

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**NÉHÁNY SZABAD GYÖK, ILLETVE ÁTMENETIFÉM-
KOMPLEX ENZIMUTÁNZÓ REAKCIÓJA**

Készítette:

Pap József Sándor
okleveles vegyész

Témavezető:

Dr. Speier Gábor
egyetemi tanár

Veszprémi Egyetem
Szerves Kémia Tanszék

2004

I. Bevezetés és célkitűzések

Az aerob élőlényekben lejátszódó oxidációs reakciók jó részét valamilyen oxidoreduktáz enzim katalizálja. Ebben a családba tartoznak a vizsgálataink alapjául szolgáló pirokatechin oxidáz (CO), kvercetin 2,3-dioxigenáz (2,3QD), 1*H*-3-hidroxi-4-oxokinolin 2,4-dioxigenáz (Qdo) és 1*H*-3-hidroxi-4-oxokinaldin 2,4-dioxigenáz (Hod) enzimek, amelyek az aromás vegyületek (*orto*-difenolok, flavonoidok és kinolon származékok) oxidatív bomlási reakcióját katalizálják. Az oxidoreduktázok működése során melléktermékként keletkező reaktív oxigén vegyületek (Reactive Oxygen Species, ROS) számos, betegségekhez vezető káros folyamat iniciálásában vesznek részt. Az élő szervezetek elsődleges védelmi vonalát ezekkel a melléktermékekkel szemben a szuperoxid dizmutáz enzimek (SOD) képviselik, melyek az elsődleges gyökforrás szuperoxid gyök-anion dizmutációját katalizálják.

Az enzimek működési mechanizmusának közvetlen vizsgálata bizonyos esetekben helyettesíthető és kiegészíthető a megfelelő modellreakciók, modellvegyületek tanulmányozásával. Ilyen módon egyszerű modellek segítségével is információhoz juthatunk a természetes enzimek működéséről. Az értekezésben bemutatott munka a következő célkitűzések köré csoportosítható:

1. A réztartalmú CO enzimhez kapcsolódva réz-, illetve cinktartalmú, kétmagvú modellkomplexek megfelelő reakcióinak összehasonlításán keresztül célunk volt annak tisztázása, hogy az enzimatis reakcióban van-e szerepe a fém redoxaktivitásának.

2. A CO enzim szubsztrátuma, a pirokatechin az ún. polifenolok körébe tartozik. Ezen molekulák gyökfogó, illetve antioxidáns sajátága már régóta ismert, s a legújabb kutatások alapján az *orto*-helyzetű fenolos hidroxilcsoportoknak köszönhető. TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinil-oxil) szabad gyök jelenlétében dioxigénnel reagáltatva a 3,5-di-*tert*-butil-pirokatechint (dbcatH₂) szerettük volna a reakció mechanizmusát vizsgálni, ezzel választ kapni arra a kérdésre, hogy minek köszönhető e szerkezet rész kitüntetett szerepe.

3. A 2,3QD enzim korábbi modelljének, a [Cu^{II}(fla)(idpa)]ClO₄ [idpa = 3,3'-imino-bis(*N,N*-dimetil-propil-amin)] komplexnek katalitikus aktivitását vizsgálva 3-hidroxi-flavon (flaH) oxigénezési reakciójában célunk volt annak felderítése, hogy a katalízis során a termék gyors szubsztrátum-termék ligandumcsere során szabadul-e fel, vagy a szubsztrátum már korábban bekapcsolódik a ciklusba.

4. A 2,3QD eddigi modellvegyületeiben a szubsztrátum aktiválása után lépett reakcióba a dioxigénnel. Egyéb oxidázok és oxigenázok működése során feltételezhető dioxigén-komplexek kialakulása a katalízis során. Irodalomból ismert dioxigén-komplexek és flaH reakciójában azt szerettük volna kideríteni, hogy elképzelhető-e az enzimatis reakció lejárásódása ilyen úton, és ha igen, betekintést nyerni az oxigénaktiválás lehetséges mechanizmusába.

5. Az 1,3-bisz(2-piridil-imino)-izoidolin (indH) rézkomplexében flavonol helyett 4H-3-hidroxi-2-metil-benzopirán-4-on-t (mcoH) alkalmazva szubsztrátumként célunk annak kiderítése volt, hogy a 2-es helyzetű szubsztituenscsere a molekulában módosítja-e a reakció kimenetelét és a mcoH alkalmazható-e modellvegyületként.

6. Általánosan elfogadott elképzelés, hogy az 1H-3-hidroxi-4-oxokinolin 2,4-dioxigenáz (Qdo) és az 1H-3-hidroxi-4-oxokinaldin 2,4-dioxigenáz (Hod) enzimekben az oxokinolin származékok oxigénezési reakciója ionos mechanizmussal játszódik le. Újabb elképzelések szerint a reakció gyökös mechanizmussal is végbemehet. Ionos modellreakciók során korábban sikerrel alkalmazott egyszerű szubsztrátumok és 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil szabad gyök (DPPH) reakciójában azt szerettük volna tisztázni, hogy a gyökös mechanizmus szerepet játszhat-e az enzimkatalízis során.

7. A 3-hidroxi-piranon származékok legtöbbje nem toxikus és átmenetifémekkel képes stabilis kelátkötés kialakítására. Ennek alapján célul tűztük ki mangán(II)-komplexeik előállítását és ezek MnSOD utánzó aktivitásának vizsgálatát.

II. Alkalmazott kísérleti módszerek

A levegőre érzékeny anyagokkal végzett preparatív munkát és a kinetikai méréseket Schlenk-technika alkalmazásával, argon atmoszférában végeztük. Az alkalmazott oldószereket víz- és dioxigén-mentesítettük, majd argon atmoszférában levegőtől és fénytől elzárva tartottuk. Az előállított komplexek, az elvégzett reakciók során kapott termékek és közttermékek azonosítása során spektroszkópiai módszereket (UV-vis, IR, ESR), röntgendiffrakciót, gázkromatográfiát, mágneses szuszeptibilitás mérést valamint elemanalízist alkalmaztunk. A kinetikai vizsgálatok során gázvolumetria, vagy UV-vis spektroszkópia segítségével követtük nyomon a reakciókat. A CO modellreakciók során dbcatH₂-t, a 2,3QD modelljeinél flaH-t, illetve mcoH-t, a Qdo és Hod enzimutánzó reakciók során 4-kinolon származékokat állítottunk elő és

alkalmaztunk szubsztrátumként. A SOD utánzó reakciók során *in situ* állítottuk elő a szuperoxid gyök-aniont.

III. Új tudományos eredmények

Pirokatechin oxidáz modellek

1.a. Elemi réz, dtbq és idpa reakciója inert körülmények között $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ komplexet eredményez. Röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás alapján a réz(II)-ionok körüli donortomok torzult négyzetes piramisos geometria szerint helyezkednek el. A DMF-ban végzett ESR vizsgálatok alapján a $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ komplex vegyérték izomerizáció révén $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dbsq})(\text{idpa})]_2$ ($\text{dbsqH} = 3,5\text{-di-}t\text{-}erc\text{-butil-szemikinon gyök}$) komplexszé alakulhat, amelynek az előbbihez viszonyított relatív koncentrációja $\sim 10^{-4}$.

1.b. Cink-perklorát, dbcatH_2 és idpa reakciója során inert körülmények között a $[\text{Zn}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ komplexhez jutottunk. A komplex szerkezete IR spektroszkópiai vizsgálatok alapján a megfelelő $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ komplex mintájára képzelhető el. A komplex inert körülmények között ESR inaktív, dioxigén hatására azonban intenzív kék színű $[\text{Zn}(\text{dbsq})(\text{idpa})]_2^{2+}$ komplex jelenik meg. Az ESR spektrum alapján a szemikinonát ligandumok az oxigén atomjaikon keresztül koordinálódnak a cinkhez, az idpa ligandum viszont csak gyenge kötést létesít vele.

1.c. Elvégeztük a dbcatH_2 reakcióját dioxigénnel DMF-ban a $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ és a $[\text{Zn}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ komplex jelenlétében is. A 3,5-di-*terc*-butil-1,2-benzokinon (dtbq) termék mellett mindkét reakcióban H_2O_2 is keletkezett. Részletes kinetikai vizsgálatok alapján a rézkatalizált reakció bruttó rendje három, a cinkkatalizált reakcióé 2,5. Megállapítottuk, hogy a rézkatalizált reakció során gyors előegyensúlyi lépésben vegyérték izomerizáció révén (szemikinonáto)réz(I)-komplex alakul ki. A szemikinonát komplex kétmagvú peroxo komplex kialakulása során aktiválja a molekuláris oxigént. A sebességmeghatározó lépésben a peroxo komplex hidrogénatomot von el a szubsztrátumtól. Erre utal a dbcatD_2 -nel végzett reakció során mért kinetikus izotópeffektus ($k_{\text{Cu}(\text{rel})} = 2,31$). A reaktánsok aktiválása tehát a réz koordinációs övezetén belül történik. A cinkkatalizált reakció során a katalizátorra kapott $\frac{1}{2}$ -es részrend alapján feltételezzük, hogy a dimer komplex csak kis mértékben disszociál. A keletkező monomer forma dioxigénnel (szemikinonáto)cink-komplexszé és szabad szuperoxid

gyök-anionná reagál, amelyet 2,2'-bisz(4-nitrofenil)-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenilén)-ditetrazolium-klorid (NBT) segítségével sikerült kimutatnunk. A sebességmeghatározó lépésben a szubsztrátum fenolos O–H kötése a jelenlévő szuperoxid gyök-anion hatására homolitikusan felhasad. Ezt a jelentős kinetikus izotópeffektus is alátámasztja ($k_{Zn(rel)} = 4,35$). A cinkkatalízis során tehát a cinkion bázicitása játssza a kulcsszerepet, a reakció a koordinációs övezetén kívül játszódik le. Megállapítottuk, hogy csak a rézkomplex alkalmas CO funkcionális modellezésére és az enzimutánzó reakcióban a réz redoxaktivitása meghatározó szerepet játszik.

2. Vizsgáltuk dbcatH₂ reakcióját dioxigénnel TEMPO szabad gyök jelenlétében, metanol oldószerben. A reakció terméke dtbq és H₂O₂. A kinetikai vizsgálatok eredményeképpen trimolekulás sebességi egyenlethez jutottunk. Előegyensúlyi hidrogénatom transzfer lépés során a TEMPO-ból és a dbcatH₂-ből TEMPOH és dbsqH keletkezik (kinetikus izotópeffektus). A sebességmeghatározó lépésben a dbsqH dioxigénnel alkil-peroxo-vegyületet képez. Erre enged következtetni a dioxigén egyes részrendje. Asszociatív mechanizmusra utal továbbá az aktiválási entrópia nagy negatív értéke is ($-84 \pm 32 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) és az, hogy NBT-dal nem tudtunk szabad szuperoxidot kimutatni. Vizsgáltuk a reakció oldószerfüggését és megállapítottuk, hogy széntetrakloridban a reakció jóval lassabban játszódik le. Ennek alapján feltételezzük, hogy a metanol oxigénatomja nemcsak a dbcatH₂ fenolos OH-csoportjával, hanem a dbsqH hidroxilcsoportjával is hidrogénhidat képez. Előbbi gátolja a szubsztrátum és a TEMPO közötti hidrogénatom átmeneti lépést, utóbbi növeli a dbsqH dioxigénnel szembeni reaktivitását. A reakció sebességét tehát a két hatás együttesen szabja meg.

Kvercetin 2,3-dioxigenáz modellek

3. A korábban azonosított szerkezetű [Cu^{II}(fla)(idpa)]ClO₄ komplex aktív katalizátornak bizonyult flaH oxigénezési reakciójában, melynek során O-benzoil-szalicilsavat (O-bsH) és CO-t kaptunk termékként DMF oldószerben. Az elvégzett kinetikai mérések alapján a katalitikus reakció bimolekulás sebességi egyenlet szerint játszódik le, a szubsztrátum kiindulási koncentrációja nem befolyásolja a reakció sebességét. A katalízis egy ciklusára feltételezett mechanizmus megfelel a [Cu^{II}(fla)(idpa)]ClO₄ autoxidációs reakciójára javasoltakkal. Ezt támasztja alá az autoxidációs és a katalitikus reakcióra számított sebességi állandók jó egyezése. Megállapítottuk, hogy a szubsztrátumnak nincs szerepe a katalitikus ciklusban és csupán

a ciklus végén, gyors cserereakció során szorítja ki a gyengébben koordinálódó *O*-bsH-t a komplexből.

4. Előállítottunk két, irodalomból ismert réz-dioxid komplexet $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O})_2(\text{Bz-TAC})_2](\text{ClO}_4)_2$ (Bz-TAC = 1,4,7-tribenzil-1,4,7-triaza-ciklononán) és $[\text{Cu}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)(\text{iPr-TAC})_2](\text{ClO}_4)_2$ (iPr-TAC = 1,4,7-tri-izopropil-1,4,7-triaza-ciklononán) összetétellel, melyeknek flaH-lal inert körülmények között lejátszódó reakciója CH_2Cl_2 -ban új, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{iPr-TAC})]\text{ClO}_4$ és $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{Bz-TAC})]\text{ClO}_4$ összetételű vegyületekhez vezetett. A termékek szerkezetét spektroszkópai módszerekkel azonosítottuk, a Bz-TAC ligandummal képzett komplex esetében a röntgendiffrakciós vizsgálat alapján a réz körüli donoratombok torzult négyzetes piramisos geometria szerint helyezkednek el. A flavonolát komplexek DMF oldószerben végzett autoxidációs reakciója $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{O-bs})(\text{Bz-TAC})]\text{ClO}_4$, illetve $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{O-bs})(\text{iPr-TAC})]\text{ClO}_4$ terméket eredményez. A röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás alapján mindkét komplex centruma torzult négyzetes piramis geometriával írható le. Az autoxidációs reakciók sebességi állandói egy nagyságrenddel kisebbek a $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpa})]\text{ClO}_4$ komplexénél, mechanizmusuk – feltételezésünk szerint – megegyezik az utóbbiéval. Bizonyítottuk, hogy sem a dioxo-, sem a peroxo-diréz komplex és flaH reakciójában nem képződik enzimatiszus termék. A megfelelő flavonoláto-komplexek viszont alkalmasnak bizonyultak az enzimatiszus reakció modellezésére. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy az enzim esetében is a koordinatív kötéssel aktivált szubsztátum reagál a jelenlévő dioxigénnel.

5. Réz(II)-dimetoxid, indH és mcoH reakciójában inert körülmények között $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ind})(\text{mco})]$ komplexet kaptunk termékként. A komplex szerkezetét egyebek mellett röntgendiffrakció segítségével azonosítottuk. A réz körüli koordinációs szféra geometriája torzult négyzetes piramis poliéderrel jellemezhető. A komplex autoxidációs reakciója $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{asp})(\text{ind})]$ (aspH = acetyl-szalicilsav) összetételű terméket szolgáltat, melyet szilárd formában IR spektroszkópiával, illetve hidrolizált termékeit GC segítségével azonosítottuk. A $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{sal})(\text{ind})(\text{H}_2\text{O})]$ (salH = szalicilsav) szekunder terméket dimetoxi-réz(II), indH és salH reakciójában is előállítottuk, szerkezetét röntgendiffrakcióval azonosítottuk, aminek alapján a koordinációs övezet torzult négyzetes piramisos geometriával írható le. Vizsgálataink alapján a mcoH alkalmazható szubsztátumként a kvercetin 2,3-dioxigenáz enzim modellreakciói során, a termékösszetétel alapján a reakció mechanizmusa megegyezik a flavonolát komplexek esetében javasolttal.

6. A kofaktor nélküli dioxigenáz enzimek modellreakcióiként DPPH szabad gyököt és oxokinolin származékokat (PhQuinH = 1*H*-2-fenil-3-hidroxi-4-oxokinolin, *N*-MePhQuinH = *N*-metil-2-metil-3-hidroxi-4(1*H*)-oxokinolin, 2-MeQuinH = 1*H*-2-metil-3-hidroxi-4-oxokinolin), illetve flaH-t reagáltattunk acetonitrilben. A reakciók során az enzimatiszikus útnak megfelelő gyűrűhasadt termékeket kaptuk (GC-MS). Az *N*-MePhQuinH esetében részletes kinetikai vizsgálatokat végeztünk, aminek eredményeképpen bimolekulás sebességi egyenlethez jutottunk. Méréseink alapján a reakciósebesség független a dioxigén koncentrációjától. Ennek alapján a sebességmeghatározó lépésben a DPPH és a megfelelő szubsztátum közötti hidrogénatom átmeneti reakcióban DPPH₂ és a megfelelő gyökös intermedierek keletkeznek. Kísérleteink azt bizonyítják, hogy az eddig feltételezett ionos mechanizmus mellett a gyökös mechanizmus is szerepet játszhat az enzimkatalízisben.

MnSOD utánzó vegyületek

7. Különböző 3-hidroxi-pirán származékok (etmalH = 4*H*-2-etil-3-hidroxi-pirán-4-on, flaH, hmcphH = 2-hidroxi-3-metil-2-ciklopentén-1-on, kojH = 4*H*-5-hidroxi-2-(hidroximetil)-pirán-4-on, malH = 4*H*-2-metil-3-hidroxi-pirán-4-on, quercH = 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavon, vagy kvercetin) és mangán(II)-perklorát reakciójában inert körülmények között a megfelelő [Mn(L)₂] (LH = etmalH, flaH, hmcphH, kojH, malH, quercH) komplexeket sikerült előállítanunk, melyeket spektroszkópiai módszerekkel azonosítottunk. A [Mn(fla)₂(py)₂] komplexet egykristály formájában is előállítottuk. A röntgendiffrakciós vizsgálat alapján a komplex oktaédres geometriával írható le és a flavonolátó-ligandumok egymáshoz képest *transz*-helyzetben találhatók. Indirekt módszerekkel (xantin/xantin oxidáz és riboflavin/metionin rendszer) vizsgáltuk az előállított vegyületek MnSOD utánzó aktivitását. A számított *k*_{SOD} sebességi állandók között a két módszer esetében nagyságrendi eltérést tapasztaltunk, ami azzal magyarázható, hogy a teljes MnSOD aktivitás nem rendelhető egyértelműen a bevitt [Mn(L)₂] komplexekhez, feltételezhetően vegyesligandumú komplexek is képződnek, illetve a komplex disszociál. Ezt támasztja alá az is, hogy kisebb pH értéknél mértünk nagyobb aktivitást, ahol a [Mn(L)₂] stabilitása kisebb, így a képződő egyéb vegyületek, illetve a nagyobb aktivitást mutató mangán(II)-ion nagyobb arányban van jelen.

IV. A tudományos eredmények jelentősége

Az értekezésben bemutatott munka alapkutatás jellegű, így az eredmények elsősorban tudományos ismereteink bővítését szolgálják. Az egyes oxidáz és dioxigenáz enzimekhez kapcsolódó vizsgálataink mellett, hogy közelebb visznek minket az enzimek hatásmechanizmusának megértéséhez, preparatív szempontból is jelentőséggel bírnak, mint igen nagy kemoszelektivitású homogénkatalitikus eljárások. A MnSOD utánzó vegyületek jelentőségét az adja, hogy a kelátképzőként használt vegyületek viszonylag nagy mennyiségben kerülnek az emberi szervezetbe, így a mangánnal képzett komplexeik ilyen jellegű hatásának felderítése indokolt.

V. A doktori értekezés témaköréhez kapcsolódó tudományos közlemények, posztterek és előadások

Közlemények:

1. L. Barhács, J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier
Kinetics and mechanism of the stoichiometric oxygenation of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpaH})]\text{ClO}_4$ [fla = flavanolate, idpaH = 3,3'-iminobis(*N,N*-dimethylpropylamine)] and the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpaH})]\text{ClO}_4$ – catalysed oxygenation of flavonol
Inorg. Chim. Acta, **320**, 83 (2001)
2. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier
The role of metals in model reactions of catechol oxidases
J. Inorg. Biochem., **86**, 371 (2001)
3. É. Balogh-Hergovich, J. Kazer, Á. Kupán, **J. Pap**, E. Speier, G. Speier
Tuning the chemoselectivity and mechanism in the reaction of some catecholate and flavonolate complexes with dioxygen
J. Inorg. Biochem., **86**, 100 (2001)
4. J. Kaizer, **J. Pap**, E. Speier and G. Speier
The Role of Metals, Ligands and Solvents in Model Reactions of Oxidases
Challenges for Coordination Chemistry in the New Century, edited by M. Melnik and A. Sirota
Slovak Technical University Press, Bratislava 2001, p. 201
5. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, L. Korecz, A. Rockenbauer
Synthesis, structure and catecholase activity of dinuclear copper and zinc complexes with an N3-ligand
J. Inorg. Biochem., **91**, 190 (2002)

6. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier
TEMPO-catalysed oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol
Polyphenols Comm., vol. 1., 31, (2002)
7. R. Csonka, J. Kaizer, **J. Pap**, and G. Speier
Kinetics and Mechanism of Stable Radicals with Phenolic Antioxidants
Free Radical Research, **37**, 46 (2003)
8. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, L. Párkányi
The Reaction of $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Peroxo- and Bis(μ -oxo)dicopper Complexes with Flavonol
Eur. J. Inorg. Chem., 2253 (2004)
9. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, and L. Párkányi
Crystal structure of aqua[1,3-bis(2-pyridylimino)isoindolato] (salicylato)-copper(II), $\text{Cu}(\text{C}_7\text{O}_3\text{H}_4)(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5)(\text{H}_2\text{O})$
Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures **219**, 141 (2004)
10. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, M. Reglier, G. Michel
Synthesis, properties, and crystal structure of a novel 3-hydroxy-(4*H*)-benzopyran-4-one containing copper(II) complex, and its oxygenation and relevance to quercetinase
Trans. Met. Chem. (megjelenés alatt)

Poszterek:

1. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
The role of metals in model reactions of catechol oxidases
10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, Florence, Italy, Aug. 26-31, 2001
2. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
TEMPO-catalysed oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol
XXI. International Conference on Polyphenols, Marrakech-Morocco, September 9-12, 2002
3. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
The Reaction of $\mu\text{-}\eta^2$ -Peroxo- and Bis(μ -oxo)Dicopper Complexes with Flavonol
XXXVth International Conference on Coordination Chemistry, Heidelberg, July 21-26, 2002
4. Róbert Csonka, József Kaizer, **József Pap** and Gábor Speier
Kinetics and Mechanism of Stable Radicals with Phenolic Antioxidants
Conference on „Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants”, Freising-Weihenstephan, September 10-13, 2003

Előadások:

1. Kaizer József, **Pap József**, Speier Gábor
3-Hidroxi-flavon réz(II)-katalizált oxigénezési reakciójának kinetikai vizsgálata
XXXV. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2000. május 24-26, Kecskemét
Előadáskivonatok, 33. o.
2. Kaizer József, **Pap József**, Speier Gábor
A fém szerepe oxidáz enzimekben: funkcionális pirokatechin oxidáz modellek vizsgálata
XXXVI. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2001. május 23-25, Pécs
Előadáskivonatok, 46. o.
3. Kaizer József, **Pap József**, Speier Gábor
3,5-Di-*tert*-butil-pirokatechin TEMPO-katalizált oxidációja (a hidrogénatom-transzfer reakciók szerepe homogénkatalitikus rendszerekben)
XXXVII. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2002. május 29-31, Mátraháza
Előadáskivonatok, 19. o.
4. Kaizer József, **Pap József**, Speier Gábor
Kétmagvú ($\mu, \eta^2: \eta^2$ -peroxo)-réz(II)- és bisz-(μ -dioxo)-réz(III)-komplexek előállítása 1,4,7-triaza-ciklononán származékokkal, és reakciójuk flavonollal
XXXVIII. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2003. május 21-23, Gyula
Előadáskivonatok, 25. o.
5. **Pap József**, Speier Gábor
3-Hidroxi-piranon származékok mangán(II)-komplexeinek SOD aktivitása
XXXIX. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2004. május 26-28, Agárd-Gárdony
Előadáskivonatok, 50. o.

VI. A doktori értekezés témaköréhez szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények, poszterek és előadások

Közlemények:

1. J. Kaizer; **J. Pap** and G. Speier
Catechol Oxidase and Dioxygenase Activity of Copper and Zinc Complexes with N_3 -ligands
J. Inorg. Biochem., **74**, 303 (1999)
2. J. Kaizer, A. Kupan, **J. Pap**, G. Speier, M. Reglier, G. Michel
Crystal structure of [3,3'-iminobis(*N,N*-dimethylpropylamine)](flavonolato)zinc(II) perchlorate, [Zu(flav)(idpaH)]ClO₄
Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures **215** (2000) 571
3. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, M. Reglier and M. Giorgi
Crystal structure of $\{(\mu\text{-carbonato})\text{bis}[3,3'\text{-iminobis}(\textit{N,N}\text{-dimethylpropylamine})]\text{copper(II)}\}$ diperchlorate hydrate, [(Cu(idpa))₂(CO₃)](ClO₄)₂·H₂O

4. É. Balogh-Hergovich, J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, G. Huttner, L. Zsolnai
Copper-mediated Oxygenolysis of Flavonols via Endoperoxide and Dioxetan
Intermediates; Synthesis and Oxygenation of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Phen})_2(\text{Fla})]\text{ClO}_4$ and
 $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L})(\text{Fla})_2]$ [FlaH = Flavonol; L = 1,10-Phenanthroline (Phen), 2,2'-Bipyridine
(Bpy), *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TMEDA)] Complexes
Eur. J. Inorg. Chem., 2287 (2002)

Poszter:

1. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
Nonenzymatic Model Reactions of Quercetin 2,3-Dioxygenase Using Copper
Flavanolate Complexes with a Tridentate Ligand
Hungarian Cost Chemistry Day, Oct. 20, 2000, Budapest

Előadás:

1. Kaizer József, **Pap József**, Speier Gábor
Réz- és cinktartalmú funkcionális pirokatechin dioxigenáz és oxidáz modellek
vizsgálata
XXXIV. Komplexkémiái Kollokvium, 1999. május 19-21, Tata
Előadáskivonatok 14. o.

THESIS OF PhD DISSERTATION

**ENZYME MODELING REACTIONS OF SOME FREE
RADICALS AND TRANSITION METAL COMPLEXES**

Written by:
József Sándor Pap

Supervisor:
Dr. Gábor Speier

University of Veszprém
Department of Organic Chemistry

2004

I. Introduction and objectives

Oxidation reactions are usually catalyzed by oxidoreductase enzymes in aerob organisms. Catechol oxidase (CO), quercetin 2,3-dioxygenase (2,3QD), 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase (Qdo) and 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase (Hod) belong to this group of enzymes that catalyze the oxidative decay of stable compounds (ortho-diphenols, flavonoids and quinolone derivatives) during the aromatic biodegradation. Our studies have relevance to these enzymes. Oxidoreductases produce also reactive oxygen species (ROS) as byproduct which initiate several harmful processes and enhance the formation of diseases. Superoxide dismutases (SOD), which catalyze the dismutation reaction of superoxide anion, the primary radical source, are the first defense line against ROS.

The investigation of enzymatic functions can give information about their mode of action by studying of model reactions and model complexes. Along that spectral and mechanistic information can be gathered about the natural enzymes. The present work can be structured according to the following aims:

1. In terms of the copper containing CO enzyme our aim was to elucidate the role of the redox activity of the copper ion during the enzymatic reaction by comparison of the corresponding model reactions of dimeric copper and zinc complexes.

2. Catechol, the substrate for the CO enzyme, is a polyphenol. Although spin trapping and antioxidant properties of these molecules are known for a long time only latest studies cleared up that the ortho-phenolic hydroxyl groups are responsible for this behavior. Our aim was to react dioxygen and 3,5-di-*tert*-butylcatechol (dbcatH₂) in the presence of the free radical 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) in order to study the reactivity of our substrate with O₂ mediated by free radicals.

3. In relation to the 2,3QD enzyme our goal was to clarify the substrate-product exchange mechanism by investigating the catalytic oxygenation reaction of 3-hydroxyflavone (flaH) in the presence of the model complex [Cu^{II}(fla)(idpa)]ClO₄ [idpa = 3,3'-imino-bis (*N,N*-dimethylpropylamine)].

4. In the 2,3QD model reactions that has been performed until now, the activated substrate reacted with dioxygen. In the of other oxidases and dioxygenases the formation of dioxygen complexes can be assumed. Our object was to prepare known dioxygen complexes and react them with flaH in order to clarify this possible pathway.

5. By using 4*H*-3-hydroxy-2-methyl-benzopyran-4-on (mcoH) instead of flaH in the copper(II) complex of 1,3-bis(2-pyridylimino)-isoindoline (indH) we aimed to elucidate the effect of the substituent in the substrate on the outcome of the reaction.

6. Generally held opinion is that the oxygenation of oxoquinolines in Qdo and Hod dioxygenase enzymes takes place by an ionic mechanism. Recently the idea of a possible radical pathway has come up. In the reaction of 2,2-diphenyl-1-ptycrylhydrazyl free radical (DPPH) and previously used model substrates we wished to prove this assumption.

7. Most of the 3-hydroxypyranone derivatives are able to form stable chelate ring with transition metals. We aimed to prepare new manganese(II) complexes using 3-hydroxypyranones as ligands and determine their SOD-like activity.

II. Experimental methods

Preparative work with air-sensitive materials and kinetic measurements were performed using standard Schlenk-technique under argon atmosphere. Solvents were dried and distilled under argon atmosphere according to standard procedures. Several separation and analytical methods (GLC, UV-Vis, IR, MS, EPR, magnetic susceptibility, elemental analyses) were used to separate and characterize the intermediates and products. Gas volumetry or electron spectroscopy was used for monitoring the conversion of the substrates at the kinetic measurements. For the CO model reactions dbcatH₂, for the 2,3QD model reactions flaH and mcoH, and for the Qdo and Hod biomimetic reaction 4-quinolon derivatives were used as substrates. Along SOD mimic assays the superoxide anion has been produced *in situ*.

III. New scientific results

Models for catechol oxidase

1.a. Reaction of Cu⁰, 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone (dtbq) and idpa results in [Cu^{II}(dbcat)(idpa)]₂. On the basis of X-ray diffraction experiments the coordination sphere around the copper(II) ion is distorted square pyramidal. EPR spectroscopic investigations showed that the [Cu^{II}(dbcat)(idpa)]₂ complex transforms into a

$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dbsq})(\text{idpa})]_2$ ($\text{dbsqH} = 3,5\text{-di-}i\text{-tert-butylsemiquinone}$) form by valence tautomerism with a concentration of 10^{-4} relative to copper(II) species.

1.b. The reaction of zinc perchlorate, dbcatH_2 and idpa gives $[\text{Zn}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ under inert atmosphere. The structure of the zinc complex can be described as the same of the copper complex on the basis of the IR spectroscopic studies. $[\text{Zn}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ was found to be EPR silent under Ar atmosphere, but in the reaction with dioxygen or under air gives dark blue EPR-active $[\text{Zn}(\text{dbsq})(\text{idpa})]_2^+$. By reason of the EPR results semiquinonate ligand is coordinated to the zinc ion with its phenolic oxygen atoms while the N-donor idpa ligand is only weakly coordinated.

1.c. Catalytic reaction of dbcatH_2 with dioxygen has been performed in the presence of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ or $[\text{Zn}(\text{dbcat})(\text{idpa})]_2$ complex in DMF solvent. Reactions gave dtbq and H_2O_2 as final products. On the basis of particular kinetic investigations the copper-catalyzed reaction has an overall kinetic order of three, in the zinc-catalyzed reaction this value is 2.5. In the copper-catalyzed reaction copper(I) semiquinonate is formed in the first step. This intermediate is able to activate molecular oxygen and forms a (peroxo)dicopper species which abstracts one atom of hydrogen from the substrate in the rate-determining step. The measured kinetic isotope effect ($k_{\text{Cu}(\text{rel})} = 2.31$) supports this assumption. Activation of the reactants takes place in the coordination sphere of the copper, consequently. Whereas the dimer zinc-complex dissociates into monomers only in a low rate that is supported by the 0.5 partial order for the catalyst in the rate equation. The monomeric form reacts with dioxygen to result in a zinc semiquinonate complex and free superoxide anion which has been proved with the positive 2,2'-bis(4-nitrophenyl)-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylene)-ditetrasolium chloride (NBT) test. Homolytic dissociation of the phenolic O-H bond of the substrate takes place in the rate-determining step due to the presence of the free superoxide anion. This is supported by the significant kinetic isotope effect ($k_{\text{Zn}(\text{rel})} = 4.35$). It can be ascertained that only the basicity of the zinc ions plays a role in the catalytic cycle. To sum up, it can be stated, that only the copper-containing system can be regarded as an appropriate CO model due to the redoxactive property of copper.

2. Reaction between dbcatH_2 and dioxygen in the presence of TEMPO gave dtbq and H_2O_2 as final products. Detailed kinetic measurements led to an equation where first order dependence has been found for all reactants. In the first step of the catalytic reaction H-atom transfer from the substrate to the TEMPO free radical gives dbsqH and TEMPOH and the low kinetic isotope effect excludes the H-atom transfer to be the rate-

limiting step. The rate-determining step was found to be the reaction of semiquinone intermediate and dioxygen which provides an alkylperoxo species that has been proved by the first order dependence of dioxygen. Associative mechanism is supported by the large negative value of the activation entropy ($-84 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) and by the negative NBT test for the free superoxide anion. Solvent dependence of the reaction has also been investigated. In CCl_4 the reaction showed much lower rate than in MeOH which allows us to draw the consequence that the oxygen atom of the methanol molecule is bound with hydrogen bond to the catechol and to the semiquinone intermediate either. Former inhibits the H-atom transfer reaction whereas the second enhances the reactivity of semiquinone against dioxygen. Rate of the reaction is determined by these two effects.

Models for quercetin 2,3-dioxygenase

3. The previously characterized $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpa})]\text{ClO}_4$ was found to be active catalyst in the catalytic oxygenation reaction of flaH where *O*-benzoylsalicylic acid (*O*-bsH) and CO were formed as products in DMF solution. Performed kinetic investigations resulted in a bimolecular rate equation, moreover the substrate concentration unaffected the reaction rate. Mechanism of the catalytic cycle corresponds to the previously suggested one for the autoxidation of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpa})]\text{ClO}_4$. Similar rate constants for the catalytic and autoxidation reactions support these results. Substrate has been established to push out the product *O*-bsH from the complex only in the closing step of the cycle.

4. Two types of dicopper dioxygen complexes – namely $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O})_2(\text{Bz-TAC})_2](\text{ClO}_4)_2$ and $[\text{Cu}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)(i\text{Pr-TAC})_2](\text{ClO}_4)_2$ (Bz-TAC = 1,4,7-triaza-1,4,7-tribenzylcyclononane and *i*Pr-TAC = 1,4,7-triaza-1,4,7-tri-isopropylcyclononane) – has been prepared according to literature data. Reaction of the complexes and flaH resulted the corresponding $[\text{Cu}(\text{fla})(\text{Bz-TAC})]\text{ClO}_4$ and $[\text{Cu}(\text{fla})(i\text{Pr-TAC})]\text{ClO}_4$ complexes under argon atmosphere. X-ray structural analysis showed a distorted square pyramidal geometry around the copper center in the case of Bz-TAC ligand. Autoxidation of flavonolate complexes in DMF resulted in the corresponding *O*-bsH in good yield. X-ray diffraction studies revealed distorted square pyramidal geometry around the copper center with both ligands. Rate constants for the reactions are one order of magnitude lower than it was found in the case of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpa})]\text{ClO}_4$. Hence enzymatic product is formed only in the reaction of flavonolate complexes with dioxygen, the consequence

can be drawn, that in the enzymatic system the coordinated substrate is able to react with the molecular oxygen.

5. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ind})(\text{mco})]$ has been synthesized in the reaction of mcoH and indH with dimethoxy copper(II). The structure of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ind})(\text{mco})]$ has been identified as a distorted square pyramid by X-ray diffraction. Autoxidation of the complex provided $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{asp})(\text{ind})]$ (aspH = acetylsalicylic acid) as product which has been characterized with IR spectroscopy in solid state. Its hydrolyzed derivatives has also been identified using GC. The secondary product $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ind})(\text{sal})(\text{H}_2\text{O})]$ (salH = salicylic acid) complex (distorted square pyramidal geometry, X-ray diffraction) has been prepared in the reaction of dimethoxy copper(II), indH and salicylic acid, too. The low molecular weight mcoH has been found to be an appropriate model substrate for 2,3QD model reactions which is supported by the identified enzyme-like products.

Qdo and Hod models

6. Functional model reactions of cofactorless dioxygenases have been performed in MeCN using DPPH free radical and oxoquinoline derivatives (PhQuinH = 1*H*-2-phenyl-3-hydroxy-4-oxoquinoline, *N*-MePhQuinH = *N*-methyl-2-methyl-3-hydroxy-4(1*H*)-oxoquinoline, 2-MeQuinH = 1*H*-2-methyl-3-hydroxy-4-oxoquinoline) or flaH as model substrates. In the reactions enzyme-like ring-cleaved products have been identified (GC-MS). In the case of *N*-MePhQuinH detailed kinetic measurements resulted in a bimolecular rate equation. Dioxygen concentration has no effect on the reaction rate so the rate-determining H-atom transfer reaction from the substrate to the free radical must precede the fast reaction between dioxygen and reactive radical intermediates. Our studies prove that a possible radical pathway may take part in the enzymatic process by the so far presumed ionic mechanism.

MnSOD mimic complexes

7. We succeeded to synthesize and characterize new manganese(II) complexes using 3-hydroxypyranone derivatives (etmalH = 4*H*-2-ethyl-3-hydroxypyran-4-on, flaH, hmcphH = 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentene-1-on, kojH = 4*H*-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-pyran-4-on, malH = 4*H*-2-methyl-3-hydroxypyran-4-on, quercH = 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon, or quercetin) and manganese(II) perchlorate. On the

basis of crystallographic analysis of the octahedral $[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{fla})_2(\text{py})_2]$ complex the flavonolate ligands occupy the equatorial positions. Superoxide dismutating activity of the manganese species has been determined utilizing indirect methods (xanthin / xanthin oxidase and riboflavin / methionin superoxide generating system). Observed k_{SOD} constants showed one order of magnitude difference depending on the applied method that can be explained by the partial dissociation of the precursor $[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{L})_2]$ (LH: etmalH, flaH, hmcphH, kojH, malH, querchH) and by the formation of some mixed ligand complexes. Higher activity has been measured at lower pH, where the $[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{L})_2]$ complexes have lower stability so it is very likely that free manganese and mixed ligand species appear in higher concentration.

IV. Importance of the results

The outlined work can be regarded as a basic research and contributes to our scientific knowledge. Investigations on oxidase and dioxygenase model reactions help us to understand some aspects of the enzymatic function. However, the reactions have preparative importance as well, as very chemoselective, homogenous catalytic methods. Significance of the MnSOD mimicking complexes is based on the natural, non-toxic chelating agents used which get to the human body in a relatively high quantity.

V. Articles, posters and lectures in relation to PhD thesis

Articles:

1. L. Barhács, J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier
Kinetics and mechanism of the stoichiometric oxygenation of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpaH})]\text{ClO}_4$ [fla = flavanolate, idpaH = 3,3'-iminobis(*N,N*-dimethylpropylamine)] and the $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{fla})(\text{idpaH})]\text{ClO}_4$ – catalysed oxygenation of flavonol
Inorg. Chim. Acta, **320**, 83 (2001)
2. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier
The role of metals in model reactions of catechol oxidases
J. Inorg. Biochem., **86**, 371 (2001)
3. É. Balogh-Hergovich, J. Kazer, Á. Kupán, **J. Pap**, E. Speier, G. Speier
Tuning the chemoselectivity and mechanism in the reaction of some catecholate and flavonolate complexes with dioxygen
J. Inorg. Biochem., **86**, 100 (2001)

4. J. Kaizer, **J. Pap**, E. Speier and G. Speier
The Role of Metals, Ligands and Solvents in Model Reactions of Oxidases
Challenges for Coordination Chemistry in the New Century, edited by M. Melnik and A. Sirota
Slovak Technical University Press, Bratislava 2001, p. 201
5. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, L. Korecz, A. Rockenbauer
Synthesis, structure and catecholase activity of dinuclear copper and zinc complexes with an N3-ligand
J. Inorg. Biochem., **91**, 190 (2002)
6. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier
TEMPO-catalysed oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol
Polyphenols Comm., vol. 1., 31, (2002)
7. R. Csonka, J. Kaizer, **J. Pap**, and G. Speier
Kinetics and Mechanism of Stable Radicals with Phenolic Antioxidants
Free Radical Research, **37**, 46 (2003)
8. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, L. Párkányi
The Reaction of $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Peroxo- and Bis(μ -oxo)dicopper Complexes with Flavonol
Eur. J. Inorg. Chem., 2253 (2004)
9. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, and L. Párkányi
Crystal structure of aqua[1,3-bis(2-pyridylimino)isoindolato] (salicylato)-copper(II), $\text{Cu}(\text{C}_7\text{O}_3\text{H}_4)(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5)(\text{H}_2\text{O})$
Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures **219**, 141 (2004)
10. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, M. Reglier, G. Michel
Synthesis, properties, and crystal structure of a novel 3-hydroxy-(4*H*)-benzopyran-4-one containing copper(II) complex, and its oxygenation and relevance to quercetinase
Trans. Met. Chem. (in the press)

Posters:

1. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
The role of metals in model reactions of catechol oxidases
10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, Florence, Italy, Aug. 26-31, 2001
2. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
TEMPO-catalysed oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol
XXI. International Conference on Polyphenols, Marrakech-Morocco, September 9-12, 2002
3. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
The Reaction of $\mu\text{-}\eta^2$ -Peroxo- and Bis(μ -oxo)Dicopper Complexes with Flavonol

XXXVth International Conference on Coordination Chemistry, Heidelberg, July 21-26, 2002

4. Róbert Csonka, József Kaizer, **József Pap** and Gábor Speier
Kinetics and Mechanism of Stable Radicals with Phenolic Antioxidants
Conference on „Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants”, Freising-Weihenstephan, September 10-13, 2003

Lectures:

1. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
3-Hidroxi-flavon réz(II)-katalizált oxigénezési reakciójának kinetikai vizsgálata
XXXV. *Komplexxémiai Kollokvium*, May 24-26, 2000, Kecskemét
Abstracts, 33. o.
2. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
A fém szerepe oxidáz enzimekben: funkcionális pirokatechin oxidáz modellek vizsgálata
XXXVI. *Komplexxémiai Kollokvium*, May 23-25, 2001, Pécs
Abstracts, p. 46
3. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
3,5-Di-*tert*-butil-pirokatechin TEMPO-katalizált oxidációja (a hidrogénatom-transzfer reakciók szerepe homogénkatalitikus rendszerekben)
XXXVII. *Komplexxémiai Kollokvium*, May 29-31, 2002, Mátraháza
Abstracts, p. 19
4. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
Kétmagvú $(\mu, \eta^2 : \eta^2$ -peroxo)-réz(II)- és bisz- $(\mu$ -dioxo)-réz(III)-komplexelek előállítása 1,4,7-triaza-ciklononán származékokkal, és reakciójuk flavonollal
XXXVIII. *Komplexxémiai Kollokvium*, May 21-23, 2003, Gyula
Abstracts, p. 25
5. **József Pap**, Gábor Speier
3-Hidroxi-piranon származékok mangán(II)-komplexeinek SOD aktivitása
XXXIX. *Komplexxémiai Kollokvium*, May 26-28, 2004, Agárd-Gárdony
Abstracts, p. 50

VI. Other articles, posters and lectures

Articles:

5. J. Kaizer; **J. Pap** and G. Speier
Catechol Oxidase and Dioxygenase Activity of Copper and Zinc Complexes with N_3 -ligands
J. Inorg. Biochem., **74**, 303 (1999)
6. J. Kaizer, A. Kupan, **J. Pap**, G. Speier, M. Reglier, G. Michel

Crystal structure of [3,3'-iminobis(N,N-dimethylpropylamine)]
(flavonolato)zinc(II) perchlorate, [Zu(fla)(idpaH)]ClO₄
Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures **215** (2000) 571

7. J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, M. Reglier and M. Giorgi
Crystal structure of {(μ -carbonato)bis[3,3'-iminobis(N,N-dimethylpropyl-
amine)]copper(II)} diperchlorate hydrate, [(Cu(idpa))₂(CO₃)](ClO₄)₂·H₂O
Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures **216**, 519 (2001)
8. É. Balogh-Hergovich, J. Kaizer, **J. Pap**, G. Speier, G. Huttner, L. Zsolnai
Copper-mediated Oxygenolysis of Flavonols via Endoperoxide and Dioxetan
Intermediates; Synthesis and Oxygenation of [Cu^{II}(Phen)₂(Fla)]ClO₄ and
[Cu^{II}(L)(Fla)₂] [FlaH = Flavonol; L = 1,10-Phenanthroline (Phen), 2,2'-Bipyridine
(Bpy), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TMEDA)] Complexes
Eur. J. Inorg. Chem., 2287 (2002)

Poster:

2. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
Nonenzymatic Model Reactions of Quercetin 2,3-Dioxygenase Using Copper
Flavanolate Complexes with a Tridentate Ligand
Hungarian Cost Chemistry Day, Oct. 20, 2000, Budapest

Lecture:

2. József Kaizer, **József Pap**, Gábor Speier
Réz- és cinktartalmú funkcionális pirokatechin dioxigenáz és oxidáz modellek
vizsgálata
XXXIV. Komplexkémiái Kollokvium, May 19-21, 1999, Tata
Abstracts, p. 14