

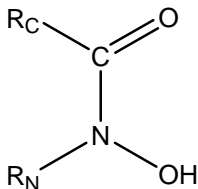
Szakmai beszámoló

az "Új sziderofór modellek fémmegkötő sajátságainak vizsgálata: Hidroxámsavak és fémionok közötti kölcsönhatás szelektivitását befolyásoló tényezők"

c. OTKA pályázathoz

(T 49612)

A hidroxámsavak közül elsősorban a mikrobiális eredetű sziderofórok családjához tartozóak (közülük is leginkább a gyógyászatban is használatos deszferrioxamin B) ismereteseek.¹ Ezek a vegyületek azért, hogy legtöbbször három kelátképző csoportjuk révén igen nagy stabilitású komplexben, szelektíven képesek kötni elsősorban a vas(III)-, de bizonyos körülmények mellett más fémionokat is, lényeges szerepet játszanak a mikroorganizmusok vas és néhány esetben feltételezhetően molibdén felvételében. Az ilyen típusú sziderofórok (melyek nem csupán hidroxamát, hanem katecholát, vagy hidroxipiridinonát típusúak is lehetnek), valamint szintetikus analógjaikat, illetve származékaikat a gyakorlat is elsősorban az igen erős fémmegkötő sajátságuk alapján használja pl. fémkivonásra. Az utóbbi időben azonban kitüntetett figyelem irányul a csak egy hidroxamátot tartalmazó (ílymódon fémion megkötésre kevésbé effektív) és az alábbi általános képlettel jellemezhető monohidroxámsavakra is, melyek számos esetben bizonyítottan, hatékony inhibitorai lehetnek metalloenzimeknek.^{2,3}



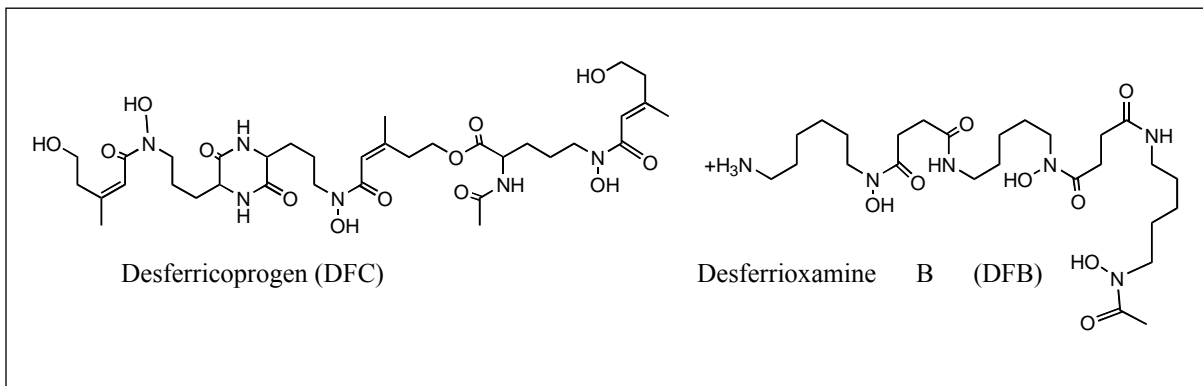
A Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában közel két évtizede mind multikelátor, mind monokelátor típusú hidroxámsavak és hidroxipiridinonátok fémkomplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata folyik azzal az alapvető céllal, hogy az ilyen típusú kelátképzők fémion-megkötő sajátságát, valamint a fémion-szelektivitásukat befolyásoló tényezőket minél szélesebb körben felderítsük. A kapott alapkutatói eredmények hasznosak lehetnek pl. adott fémionra szelektív, vagy adott enzimmel való szelektív kölcsönhatásra kifejlesztendő új ligandumok tervezése során.

A most zárult kutatási program támogatásával az alábbi konkrét területeken folyt jelentősebb eredményeket hozó munka:

- (1) Két trihidroxámsav típusú természetes sziderofór (deszferrioxamin B és deszferrikoprogén) számos fémionnal képezett komplexeinek részletes vizsgálata, majd a kapott eredmények összevetése révén következtetések levonása a kelátképző csoportokat összekötő láncok főbb szerkezeti elemeinek a fémionmegkötésben játszott szerepére.
- (2) Hidroxipiridinon kelátképzőket tartalmazó EDTA-származék komplexképző sajátságainak felderítése.
- (3) Tekintettel az imidazol-gyűrű biológiai rendszerekben megfigyelhető kitüntetett fémion-megkötő szerepére, az R_C szubsztituensben imidazolcsoportot tartalmazó új ligandumok szintézise és fémmegkötő sajátságaik tanulmányozása.

(1) A deszferrioxamin B (DFB) és deszferrikoprogén (DFC) sziderofórok komplexképző sajátosságai és fémionmegkötésük különbözőségeinek értelmezése: Miért lehet a DFC sokkal hatékonyabb az ólom(II)ion megkötésére, mint a DFB?

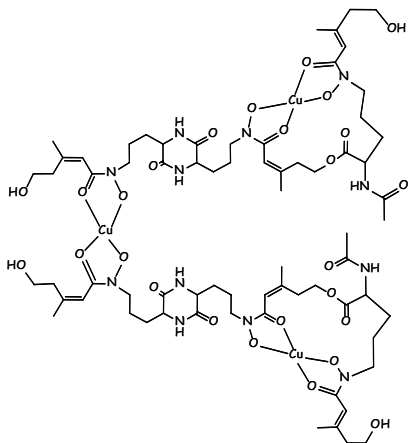
Amint a két tanulmányozott sziderofór alább mutatott képletén látható, mindkét molekula három hidroxámsavcsoportot tartalmaz és eredményeink szerint a megfelelő savi disszociációs állandók is jó egyezést mutatnak. Különbség mutatkozik azonban közöttük a kelátképző csoportokat összekötő láncok tekintetében. Nevezetesen: (i) a DFB-ben a két összekötő lánc minden vonatkozásban teljesen azonos, míg a DFC-belié közül az egyik sokkal merevebb a benne található diketopiperazin gyűrű következtében, mint a stabilis észterkötést tartalmazó másik. (ii) a DFC-beli láncok egy kötésnyivel hosszabbak, mint a DFB-ben találhatóak, (iii) minden egyes hidroxámsavcsoporthoz képest β -helyzetben egy-egy kettőskötés található a DFC láncokban, illetve (iv) a két sziderofórral képződő azonos kötésmódú komplexek protonáltsága (ílymódon töltése, hidrofób/hidrofil sajátossága), a teljesen deprotonált komplexek kivételével (melyek a DFB-vel azonban csak pH *ca* 10 fölött képződnek) különböző. Ennek oka a DFB-ben megtalálható, csupán jóval pH 10 fölött deprotonálódó, a fémion-megkötésben közvetlenül szerepet nem játszó terminális ammóniumcsoport.



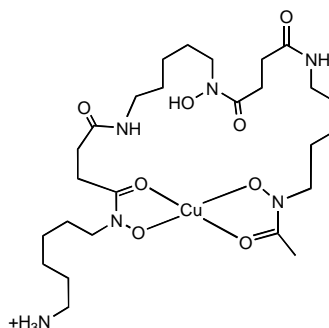
A munka során az említett szerkezeti különbségeknek a fémion-megkötésben játszott szerepét elemeztük, bevonva a vizsgálatokba számos biológiailag, gyógyászati szempontból, vagy orvosdiagnosztikai szempontból fontos fémiont (pl. Fe(III), Ga(III), In(III), Mo(VI), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Ca(II), Mg(II)), de néhány kifejezetten toxikus (pl. Al(III), Pb(II), valamint Cd(II)) fémiont is. A DFC-vel döntően a jelen pályázat keretében készültek az oldategyensúlyi vizsgálatok, míg a DFB-nél több fémionnal is, korábbi munkáink eredményeit^{4,5} vontuk be az összehasonlító elemzésbe, mely az alábbi következtetésekre vezetett:

(i) A szabályos oktaédes geometriájú komplexet képező fémionok közül a relative kisebb ionméretűek (Fe(III), Al(III) és Ga(III)) a rövidebb összekötő láncot tartalmazó DFB-vel, míg a többiek a DFC-vel képeznek valamelyest nagyobb stabilitású trisz-komplexet.

(ii) A Cu(II)ionhoz a síkban maximálisan két hidroxamát koordinálódik, a harmadik révén a DFC, dinukleáris komplexet képezve (Séma 1) fémion fölösleget is képes megkötni, ami azonban a DFB-vel nem következik be. Bizonyítani tudtuk, hogy ennek az eltérésnek az oka abban keresendő, hogy a DFB két szomszédos kelátképző csoportjának ugyanazon réz(II)ionhoz történő koordinálódása nem kedvezményezett, így ezen sziderofórral az 1:1 arányú komplexben a Séma 2-n látható kötésmód a legvalószínűbb, ahol a további fémion megkötés sztérikusan gátolt.

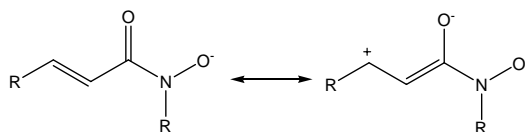


Séma 1: A $[\text{Cu}_3(\text{DFC})_2]$ komplexbeli legvalószínűbb kötésmód



Séma 2: A $[\text{Cu}(\text{DFB})\text{H}_2]^+$ komplexbeli legvalószínűbb kötésmód

(iii) Az ólom(II)ionnal képződő komplexek geometriáját alapvetően a fémion külső elektronhéján található $6s^2$ elektronok viselkedése határozza meg. Nevezetesen az inert elektronpárként jelenlévő $6s^2$ -nek nagy a térigénye, aminek következtében, ilyen komplexben csupán kis térrészre zsúfolt elrendezésben koordinálódhat viszonylag kevés (jellemzően nem több, mint 4) donortom. Egyértelműen bizonyítottuk, hogy ez a jellemző a DFB-vel való komplexképződésre, ahol az 1:1 arányú komplexben a fémionhoz koordinálódó hidroxamátok maximális száma kettő és a szabadon maradó harmadik kelátképző csoportja révén a DFB igen nagy kedvezményezettséggel köt fölős ólom(II)iont. Például, az 1:1 Pb(II)-DFB arányú mintában is a fémionnak közel 80 %-a M_2A_3 -típusú komplexben kötött. Ettől teljesen eltér azonban a DFC-vel szembeni viselkedés, ahol lényegesen nagyobb stabilitású 1:1 arányú komplex képződik (a stabilitásnövekedés a DFB komplexéhez képest 3 nagyságrend) és teljesen alárendelt a dinukleáris komplex képződése. Modell monohidroxámsavakkal kapott eredmények révén is bizonyítottuk, hogy ennek oka elsősorban a hidroxamátok és a hozzájuk képest β -helyzetű kettős kötések közötti konjugáció (Séma 3) következtében megnövekedett kelátstabilitás, melynek eredménye az, hogy a Pb(II)-DFC komplexben a $6s^2$ elektronok is résztvesznek a koordinatív kötések kialakításában. Ez pedig megengedi az oktaédes geometria kialakulását, tehát az 1:1 arányú komplexben mindhárom hidroxamát koordinálódását.

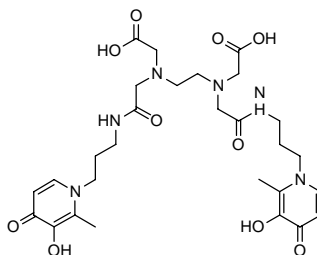


Séma 3: A hidroxamát és a β -helyzetű kettős kötés közötti konjugáció

Közelmúltbeli eredmények továbbá azt is mutatják, hogy a DFC *in vivo* is sokkal hatékonyabb lehet a Pb(II)ion megkötésében, mivel – szemben a DFB-vel – a sokkal hidrofóbabb DFC-nek a sejtfalon történő átjutása bizonyosnak látszik⁶ ([16] I. Pócsi, V. Jeney, P. Kertai, I. Pócsi, T. Emri, Gy. Gyémánt, L. Fésüs, J. Balla, Gy. Balla, Mol. Nutr. Food Res., in press.)

(2) Az EDTA hidroxipiridinon származékainak fémkomplexei

Mióta a deferripron (DFP, 1,2-dimetil-3-hidroxipiridin-4-on), mint a Thalassemia szájon át adva is hatásos gyógyszere (*kb.* 15 éve) a gyógyászatban alkalmazásra került, a kutatók számos új, elsősorban fémion-kivonásra tervezett hidroxipiridinont állítottak elő és vizsgáltak. Ehhez a területhez kapcsolódva, egy lisszaboni laboratóriummal való nemzetközi együttműködésben, a pályázat keretében a Lisszabonban előállított néhány új hidroxipiridinon származéknak, pl az EDTA bisz-hidroxipiridinon származékának (Séma 4) fémmegkötő sajátosságait vizsgáltuk.



Séma 4: A bisz(3-hidroxi-4-piridinon)-EDTA képlete

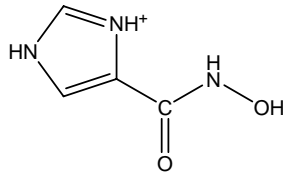
Az oldategyensúlyi vizsgálatok azt bizonyították, hogy a Séma 4. által mutatott ligandum a nagyobb oxidációs állapotú vizsgált fémionokkal (döntően M^{3+}) lényegében csupán hidroxipiridinonát típusú, igen nagy stabilitású komplexeket képez. Ugyanakkor a már kis pH-n bekövetkező karboxil deprotonálódások révén (az egyébként igen gyakran nagyon rosszul oldódó hidroxipiridinonát fémkomplexekhez képest) számottevően megnövekedett oldékonyságú komplexek képződnek. A molibdén(VI) esetében is döntően csak a hidroxipiridinonátok koordinálódnak és a képződő legstabilisabb komplexben az MoO_2^{2+} részecskéhez a ligandum két hidroxipiridinonát kelátja révén kapcsolódik. A ^{17}O NMR eredmények révén viszont e rendszerben bizonyos intermolekuláris átalakulásokra is lehetett következtetni. Az M^{2+} átmeneti fémionokkal (pl. Cu^{2+} , Zn^{2+}) kapott eredmények azonban már egyértelműen azt bizonyították, hogy a kölcsönhatásban nem kizárólagos a hidroxipiridinonátok részvétele és ezen rendszerekben kötési izomerek is jelen vannak, valamint kötémódváltások is bekövetkeznek a pH függvényében.

(3) Imidazolcsoportot tartalmazó új ligandumok szintézise és fémkomplexeik vizsgálata

A közelmúlt évtizedeiben jelentős figyelem fordult a metalloenzimek monohidroxámsavak általi szelektív inhibíálásának a tanulmányozására. Az inhibíció során meghatározó, hogy az inhibítor molekula a hidroxamátcsoportja révén

kölcsönhatásba lép az enzim aktív centrumában található fémion(ok)kal, ezért a gátlás mechanizmusának feltérképezéséhez értékes információkkal járulhatnak hozzá a fémion – monohidroxámsav kölcsönhatások (az azokat befolyásoló tényezők) részletes tanulmányozása révén nyert eredmények. Ismert, hogy a kelátképző csoporton kívül a potenciális inhibítornak rendelkeznie kell legalább egy hidrogén-kötés kialakítására képes molekulárral, valamint egy, vagy több olyan oldallánccal, mely specifikus egyéb kölcsönhatásra (pl. van der Waals kölcsönhatás) képes az enzim alkötőhelyeivel. Folytatva az ebben a témakörben végzett korábbi kutatásainkat, a jelen pályázat során olyan új monohidroxámsavak előállítására és elsősorban Ni^{2+} -, Cu^{2+} - és Zn^{2+} -komplexeik oldategyensúlyi vizsgálata történt, melyek oldalláncukban önmagukban, vagy más donor(ok)kal együtt, a hidroxámsavcsoporthoz képest különböző távolságban imidazolgyűrűt tartalmaztak. A jelentős részben nemzetközi együttműködésben előállított aminosav származékok, aminosav analógok és peptidszármazékok képletét az 5. Séma mutatja.

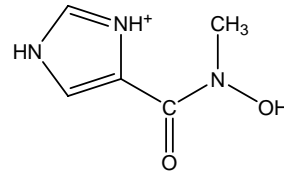
Amino- és imidazolhidroxámsavak:



Imidazol-4-karbohidroxámsav

N-hidroxi-imidazolínium-4-karboxamid

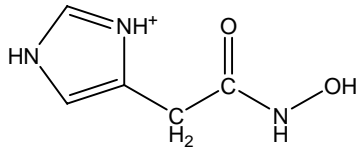
Im-4-Cha (H_2L^+)



N-Metil-Imidazol-4-karbohidroxámsav

N-hidroxi-N-metil-imidazolínium-4-karboxamid

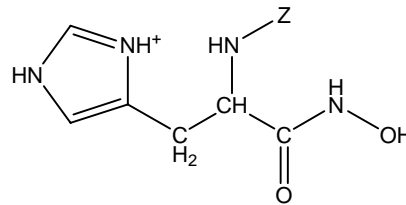
N-Me-Im-4-Cha (H_2L^+)



Imidazol-4-acetohidroxámsav

2-(4-imidazolínium)-N-hidroxiacetamid

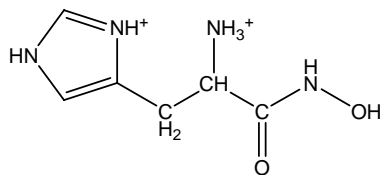
Im-4-Aha (H_2L^+)



Z-hisztidinhidroxámsav

L-N-benziloxikarbonil-N-hidroxi-hisztidilamid

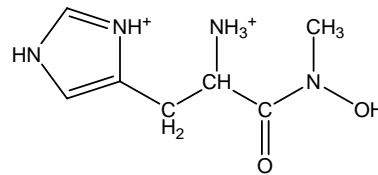
Z-Hisha (H_2L^+)



L-Hisztidinhidroxámsav

L-N-hidroxi-hisztidilamid

Hisha (H_3L^{2+})

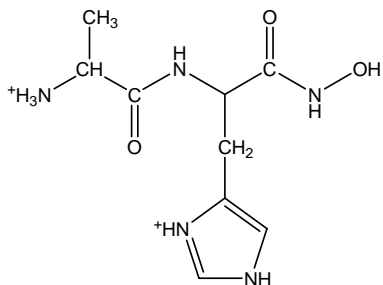


N-Metil-Hisztidinhidroxámsav

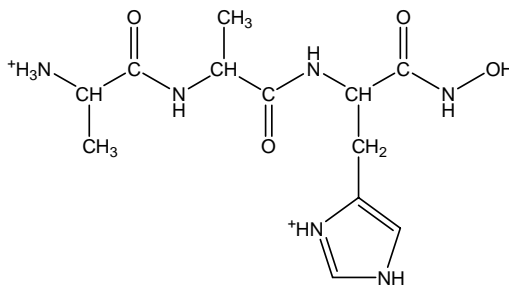
L-N-hidroxi-N-metil-hisztidilamid

N-Me-Hisha (H_3L^{2+})

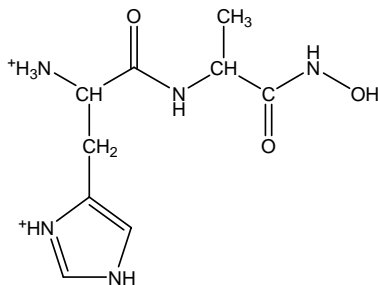
Peptidhidroxámsavak:



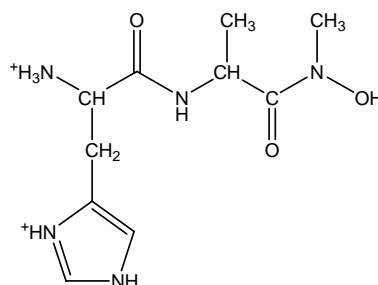
L-Alanil-*L*-hisztidinhidroxámsav
Ala-HisNHOH (H_3L^{2+})



L-Alanil-*L*-alanil-*L*-hisztidinhidroxámsav
Ala-Ala-HisNHOH (H_3L^{2+})



L-Hisztidil-*L*-alaninhidroxámsav
His-AlaNHOH (H_3L^{2+})



N-Metil-*L*-hisztidil-*L*-alaninhidroxámsav
His-AlaN(Me)OH (H_3L^{2+})

Séma 5: Az oldalláncban imidazolgyűrűt tartalmazó vizsgált ligandumok képlete

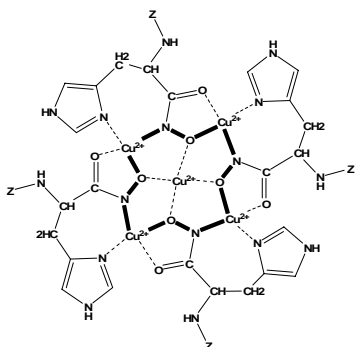
A vizsgálatok eredményeként kapott főbb eredmények az alábbiak:

(i) A legtöbb esetben az imidazol szerepel elsődleges fémion-megkötőként, ami fémiontól függően pH ca. 2.5 – 5 között következik be.

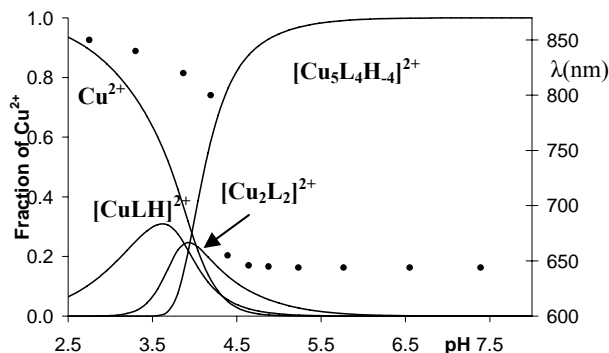
(ii) Az imidazolt, ha hozzáképest kelátképző helyzetben nincs más donoratom, a pH növelésével (a hidrolízist jóval megelőzően) a Zn^{2+} -iont tartalmazó rendszereknél a hidroxamát-kelát kiszorítja a koordinációs szférából (pl. *Z*-Hisha esetében), ílymódon szabadon hagyva azt további kölcsönhatási lehetőségre pl. metalloenzim alkotóhelyekkel. Különösen a Cu^{2+} -ionokkal képződő komplexekben azonban az imidazol szinte mindig koordinálódik a fémionhoz, ami gyakran polinukleáris komplexek képződését eredményezi.

(iii) A hidroxámsavcsoporthoz képest az imidazolcsoportot α - és β -helyzetben tartalmazó Im-4-Cha, Im-4-Aha ligandumokkal nem csupán a Cu^{2+} -, de a Ni^{2+} - és a Zn^{2+} -ionok is

képeznek fémkorona-típusú komplexeket. Ezeket pl. ESI-MS technika révén egyértelműen bizonyítani lehetett. Meglepően, a Cu^{2+} -ionnal az imidazolt a hidroxámsavcsoporthoz γ -helyzetben tartalmazó Z-Hisha is nagy kedvezményezettséggel képezi a 7- és 5-tagú gyűrűk által felépített fémkorona típusú komplexet (Séma 6 és 1. ábra)



Séma 6: A Cu^{2+} -Z-Hisha rendszerben képződő $[\text{Cu}_5\text{L}_4\text{H}_4]^{2+}$ komplexbeli kötési mód

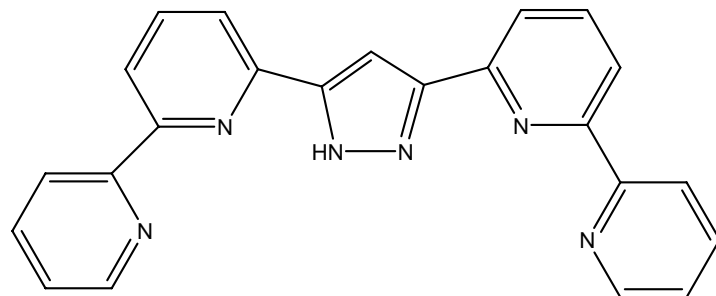


1. ábra: A Cu^{2+} -Z-Hisha rendszerben 1:1 arányánál képződő komplexek koncentrációeloszlása a látható tartománybeli spektrum λ_{max} értékének pH-szerinti változásával.

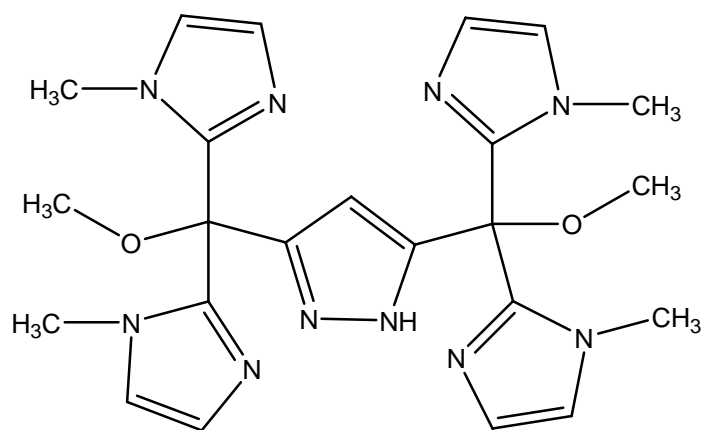
(iv) Amennyiben az imidazol kelátképző helyzetben van (pl. hisztidin, vagy hisztidil-peptid származék), az amino-N és imidazol-N koordinálódása révén képződő un. hisztaminszerű koordináció fémiontól függően, kötési izomereket eredményezve a hidroxámát mellett megjelenik (Zn^{2+}), kb. azonos stabilitással szerepel, ami polinukleáris komplexek képződését eredményezi (Cu^{2+}), illetve szinte kizárólagossá válik (Ni^{2+}).

(v) Amennyiben a tanulmányozott peptidszármazékokban a hisztidil-rész C-terminális helyzetű volt (Ala-His-NHOH, Ala-Ala-His-NHOH), komplexképzés szempontjából a molekula inkább viselkedik peptidszerűen, mint hidroxámsavszerűen.

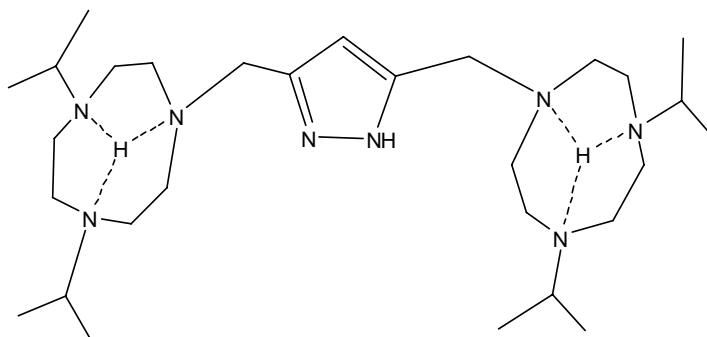
Tekintettel arra, hogy metalloenzim inhibíció esetén az inhibitor koordinálódásához csupán az enzimen (alapesetben a szubsztráttal való kölcsönhatásra) „szabadon” lévő koordinációs helyek állnak rendelkezésre, ezért, további új eredmények várhatóak vegyes ligandumú komplexek tanulmányozása révén. A témában eddig, nemzetközi együttműködésben olyan új ligandumok fémkomplexeit tanulmányoztuk, melyek elsősorban Zn^{2+} fémionnal hidroláz típusú metalloenzimek aktív centrumát modellező stabilis kétmagvú komplexeket képeznek. A Zn^{2+} mellett, minden esetben a Ni^{2+} - és Cu^{2+} -ionokat tartalmazó rendszereket is vizsgáltuk, azaz az un. törzskomplexek vizsgálatát befejeztük és a közeljövőben kezdődik ezen rendszerek és a 6. sémán már bemutatott monohidroxámsavak részvételével képződő vegyes ligandumú komplexek tanulmányozása.



3,5-bis(2,2'-bipiridin-6-il)-1-*H*-pirazol



3,5-bisz[bisz(1-metil-1-*H*-imidazol-2-il)metoximetil]-1-*H*-pirazol



3,5-bisz[4,7-diizopropil-1,4,7-triazonán-1-il]metil]-1-*H*-pirazol

Hivatkozások:

1. A-M. Albrecht-Gary, A. L. Crumbliss, in *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 35 (Eds.: A. Sigel, H. Sigel), Marcel Dekker, New York, 1998.
2. E. M. F. Muri, M. J. Nieto, R. D. Sindelar, J. S. Williamson, *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 1631.
3. D. T. Puerta, S. M. Cohen, *Current Topics in Med. Chem.* 4 (2004) 1551.
4. E. Farkas, H. óka and G. Micera, *J. Inorg. Biochem.*, 65 (1997) 281.
5. E. Farkas, É.A. EnyCsedy and H. Csóka, *Polyhedron*, 18 (1999) 2391.
6. I. Pócsi, V. Jeney, P. Kertai, I. Pócsi, T. Emri, Gy. Gyémánt, L. Fésüs, J. Balla, Gy. Balla, *Mol. Nutr. Food Res.*, in press.