



**Imidazoltartalmú monohidroxámsavak oldatbeli
kölsönhatása Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -ionokkal**

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

Csapó Edit

Témavezető: Prof. Dr. Farkas Etelka

**Interaction between imidazole containing monohydroxamic
acids and Cu^{2+} -, Ni^{2+} - and Zn^{2+} - ions in solution**

PhD theses

Edit Csapó

Supervisor: Prof. Dr. Etelka Farkas

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2009

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Régóta ismert, hogy bizonyos átmenetifémionok létfontosságúak az élő szervezet számára, ugyanis biomolekulák alkotóelemeiként meghatározó szerepet játszanak szerves molekulák szintézisében, szállításában illetve metalloenzimekben szerepelve biológiai rendszerek sav-bázis és redoxifolyamatainak katalizálásában. Jól ismert tény az is, hogy a fehérjék peptid és oldalláncbeli donorcsoportjai, sok esetben a hisztidin imidazol-nitrogénjei, jelentenek elsősorban potenciális fémmegkötő helyet a metalloenzim aktív centrumában lévő fémion(ok) számára. Különféle biológiai, biokémiai kutatások jelentős hányada a metalloenzimek működési mechanizmusának feltérképezésére irányulnak, de mindemellett azok működésének szabályzása is kiemelt fontossággal bír, pl. a rákgyógyászatban is.

A közelmúltban különleges figyelem fordult többek között a cinktartalmú mátrix metalloproteináz (MMP) enzimesalád hidroxámsavakkal (általános képlet: $R_C\text{CONR}_N\text{OH}$) való hatásos, szelektív inhibíálásának a tanulmányozására, mivel számos betegség, pl. a különféle ízületi gyulladások, periodontális betegségek, sclerosis multiplex, kialakulása is ezen enzim túlműködésével hozható kapcsolatba. Az inhibíció során az inhibítor molekula az enzim aktív centrumában kötött fémion(ok)hoz erős kelátképző hidroxámsavcsoportja révén koordinálódva képes a szubsztrát molekula megkötődését gátolni, ezáltal az enzim működését blokkolni. Több kutatócsoport is szintetizál ilyen szubsztrát-analóg inhibítor vegyületeket és az eredmények egyértelműen mutatják többek között azt is, hogy a metalloenzim-inhibíció szelektivitása, a molekuláris felismerés jelentősen befolyásolható egy hidroxámsav-alapú inhibítornál a hidroxámsavcsoportához kapcsolódó R_C „oldallánc” szerkezetével, amely segít az enzim kötőhelyének azonosításában és a kölcsönhatás erősítésében másodlagos kötések (pl. H-kötés, van der Waals kölcsönhatás) kialakításával.

Egy inhibíciós mechanizmus megértéséhez a fémionok és az inhibítor szerepét betöltő ligandumok közötti oldatbeli kölcsönhatások alaposabb megismerése lehet az egyik legfontosabb eszköz. A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában már több mint két évtizede foglalkoznak hidroxámsavak fémionokkal való kölcsönhatásának tanulmányozásával. A jelen doktori munka keretében 12 szintetikusan előállított monohidroxámsav fémmegkötő sajátságát térképeztük fel Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -ionokkal. A vizsgált vegyületek a hidroxámsavcsoport mellett a molekula R_C „oldalláncában” olyan potenciális donorcsoport(ka)t tartalmaznak, melyeket egy tervezett hidroxámsav-alapú inhibítor molekula is magában foglalhat, illetve szerepük lehet a fentebb említett másodlagos kölcsönhatások kialakításában. Célunk volt tanulmányozni egyrészt, hogy ezen „oldalláncbeli” donorcsoportok típusa (amino-N és/vagy imidazol-N, peptidcsoport(ok)), száma (egy, kettő, három/négy) illetve helyzetük a hidroxámsavcsoporttól (α -, β -, γ -helyzet) hogyan befolyásolja a molekula koordinációs sajátságát egy egyszerű monohidroxámsavéhoz képest. Jól ismert korábbi irodalmakból, hogy számos esetben nemcsak a hidroxamát-oxigéneknek, hanem a hidroxamát-N-nek is, ha lehetősége van koordinálódni ($\text{R}_\text{N} = \text{H}$), meghatározó szerep jut a fémionok megkötésében. A dolgozatban tanulmányoztuk továbbá azt is, hogy az R_N csoport hidrogénről metilcsoportra történő cseréjének következtében a hidroxamát-N koordinációból való kiiktatása milyen hatással van a ligandumok koordinációs sajátságaira a vizsgált fémionok vonatkozásában. A fémion-ligandum kölcsönhatás feltérképezése céljából pH-potenciometriás és különféle szerkezetvizsgáló módszereket, többek között UV-látható spektrofotometria, ^1H NMR, ESR, CD spektroszkópia valamint ESI-MS spektrometria alkalmaztunk.

1. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

pH-potenciometria: Alapvető vizsgálati módszerünk révén valamennyi rendszerre elvégeztük ezen méréseket, amelyek magukban foglalták a ligandumok savi disszociációs és a képződő fémkomplexek összetételének valamint stabilitási állandóinak a meghatározását is ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KCl}$). Az adatok elemzéséhez a PSEQUAD és SUPERQUAD számítógépes programokat használtuk.

UV-látható spektrofotometria: UV-Vis méréseket Cu^{2+} - és Ni^{2+} -ionokat tartalmazó rendszerekben végeztünk, ugyanis ezen fémionoknak az elektronszerkezetükből adódóan jellegzetes, d-d átmenetekhez tartozó elnyelésük van elsősorban a látható hullámhossztartományban, de mindemellett a fémion-töltésátviteli sávok is informatívak. A kapott spektrumok információt szolgáltattak a fémionhoz koordinált ligandum donoratomjairól illetve a képződő komplexek geometriájáról.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia: Hasonlóan az UV-Vis spektrofotometriás mérésekhez, a Cu^{2+} - és Ni^{2+} -tartalmú rendszerek esetén elvégzett CD vizsgálatok is információt adtak a komplexek szerkezetére vonatkozóan.

Elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia: Az ESR vizsgálatok csak párosítatlan elektronokat tartalmazó részecskék tanulmányozására irányulnak, így ezen módszer a Cu^{2+} -ion paramágneses sajátsága miatt kiválóan alkalmas komplexei tanulmányozására. Az ESR spektrális paraméterek ($g_{\parallel}$, $A_{\parallel}$) segítséget nyújtottak a koordinációs mód és az esetleges térbeli szerkezet változásainak felderítésében.

Elektro-spray ionizációs tömegspektrometria (ESI-TOF-MS): A kismértékű ionizáció miatt lehetséges a komplexhez rendelhető direkt jelek észlelése, amelyek a megfelelő tömeg/töltés arány (m/z arány) és a jellemző izotópeloszlás alapján beazonosíthatóak. Ennek eredményeképpen az ESI-MS módszert a

képződő komplexek sztöchiometriájának megállapítására több esetben is használtuk mindhárom fémion rendszerében.

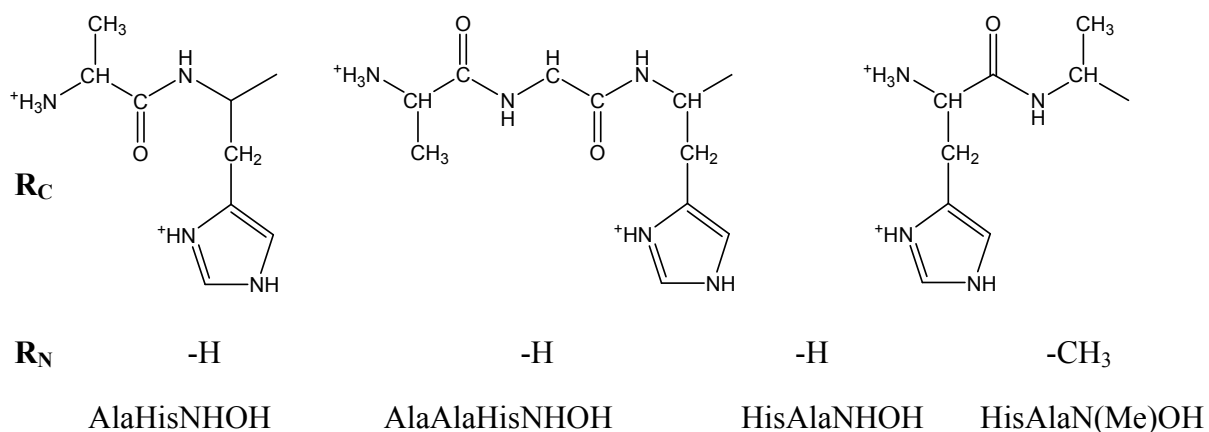
^1H NMR spektroszkópia: ^1H NMR szerkezetvizsgáló módszert használtuk egyrészt az előállított ligandumok tisztaságának ellenőrzésére, azok protonálódási folyamatainak feltérképezéséhez, továbbá a diamágneses Zn^{2+} -komplexekbeni kötésmódok alaposabb megismeréséhez D_2O oldószerben.

A vizsgált vegyületeknek szinte egyike sem kapható kereskedelmi forgalomban, előállításuk egyrészt a DE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén, másrészt együttműködésben más európai kutatócsoportok munkája illetve szakmai irányítása mellett történt.

A tanulmányozott ligandumok protonált formáinak szerkezeti képlete, az R_C „oldalláncban” lévő donorcsoportok száma szerinti csoportosításban, alább látható.

Az R_C oldalláncban amino-N vagy imidazol-N donorcsoport					
R_C	R_N	rövidítés			
	-CH ₃	<i>N</i> -Me- α -Ala			
	-CH ₃	<i>N</i> -Me- β -Ala			
	-H	im-4-Cha	Az R_C oldalláncban amino-N és imidazol-N donorcsoport		
	-CH ₃	<i>N</i> -Me-im-4-Cha		-H	Hisha
	-H	im-4-Aha		-CH ₃	<i>N</i> -Me-Hisha
	-H	Z-Hisha			

Az R_C oldalláncban amino-N, imidazol-N és peptidcsoport(ok)



3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A doktori munka során oldategyensúlyi vizsgálatokat végeztünk 12 szintetikusan előállított hidroxámsav származék Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -ionnal alkotott rendszereiben. Két ligandum esetén a mérések során fellépő oldékonysági problémák miatt 50:50 %(m/m) DMSO/víz oldószerkelegben is elvégeztük vizsgálatainkat. Méréseink során meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit, a fémes rendszerekben képződő komplexek stabilitási szorzatait. A komplexekhez rendelhető szerkezetekre, a bennük található kötésmódokra UV-Vis, CD, ESR, 1H NMR és ESI-MS mérésekkel gyűjtöttünk információkat. A tanulmányozott ligandumok döntő többségében már rendelkezésünkre álltak, de kettő esetében módszert is dolgoztunk ki előállításukra és azok szintézisét el is végeztük.

3.1. Sav-bázis sajátosságok

Meghatároztuk valamennyi vizsgált ligandum savi disszociációs állandóit 0,20 M (KCl) ionerősség mellett. A tanulmányozott vegyületek közül 6 esetében (*N*-Me- α -Alaha, *N*-Me- β -Alaha, im-4-Cha, *N*-Me-im-4-Cha, im-4-Aha és Hisha) a jelen munka során számolt disszociációs állandók jó egyezést mutattak a Tanszéken már korábban meghatározott értékekkel, míg a másik 6 ligandumra

(Z-Hisha, N-Me-Hisha és a hisztidintartalmú peptidhidroxámsavak) a meghatározott adatok újak, korábbi irodalomban nem lelhetők fel. A makroállandók meghatározásán túl következtetéseket tettünk a molekulákbeli egyes donorcsoportok bázicitási sorrendjére is. Ennek eredményeként megállapíthattuk, hogy: **(1)** a Z-Hisha esetén, hasonlóan az imidazol-hidroxámsavakhoz, megvalósul a hidroxamát és az imidazol-N protonálódási folyamatai pH-tartományának elkülönülése, melynek alapján a kisebb makroállandó az imidazólium-, a nagyobb a hidroxámsavcsoport protonvesztéséhez rendelhető; **(2)** az N-Me-Hisha mindhárom disszociábilis protonjának elvesztése, egyezésben a Hisha esetén megállapítottakkal, nagymértékben átfedő folyamatokban történik. Az NMR mérések alapján is a legsavasabb mindenképpen az imidazóliumcsoport, de a másik két csoportra vonatkozóan a makroállandók részletesebben nem elemezhetőek; **(3)** a hisztidintartalmú peptidhidroxámsavak esetén a csoportok deprotonálódási pH-tartománya csak kismértékű átfedést mutatott az NMR mérések alapján, a bázicitási sorrendben az imidazóliumcsoport a legsavasabb, míg a másik két funkciócsoport közül a hidroxamátcsoport a bázikusabb sajátosságú.

3.2. Az R_C oldalláncban amino-N donort tartalmazó monohidroxámsavak Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -komplexei

Ezen ligandumok a hidroxámsavcsoportokhoz képest α - illetve β -helyzetben egy amino-N donort tartalmaznak, a hidroxamát-N pedig metil szubsztituenst hordoz, miáltal a koordinációban nem vehet részt. A Cu^{2+} -, Ni^{2+} -, Zn^{2+} -N-Me- β -Alaha rendszereket elemezve megállapítottuk, hogy ha az aminocsoport β -helyzetbe kerül, akkor már nem vesz részt a koordinációban és mindhárom fémionnal csak hidroxamát-[O,O]-kelát alakul ki. Amennyiben azonban az aminocsoport α -helyzetben van, kötési izomerekben a hidroxamát-[O,O]-kelát mellett egy hattagú-[NH₂, O_{hidr}]-kelát képződését is igazoltuk.

3.3. Az R_C oldalláncban imidazol- N donorcsoportot tartalmazó monohidroxámsavak Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -komplexei

Azon fémion-imidazolhidroxámsav rendszerekben, ahol a ligandumok a hidroxámsavcsoport mellett α -, β - vagy γ -helyzetben egy imidazol-gyűrűt tartalmaznak, illetve $R_N = H$, megállapítottuk, hogy a fémion-ligandum kölcsönhatás számottevően kisebb pH-n kezdődik, mint a szerkezetileg analóg, imidazolcsoport helyett aminocsoportot tartalmazó rendszereknél az ismeretes.

Igazoltuk, hogy a Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -iont tartalmazó valamennyi rendszer esetén az imidazol- NH^+ protonja fémion indukáltan szorul le, ami az imidazol koordinációját támasztja alá és az im-4-Cha, im-4-Aha és Z-Hisha fémion tartalmú rendszereiben a horgonydonor szerepét is ezen csoport tölti be. (A Zn^{2+} -im-4-Cha titrálási görbéi ugyan nem mutatnak az imidazol- NH^+ deprotonálódási pH-tartományában a fémkomplexek képződéséhez rendelhető mérhető pH-effektust, de az 1H NMR eredmények imidazol- N részvételével történő gyenge koordinációra utalnak.)

A Cu^{2+} - α -Alaha, - β -Alaha, -GABAha rendszerekben képződő fémkorona típusú részecskékkel analóg komplexek képződését az imidazol-származékokkal is igazoltunk és megállapítottuk, hogy azok stabilitási sorrendje is azonosan alakul. (A $[Cu_5L_4H_4]^{2+}$ komplexek stabilitási sorrendje az egyes ligandumokkal: β -Alaha $\gg$ α -Alaha $>$ GABAha, illetve im-4-Aha $\gg$ im-4-Cha $>$ Z-Hisha). Különbséggként állapítottuk meg ugyanakkor, hogy az imidazol-származékok közül az im-4-Cha-val a fémkorona típusú komplex a Ni^{2+} - és Zn^{2+} -ionokkal is kimutatható volt.

A három fentebb említett primer imidazolhidroxámsav N -Me-származékai közül csak az α -helyzetben imidazolcsoportot tartalmazót sikerült előállítani. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy ezen ligandum Cu^{2+} - és Ni^{2+} -tartalmú rendszereiben, szemben a szerkezetileg analóg N -Me-aminoszármazékkal, egy

$[M_2L_3]^+$ összetételű részecske is képződik, melyben valószínűsíthetően a három közül az egyik ligandum hídként köt össze két hidroxamátó-kelátos monomert.

3.4. Az R_C oldalláncban amino-N és imidazol-N donorcsoportokat tartalmazó monohidroxámsavak Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -komplexei

Ezen csoportba sorolható ligandumok (Hisha, *N*-Me-Hisha) már a monohidroxámsav R_C oldalláncában az amino-N és imidazol-N donorcsoportokat együtt tartalmazzák. A Hisha-t ($R_N = H$) tartalmazó rendszerekre korábbi irodalmi eredmények már születtek, de a jobb összevethetőség érdekében, a többi méréssel azonos körülmények között a jelen munka során ezzel a molekulával is történtek vizsgálatok. A meghatározott oldategyensúlyi modellek, valamint a képződő komplexek stabilitási állandói mindhárom fémion esetében jó egyezést mutattak az irodalmi értékekkel.

Az *N*-Me-származék esetén, melyet e munka során új ligandumként állítottunk elő és tanulmányoztunk, a hidroxamát-N a koordinációban már nem vehet részt, a molekula két végén egy-egy jól elkülönült kelátképző csoport, [O,O] és [NH₂,N_{imid}], helyezkedik el. Az eredmények szerint a hidroxamát-N, mint potenciális donatoratom, kiiktatása a Ni^{2+} - és Zn^{2+} -tartalmú rendszerekben a képződő komplexek kötés módjait, a Hisha-éhoz képest jelentősen nem változtatta meg. Amíg a Ni^{2+} -ionnál az [NH₂,N_{imid}]-, addig a Zn^{2+} esetén az [O,O]-kelátok fémionokhoz való kötődését igazoltuk mindkét ligandummal. Lényeges különbség mutatkozott azonban a Cu^{2+} -tartalmú rendszerek esetén. A Cu^{2+} -Hisha rendszerben a hidroxamát-oxigéneken indul a komplexképződés, mely a pH emelésével fokozatosan a nitrogénekre tevődik át. Ezzel ellentétben az *N*-Me-származék esetén a donatoratomok fentebb említett elkülönülése a pH emelésével nem következik be. UV-Vis, CD és ESR mérésekkel is bizonyítottuk, hogy a $[CuL_2H_2]^{2+}$ és $[Cu_2L_2]^{2+}$ komplexekben is átlagosan egy [O,O]-, és egy [NH₂,N_{imid}]-kelát Cu^{2+} -ionhoz történő koordinációja valósul meg,

de a $[\text{CuLH}]^{2+}$ összetételű komplex is kétféle, az $[\text{O},\text{O}]$ - vagy $[\text{NH}_2,\text{N}_{\text{imid}}]$ kötésmóddal létezhet.

**3.5. Oldalláncban amino-N, imidazol-N és peptidcsoportot tartalmazó
monohidroxámsavak Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -komplexei:
hisztidintartalmú peptidhidroxámsavak**

A hisztidintartalmú peptidek hidroxámsav származékainál az R_C oldalláncban az amino-N és imidazol-N donorcsoportokon kívül további egy vagy két peptidcsoport is megtalálható. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a kisebb bázicitású imidazol koordinációban való szerepe inkább kisebb pH-n domináns, míg a bázikusabb hidroxamát a pH emelésével párhuzamosan válik meghatározóvá. (Kivételt képez a Cu^{2+} -AlaAlaHisNHOH rendszer, ahol éppen a hidroxamát-oxigének részvételével indul a fémion-ligandum kölcsönhatás, de ezen donortomok pH $\sim 7,5$ felett teljesen ki is szorulnak a fémion koordinációs szférájából, és a stabilis, $[\text{NH}_2,\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{imid}}]$ -kelát kialakulása lesz a meghatározó.)

Összehasonlítva a Cu^{2+} - és Ni^{2+} -ionok ezen ligandumokkal való kölcsönhatását megállapítottuk, hogy a Cu^{2+} -ion az imidazol-N(3)-nel mindig kialakít valamiféle kölcsönhatást, pl. imidazol-hidas, di- és polinukleáris részecskék képződésével. A Ni^{2+} -ion esetén azonban azt találtuk, hogy nagyobb pH-n az imidazol-N(3) kikerül a fémion koordinációs szférájából és helyette a hidroxamát-N részvételével kialakuló síknégyszetes geometriájú komplexek képződnek.

A „leggyengébb” kölcsönhatást a Zn^{2+} -ionokat tartalmazó rendszerekben figyeltük meg, ahol kötési izomerek kialakulását találtuk, de a hidroxamát- $[\text{O},\text{O}]$ -keláton keresztüli kötődés minden esetben valószínűsíthető. A peptid-NH deprotonálódása és koordinációja egyetlen esetben sem volt bizonyítható a Zn^{2+} -ionnal.

4. AZ EREDMÉNYEK VÁRHATÓ HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

Vizsgálataink célja, alapkutatás jellegéből adódóan, eddig még nem tanulmányozott olyan monohidroxámsavak Cu^{2+} -, Ni^{2+} - és Zn^{2+} -ion megkötő képességének feltérképezése volt, mely molekulák az erős kelátképző hidroxámsavcsoport mellett egyéb koordinálódásra képes, az inhibíció szelektivitásában szerepet játszó egyéb funkciócsoportot is tartalmaznak. A munka során a fémion-hidroxamát rendszerekben képződő komplexek stabilitási viszonyait és lehetséges szerkezetüket derítettük fel. Ezen eredmények egy pl. biológiai aktivitás (enziminhibíció) vizsgálathoz, illetve új, potenciális enziminhibítorok tervezéséhez szolgáltathatnak értékes információkat.

1. INTRODUCTION AND AIM OF THE WORK

Among other metal ions, Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} -ions are essential for living organisms. On one hand, as a part of small biomolecules they play a role in the synthesis and transfer of organic molecules, on the other hand metalloenzymes, which contain these metal ions, catalyze the acid-base and the redox-processes of the biological systems. It is also known that in most cases these metal ions are coordinated by the peptide and side-chain imidazole donors of the proteins.

Nowadays the selective inhibition of metalloenzymes is an area of intense interest because numerous serious diseases are correlated with the dysfunction of these enzymes. For example, the zinc-containing matrix metalloproteinases (MMPs) play a determinant role in the evolvement of arthritis, periodontal diseases, multiple sclerosis and in the metastatic spread of various human cancers. Previous results involving zinc-containing histone deacetylases, MMPs show that hydroxamic acids, which have good metal binding capability, are effective inhibitors of these enzymes. There is no doubt that the inhibitory effect is correlated with the chelation of the catalytic metal center, thereby the linkage of the substrate molecule is hindered. The selectivity of the inhibitor is influenced by the structure of the R_C side chain of the molecule.

As a consequence, equilibrium studies between hydroxamic acids and various metal ions are important for better understanding the mechanism of the inhibition. The complex formation behaviour of different type of hydroxamic acid molecules with numerous metal ions has been studied for ca. 20 years at the University of Debrecen. In this work the metal binding capability of 12 different synthetic hydroxamic acid molecules with Cu^{2+} -, Ni^{2+} - and Zn^{2+} -ions have been investigated by pH-potentiometry, UV-visible spectrophotometry, CD, EPR, ^1H NMR and ESI-MS techniques. Besides the hydroxamic acid group these molecules contain different type of potential donor atoms in R_C side chain at α -, β - or γ -position to the functional group.

All the studied ligands were synthesized at the University of Debrecen, or within the frame of collaborations. The structures of the protonated ligands studied are listed below:

amino-N or imidazole-N donors in the R _C side chain		
R _C	R _N	abbrev.
	-CH ₃	<i>N</i> -Me-α-Ala
	-CH ₃	<i>N</i> -Me-β-Ala
	-H	im-4-Cha
	-CH ₃	<i>N</i> -Me-im-4-Cha
	-H	im-4-Aha
	-H	<i>Z</i> -Hisha

amino-N and imidazole-N donors in the R _C side chain		
R _C	R _N	abbrev.
	-H	Hisha
	-CH ₃	<i>N</i> -Me-Hisha

amino-N, imidazole-N and peptide group(s) in the R _C side chain		
	-H	AlaHisNHOH
	-H	AlaAlaHisNHOH
	-H	HisAlaNHOH
	-CH ₃	HisAlaN(Me)OH

2. EXPERIMENTAL METHODS

pH-potentiometry: The most common experimental method for the study of the protonation and complex formation processes in aqueous solution. The aim of the measurements is to determine the composition and the stability constants of the complexes formed ($T = 298\text{ K}$, $I = 0.20\text{ M KCl}$). The stability constants from the experimental data were calculated by SUPERQUAD and PSEQUAD programs.

UV-visible spectrophotometry: In the Cu^{2+} - and Ni^{2+} -containing systems UV-Vis measurements were performed, because these metal ions have typical absorption in the visible wavelength range concerning the d-d transitions but the presence of charge transfer bands is not negligible either. The character of the spectra provided useful information about the geometry of the complex(es) and the coordinating donors of the ligand.

CD spectroscopy: Similarly to UV-Vis measurements, the CD spectra of the Cu^{2+} - and Ni^{2+} -containing systems were used to obtain additional structural information about complexes formed.

EPR spectroscopy: EPR spectroscopy was applied to characterize the complexes of the paramagnetic Cu^{2+} -ion. The spectral parameters ($g_{\parallel}$, $A_{\parallel}$) of the EPR provided useful information about the coordinating donors of the ligand(s) in the complexes.

Mass-spectroscopy (ESI-MS): This technique, using soft ionization ion-source (ESI), allows collecting information about the molecular mass of the metal complexes confirming the assumed structures in solutions. The ions formed by ionization are separated by mass/charge (m/z).

^1H NMR spectroscopy: This method was used to check the purity of the newly synthesized molecules, to get deeper insight into the protonation steps of the ligands, and furthermore it was used to obtain structural information for diamagnetic Zn^{2+} -complexes.

3. NEW SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS

Equilibrium data for complexation of 12 synthetic monohydroxamic acids with Cu^{2+} -, Ni^{2+} - and Zn^{2+} -ions have been determined in aqueous solution. In the case of two ligands, due to solubility problems of the complexes, equilibrium studies in 50:50 %(m/m) DMSO : water solvent mixture were also performed. Stoichiometry and structure of the complexes were determined by using pH-potenciometry, UV-Vis, CD, EPR, ^1H NMR and mass spectrometric techniques. New methods were also developed for the synthesis of two ligands studied.

3.1 Acid-base properties of the ligands

Acid dissociation constants (pK_a) of all the studied ligands at an ionic strength of 0.20 M (KCl) were determined. In the case of six ligands (*N*-Me- α -Alaha, *N*-Me- β -Alaha, im-4-Cha, *N*-Me-im-4-Cha, im-4-Aha and Hisha) the results are in good agreement with those obtained earlier in our laboratory. For the new molecules the estimated pK_a values were also determined for the first time and it was found that: **(1)** For Z-Hisha the protonation processes of the imidazole and hydroxamate groups do not overlap, the lower pK_a belongs mostly to the deprotonation of the imidazolium- NH^+ , while the higher one to the hydroxamic function. **(2)** Similarly to Hisha, for *N*-Me-Hisha the three dissociation processes overlap significantly. It was found that the imidazolium moiety is the most acidic among the three groups, but the NMR measurements could not show unambiguous order of the acidity for the other two groups. **(3)** For the histidine containing peptidehydroxamic acids the pH^* dependence of the NMR shifts of all the non-dissociable protons close to the amino-, imidazole- and hydroxamate-donors indicated relatively low extent of the overlapping of the individual processes, therefore the acidity trend could be determined. The NMR data suggest that the lowest pK_a values of the ligands belong to the

dissociation of the protonated imidazole, while the highest ones to that of the hydroxamic functions.

3.2. Cu^{2+} -, Ni^{2+} - and Zn^{2+} -complexes of monohydroxamic acids containing amino-N donor in the R_C side chain

These monohydroxamic acids contain amino-N donor atoms at α - or β -position in the R_C side chain, and the R_N is methyl group, thus the hydroxamate-N is not available for coordination. Only hydroxamate-type coordination of N -Me- β -Alaha was found with all the three metals, but the formation of an additional six-membered chelate via the amino-N and hydroxamate-O is suggested parallel to the hydroxamate one in the case of N -Me- α -Alaha.

3.3. Cu^{2+} -, Ni^{2+} - and Zn^{2+} -complexes of monohydroxamic acids containing imidazole-N donor in the R_C side chain

For ligands having imidazole ring at α -, β - or γ -position to the hydroxamate function the equilibrium studies with Cu^{2+} -, Ni^{2+} - and Zn^{2+} -ions showed that the complex formation processes with these ligands start at lower pH compared to the former aminohydroxamates systems investigated previously.

In all systems the coordination of the imidazole-N(3) was confirmed and it was also found that this group behaves as anchor donor not only to Cu^{2+} and Ni^{2+} , but even to Zn^{2+} . Similarly to primary α -, β - and γ -aminohydroxamate systems, a pentanuclear metallocrown is unambiguously formed with all the imidazole-derivatives in the Cu^{2+} -containing systems and the order of the stability of these complexes is also similar. (Stability orders of the $[\text{Cu}_5\text{L}_4\text{H}_4]^{2+}$ species are as follows: β -Alaha $\gg$ α -Alaha $>$ GABAha, and im-4-Aha $\gg$ im-4-Cha $>$ Z-Hisha.) The presence of this pentanuclear $[\text{Cu}_5\text{L}_4\text{H}_4]^{2+}$ complex with significantly lower stability in the Ni^{2+} - and Zn^{2+} -im-4-Aha systems was also observed.

Despite all of our efforts the synthesis of only one secondary imidazole-derivative was successful. This ligand contains the imidazole ring at α -position in the side chain. In contrast to *N*-Me- α -Alaha, beside the mononuclear species, a dinuclear complex, $[M_2L_3]^+$, was also found in the Cu^{2+} - and Ni^{2+} -*N*-Me-im-4-*Cha* systems. A possible bonding mode is that one of the three ligands bridges two monomers. Stacking interaction between the imidazole rings of the latter two ligands might stabilize this species. This binding mode is interesting because for the design of molecules with potential inhibitory effect on metalloenzymes having two metal ions in the catalytic centre, one of the most important structural requirements is that the ligand is able to coordinate simultaneously both metal ions in the catalytic centre.

3.4. Cu^{2+} -, Ni^{2+} - and Zn^{2+} -complexes of monohydroxamic acids containing amino-*N* and imidazole-*N* donors in the R_C side chain

These molecules contain the amino-*N* and imidazole-*N* in the R_C side chain. According to the results the stability constants of the complexes formed in the Cu^{2+} - Ni^{2+} - and Zn^{2+} -Hisha systems are in good agreement with earlier findings in the literature. The methylation of the hydroxamate-*N* in the *N*-Me-Hisha results in two separated chelating groups, which are not able to coordinate to the same metal ion at the same time. One chelate can be formed via the hydroxamate-oxygens ([O,O] coordination) while another one via the amino-*N* and imidazole-*N*(3) donors (histamine-type- $[NH_2, N_{imid}]$ chelate).

As the hydroxamate-*N* is not able to coordinate in *N*-Me-Hisha, comparison of the Ni^{2+} and Zn^{2+} binding ability of Hisha with that of the *N*-Me-derivative showed similar coordination modes, nevertheless formation of a tris complex in the Ni^{2+} -*N*-Me-Hisha system is also observed. With Cu^{2+} the coordination modes are different with the two ligands. In contrast to the results obtained in the Cu^{2+} -

Hisha system, coordination of the metal ion via both hydroxamate-[O,O] and histamine-type-[NH₂,N_{imid}] chelates was confirmed with the *N*-Me derivatives.

3.5. Cu²⁺-, Ni²⁺- and Zn²⁺-complexes of monohydroxamic acids containing amino-N, imidazole-N and peptide group(s) in the R_C side chain: histidine containing peptidehydroxamic acids

Coordination properties of the ligands having amino-N, imidazole-N and peptide group(s) in the R_C side chain are much wider than for molecules presented previously in chapter 3.3 and 3.4. The lower basicity imidazole, compared to that of the hydroxamate gives a benefit to the former donor especially at lower pH and the role of the hydroxamate generally increases upon increasing the pH.

In contrast to this, in the Cu²⁺-AlaAlaHisNHOH system, the hydroxamate takes part in the coordination only at lower pH and the (NH₂, N⁺, N⁻, N_{imid}) bonding mode with very high stability is dominant at higher pH.

Comparison of the coordination modes in the Cu²⁺- and Ni²⁺-containing systems one can conclude that the imidazole-N(3) plays a determinant role in the Cu²⁺ complexes, for example often imidazole-bridged di- and polynuclear species are formed. In contrast to it, in the Ni²⁺-containing systems, instead of imidazole-N(3), coordination of hydroxamate-N forming square planar complexes is dominant at higher pH. With Zn²⁺, formation of various bonding isomers with rather low stability was found, but the presence of the hydroxamate-[O,O] chelate is not negligible. The deprotonation and coordination of the peptide-N were not observed.

4. POSSIBLE APPLICATION OF THE RESULTS

The aim of our studies was first of all to explore the interaction between the Cu^{2+} -, Ni^{2+} -, Zn^{2+} -ions and hydroxamic acids containing potential donors in the R_C side chain of the molecules. The importance of the hydroxamic acids is based on their good complex forming ability and these compounds are also capable for the inhibition of a wide variety of enzymes (MMPs, histone deacetylases, ureases). This work, as a general research focused mostly on the determination of stability, stoichiometry and solution structure of the hydroxamate complexes formed. These results can be used for biological studies, for example enzyme inhibition investigations of these ligands or design of new potential inhibitor molecules.

5. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK (PUBLICATIONS)

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények (articles connected to the thesis)

1. E. Csapó, E. Farkas, P. Buglyó, N. V. Nagy, M. A. Santos: **Synthesis and characterization of Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} binding capability of histidinehydroxamic acid derivatives**

közlésre előkészítve (prepare for publication)

2. E. Farkas, E. Csapó, P. Buglyó, C. A. Damante, G. Di Natale: **Metal binding ability of histidine-containing peptidehydroxamic acids: Imidazole versus hydroxamate coordination**

Inorganica Chimica Acta, **342** (2009) 753

3. E. Farkas, D. Bátka, E. Csapó, P. Buglyó, W. Haase, D. Sanna: **Synthesis and Characterization of Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} Binding Capability of Some Amino- and Imidazole Hydroxamic Acids: Effects of Substitution of Side Chain Amino-N for Imidazole-N or Hydroxamic-N-H for -N-CH₃ on Metal Complexation**

Polyhedron, **26** (2007) 543

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

1. M. Jarenmark, E. Csapó, E. Farkas, M. Haukka, E. Nordlander: **Unsymmetrical dizinc complex as model for the active sites of phosphohydrolases**

Dalton Trans., *elfogadva (accepted)*

2. H. Müller, B. Bauer-Siebenlist, E. Csapó, S. Dechert, E. Farkas, F. Meyer: **New pyrazole-based ligands with two tripodal binding pockets: Potential scaffolds for metalloprotein modeling**

Inorganic Chemistry, **47** (12) (2008) 5278

Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek (lectures and posters)

1. E. Csapó, E. Farkas, P. Buglyó, M. A. Santos (poszter): **Characterization of Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} binding capability of histidinehydroxamic acid derivatives**

10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 25th – 28th September, 2009, Debrecen, Hungary

2. Csapó E., Farkas E. (előadás): **Hisztidinhidroxámsav származékok oldatbeli kölcsönhatása Cu(II) -, Ni(II) - és Zn(II) -ionokkal**

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

3. E. Csapó, E. Farkas, C. A. Damante, G. Di Natale (angol nyelvű előadás): **Imidazole versus hydroxamate preference in Cu^{2+} and Ni^{2+} complexes of histidine-containing peptidehydroxamic acids**

4th Central European Conference Chemistry towards Biology, 8th – 11th September, 2008, Dobogókő, Hungary

4. E. Farkas, E. Csapó, P. Buglyó, C. A. Damante, G. Di Natale (poszter): **Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ complexes of histidine-containing potential metalloenzyme inhibitor peptidehydroxamic acids: Metal dependent competition between imidazole-*N* and hydroxamate-*N***

4th EuCheMS Conference on Nitrogen Ligands, 24th – 28th August, 2008, Garmisch-Partenkirchen, Germany

5. E. Farkas, D. Bátka, E. Csapó and P. Buglyó (poszter): **Effects of R_N and R_C Substituents on the Metal Binding Capability of Potentially Metalloenzyme Inhibitor Hydroxamic Acids**

2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences, 4th - 8th September, 2007, Wroclaw, Poland

6. E. Csapó, E. Farkas, P. Buglyó, G. Pappalardo, D. Sanna (angol nyelvű előadás): **The role of imidazole in the metal binding ability of histidine containing peptidehydroxamic acids**

2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences, 4th - 8th September, 2007, Wroclaw, Poland

7. Csapó E., Farkas E., Buglyó P., G. Pappalardo (előadás): **Hisztidint tartalmazó peptidhidroxámsavak kölcsönhatása Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)ionokkal,**

XLII. Komplexkémiái Kollokvium, 2007. május 23-25, Mátrafüred, Magyarország

8. Csapó E., Farkas E. (előadás): **Új sziderofór modellek Cu(II), Ni(II) és Zn(II) komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata**

XXIX. Kémiai Előadói Napok, 2006. október 30–31, Szeged, Magyarország

Az értekezéshez nem kapcsolódó előadások és poszterek (lectures and posters not detailed in the thesis)

1. S. Chaves, R. Jelic, E. Csapó, F. A. Danalache, D. Silva, E. Farkas, M. A. Santos (poszter): **Molybdenum(VI) complexation of hydroxy(thio)pyridinones with potential biological significance**

10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 25th – 28th September, 2009, Debrecen, Hungary