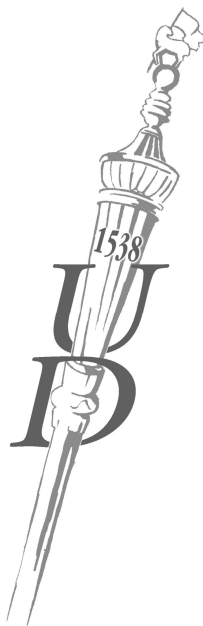


Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**HIDROXÁMSAV ALAPÚ SZIDEROFÓROK ÉS
MODELLJEIK MANGÁN- ÉS
KOBALTKOMPLEXEI**

Szabó Orsolya

Témavezető: Prof. Dr. Farkas Etelka



DEBRECENI EGYETEM
Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2013.

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A hidroxámsavak évtizedek óta a figyelem előterében vannak. Egyik jelentős biológiai hatásuk az enziminhibícióhoz köthető, mely főként a monohidroxámsavakkal van kapcsolatban. Az inhibíciós mechanizmus teljesebb megértése, új inhibitorok tervezése érdekében számos 3d átmenetifém-ion monohidroxámsavakkal való kölcsönhatását tanulmányozták. Azonban csak elvétve található olyan irodalom, amiben a Mn(II)- vagy a Co(II)-monohidroxámsav rendszereket vizsgálták.

Az enziminhibíció egyik fontos lépése az inhibitor célhelyre való juttatása, amely kapcsán az utóbbi évektől kap figyelmet a kobalt(III/II)-monohidroxámsav kölcsönhatás. Az irodalom szerint Co(III)-tartalmú „prodrug”-okat fejlesztenek ki, melyekkel célzottan a rákos sejtekhez juttatják az inhibítort. A kobalt tekintetében ezen aspektus keltette fel érdeklődésünket, míg a Mn(II)komplexek vonatkozásában az esetleges kontrasztanyagként való alkalmazhatóságának lehetősége volt érdekes számunkra a trihidroxámsav alapú természetes sziderofórok tekintetében.

A rendelkezésünkre álló kevés irodalom, valamint az előzőekben említett néhány érdekes aspektus miatt célunk volt egyrészt mindkét fémion +2-es oxidációs formáik mono-, di- és trihidroxámsav származékokkal való oldatbeli kölcsönhatásának feltérképezése, ami jelenti a Mn(II)- és a Co(II)-rendszerekben az egyensúlyi modell felállítását, a termodinamikai stabilitás, valamint a redox stabilitás feltérképezését. Vizsgálatainkba mindösszesen 18 ligandumot vontunk be, melyek közül 1 esetben, a γ -amino-vajsav hidroxámsav származékának (GABA-ha) esetében, a szintézis is ezen munka során történt. Ezen 18 ligandum között szerepelnek az enziminhibíció szempontjából potenciális jelentőségű egyszerű monohidroxámsavak, valamint aminosavak. Utóbbiak R_C szubsztituenseiben további

koordinálódni képes donorcsoportot vagy kelátképzőt tartalmaznak, amely ligandumcsoportnál célunk annak felderítése mindkét fémion tekintetében, hogy a hidroxamát koordinációban játszott szerepét hogyan befolyásolja a tőle különböző kötéstávolságban lévő, illetőleg különféle típusú R_c szubsztituensbeli donortom vagy kelátképző csoport. Tanulmányoztuk továbbá jelen munka során az irodalomban nagyon kevésbé, illetve egyáltalán nem vizsgált 4 trihidroxámsav alapú természetes sziderofór, valamint DFB modell dihidroxámsavak $Mn(II)$ - és $Co(II)$ komplexeit is.

A fémion-ligandum kölcsönhatás feltérképezése érdekében, szigorúan anaerob körülmények között, főként pH-potenciometriás méréseket végeztünk, melyek mellett egyéb szerkezetvizsgáló módszereket is alkalmaztunk (UV-Vis spektrofotometria, ESI-MS). A $Mn(II)$ sziderofórokkal és két kiválasztott dihidroxámsavval alkotott rendszere esetében relaxometriás vizsgálatok is történtek.

Tekintettel a $Mn(II)$ és a $Co(II)$ redox aktív voltára, vizsgálatainkat kiterjesztettük a levegő jelenlétében történő mérésekre is. A $Co(II)$ -t tartalmazó rendszerek esetén hidrogén-peroxid szerepelt oxidálószerként. Az oxidáció nyomon követése spektrofotometriás módszerrel történt, és a sziderofórokkal, ahol egyértelmű volt a $Mn(III)$ - illetve a $Co(III)$ komplexek képződése, célunk volt a +3-as oxidációs állapotú fémiont tartalmazó komplexek stabilitási állandójának meghatározása. Ezen esetekben az UV-Vis spektrofotometriás mérések mellett ciklikus voltametriás méréseket is végeztünk.

2. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A +2-es oxidációs állapotú rendszerek vizsgálata során mindkét fémionnal az inert atmoszférát argon gáz buborékoltatásával biztosítottuk a pH-metriás, és a Co(II) esetében a spektrofotometriás mérések teljes ideje alatt is. A pH-potenciometriás méréseknél a Co(II)-aminohidroxámsav rendszerek esetében az argon gáz oxigénmentesítésére is szükség volt (ún. Cr(III)/Cr(II)-es mosó segítségével), mivel ezen rendszereknél már akár nyomnyi mennyiségű oxigén jelenléte is elegendő az oxidációhoz. A mintaelőkészítésnél a pH-metriás és a spektrofotometriás mérések során nem volt szükség az inert atmoszféra biztosítására, mivel a mérések minden esetben savas tartományból indultak. A Mn(II)komplexek relaxivitásának meghatározásánál azonban a mintaelőkészítésnél is inert atmoszférát kellett biztosítanunk, mivel a mérések lúgos pH-tartományban készültek.

pH-potenciometria: Vizsgálataink alapjául minden általunk tanulmányozott rendszernél ez a mérési módszer szolgált, mely eredményekből a ligandumok savi disszociációs állandóit, valamint a rendszerben képződő fémkomplexek összetételét és stabilitási állandóit határoztuk meg ($T = 298 \text{ K}$, $I = 0,20 \text{ M KCl}$). A ligandum koncentrációja a mintákban $0,0008 - 0,005 \text{ mol/dm}^3$ között, míg a fémion-ligandum aránya 1:1 és 1:5 között változott. A mérési eredmények kiértékeléséhez a PSEQUAD és a SUPERQUAD számítógépes programokat használtuk.

UV-látható spektrofotometria: A $3d^5$ Mn(II)-iont tartalmazó komplexek spektruma a nagyon kicsiny moláris abszorbancia értékek miatt nem igazán informatív, viszont a Co(II)-iont tartalmazó rendszereknél kapott spektrumok elemzésével a képződő komplexek geometriájára, a komplexben lévő koordinációs módokra, a koordinálódó hidroxamátcsoportok számára

következtettünk. Mindkét fémion esetében végeztünk spektrális vizsgálatokat az oxidáció nyomon követésére.

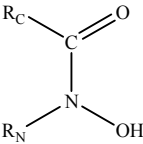
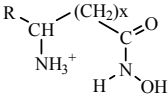
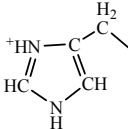
Ciklikus voltammetria (CV): Mindkét fém - sziderofór komplexeinek formálpotenciál értékeit, illetve a +3 oxidációs állapotú fémiont tartalmazó komplexek stabilitási állandóit határoztuk meg ezzel a módszerrel. Mérésekhez klasszikus háromelektrodos rendszert alkalmaztunk (kobalt estében szén-, míg a mangánnál platina munkaelektrodát használtunk, a referencia elektród mindig Ag/AgCl volt). A regisztrált voltammogramokat a CACYVO programmal értékeltük ki.

Relaxometria: Relaxometriás méréseket Mn(II)komplexekkel végeztünk (a 4 sziderofórral és 2 kiválasztott dihidroxámsavval). Relaxációs időt mértünk, melyből relaxivitás értékeket számoltunk.

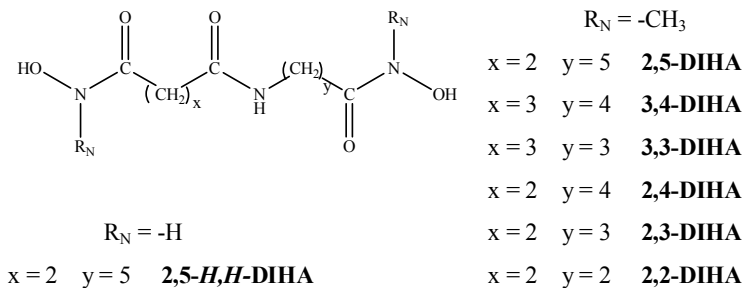
Elektro-spray ionizációs tömegspektrometria (ESI-TOF-MS): Mindkét fémion esetében néhány kiválasztott ligandummal alkotott komplexére végeztünk ESI-MS méréseket, a képződő komplexekben lévő sztöchiometriának, illetve a fémion oxidációs állapotának alátámasztására.

A vizsgált vegyületek közül az Aha-t, a Bha-t, a Glu- γ -ha-t és Asp- β -ha-t különböző cégektől szereztük be, a dihidroxámsavak, a MeAha és a Hiszha Tanszékünkön korábbi munkák során kerültek előállításra. A sziderofórok közül a DFB-t mezilát formában a CIBA-GEIGY gyógyszergyártótól vásároltuk, míg a DFC-t, a DFR-t és a TAF-ot a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék bocsájtotta rendelkezésünkre. Jelen munka keretein belül egy ligandum, a γ -amino-vajsav hidroxámsav származékának (GABA-ha) előállítására került sor.

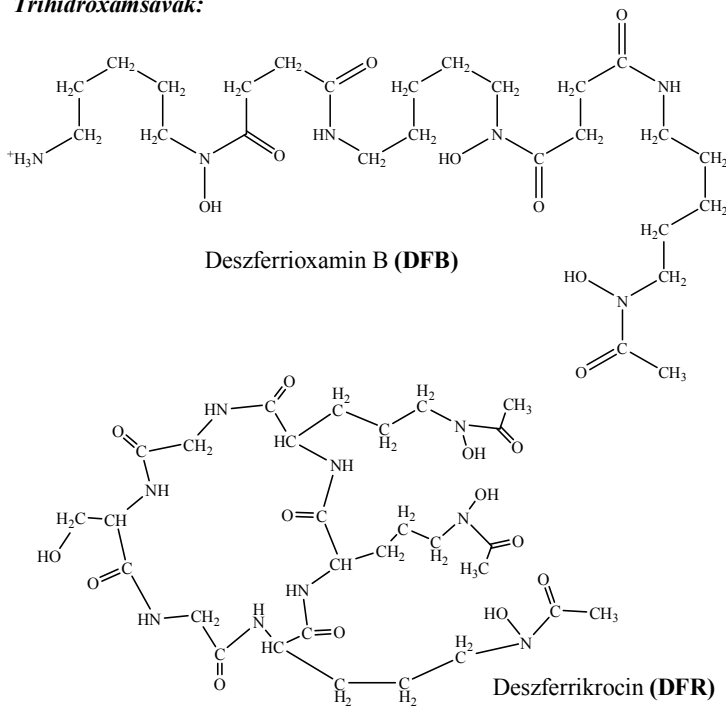
A tanulmányozott ligandumok nevei és szerkezeti képletei csoportosítva alább láthatók.

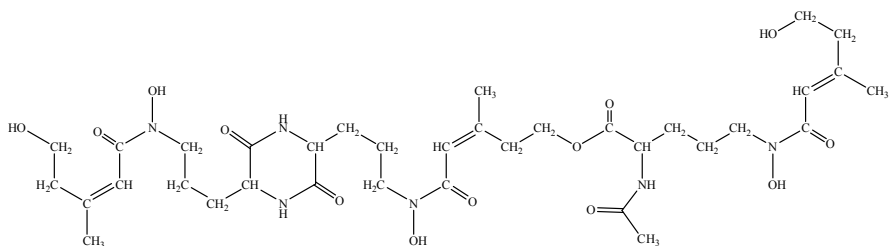
Monohidroxámsavak				
	R _C	R _N	Név	Rövidítés
	- CH ₃	- H	Aceto-hidroxámsav	Aha
	- CH ₃	- CH ₃	N-Me-Aceto-hidroxámsav	MeAha
	- C ₆ H ₅	- H	Benzo-hidroxámsav	Bha
	- CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺	- H	γ-amino-butánsav-hidroxámsav	GABA-ha
	R	x	Név	Rövidítés
	- COOH	1	Aszparaginsav-β-hidroxámsav	Asp-β-ha
	- COOH	2	Glutaminsav-γ-hidroxámsav	Glu-γ-ha
		0	Hisztidin-hidroxámsav	Hiszha

Dihidroxámsavak:

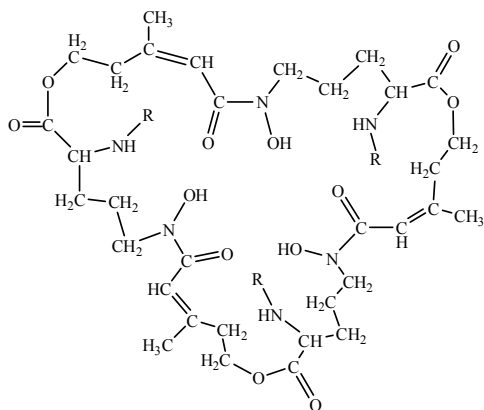


Trihidroxámsavak:





Deszferrikoprogén (DFC)



N',N'',N'''-
triacetilfuzarinin C
(TAF)

R = acetyl

3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Jelen doktori munka során oldategyensúlyi vizsgálatokat végeztünk 18 hidroxámsavszármazék Mn(II)- és Co(II)-ionokkal alkotott rendszereire. A +2-es oxidációs állapot vizsgálatához mindkét fémionnál inert atmoszférát biztosítottunk. Vizsgálataink első lépéseként valamennyi esetben a ligandumok protonálódási állandóit határoztuk meg, majd a fémiont is tartalmazó rendszerekben a képződő komplexek stabilitási állandóit. A komplexekben megvalósuló szerkezetek, kötőmódok felderítésére további mérési módszereket is alkalmaztunk (UV-Vis spektrofotometria, ESI-MS). A Mn(II)-sziderofór rendszerekre relaxometriás vizsgálatokat is végeztünk.

Néhány kiválasztott rendszer aerob körülmények közötti pH-függő redox aktivitását spektrofotometriásan követtük nyomon. Valamennyi rendszernél azt tapasztaltuk, hogy lúgos körülmények között levegő oxigénje általi oxidáció következik be, azonban az M(III)komplexek kizárólagos jelenlétét csak a sziderofóroknál találtuk. Ez utóbbi esetben az M(III)komplexek stabilitási állandóit ciklikus voltametriás mérésekkel határoztuk meg.

3.1. A Mn(II)- és a Co(II)-monohidroxámsav rendszerek

Ezen ligandumok között szerepelnek egyszerű monohidroxámsavak (Aha, MeAha és Bha), valamint olyan aminosavak származékai, melyek a kapcsolódó oldalláncban további koordinálódni képes donorcsoportot (GABA-ha) vagy kelátképző csoportot tartalmaznak a hidroxamátcsoporthoz képest különböző helyzetben (Asp-β-ha, Glu-γ-ha, Hiszha).

Ezen ligandumok Mn(II)- és Co(II)-vel alkotott rendszereivel végzett vizsgálatok eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a monohidroxámsavak mindkét fémionnal közepes stabilitású komplexeket képeznek, melyek egymáshoz viszonyított stabilitása megfelel az Irving-Williams trendnek, mely szerint a Co(II)komplexek valamelyest stabilabbak. Továbbá kimutattuk a Co(II)-egyszerű monohidroxámsav rendszerekben a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexek képződését, szemben a Mn(II)-ionnal alkotott rendszerekkel, ahol a hidrolízis ezt minden vizsgált aránynál megakadályozta. Az aminoszavak rendszerek esetében az mondható, hogy a γ -helyzetben lévő aminoszav nem befolyásolja a hidroxamátoszóport koordinációját egyik általunk vizsgált fémionnal sem. Továbbá feltételezzük, hogy az Asp- β -ha, a Glu- γ -ha és a Hiszha ligandumokkal képződő Mn(II)- és Co(II)komplexekben a koordináció nem tisztán hidroxamátoszóport.

3.2. A Mn(II)- és Co(II)-több hidroxamátoszóportot tartalmazó rendszerek

Vizsgált ligandumaink között szerepel 4 trihidroxámsav alapú természetes siderofór (DFB, DFR, DFC, TAF) és néhány DFB modell dihidroxámsav is (2,5-DIHA, 2,5-*H,H*-DIHA, 2,4- 2,3- 2,2- 3,4- 3,3-DIHA).

A Mn(II)- és a Co(II)-trihidroxámsavakkal alkotott komplexeiről megállapítottuk, hogy ezekben a rendszerekben 1:1 arányú, különböző protonáltságú komplexek képződnek. Mindkét fémion tekintetében a DFC és a TAF nagyobb stabilitású komplexeket képez, mint a DFB vagy a DFR. Ez a stabilitásbeli növekedés a hidroxamátoszóport és a β -helyzetben lévő kettőskötés között kialakuló konjugációval magyarázható. Igazoltuk, hogy mindkét fémion komplexeiben oktaéderez koordináció valósul meg.

Megállapítottuk, hogy a Co(II)-DFR rendszerben a harmadik hidroxamát koordinálódása nem következik be, annak ellenére, hogy a spektrofotometriás mérések alapján a képződő komplexben oktaéderes geometriát feltételeztünk. Hasonló megállapítást tettünk a dihidroxámsavak (L) esetében is, mely szerint a $[\text{Co}_2\text{L}_3]^{2-}$ típusú komplex, amely mindkét fémion vonatkozásában három koordinált hidroxamátot tartalmaz, képződése nem kedvezményezett. Valószínűleg szterikus okai lehetnek, hogy az említett rendszerekben nem képződik a három koordinált hidroxamátcsoportot tartalmazó komplex.

A Mn(II)-sziderofórok triszkelátos komplexeiben a relaxitás a várakozásnak megfelelően a $\text{Mn(II)}_{\text{aq}}$ -hoz képest lecsökken, azonban meglepő módon a biszkelátos komplexekhez (ahol tehát van még egy, a fémionhoz nem koordinálódó, protonált formában lévő hidroxámsavcsoport) tartozó relaxitás kiugróan nagy érték. Ezt a relaxitás növekedést víz közvetítésével lejátszódó intramolekuláris dinamikus protoncserével magyarázzuk, ami a koordinált és a még nem koordinált hidroxamátok között történik. Ezt a feltételezést a dihidroxámsavakkal kapott eredmények is alátámasztják, mivel ezen ligandumok két koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexeire meghatározott relaxitás értékek nem kiugróak, hanem értelmezhetők a koordinációs szférában még bennlévő vízmolekulák száma alapján.

3.3. A Mn(II)- és Co(II)komplexek redox stabilitása

A Mn(II)-t tartalmazó rendszereknél megállapítottuk, hogy pH 7,5 fölött minden vizsgált ligandumnál bekövetkezett a levegő oxigénje általi oxidáció, azonban a folyamat mértéke függ a pH-tól és a koordinálódó hidroxamátok számától. A Mn(III)komplex képződése teljes

(sztöchiometrikus) reakcióban csak a sziderofórokkal, $\text{pH} \sim 9$ fölött következett be. Ezen esetekben, a Mn(III) komplexekkel ciklikus voltammetriás mérések is készültek. Megállapítást nyert, hogy a DFC-vel, a TAF-fal a redoxi folyamat kvázi reverzibilis, míg a DFB-vel a katód, illetve anód csúcsáram aránya függ a mintabeli fémion-ligandum aránytól. (A DFR esetén a rendelkezésre álló igen csekély mennyiségű sziderofór miatt arányfüggést végezni nem tudtunk.) Minden esetben megtörtént a formálpotenciál meghatározása, melyek figyelembe vételével a Mn(III) -sziderofór komplexekre stabilitási állandókat is számoltunk. Megállapítottuk, hogy az értékek nagyságrendileg a megfelelő Fe(III) komplex állandóival összevethetőek. Mivel a DFB és a DFC esetében már sok fémionnal meghatározták a képződő komplexek stabilitási állandóját, valamint figyelembe véve a fémionok első hidrolízis állandója és egy adott ligandummal képezett komplexük stabilitási állandója közötti lineáris összefüggést, a $[\text{Mn(III)DFB}]$ és a $[\text{Mn(III)DFC}]$ komplexekre számolt állandókat a korrelációs egyenesre illesztve, a Mn(III) első hidrolízis állandójára (melyre az irodalomban alig van adat) is becslést tettünk.

A Co(II) -iont tartalmazó rendszerek oxidációja csak nagy pH -értékeken ($\text{pH} \sim 9$ fölött), hidrogén-peroxidnak a mintához történő adagolásával teljes mértékben csupán a sziderofórokkal ment. A kapott Co(III) -tartalmú minták ciklikus voltammetriás mérései azt mutatták, hogy a komplexbeli központi fémion redukciója irreverzibilis, így a voltammogramok alapján csak a katódos csúcspotenciál volt meghatározható. Ebből kifolyólag a Co(III) -sziderofór komplexeknél csupán a stabilitási állandók közelítő felső határértéke volt számolható. Ezen értékek alapján megállapítottunk, hogy a Co(III) -sziderofór komplexek rendkívül stabilak, állandójuk felső

határértéke több nagyságrenddel nagyobb a Fe(III)-mal alkotott megfelelő komplexek állandóinál.

4. AZ EREDMÉNYEK VÁRHATÓ HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

Vizsgálataink alap kutatás jellegűek. A munka során a Mn(II)- és a Co(II)-hidroxamát rendszerekben képződő komplexek stabilitási viszonyait és lehetséges szerkezetüket derítettük fel. Azon monohidroxámsavak tekintetében, ahol az oldalláncban lévő donorcsoporttal vagy donorcsoportokkal további nem-kovalens kölcsönhatás kialakítására nyílik lehetőség, a kapott eredmények értékes információt szolgáltathatnak pl. új inhibitor molekulák tervezéséhez.

A Mn(II)-hidroxamát komplexeknél a meghatározott relaxivitás értékek információt nyújthatnak pl. új Mn(II)-tartalmú MRI kontrasztanyagok tervezésénél.

További érdekes eredmény, hogy az M(II)-sziderofórok M(III)komplexeiké sztöchiometrikus reakcióban oxidálódnak. Ezen utóbbi komplexek stabilitása közel esik vagy meghaladja a megfelelő Fe(III)komplexek stabilitását. Ez az eredmény egyértelműen mutatja, hogy a Mn(III), de különösen a Co(III) jelenléte a mikroorganizmusok vas-felvételét számottevően megzavarhatja, aminek érdekes aspektusai lehetnek pl. gyógyszerek fejlesztése szempontjából.

Propositions of PhD theses

**MANGANESE AND COBALT COMPLEXES OF
HYDROXAMIC ACID BASED SIDEROPHORES
AND THEIR MODELS**

Orsolya Szabó

Supervisor: Prof. Dr. Etelka Farkas



UNIVERSITY OF DEBRECEN
PhD Program in Chemistry
Debrecen, 2013.

1. INTRODUCTION AND AIM OF THE WORK

Hydroxamic acids have been in the focus of interest for ages. One of the most important biological effects is connected to the enzyme inhibition, which is mostly in connection with monohydroxamic acids. The interaction of monohydroxamic acids with numerous 3d transition metal ions have been investigated to get a deeper understanding of the mechanism of the inhibition or to plan new inhibitor molecules. However, very few results can be found in literature which deal with the Mn(II)- or Co(II)-monohydroxamate systems.

One of the most important steps of the enzyme inhibition mechanism is the transfer of the inhibitor molecule to the target cell. This is the reason why the attention have turned to the interaction of cobalt(III)/(II) and monohydroxamic acid in the past few years. According to the literature Co(III) containing prodrugs are developed that carry the inhibitor directly to the cancer cells. In the case of cobalt this aspect aroused our interest. What was so interesting for us regarding trihydroxamate based siderophores is that the Mn(II) complexes can be potential candidates for application as contrast agents in medical magnetic resonance imaging.

Since there are very few data in literature on the Mn(II)- and Co(II)-hydroxamate complexes and on some of the above mentioned aspects, our aim was to investigate the interaction of numerous mono-, di-, and trihydroxamate derivatives with Mn(II) and Co(II) ions. This means the determination of the equilibrium models, the investigation of the thermodynamic and redox stability in the Mn(II) and Co(II) containing systems. In this work 18 ligands were investigated. Among them one was synthesized during this work (GABA-ha: γ -Aminobutyric acid-hydroxamic acid). These 18 investigated ligands belong to monohydroxamic- and

aminohydroxamic acids, which have potential importance in the enzyme inhibition. Aminohydroxamic acids have additional donor- or chelate forming groups in the R_C substituents. With these ligands our aim was to investigate the effect of the different donor- or chelate forming group (in different position from the hydroxamate group) during the coordination. The Mn(II) and the Co(II) complexes of four trihydroxamic acid based siderophores, which are hardly or not studied at all in the literature, and DFB model dihydroxamic acids were also investigated.

To get information about the metal ion - ligand interaction, strictly under anaerob circumstances, mainly pH-potentiometric and additional spectroscopic methods were carried out (UV-Vis spectrophotometry, ESI-MS). Furthermore in the case of Mn(II)-siderophore and -dihydroxamic acid systems relaxometric measurements were also performed.

Because both metal ions (Mn(II) and Co(II)) are redox active, measurements were carried out under aerobic conditions too. At the Co(II) containing systems the hydrogen peroxid was used as oxidizing agent. To follow the oxidation process spectrophotometric method was applied. With the siderophores, where the formation of the Mn(III) or Co(III) complexes were unambiguous, our aim was to determine the stability constants of the complexes containing metal ion in the +3 oxidation form by using cyclic voltammetry.

2. EXPERIMENTAL METHODS

Systems containing the metal ions in +2 oxidation form argon gas was bubbled through the sample to ensure the inert atmosphere during the pH-potentiometric and the spectrophotometric measurements at the Co(II)-hydroxamic acid systems too. It was necessary to purify the argon gas from the oxygen traces at the potentiometric method in the case of Co(II)-aminohydroxamic acid systems, because in these systems trace amount of oxygen is enough to the oxidation. During the preparation of the pH-potentiometric and spectrophotometric samples the inert atmosphere was not necessary to ensure, because the measurements were started in acidic circumstances. However, at the determination of the relaxivity of the Mn(II) complexes inert atmosphere was ensured also during the preparation of the samples, because the measurements were carried out under basic conditions.

pH-potentiometry: The ligand concentration varied in the range of 0,0008 - 0,005 mol/dm³, and the metal to ligand ratio ranged from 1:1 to 1:5 in the samples. From the experimental results the dissociation constants of the ligands as well as the stoichiometry and the stability constants of the formed complexes were determined ($T = 298\text{ K}$, $I = 0.20\text{ M KCl}$). Calculations were performed with the PSEQUAD and the SUPERQUAD computer programs.

UV-Vis spectrophotometry: The spectra of the 3d⁵ Mn(II) ion containing complexes actually have no information because of the very small molar absorption coefficient. In the case of the Co(II) containing spectra, we get information about the geometry, the coordination modes and the number of the coordinated hydroxamate groups of the formed complexes. Spectrophotometry was used to follow the oxidation process in the case of both ions.

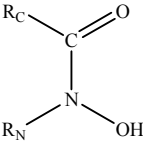
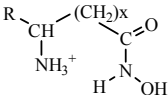
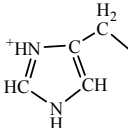
Cyclic voltammetry (CV): The formal potentials and the stability constants of the +3 oxidation state metal ion containing siderophore complexes (Mn(III) and Co(III)) were determined by this method. Classical three electrodes system was used for the measurements (in the case of cobalt carbon- at manganese platina working electrode was used, and the reference electrode was always Ag/AgCl). The registered voltammograms were evaluated with the help of CACYVO computer program.

Relaxometry: Relaxometric measurements were carried out on Mn(II) complexes, the ligands were four siderophores and two of the dihydroxamic acids. Relaxivity values were calculated from the measured relaxation times.

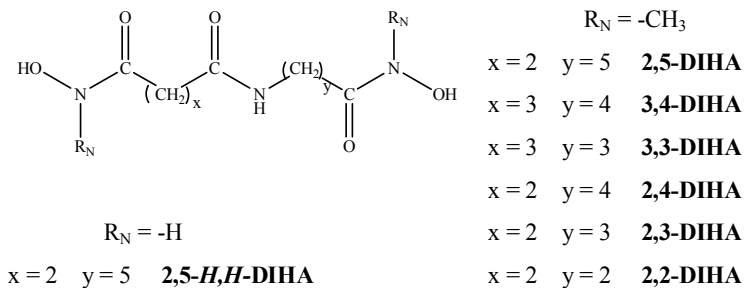
Elektro-spray ionization mass spectroscopy (ESI-TOF-MS): Selected systems were studied by this method to prove the stoichiometry and the oxidation state of the metal ion in the complexes formed.

Aha, Bha, Glu- γ -ha and Asp- β -ha are commercially available, therefore these ligands were bought. The dihydroxamic acids, MeAha and Hisha were synthesized at our Department during earlier works. Among the siderophores the DFB, in mesilate form, was produced by CIBA GEIGY, DFC, DFR and TAF were isolated by the Microbial Biotechnology and Cellbiology Department. In this work one ligand, γ -Aminobutyric acid-hydroxamic acid (GABA-ha) was synthesized.

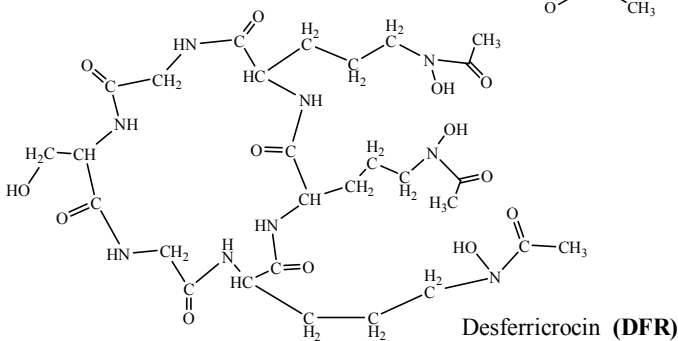
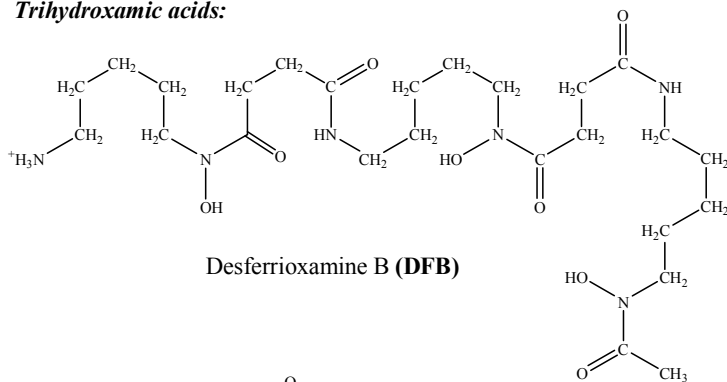
The names and the structures of the studied ligands are listed below.

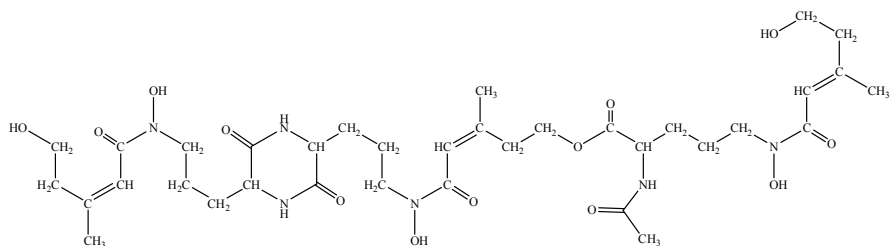
Monohydroxamic acids				
	R _C	R _N	Name	Abbr.
	- CH ₃	- H	Aceto-hydroxamic acid	Aha
	- CH ₃	- CH ₃	N-Me-Aceto-hydroxamic acid	MeAha
	- C ₆ H ₅	- H	Benzo-hydroxamic acid	Bha
	- CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺	- H	γ-Aminobutyric acid-hydroxamic acid	GABA-ha
	R	x	Name	Abbr.
	- COOH	1	Aspartic acid-β-hydroxamic acid	Asp-β-ha
	- COOH	2	Glutamic acid-γ-hydroxamic acid	Glu-γ-ha
		0	Histidine-hydroxamic acid	Hisha

Dihydroxamic acids:

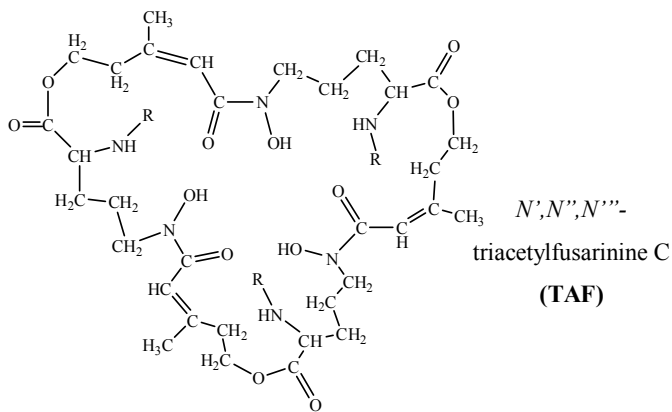


Trihydroxamic acids:





Desferricoprogen (DFC)



R = acetyl

3. NEW SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS

Solution equilibrium study on complexes formed between 18 hydroxamic acid derivatives and Mn(II) or Co(II) ions have been done in this PhD work. To maintain the +2 oxidation state of the metal ions inert atmosphere was used during the experimental work. At first the protonation constants of the ligands were determined what was followed by the determination of the stability constants of the complexes formed by pH-metry in the metal ion containing systems. To get information about the structures, bonding modes of the complexes, measurements by UV-Vis spectrophotometry, ESI-MS were performed. On the investigated Mn(II)-siderophore systems, relaxometric measurements were also done.

On selected systems, under aerobic condition, redox activity as a function of pH was also studied by UV-Vis spectrophotometry. Oxygen sensitivity of all systems under basic condition was found, but predominant formation of M(III) complexes was supported only in the siderophore containing systems. In these latter cases determination of the stability of M(III) complexes by cyclic voltammetry was also performed.

3.1. The Mn(II)- and Co(II)-monohydroxamic acid systems

Among investigated ligands there are simple monohydroxamic acids (Aha, MeAha and Bha) and also some aminohydroxamic acid derivatives. The latter contain additional donor (GABA-ha) or chelate forming group (Asp- β -ha, Glu- γ -ha, Hisha) in the connecting side chain at different position from the hydroxamate.

The results show moderate stability of the Mn(II) and the Co(II) complexes with monohydroxamic acids. The stabilities follow the Irving-

Williams trend, what means that the Co(II) complexes are somewhat more stable than the Mn(II) ones. Furthermore, the formation of tris-chelated complexes was found only in the Co(II)-simple monohydroxamic acid systems, but not in the Mn(II) containing systems, where this is hindered by the hydrolysis of the metal ion. In the case of Mn(II)- and Co(II)-aminohydroxamic acid systems, the amino group in the γ -position has no effect on the coordination of the hydroxamate group. However, the coordination is not clearly hydroxamate type in the complexes formed in the Mn(II)-Asp- β -ha, Mn(II)-Glu- γ -ha, Mn(II)-Hisha, Co(II)-Asp- β -ha, Co(II)-Glu- γ -ha and Co(II)-Hisha systems.

3.2. The Mn(II)- and Co(II)- di,- and trihydroxamic acid systems

Four trihydroxamate based natural siderophores (DFB, DFR, DFC, TAF) and some DFB model dihydroxamic acids (2,5-DIHA, 2,5-*H,H*-DIHA, 2,4- 2,3- 2,2- 3,4- 3,3-DIHA) belong to this group of the ligands.

Different protonated and non-protonated complexes can be formed with 1:1 ratio in the Mn(II)- and the Co(II)-trihydroxamic acids systems. With both metal ions the DFC and the TAF form more stable complexes compared to the DFB or the DFR. This stability increase can be explained by the conjugation of the hydroxamate group and the double bond in β -position to the hydroxamate function. The octahedral geometry in the formed complexes with both metal ions was confirmed.

Surprisingly, formation of tris-chelated complex was not found in the Co(II)-DFR system, but the registered UV-Vis spectra suggest octahedral geometry of the complex. Also with dihydroxamates (L), the formation of $[\text{Co}_2\text{L}_3]^{2-}$, in which three coordinated hydroxamates per metal ion would be

assumed, was not found. Sterical hindrance might be responsible for these unexpected results.

The relaxivity values calculated for the tris-chelated complexes are close to the expected values, but this is not the case for the bis-chelated complexes, in which one of the three functions is still in its protonated, non-coordinated form. In these latter cases, the values are surprisingly high, what can be explained by the water mediated intramolecular prototropic exchange between the coordinated hydroxamate and protonated, non-coordinated hydroxamic functions. This assumption was supported by the results of the bis-chelated complexes with dihydroxamic acids, because the relaxivity values obtained for these bis-chelated complexes can be explained by the number of the inner-sphere water molecules.

3.3. Redox stability of the Mn(II) and Co(II) complexes

At the Mn(II)-systems we determined that above pH 7.5, no matter what the ligand was, some oxidation occurred by the air oxygen, but the rate and the extent of that reaction depend on both the pH and the number of the coordinated hydroxamates. The formation of the Mn(III) complexes was complete (stoichiometric) only with siderophores, above pH ~ 9. In these cases cyclic voltammetric measurements were also done. Quasi-reversibility of the redox processes was found if the ligand was DFC or TAF. However, in the case of Mn(III)-DFB the ratio of the peak (cathodic and anodic) currents depends on the metal-to-ligand ratio. (Unfortunately we had small amount of DFR therefore we could not make measurements for ratio dependence.) The formal redox potentials were determined and the stability constants for the Mn(III)-siderophore complexes were calculated. These values are close to the stability constants of the corresponding Fe(III)

complexes. Considering the linear correlation of the first hydrolysis constants of the metal ions with the stability constants of the formed complexes with a given ligand, we estimated the first hydrolysis constant of the Mn(III) (for what hard to find data in literature), using the stability constants for complexes formed between DFB or DFC and numerous metal ions.

In the cases of the Co(II)-systems the oxidation was successful only at high pH (above pH $\sim$ 9), using hydrogen peroxide, and only in the case of siderophores it was complete. The results of the cyclic voltammetric measurements performed on the Co(III) containing samples show the irreversible reduction of the central metal ion, therefore only the cathodic peak potential could be determined from the voltammogram. From this reason only the upper limit of the stability constants could be calculated for the Co(III)-siderophores complexes. On the basis of the values, we can say that the Co(III)-siderophore complexes are exceptionally stable, the upper limit of their constants are many orders of magnitude higher than the stability constants of the corresponding Fe(III) complexes.

4. POSSIBLE APPLICATION OF THE RESULTS

The results obtained in this work are based on basic research study. The stability and the possible structure of the complexes formed in the Mn(II)- and the Co(II)-hydroxamate systems were determined. However, the knowledge of the main factors determining the interaction between manganese or cobalt and various monohydroxamic acids could be useful for design of new inhibitor molecules.

The determined relaxivity values at the Mn(II)-hydroxamate complexes may provide information for planning new Mn(II) containing MRI contrast agents.

A further interesting result is that the M(II)-siderophores can be oxidized to M(III) complexes in stoichiometric reactions. The stability of the formed latter complexes is close to or higher compared to the stability of the corresponding Fe(III) complexes. These data unambiguously show that the presence of the Mn(III), especially the Co(III) may disturb the siderophore-mediated iron uptake process in microorganisms, which might have interesting aspects, for example, in drug development.

5. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK (PUBLICATIONS)

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények (Articles connected to the thesis):

1. Orsolya Szabó, Etelka Farkas: **Characterization of Mn(II) and Mn(III) binding capability of natural siderophores desferrioxamine B and desferricoprogen as well as model hydroxamic acids**

Inorganica Chimica Acta, **376** (2011) 500-508

(Impakt faktor: 1,846)

2. Etelka Farkas, Orsolya Szabó: **Co(II) and Co(III) hydroxamate systems: A solution equilibrium study**

Inorganica Chimica Acta, **392** (2012) 354-361

(Impakt faktor: 1,687)

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények (Articles not detailed in the thesis):

1. Etelka Farkas, Orsolya Szabó, Gyula Tircsó, László Somsák: **Relaxometric determination of binding between Mn(II) - UDP and Mn(II) - UDP-glucose in Aqueous Solution**

Carbohydrate Research, **368** (2013) 68-72

(Impakt faktor: 2,044)

Az értekezéshez kapcsolódó előadások (Lectures connected to the thesis):

1. Szabó Orsolya, Farkas Etelka: **Mn(II)- és Co(II)-ionok oldatbeli kölcsönhatása hidroxámsavakkal**

XLIV. Komplexkéimiai Kollokvium, 2009. május 27-29, Siófok, Magyarország

2. Etelka Farkas, Orsolya Szabó: A Comparison Between $Mn^{2+/3+}$ and $Fe^{2+/3+}$ Binding Ability of Desferrioxamine B and Model Hydroxamic Acids

10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2010. június 22-26, Thessaloniki, Görögország

3. Szabó Orsolya, Farkas Etelka: A $Mn(II)$ - és $Mn(III)$ ionok hidroxámsavakkal való kölcsönhatásának koordinációs kémián túlmutató néhány aspektusa

MKE 1. Nemzeti Konferencia, 2011. május 22-25, Sopron, Magyarország

4. Etelka Farkas, Orsolya Szabó: Possible Biological Relevance of Complexes between Manganese(II)/(III) and Hydroxamates

11th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (ISMIB 2011), 2011. június 20-23, Cambridge, UK

5. Szabó Orsolya, Farkas Etelka: Néhány nyitott kérdés a $Co(II)$ -hidroxamát oldatbeli kölcsönhatását illetően

XLVI. Komplexkémiái Kollokvium, 2012. május 21-23, Mátrafüred, Magyarország

6. Etelka Farkas, Orsolya Szabó: Factors affecting the thermodynamic and redox stability of manganese(II)-and cobalt(II)-hydroxamate complexes

International Symposium on Metal Complexes (ISMEC 2012), 2012. június 18-22, Lisszabon, Portugália

7. Etelka Farkas, Orsolya Szabó: Bioinduced Investigation on Cobalt(II)/(III) – Hydroxamate systems

12th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (ISMIB 2013), 2013. március 11-13, Punta del Este, Uruguay

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek (Posters connected to the thesis):

1. Orsolya Szabó, Etelka Farkas: **Interaction of Mn(II) and Co(II) Ions with Hydroxamic Acids**
10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC10), 2009. szeptember 25-28, Debrecen, Magyarország
2. Orsolya Szabó, Etelka Farkas: **Interaction of Mn(II) and Co(II) Ions with DFB and model Dihydroxamic Acids**
XI. International Symposium on Inorganic Biochemistry Challenge for all Generations, 2010. szeptember 4-8, Kudowa Zdrój, Lengyelország
3. Etelka Farkas, Orsolya Szabó: **Mn^{2+/3+} and Fe^{2+/3+} Binding by Natural Siderophores and Model Hydroxamic Acids**
Chemistry towards Biology, 2010. szeptember 8-11, Priosten, Horvátország
4. Orsolya Szabó, Etelka Farkas: **Interesting Differences Between the Number of Coordinated Hydroxamates in the Cobalt(II) complexes Formed with Mono- Di- and Trihydroxamates**
4th European Conference on Chemistry for Life Science (4ECCLS), 2011. augusztus 31-szeptember 3, Budapest, Magyarország
5. Etelka Farkas, Orsolya Szabó, Gyula Tircsó: **Bioinspired Investigation on Complexes of Desferrioxamine B, Desferricoprofen and their Model Ligands with Mn(II) and Mn(III)**
11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (11 ISABC), 2011. december 2-5, Barcelona, Spanyolország
6. Etelka Farkas, Orsolya Szabó, Gyula Tircsó: **Bioinduced investigation on metal ion hydroxamate systems**
4th EuCheMS Chemistry Congress, 2012. augusztus 26-30, Prága, Csehország
7. Orsolya Szabó, Etelka Farkas: **Characterization of Mn(II)- and Co(II)-aminohydroxamate complexes in solution**
11th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EUROBIC11), 2012. szeptember 12-16, Granada, Spanyolország

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó poszterek (Posters not detailed in the thesis):

1. Orsolya Szabó, Etelka Farkas, László Somsák: **Interaction Between Mn(II) and UDP-Glucose in Aqueous Solution**
4th European Conference on Chemistry for Life Science (4ECCLS),
2011. augusztus 31-szeptember 3, Budapest, Magyarország (poszterelőadás angol nyelven)