

MTA Doktori Értekezés

**A PORFIRINEK KÖLCSÖNHATÁSAINAK NÉHÁNY BIOFIZIKAI
ASPEKTUSA**

CSIK GABRIELLA



**SEMMELWEIS EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SUGÁRBIOLÓGIAI INTÉZET**

**Budapest
2019**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Porphirin típusú fényérzékenyítők szerkezete, jellemzése és felhasználása	8
2.2. Porphirin származékok kötődése és lokalizációja modell membránokban	17
2.3. Porphirin származékok kötődése nukleinsavakhoz	21
2.3.1. A kötődés formái	21
2.3.2. A kötött formák jellemzése	23
2.4. A fotodinamikus reakció antimikrobiális alkalmazása	29
3. Célkitűzés	34
4. Anyagok és módszerek	36
4.1. Pufferek	36
4.2. Porphirin származékok és porphirin-peptid konjugátumok	37
4.3. Liposzómák előállítása és jelölése	40
4.4. T7 bakteriofág preparátum készítése	42
4.5. DNS izolálása T7 bakteriofágból	43
4.6. Nukleoszómák és nukleoszóma DNS izolálása HeLa sejtből	43
4.7. Sejtvonalak, sejttenyésztés	44
4.8. Abszorpciós és fluoreszcencia spektroszkópia	44
4.9. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	45
4.10. Elektron spin rezonancia spektroszkópiái (ESR)	45
4.11. Porphirinek dimerizációs állandójának meghatározása	46
4.12. Porphirin – liposzóma kötődési állandójának meghatározása	47
4.13. A porphirin-liposzóma kötődés sebességi állandójának meghatározása	47
4.14. Mikroklorimetria	48
4.15. Fényforrások	48
4.16. Szingulett oxigén kimutatása jodometriával	49
4.17. T7 bakteriofág inaktivációja	49
4.18. Agaróz gélelektroforézis	50
4.19. Polimeráz láncreakció	50
4.20. Áramlási citometria	51
4.21. Lézer pásztázó mikroszkópia	51

4.22. Adatfeldolgozás	52
5. Eredmények	53
5.1. Porfirinek kölcsönhatása modellembránokkal	53
5.2. Kationos porfirinek kötődése természetes polinukleotidokhoz és nukleoprotein komplexekhez	61
5.2.1. Mezo-szubsztituált porfirinek kötődése természetes polinukleotidokhoz	61
5.2.1.1. A kötött formák azonosítása és mennyiségi meghatározása	61
5.2.1.2. A bázisösszetétel szerepe a kötött formák közötti eloszlásban	70
5.2.1.3. A porfirin származék töltésének szerepe a kötődésben	71
5.2.2. Mezo-szubsztituált porfirinek kötődése természetes nukleoprotein komplexekhez	75
5.2.2.1. A kötött formák azonosítása és mennyiségi meghatározása	75
5.2.2.2. A porfirin származék töltésének szerepe a kötődésben	81
5.2.2.3. A kötött formák elemzése nukleosóma esetén	84
5.2.3. A környezet ioneösszegének és ionösszetételének hatása a kötődésre	86
5.3. A porfirin kötődésének hatása a DNS/NP termikus stabilitására	89
5.3.1. A DNS termikus stabilitása	89
5.3.2. A nukleoprotein komplex termikus stabilitása	91
5.4. Porfirin származékok genotoxicitása	94
5.5. Porfirin-peptid konjugátumok kötődése természetes polinukleotidhoz és nukleoprotein komplexhez	97
5.6. Porfirin származékok <i>in vitro</i> sejtfelvétele és sejten belüli lokalizációja	105
5.7. Porfirin származékok fototoxicitása	109
5.7.1. A fotodinamikus reakció hatékonysága és mechanizmusa	109
5.7.2. A fotoreakció szerkezeti következményei	114
6. Megbeszélés	120
7. Az eredmények gyakorlati jelentősége	140
8. Hivatkozások jegyzéke	141
9. Köszönetnyilvánítás	164
10. Közlemények	165
10.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények	165
10.2. További közlemények	166

Rövidítések jegyzéke

5-DSA	5-doxil-sztearinsav
7-DSA	7-doxil-sztearinsav
12-DSA	12-doxil-sztearinsav
ANS	8-anilino-1-naftalinszulfonsav
AMD	age related macular degeneration (időskori makuladegeneráció)
BMPCP	5,10-bisz(1-metil-4-piridinio)-15,20-di-(4-karboxifenil)porfirin
BMPCP(4P)₂	NH ₂ -Lys[Lys(Ala-D-Ala-Ala-BMPCP-Ala-D-Ala-Ala)]-CONH ₂
BPD	benzoporphyrin derivative (benzoporfirin származék)
CPP	cell penetrating peptides (sejtpenetráló peptidek)
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrién
DMPC	1,2-dimirisztoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidilkolin
DMPG	1,2-dimirisztoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidilglicerol
DMTU	1,3-dimetil-2-tiourea
DPIX	deuteroporfirin IX
DPBF	1,3-difenil-izobenzofurán
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glycero-3-foszfatidilkolin
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidilkolin
DSC	differential scanning calorimetry
DTTCI	3,3'-dietil-2,2'-tiatrikarbocianin jodid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ESR	elektron spin rezonancia spektroszkópia
FCS	fetal calf serum (fötális borjúsérum)
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
HIV	Human Immunodeficiency Virus (humán immundeficiencia vírus)
Hp	hematoporfirin
HpD	hematoporphyrin derivative (hematoporfirin származék)
HPMI	HEPES puffer – RPMI médium
HSV	herpes simplex vírus
LDL	low density lipoprotein (alacsony sűrűségű lipoprotein)

MB	methylene blue (metilénkék)
MPE	mezoporfirin IX dimetil észter
MPCI	mezoporfirin IX dihidroklorid
NLS	nuclear localization sequence (sejtmagban lokalizálódó szekvencia)
NP	nukleoprotein komplex
PS	photosensitizer (fényérzékenyítő)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PCV	polypoidal choroidal vasculopathy érhártya vaszkulopátia)
PDI	photodynamic inactivation (fotodinamikus inaktiváció)
PDR	photodynamic reaction (fotodinamikus reakció)
PDT	photodynamic therapy (fotodinamikus terápia)
PPIX	protoporfirin IX
QD	quantum dot
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SFV	Semiliki Forest vírus
SUV	small unilamellar vesicles (kis unilamelláris liposzóma)
SV40	Simian vírus
TAE	Tris-acetate-EDTA
TMPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-metil-4-piridinio)porfirin
TMPyMPP	5,10,15-trisz(1-metil-4-piridinio),20-monofenilporfirin
TMPCP	5,10,15-trisz (1-metil-4-piridinio)20-mono-(4-karboxifenil)porfirin
TMPCP-4P	NH ₂ –Lys(TMPCP-Ala-D-Ala-Ala)–CONH ₂
TP(2-OGluOH)₄P	5,10,15,20-tetrakis(2-β-D-glükózil-fenil)porfirin
TP(4-OGluOH)₄P	5,10,15,20-tetrakis(4-β-D-glükózil-fenil)porfirin
TP(4-OGluOH)₃P	5,10,15-trisz(4-β-D-glükózil-fenil),20-fenilporfirin
TP(4-OXylOH)₄P	5,10,15,20-tetrakis(4-β-D-xilózil-fenil)porfirin
TPF5(4-OGalOH)₃P	5,10,15-trisz(4-β-D-galaktozil-fenil),20-(2',3',4',5'-pentafluorofenil)porfirin
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometán

VEGF	vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)
VSV	Vesicularis Stomatitis vírus

1. Bevezetés

A porfirinek sokrétű, változatos szerepet játszanak a természetben. Molekulaszerkezeti variabilitásuk és változatos molekuláris környezetük révén fotofizikai, kémiai, fiziko-kémiai tulajdonságaik igen széles skálán változhatnak. Ez a változatosság tovább növelhető különböző ionokkal/molekulákkal alkotott komplexeik illetve konjugátumaik révén. Ennek a változatosságnak köszönhető, hogy évtizedek óta számos tudományterület kutatási repertoárjában vannak jelen a porfirinekkal kapcsolatos kérdések, így foglalkoznak tulajdonságaik elemzésével, fotokémiai reakcióik leírásával, biológiai/fotobiológiai szerepük feltárásával, új származékaik szintézisével.

A porfirinek gyakorlati felhasználásának számos lehetősége ismert. Így szerepük lehet fémionok kolorimetriás analízisében [1], amfifil aggregátumaik révén szupramolekuláris szerkezetek részeként kémiai/biológiai szenzorok működésében [2], a félvezető technikában QD-porphyrin nanorészecskék alkotóiként [3] vagy mesterséges metalloproteinek tervezésében. Ez utóbbi esetben Fe-porfirinnel komplexet alkotó *de novo* helikális scaffoldok beépíthetők biológiai membránokba, ahol elektron transzfer folyamatok potenciális szereplői lehetnek [4,5].

Az orvostudományban az utóbbi évtizedekben a porfirinek fotodinamikus terápiában (PDT) betöltött szerepe kapta a legnagyobb figyelmet [6]. Ennek alapja, hogy megvilágítás hatására a fényérzékenyítő közreműködésével reaktív oxidáló ágensek – szingulett oxigén és/vagy szabad gyökök – keletkeznek, amelyek jelenléte sejtdestrukcióhoz, nekrozishoz illetve apoptózishoz vezethet. Alkalmazásának elsődleges területe a daganatos sejtek eltávolítása. Több porfirin származéknak a tumorterápia szempontjából előnyös tulajdonsága, hogy a tumorszövetben mutatott retenciós idejük hosszabb, mint a környező szövetekben, valamint a jelentős abszorpciós képesség vörös tartományban, ahol a látható fény behatolási mélysége a legnagyobb.

A tumorterápia mellett látunk klinikai példákat a fotodinamikus reakció (PDR) felhasználására az időskori makula degeneráció kezelésében [7], atheroscleroticus plakkok eltávolításában [8,9] vagy nem malignus bőrgyógyászati kórképek terápiájában [10,11]. Ugyancsak a fotodinamikus reakció destruktív hatásán alapul annak antimikrobiális alkalmazása [12,13].

A fotodinamikus reakció bármely felhasználásáról is legyen szó, annak hatékonyságát kritikusan befolyásolja a fényérzékenyítő sejten belüli lokalizációja. Ennek elsődleges oka az, hogy a szabad gyökök, de különösen a szingulett oxigén hatótávolsága szuszpenziókban olyan

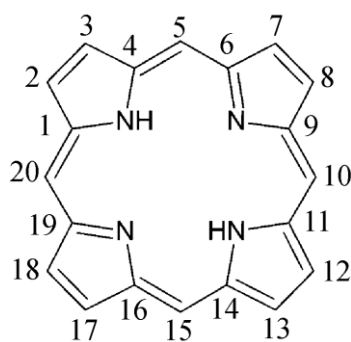
rövid ($D=1.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $\tau= 3\text{-}25 \text{ }\mu\text{s}$) [14,15,16] hogy hatása elsődlegesen a fényérzékenyítő környezetében várható. A porfirinek és rokon vegyületeik kötődhetnek a membrán struktúrákhoz, fehérjékhez és nukleinsavakhoz [17]. Ismert, hogy az első generációs fényérzékenyítők elsődlegesen a sejtmembránban lokalizálódnak, illetve a véráramban kötődnek a lipoproteinekhez illetve kisebb mértékben albuminhoz [18]. A második generációs fényérzékenyítők számossága és nagy szerkezeti variabilitása ennek a kérdésnek sokkal részletesebb, árnyaltabb tanulmányozását tette szükségessé. Ebbe a munkába kapcsolódott be kutatócsoportunk az 1990-es években.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Porfirin típusú fényérzékenyítők szerkezete, jellemzése és felhasználása

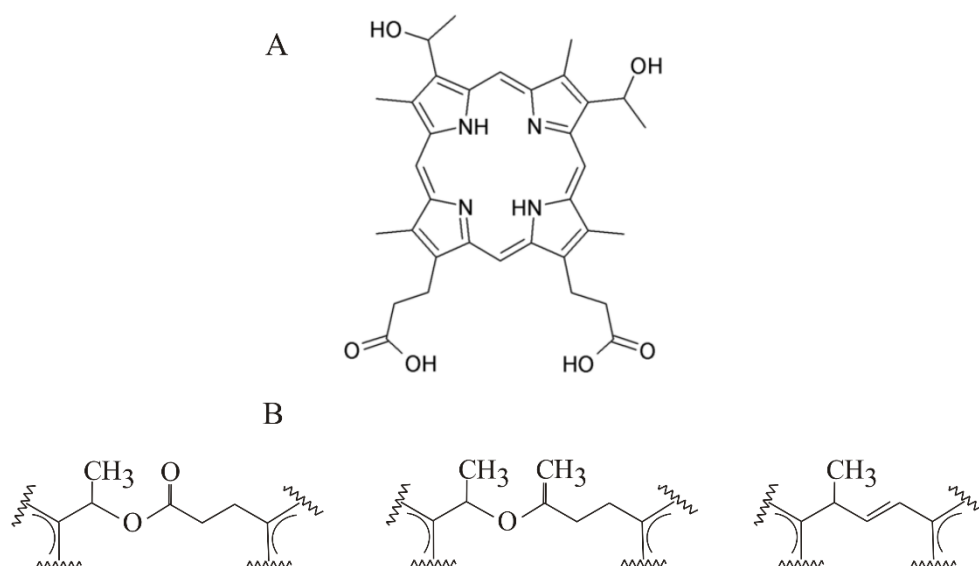
Az alábbiakban a fotodinamikus alkalmazások szempontjából fontos főbb porfirin származékokat mutatom be.

A fényérzékenyítés modern kori kutatása a XX. század elején kezdődött von Tappeiner [19] Oskar Raab megfigyeléseire [20] alapuló munkásságával. Von Tappeiner eozinnal kezelt laphám carcinoma sejteket világított meg látható fénnel, és kimutatta, hogy az így kiváltott fotokémiai reakció a sejtek pusztulásához vezetett [21]. Követői számos potenciális szenzibilizáló vegyület, közöttük porfirin származékok hatékonyságát tesztelték különböző sejtvonalakon, és különböző szerveződési szintű organizmusokon. (A porfirin váz szerkezetét az 1. ábra mutatja.) Meyer-Betz 1913-ban [22] hematoporfirin (2. ábra) tartalmú készítményt injektált saját szervezetébe, amely mindaddig nem váltott ki semmiféle érzékelhető hatást, amíg bőrét napfény nem érte. Fény hatására azonban elhúzódó fototoxitsra mutató elváltozások, kivörösödés, extrém ödémásodás jelent meg. Habár ezen kutatások eredményeként a porfirinek fototoxitsának alapjai már ismertek voltak, a módszer sejtinaktivációban, kitüntetetten pedig tumorsejtek elpusztításában való felhasználása több évtizedet váratott magára.



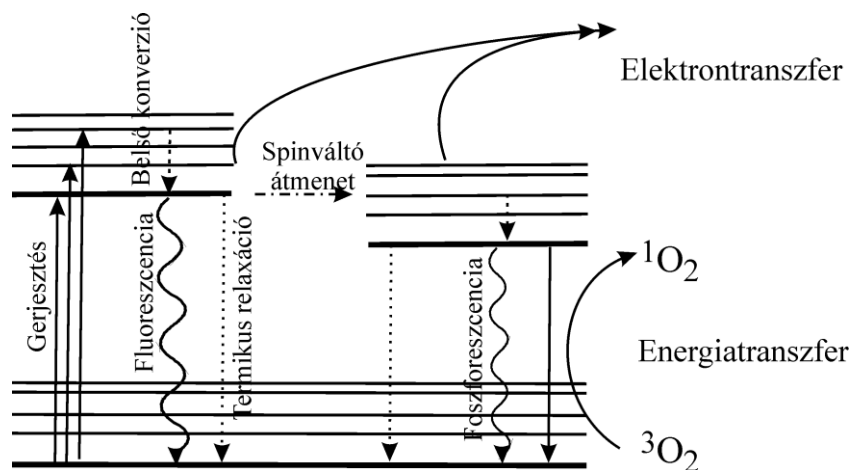
1. ábra A porfirinváz szerkezete

Lipson az 1960-as években [23] szisztematikusan vizsgálta a hematoporfirin és más porfirin származékok, így uroporfirin és protoporfirin szelektív felhalmozódását implantált tumorokban. Eredményei felhasználásával sikeresen próbálkozott emlőrák metasztázisok kezelésével, ami mérföldkövet jelentett a fényérzékenyítő hatóanyag és fény kombinált alkalmazása, azaz a fotodinamikus terápia kidolgozásában.



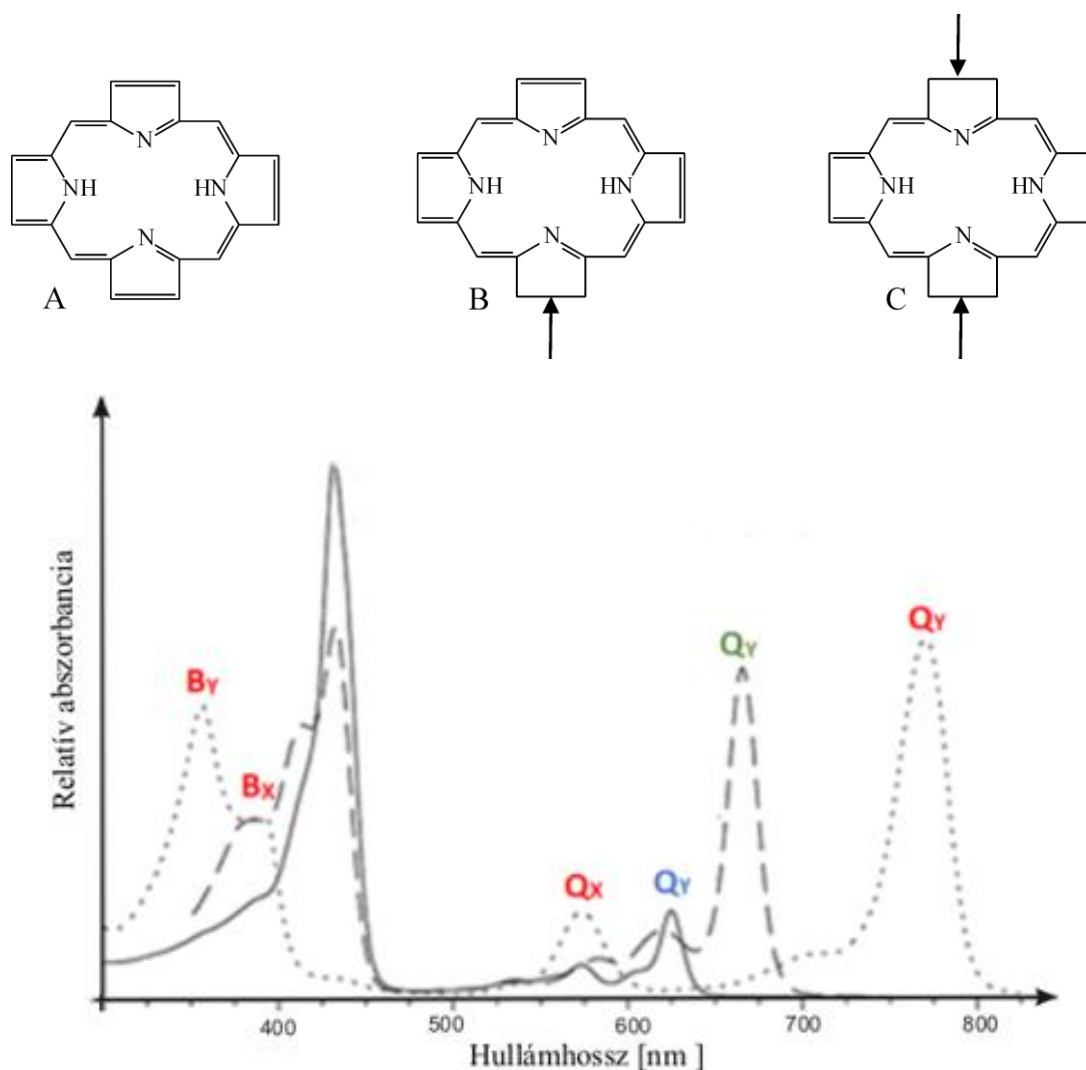
2. ábra. A hematoporfirin (A) és a hematoporfirin származékok dimerjeiben megjelenő szerkezetek (B)

A fotodinamikus hatás alapja a porfirinek gerjesztése nyomán lejátszódó elektron- vagy energiáttranszfer (3. ábra). A keletkező reaktív gyökök és szingulett oxigén sejtdestrukciónak vezető oxidációs folyamatokat indítanak el [24-26].



3. ábra. Tipikus fényérzékenyítő Jablonski diagramja

A kiterjedt klinikai vizsgálatok, kiemelten Dougherty kutatásai [27-30] az 1970-es években kezdődtek és vezettek a Photofrin® készítmény [31] kifejlesztéséhez, amelyet a mai napig is használnak a klinikumban. A Photofrin® hematoporfirin monomer, dimerek és nem meghatározott lánc hosszúságú oligomerek keveréke, amelyekben a fotokémiai hatás feltehetően a dimer formának köszönhető (2. ábra).



4. ábra. A porfirin (A), klorin (B) és bakterioklorin (C) szerkezete és tipikus abszorpciós spektruma. Porphirin: folytonos vonal; klorin: szaggatott vonal; bakterioklorin: pontozott vonal. A nyilak a molekulaszervezetben való különbségekre mutatnak.

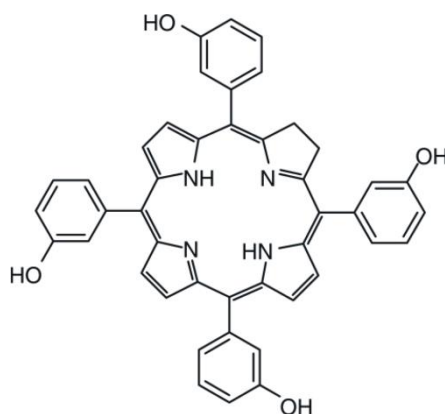
A Photofrin® jó fényérzékenyítő tulajdonságú, fototoxicitása szisztémás alkalmazás esetén is megfelelő, szelektív felhalmozódása pedig lehetőséget adott szelektíven a tumort érintő fotoszenzibilizációra. Fluoreszcens tulajdonságának köszönhetően felhasználható áttétek, recidívák lokalizációjának meghatározására is. Ezek mellett azonban a hematoporphirin alapú készítmény több kedvezőtlen tulajdonsággal is rendelkezik. Így a bőrben való retenciója elhúzódó, akár több hetes fényérzékenységet is okozhat; hidrofóbicitása miatt aggregációra hajlamos; az abszorpciós spektrum leghosszabb hullámhosszú tartományában a sáv maximumának moláris abszorpciós állandója kicsi. A jelzett sáv hullámhossz tartománya (felső határa kb. 630 nm), tekintettel a fény behatolási karakterisztikájára, nem mondható optimálisnak. Mindezek a hátrányok vezettek további fényérzékenyítők, az u.n. második

generációs” készítmények tervezéséhez, előállításához és az azokkal kapcsolatos kutatásokhoz. (1. táblázat).

1. táblázat Második generációs fotoszenzibilizálók és a Photofrin® összehasonlítása [32,111,112]

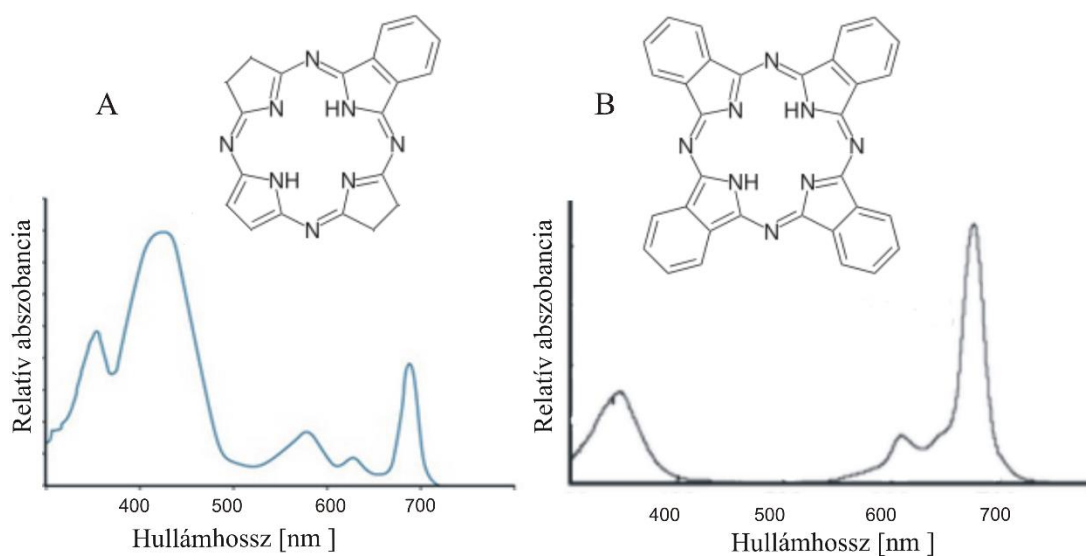
<i>Vegyület</i>	<i>Vörös absz. sáv (nm)</i>	$\varepsilon_{(\lambda)}$ ($M^{-1} cm^{-1}$)	1O_2 -kvantumhatásfok (közeg)
Photofrin	630	3500-4000	0,11 (víz, pH 7,4) 0,23 (liposzóma)
Klorin	680-700	40 000	0,54 – 0,65 (benzol)
Bakterioklorin	780-800	150 000	0,20 (metanol)
Benzoporfirin	680-720	43 900	0,77 (benzol)
Ftalocianin	680-720	200 000	0,17 – 0,50 (víz, pH 7,0) 0,70 (liposzóma)
Naftalocianin	780-820	350 000	0,19 (benzol)

A tumorterápiában a kezdeti tapasztalatok alapján a fotoszenzibilizálószer (PS) következő tulajdonságai mondhatók a legfontosabbnak, természetesen a megfelelő fotofizikai előnyök megtartása mellett: 1) szelektív felhalmozódás a tumorszövetben; 2) gyors elimináció a szervezetből, különös tekintettel a bőrre; 3) (a hematoporfirinhez képest) jó vízóldékonyság; 4) elhanyagolható sötét-toxicitás; 5) az abszorpciós sáv vörös eltolódása és 6) nagy abszorpciós koefficiens a legnagyobb behatolási mélységgel rendelkező vörös tartományban [32]. Különösen az utolsó két szempont figyelembe vételével mondhatjuk sikeresnek a klorinok illetve bakterioklorinok vizsgálatát. A tetra-pirrol rendszerben a kettős kötések számának megváltozása számottevően változtathatja az abszorpciós spektrum szerkezetét, ahogy azt a 4. ábrán bemutatott példák is szemléltetik. A klorinok (2,3-dihidroporfirinek) egy kettős kötés redukciójából származnak, ami egyúttal a molekula szimmetriáját is megváltoztatja. Mindez a Q_y sáv vörös eltolódásához és amplitúdójának növekedéséhez vezet. A bakterioklorin a két egymással szemközti pirrol gyűrű telítésével nyerhető, ami tovább erősíti az előzőekben leírt hatást.



5. ábra. 5,10,15,20-tetrakis(3-hidroxifenil)klorin (m-THPC) szerkezete

A klorin származékok közül a 5,10,15,20-tetrakis(3-hidroxifenil)klorin (m-THPC) (5. ábra) másnéven Foscan[®] bizonyult különösen hatékornak [33] – a Photofrin[®] készítménynél becslések szerint a fotodinamikus dózis (hatóanyag dózis*fény dózis) összehasonlításában 100-szor hatékonyabb –, és lett sikeres hatóanyag a klinikumban.



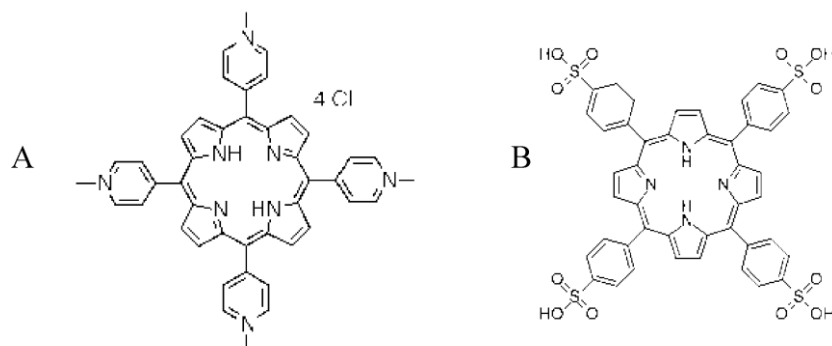
6. ábra. A benzoporfirin (A) és a ftalocianin (B) szerkezete és tipikus abszorpciós spektruma

A porfirin szerkezetben a kettős kötések telítése mellett egy másik lehetséges megközelítés az abszorpciós spektrum szükséges módosítására az oldalláncok módosítása, illetve a delokalizált szerkezet kiterjesztése további aromás gyűrűk beépítésével. Az előbbire a benzoporfirinek, utóbbira a ftalocianinok említhetők példaként (6. ábra). A Visudyne[®]-ként ismertté vált hatóanyag bezoporfirin (6. ábra) származék (BPD), másnéven verteporfirin, ami egy $\lambda=690$ nm-nél gerjeszthető, stabil, egy komponensű készítmény, ami ráadásul 24 óra alatt

teljesen kiürül a szervezetből. A verteporfint nagy sikerrel alkalmazzák az időskori makuladegeneráció (AMD) [34] és a polipoidal choroidal vasculopátia (PCV) [35] kezelésében. A ftalocianinok (6. ábra), de különösen azok fémkomplexei is ígéretes második generációs fényérzékenyítő vegyületekként jelentek meg a kínálatban [36]. Jelentős szerepük utóbb nem elsősorban a PDT-ben mutatkozott. Előnyük az oldalláncok szubsztitúciója révén kialakítható szerkezetek sokfélesége [37,38].

A második generációs fényérzékenyítők közös előnyös tulajdonsága, hogy a) fényelnyelési képességük a hematoporfirinénál sokkal kedvezőbb abban a hullámhossz tartományban, ahol a fény behatolási mélysége a legnagyobb; b) szingulett oxigéntermelési hatásfokuk magas; továbbá c) belőlük stabil, homogén összetételű készítmények állíthatók elő. Egyes származékok hátránya ugyanakkor erősen hidrofób karakterük, ami kedvezőtlen lehet a célsejthez való eljutás folyamatában, elősegítheti a hatékonyságot csökkentő aggregációt és az is kérdéses, hogy a kémiai szerkezet megfelelően befolyásolja-e sejten belüli lokalizációjukat.

A fent tárgyalt tulajdonságokon túl a porfirin töltése is szerepet játszhat a daganat sejtekkel való kölcsönhatásban. Különböző megközelítések okán, de mind pozitív mind negatív töltést hordozó származékok kipróbálásra kerültek fotoinaktivációs folyamatokban. A töltéssel rendelkező származékok egy-egy példáját mutatja a 7. ábra.



7. ábra. A mezo-tetrakisz-piridil-porfirin (A) és mezo-tetra-(szulfonaftofenil)-porfirin (B) szerkezete

A pozitív töltést hordozó porfirin származékok és analógok fotodinamikus hatásának vizsgálatát több körülmény is indokolta.

(1) Az 1970-es évek óta ismert, hogy kationos porfirinek nukleinsavakhoz kötődhetnek (részleteket lásd később). Ennek alapján feltételezhető volt, hogy ezek a vegyületek a sejteken belül a nukleinsavak környezetében fognak felhalmozódni, s így fotokémiai sérüléseket hoznak létre a mitokondriális illetve nukleáris DNS-ben. Ugyancsak a nukleinsavhoz való kötődés

alapján lehetett feltételezni, hogy vírusok nukleinsav alkotóihoz kapcsolódva lehetnek hatékony antivirális ágensek. Ez utóbbi jelenségnek többek között a vérkészítmények sterilizálásában lehet szerepe [39]. A membránburokkal rendelkező vírusok inaktivációjában az elsősorban membránban lokalizálódó fényérzékenyítőket is sikerrel alkalmazzák [13,40-42], de a burok nélküli vírusok fotodinamikus úton történő inaktivációja nem megoldott, s ezen a területen a kationos porfirinek új lehetőséget kínálnak.

(2) A kationos porfirinek előnye lehet a fotodinamikus daganatterápiában, hogy a tumorsejtek felszínének töltésviszonyai miatt feltehetően a pozitív töltésű hatóanyagok nagyobb affinitást, esetleg szelektív felhalmozódást mutathatnak ezekben a sejtekben [43-45].

(3) A mikroorganizmusok egyre növekvő antibiotikum-rezisztenciája miatt egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik más, potenciális antibakteriális eljárások, így a fotodinamikus reakciók felhasználása iránt [46]. A Gram-pozitív baktériumok inaktivációjában számos első- illetve második generációs fényérzékenyítő hatékonynak bizonyult [47,48,49]. Ugyanakkor a Gram-negatív baktériumokkal szemben ezek hatástalanok voltak [50]. A Gram-negatív baktérium fal szerkezete indokolta [51] a kationos porfirinek kipróbálását, s ezek a próbálkozások eredményesnek is bizonyultak [52,53].

Munkánk kiemelkedő részét képezi a pozitív töltésű porfirinek és nukleinsavak illetve nukleoprotein komplexek kölcsönhatásának elemzése. Az ezzel kapcsolatos irodalmi ismeretek részletes áttekintésére a 2.3. fejezetben térek ki.

A negatív töltésű porfirin illetve ftalocianin származékok nem váltak jelentőssé a fotodinamikus eljárásokban. A Mezo-tetra-(4-szulfonatofenil)-porfirin [54] előnye, hogy vízzoldékony és kitűnő szingulett oxigén termelési kvantumhatásfokkal rendelkezik [55], ami megfelelő lehetne a PDT szempontjából. Ugyanakkor a vegyület könnyen protonálódik, a protonált forma pedig aggregálódik, ami a spektrális tulajdonságok drasztikus megváltozását okozza [56], és ezért fototoxikus aktivitása csekély. Ennek ellenére jelentőségük nem elhanyagolható. Nem fototoxikus ágensként makromolekulákhoz történő kötődésük révén felbukkannak tumorelles vagy egyéb terápiás eljárásokban [57,58].

Az elmúlt évtizedekben számos törekvés irányult arra, hogy a már ismert szerkezetű porfirin típusú fényérzékenyítők hatékonyságát fokozzák oldhatóságuk növelése, aggregációs hajlandóságuk csökkentése, szelektív felhalmozódásuk fokozása illetve sejten belüli lokalizációjuk módosítása révén. Az erre irányuló stratégiák közül különös figyelmet érdemel a különböző fényérzékenyítő konjugátumok tervezése, szintézise.

Biotin kapcsolása ftalocianinhoz például elősegíti az amfifil karakter kialakulását és fokozza a sejtbeni felhalmozódását [59]. Hasonló megfontolások is támogatták az aszimmetrikus szerkezet kialakítását lehetővé tevő, a hidrofób/hidrofil karakter finom szabályozására alkalmas, és így a vízdékonyság fokozását biztosító mezo-szubsztituált porfirin származékok tervezését, szintézisét és fotobiológiai folyamatokban történő vizsgálatát [60-62]. A mezo-szubsztituált porfirinek között az utóbbi évtizedekben jelentős szerepet kaptak a mono- és diszacharid konjugátumok, amelyekben a planáris szerkezetű tetrafenil-porfirin fenil csoportjához kapcsolódik a szénhidrát részlet. Ezekben a vegyületekben a sejten belüli lokalizáció szempontjából kritikus [63,64] méret, elektrondenzitás, térszerkezet, hidrofób/hidrofil karakter hangolható a szacharid partner szerkezetének, méretének, a szubsztituensek orto- vagy para- pozíciójának, illetve a fenil csoportok egyéb szubsztituenseinek (pl. penta-fluorofenil csoport) megválasztásával. A szénhidrát részlet jelenléte ezen felül előnyös lehet a sejtekkel való kapcsolat kialakításában is, amennyiben sejt felszíni receptorokhoz való kötődést tesznek lehetővé [65].

Különösen kiemelkedő munkát végzett a glikozilált porfirinek tervezése szintézise terén Momanteau majd Maillard kutatócsoportja [66-70]. **E kutatócsoporttal együttműködésben foglalkoztunk a glikozilált porfirinek és modellmembránok közötti kölcsönhatások, az egyes származékok membránon belüli lokalizációjának kutatásával, fotokémiai hatékonyságuk vizsgálatával.**

Egy további lehetséges megközelítés a sejtbeni felhalmozódás fokozására a porfirin, illetve klorin vagy ftalocianin kapcsolása szteroid hormonnal illetve koleszterinnel [71,72]. A koleszterin elősegíti a konjugátum asszociációját LDL-lel, s ezen keresztül fokozhatja felhalmozódását a daganat sejtekben [18]. Osati és mtsai [73] különböző szteroid hormonokat kapcsoltak porfirinekhez illetve ftalocianinokhoz azt feltételezve, hogy a szteroidok sejt felszíni receptorai elősegítik azok sejtbe jutását. Ezek a próbálkozások nem jártak a várt sikerrel. Vagy a receptor aktivitása nem bizonyult megfelelőnek a konjugátumokkal szemben, vagy – mint az más konjugátumok esetében is tapasztalható volt – a konjugáció kedvezőtlenül befolyásolta a porfirinek fotofizikai tulajdonságait.

Más, kis molekulákhoz hasonlóan, a porfirin típusú vegyületek célbajuttatásában is kiemelkedő stratégia lehet oligopeptidek kapcsolása a fényérzékenyítő molekulához. A peptid kiválasztásában több megközelítés ismert. Történtek vizsgálatok sejtpenetráló peptid (CPP) [74], oktaarginin konjugátumokkal [75], vagy a tumorok körüli erek falában elhelyezkedő vascular endothelial growth factor (VEGF) specifikus heptapeptidek konjugátumaival. A

fényérzékenyítő-oligopeptid konjugátumoknak egy speciális csoportját képezik azok a vegyületek, amelyek szintézisének célja nem a humán sejtekben, hanem a patogén mikroorganizmusokban való felhalmozódás fokozása. Doselli és mtsai [76] kapcsoltak először pozitív töltésű antimikrobiális peptidet, apidaecint, majd magainint és buforint [77] negatív töltésű vagy neutrális porfirin származékokhoz, ezzel elősegítve azok Gram-negatív baktérium sejtekbe való bejutását.

A szerteágazó eredmények részletes elemzésére a dolgozat keretei között nincs mód, de néhány összefoglaló megállapítást feltétlenül tehetünk. Az oligopeptidek kapcsolása PS-ekhez sikeres próbálkozásnak bizonyult abban a tekintetben, hogy sikerült elérni, hogy a fényérzékenyítők nagyobb mértékben legyenek jelen a célzott sejtekben. Ez azonban többnyire nem jár együtt a fototoxikus hatás fokozódásával, aminek több, konjugátumonként esetleg eltérő oka is lehet: a konjugálás kedvezőtlenül befolyásolhatja a PS fotofizikai paramétereit és/vagy megváltoztatja annak sejten belüli lokalizációját. Ez utóbbi még akkor is megfigyelhető volt, amikor a PS-hez sejtorganelleket – sejtmagot (NLS) vagy mitokondriumot (MSP) – célzó peptideket kapcsoltak [78,79]. Ezen próbálkozások összességében eredménytelennek bizonyultak.

A PS-oligopeptid konjugátumokkal kapcsolatos újabb eredményekről ad részletesebb áttekintést Orosz és Csik összefoglaló közleménye [80].

A célbajuttatáson túl a konjugáció célja lehet a porfirin fotofizikai tulajdonságainak javítása vagy új fotokémia útvonalak megnyitása. A kumarin-porfirin konjugátumokban például a kumarin (donor) és porfirin (akceptor) közötti energiatranszfer lehetőségét használják ki [81,82]. A konjugátumban a PS gerjesztése szélesebb spektrumban válik lehetségessé a kumarin komponens UV abszorpciója révén.

A fényérzékenyítő vegyületek konjugátumainak szintézisében egy, a fentiekől merőben eltérő stratégia az, amikor a cél nem a PS célba juttatása, hanem maga a PS a konjugátum célbajuttató komponense. A három illetve négy pozitív töltést hordozó porfirin származékokról ismert, hogy nagy affinitással kötődnek nukleinsavakhoz. (Ennek hátterét részletesebben bemutatam a 2.3. fejezetben.) Ennek alapján feltételezhető volt, hogy ilyen kationos porfirinekkal konjugált molekulákat [83] a porfirin segítségével a nukleinsav környezetébe lehet juttatni [84]. A DNS-hez kötődött konjugátumok megváltoztathatják a nukleinsav térszerkezetét [85] és így befolyásolhatják működését. A konjugátumok megfelelő tervezésével szekvencia specifikus kötődés és hatás is elérhető [86]. További lehetőség, hogy a

konjugátumok – kihasználva a porfirinek fotokémiai reakcióit – irányított lánc töréseket és/vagy keresztkötéseket hozhatnak létre a DNS-ben [87,88].

Annak ellenére, hogy számos, különböző szerkezetű kationos porfirin-konjugátum ismert, nem tudjuk, miként befolyásolja a konjugáció a kationos porfirinek kötődését a DNS-hez illetve nukleoprotein komplexhez, hogyan módosítja az egyes kötési módok kialakulásának lehetőségét. Ezen kérdések megválaszolása érdekében **porfirin-tetrapeptid konjugátumok segítségével azonosítottuk az egyes kötési formákat, és meghatároztuk azok mennyiségi megoszlását.**

2.2. Porfirin származékok kötődése és lokalizációja modell membránokban

A fényérzékenyítő vegyületek sejten belüli elhelyezkedésének kiemelten fontos szerepe van a hatásmechanizmusuk és a kifejtett hatás eredményessége szempontjából. Ennek hátterében az áll, hogy az indirekt fotoreakcióban megjelenő citotoxikus reaktív ágensek élettartama rövid, tipikusan 40 ns-nál rövidebb, így hatótávolságuk is korlátozott, átlagosan 20 nm [89]. Ezért a fényérzékenyítő vegyületek sejten belüli elhelyezkedése egyúttal a kialakuló fotokémiai sérülések helyét is meghatározza.

A porfirin származékok a sejten belül különböző sejtalkotókban lokalizálódhatnak [15,90]. Ezek közül kiemelten a sejtmembránban [43,91], mitokondriumok membránjában [92,93], a lizoszómákban [94-96] és az endoplazmatikus retikulumban [97]. Bizonyos esetekben feltételezhető kötődésük a mitokondriális DNS illetve a nukleáris DNS környezetében [98-100]. Egy adott porfirin származék sejten belüli lokalizációját, és ezzel összefüggésben fotoreakciójának támadáspontját befolyásolhatják a fényérzékenyítő vegyület tulajdonságai, így a hidrofóbicitás, a hordozott töltések száma és milyensége, töltés/tömeg aránya, a tetrapirrol gyűrűn megjelenő szubsztituensek minősége és száma, valamint a sejtbejutás mechanizmusa, a kérdéses célsejt típusa.

A sejten belüli lehetséges támadáspontok közül kezdetektől különös figyelmet kapott a sejtmembrán. Ennek oka kettős. A sejtmembrán jelenti ugyanis a sejttel létrejövő kapcsolat első vonalát, továbbá a porfirin típusú fényérzékenyítők többnyire lipofil karakterük miatt készséget mutatnak a kettős lipid rétegben való elhelyezkedésre. A membránhoz való kötődés így előfeltétele a későbbi citotoxikus hatás kialakulásának [101,102], aminek célpontja számos esetben ugyancsak a sejtmembrán.

A membránnal kialakított kapcsolat elemzése, a membránban zajló folyamatok – a porfirin membránon belüli elhelyezkedésének, a $^1\text{O}_2$ keletkezés hatásfokának, az oxidatív sérülések

kialakulásának – megismerése fontos a PDT hatásmechanizmusának megértése, új fényérzékenyítő vegyületek tervezése, az eljárás hatásosságának fokozása szempontjából.

A különböző összetételű liposzómák, mint membrán modellek alkalmasak a membránt érintő folyamatok sokrétű tanulmányozására [103]. Lehetőséget adnak a porfirin származékok asszociációját befolyásoló fiziko-kémiai paraméterek, a fotobiológia hatékonyságot módosító fotofizikai jellemzők vizsgálatára, a fotobiológiai hatásmechanizmus részleteinek feltárására [104-106]. A liposzóma alkotóinak megválasztásával modellezhetők a membrán egyes tulajdonságai, többek között viszkozitása, felületi töltéseloszlása, a kettős réteg vastagsága, stb. [107,108]. Ez a változatosság lehetővé teszi a kötődést befolyásoló különböző tényezők megismerését, elemzését.

2. táblázat Porfirin származékok liposzóma kötődési állandói (K_b [M^{-1}])

vegyület	K_b [M^{-1}]	körülmények	hivatkozás
Hp	$1,6 \times 10^3$	pH 7,4; 37 °C	[113]
HpD	$4,1 \times 10^3$	pH 7,4; 37 °C	[113]
ZnHp	$1,6 \times 10^3$	pH 7,4; 37 °C	[114]
Klorin e6	$9,1 \times 10^3$	pH 6,5	[115]
Klorin e6	$5,9 \times 10^3$	pH 7,4	[115]
Klorin e6	$6,3 \times 10^3$	tojás lecitin, szobahőmérséklet	[116]
MPE	$2,8 \times 10^5$	DMPC; pH 7,4; szobahőmérséklet	[117]
MPCl	$7,1 \times 10^4$	DMPC; pH 7,4; szobahőmérséklet	[117]
DPIX	$2,3 \times 10^4$	pH 7,2; 37 °C	[118]
PPIX	$2,3 \times 10^4$	pH 7,2; 37 °C	[118]

Az egyik alapvető kérdés egy porfirin származék várható kötődési készsége a membránhoz. A porfirin lipofilicitása jellemezhető az *n*-oktanol-víz rendszerben mért megoszlási hányadossal. Egyszerűsített megközelítés szerint a membrán-porfirin kötődési állandója becsülhető, legalábbis a kötődési állandók relatív sorrendje megadható a megoszlási

hányadosok alapján. Számos vegyületre kiterjedő összehasonlító elemzés szerint [109] azonban a korreláció a liposzómákon meghatározott kötődési állandó és a megoszlási hányados között nem feltétlenül áll fenn [110]. Különösen így van ez az aszimmetrikusan szubsztituált, vagy hosszú alkil-karboxil oldalláncokat hordozó porfirin származékok, illetve töltött fejcsoportokat is tartalmazó liposzómákkal végzett kísérletek esetén. Ezért a kötődési állandók meghatározása nem látszik megkerülhetőnek.

Az irodalomban számos adat áll rendelkezésre különböző porfirin származékok liposzóma kötődési állandóival kapcsolatban. Ezek közül néhányat mutat be a 2. táblázat.

A kötődési állandók meghatározására kínálkozó módszer a porfirin származék abszorbanciájának, vagy még inkább fluoreszcencia intenzitásának változása a liposzóma jelenlétében, mivel az apoláros közegben való elhelyezkedés a fluoreszcencia intenzitás növekedéséhez vezet. Ugyanakkor nehézséget jelent az irodalmi adatok összehasonlításakor és felhasználásakor, hogy a modellmembrán összetétele és a kísérleti körülmények, például a koncentráció viszonyok, vagy akár a mértékegységrendszerek széles variabilitást mutatnak. Néhány fontos megállapítás azonban így is tehető.

A kötődési állandó nagysága számos tényezőtől függ, így a porfirin származék hidrofób/hidrofil karakterétől, a liposzóma lipidösszetételétől [119], a fejcsoportok töltésétől [120] a pH-tól [115]. Jelentősége van a szénhidrogénlánc hosszának [117], ami befolyásolja a láncon belüli lokalizációt, és így a lehetséges kötőhelyek számát is. Az alkalmazott koncentrációk mellett a hidrofób származékok egy része bizonyosan aggregált formában van jelen, de a modell membránnal csak a monomerek lépnek kölcsönhatásba [113].

Az eredmények értékelésénél tekintettel kell lenni arra, hogy a membránban megváltozhatnak a porfirinek fotofizikai paraméterei [121-124]. Ezt egyrészt a vizes oldathoz képest hidrofób vagy éppen a heterogén környezet okozhatja. Másrészt – habár általánosan érvényes, hogy az apoláris porfirinek a liposzómákban monomer állapotban vannak jelen –, a magas porfirin/lipid arány vagy a porfirin nagy lokális koncentrációja, klaszterek kialakulása miatt mégis létrejövő aggregáció, ami kedvez a fluoreszcencia kioltási folyamatok lejátszódásának [125].

A porfirinek fotokémiai hatékonyságát a membrán kötődési hajlandóságon túl befolyásolhatja a lipid kettős rétegen belüli lokalizációjuk. Csak a foszfolipid kettős réteget tekintve, a porfirinek három különböző elrendeződésben kötődhetnek a membránhoz [103,126]. Elhelyezkedhetnek a poláros fejcsoport-víz határrétegben, a lipid oldalláncok nyaki, poláros fejcsoportokkal határos részében vagy az apoláros oldalláncok környezetében a

láncokkal párhuzamosan illetve a lipid kettős réteg határán [117,127,128]. Több porfirin származék esetében kimutatták, hogy elhelyezkedése a fenti kompartmentek nemcsak egyikét érinti.

A hematoporfirin (Hp) és metil észtere a lipid vízzel érintkező régióiban helyezkednek el [63,127], de lokalizációjuk függ a hőmérséklettől, a szénhidrogén lánc rendezettségétől. A fázisátalakulási hőmérséklet közelében az unilamelláris liposzóma belső réteg is hozzáférhetővé válik a Hp számára. A Hp koncentrációjának növekedése szintén megváltoztatja a vegyület elhelyezkedését, alacsonyabb koncentrációknál a teljes molekula a fejcsoportok környezetében lokalizálódik, míg magasabb koncentrációknál a poláros oldallánc a fejcsoportok, az apoláros tetrapirrol gyűrű a lipid fázisban helyezkedik el [103]. Richelli és mtsai [63] szerint az apoláros protoporfirin IX már a fázisátalakulási hőmérséklet alatt és kis koncentrációk mellett is a lipid mátrixban lokalizálódik, más eredmények szerint azonban az unilamelláris DMPC liposzómában részben az apoláros régióban helyezkedik el, részben annak a nyaki, a poláros fejcsoportokkal határos régiójában [129]. A klorin e6 DMPC és DPPC liposzómákban alacsony koncentrációban a belső, magasabb koncentrációban a külső lipid rétegben halmozódik fel.

A porfirin származékok liposzómában való lokalizációjának meghatározására széles metodikai repertoár áll rendelkezésre. Ezek többsége a porfirin származék saját fotofizikai paramétereinek, így az abszorbancia, a fluoreszcencia intenzitás [127], a kvantumhatásfok [126] illetve az élettartam [130] jellegzetes, a molekuláris környezettel összefüggésben változó értékeit használja ki.

A lokalizáció pontosabb meghatározására ad lehetőséget, ha a fent említett paraméterek változását a lipidek fázisátalakulási folyamatával összefüggésben vizsgáljuk, azaz a hőmérséklet függvényében követjük. További lehetőség a kötött porfirin anizotrópiájának meghatározása illetve az anizotrópia változása a hőmérséklet függvényében [103], azaz az egyes lipid régiók rendezettségével összefüggésben. A porfirinek saját fluoreszcenciáját kihasználó módszerek közül is kiemelést érdemel a „site-selective” fluoreszcencia spektroszkópia [117]. A módszer különösen hasznos, ha feltételezhető, hogy a porfirin elhelyezkedése nemcsak egy kompartmentet érint. Az inhomogén eloszlásfüggvények elemzése lehetővé teszi annak meghatározását, hogy egy adott porfirin-lipid kölcsönhatás során hány féle kötőhely (lokalizáció) kialakulására van lehetőség.

A porfirinek saját fluoreszcens jelének kihasználásán túl alkalmazhatunk az egyes lipid régiókat specifikusan jelölő fluoreszcens vagy ESR jelet szolgáltató spinjelző [131]

molekulákat illetve ismert lokalizációjú quenchereket [116]. Ilyenkor a jelölő molekula által szolgáltatott jel változásából következtethetünk a porfirin azonos régióban való elhelyezkedésére. Ez utóbbi módszerek előnye lehet a pontosabb lokalizáció meghatározás, de kockázatuk, hogy a jelző vagy quencher maga is módosítja az eredeti lipid környezetet.

A kutatás során azt elemeztük, hogy milyen tényezők befolyásolják a fényérzékenyítő lipid kettős rétegen belüli elhelyezkedését, különös tekintettel a porfirin szerkezetére. A választott glikozilált porfirinek vegyületcsaládjának képviselői lehetőséget nyújtanak a molekulaszerkezet „finom hangolására” (lásd 2.1 fejezet), így a porfirin lokalizációja és a molekulaszerkezet közötti kapcsolat részleteinek tanulmányozására.

2.3. Porfirin származékok kötődése nukleinsavakhoz

2.3.1. A kötődés formái

A DNS-ligandum kölcsönhatások témaköre a biokémia, molekuláris biológia kiterjedten vizsgált területe. Jelentőségük többek között az örökítőanyag expressziójának szabályozásában [132], módosításában, mutagén anyagok hatásmechanizmusának megértésében áll [133]. A molekuláris biológiai kutatások módszerei is, például a gél elektroforézis vagy a DNS-szekvenálás, gyakran építenek ilyen kölcsönhatásokra [134,135].

Számos olyan kisméretű ligandum ismert, amely a nukleinsavakhoz, kitüntetetten a kettős szálú DNS-hez nem kovalens kötéssel képes kötődni. Ezt vagy a kötődő molekula planáris aromás szerkezete, vagy megfelelő térszerkezete és a cukor-foszfát láncsal elektrosztatikus kölcsönhatás kialakítására alkalmas töltéseloszlása teszi lehetővé. Az előbbi a fő kötődési módok közül a bázispárok közé történő interkaláció, az utóbbi a cukor-foszfát láncok részvételével kialakuló, úgynevezett külső kötődés számára biztosít kedvező feltételeket [136,137].

Az interkaláló vegyületek közül számos ismert, mint antimikrobiális szer (pl. akridin származékok) [138] vagy tumorellenes hatóanyag (pl. antraciklinek) [139]. Hatásuk alapja a transzkripció és replikáció gátlása [140]. Az interkaláló vegyületek széles körben használtak a DNS szerkezeti és szerkezet dinamikai vizsgálataiban, továbbá mint a DNS fluoreszcens jelzői (pl. cianinok) [141].

Kis molekulák (< 1 kD) külső kötődése jellemzően a két polinukleotid szál által képzett kis árokban alakul ki (ellentétben a fehérje-kötődésével, ami tipikusan a nagy árokban jön létre). A kis árokban lévő G-C bázispárok amino-csoportjaik által okozott szterikus gátlás miatt nem kedveznek a ligandumok kis árokba való kötődésének. Ebből következik az ilyen kötődések A-

T bázisspecifitása. [142,143]. A kis árokba kötődő vegyületek között szintén találunk ígéretes tumorellenes szereket (pl. netropsin, distamycin A) [144], antibakteriális hatóanyagokat (pl. duocarmycin A) és fluoreszcens jelzőként használt vegyületeket (pl. Hoechst festékek) [142].

A porfirin származékok közül a pozitív töltést hordozó származékokról volt feltételezhető, hogy nukleinsavakkal képesek a fent leírt kötési módok kialakítására. A kationos porfirinek alapvegyületének tekinthető 5,10,15,20-tetrakis(1-metil-4-piridinio)porfirin (TMPyP) (lásd 10. ábra, Anyagok és módszerek) DNS iránt mutatott affinitása több mint 30 éve ismert és kiterjedten vizsgált jelenség. A molekula szerkezete lehetőséget nyújt mindkét fő kötési mód kialakítására.

Az interkaláció szempontjából fontos a vegyület planáris szerkezete, mérete és az aromás gyűrűk jelenléte. A TMPyP szerkezete megfelel a planaritás követelményének [145]; a mezo-szubsztituensek ko-planáris helyzete pedig tovább növeli a tetrapirrol aromás jellegét. Az alapvegyület Ni^{II} és Cu^{II} komplexei szintén planáris szerkezetűek, s mint ilyenek szintén képesek interkalációra, sőt elősegíthetik azt [146-148].

Az A-T szekvencia (amihez legalább három egymás követő A-T bázispárra van szükség a kis árokba való külső kötődésnek kedvez, aminek egyik oka az A-T régió kis árkanak negatív töltése. Itt a kötődés létrejötté szempontjából a porfirin pozitív töltésének és H-híd kialakítási képességének van szerepe [149-151]. A TMPyP is kialakít kis árokbeli kötődést, és axiális ligandumokat (pl. Zn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{3+}) tartalmazó komplexei számára ez a preferált kötődési mód [152].

Az irodalomban konszenzus van arról, hogy a TMPyP mindkét típusú, nem kovalens kötéssel kapcsolódhat a kettős szálú DNS-hez [146,153]. Meg kell jegyezni, hogy megfelelő koncentráció viszonyok (nagy relatív porfirin koncentráció) mellett az un. külső aggregáció is létrejöhet, ami a porfirinek egymáshoz való kapcsolódásával alakul ki.

A kétféle kötődési mód létezését molekulamodelllezési megközelítések is alátámasztották. Születtek eredmények TMPyP-dinukleotid (TA, GC) [145], TMPyP-hexanukleotid (CGCGCG, TATATA) [154], valamint TMPyP-dodekanukleotid [155] komplexekkel kapcsolatosan. A modellek hozzájárulnak a szekvencia-specifitás megértéséhez; a TA és a TATATA modellekben ugyanis a külső kötött, a GC és CGCGCG modellekben pedig az interkalált állapot mutatkozott a legalacsonyabb energiájúnak. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezek a modellek általában nem, vagy korlátozottan vették figyelembe a környezet (pl. oldószer, ionerő) hatását.

A kétféle kötődési módot bizonyították a DNS-hasításon alapuló „footprinting” vizsgálatok. Ezek a különböző ágensek (metidium-propil-EDTA, KMnO_4 , DNáz I) által előidézett DNS-degradációt, illetve annak a kötődő molekula által okozott megváltozását elemzik a termékek elektroforézisével. Kimutatták [156,155], hogy a külső kötött, A-T preferenciát mutató állapot a kis árok-támadáspontú hasító vagyületek aktivitását jelentősen gátolja egy, mintegy 4-5 bázispár hosszú régióban, míg G-C preferenciájú interkaláció esetén a DNáz I aktivitásában figyelhető meg változás, de csak az érintett régió 1-2 bázispárnyi környezetében.

2.3.2. A kötött formák jellemzése

Kezdetektől észszerűnek mutatkozott a kötődési módok könnyebb elemzése érdekében a kétféle kötött állapotot külön mintákban előállítani és elemezni. Erre lehetőséget ad a két fő kötés mód, az interkaláció és a külső kötődés eltérő bázispreferenciája [156,157]. Jóllehet mai ismereteink szerint ez a szelektivitás korántsem kizárólagos, az egyes kötött állapotok elkülönített jellemzésére alkalmasnak bizonyultak a csak A-T illetve csak G-C tartalmú szintetikus kettős szálú oligo- illetve polinukleotidok, $(\text{A-T})_n$ és $(\text{G-C})_n$. A másik lehetőség az egyes kötött formák diszkrét előállítására a szabadbázisú vegyület megfelelő komplexképzése valamely fématommal a fent leírtak szerint.

Spektroszkópiai jellemzés

A kationos porfirinek abszorpciós spektruma megfelel a szabad bázisú porfirinek tipikus spektrumának. A spektrum Soret sávja jellegzetes eltolódást mutat a különböző kötésformák kialakulásakor. A külső kötődés a Soret-sáv mérsékelt, 5-8 nm-es vörös eltolódását, valamint néhány százalékos hipokrómiáját okozza. Az interkaláció ugyanakkor kifejezett, kb. 10-25 nm vöröseltolódással és 40-50 %-os abszorpciós csökkenéssel jár együtt [146,158].

A kötődés hatása a fluoreszcencia emissziós spektrumokban is felismerhető. A szabad porfirin tagolatlan, széles emissziós sávja mindkét kötött formában két elkülönülő sávra hasad és intenzitása is megváltozik. Interkalációkor csökken, külső kötődés kialakulásakor növekszik a fluoreszcencia intenzitás [159,160]. A kötődés következtében a kationos porfirin fluoreszcencia élettartama is jellegzetes változást mutat. A szabad állapotú TMPyP szingulett gerjesztett élettartama (4,1 ns) külső kötődés esetén nő (10,6 ns), interkaláció esetén pedig csökken (1,1 ns) foszfát pufferben [160]. A triplett állapot élettartamára vonatkozó mérésekből megállapítható, hogy a szabad forma élettartama O_2 -mentes környezetben 74 μs , O_2 jelenlétében pedig 2,3-2,5 μs . Borissevitch és mtsai [161] az O_2 -mentes környezetben csak egy fajta triplett kötött állapotot figyeltek meg ($\tau=340 \mu\text{s}$), míg oxigén jelenlétében két, 7,3-13,0

illetve 25,0-32,0 μ s-os komponenst írtak le. A DNS-kötődés során mutatott kinetika alapján a rövidebb élettartamú komponenst a külső komplex-szel, a hosszabb élettartamú populációt pedig az interkalált formával azonosították.

3.táblázat A TMPyP DNS-hez kötött két fő formájának jellemzői

	interkaláció	külső kötődés	hivatkozás
Bázispreferencia	G - C	A - T	[157], [171], [156]
Kötőhely hossza	1 - 2 bp	4 - 5 bp	
Orientáció*	~ 82 - 85 °	~ 45 - 65 °	[170], [152],
Kötődési állandó (M ⁻¹)			
alacsony ionerő	5 x 10 ⁶ - 2 x 10 ⁷	4 x 10 ⁶	[158], [162], [173], [172],
nagy ionerő	6 x 10 ⁴	7 x 10 ⁴	
Abszorpciós spektrum			
Soret sáv vörös eltolódás	10 - 25 nm	5 - 8 nm	[167], [158], [146]
Soret sáv hipokrómia	> 40 %	5 - 10 %	
Lumineszcencia jellemzők			
Emissziós sáv szerkezete	felhasad	felhasad	[159], [160], [161]
Fluoreszcencia intenzitás	csökken	nő	
Szingulett élettartam	1,1 ns	10,6 nsc	
Triplett élettartam	25,0 – 32,0 μs	7,3 – 13,0 μs	
Kontakt energia-transzfer	van	nincs (?)	[152], [162]
CD-jel a Soret-sávban	negatív	pozitív	[167], [158], [168], [174], [152], [169]

* - a polinukleotid hossz tengelyéhez képest

A DNS-bázisok és a kromofór közelségére utaló bizonyíték a Förster-féle rezonancia energiáttranszfer létrejötte. Ilyenkor a bázisok abszorpciós maximumán ($\lambda=260$ nm) gerjesztve a rendszert, a TMPyP -re jellemző hullámhossztartományban a porfirinre jellemző emisszió jelenik meg [152,162]. A jelenség – a bázisok és a ligandum elektron-rendszerének közeli kapcsolata miatt – interkaláció esetén figyelhető meg, így arra specifikusnak tekinthetjük [163]. Egyes megfigyelések azonban ennek ellentmondva, éppen a kationos porfirinek esetében, lehetséges ellenpéldával is szolgálnak [164].

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia szintén szolgáltat bizonyítékot a kötött formák megjelenésére, az egyes kötött formák azonosítására. A szabad TMPyP monomer akirális, ugyanakkor akirális porfirin-molekula a királis duplaszálú DNS-hez kötődve indukált optikai aktivitást mutat 300 nm felett, s így ez a jel jó elkülönül a DNS saját CD jelétől [165,166]. Több szerző bizonyította, hogy a TMPyP külső komplex esetén a Soret-sávban megjelenő jel pozitív, interkaláció esetén pedig negatív [152, 158,167-169].

Spektroszkópiai megközelítések a komplexek térszerkezetére vonatkozóan is szolgálhatnak információval. Mint azt lineáris dikroizmus módszerével kimutatták, az interkaláció esetén a TMPyP síkja a DNS-bázisok síkjával közel párhuzamos [152], míg külső kötődés esetén, azzal 42-45 fokos, Zn-komplex esetében 62-67 fokos [170], árok-kötődésre jellemző szöget zár be.

A TMPyP kötött formáinak jellemzésére szolgáló adatokat a 3. táblázatban foglalom össze.

Mint a fenti példák is alátámasztják, a TMPyP, illetve különböző fémkomplexeinek kötődése homogén bázisszekvenciájú oligo- és polinukleotidokhoz bizonyított, és a két kötési forma azonosítása és széles körű jellemzése is megtörtént. Ugyanakkor a vegyes bázis-összetételű, természetes DNS-hez való kötődésről kevés adat áll rendelkezésre [171,174]. Az általunk alkalmazott és az „Eredmények” fejezetben bemutatott abszorpciós spektrum-felbontás módszerének egyfajta megközelítését már korábban felhasználták ugyan a kétféle kötött állapot kvantitatív szétválasztására [161], de korábbi próbálkozások eredményei nem voltak összeegyeztethetőek az egyes kötött formákra kapott korábbi kísérleti adatokkal.

Munkánk során arra kerestünk választ, hogy a kationos porfirinek ismert kötött formái kimutathatók illetve azonosíthatók-e természetes, kettős szálú polinukleotidok jelenlétében. Tovább lépve arra is kíváncsiak voltunk, hogy létrejönnek-e ezek a kötött formák akkor is, ha a polinukleotid nem izolált formában, hanem nukleoprotein komplexek alkotórészeként van jelen a rendszerben. A kötött formák azonosításában elsősorban a különböző spektroszkópiai módszerek által szolgáltatott eredmények összehasonlító elemzésére támaszkodtunk.

A kötődés kinetikája

A TMPyP DNS-kötődésének időbeni viszonyait Pasternack és munkatársai tanulmányozták a porfirin-DNS elegyhez adott detergens (SDS), valamint nagy koncentrációjú sóoldat hatására létrejövő disszociáció, illetve többféle polinukleotid (szintetikus poli(A-T)₂, poli(G-C)₂, vegyes bázisösszetételű természetes DNS) közötti kompetíciós kísérletek időviszonyait elemezve. Eredményeik szerint a kötődés módjától függően a reakció néhányszor 10-500 ms-nyi idő alatt játszódik le; a külső kötődés gyorsabban, az interkaláció lassabban megy végbe. Megemlítendő továbbá, hogy a reakciók kinetikájának részletes elemzése során a szerzők megállapították, hogy a kétféle kötött forma átalakulhat egymásba, és ehhez nincs szükség közbeeső disszociált állapot megjelenésére [167].

A kötődés energetikai viszonyai

A két kötési mód kialakulásának és stabilitásának energiaviszonyaira vonatkozóan ellentmondóak az irodalmi adatok. Abban megegyeznek az eredmények, hogy a DNS-ben okozott jelentős torzulás [175] ellenére az interkaláció entalpia vezérelt folyamat [158,176,177]. Tjahjono és mtsai [176] szerint ugyanígy exoterm és entalpia vezérelt a TMPyP kötődése poly(dA-dT)₂ szekvenciához, ami feltételezhetően kis árokba való kötődéssel történik. Más szerzők szerint a külső kötődés endoterm és entrópia vezérelt folyamat [158,177].

McMillin és mtsa [178] molekuláris modellezési, krisztallográfiai, valamint ún. „hajtű”-DNS fragmentumokon végzett kísérletek alapján az egyes kötődésekre vonatkozó aktivációs és kötődési, „reorganizációs” energia-mennyiségeket becsülték meg. Tanulmányuk szerint a külső kötődés jelentős aktivációs energiát igényel, mivel a lokális DNS-struktúrának jelentős torzulást kell elszenvednie. A kedvező elektrosztatikus kölcsönhatások miatt azonban a kötődéskor felszabaduló energia is jelentős. Interkaláció esetén az aktivációs energia-igény valamivel mérsékeltebb, jóllehet magába foglalja a TMPyP piridil-csoportjainak a porfirin-gyűrű síkjába való rendeződését és a DNS részleges „kicsavarodását”. A kötődés energiáját itt a TMPyP piridil-csoportjainak és a foszfát oxigén-atomoknak az elektrosztatikus kölcsönhatása, valamint a porfirinváz és a bázisok között hidrofób és van der Waals kölcsönhatások adják. A szerzők feltételezése szerint azonban – a korábbi eredményektől eltérően – ez kisebb, mint a külső kötődés kialakulásakor felszabaduló energia-mennyiség.

A kötődés mennyiségi jellemzése

A ligandumok kötődésének mennyiségi leírására számos koncepció született. Az első modellt a reakció leírására és a kötődési állandó meghatározására Scatchard dolgozta ki [179]. Ez a modell egy ismert számú, egymástól független, egyforma kötőhelyekből álló

polinukleotidhoz való kötődést ír le a tömeghatás törvénye alapján, a „kötődési izoterma” (a telített kötőhelyek / szabad molekulák arányának ábrázolása a telített kötőhelyek függvényében) használatával. Ezt megközelítési módot azóta is elterjedten használják. A modell nagy előnye, és egyben jelentős hátránya is az egyszerűség. A valós kötődések bizonyos jellemzői ugyanis a Scatchard-modellnek gyakran nem felelnek meg. Ezért a későbbiekben több megközelítést dolgoztak ki a következő, a modell által le nem írt jelenségek figyelembe vételére: 1) szekvencia-specifititás, 2) kooperatív hatások, 3) átfedő kötőhelyek, több nukleotidhoz kötődő vegyületeknél [143]. Ezek közül a Scatchard-modellbe a szekvencia-specifitást és a kooperatív hatásokat lehet korlátozottan beépíteni.

Egy másik, gyakran alkalmazott módszer a McGhee és von Hippel által 1974-ben kidolgozott „neighbor exclusion” modell [180]. A szerzők statisztikai modellt használva sikeresen beépítették a DNS-kötődés leírásába mind az átfedő kötőhelyek, mind a kooperatív hatások elemzésének lehetőségét, valamint tanulmányukban útmutatást adnak a szekvencia-specifititás beépítésére is. Mint a Scatchard-modellnél is, ebben az esetben is a kísérleti „kötődési izoterma” illesztése szükséges egy – ezúttal nem lineáris – elméleti függvénnyel. A modell *per se* alkalmazhatósága azonban igencsak korlátozott; a kooperatív hatások jellemzésére használt mennyiség (ω) és a kötőhely-hossz (n) változása ugyanis nagyon hasonló jelleggel befolyásolja a próbafüggvényt, így – külső információ hiányában – a két mennyiség elválasztása még igen pontos kísérleti adatok esetén is nehézkes. A többféle kötőhely beépítése pedig még több, korántsem független paramétert visz be a függvénybe. Ezért a modell alkalmazását csak többféle bázis-összetételű DNS parallel vizsgálata esetén célszerű megkísérelni [143].

A kationos porfirinekkal foglalkozó irodalomban a fenti korlátok ellenére a két modell elterjedten használt. A 3. táblázatban bemutatott kötődési állandók meghatározása ezen modellek alapján történt. A szerzők többsége azonban, jelezve a kiszámított állandók érvényességi korlátaikat, azokat „látszólagos” kötődési állandóként említi [158,162,172,173].

Strickland és mtsai az egyensúlyi dialízis módszerét alkalmazva a két kötődési módra érvényes kötődési állandókat, valamint ezek ionerősség-függését határozták meg szintetikus, duplaszálú poli(A-T)_n és poli(G-C)_n polinukleotidokon [147]. Eredményeik szerint mindkét kötődés erőssége jelentős ionerősség-függést mutat, és a vizsgált ionerősség tartományban (0.12 – 0.52 M) a $4 \times 10^6 - 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ intervallumban található. Korábbi, abszorpciós spektroszkópiai mérések hasonló rendszereken ezzel egybehangzó eredményeket adtak [167,168].

A kationos porfirinek kötött formáinak azonosítására természetes, vegyes bázisösszetételű DNS-hez való kötődés során kevés példát találunk az irodalomban. Még inkább így van ez a kötött formák mennyiségére, mennyiségi megoszlására vonatkozóan. Pasternack és munkatársai a természetes DNS-en kialakuló viszonyokat, a két kötött állapot együttes előfordulását is megkísérelték leírni, a különböző közelítéssel végzett számításaik azonban egymástól eltérő eredményeket adtak [158]. Ennek elsősorban metodikai okai vannak; egy ilyen rendszerben ugyanis a kétféle kötött állapot „hagyományos” kísérleti módszerekkel történő szétválasztása meglehetősen nehézkes, valamint a bonyolult „neighbor exclusion” és kooperatív hatásokat adekvátan leíró elméleti modell felállítása sem járt sikerrel.

A kutatás során, az egyes kötött formák azonosítását követően, megkíséreltük azok mennyiségi jellemzését is megadni mind természetes kettős szálú DNS, mind az azt tartalmazó nukleoprotein komplex jelenlétében létrejövő kötődések esetében. Elemezni kívántuk azt is, hogy milyen tényezők befolyásolják a kötődés lehetőségét és a kationos porfirinek egyes kötési módok közötti megoszlását.

Kationos porfirinek kötődése B-DNS-től eltérő nukleinsav szerkezetekhez

Az eddigi kutatások legkiterjedtebben a kettős szálú B-DNS – kationos porfirin között kialakuló kapcsolatok feltárásával foglalkoztak. Kimutatták ugyanakkor, hogy kationos porfirinek vagy azok fémkomplexei kötődhetnek B-DNS-től eltérő szerkezetű nukleinsavakhoz, így Z-DNS-hez [181,182], egyszálú nukleinsavakhoz [169,183] vagy RNS kettős szálú doménjeihez [184]. E kötődési jelenségek fontos szerepet játszhatnak molekulafelismerési folyamatokban, a nukleinsavak szerkezeti átmeneteinek indukálásában, vagy akár nanostruktúrák előállításában.

A további DNS szerkezetek közül is – legalábbis ami a kationos porfirinekkel való kölcsönhatás jelentőségét illeti – kiemelkedik a G-quadruplex szerkezet. Izolált DNS molekulákban megjelenő guanin-kvartett (G-quadruplex) szerkezetről számos adat áll rendelkezésünkre; kialakulása, térszerkezete, a stabilitását biztosító illetve módosító körülmények ismertek. A sejtek genetikai állományában számos, guaninban gazdag szekvencia alkalmas lehet guanin-kvartett (G4) kialakítására, ugyanakkor ezek megjelenése és funkciója a működő DNS-ben még nem teljesen tisztázott. A TMPyP planáris aromás szerkezete és a karok pozitív töltése alkalmassá teszi a guanin-kvartett-tel való kölcsönhatásra [185]. Domináns kötődési formájában a legutolsó guanin-kvartetthez kapcsolódik stacking kölcsönhatás révén [186,187]. Egy másik lehetőségként a TMPyP kötődhet a guaninokat összekötő egyszálú hurokhoz, de ez a kölcsönhatás gyengébb, és kialakulását tekintve is kérdéses [188]. A TMPyP

kötődése feltételezhetően gátolja a telomeráz enzim működését [189,190], s mint ilyennek nagy jelentősége lehet daganat terápiás alkalmazásokban.

2.4. A fotodinamikus reakció antimikrobiális alkalmazása

A fotodinamikus reakciók (PDR) elsődleges alkalmazási területe a daganatok terápiája [26,89]. Akkor is így van ez, ha a fotodinamikus reakció felfedezése és az ezzel kapcsolatos korai kutatások mikrobiális sejtekhez kötődtek [21,191]. Melnick és Wallis az 1960-as években már kimutatta a PDR antivirális hatékonyságát állati vírusokon [192], de eredményeik később részben megkérdőjeleződtek, ami jelentősen hátráltatta az ilyen irányú kutatásokat. A 1980-as években fordult újra a figyelem a fotodinamikus reakciók (PDR) antimikrobiális – antibakteriális, antivirális, gombaölő – hatásának és gyakorlati alkalmazásának kutatása felé.

A PDR antimikrobiális hatását számos területen bizonyították. Eredményesen inaktíválhatja mind a Gram(+) mind a Gram(-) baktériumokat [193]. Ezek az alkalmazások ígéretesek és fontosak lehetnek a rezisztens törzsek elleni védekezésében [194], biofilmek komponenseinek inaktivációjában [195] vagy a periodontális kolóniák visszaszorításában [196], víztartalékok fertőtlenítésében [197].

A vírusinfekció elleni védekezés módszereinek fejlesztése, hatékonyságuk növelése, az alkalmazott metodikai repertoár szélesítése napjaink orvostudományának egyik nagy kihívását jelentik. Tünetmentes vagy banális lefolyású fertőzések mellett több infekció potenciálisan vagy biztosan halálos kimenetelű is lehet. A számtalan transzmissziós lehetőség közül különös figyelmet kap a transzfúziók kapcsán átvitt vírusfertőzések problémaköre. Ez annak ellenére így van, hogy az utóbbi évtizedben, a donorok kivizsgálásának és a vérkészítmények, szerológiai és molekuláris biológiai szűrésének köszönhetően jelentősen csökkent a vírusfertőzés átvitelének kockázata. A szűrés azonban a módszerek fejlődése ellenére elégtelen lehet például ismeretlen antigenitású és/vagy nukleinsav-szekvenciájú vírusok jelenléte vagy a szerológiai „ablak” periódus jelensége miatt [198,199]. Ezért – bár a költség-hatékonyság kérdése a fertőzések alacsony incidenciája miatt itt igen fontos – kiterjedt kutatások folynak a vérkészítmények fiziko-kémiai sterilizálásával kapcsolatban [200,201]. Az ilyen eljárásokkal szemben értelemszerűen két lényeges elvárás merül fel: 1) a patogén mikrobák széles körének minél teljesebb mértékű inaktivációja, illetve 2) minimális reziduális toxicitás, azaz a készítménynek és a fogadó szervezetnek a védelme. Mivel ezeknek a követelményeknek igen jól megfelel a fotodinamikus hatás térbeli és időbeli szelektivitása, az egyéb eljárásokkal – így például hőhatás, detergens használata, ionizáló sugárzás alkalmazása, kémiai kezelések –

történő próbálkozások mellett kiterjedten folyik a fotodinamikus vírusinaktiváció lehetőségeinek vizsgálata.

A plazmában található vírusok fotokémiai úton történő eliminálásával az 1980-as évek elején kezdett el célzottan foglalkozni az orvostudomány [202]. Az elsők között merült fel a fenotiazin származékok, mint fényérzékenyítők kipróbálása a vérkészítmények fotodinamikus fertőtlenítésében [203]. Lambrecht és mtsai a HIV-1 és a SFV csíraszámának 6, a HSV és VSV csíraszámának 5 nagyságrenddel való csökkenését tapasztalták metilénkék (MB) és fény kombinált alkalmazása után. A metilénkék kipróbálását korábbi megfigyeléseken és a vegyületek fotofizikai tulajdonságain túl az a megfigyelés is indokolta, hogy a metilénkék kötődik a nukleinsavakhoz [204,205]. Mint az már a membránmodellekkel kapcsolatos fejezetben említésre került, a fotodinamikus reakciók hatásmechanizmusával kapcsolatban általánosan elfogadott nézet, hogy a fényérzékenyítő lokalizációja egyben az indirekt fotokémiai reakció lehetséges támadáspontját is meghatározza, mivel a sejtben $^1\text{O}_2$ közvetítette sérülések annak keletkezésétől mintegy 100 nm-es távolságon belül alakulnak ki.

Megállapították, hogy a metilénkék hatékonyan szenzibilizálja több, extracelluláris, burokkal rendelkező vírus, például HIV-1, HSV, VSV inaktivációját [206]. Ugyanakkor az intracelluláris vírusokkal szemben hatékonysága csekély.

Az SV40 sikeres inaktivációjával [207] kapcsolatban született eredmények inkább kivételnek tekinthetők, mert a burokkal nem rendelkező vírusok ellenállónak bizonyulnak a MB kezeléssel szemben. A MB kezelések lehetőségét korlátozza továbbá, hogy az hemolízist okoz, fokozza a vörösvérsejtek kálium kiáramlását és elősegíti szérum fehérjék nem-specifikus kötődését a vörösvérsejtek felszínéhez [208]. Mellékhatásai miatt a MB alkalmazása csak sejtmentes környezetben engedélyezett. Ugyanakkor az 1990-es évek eleje óta a vérbankok Európa-szerte alkalmazzák például a THERAFLEX MB-PLASMA[®] (MacoPharma, Tourcoing, France) komplex készítményt a plazma vírusszennyeződésének inaktiválására [209].

A fenotiazin származékokon kívül az elmúlt 30 évben számos más fényérzékenyítő vegyület aktivitását és felhasználásának lehetőségét tesztelték. Így például a merocianin 450, első és második generációs hipericin származékok [210], hipokrellin A [211], ftalocianinok [212,213], hematoporfirin származékok [214] szintén alkalmasak lehetnek fotodinamikus vírusinaktivációra. Megjegyzendő, hogy ezek a vegyületek, hasonlóan a metilénkékhöz, csak a peplonnal rendelkező vírusok ellen és csak sejtmentes készítményekben használhatók eredményesen [42].

A felsorolt fényérzékenyítők fotokémiai hatásmechanizmusának alapja döntően a II. típusú fotokémiai reakció. Ez azt jelenti, hogy a vegyületek fotoaktivációja szingulett oxigén termelődését eredményezi a rendszerben, aminek a jelenléte vezet a vírusalkotók fotokémiai sérüléséhez. Az I típusú fotokémia reakció, vagyis a szabad gyökök szerepe e folyamatban csekély. Ezt támasztják alá a kompetítorokkal végzett kísérletek [13,215].

A szingulett oxigén potenciális támadáspontjai lehetnek a peplont alkotó telítetlen lipidek és fehérjék, a fehérje kapszid, a magfehérje vagy a nukleinsavak. Az a tény azonban, hogy a fenti fényérzékenyítők peplonnal rendelkező vírusokat képesek inaktiválni jelzi, hogy ebben az esetben a molekuláris támadáspont(ok) a peplon alkotói között keresendő(k). Az irodalomban kevés adat áll rendelkezésünkre a telítetlen zsírsavak oxidatív sérüléseinek a vírusinaktivációban betöltött szerepéről, de közvetett bizonyítékok alapján mégis azt mondhatjuk, hogy ez nem elhanyagolható [216]. Több szerző részletesen vizsgálta és azonosította a fehérjékben kialakuló sérüléseket [217]. A fotooxidációra érzékeny aminosavak fototermékeinek megjelenése megváltoztathatja a fehérje térszerkezetét, ami a funkció elvesztéséhez is vezethet. Éppen a fehérjékben okozott fotokémiai sérülésekkel magyarázhatók a metilénkéssel szenibilizált fotodinamikus kezelések mellékhatásai is, így a plazma fehérjék, alvadási faktorok sérülései [218], a sejtes elemek fehérjekomponenseinek sérülései.

Mindezen mellékhatások kiküszöbölésének egyik lehetséges megközelítése olyan fényérzékenyítő vegyületek alkalmazása, amelyek szelektíven kötődnek a nukleinsavakhoz és szelektíven károsítják azt. További követelmény a hidrofíli karakter, ami biztosíthatja a membránokkal való kölcsönhatásuk, illetve aggregációjuk alacsony szintjét. Ezért a kutatások egyik fő irányát a nukleinsavakhoz nagy affinitással, szelektíven kötődő fényérzékenyítő molekulák vizsgálata jelentette [219-221]. Ezek között szerepelnek az általunk is tanulmányozott kationos porfirin származékok.

Az antivirális hatás tesztelésének elfogadott módja – még a patogén vírusokon való kipróbálást megelőzően – a hatékonyság és hatásmechanizmus vizsgálata **bakteriofágokon**. A bakteriofágok korán megjelentek a fotodinamikus hatások kutatásában [222]. A kezdeti kutatások nem irányultak célzottan a fotodinamikus vírusinaktiváció gyakorlati alkalmazására, de több alapvető információt szolgáltattak annak megalapozására [223]. Yamamoto számos festék összehasonlító elemzését végezte el a T-sorozat tagjainak (T1-7) felhasználásával [224]. Eredményei figyelemre méltóak még akkor is, ha a besugárzás körülményei nem voltak reprodukálhatóak és feltehetően a szerző a különböző vegyületek fotofizikai tulajdonságaira sem volt tekintettel.

A bakteriofágok alkalmas modelljei lehetnek mind a peplon nélküli ($Q\beta$, λ , T sorozat) mind a peplonnal rendelkező (PM2, PRD1, $\Phi 6$) patogén vírusoknak. Genomjuk modellezheti mind az RNS ($Q\beta$, $\Phi 6$, MS2), mind a DNS örökítő anyagú vírusokat (T sorozat, λ , PM2).

A bakteriofágokon végzett kísérletek hozzájárultak a fotodinamikus inaktiváció (PDI) molekuláris támadáspontjainak megismeréséhez is. A metilénkék hatékonyságával kapcsolatban a fentiekben említettük, hogy az megfelelő mértékben (5-7log) inaktiválja a burokkal rendelkező patogén vírusokat, de szinte hatástalan a külső membránnal nem rendelkező vírusokkal szemben. Ennek hátterét vizsgálták PM2 bakteriofágon. Metilénkék jelenlétében besugárzott PM2 mintákból izolált DNS elemzésével kimutatták, hogy a DNS sérülések és az inaktiváció mértéke között nincs korreláció [225]. Hasonlóan kezelt, membrán burokkal nem rendelkező M13 baktriofág esetében ugyanakkor a DNS sérülések szoros összefüggést mutatnak az inaktivációval [212], ami azonban sokkal kisebb mértékű (2log), mint a membránnal rendelkező vírusé. Schneider és mtsai [226] oxidatív sérüléseket és RNS-fehérje keresztkötést mutattak ki $Q\beta$ bakteriofágban, de a sérülések és az inaktiváció összefüggését nem vizsgálták.

A fenti megfigyeléseket magyarázhatja, hogy lipidek jelenlétében a MB elsődlegesen az azokat tartalmazó struktúrákban lokalizálódik, míg a lipid komponens hiányában a nukleinsavakhoz kötődik, illetve részben aggregátumok formájában van jelen a vizes oldatban [227]. Mind az aggregáció, mind a nukleinsavakhoz való kötődés – tekintettel a MB elnyelési spektrumára – csökkenti a MB tényleges abszorbanciáját.

DNS-hez kötődő más fényérzékenyítők hatékonyságát és hatásmechanizmusát tanulmányozták λ fágon. Kimutatták, hogy a kötődés megváltoztatja például a riboflavin abszorpciós spektrumát, ami megmutatkozik a hatásspektrum maximumának hullámhosszában is [228]. Kasturi és Platz [219] a fág-titer 7 nagyságrenddel való csökkenéséről számolt be kationos porfirinnel kezelt és besugárzott mintákban. A koncentráció viszonyok és kötődési állandók ismerete nélkül nem ítélt meg, hogy ez a kötött, vagy a már feleslegben lévő szabad porfirinnek tulajdonítható-e. Meglepő, számos más eredménynek ellentmondó tapasztalatuk, hogy az inaktivációt nem befolyásolta az oxigén jelenléte. Majiya és mtsai [229] kationos porfirinnel szenibilizált MS2 bakteriofág esetében a II. típusú, szingulett oxigén közvetítésével lejátszódó fotokémiai reakció dominanciáját mutatták ki.

Új fényérzékenyítő struktúrák kipróbálására is alkalmas vírusmodellül szolgálhatnak bakteriofágok. Így például Snow és mtsai [230] kationos fullerén aggregátumok hatékonyságát

tesztelte MS2 peplon nélküli RNS fágokon. Ugyanebben a közleményben szoros korrelációt találtak a $^1\text{O}_2$ koncentrációja és az inaktiváció mértéke között.

A fotodinamikus eljárás eredményét befolyásoló tényező a megfelelő emissziós spektrummal rendelkező fényforrás és a besugárzási körülmények – fényintenzitás, időbeni eloszlás – megfelelő megválasztása. Q β bakteriofágokon nyert eredmények szerint a kisebb intenzitású illetve frakcionált besugárzás azonos végső beeső (J/m^2) dózis mellett nagyobb arányú fáginaktivációt eredményez [231]. Ezek alapján a reciprocitás törvényének korlátozott érvényességére nemcsak a fotodinamikus terápiában, hanem a vérkészítmények sterilizálását célzó eljárások kidolgozásánál is figyelemmel kell lennünk.

Megállapítható, hogy a bakteriofágokon nyert adatok megalapozhatják a PDR patogén vírusokon való alkalmazását, hasznos adatokat szolgáltathatnak a kezelések hatékonyságának optimalizálásához. Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a kísérleti körülmények – hatóanyag kémiai szerkezet és koncentráció, kötődési folyamatok elégtelen elemzése, fényforrás spektrum, fényintenzitás, vírustiter, stb. –, és az eredmények bemutatásának nagy változatossága miatt szinte lehetetlen az egyébként nagyszámú eredmény összehasonlító elemzése.

A TMPyP - DNS és TMPyP - T7 nukleoprotein komplex kölcsönhatásaink általunk elvégzett elemzése megfelelő alapot biztosított ahhoz, hogy a TMPyP fotodinamikus hatékonyságának és a fotoreakció mechanizmusának elemzésén túl arra is választ keressünk, hogy melyek a vírusinaktiváció optimális körülményei; valóban biztosítható-e a sérülések szelektív lokalizációja a porfirin szelektív kötődésével.

3. Célkitűzés

Az orvostudományban a porfirin származékok két fő alkalmazási területe a daganatok fotodinamikus terápiája (PDT) és a mikroorganizmusok fotodinamikus inaktivációja (PDI). Mindkét területen a hatékonyság és hatásmechanizmus szempontjából meghatározó lehet – a fotofizikai paramétereken túl – porfirin származék lokalizációja, a környezetben lévő molekulákkal kialakított kapcsolata. Ezeknek a kölcsönhatásoknak az elemzéséhez járultunk hozzá kutatásainkkal. Vizsgálataink két vegyületcsaládra, a mezo-pozícióban monoszaharidot tartalmazó glikozilált porfirin származékokra és a pozitív töltésű kationos porfirin származékokra terjedtek ki.

1. A glikozilált porfirin származékok és modellmembránok kölcsönhatásának elemzése.

Arra kerestünk választ, hogy

- milyen tényezők befolyásolják a fényérzékenyítő kötődését a membránhoz; a porfirin szerkezete és a modellmembrán lipidösszetétele milyen hatással van a folyamatra.
- a porfirin származék szerkezete hogyan befolyásolja annak lipid kettős rétegen belüli lokalizációját

2. Kationos porfirin származékok és peptid konjugátumaik kötődése DNS-hez és nukleoprotein komplexhez, a kötődés kvantitatív és kvalitatív jellemzése.

Arra kerestünk választ, hogy

- az interkaláció és a kis árok kötődés, mint a kationos porfirinek kötött formái kimutathatók illetve azonosíthatók-e természetes, kettős szálú polinukleotidok jelenlétében
- létrejönnek-e ezek a kötött formák akkor is, ha a polinukleotid nem izolált formában, hanem nukleoprotein komplexek alkotórészeként van jelen a rendszerben.

A kötött formák azonosításán túlmenően célul tűztük

- a kötött formák mennyiségi jellemzését, a kötött porfirin egyes kötött formák közötti megoszlásának meghatározását mind természetes kettős szálú DNS, mind az azt tartalmazó nukleoprotein komplex jelenlétében
- kationos porfirinek kötési módok közötti megoszlását befolyásoló tényezők vizsgálatát, így a DNS bázisösszetételének, a porfirin származék töltésének, a környezet ionösszetételének és ionerősségének hatását a folyamatra

A porfirin származékok biológiai hatásának lehetséges támadáspontjai a DNS és a nukleoprotein komplex. Ezt használhatjuk ki például a vírusok fotodinamikus inaktivációjában.

Kutatásunk egyik kérdésköre a vírusinaktiváció kvantitatív jellemzése és mechanizmusának feltárása volt. Vizsgálatainkban a T7 bakteriofágot, mint a membrán burokkal nem rendelkező patogén vírusok modelljét használtuk.

3. A porfirin származékok kötődése és fotoreakciója által okozott szerkezeti és funkcionális változások jellemzése

Célunk volt

- a glikozilált és kationos porfirin származékok, porfirin-peptid konjugátumok DNS és nukleoprotein komplex szerkezeti stabilitására gyakorolt hatásának elemzése
 - a T7 bakteriofág porfirin származékok kötődése által, de fény közreműködése nélkül (u.n. sötét reakció révén) okozott inaktivációjának kvantitatív jellemzése; az egyes származékok hatékonyságának összehasonlítása
 - a szabad gyökök illetve a szingulett oxigén jelenlétének, vagyis az I. illetve II. típusú fotokémiai reakció fotoszenzibilizált vírusinaktivációban játszott szerepének kimutatása
 - a glikozilált és kationos porfirin származékok fotokémiai reakciói által indukált fáginaktiváció mértékének meghatározása
 - DNS-hez kötődő származékok esetén a kötött és szabad formák fotokémiai hatékonyságának összehasonlítása
 - a fotokémiai reakciók következtében a nukleoproteinek – T7 bakteriofág és nukleoszóma – és az azokból izolált nukleinsav komponensek termikus stabilitásában bekövetkezett változások elemzése
- Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy valóban biztosítható-e a fotokémiai sérülések szelektív lokalizációja a porfirin szelektív kötődése révén.

4. Kationos porfirinek és peptid-konjugátumaik sejten belüli lokalizációja

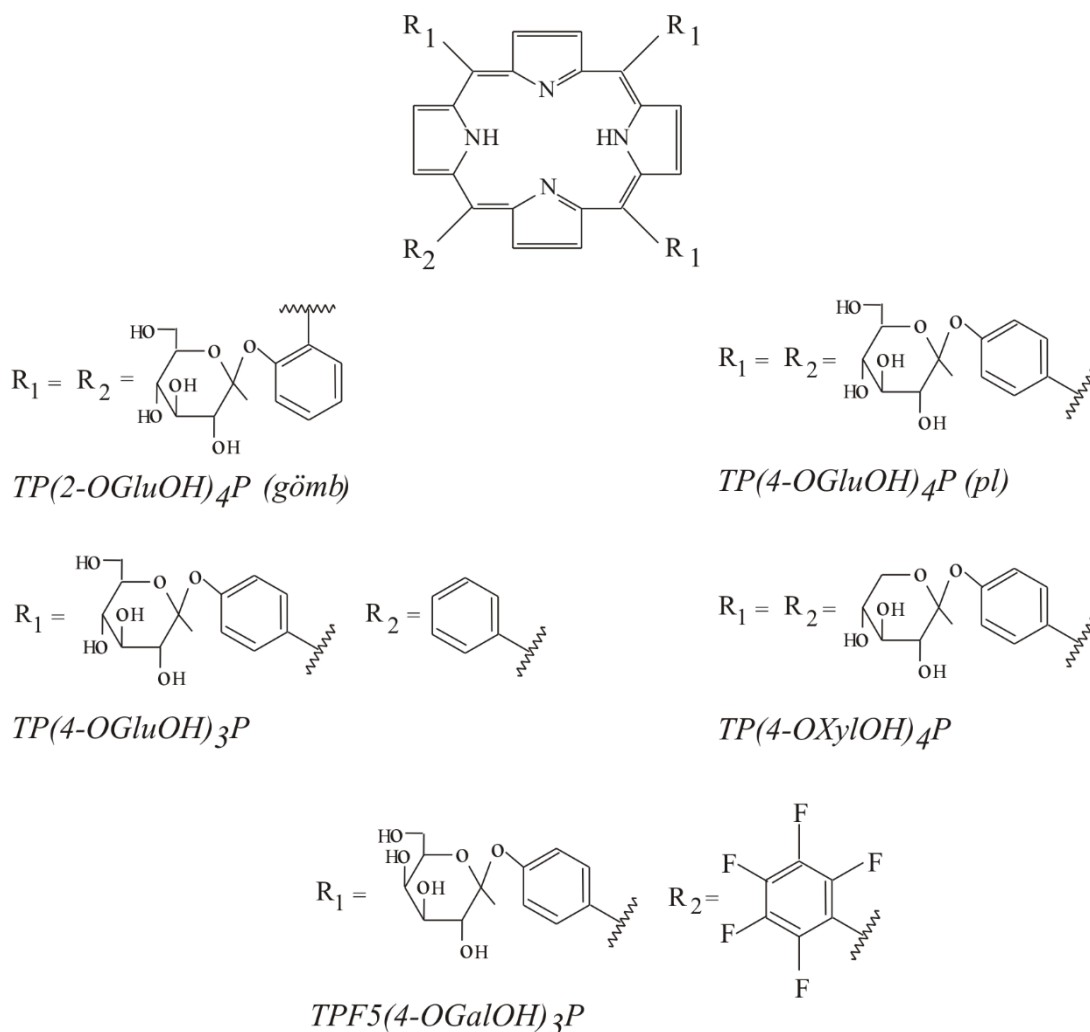
Arra kerestünk választ, hogy

- hogyan befolyásolja a porfirin töltése és a konjugátum szerkezete a sejtekben való felhalmozódást
- az izolált DNS-hez/nukleoprotein komplexhez való kötődés alapján várható-e a porfirin származék lokalizációja a sejtmagban
- a sejten belül mely sejtalkotókban lokalizálnak a kationos porfirinek és peptid-konjugátumaik.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Pufferek

A T7 bakteriofágok tenyésztéséhez valamint a liposzómák készítésénél M9 foszfát puffert (20 mM KH_2PO_4 , 40 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NH_4Cl , 1 mM MgSO_4 ; pH 7,4; $\mu=124$ mM) használtunk.



8. ábra A dolgozatban vizsgált mezo-szubsztituált glikozilált porfirinek: 5,10,15,20-tetrakis(2- β -D-glükózil-fenil)porfirin ($TP(2-OGluOH)_4P$), 5,10,15,20-tetrakis(4- β -D-glükózil-fenil)-porfirin ($TP(4-OGluOH)_4P$), 5,10,15-trisz(4- β -D-glükózil-fenil),20-fenilporfirin ($TP(4-OGluOH)_3P$) és 5,10,15-trisz(4- β -D-galaktozil-fenil),20-(2',3',4',5'-pentafluorofenil)porfirin ($TPF5(4-OGalOH)_3$), 5,10,15,20-tetrakis(4- β -D-xilozil-fenil)porphyrin $TP(4-OXyLOH)_4P$ szerkezeti képlete

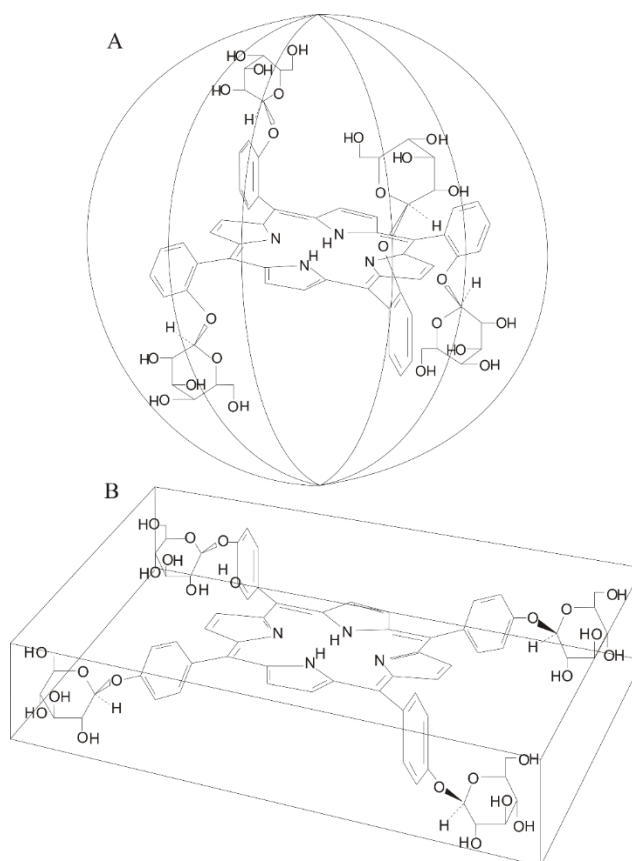
A T7 bakteriofággal és az abból izolált DNS-sel végzett fáginaktivációs illetve spektroszkópiai méréseink során, ahol az ettől való eltérést nem jelöltük Tris-HCl (pH 7,4) puffert [232] alkalmaztuk. Az oldatok 70 mM teljes ionerősség esetén 20 mM, nagyobb ionerő

esetén 40 mM tris-(hidroximetil)-aminometánt (Tris-t) tartalmaztak. A végleges ionerősséget telített NaCl megfelelő mennyiségének hozzáadásával érték el. A pH beállításához 10 M-os sósavat használtunk.

A kétértékű ionokkal (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}) kiegészített fenti Tris-HCl pufferekben a kérdéses ionok koncentrációja, telített klorid ill. szulfát sóik oldatának megfelelő elegyítése után minden esetben 1 mM volt [233].

4.2. Porfirin származékok és porfirin-peptid konjugátumok

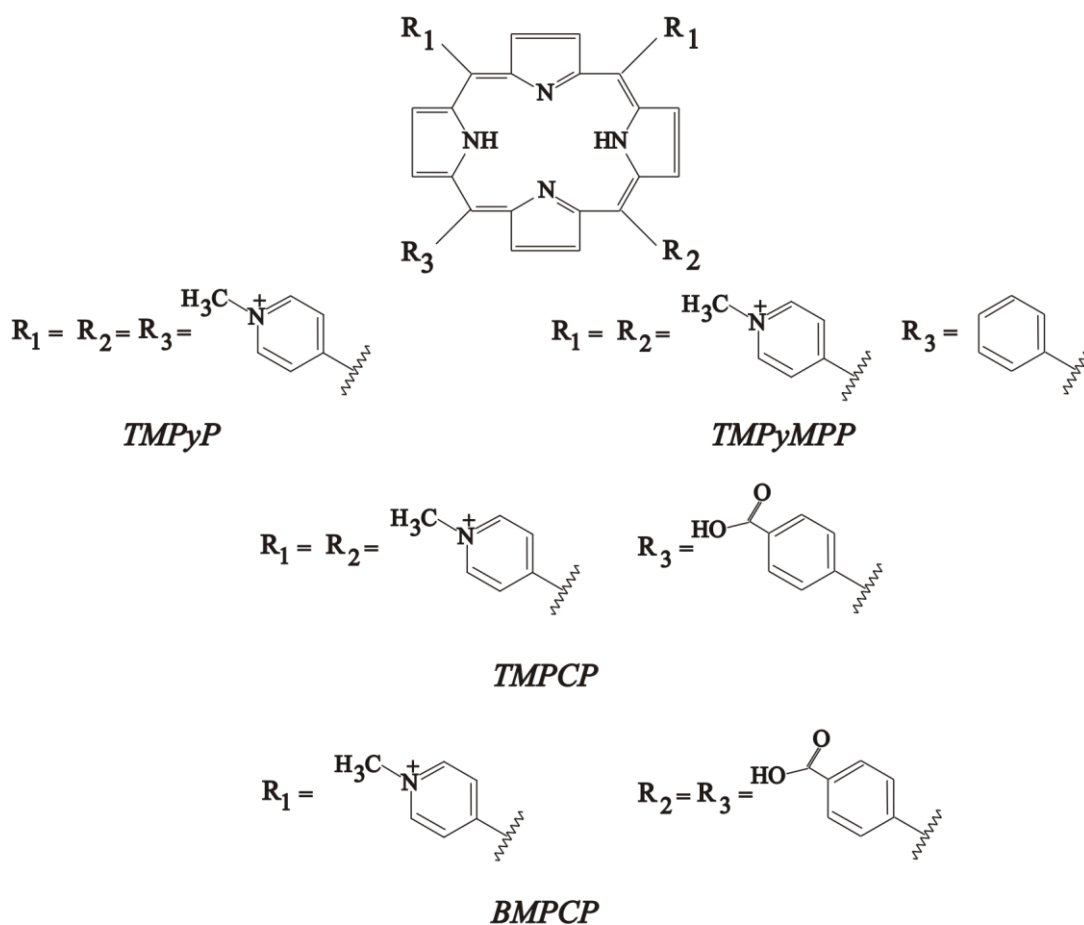
A dolgozatban bemutatott vizsgálatokban szereplő *neutrális* mezo-szubsztituált porfirin származékok a *glikozilált* 5,10,15,20-tetrakis(2- β -D-glükózil-fenil)porfirin (TP(2-OGluOH)₄P), az 5,10,15,20-tetrakis(4- β -D-glükózil-fenil)porfirin (TP(4-OGluOH)₄P), az 5,10,15-tris(4- β -D-glükózil-fenil),20-fenilporfirin (TP(4-OGluOH)₃P), az 5,10,15-tris(4- β -D-galaktozil-fenil),20-(2',3',4',5'-pentafluorofenil)porfirin (TPF5(4-OGalOH)₃) valamint az 5,10,15,20-tetrakis(4- β -D-xilózil-fenil)porfirin (TP(4-OXylOH)₄P) (8. ábra). A planáris és gömbszimmetrikus származékok térszerkezetét a 9. ábrán mutatom be.



9. ábra A gömbszimmetrikus (A) és planáris (B) glikozilált tetrafenilporfirinek térszerkezete

A tanulmányozott, *pozitív töltéssel* rendelkező származékok az 5,10,15,20-tetrakis(1-metil-4-piridinio)porfirin (TMPyP), az 5,10,15-trisz(1-metil-4-piridinio),20-monofenilporfirin (TMPyMPP), az 5,10,15-trisz (1-metil-4-piridinio)20-mono-(4-karboxifenil)porfirin (TMPCP) valamint az 5,10-bisz(1-metil-4-piridinio)-15,20-di-(4-karboxifenil)porfirin (BMPCP) (10. ábra).

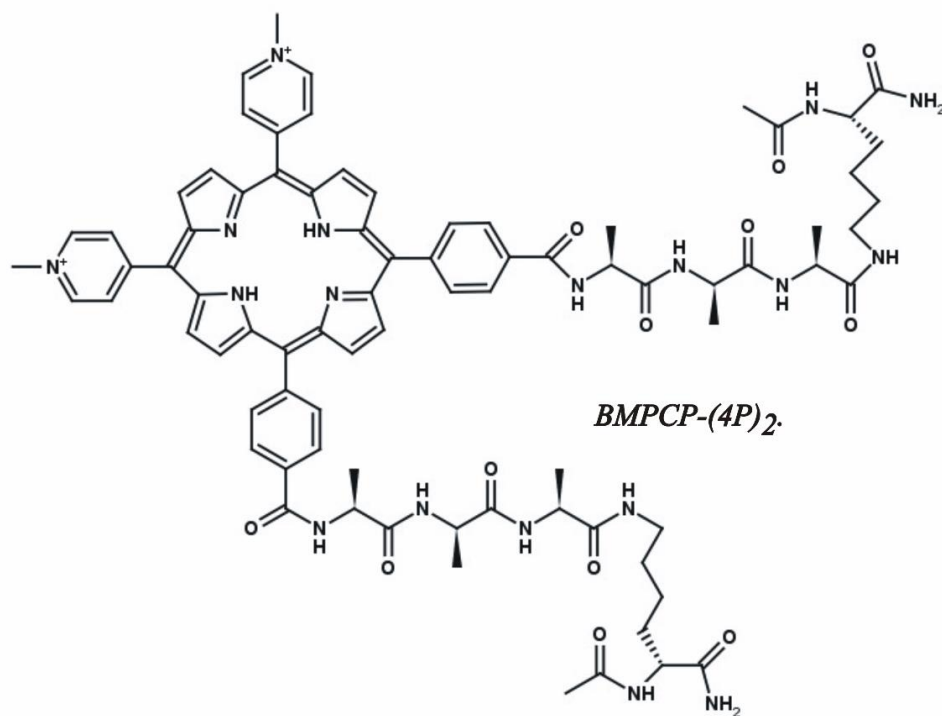
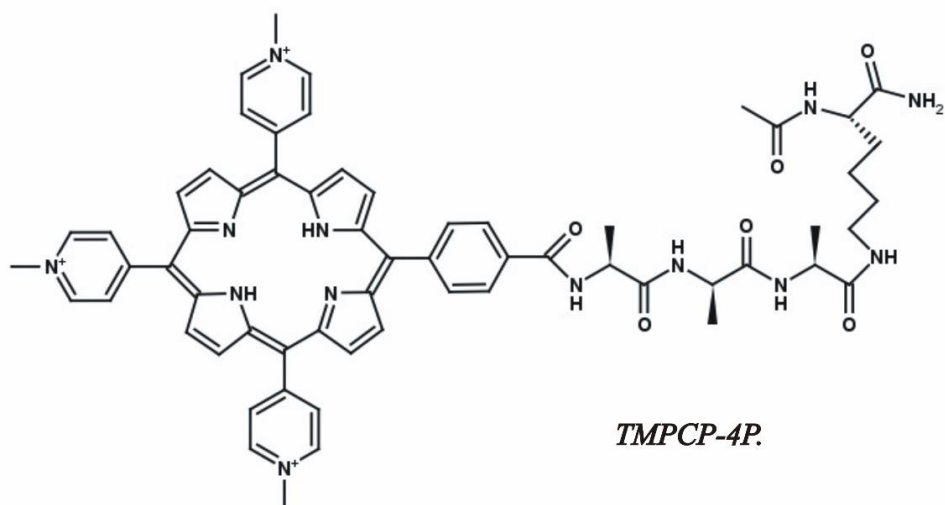
A mezo-szubsztituált, glikozilált tetrafenilporfirin konjugátumokat Ph. Maillard bocsátotta rendelkezésünkre (Institute Curie Section de Recherche (Orsay, Franciaország)) [66,67,69], a többi vegyület a Frontier Scientific (korábban Porphyrin Products) (Carnforth, UK) terméke volt.



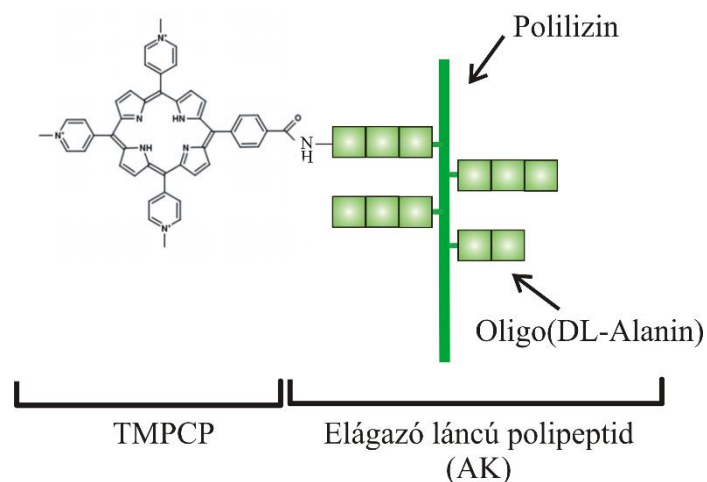
10. ábra A dolgozatban vizsgált kationos porfirinek: 5,10,15,20-tetrakis(1-metil-4-piridinio)porfirin (TMPyP), 5,10,15-trisz(1-metil-4-piridinio),20-monofenilporfirin (TMPyMPP,) 5,10,15-trisz (1-metil-4-piridinio)20-mono-(4-karboxifenil)porfirin (TMPCP) és 5,10-bisz(1-metil-4-piridinio)-15,20-di-(4-karboxifenil)porfirin (BMPCP) szerkezeti képlete

A BMPCP és TMPCP tetrapeptid konjugátumait: $\text{NH}_2\text{-Lys(TMPCP-Ala-D-Ala-Ala)-CONH}_2$ (TMPCP-4P) és $\text{NH}_2\text{-Lys[Lys(Ala-D-Ala-Ala-BMPCP-Ala-D-Ala-Ala)]-CONH}_2$ (BMPCP(4P)₂) (11. ábra) és az elágazó láncú poli[Lys-(DL-Ala_m)] (AK) polipeptiddel képzett konjugátumot (TMPCP-AK) (12. ábra) kutatócsoportjaink közötti együttműködés keretében

Mező Gábor és mtsai (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) készítették és jellemezték [234,235].



11. ábra BMPCP és TMPCP tetrapeptid konjugátumainak: $\text{NH}_2\text{-Lys(TMPCP-Ala-D-Ala-Ala)-CONH}_2$ (TMPCP-4P) és $\text{NH}_2\text{-Lys[Lys(Ala-D-Ala-Ala-BMPCP-Ala-D-Ala-Ala)]-CONH}_2$ (BMPCP(4P)₂) szerkezeti képlete



12. ábra A TMPCP-elágazó láncú polipeptid konjugátum (TMPCP-AK) sematikus felépítése

Az elágazó láncú polipeptid polilizin gerincének átlagos polimerizációs foka $\overline{DP}_n=250$, a DL-Ala/Lys mól/mól aránya 2,7, a [Lys-(DL-ALA_{2,7})] monomer egységek átlagos móltömege 320 Da.

A porfirin származékokat por, illetve oldékonyságuktól függően optikai tisztaságú metanolban (Sigma, Deisenhofen, Németország) vagy desztillált vízben készített törzsoldat ($\sim 10^{-3}$ M) formájában, sötétben tároltuk 4 °C-on. A mérések során ezekből a törzsoldatokból a felhasznált pufferekbe való direkt hígítással állítottuk elő a kívánt koncentrációjú oldatokat. Az aktuális koncentrációt a vegyületek spektroszkópiai tisztaságú oldószerekben mért abszorbanciája alapján határoztuk meg. A vegyületeknek a dolgozatban használt rövidítését és moláris abszorbanciáját a 4. táblázat foglalja össze.

4.3. Liposzómák előállítása és jelölése

A lipid–porfirin kölcsönhatások vizsgálatára különböző összetételű, kis unilamelláris liposzómákat (SUV) állítottunk elő [239,240]. A felhasznált foszfolipidek főbb paramétereit az 5. táblázatban foglaljuk össze. A foszfolipidet kloroformban oldottuk fel, majd az edényt folyamatosan forgatva az oldószert légritkított térben elpárologtattuk. Ezután a lipid filmet foszfátpufferbe szuszpendáltuk, (a törzsoldat foszfolipid koncentrációja $c=1,5$ mM volt), majd a szuszpenzió kitisztulásáig kezeltük ultrahanggal (MSE Ultrasonic Disintegrator; $A=8\mu\text{m}$, $f=23\text{kHz}$, $P=15\text{W}$). A liposzómák méretét fényszórásméréssel (ALV Goniometer, Spectraphysics 124B He–Ne lézer, $P=10$ mW, $\lambda=632.8$ nm) ellenőrizve az átlagos átmérő 50 nm körülinek adódott. A különböző összetételű liposzómák átlagos méretében nem találtunk szignifikáns különbséget.

4. táblázat A dolgozatban használt porfirin származékok abszorpciós maximumának hullámhossza (λ) és moláris abszorbanciája (ϵ)

vegyület	oldószer	λ (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	hivatkozás
Glikozilált porfirinek				
TP(2-OGluOH) ₄ P	MeOH	415	$3,5 \times 10^5$	[97]
TP(4-OGluOH) ₄ P	MeOH	415,5	$4,07 \times 10^5$	[236]
TP(4-OGluOH) ₃ P	MeOH	416	$5,6 \times 10^5$	[236]
TPF5(4-OGalOH) ₃	MeOH	415	$5,94 \times 10^5$	[236]
Kationos porfirinek				
BMPCP	MeOH	421	$1,59 \times 10^5$	[234]
TMPCP	MeOH	426	$4,02 \times 10^5$	[234]
TMPyP	Tris-HCl	422	$3,17 \times 10^5$	[237]
TMPyMPP	Tris-HCl	422	$2,7 \times 10^5$	[238]
Porfirin-konjugátumok				
BMPCP-(4P) ₂	MeOH	420	$2,37 \times 10^5$	[234]
TMPCP-4P	MeOH	426	$4,62 \times 10^5$	[234]
TMPCP-AK			-	-

5. táblázat A liposzómák előállításához felhasznált foszfolipidek jellemző paraméterei

foszfolipid	telített/telítetlen arány (mól/mól)	fejcsoport töltés	fázisátalakulási hőmérséklet (°C)	felhasználás
DMPC	14:0	neutrális	24	Kötődés
DMPG	14:0	negatív	23	vizsgálatok
DPPC	16:0	neutrális	41	ESR vizsgálatok
DOPC	18:1	neutrális	-17	

A porfirinek kötődési vizsgálatait neutrális fejcsoportú 1,2-dimirisztoil-*sn*-glicero-3-foszfadilkolinból (DMPC) (Sigma-Aldrich, Németország) és DMPC és negatív töltésű

fejcsoportú 1,2-dimirisztoil-*sn*-glicero-3-foszfatidilglicerol (DMPG) (Sigma-Aldrich, Németország) 9:1 (mól/mól) arányú keverékéből készített liposzómákon végeztük [236].

DMPC és DMPC/DMPG liposzómák fejcsoport régiójának illetve szénhidrogénlánc régiójának fluoreszcens jelzésére a SUV szuszpenzióját 8-anilino-1-naftalinszulfonsavval (ANS) (Sigma-Aldrich) illetve 1,6-difenil-1,3,5-hexatriénnel (DPH) (Sigma-Aldrich) inkubáltuk 30 percig a jelzők telítési koncentrációja felett, a lipidek fázisátalakulási hőmérsékleténél magasabb hőmérsékleten (37 °C-on) [236,241]. A jelzők fluoreszcencia élettartamának illetve anizotrópiájának mérése során a mintákat $\lambda_g=398$ nm-en (ANS) illetve $\lambda_g=357$ nm-en (DPH) gerjesztettük, az emittált jelet $\lambda_{em}=480$ nm-en (ANS) illetve $\lambda_{em}=450$ nm-en (DPH) detektáltuk.

A liposzómák lipid régiójának elektron spin rezonancia spektroszkópiai vizsgálatához 1,2-dipalmitoil-*sn*-glycero-3-foszfatidilkolin (DPPC) és 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-foszfatidilkolin (DOPC) felhasználásával 70:30 illetve 85:15 (mól/mól) összetételű liposzómákat készítettünk. [242]. A liposzóma membránt különböző mélységekben, így a fejcsoportnál, a szénhidrogén lánc középső és terminális részén vizsgáltuk különböző spinjelölők segítségével. Spinjelzésre 5-doxyl-, 7-doxyl-, és 12-doxyl-sztearinsavat (ICN Biomedicals Inc Ohio, U.S.A.) valamint 16-doxyl-sztearinsav (Sigma Chem. Co) jelölőt használtunk. A jelölő molekulát, valamint a vizsgált porfirin származékot a preparálás első lépésében a lipidekkel együtt oldottuk fel kloroformban, majd követtük a fent leírt liposzóma preparálási eljárást. A lipid:spinjelző illetve a lipid:porfirin molarány 100:1 illetve 1000:1(mól/mól) volt.

4.4. T7 bakteriofág preparátum készítése

Nagy tisztaságú T7 bakteriofág (ATCC 11303-B7) preparátumot *Escherichia coli* (ATCC 11303) gazdasejt felhasználásával készítettünk. A fágokszorozódás mértékét Gáspár és mtsai [243] eljárásának megfelelően optimalizáltuk. A tenyésztést és a lizátum tisztítását Strauss és Sinsheimer (1963) [244] módszere szerint végeztük. A fágoldatot tisztítás után CsCl gradiensen koncentráltuk, így 100 mg/ml töménységet tudtunk elérni. A preparálási eljárás végén a bakteriofágok körülbelül 30%-a volt fertőzőképes.

A mérésekhez a törzsoldat oldószerét a kívánt ionösszetételű puffer oldatra Sephadex™ G-25 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Fairfield, CT, U.S.A.) tartalmú NAP-5™ oszlop felhasználásával cseréltük.

A fág oldatok koncentrációját foszfát pufferben a bázisok átlagos moláris abszorbanciájának ismeretében ($\epsilon_{260}=7,3 \cdot 10^5$ mól bázis*liter⁻¹*cm⁻¹) optikai denzitásuk alapján határoztuk meg.

4.5. DNS izolálása T7 bakteriofágból

A T7 bakteriofág szuszpenziót 0,5%-os SDS (nátrium-dodecil-szulfát) oldattal (Sigma) 30 percen át 65 °C-on inkubáltuk, majd a fehérje-SDS komplexet 1M KCl oldattal (Sigma) jégágyon lecsapattuk. A keletkező csapadékot kétszer 10 percen át Eppendorf centrifugán 13000 fordulat/perc (rpm) sebességgel centrifugáltuk (Heraeus Biofuge 13; Pegasus Scientific, Burtonsville, MD, U.S.A., illetve Beckman J2-21; Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.A.). A felülúszóhoz kétszeres térfogatú hideg etanolt adva a DNS kicsapódik. Újabb centrifugálás (10 perc, 13 000 rpm) után, a felülúszót leöntve a csapadékot két alkalommal, az eredeti térfogat $\frac{1}{2}$ részének megfelelő 70 %-os etanol-oldattal mostuk át (lépésenként újabb centrifugálással). A végezetül nyert csapadékról a felülúszót leöntve, a mintát beszárítva tiszta DNS-t nyerhetünk, amit Tris-HCl (pH 7,4) pufferben, szobahőmérsékleten, alkalmanként óvatos keveréssel oldottuk fel. A tisztítás során nyert DNS mennyiségét spektroszkópiai úton ($\epsilon_{260} = 6,67 \times 10^5$ mól bázis $\cdot$ liter $^{-1} \cdot$ cm $^{-1}$), a DNS láncok hosszát gélelektroforézissel, a kettős helikális szerkezet meglétét abszorpciós olvadási (lásd később) mérésekkel ellenőriztük.

4.6. Nukleoszómák és nukleoszóma DNS izolálása HeLa sejtéből

A HeLa sejteket 10 % borjúsérummal kiegészített RPMI-640 médiumban szaporítottuk. A sejtmag illetve a mono- és oligonukleoszómákat tartalmazó frakciót Hammermann és mtsai [245] módszere szerint izoláltuk. A nukleoszómákat tartalmazó frakciót a korábban leírtak szerint [246] Tris-HCl pufferrel (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4), szemben dializáltuk, majd Centricon cartridge (Centricon, MA, U.S.A.) felhasználásával töményítettük. A minták összetételét poliakrilamid gélelektroforézissel azonosítottuk. A mintákban azonosított nukleoszómák 150 bázispárnál nem hosszabb DNS fragmentumokat és ekvimoláris mennyiségben core hiszton proteineket tartalmaztak. Linker hiszton- és nem-hiszton proteineket a minták nem tartalmaztak. A minták bázis koncentrációját – feltételezve, hogy bázisösszetételükben a GC:AT arány a T7 fágéhoz hasonlóan 1:1 – a T7 fág moláris abszorbanciáját felhasználva az abszorpciós spektrumok alapján határoztuk meg. Ez feltehetően pontatlanságot okoz a koncentráció meghatározásában. Mivel azonban a nukleoszómák bázisösszetétele változó, ennél pontosabb azonosításuk nem lehetséges. A DNS izolálását a T7 bakteriofág DNS-ének izolálására fentebb leírt (lásd 4.5.) módszerrel végeztük.

4.7. Sejtvonalak, sejtenyésztés

A kationos porfirinek és konjugátumaik sejtbéli felhalmozódását HL-60 (akut promyelocytic leukémia sejt; ATCC: CCL-240) sejten belüli lokalizációját HT-29 (humán vastagbél adenocarcinoma sejt; ATCC: HTB-38) sejteken vizsgáltuk. A HL-60 sejtkultúrát 10% hőkezelt borjúsérummal (FCS; Sigma-Aldrich), L-glutaminnal (2 mM) és gentamicinnel (160 µg/ml; Sigma-Aldrich) kiegészített Iscove's Modified Dulbecco's tápfolyadékban (IMDM) (Sigma-Aldrich) növesztettük. A HT-29 sejtek tápoldata hasonló adalékokkal kiegészített RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) tápoldat volt.

4.8. Abszorpciós és fluoreszcencia spektroszkópia

Az elnyelési spektrumokat Cary 4E (Varian Ausztrália) spektrofotométerrel rögzítettük.

A korrigált emissziós és gerjesztési spektrumokat polarizátor-analizátor rendszerrel is felszerelt FS900CD (Edinburgh Analytical Instruments, UK) illetve Fluorolog 4 (Jobin Yvon, Franciaország) spektrofluoriméterrel mértük.

A fluoreszcencia anizotrópiát

$$A = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} - 2GI_{VH}} \quad (1)$$

egyenlet szerint határoztuk meg, ahol V és H a gerjesztési és emissziós polarizátorok orientációját jelzi és $G = I_{HV}/I_{HH}$.

Porfirin származékok fluoreszcencia kvantumhatásfokát (Φ_F^S)

$$\Phi_F^S = \left(\frac{n^S}{n^R} \right)^2 * \frac{F^S}{A^S} * \frac{A^R}{F^R} \Phi_F^R \quad (2)$$

egyenlet szerint számítottuk, ahol Φ_F^R a referenciaként alkalmazott rodamin B kvantumhatásfoka etilén glikolban [247], A a minta abszorbanciája a gerjesztés hullámhosszán, F az emissziós spektrum görbe alatti területe, n az oldat törésmutatója, az S index a mintára, R a referenciára utal. Az integrált fluoreszcencia intenzitás meghatározásánál a gerjesztés hullámhosszán azonos abszorbanciájú minta és referencia oldatokat hasonlítottunk össze.

A fluoreszcencia élettartam méréséhez a fent említette FS900CD spektrofluoriméter gerjesztő fényforrását egy 1,5 ns impulzusszélességű hidrogén-töltésű villanólámpára cseréltük, amelynek impulzusszélessége 1,5 ns. A fluoreszcencia élettartamot időkorrelált egyfoton-számlálással határoztuk meg.

A DNS és porfirin közötti energiatranszfer vizsgálatokor a minták gerjesztése $\lambda=260$ nm hullámhossznál történt, a vizsgált emissziós hullámhossztartomány $\lambda=600-800$ nm volt.

A T7 nukleoprotein komplex, valamint a T7 fágból izolált DNS szerkezeti stabilitását optikai denzitásuk hőmérséklettől függő változásán keresztül, az abszorpciós olvadási görbék felvételével vizsgáltuk [248,249]. A méréseket Peltier hőmérsékletszabályozóval felszerelt, hat minta párhuzamos mérésére alkalmas Cary 4E spektrofotométerrel a nukleinsav abszorpciós maximumán ($\lambda=260$ nm) végeztük. A hőmérsékletet 25-98 °C tartományban változtattuk, a fűtési sebesség 0,5 °C/perc volt. Párhuzamosan 5 mintán végeztünk mérést, a hatodik mintatartót az alkalmazott pufferrel töltöttük meg, és ebben mértük a hőmérsékletet. A mérési adatokat 0,5 °C-onként gyűjtöttük, Microcal Origin program segítségével dolgoztuk fel. A görbéket a 25 °C-on mért abszorpciós értékre vonatkoztatva normalizáltuk, majd 5 pontonként simítottuk. Az így nyert adatokból számítottuk az olvadási görbék első deriváltját, amit ismételtén 5 pontonként simítottunk. Meghatároztuk a simított derivált görbék maximum helyeit (T_m : fázisátalakulási hőmérséklet) és a sávok félérték szélességét (w). T_m a rendszer stabilitására, w az átalakulás kooperativitására jellemző paraméter.

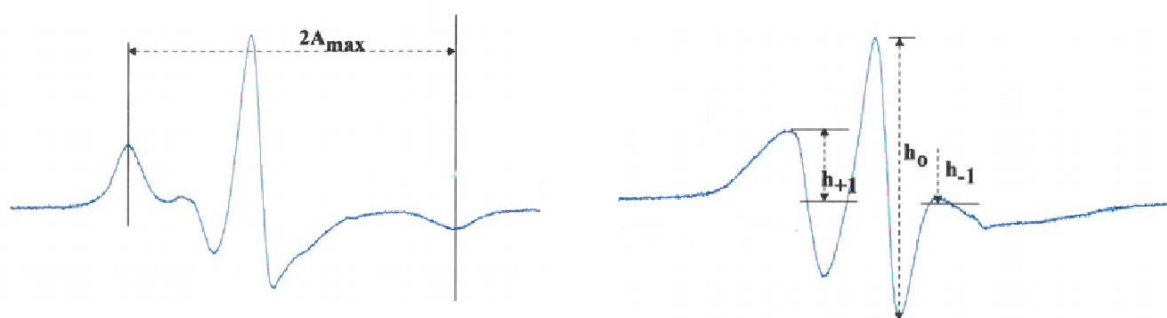
4.9. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A CD spektroszkópia a porfirinek DNS-hez illetve nukleoprotein komplexhez (NP) való kötődéséről, a kötődési módokról nyújthat információt. A CD méréseket aminosav-sulfonsavval kalibrált, PFD-425S Peltier hőmérsékletszabályozóval felszerelt Jasco J-810 spektro-polariméterrel végeztük. A kötődési vizsgálatokhoz állandó porfirin és változó DNS/NP koncentrációjú minták sorozatát használtuk. A spektrumokat $\lambda=380$ nm és 500 nm között rögzítettük és Savitzky – Golay algoritmussal simítottuk [250]. A spektrum sávok intenzitását a maximumokhoz tartozó moláris ellipticitással ($[\Theta]$ deg x cm² / dmól/) jellemeztük.

A DNS-ben illetve nukleoprotein komplexben bekövetkező szerkezeti változásokra a polimerek CD jelének hőmérsékletfüggő változásából következtethetünk. A T7 fág illetve az izolált nukleoszómák porfirin komplexeinek CD spektrumait $\lambda=220$ nm és 350 nm között rögzítettük 25 °C és 98 °C között 1 °C-onként. A mintákban a $\lambda=260$ nm-en mért optikai denzitás 1, a bázispár/porfirin molarány 40 (T7) illetve 50 (nukleoszóma) volt. A $\lambda=225$ nm illetve $\lambda=280$ nm-hez tartozó értékeket ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében. A görbéket simítottuk, majd a simított adatsorokból számítottuk az olvadási görbék első deriváltját.

4.10. Elektron spin rezonancia spektroszkópiai (ESR)

A liposzómák különböző lipid régióiban, a porfirinek kötődésének hatására bekövetkező szerkezeti változásokat ESR spektroszkópiával tanulmányoztuk. Az ESR spektrumokat hőmérsékletszabályozóval felszerelt Bruker-EMX6 X-sávú (9-10 GHz) spektrométerrel regisztráltuk. A hőmérsékletet a ~20 µl-es minta centrumának közelében szabályoztuk ~ 0,1 °C pontossággal. A modulációs amplitúdó 2 és 35 °C között 2,0 Gauss (G), 35 °C fölött pedig 1,0 Gauss volt, a mikrohullámú teljesítmény 20 mW. 5 perces felvételi időt és 0,2 s időállandót alkalmazva 2048 pontban vettük fel a spektrumot.



13. ábra Liposzóma preparátumok tipikus ESR spektruma. A kiértékelésekhez használt paraméterek: a külső csatolási állandó ($2A_{\max}$), valamint a 12-DOX ill. 16-DOX spinjelölőknél használt h_{-1} és h_0 jelamplitúdók

A membránfluiditás jellemzésére három paramétert használtunk: a $2A_{\max}$ külső csatolási állandót, valamint az „f” és a „k” paramétereket (13. ábra). Az 5-doxil- és 7-doxil-sztearinsavjelölők esetén, ill. 12-doxil-sztearinsavnál 2–25 °C hőmérséklet-tartományban a $2A_{\max}$ külső csatolási állandót használtuk. A $2A_{\max}$ külső csatolási állandó a 13. ábrán látható spektrum két legtávolabbi csúcsa közötti távolság. 25 °C hőmérséklet fölött 12-doxyl-sztearinsav jelölő esetén a $2A_{\max}$ csatolási állandó az ESR spektrumról nem volt leolvasható, ilyenkor a membrán fluiditását az SL-12 esetén az $f = \frac{h_{-1}}{h_0}$ paraméterrel jellemeztük, ahol h_{-1} a magasterű csúcs, h_0 pedig a középső csúcs. 16-doxil-sztearinsav esetén az alacsonyterű csúcs (h_{+1}) és a középső csúcs (h_0) amplitúdóinak hányadosával, a k paraméterrel ($k = \frac{h_{+1}}{h_0}$) jellemeztük a membrán fluiditását.

4.11. Porfirinek dimerizációs állandójának (K_d) meghatározása

A dimerizációs állandókat Margalit módszere szerint [113] határoztuk meg. Feltételezve, hogy az aggregációs folyamat első lépése a porfirin dimerek kialakulása, valamint hogy a dimerek fluoreszcencia kvantumhatásfoka elhanyagolható a monomerekéhez képest [251], a

$$[P] = [M] + 2K_d [M]^2 \quad (3)$$

összefüggésben a monomer koncentráció $[M]$ helyettesíthető a kF kifejezéssel, ahol F a mindenkor fluoreszcencia intenzitás, k pedig egy arányossági tényező, így a következő összefüggés nyerhető:

$$[P]/F = k + 2k^2K_dF \quad (4)$$

Ez alapján a dimerizációs állandó meghatározható a $[P]/F$ versus F függvény tengelymetszetéből és meredekségéből.

4.12. Porfirin – liposzóma kötődési állandójának meghatározása

A kötődési állandó meghatározását állandó porfirin koncentráció (10^{-7} M) és 10^{-6} M-tól a telítési koncentrációig változó lipid koncentráció mellett végeztük. Mérés előtt a megfelelő lipid koncentrációjú liposzóma oldatokat a porfirinekkel 30 percig 37°C -on inkubáltuk. A kötődési állandó az alábbi összefüggés alapján határozható meg:

$$K_L = \frac{[P_i]}{[P_f][c_l]} \quad (5)$$

ahol P_i és P_f az inkorporált ill. a szabad porfirin koncentrációja, c_l a lipid koncentráció. Az alkalmazott koncentrációk esetében a fluoreszcencia révén emittált fény intenzitása a koncentrációval arányosnak tekinthető [252]. Így a kötődési állandó rögzített porfirin koncentráció esetén az adott hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitásokból határozható meg az alábbiak szerint [253]:

$$F = F_o + (F_l - F_o) \frac{K_L c_l}{1 + K_L c_l} \quad (6)$$

ahol F az aktuális fluoreszcencia intenzitás, F_o a szabad porfirin fluoreszcencia intenzitása ($c_l = 0$), F_l a fluoreszcencia intenzitás a lipid telítési koncentrációjánál.

4.13. A porfirin-liposzóma kötődés sebességi állandójának meghatározása

A porfirin származékok fluoreszcencia intenzitásának változását mértük a liposzómába való beépülés során az idő függvényében. A porfirin származékokat a fluoreszcencia mérés

helyszínén adtuk hozzá a DMPC, vagy DMPC/DMPG liposzómákhoz közvetlenül a detektálás megkezdése előtt. A porfirin származék koncentrációja 10^{-7} M, a lipid koncentráció a porfirin teljes beépüléséhez szükséges nagyságú volt. A mérés előtt és alatt a vizsgált minták hőmérsékletét 18 °C-on (lipidek fázisátalakulási hőmérséklete alatt) illetve 37 °C-on (lipidek fázisátalakulási hőmérséklete fölött) tartottuk. A gerjesztés és detektálás az adott porfirin gerjesztési ill. emissziós maximumán történt. 40 percig tartó mérés során másodpercenként gyűjtöttünk adatokat. A kapott görbékre a legkisebb négyzetek módszerének alkalmazásával egy, vagy két exponenciális függvényt illesztettünk. Az illesztés jóságát χ^2 próbával ellenőriztük. Ha két exponenciális függvény illesztése nem eredményezett lényeges javulást, akkor egy exponenciális illesztettünk a görbére.

4.14. Mikrokalorimetria

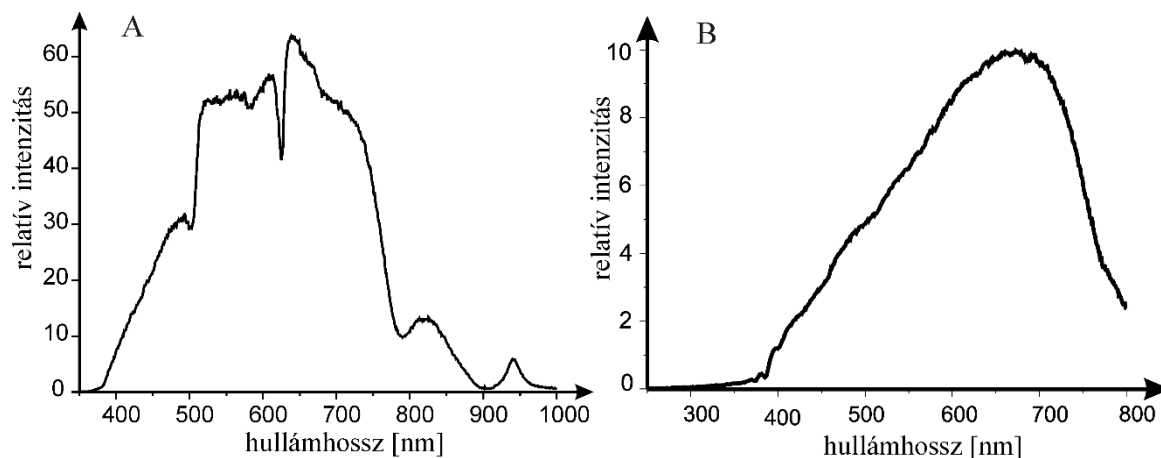
A mikrokalorimetriával (DSC) a lipidek fázisátalakulásának két jellemző paraméterét határoztuk meg: a fő fázisátalakulás hőmérsékletet (T_m), vagyis a fő fázisátalakulási csúcshoz tartozó hőmérsékletet, valamint a fázisátalakulás félértékszélességét ($T_{1/2}$), azaz az átalakulási görbe magasságának felénél a görbe két szára között mérhető hőmérsékletkülönbséget [254].

Vizsgálataink során a DMPC-t illetve a DMPC:DMPG 9:1 mól/mól arányú keverékét és a fényérzékenyítő anyagot együttesen kloroformban oldottuk fel lipid:porfirin 20:1 mól/mól arányban. A szerves oldószer nitrogéngázzal történt elpárologtatása után foszfát puffert adtunk hozzá, majd fél órán át rázattuk, a fő fázisátalakulási hőmérséklet feletti hőfokon tartva a rendszert. Ezután 10 °C és 40 °C közötti hőmérséklettartományban 5 °C/perc fűtési sebességgel regisztráltuk a fázisátalakulási görbéket. Minden egyes vegyület esetében legalább 3 párhuzamos mérést végeztünk és kiszámítottuk a mérési eredmények átlagát és szórását. A fényérzékenyítő anyagot tartalmazó minták fázisátalakulási paramétereit összevetettük a tisztán DMPC-t ill. DMPC/DMPG keverékét és vizet tartalmazó mintákéval. A különbségek statisztikai értékelésére kétmintás t-próbákat végeztünk.

4.15. Fényforrások

A fotodinamikus reakciók hatásának vizsgálatakor a szenzibilizált mintákat halogén lámpával, (Tungsram – GE Lighting, 12V, 100W) illetve quartz W-halogén lámpával (Newport Oriel, 250W) (14A ésB ábra). sugároztuk be. A lámpa intenzitását Ophir Pyro-electric Detector 10A-P (Optronix, Israel) detektorral felszerelt Nova Laser Power/Energy Monitor típusú készülékkel ellenőrizzük. A $\lambda=380$ nm-nél rövidebb hullámhosszú tartományt üveglap

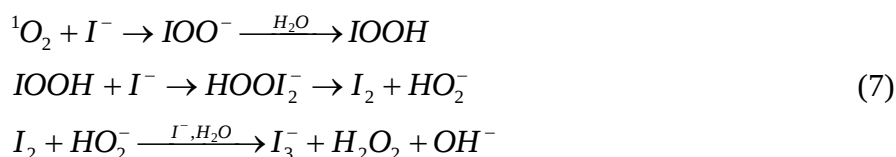
alkalmazásával, az infravörös sugárzást az Oriel lámpa használatakor 10 cm vastag víréteggel szűrtük ki.



14. ábra A besugárzásra használt fényforrások emissziós spektruma: (A) Newport Oriel, (B) Tungsram – GE

4.16. Szingulett oxigén kimutatása jodometriával

A jodometriás reagenst (0,2 M kálium-foszfát (pH 6,2), 0,12 M kálium-jodid, 10 μ M ammónium-molibdát) felhasználásig fénytől elzárva hűtőszekrényben tároltuk. A besugárzást megelőzően a reagens oldatát a kívánt koncentráció (0 - 2 μ M) eléréséhez szükséges porfirin származékkal egészítettük ki és sugároztuk be. Az oldat abszorpciós spektrumát a besugárzás megkezdése előtt és meghatározott besugárzási idők után rögzítettük $\lambda=220-600$ nm tartományban. A besugárzás során keletkező szingulett oxigén hatására az alábbi reakcióséma szerint I_3^- képződik.



A I_3^- mennyiségére az oldat $\lambda=355$ nm-en mért abszorbanciájából következtethetünk ($\epsilon_{355}=2,47 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [255].

4.17. T7 bakteriofág inaktivációja

A fág fertőzőképességét lemezöntéses előszám meghatározással végeztük, szokványos agar táptalajon tenyésztett *Escherichia coli* (ATCC 11303) baktérium-gyepen. Az inaktiváció mértékét az $\ln(N/N_0)$ értékkel jellemeztük, ahol N az aktuális, N_0 pedig a kezelés előtti tarfoltszámot jelenti.

T7 fág „sötét” inaktivációjának követésekor a bakteriofág szuszpenziót a vizsgált porfirin származékok ismert koncentrációinak hozzáadását követően a fény teljes kizárása mellett, sötétben inkubáltuk. A kísérletekben a porfirin oldatok koncentrációját 0,1-10 μM , a porfirin:bázispár moláris arányát (1/r) 0-0,5 tartományban változtattuk.

Porfirinnel szenzibilizált T7 fág fotoinaktivációjának jellemzéséhez besugárzás előtt a porfirinnel szenzibilizált bakteriofág szuszpenziót sötétben 10 percig inkubáltuk. A porfirinek koncentrációját 0,1-10 μM között változtattuk, a porfirin/bázispár arány (1/r) 0,02-0,5 tartományban volt. A besugárzás kvarc küvettában történt, a mintákat besugárzás alatt folyamatosan kevertük. Az inaktiváció mértékét ($\ln(N/N_0)$) a beeső dózis vagy a porfirin koncentráció függvényében ábrázoltuk. A T7 bakteriofág érzékenységét az inaktivációs hatáskeresztmetszettel jellemeztük (σ [cm^2/J]). (A hatáskeresztmetszet megfelel azon beeső dózis reciprokának, amelynél adott koncentrációnál az élő fágok száma az e-ed részére csökken.)

A keletkező gyökök szerepének tanulmányozásakor a fenti mintákhoz 1,3-dimetil-2-tioureát (DMTU) (Sigma) vagy NaN_3 -ot (Sigma) illetve 1,3-difenil-izobenzofuránt (DPBF) adtunk. A gyökfogók koncentrációját 0,1 és 20 mM között változtattuk.

4.18. Agaróz gélelektroforézis

A gélelektroforézis kísérleteket vízszintes elrendezésű agaróz gélek alkalmazásával végeztük, MINI-H800 (Biocenter Laboratóriumi Szolgáltató Kft., Szeged) eszközzel. A teljes T7 bakteriofág, valamint az izolált T7 DNS elektroforéziséhez 1 %-os, a PCR termékek analíziséhez pedig 2 %-os agaróz géleket használtunk. A minták gélbe töltéséhez, valamint a vándorlás követéséhez azokhoz brómfenol kék (0.05%), szukróz (40%), EDTA (0.1 M, pH 8.0), és SDS (0,5%) keverékét adtuk (Sigma gél-töltő puffer), mintánként azonos mennyiségben. A géleket etidium-bromiddal (Sigma) festettük, a DNS-sávokat UV-átvilágító (Sigma) felett figyeltük meg. Méret-standardként 1 kb DNS-keveréket („létra”; Sigma) vagy a λ fág HindIII restrikciós enzimmel emésztett fragmentumait (Sigma) használtuk.

4.19. Polimeráz láncreakció

A T7 fág örökítő anyagának épségét illetve károsodását polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk. A reakcióhoz a fág-genom egy 555 bp hosszúságú szakaszát [256] amplifikáltuk 5'-CTGTGTCAATGTTCAACCCG-3', valamint 5'-GTGCCCAGCTTGACTTTCTC-3' primerek segítségével (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, U.S.A.). A reakciót mindenkor 12,5 μl térfogatú mintákon végeztük; a vizsgált DNS-mintákhoz előzetesen

optimalizált arányban kevert és hígított primereket, PCR-puffert, dezoxi-ribonukleozid-trifoszfátokat és AmpliTaq Gold DNS-polimeráz enzimet (Perkin Elmer, Wellesley, MA, U.S.A.) adtunk. Az amplifikálást Perkin Elmer GeneAmp 2700 PCR készülékkel végeztük. A reakció után a termékeket az előző pontban leírtak szerint gél elektroforézissel elemeztük.

A T7 fágon végzett PCR mérésekhez a T7 nukleoprotein 65 °C-on történő termikus átalakulása (kapszid fellazulása) miatt nem szükséges a DNS előzetes preparálása, az amplifikálás a teljes fág használatával is elvégezhető.

4.20. Áramlási citometria

A HL-60 sejtek által felvett porfirin származékok mennyiségét áramlási citometriával határoztuk meg. A sejteket RPMI-1640 médiumban oldott, 2,5-20 μM koncentrációjú porfirin származékkal inkubáltuk 0,5-5 órát. Kontrolként porfirint nem tartalmazó tápoldatban inkubált sejteket használtunk. Az inkubálási periódus végén az inkubáló elegyet eltávolítottuk, a sejteket kétszer mostuk szérumban mentes tápoldattal majd 100 μl 1 mM-os tripszinnel kezeltük [257-259]. A tripszin további hatását 10% szérumban tartalmazó HEPES pufferrel gátoltuk (100 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,4 mM MgCl_2 , 0,04 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 20 mM D-glükóz, 24 mM NaHCO_3 és 5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4). A sejteket FACS-csővekben centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc, 4 °C). A felülúszó eltávolítása után a sejteket HPML-ben szuszpendáltuk. Az intracelluláris fluoreszcencia intenzitását BD LSR II (BD Biosciences, UK) áramlási citométerrel detektáltuk ($\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em}}=670-735$ nm); a kontrol autofluoreszcenciájánál nagyobb intenzitást mutató sejteket számoltuk. Az adatokat FACSDiVa 5.0 software-rel elemeztük.

4.21. Lézer pásztázó mikroszkópia

A lézer pásztázó mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk a porfirinek élő sejteken belüli lokalizációját. A porfirin származékok sejten belüli lokalizációját Zeiss 710 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) konfokális mikroszkóppal követtük. HT-29 sejteket speciális mintatartóban (Lab-Tek II 8-chamber Slide, Thermo Fisher Scientific Inc. NYSE: TMO) a kísérleteket megelőző 24 órában növesztettünk. A mintákat végül 20 μM porfirin származékkal 3 órát inkubáltuk. A porfirin származékok kimutatásához a mintákat $\lambda=488$ nm-en gerjesztettük, az emissziót $\lambda=650-750$ nm tartományban detektáltuk. Az egyes sejtorganellekben való lokalizáció azonosításához ko-lokalizációs vizsgálatokat végeztünk. A sejtmag DNS-ét SYBR GreenI-gyel (inkubációs koncentráció 400 nM; $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em}}=520$ nm), a lizoszómákat Lyso Tracker Green DND-26-tal (inkubációs koncentráció 50 nM; $\lambda_{\text{ex}}=488$

nm, $\lambda_{em}=633$ nm), a mitokondriumokat MitoTracker Deep Red FM-mel (inkubációs koncentráció 100 nM; $\lambda_{ex}=510$ nm, $\lambda_{em}=665$ nm) jelöltük. A kontroll mintákat csak egy festékkel, illetve jelölő nélküli tápoldatban inkubáltuk. Az adatokat ImageJ software-rel elemeztük.

4.22. Adatfeldolgozás

Az adatok feldolgozásához, ahol azt másképp nem jelöltük Microsoft® Excel (Microsoft, Redmond, Washington, U.S.A.) táblázatkezelő illetve Origin® 7.0 (OriginLab, Northampton, MA, U.S.A.) programot használtunk. Az abszorpciós spektrumok felbontásához a kísérleti adatok elméleti függvényekkel való illesztését az Origin® 7.0 programmal végeztük. Az abszorpciós spektrumok felbontásához egy, Zupán Kristóf (akkor Ph.D. hallgató) által készített programot használtunk, amely a felbontásokat automatikusan, programozható paraméterezéssel végezte el egy-egy spektrumon vagy spektrumsorozaton.

5. Eredmények

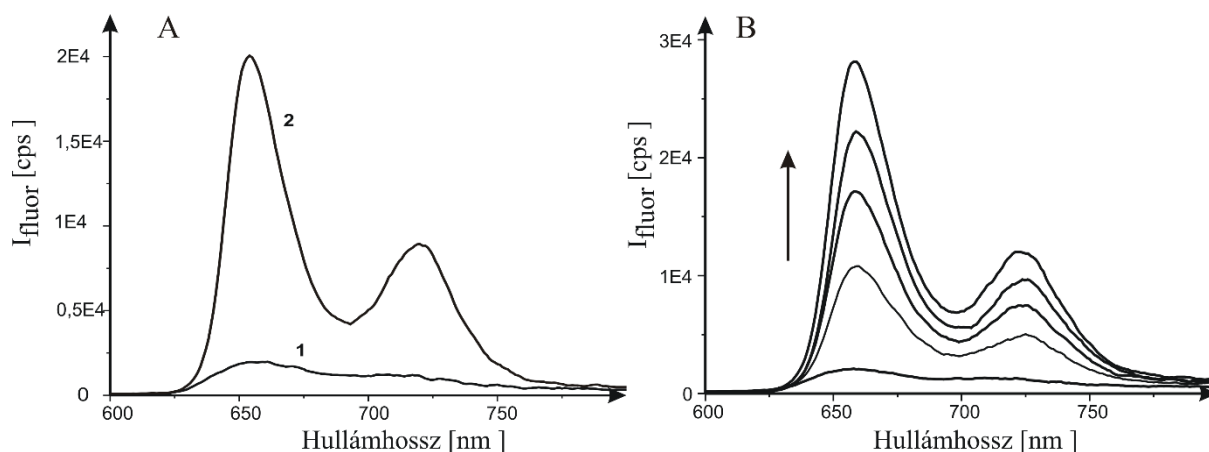
5.1. Porfirinek kölcsönhatása modellmembránokkal

A fotodinamikus reakció tumorellenes hatásában fontosnak látszik a fényérzékenyítőszer, így a porfirin sejten belüli lokalizációja. Előnyt jelenthet, ha a porfirin származék a membrán struktúrákban lokalizálódik, azaz alapvetően hidrofób karakterű. Másfelől azonban a hidrofób karakter növeli az aggregátumok kialakulásának lehetőségét, ennek révén pedig előnytelenül befolyásolja a fotofizikai tulajdonságokat, az aggregátumokban például csökken az abszorbancia, fokozódik a fotodegradáció.

Mindezen problémák egyik lehetséges megoldásának látszik szénhidrát oldalláncok kapcsolása a porfirin származékhoz. Az oldalláncok szerkezetének, a kapcsolat módjának változtatása révén a különböző méretű, polaritású, térszerkezetű konjugátumok szintézise lehetséges. További inspirációt jelentett a porfirin-szénhidrát konjugátumok szintézisére, hogy egyes megfigyelések szerint ezek a konjugátumok specifikus kölcsönhatásba léphetnek bizonyos tumorsejteken nagy számban expresszáldó lektin receptorokkal [260].

A glikozilált tetrafenilporfirinekkel kapcsolatos kutatás egyik fő kérdése az volt, hogy hogyan befolyásolja a membránnal való kölcsönhatást a porfirin származék polaritása, a molekula geometriája. Ennek megfelelően saját vizsgálatainkhoz olyan mezo-szubsztituált glikozilált porfirineket választottunk és hasonlítottunk össze, amelyek a szubsztituensek természete, száma, anellálása alapján különböznek egymástól (lásd 8. és 9. ábra). A modell membránokon végzett kötődési vizsgálatokban a porfirin származékok és konjugátumok fotofizikai tulajdonságait figyelembe véve elsősorban spektroszkópai módszerekre támaszkodtunk.

A tanulmányozott glikozilált porfirin származékok abszorpciós spektruma megfelel a szabad bázisú porfirinek tipikus abszorpciós spektrumának [236] A vegyületek moláris abszorbanciája és Q-sávjainak szerkezete, a TP(2-OGluOH)₄P kivételével, érzékenyen változik a molekuláris környezet polaritásával. Hasonló megállapítás tehető a fluoreszcencia spektrumok szerkezetére és amplitúdójára vonatkozóan is. Ennek alapján megállapítható, hogy a fluoreszcencia spektroszkópia alkalmas a porfirin származékok és modell membránok közötti kölcsönhatás tanulmányozására. Szemléltetésül a 15. ábrán bemutatjuk az aszimmetrikus TP(4-OGluOH)₃P fluoreszcencia emissziós spektrumait különböző oldószerekben illetve M9 foszfát pufferben különböző koncentrációjú DMPC oldatokból készített liposzómák jelenlétében.



15. ábra $TP(4-OGluOH)_3P$ fluoreszcencia emissziós spektruma (A) M9 foszfát pufferben, pH 7,4 (1) és metanolban (2); (B) M9 foszfát pufferben különböző mennyiségű DMPC liposzóma jelenlétében. A DMPC:porfirin mólarány 0-200 között változik. A nyíl a növekvő lipid koncentráció irányát jelöli. A porfirin koncentrációja 10^{-6} M. A gerjesztés az abszorpciós spektrumok Soret-sávjának maximumán történt.

A DMPC koncentrációjának emelésével az apoláros oldószerben tapasztalhatóhoz hasonlóan fluoreszcencia intenzitásnövekedést láthatunk, ami a kromofór apoláros környezetben való lokalizációját mutatja. A szimmetrikusan szubsztituált származékok esetében elhanyagolható ($TP(2-OGluOH)_4P$) vagy hasonló, de kisebb mértékű ($TP(4-OGluOH)_4P$) változást tapasztaltunk [236].

6. táblázat Porfirin származékok kötődési állandója (K_L) (M^{-1}) különböző összetételű liposzómákhoz, szobahőmérsékleten. (M9 foszfát puffer pH 7,4)

porfirin származék	$K_L (M^{-1})$	
	DMPC	DMPC/DMPG (9/1 mól/mól)
$TP(2-OGluOH)_4P$	-	-
$TP(4-OGluOH)_4P$	-	$4,2 \times 10^3$
$TP(4-OXylOH)_4P$	$3,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^4$
$TP(4-OGluOH)_3P$	$1,0 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$
$TPF5(4-OGalOH)_3P$	$9,8 \times 10^3$	$6,9 \times 10^4$

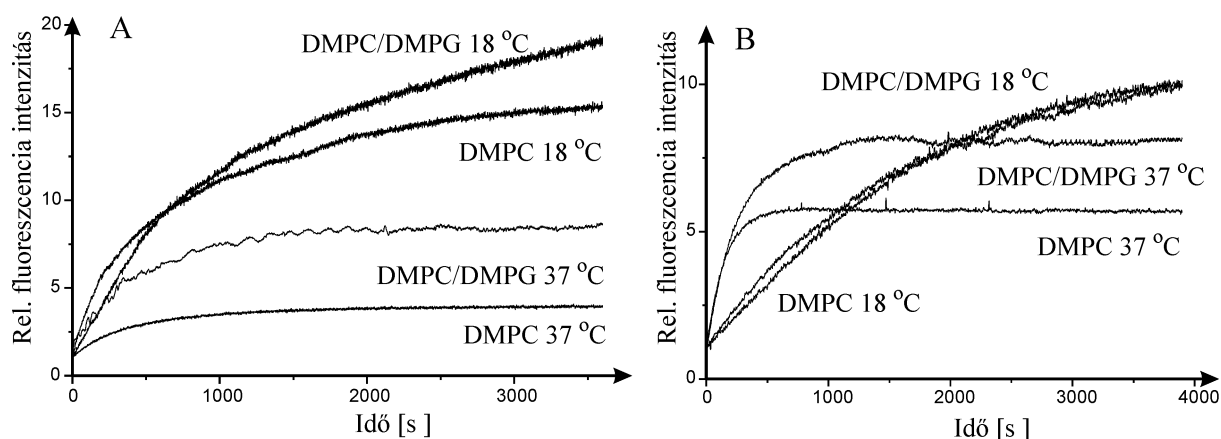
A fluoreszcencia spektrumok által szolgáltatott adatok alapján az egyes vegyületek kötődési állandói meghatározhatók (lásd 5. és 6. egyenlet). A töltéssel nem rendelkező fejcsoportú DMPC-ből készült liposzómák mellett a negatív töltésű fejcsoportú DMPG-t tartalmazó (DMPC:DMPG=9:1) liposzómákhoz való kötődést is vizsgáltuk. A kötődési állandókat a 6. táblázat foglalja össze.

A fluoreszcencia emissziós spektrumokon túl a kromofór egyéb fotofizikai paraméterei, így fluoreszcencia élettartama is megváltozhat a modellmembránokkal való kölcsönhatás következtében. A 7. táblázatban a vizsgált vegyületek fluoreszcencia élettartamát mutatjuk foszfát pufferben DMPC liposzóma nélkül és annak jelenlétében.

7. táblázat Porfirin származékok élettartama (τ_F) (ns) szabad állapotban és DMPC liposzóma jelenlétében (porfirin: DMPC molarány 1:200), M9 foszfát pufferben, pH 7,4 szobahőmérsékleten.

	τ_F (ns)	τ_F (ns)
porfirin származék	DMPC -	DMPC +
TP(2-OGluOH) ₄ P	11,1	11
TP(4-OGluOH) ₄ P	8,2	8,5
TP(4-OXylOH) ₄ P	8,5	10,5
TP(4-OGluOH) ₃ P	7,3	11
TPF5(4-OGalOH) ₃ P	6,8	10,3

A kötődési hajlandóságra utalhat az egyes származékok esetében a porfirin-lipid kölcsönhatási kinetikája. Ennek tanulmányozására követtük a vegyületek emissziós maximum értékén mutatott fluoreszcencia intenzitását az idő függvényében a liposzóma preparátum hozzáadása után (16. ábra). A kísérleti görbékre illesztett függvények alapján határoztuk meg a sebességi állandókat a lipidek fázisátalakulási hőmérséklete alatt (18 °C) és fölött (37 °C) [261]. Mint az a 8. táblázat adataiból kitűnik, 18 °C-on határozott két lépcsős kinetikát azonosíthattunk, míg a fázisátalakulási hőmérséklet fölött a kinetika – a TP(4-OGluOH)₃P – DMPC kölcsönhatástól eltekintve – egy sebességi állandóval volt jellemezhető.

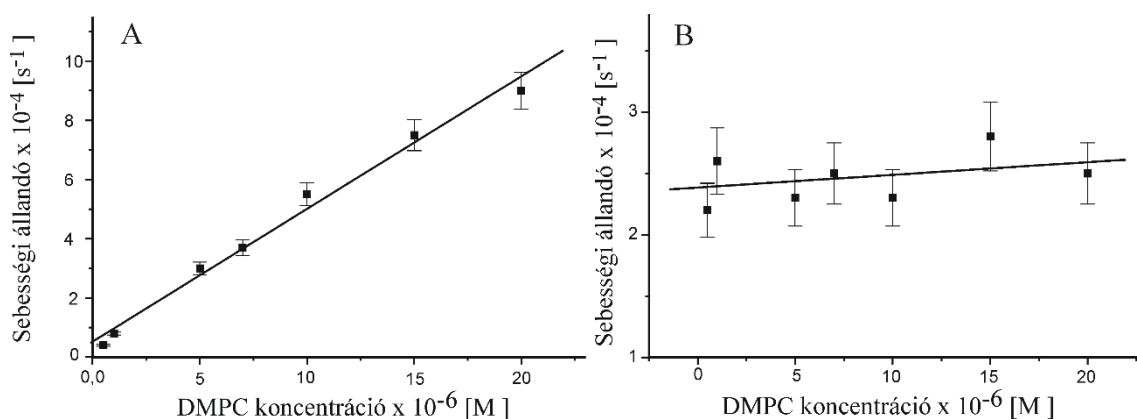


16. ábra $TP(4-OGluOH)_3P$ (A) és $TP(4-OXylOH)_4P$ (B) fluoreszcencia intenzitása az idő függvényében DMPC illetve DMPC:DMPG=9:1 liposzómával való összekeverés után 18 °C-on és 37 °C-on a lipid mentes mintákban mért intenzitásokhoz viszonyítva. A porfirin koncentrációja 10^{-7} M, a lipid:porfirin molarány 200:1. A gerjesztés az abszorpciós spektrumok Soret-sávjának maximumán történt. $\lambda_{em}=655$ nm. (M9 foszfát puffer pH 7,4)

8. táblázat Glikozilált porfirin származékok – modell membránok kölcsönhatásának sebességi állandói, k_1 , k_2 , ($\times 10^{-3} s^{-1}$) a fázisátalakulási hőmérséklet alatti (18 °C) és feletti (37 °C) hőmérsékleten, M9 foszfát pufferben pH7,4). (porfirin:DMPC molarány 1:200)

porfirin származékok	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂
	DMPC		DMPC/DMPG		DMPC		DMPC/DMPG	
	18 °C				37 °C			
TP(4-OGluOH) ₄ P	-	-	0,8	-	-		2,3	-
TP(4-OXylOH) ₄ P	0,9	0,25	1	0,54	0,69	-	7,3	-
TP(4-OGluOH) ₃ P	6,0	0,75	1,7	0,1	2,6	0,33	1,9	-
TPF5(4-OGalOH) ₃ P	1,0	0,24	1,2	0,46	1,88	-	2,1	-

A két sebességi (k_1 és k_2) állandó nem azonos módon és mértékben változik a lipid koncentráció változásával, mint azt a 17. ábrán bemutatott példa is mutatja. A kezdeti, „gyors” fázis sebességi állandója meredeken nő a lipid koncentrációjának emelésével (meredeksége $44,8 s^{-1}M^{-1}$), míg a másik komponens változásának meredeksége egy nagyságrenddel kisebb ($1,27 s^{-1}M^{-1}$).



17. ábra $TP(4-OXylOH)_4P$ – DMPC kötődésének sebességi állandói, k_1 (A) és k_2 (B) a DMPC koncentrációjának függvényében 18 °C-on. A porfirin koncentráció 1×10^{-7} M. (M9 foszfát puffer pH 7,4)

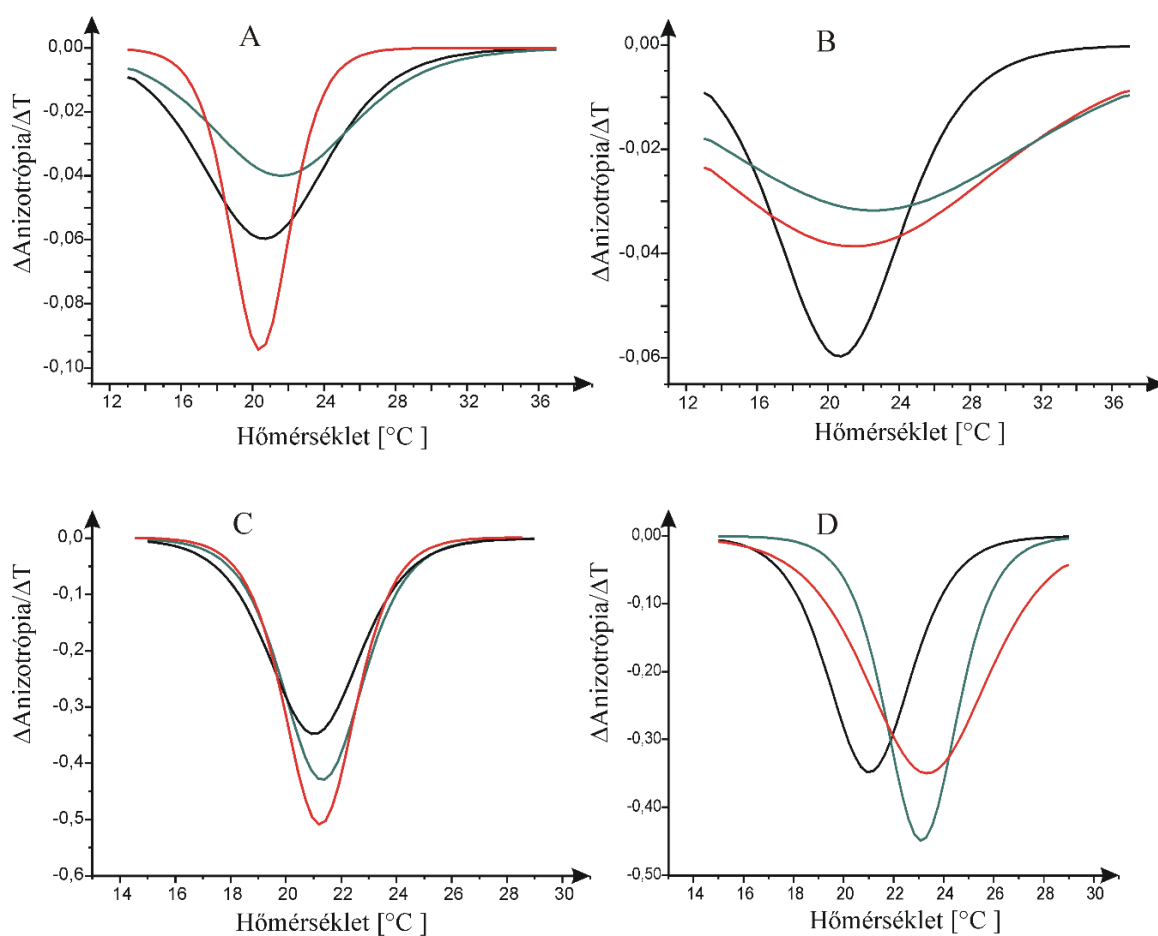
A porfirin származékok fotokémiai hatékonyságát a membrán kötődési hajlandóságon túl befolyásolhatja a lipid kettős rétegen belüli lokalizáció. Csak a foszfolipid kettős réteget tekintve, a porfirinek három különböző elrendeződésben kötődhetnek a membránhoz [103,126]. Elhelyezkedhetnek a poláros fejcsoport-víz határrétegben, a lipid oldalláncok nyaki, poláros fejcsoportokkal határos részében vagy az apoláros oldalláncok környezetében a láncokkal párhuzamosan illetve a lipid kettős réteg határán.

A lokalizáció tanulmányozásának egyik módja a lipid régiók szelektív fluoreszcens jelzése. Ismert, hogy az 8-anilino-1-naftalinszulfonsav (ANS) a liposzómában az apoláris oldalláncok és fejcsoportok határrétegében lokalizálódik, míg az 1,6-difenil-1,3,5- hexatrién (DPH) a szénhidrogénláncokkal párhuzamosan vagy a lipid rétegek között. Vizes oldatban az ANS, DPH nem fluoreszkál, de apoláros oldószerben, vagy membránhoz kötődve jelentős mértékű fluoreszcenciát mutatnak [262,241]. Az ANS illetve DPH környezetének megváltozása módosítja azok fotofizikai paramétereit, így fluoreszcencia élettartamát, továbbá megváltoztathatja a környezet rendezettségére jellemző anizotópiát.

Azt figyeltük meg, hogy a fluoreszcens jelzők élettartama nem változik szignifikánsan a szimmetrikusan szubsztituált származékok jelenlétében (9. táblázat). Az aszimmetrikus porfirin származékok kötődése után mért lecsengési görbék elemzésekor a legjobb illesztéseket két élettartam komponens feltételezésével kaptuk. Mindkét komponens szignifikánsan rövidebb, mint a porfirin jelenléte nélkül kapott megfelelő értékek.

9. táblázat DMPC liposzómához kötött DPH és ANS élettartama (ns) porfirin származékok kötődése előtt és után 20 °C-on. ($\lambda_{g(ANS)}=398$ nm, $\lambda_{g(DPH)}=357$ nm, $\lambda_{em(ANS)}=480$ nm, $\lambda_{em(DPH)}=450$ nm)

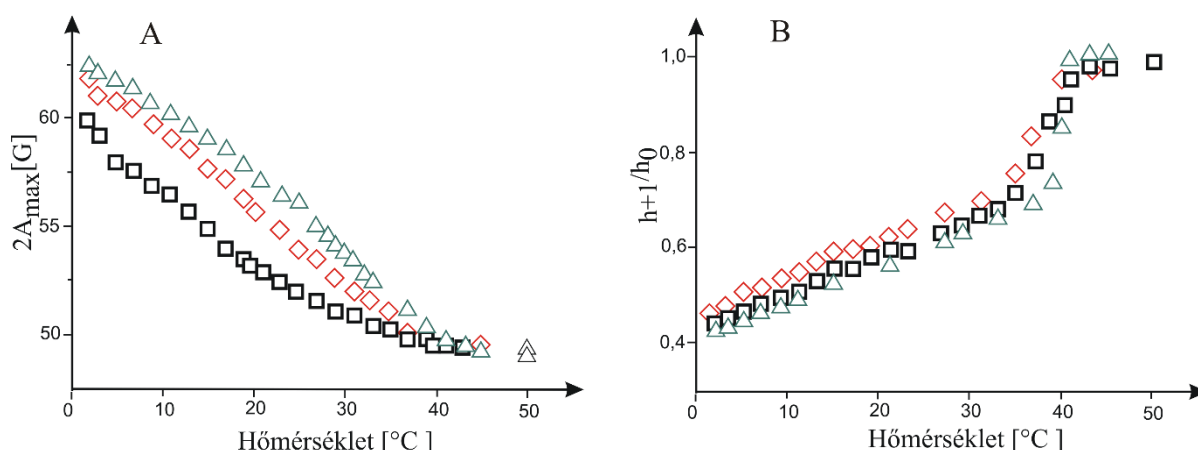
	DPH		ANS	
porfirin származékok	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
-	8.6	—	9.3	—
TP(2-OGluOH) ₄ P	8.4	—	9.2	—
TP(4-OGluOH) ₄ P	8.2	—	9.0	—
TP(4-OGluOH) ₃ P	5.5	2.3	7.7	1.7
TPF5(2-OGalOH) ₃ P	6.8	2.2	7.9	2.0



18. ábra DMPC liposzómához kötött ANS (A,B) és DPH (C,D) hőmérsékletfüggő anizotrópiájának változása porfirin nélküli liposzómákban (—) és porfirin származékok: TP(2-OGluOH)₄P (—), TP(4-OGluOH)₄P (—) (A,C) és TP(4-OGluOH)₃P (—), TPF5(4-OGalOH)₃P (—) (B,D) jelenlétében. ($\lambda_{g(ANS)}=398$ nm, $\lambda_{g(DPH)}=357$ nm, $\lambda_{em(ANS)}=480$ nm, $\lambda_{em(DPH)}=450$ nm)

A DPH és ANS anizotrópiájának hőmérsékletfüggő változásán keresztül a porfirin származék kötődésén túl információt nyerhetünk a liposzóma termikus stabilitásáról és az alkotórészek kooperativitásáról is a fázisátalakulás folyamatában. A 18. ábrán összefoglalt eredményeink azt mutatják, hogy a TP(4-OGluOH)₃P és a TPF5(2-OGalOH)₃P jelenléte növeli a fázisátalakulási hőmérsékletet és, – különösen az ANS lokalizációjára jellemző régióban – csökkenti a kooperativitást [236]. A szimmetrikusan szubsztituált származékok, azonos lipid/porfirin arányok mellett kisebb mértékben ugyan, de szintén csökkentik a kooperativitást a foszfolipid réteg nyaki régiójában.

A porfirin származékok apoláros lánc mentén való elhelyezkedésének pontosabb feltérképezésére ad lehetőséget az ESR spektroszkópia [263,264]. A liposzómákba az apoláros lánc megfelelő helyén spinjelölt csoportot hordozó zsírsavakat építettünk, és az ezek által szolgáltatott jel változását követtük a porfirinek jelenlétében. Szemléltetésül itt az 5-ös (5-DSA) és 16-os (16-DSA) pozíciókban jelzett zsírsavakkal kapott eredményeket mutatom be.



19. ábra 5-DSA külső csatolási állandója ($2A_{\max}$) (A) és 16-DSA k paramétere ($k=h_{+1}/h_0$) (B) DPPC liposzómában a porfirin nélküli kontroll ($\square$), és a porfirineket: TP(4-OGluOH)₄P-t ($\diamond$) vagy TPF5(4-OGalOH)₃P-t ($\triangle$) tartalmazó mintákban a hőmérséklet függvényében.

A fejcsoportok közelében monitorcsoporttal rendelkező spinjelölő (5-DSA) alkalmazásakor a csatolási állandó ($2A_{\max}$) a hőmérséklet emelkedésével csökken, ami a rigiditás csökkenését jelzi (19.A ábra). Porfirin származék jelenlétében a csatolási állandók értéke magasabb, mint kontroll mintákban. Ez egyrészt jelzi a TP(4-OGluOH)₄P és TPF5(4-OGalOH)₃P jelenlétét az 5-DSA-val jelzett régióban, másrészt arra mutat, hogy jelenlétükben a membrán rigidebbé válik, fluiditása csökken. Ez a hatás a TPF5(4-OGalOH)₃P esetében kifejezettebb. A két porfirin származék fluiditást befolyásoló hatása a mélyebb régiókban (19.B ábra) lényegesen kisebb, és nem is azonos irányban befolyásolják a membrán rigiditását. A

TPF5(4-OGalOH)₃P, a nyaki régióhoz hasonlóan, stabilizáló hatású, míg a szimmetrikusan szubsztituált származék, inkább a fluiditás növelése irányában látszik hatni, de az általa okozott változások nem szignifikánsak.

A kötődés következményeként a membránban kialakuló szerkezeti változásokra mutathat rá a foszfolipidek mikroklorimetriás (DSC) vizsgálata [254,265]. Megjegyzem, hogy a módszer mintakészítési feltételei miatt itt nem liposzómák és ligandumok kölcsönhatását látjuk.

Meghatároztuk a lipidek szénhidrogénláncainak konformációváltásával kapcsolatos fő fázisátalakulás hőmérsékletet (T_m), vagyis a fő fázisátalakulási csúcs maximumához tartozó hőmérsékletet, és a fázisátalakulás félértékszélességét ($T_{1/2}$), ami a résztvevő komponensek kooperativitására jellemző érték lehet [261]. Az eredményeket a 10. táblázatban foglalom össze.

10. táblázat A DMPC ill. DMPC és DMPG (9:1) fő fázisátalakulási hőmérséklete (T_m) és a fázisátalakulás félértékszélessége ($T_{1/2}$) (átlag $\pm$ S.D) különböző porfirin származékok jelenlétében. A lipid : porfirin molarány 20:1.

porfirin származék	$T_m(^{\circ}\text{C})$		$T_{1/2}(^{\circ}\text{C})$	
	DMPC	DMPC/DMPG (9:1)	DMPC	DMPC/DMPG (9:1)
-	24.4 $\pm$ 0.2	22.8 $\pm$ 0.97	1.34 $\pm$ 0.29	1.4 $\pm$ 0.37
TP(2-OGluOH) ₄ P	24.5 $\pm$ 0.4	-	1.5 $\pm$ 0.22	-
TP(4-OGluOH) ₄ P	24.7 $\pm$ 0.1	23.8 $\pm$ 0.24	2.63 $\pm$ 0.76	1.37 $\pm$ 0.09
TP(4-OXylOH) ₄ P	22.6 $\pm$ 0.07	23.4 $\pm$ 0.46	1.1 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.18
TP(4-OGluOH) ₃ P	23 $\pm$ 0.38	24.7 $\pm$ 0.15	5.35 $\pm$ 0.21	5.0 $\pm$ 1.02
TPF5(4-OGalOH) ₃ P	24.2 $\pm$ 0.1	24.1 $\pm$ 0.04	3.6 $\pm$ 0.85	1.4 $\pm$ 0.04

Mint a táblázat adataiból is kitűnik, az aszimmetrikus TP(4-OGluOH)₃P az egyetlen vegyület, amelynek a jelenléte szignifikánsan megváltoztatja mindkét összetételű mintában a fázisátalakulás paramétereit. Mindkét mintában növeli az átalakulás félérték szélességét, vagyis csökkenti a kooperativitást, de érdekes módon nem azonos irányban befolyásolja a fázisátalakulás hőmérsékletét.

5.2. Kationos porfirinek kötődése természetes polinukleotidokhoz és nukleoprotein komplexekhez

5.2.1. Mezo-szubsztituált porfirinek kötődése természetes polinukleotidokhoz

5.2.1.1. A kötött formák azonosítása és mennyiségi meghatározása

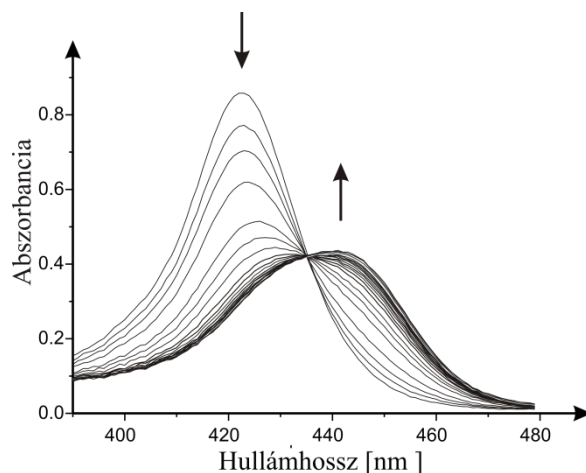
A töltéssel nem rendelkező glikozilált porfirin származékok kölcsönhatása DNS-sel az általunk használt spektroszkópiai módszerekkel nem volt kimutatható. Az irodalomban sem ismeretesek olyan adatok, amelyek alátámasztanák ilyen kölcsönhatás kialakulását. Ugyanakkor a kationos porfirinek és nukleinsavak kölcsönhatása bizonyítható volt.

A négy pozitív töltéssel rendelkező TMPyP kötődését szintetikus oligonukleotidokhoz korábban sokrétűen vizsgálták [146,147,174].

A szintetikus oligonukleotid szekvenciájának megfelelő megválasztása (pl. dG-dC; dA-dT) révén egymástól elkülönülve megjelenő és tanulmányozható kötött formái, az interkalált és a kis árokhoz kívülről kapcsolódó TMPyP, azok spektroszkópiai jellemzői, szerkezete ismertek. A kétféle kötött forma egyidejű vizsgálatára, kialakulásuk kvantitatív és kvalitatív leírására azonban az irodalomban nagyon kevés támpontot találunk. Még inkább így van ez, ha nem oligo-, hanem polinukleotidokkal kölcsönhatásban kialakuló kötött formák eloszlását, jellemzését szeretnénk megismerni.

Mi a kötött formák kialakulását természetes polinukleotidokon kívántuk vizsgálni, különös tekintettel azok egymás mellett való megjelenésére; a kötődést és a kötött formák megoszlását befolyásoló tényezőkre [237]. Munkánk első fázisában természetes polinukleotidként a T7 bakteriofágból izolált, 40 kb hosszúságú kettős szálú DNS-t használtuk, amely kísérleti körülményeink között B-konformációjú, bázisösszetételére a G-C és A-T bázispárok 50-50 %-os aránya jellemző.

A TMPyP interkalált illetve külső kötésben DNS-hez kapcsolódó formájának abszorpciós spektruma jellegzetes eltérést mutat a szabad formáétól (2.3. fejezet, 3. táblázat). Ennek analógiájára rögzítettük a megfelelő abszorpciós spektrumokat csak egyértékű ionokat tartalmazó Tris-HCl (pH 7,4; I=68 mmól) pufferben izolált T7 DNS-sel való titrálás során. Egy, a DNS relatív koncentrációjának növekedése nyomán kialakuló spektrumsorozat Soret sávjának tipikus változását a 20. ábrán mutatom be.



20. ábra A TMPyP abszorpciós spektrumának változása izolált T7 DNS-hez való kötődés során (Tris-HCl puffer, pH 7,4) a $\lambda=390-480$ nm tartományban. A bázispár/porfirin arány (r) 1-20 között változik. A spektrum változásának irányát a nyilak jelzik.

Megfigyelhető, hogy a TMPyP Soret sávja jelentős, körülbelül 20 nm-es vörös irányú eltolódása és 41 %-os hipokrómiája. Az eltolódások iránya, jellege alapján állíthatjuk, hogy létrejön a kötődés a porfirin és a polinukleotid között. A változások mértékét az irodalmi adatokkal összevetve (3. táblázat) megállapítható, hogy azok egyik kötött formára jellemző értékekkel sem azonosak, azok között helyezkednek el. Ez alapján valószínűsíthető mindkét típusú kötött populáció egyidejű jelenléte.

Az egyes formákra jellemző spektrumok felderítéséhez a spektrumsorozat tagjait komponenseikre bontottuk az alábbi feltevésekből kiindulva [237]:

- A TMPyP az izolált T7 DNS-hez kétféle módon kötődik; ezek alapvető tulajdonságai megfelelnek az irodalomból ismert külső kötődésnek és interkalációnak.
- Mindhárom (a szabad és a kétféle kötött) forma egy-egy jól meghatározott „állapot-spektrummal” jellemezhető. Így minden mért spektrum három komponens spektrum összegeként adható meg:

$$A(\lambda) = A_{sz}(\lambda) + A_k(\lambda) + A_i(\lambda), \quad (8)$$

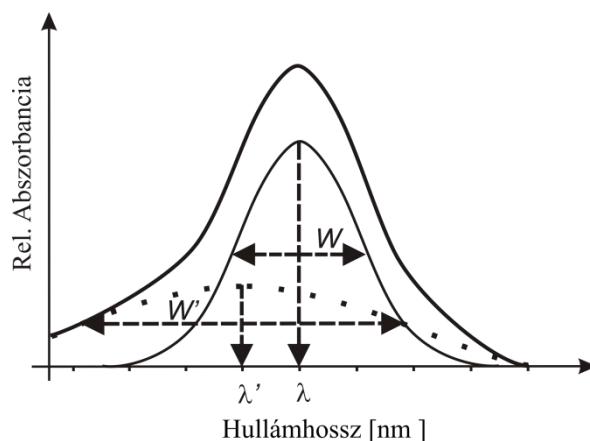
ahol A_{sz} , A_k , A_i rendre a szabad, a külső kötött és interkalált spektrumokat jelöli.

- A szabad állapot ismert spektrumának mintájára (4. ábra) feltételezhető, hogy a kötött állapotok spektrumainak Soret sávja megfelelően közelíthető két Gauss-függvény összegével: egy görbe az állapot abszorpciós maximum körüli tartományhoz, egy pedig annak rövid hullámhosszú oldalán található vállhoz rendelhető. Hogy ez a közelítés minél jobb legyen, az illesztési tartományt viszonylag szűknek ($\lambda=390-480$ nm) választottuk (ezért nem volt szükség hullámhossz – frekvencia konverzióra sem).

- Az egyes állapotokat jellemző Gauss-görbe párokat (21. ábra) (a függvények maximumhelyeivel (λ , λ' megfelelően a csúcs- és váll-görbére), félérték-szélességével (w , w'), valamint azok görbe alatti területével (A , A') írtuk le. Egy állapothoz tartozó spektrum az adott hullámhossz tartományban tehát két ilyen függvény összegeként írható fel:

$$A_x(\lambda) = \frac{A_x}{w_x \sqrt{\pi/2}} \exp\left(-\frac{2(\lambda - \lambda_x)^2}{w_x^2}\right) + \frac{A'_x}{w'_x \sqrt{\pi/2}} \exp\left(-\frac{2(\lambda - \lambda'_x)^2}{w'^2_x}\right) \quad (9)$$

Feltételeztük továbbá, hogy a teljes vizsgált hullámhossz- és koncentrációtartományban, valamint a kötőhelyek telítettségétől függetlenül érvényes a spektrumokra a Lambert-Beer törvény linearitása.



21. ábra A TMPyP egy állapothoz tartozó abszorpciós spektrum $\lambda=390-480$ nm-es tartományának modellezése két Gauss-függvény összegeként. Az összspektrumot vastag folytonos vonallal, a komponenseket vékony folytonos („csúcs”-sáv) és pontozott vonallal („váll”) jelöljük.

Ebből ugyanis következik, hogy egyrészt az egyes „állapot-spektrumok” alakját jellemző λ , λ' , w , w' paraméterek konstansnak tekinthetők, másrészt egy állapot csúcs- és váll-görbéjének területe – mivel ugyanazon molekula-populáció „hozza létre” azokat – egymással egyenesen arányos. Az arányossági tényezőt α -val jelölve a következő összefüggés adódik:

$$\alpha_x = A'_x/A_x \quad (10)$$

Az egyetlen paraméter, amely változik egy bizonyos porfirin populáció spektrumaiban az az összes terület A_x , míg a többi paraméter (α_x , λ_x , λ'_x , w_x , w'_x) állandó marad.

A kezdeti illesztési próbálkozásokban az is megmutatkozott, hogy a két kötött állapot jól illeszthető két külön csúcs görbe és egy közös váll kombinációjával. Ennek paraméterei,

szélessége és hullámhossz maximuma nem változnak a vizsgált koncentráció viszonyok mellett. Az együttes vállhoz tartozó paramétereket a továbbiakban A'_e , λ'_e , w'_e jelöljük. Ilyen módon az egy adott spektrumhoz tartozó változó paraméterek a következők: A_{sz} , A_k , A_i , A'_e , λ_k , λ_i , λ'_e , w_k , w_i , w'_e .

Mivel a mindenkori váll területe a fentiek szerint a két kötött forma spektrumához tartozó vállak összege:

$$A'_e = A'_k + A'_i. \quad (11)$$

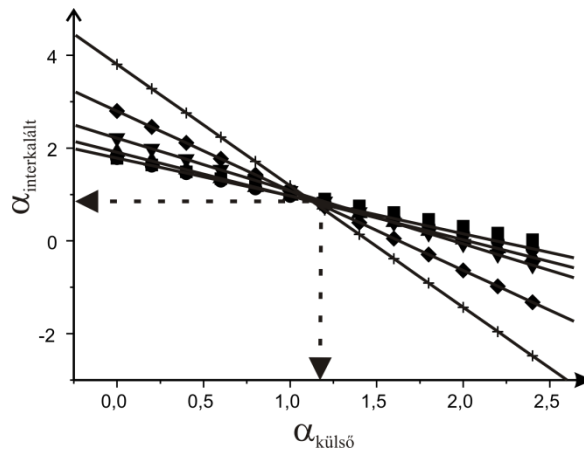
A $\alpha_x = A'_x/A_x$ egyenlet figyelembe vételével:

$$A'_e = A_k \alpha_k + A_i \alpha_i, \quad (12)$$

amiből α_i megadható, mint α_k lineáris függvénye:

$$\alpha_i = \frac{A'_e}{A_i} - \frac{A_k}{A_i} \alpha_k \quad (13)$$

Egy adott bázispár/porfirin (r) aránynál felvett spektrum felbontási sorozatából az arra vonatkozó függvény megalkotható. A felbontásokat elvégeztük $0 \leq r \leq 40$ tartományban. Különböző r értéknél felvett spektrumok felbontásából a 22. ábrán bemutatott görbesereg nyerhető, ahol minden egyenes egy adott r értéknél kapott pontokra illesztett függvényt mutat.



22. ábra A DNS-hez kötött állapotok α értékeinek meghatározása: $\alpha_{interkalált}$ ábrázolása $\alpha_{külső}$ függvényében, különböző r arányok mellett felvett spektrumok felbontásából.

Az ábrából világosan kitűnik, hogy az egyenesek jó közelítéssel egy pontban metszik egymást, vagyis a különböző r értékekre adott illesztéseknek van egy közös megoldása. Ez a

kvázi-metszéspont adja meg a minden mintára leginkább elfogadható α értékpárt. Ezek alapján $\alpha_{\text{külső}} = 1,2$, $\alpha_{\text{interkalált}} = 0,8$ értékek adhatók meg. Ezeket, mint állandókat használtuk a továbbiakban spektrumfelbontások során.

A kötött állapotok csúcs-görbéinek paramétereire azokat az értékeket kerestem, amelyek az egész sorozatra (és nem pedig az egyes spektrumokra) nézve a legjobb illesztést, azaz a legkisebb χ^2 -értékeket adják. Az ilyen módon végzett felbontás eredményeiből megállapítható volt, hogy a kétféle kötött állapot csúcs-görbéinek maximumhelye $\lambda=430$, illetve $\lambda=446$ nm-nél található, félérték-szélességük pedig rendre 20 nm, illetve 19 nm volt. Az egyik állapotot ($\lambda=430$ nm, $w=20$ nm) a korábbi ismeretek alapján a külső kötött, a másikat pedig ($\lambda=446$ nm, $w=19$ nm) az interkalált formának feleltettük meg [146,158,167]. A kötött állapotok rövidhullámhosszú oldalon elhelyezkedő közös vállának paraméterei $\lambda'_e=420$ nm és $w'_e=67$ nm voltak.

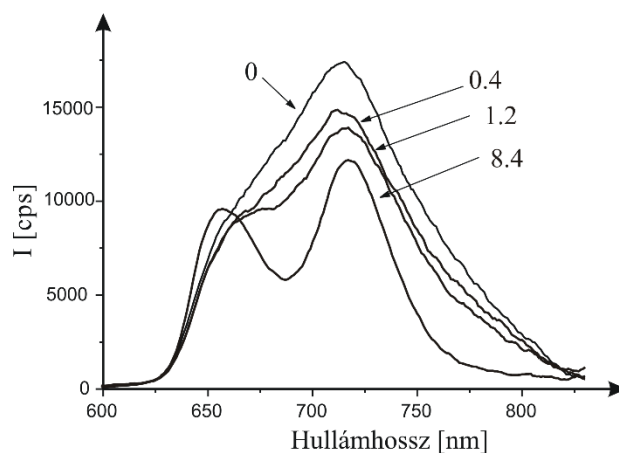
A felbontások eredményeként kapott állandókat a 11. táblázatban foglalom össze. (A táblázatban szereplő moláris extinkciós állandót nem a felbontások alapján határoztuk meg, meghatározási módjára a továbbiakban kitérek.)

11. táblázat A TMPyP szabad és DNS-hez kötött állapotainak abszorpciós spektroszkópiai jellemzői a $\lambda=390-480$ nm tartományban: az abszorpciós sávok (csúcs és váll) maximumhelyei (λ_x, λ'_x), a sávok szélessége (w_x, w'_x), a váll és csúcs területi aránya (α_x), és a moláris extinkciós állandó a spektrum maximumánál (ϵ).

Forma	$\lambda_x(\text{nm})$	$w_x(\text{nm})$	$\lambda'_x(\text{nm})$	$w'_x(\text{nm})$	α_x	$\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
Szabad	423	17	415	41	1,32	$3,17 \times 10^5$
DNS-hez kötött						
külső kötés	430	20	420	67	1,20	$2,98 \times 10^5$
interkaláció	446	19	420	67	0,80	$1,66 \times 10^5$

A TMPyP kötődése az abszorpciós spektrum megváltozásán túl jellegzetes változásokat eredményez annak a fluoreszcencia emissziós spektrumában, továbbá az egyes kötött formák az irodalomból már ismert fluoreszcencia élettartamokkal is jellemezhetők. Ezért remélhető, hogy a TMPyP fluoreszcencia jellemzőinek DNS jelenlétében mutatott változásai további bizonyítékokat szolgáltathatnak az abszorpciós spektrumok felbontásának eredményei alapján feltételezett kötődési folyamatok alátámasztására.

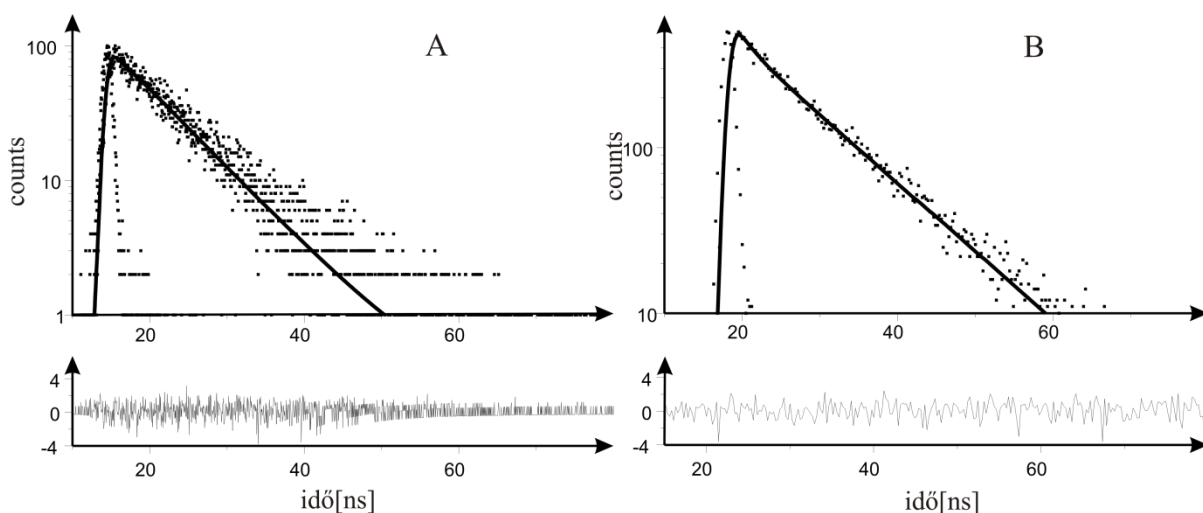
A TMPyP széles, tagolatlan emissziós sávja DNS hozzáadására két csúcsra hasad fel, valamint intenzitása csökken (23. ábra). A gerjesztést a fényelnyelés „kvázi” izoszbesztikus pontján végeztük, valódi izoszbesztikus pontról ugyanis a háromféle állapot miatt nem beszélhetünk (20. ábra). Mindez az irodalmi adatokkal összhangban a porfirin és a polinukleotid kötődésére utal [159-161]. Megjegyzem, hogy a kapott fénykibocsátási színeképek nagyon hasonlóak a TMPyP metanolban mutatott spektrumához, amiből arra lehet következtetni, hogy a molekula – legalábbis részben – apoláros környezetbe került. A fluoreszcencia spektrum alakjának, amplitúdójának változása jelzi a kötődés tényét, de a spektrumok részletes elemzésére, felbontására nem vállalkozhatunk.



23. ábra A TMPyP emissziós spektrumának változása T7 bakteriofágból izolált DNS hozzáadásakor (Tris-HCl, pH7,4); r értékeit az ábrán jelöljük. $c_{\text{TMPyP}} = 2 \mu\text{M}$

A kötött formák jelenlétének igazolását segítheti a fluoreszcencia élettartam(ok) azonosítása a feltehetően kötött TMPyP populációkat tartalmazó mintákban. Ezért TMPyP DNS-t nem tartalmazó, valamint DNS-t különböző bázispár/porfirint molarányt (3, 6, 8, 12) eredményező koncentrációban tartalmazó oldatainak fluoreszcencia lecsengési görbéit rögzítettük és elemeztük. A mintákat az abszorpciós spektrumok izoszbesztikus pontjához tartozó hullámhosszon gerjesztettük.

A csak szabad TMPyP-t tartalmazó oldat fluoreszcencia lecsengése mono-exponenciálisnak mutatkozott. A második ($r=3$) mintában három, a nagyobb arányban ($r>3$) DNS-t tartalmazó mintákban pedig két komponensű exponenciális görbére volt szükség a megfelelő pontosságú illesztéshez eléréséhez.



24. ábra A szabad (A) és a T7 DNS-hez kötött ($r=12$) TMPyP (B) fluoreszcencia lecsengési görbéje, valamint ezek illesztése mono- illetve bi-exponenciális függvényekkel. Az alsó grafikonok az illesztéstől való eltérést mutatják. ($\lambda_g=436$ nm)

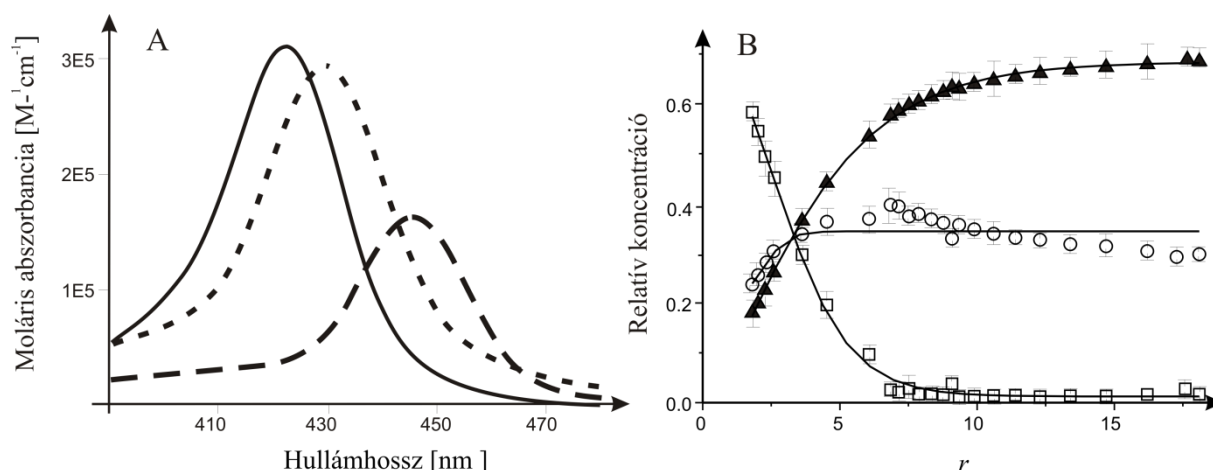
A megfelelő élettartam komponenseket a 12. táblázatban foglalom össze. Látható, hogy a DNS jelenlétében detektált két komponens hibahatáron belül független a DNS koncentrációjától, és egymástól szignifikánsan különbözik. Értékeik jó közelítéssel megfelelnek az irodalomból ismert [160], az interkalált (rövidebb idejű komponens) illetve kis árokhöz kötődő formák élettartamának (hosszabb idejű komponens). Azt is érdemes megfigyelni, hogy míg $r=3,6$ -nél a szabad állapotra jellemző komponens is megjelenik, magasabb r értékeknél ez eltűnik, jelezve, hogy itt már csak a kötött állapotok populációi vannak jelen a rendszerben.

12. táblázat A TMPyP fluoreszcencia élettartamának komponensei és azok relatív mennyisége Tris-HCl pufferben (pH7,4) szabad állapotban és DNS jelenlétében különböző r értékeknél

Minta	r	τ_1 (ns)	%	τ_2 (ns)	%	τ_3 (ns)	%
TMPyP	0	$5,4 \pm 0,3$	100				
	3,6	$5,4 \pm 0,2$	35	$10,4 \pm 0,5$	32,5	$2,6 \pm 0,3$	32,5
TMPyP + DNS	8			$10,3 \pm 0,4$	34	$2,7 \pm 0,4$	66
	12			$10,2 \pm 0,5$	29	$2,8 \pm 0,3$	69,5

A kötött formák jelenlétének bizonyításán túl, az élettartam meghatározása lehetőséget adott az egyes komponensek relatív mennyiségének meghatározására is, a bemérési porfirin

koncentráció ismeretében tehát az egyes komponensek koncentrációja meghatározható. Azonos porfirin koncentrációjú és azonos bázispár/porfirin aránnyal jellemezhető, a két módszerrel egyidejűleg vizsgált mintákon az abszorpciós spektrumok felvételét majd felbontását és a fluoreszcencia lecsengési görbék felvételét és elemzését elvégezve, az abszorbancia és komponens koncentráció adatokat összevetve, az egyes kötött formák moláris extinkciós együtthatói (ϵ) meghatározhatóak. Az ϵ értékeket a 11. táblázat és a 25. ábra. mutatja be.



25.ábra TMPyP szabad (folytonos vonal), és izolált DNS-hez kötött formáinak (külső (---) és interkalált (— · —)) rekonstruált abszorpciós spektrumiai (A), és az egyes formák (szabad ($\square$), külső kötött ($\circ$), interkalált ($\blacktriangle$)) megoszlása a bázispár/porfirin mólarány (r) függvényében (B)

Az ϵ értékek és spektrumfelbontások alapján **a továbbiakban tetszőleges összetételű mintákban meghatározható az egyes kötött formák abszolút koncentrációja** a 25. ábra szerint.

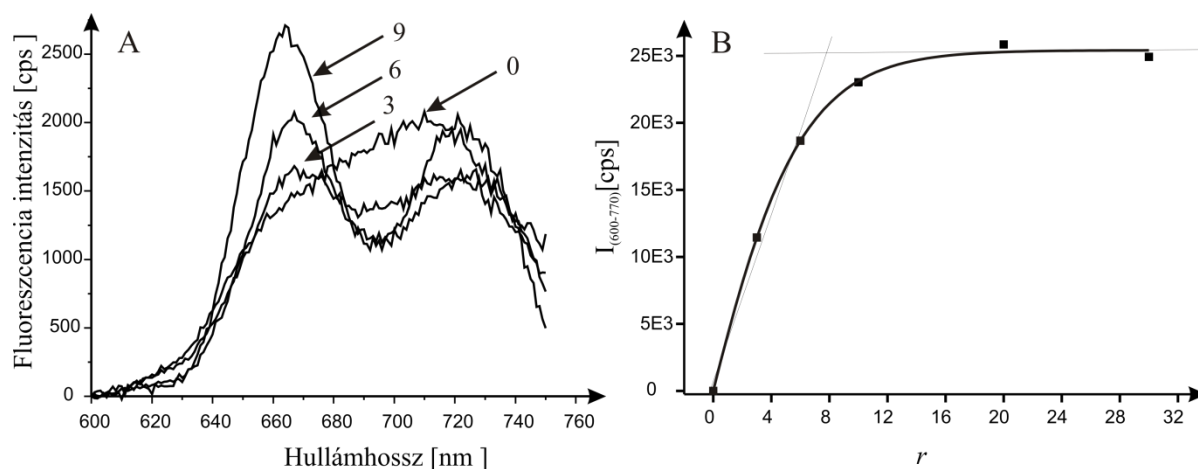
További bizonyítékot jelent a két kromofór, azaz a nukleotid bázisok és a porfirin közelségére a fluoreszcencia energia-transzfer jelensége is. Az oldat $\lambda=260$ nm-en történő gerjesztését követően a TMPyP emissziója DNS jelenlétében növekedő intenzitást mutat, valamint ismét megfigyelhető a színek már ismert felhasadása (26. ábra). A spektrum alakja – irodalmi analógiák alapján [160] – az interkalált forma spektrumának felel meg.

Az

$$I_{\text{kötött}} = I - I_0 n_{\text{sz}} \quad (14)$$

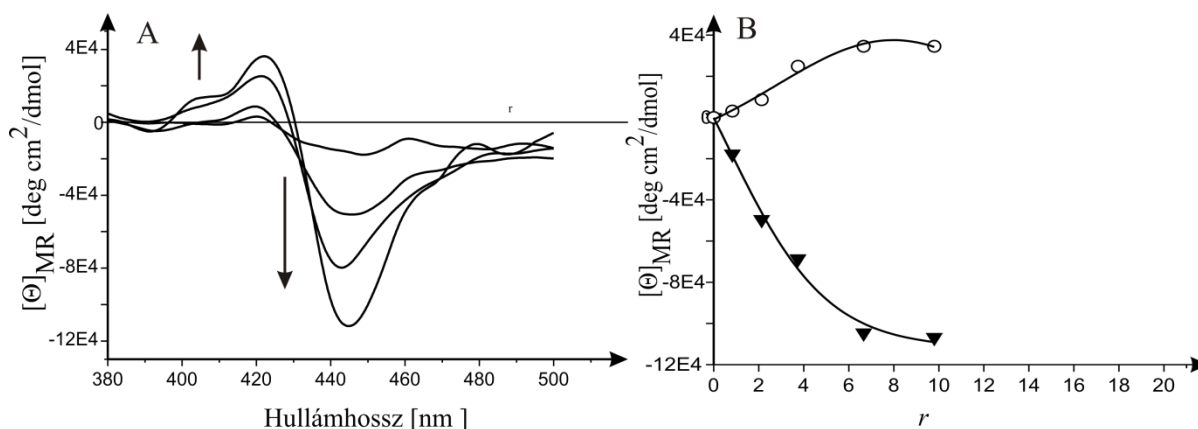
összefüggés alapján, ahol I a fluoreszcencia intenzitás az adott bázispár koncentráció mellett, I_0 a szabad porfirin fluoreszcencia intenzitás és n_{sz} a szabad porfirin relatív koncentrációja, megadható a kötött porfirin mindenkor fluoreszcencia intenzitása. Ennek értékeit r

függvényében mutatjuk a 26. ábrán. A görbe telítési értéke az interkalációs lehetőségek telítését jelzi.



26. ábra (A) A TMPyP emissziós spektruma ($\lambda_{em}=600-770$ nm; $\lambda_g=260$ nm) különböző mennyiségű izolált T7 DNS (r : 0-9) jelenlétében, Tris-HCl pufferben; $c_{TMPyP}=2\mu M$. Az egyes görbékhez tartozó bázispár/porfirin molarányokat az ábrában tüntetjük fel. (B) Az integrált fluoreszcencia intenzitás változása (lásd 14 képlet) r függvényében.

Mint ismert, az akirális TMPyP DNS jelenlétében, kötött állapotainak megfelelő jellegzetes CD jelet szolgáltat [266,267]. A TMPyP CD spektrumainak sorozatát rögzítettük a növekvő r értékkel jellemezhető minták sorozatán. Egy tipikus spektrumsorozatot a 27.A ábrán mutatunk be. A spektrumokban megjelenik mind a kisárokba való külső kötődésre jellemző pozitív ($\lambda_{max}=422$ nm), mind az interkalációra jellemző negatív ($\lambda_{max}=448$ nm) sáv. A sávok amplitúdója változik a bázispárok koncentrációjával.



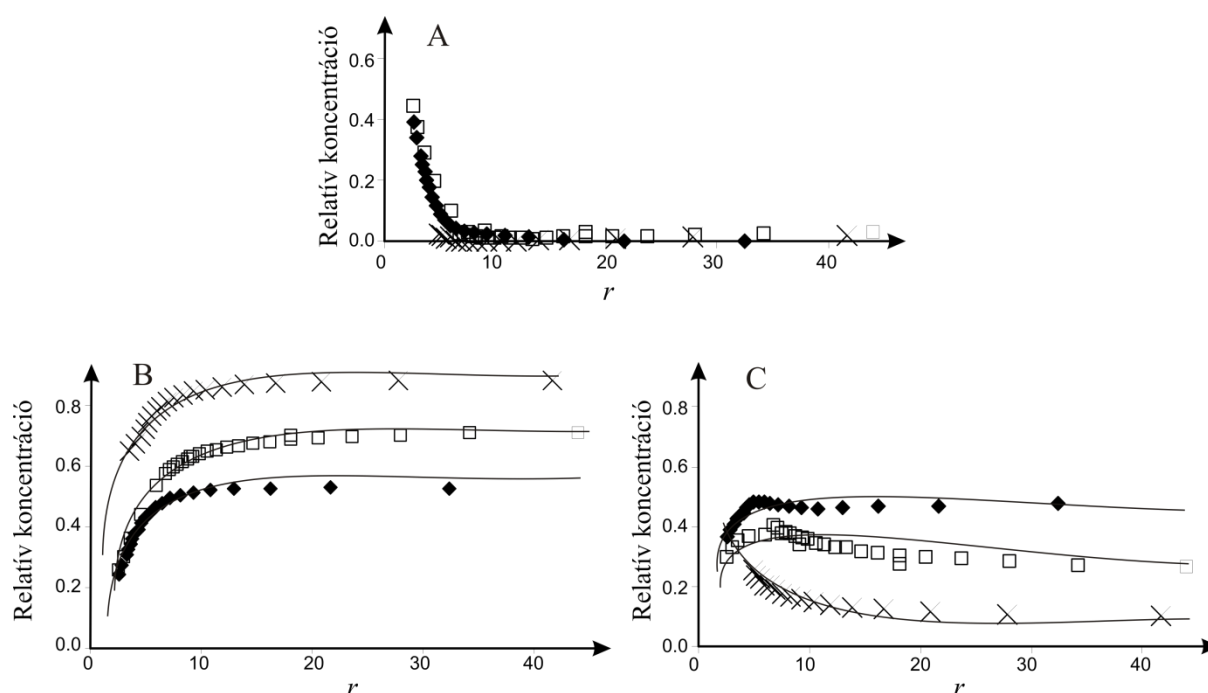
27. ábra (A) TMPyP CD spektrumai izolált DNS jelenlétében (r : 0,8-6.6). A változás irányát az ábrában nyíllal jelöljük. (B) A moláris ellipticitás változása $\lambda=422$ nm-en (○) és 448 nm-en (▼) r függvényében.

A sávok jellemző maximum értékeinél, ($\lambda=422$ és $\lambda=448$ nm) külön is meghatároztuk a moláris ellipticitás értékeket a bázispár/porfirin arány függvényében (27.B ábra). Ebben az ábrázolási módban is kitűnik az amplitúdók telítésbe hajló növekedése. A telítés körüli r értékek jó egyezést mutatnak a spektrumfelbontások alapján kapott értékekkel (25. ábra).

A T7 fágból izolált 40 kbp méretű DNS mellett, a fentiekhez hasonlóan megvizsgáltuk a TMPyP kötődését izolált HeLa nukleoszóma átlagosan 150 bp hosszú DNS-hez. A T7 DNS esetében használt módszer a nukleoszóma DNS esetében is minden tekintetben alkalmazható volt. Az interkalált és külső kötött formák közötti megoszlás a telítési bázispár/porfirin aránynál itt is hasonlóan, közelítőleg 60/40-nek adódott [246].

5.2.1.2. A bázisösszetétel szerepe a kötött formák közötti eloszlásban

A bevezetésben idézett korábbi közlemények [155,171,268] alapján egyértelműnek látszik, hogy a kationos porfirin származékok DNS-kötődésére bizonyos bázisszelektivitás jellemző. Korábban nem vizsgálták azonban, hogy az egyes kötőmódok hogyan befolyásolják egymást, milyen arányban jönnek létre a különböző kötődések kevert bázisösszetételű, természetes polinukleotidokon.



28. ábra TMPyP kötődése különböző bázisösszetételű izolált DNS-ekhez: a szabad (A), az interkalált forma (B) a külső komplex (C) megoszlása T7 fágból (50 % A-T, 50 % G-C) ($\square$), csirke vörösvérsejtből (68 % A-T, 32 % G-C) ($\blacklozenge$) és *Micrococcus luteus*-ból (28 % A-T, 72 % G-C) ($\times$) izolált DNS esetén (Tris-HCl puffer pH7,4)

A leírt metodikát használva megvizsgáltuk a TMPyP kötődését a kiegyenlített bázisösszetételű (50 % A-T, 50 % G-C) T7 bakteriofág DNS-étől eltérő összetételű, csirke vörösvérsejtből (68 % A-T, 32 % G-C) származó illetve *Micrococcus luteus* baktériumból (28 % A-T, 72 % G-C) izolált polinukleotidokhoz is. A titrálási sorozatokból kapott abszorpciós spektrumok felbontásához a T7 DNS-re kapott paramétereket használtuk, amelyekkel kellő pontosságú (alacsony χ^2 -értékek) illeszkedéseket kaptunk mindkét eltérő összetételű polinukleotid esetében is. A TMPyP megoszlását az egyes rendszerekben a 28. ábra foglalja össze.

Az A-T túlsúlyú csirke DNS esetében a külső kötődés aránya emelkedett, az interkalációé pedig csökkent, míg a G-C túlsúlyú *Micrococcus luteus* DNS-hez való kötődéskor pedig inkább az interkaláció dominál. Ez utóbbinál $r > 10$ bázispár/porfirin arányoknál a TMPyP molekulák több mint 85 %-a képes interkalálódni a bázispárok közé. T7 DNS-nél ez az arány kb. 70 %, csirke DNS esetén pedig csak 50 %-ra tehető. A kis árokhhoz kapcsolódó forma azonban még a 68 % A-T összetételű csirke DNS-ben sem válik dominássá. Figyelemre méltó továbbá, hogy a szabad forma részaránya mindhárom esetben $r \approx 6$ -nál csökken a mérési hiba tartományába.

5.2.1.3. A porfirin származék töltésének szerepe

A kationos porfirinek és nukleinsavak kölcsönhatásának kutatásában az irodalomban többnyire négy pozitív töltést hordozó porfirin származékokat – azok szabad bázisú változatait illetve fémkomplexeit – választottak, ezekkel kapcsolatban áll rendelkezésünkre a legtöbb irodalmi adat. A fentiekben mi is a szabad bázisú tetrakationos származék és természetes polinukleotidok kölcsönhatására vonatkozóan mutattuk be eredményeinket. Ugyanakkor egyes vizsgálatok alapján az a kérdés is feltehető, hogy a pozitív töltések száma, elhelyezkedése hogyan befolyásolja a porfirin-polinukleotid kölcsönhatást.

A kérdés megválaszolása érdekében egy három (TMPCP) illetve egy két pozitív töltést hordozó (BMPCP) porfirin származék és természetes polinukleotid kölcsönhatását tanulmányoztuk. A pozitív töltések mellett ezek a származékok egy (TMPCP) illetve két (BMPCP) negatív töltéssel is rendelkeznek karboxilcsoportjaik révén. A pozitív töltések számán kívül az indokolja a TMPCP és BMPCP kiválasztását, hogy karboxilcsoportjuk alkalmassá teszi azokat további származékok, így például oligopeptid konjugátumok szintézisére, amelyek újabb érdekes lehetőségeket nyithatnak a kationos porfirinek alkalmazásában.

A TMPCP illetve BMPCP és a T7 fágból izolált DNS között kialakuló kapcsolat elemzésében a fentiekben a tetrakationos származékkal (TMPyP) kapcsolatban bemutatott megközelítést és módszereket alkalmaztuk (5.2.1.1 fejezet). A TMPCP és BMPCP abszorpciós spektrumai a TMPyP esetében észleltekhöz hasonlóan hipokrómiát és vörös eltolódást mutatnak a DNS jelenlétében, a bázispár koncentrációjától függő mértékben [234] A spektrumsorozatok elemzése [234,235] alapján kapott paramétereket a 13. táblázatban foglaljuk össze.

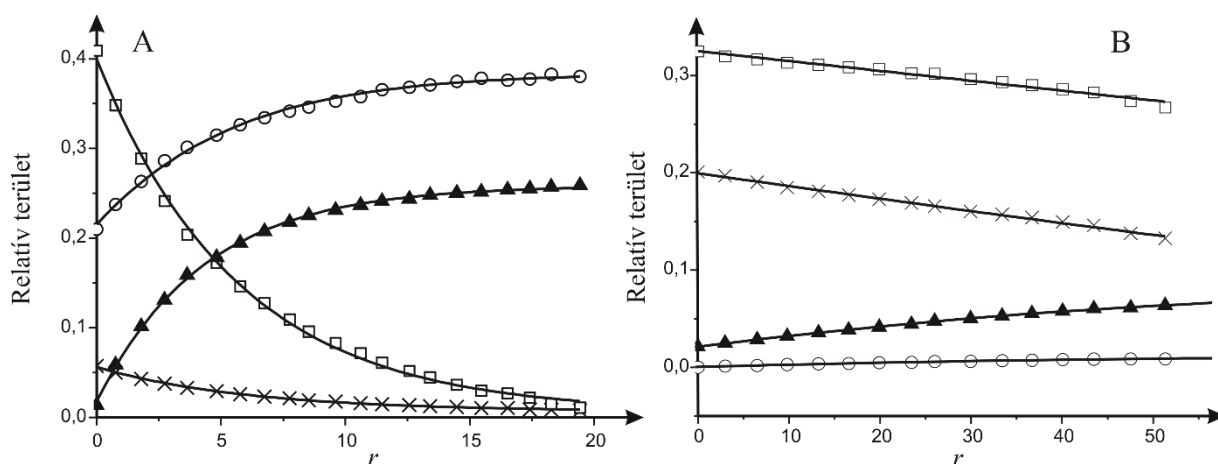
A spektrumok alapján ezekben a rendszerekben is két kötött formát feltételezve kaptuk a legjobb illesztést mutató eredményeket. A vörös eltolódás és a hipokrómia mértéke alapján a két kötött forma vélelmezhetően itt is az interkalációnak és a külső kötésnek feleltethető meg.

13. táblázat Kationos porfirinek szabad és DNS-hez kötött állapotainak abszorpciós spektroszkópiai jellemzői $\lambda=370-490$ nm tartományban (Tris-HCl puffer, pH 7,4): az abszorpciós sávok maximumhelyei λ_i (nm) és a sávok szélessége w_i , (nm). λ_i hibája < 1 nm, w_i hibája $< 0,5$ nm.

Vegyület	λ_1 (nm)	w_1 (nm)	λ_2 (nm)	w_2 (nm)	λ_3 (nm)	w_3 (nm)	λ_4 (nm)	w_4 (nm)
	közös váll		csúcs (szabad)		csúcs (kötött)			
BMPCP	407	17	418.5	13.5	429	7	435	14
TMPCP	402	15	422	17.5	429	25	446	25

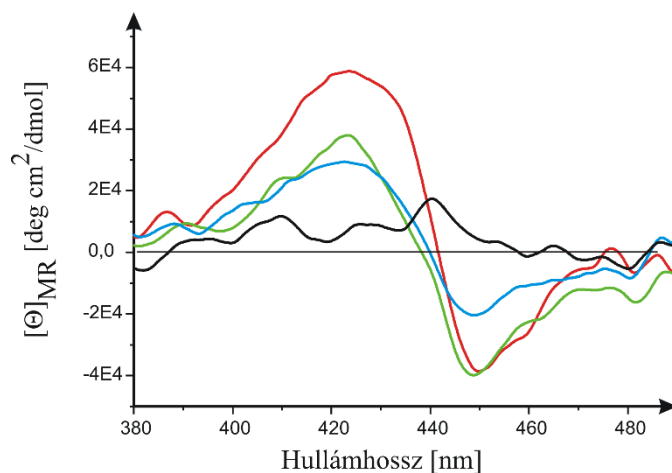
Az egyes sávok relatív aránya ebben az esetben is változik a bázispár/porfirin molarány függvényében, amit a 29. ábra szemléltetünk. A TMPCP esetében (29.A ábra) két sáv relatív területe nő r növekedésével, de meg kell jegyeznünk, hogy a $\lambda=429$ nm-es maximummal rendelkező sáv már a szabad TMPCP spektrumában is jelen van. Feltételezhetjük, hogy a szabad porfirin származék abszorpciós spektrumának egyik komponense a felbontás során nem választható el az egyik kötött formához tartozó abszorpciós sávtól.

A 29.A és B ábrák összehasonlításakor az is megfigyelhető, hogy azonos r értékeket tekintve markáns különbség van az egyes sávok részaránya – így feltehetően a hozzájuk tartozó szabad és kötött formák mennyisége – között a TMPCP illetve BMPCP spektrumaiban.



29. ábra A TMPCP (A) és BMPCP (B) abszorpciós sávjainak relatív területe izolált DNS jelenlétében a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében T7 fágól izolált DNS-hez kötődéskor a sávok maximumhelyeinek pozíciója szerint (Tris-HCl puffer, pH 7,4). TMPCP: 402 nm (x), 422 nm ($\square$), 429 nm ($\circ$), 446 nm ($\blacktriangle$); BMPCP: 407 nm (X), 418,5 nm ($\square$), 429 nm ($\circ$), 435 nm ($\blacktriangle$).

A TMPCP két kötött formájának meglétét támaszthatja alá az egyes formáknak megfelelő indukált CD jel megjelenése (30. ábra) a DNS jelenlétében. A pozitív (külső kötés) és negatív (interkalált forma) sávok megjelenése, és amplitúdóik változása a bázispár/porfirin molarány függvényében világosan felismerhető a TMPCP spektrumsorozatán (30. ábra) már az $r=0$ - 15 tartományban. A két pozitív és két negatív töltést hordozó BMPCP hasonló spektrumsorozatán még $r=30$ -nál sem emelkednek ki a sávok a zajszintből (ábra nélkül).



30. ábra (A) TMPCP CD spektrumai T7 fágól izolált DNS jelenlétében (Tris-HCl puffer, pH 7,4). Az egyes spektrumokhoz tartozó mintákban a bázispár/porfirin molarány: 0 (fekete), 5 (kék), 10 (zöld), 15 (piros). A porfirin koncentráció 1 μ M.

A TMPyP példáján láttuk, hogy az egyes kötött formák azonosítását azok fluoreszcencia élettartama is alátámaszthatja. A BMPCP és TMPCP fluoreszcencia lecsengési görbéit DNS

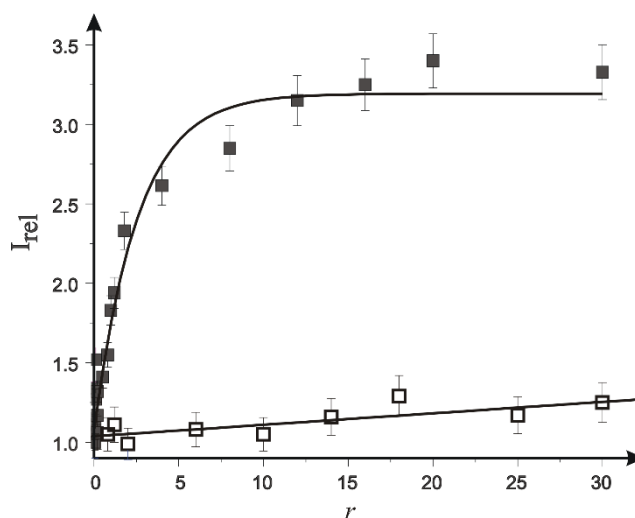
nélküli illetve DNS-t tartalmazó oldataikban rögzítettük. A lecsengési görbékre illesztett komponensek alapján kapott fluoreszcencia élettartamokat a 14. táblázat tartalmazza.

A BMPCP fluoreszcencia lecsengési görbéje mono-exponenciálisnak mutatkozik mind szabad állapotban, mind a DNS jelenlétében is. Megjegyzendő, hogy a táblázatban mutatott adat $r=6$ bázispár/porfirin molarányú oldatra vonatkozik, de nagyobb arányoknál sem mutatkozott további komponens. A DNS-t tartalmazó oldatban a TMPCP bi-exponenciális lecsengési görbét mutat. Az élettartam komponensek egyike szignifikánsan rövidebb, mint a szabad állapothoz tartozó élettartam. Mint korábban láttuk, ez az eltolódás az interkalált forma jelenlétére utal.

14 táblázat A BMPCP és TMPCP fluoreszcencia élettartamának komponensei Tris-HCl pufferben (pH7,4) szabad állapotban és DNS jelenlétében ($r=6$)

Vegyület	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
BMPCP	$8,76 \pm 0,21$	-
BMPCP +DNS	$8,84 \pm 0,23$	-
TMPCP	$8,99 \pm 0,19$	-
TMPCP + DNS	$2,38 \pm 0,18$	$8,64 \pm 0,4$

A TMPCP esetében az élettartamok mellett a DNS bázisai és a porfirin származékok között létrejövő energiatranszfer is világosan jelzi az interkalált TMPCP jelenlétét. (31. ábra).



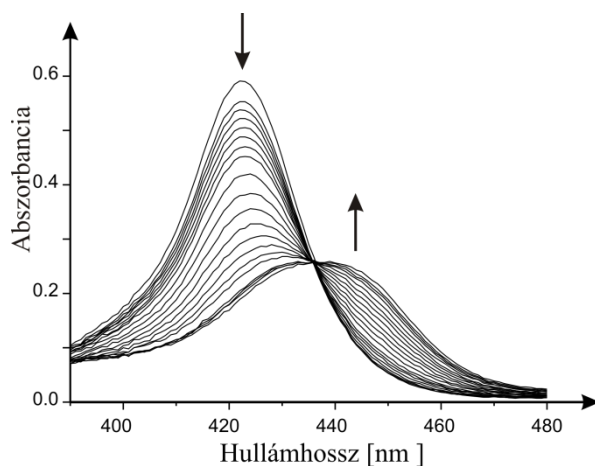
31. ábra (A) A TMPCP (■) és BMPCP (□) integrált fluoreszcencia intenzitása ($\lambda_{em}=600-770$ nm; $\lambda_q=260$ nm) (lásd 14. képlet) izolált T7 DNS bázispár/porfirin molarány (r) függvényében.

Az indukált CD-jel hiánya és a fluoreszcencia élettartam adatok arra mutatnak, hogy a BMPCP nem kötődik interkalációval a polinukleotidhoz. Ugyanakkor az abszorpciós spektrum felbontásával kapott komponensek egyike ($\lambda_{\max}=435$ nm) és a BMPCP esetében is kimutatható energiatranszfer (31. ábra) jelezheti az interkalált forma jelenlétét csekélyebb mértékben még a két pozitív töltést hordozó származék esetében is.

5.2.2. Mezo-szubsztitált porfirin származékok kötődése természetes nukleoprotein komplexekhez

5.2.2.1. A kötött formák azonosítása és mennyiségi meghatározása

Mint azt bemutattuk, a TMPyP kötődésének számos aspektusát részletesen tanulmányozták az elmúlt évtizedekben. A polinukleotidok és a TMPyP kölcsönhatásával azonban csak nagyon kevés publikáció foglalkozott. A nukleoprotein komplexek és a kationos porfirinek kölcsönhatásának kvantitatív leírására pedig nem is találtunk adatot az irodalomban, holott a természetben a DNS döntően fehérjékkel alkotott komplexekben fordul elő. Ezért megkíséreltük a TMPyP és természetes nukleoprotein komplexek, a T7 nukleoprotein valamint a nukleosóma közötti kölcsönhatást kimutatni, a kialakuló kötéseket elemezni, kvalitatív és kvantitatív leírását adni.



32. ábra A TMPyP abszorpciós spektrumának változása nukleoprotein komplexhez (T7 bakteriofághoz) való kötődés során (Tris-HCl puffer, pH=7,4). A bázispár/porfirin arány (r) 1-60 között változik. A spektrum változásának irányát a nyilak jelzik.

A TMPyP és T7 nukleoprotein (NP) kapcsolatának leírásához a TMPyP-izolált DNS rendszeren, a fentiekben bemutatott módszereket alkalmaztuk [237]. Kiindulásként felvettük a TMPyP abszorpciós spektrumainak sorozatát növekvő NP koncentrációk mellett (A NP mennyiségét a komplexben lévő bázispár mólban kifejezett mennyiséggel jellemeztük, vagyis

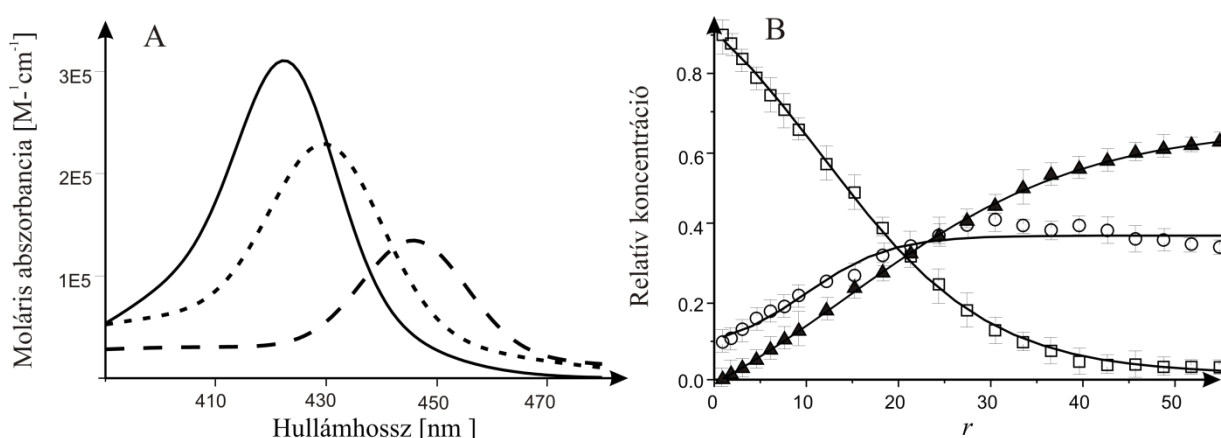
a TMPyP-NP arányok jellemzésére itt is r értékét, vagyis a bázispár/porfirin arányt használtuk.) A spektrumsorozat $\lambda=390-480$ nm-es tartományát a 32. ábrán mutatom be.

A spektrumsorozatban látható eltolódás és hipokromicitás hasonló az izolált DNS esetében látottakhoz (20. ábra). A további elemzéséhez a spektrumok felbontásának fent bemutatott módszerét alkalmaztuk. A legjobb illeszkedést ebben az esetben is a szabad porfirin származékra jellemző paraméterek mellett további két porfirin populáció feltételezésével kaptuk. Ezek abszorpciós spektrumainak paramétereit a 15. táblázatban foglalom össze.

15. táblázat A TMPyP NP-hez kötött állapotainak abszorpciós spektroszkópai jellemzői: az abszorpciós sávok (csúcs és váll) maximumhelyei (λ_x , λ_x'), a sávok szélessége (w_x , w_x'), a váll és csúcs területi aránya (α_x), és a moláris extinkciós állandó a spektrum maximumánál (ϵ).

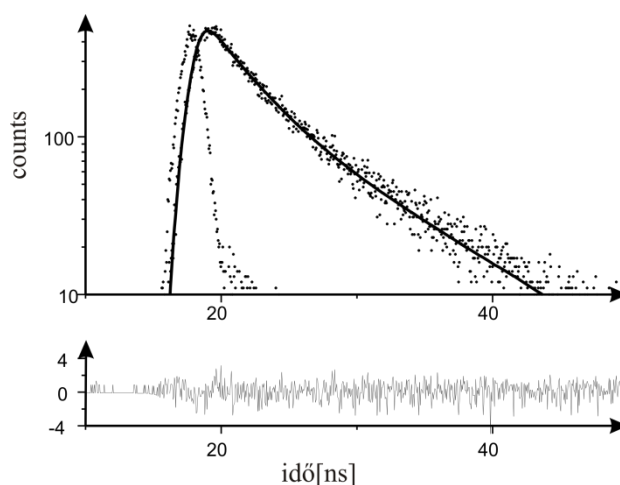
Forma	$\lambda_x(\text{nm})$	$w_x(\text{nm})$	$\lambda_x'(\text{nm})$	$w_x'(\text{nm})$	α_x	$\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
Szabad	423	17	415	41	1,32	$3,17 \times 10^5$
NP-hez kötött						
külső kötés	430	20	411	73	1,29	$2,29 \times 10^5$
interkaláció	446	19	411	109	1,59	$1,34 \times 10^5$

A kapott paraméterek csak kis eltérés mutatnak a DNS esetében kapott (11. táblázat), valamint az irodalomból ismert értékektől. Az egyes formák rekonstruált spektrumait és a bázispár/porfirin molarány függvényében meghatározott megoszlásaikat a 33. ábra foglalja össze.



33. ábra TMPyP szabad állapotú (folytonos vonal), és T7 NP-hez kötött formáinak (külső (- -) és interkalált (- - -)) rekonstruált abszorpciós spektrumai (A), és az egyes formák (szabad ($\square$), külső kötött ($\circ$), interkalált ($\blacktriangle$)) megoszlása a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében (B)

A TMPyP fluoreszcencia emissziós spektruma NP jelenlétében a DNS-nél illetve poláros oldószerben látott felhasadást mutat, ami feltehetően itt is valamely kötődés eredménye (nem szemléltetett adat).



34. ábra NP-hez kötött TMPyP ($r=27$) fluoreszcencia lecsengési görbéje, valamint az ezekre illesztett függvény. Az alsó grafikon az illesztéstől való eltérést mutatja.

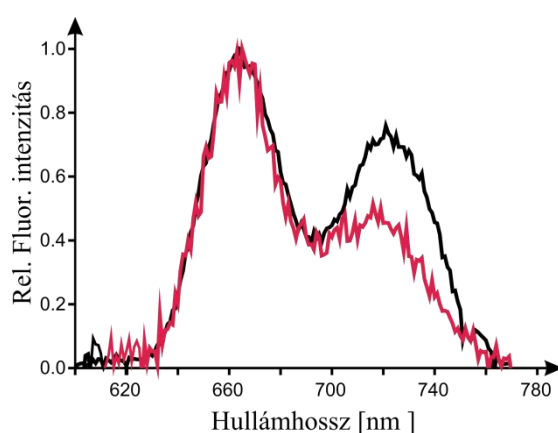
A TMPyP-NP komplex fluoreszcencia lecsengési görbéi (egy példáját mutatjuk a 34. ábrán) kis bázispár/porfirin arányoknál, de még $r=27$ -nél is három komponensre bonthatók; az ezekből meghatározott élettartamok egyike mindig a szabad TMPyP-re jellemző értéket adja (16. táblázat). Ez a komponens csak $r=40$ körül válik elhanyagolhatóvá. A legrövidebb – az irodalom szerint az interkalált formát mutató [159-161] – komponens hibahatáron belül azonos a NP és a DNS esetében. A harmadik, a leghosszabb élettartam komponens vélelmezhetően külső kötött formához tartozik, de szignifikánsan eltér az irodalmi [159-161] illetve a T7 DNS-hez való kötődéskor kapott értéktől (3. táblázat).

16. táblázat A TMPyP fluoreszcencia élettartamának komponensei és azok relatív mennyisége Tris-HCl pufferben (pH 7,4) NP jelenlétében különböző r értékeknél

Minta	r	τ_1 (ns)	%	τ_2 (ns)	%	τ_3 (ns)	%
TMPyP	0	$5,4 \pm 0,3$	100				
TMPyP	18	$5,4 \pm 0,5$	38	$7,3 \pm 0,3$	33	$2,3 \pm 0,4$	29
+ NP	27	$5,4 \pm 0,3$	12	$7,4 \pm 0,8$	44	$2,7 \pm 0,2$	44

A NP nukleotidbázisaival való interkaláció jelenlétére vonatkozó feltevést bizonyítja a TMPyP és a bázisok közötti energiatranszfer megléte, valamint a TMPyP-NP komplex CD spektruma is.

A TMPyP-NP komplex $\lambda=260$ nm-en történő gerjesztésének nyomán, a porfirin származék teljes kötődésekor ($r=40$) megjelenő fluoreszcencia spektrum normált alakját mutatja a 35. ábra. Összehasonlításként a TMPyP-DNS komplex hasonló körülmények ($r=8$) között felvett spektrumát is bemutatjuk. A két spektrum alakja és felhasadt sávok maximumhelye megfelel egymásnak és az irodalomban az interkalált forma jellemzőiként ismert értékeknek [159-161].



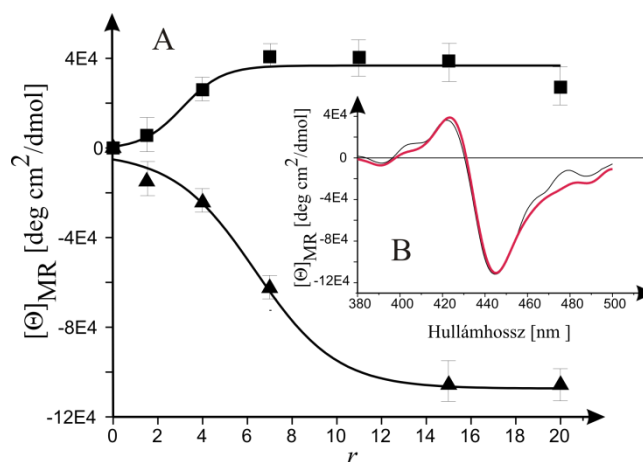
35. ábra A TMPyP normált emissziós spektruma ($\lambda_{em}=600-770$ nm; $\lambda_g=260$ nm) izolált T7 DNS ($r=8$) (fekete) és NP ($r=40$)(piros) jelenlétében, Tris-HCl pufferben; $C_{TMPyP}=2\mu M$

A TMPyP CD spektrumában a NP hozzáadása nyomán két sáv emelkedik ki a zajszintből; az r érték növekedésével amplitúdójuk nő. A sávok pozíciója megegyezik az izolált DNS jelenlétében látottakéval, amit a 36.B ábrán a két spektrum egymás melletti ábrázolása jól dokumentál.

Érdemes megemlíteni, hogy azonos TMPyP koncentrációnál maximális amplitúdójuk megegyezik, de ezt, ahogy azt a 36.A és 36.B ábra összevetéséből láthatjuk, nem azonos DNS illetve NP mennyiségeknél, vagyis nem azonos bázispár/porfirin molarányoknál érjük el a két rendszerben.

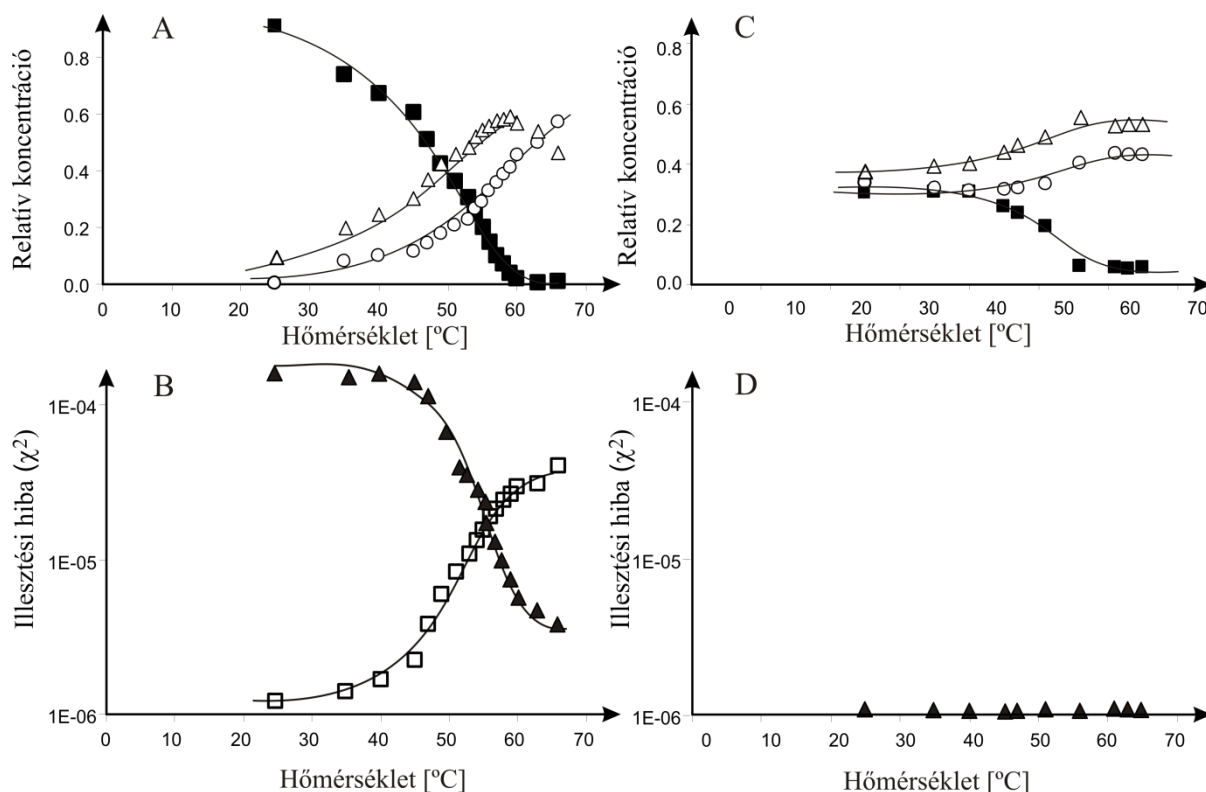
Ha a NP esetében a telítés értékre különböző módszerekkel kapott eredményeket összehasonlítjuk, azt látjuk, hogy az abszorpciós spektrumfelbontás és fluoreszcencia élettartamok alapján meghatározott értékek jó egyezést mutatnak, a telítési $r=40$ értékkel becsülhető. A moláris ellipticitás azonban $r \geq 10$ értéknél már nem változik szignifikánsan, sőt a két kötődési folyamat telítési értékének sorrendje sem azonos. A DNS esetében ilyen eltérést nem

tapasztaltunk a CD és az abszorpciós, illetve fluoreszcencia spektrumok elemzése alapján nyert eredményei között.



36. ábra (A) A moláris ellipticitás változása $\lambda=422$ nm-en (■) és $\lambda=448$ (▲) nm-en r függvényében a TMPyP CD spektrumában NP jelenlétében. (B) TMPyP CD spektrumai NP (piros) ($r=15$) és izolált DNS jelenlétében (fekete) ($r=6,6$) (Tris-HCl, pH 7,4)

A fentiek alapján a NP-ben is a polinukleotidban megjelenő kötési módokat lehet azonosítani, és ezeken kívül nem jelenik meg más kötési mód.



37. ábra A szabad TMPyP (■) és kötött formáinak (interkalált forma (O), külső komplex (Δ)) megoszlása a hőmérséklet függvényében T7 NP (A) illetve izolált DNS (C) jelenlétében, valamint a megfelelő spektrumillesztések hibái (B, D) a „NP paramétereket” (□) illetve a „DNS paramétereit” (▲) használva. Mindkét mintában $r=5$.

E feltevés ellenőrzésének egyik lehetséges módja a kötődés hőmérséklet függésének elemzése, illetve az azt leíró modellek érvényességének ellenőrzése 20 °C és 70 °C között. Mint ismeretes [232,269], ebben a hőmérséklet tartományban a használt ionerősségű oldatokban a B-konformációjú DNS szerkezete nem változik. A T7 nukleoprotein szerkezetében azonban 50 °C körül egy jellegzetes szerkezeti változás történik, a kapszid szerkezete fellazul, a kapszidban levő torzult B-konformációjú DNS egy része kitüremkedik, és a szabályos B-konformációjú polimer nagy valószínűséggel a kapszid külső környezetében helyezkedik el.

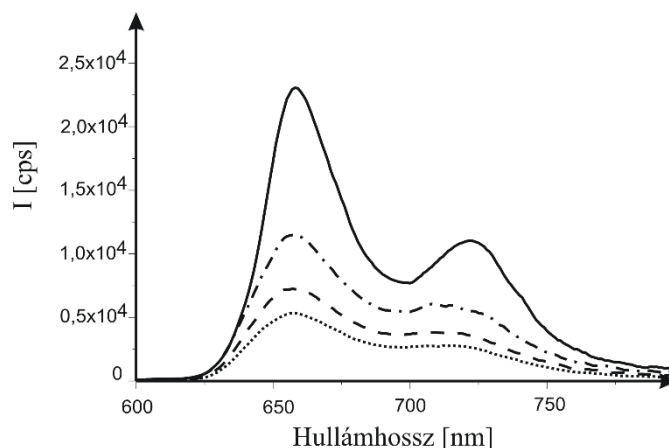
A 37.A ábrán látható, hogy a hőmérséklet emelésével a NP környezetében lévő szabad porfirin mennyisége csökken, 60 °C-nál eléri a teljes kötődést. A használt bázispár/porfirin aránynál ($r=5$) ez az izolált DNS-re jellemző telítési érték szobahőmérsékleten. Megfigyelhető továbbá, hogy a spektrumillesztés hibája (37.B ábra), amennyiben a korábban NP-hez kötött állapotok spektrumfelbontási paramétereit használjuk, nő a hőmérséklet emelkedésével, illetve a kötött állapotok átrendeződésével. Ugyanezekre a mintákra, a spektrumfelbontást a „DNS-paraméterekkel” elvégezve látható, hogy annak hibája ellentétes irányban változik.

Párhuzamos kísérletben, a TMPyP-DNS kötődését vizsgálva látható, hogy körülbelül 40 °C -ig a megoszlás közel állandó, de a hőmérséklet további emelkedése – ebben az esetben is – kedvez további kötött állapotok kialakulásának. A spektrumillesztések hibája a teljes hőmérséklet tartományban állandónak mutatkozik.

A TMPyP-T7 fág rendszer melegítésekor tapasztalt spektrális változások arra is utalnak, hogy a TMPyP polinukleotidot tartalmazó oldatának elnyelési színeképéből, annak a fent leírt módon való elemzésével meg lehet különböztetni a rendszerben a DNS torzult és natív B-konformációjú alakját. Mivel az illesztési hiba növekedése a bemutatott kísérletben folytonos volt, ezért – a DNS-nek csupán két, diszkrét állapotát feltételezve – felmerül a kvantitatív szerkezetvizsgálat lehetősége is.

5.2.2.2. A porfirin származék töltésének szerepe a kötődésben

A porfirin-DNS kötődéshez hasonlóan a porfirin-NP kölcsönhatással kapcsolatban is felmerül a porfirin származék töltéseinek illetve töltéseloszlásának szerepe.



38. ábra A $TP(4-OGluOH)_3P$ emissziós spektrumának vált ozása T7 bakteriofág hozzáadásakor (Tris-HCl, pH7,4); $c_{porfirin}=2\mu M$; fágpartikulumok koncentrációja 0 ($\cdots$), 0.025 ($----$), 0.05 ($.-.-.$), 0.25 ($—$) nM; $\lambda_{ex}=417$ nm.

A neutrális glikozilált porfirin származékok közül az aszimmetrikusan szubsztituált $TP(4-OGluOH)_3P$ fluoreszcencia intenzitása változik meg a NP jelenlétében (38. ábra). Spektrális eltolódást vagy átrendeződést azonban nem tapasztalunk sem az emissziós sem az abszorpciós spektrumokban (ábra nélküli adat).

A kationos porfirinek közül vizsgálataink itt is a DNS-kötődés kapcsán már bevezetett származékokra – TMPCP és BMPCP – terjedtek ki [234].

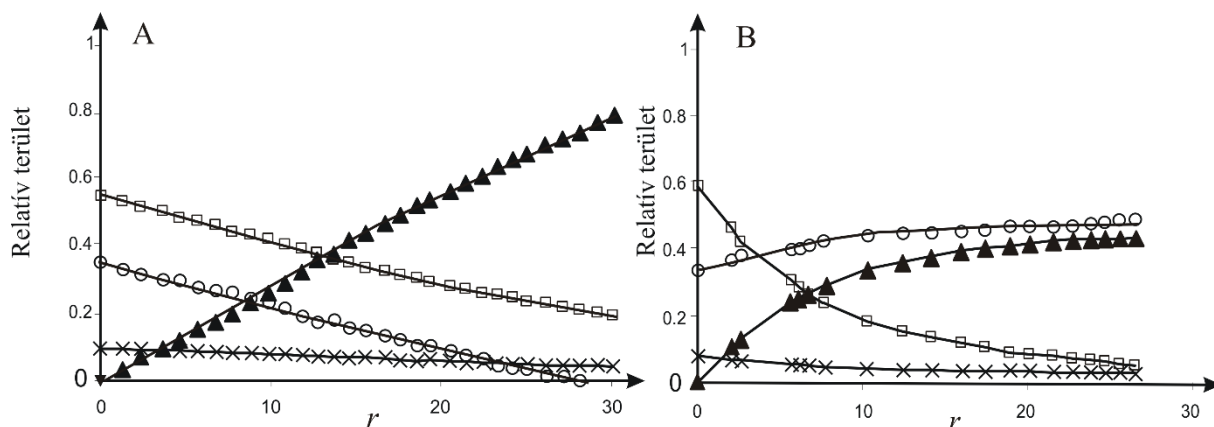
Elemeztük e származékok növekvő mennyiségű nukleoprotein komplexet tartalmazó oldatainak abszorpciós spektrumait. A TMPCP spektrumsorozatában látott változások jellege megfelel a kötődéskor fentebb leírtaknak (itt ábra nélkül). A spektrumfelbontások során ebben az esetben is két új abszorpciós sáv jelenik meg, ezek paramétereit a 17. táblázatban mutatom be.

A BMPCP kötődése a T7 NP-hez az alkalmazott spektroszkópai módszerekkel a vizsgált bázispár/porfirin molarányoknál nem volt kimutatható.

A TMPCP spektrumsorozatát olyan T7 bakteriofág oldat felhasználásával vettük fel, amelyet előzetesen 65 °C-ra melegítettük. A TMPyP példáján a (37. ábra) láttuk, ezen a hőmérsékleten a DNS „kiszabadulása” a kapszidból az izolált DNS-éhez hasonló kötődési feltételeket teremthet a porfirin számára.

17. táblázat TMPCP szabad és T7 NP-hez valamint előzetesen 65 °C-ra felmelegített T7 NP-hez kötött állapotainak abszorpciós spektroszkópai jellemzői $\lambda=370-490$ nm tartományban (Tris-HCl puffer, pH 7,4): az abszorpciós sávok maximumhelyei λ_i (nm) és a sávok szélessége w_i (nm). λ_i hibája < 1 nm, w_i hibája < 0,5 nm.

Vegyület	λ_1 (nm)	w_1 (nm)	λ_2 (nm)	w_2 (nm)	λ_3 (nm)	w_3 (nm)	λ_4 (nm)	w_4 (nm)
	közös váll		csúcs (szabad)		csúcs (kötött)			
TMPCP	401	17	422	17	429	25	434	30
TMPCP (65 °C)	401	15	422	19	429	26	444	24



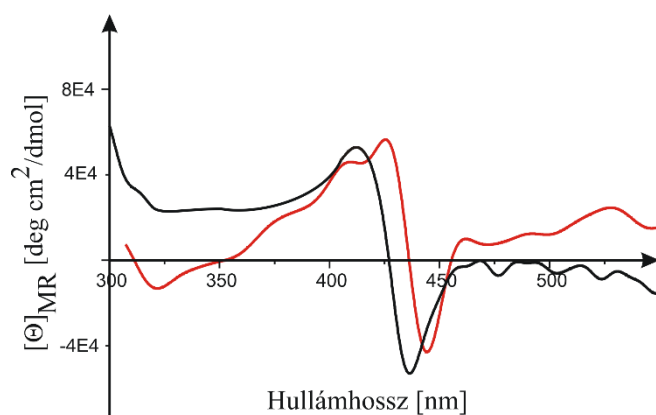
39. ábra A TMPCP abszorpciós sávjainak relatív területe a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében T7 NP-hez (A) és 65 °C-ra felmelegített T7 NP-hez (B) történő kötődéskor a sávok maximumhelyeinek pozíciója szerint (Tris-HCl puffer, pH 7,4). (A): 401 nm (x), 422 nm ($\square$), 429 nm ($\circ$), 434 nm ($\blacktriangle$); (B): 401 nm (X), 422 nm ($\square$), 429 nm ($\circ$), 444 nm ($\blacktriangle$).

Érdekes megfigyelni, hogy az illesztéssel nyert komponensek közül a kisebb vörös eltolódást mutató komponens maximumának hullámhossza ($\lambda=429$ nm) megegyezik a három – izolált DNS, NP, és a 65 °C-ra melegített NP – spektrumsorozatban. A nagyobb eltolódást mutató, interkalált formához rendelhető komponens maximumhelye szignifikánsan különbözik a NP ($\lambda=434$ nm) és a DNS illetve 65 °C-ra melegített NP jelenlétében felvett spektrumokban ($\lambda=444$ nm illetve $\lambda=446$ nm).

Az egyes komponensekhez tartozó görbe alatti területek, azaz az egyes kötött formák aránya változik a bázispár/porfirin molaránnyal mind a T7 NP mind a 65 °C-ra felmelegített T7 NP jelenlétében (39. ábra). Az NP (65 °C) (39. B ábra) jelenlétében regisztrált változás hasonló az izolált DNS-hez való kötődésnél látottakhoz, és értelmezhető a két kötött komponens mennyiségének növekedésével és a szabad TMPCP mennyiségének csökkenésével. T7 NP

kötődéskor (39.A ábra) az interkalált formaként értelmezhető komponens ($\lambda_{\max}=434$ nm) mennyisége ugyancsak nő r értékének növekedésével, de a $\lambda_{\max}=429$ nm-es komponens relatív mennyiségének csökkenése nem értelmezhető pusztán egy kötött forma koncentrációjának változásával.

A TMPCP – NP kötődéskor két kötött forma kialakulását támasztják alá a TMPCP indukált CD spektrumai (40. ábra) és a fluoreszcencia élettartam adatok is (18. táblázat).

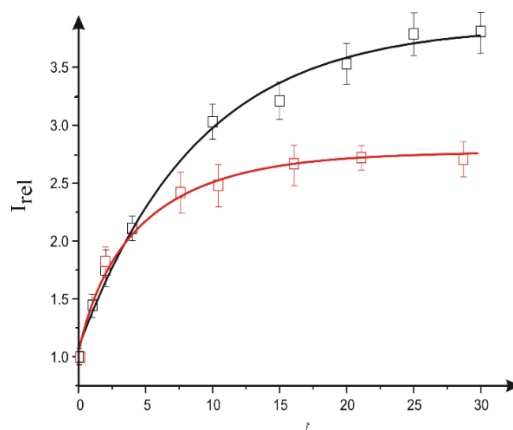


40. ábra TMPCP CD spektrumai T7 NP-hez (fekete) és 65 °C-ra felmelegített T7 NP-hez (piros) történő kötődéskor (Tris-HCl puffer, pH 7,4). A porfirin koncentráció 1 μ M, $r=30$.

18 táblázat A TMPCP fluoreszcencia élettartamának komponensei (τ [ns]) Tris-HCl pufferben (pH7,4) T7 NP-t illetve 65 °C-ra felmelegített T7 NP-t tartalmazó oldatában ($r=30$).

Minta	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
TMPCP + NP	$3,14 \pm 0,15$	$10,56 \pm 0,28$
TMPCP + DNS	$3,52 \pm 0,21$	$10,1 \pm 0,35$

A két kötött forma közül az interkaláció meglétét támasztja alá a megfelelő negatív sáv a CD spektrumban, és a kimutatható fluoreszcencia energia transzfer a nukleinsav és a porfirin között (40. ábra). Ezen túlmenően, mind az abszorpciós spektrum megfelelő komponens sávjainak (39.A, B, ábra), mind az energia transzfer révén detektálható fluoreszcencia intenzitásának alakulása a bázispár/porfirin arány függvényében (41. ábra) azt mutatja, hogy a fág struktúra kedvez az interkaláció kialakulásának.

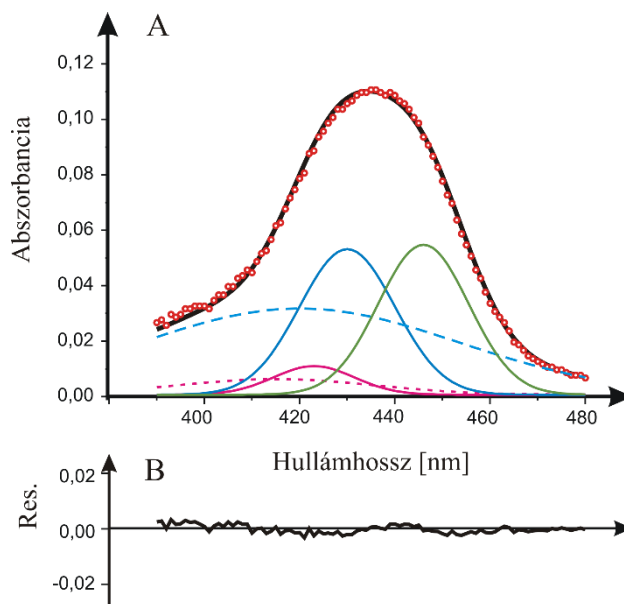


41. ábra (A) A TMPCP integrált fluoreszcencia intenzitása ($\lambda_{em}=600-770$ nm; $\lambda_g=260$ nm) T7 NP-hez (fekete) illetve 65 °C-ra felmelegített T7 NP-hez (piros) történő kötődéskor bázispár/porfirin molarány (r) függvényében (Tris-HCl puffer, pH 7,4). A porfirin koncentráció 1 μ M.

5.2.2.3. A kötött formák elemzése nukleoszóma esetén

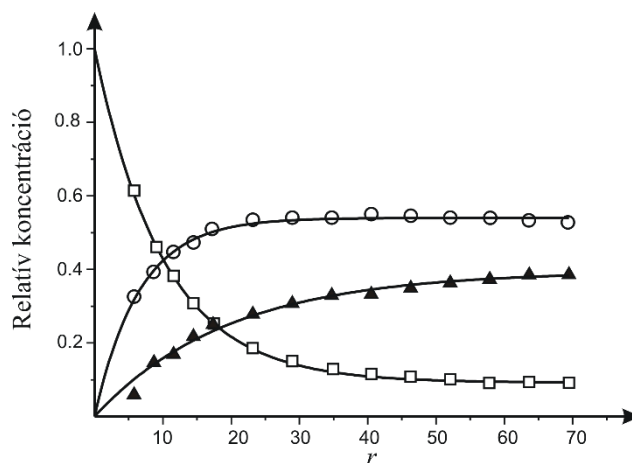
A modellként használt T7 nukleoprotein – TMPyP kölcsönhatás elemzése után szükségesnek láttuk annak tisztázását is, hogy eukarióta sejtekben előforduló nukleoprotein komplexek esetében hogyan módosul a DNS – porfirin származék kölcsönhatás. Az eukarióta sejtekben előforduló leggyakoribb nukleoprotein komplex a nukleoszóma. Esetünkben HeLa sejtekből izolált nukleoszómákat használtunk a kötődési folyamatok vizsgálatára.

Rögzítettük a TMPyP abszorpciós spektrumait különböző mennyiségű nukleoszóma jelenlétében. A relatív koncentráció meghatározásakor ismét a bázispár/porfirin molarányt, míg a spektrumok felbontásakor a T7 NP esetében kapott paramétereket használtuk. Az alkalmazott „NP modell”-t ” (15. táblázat) felhasználva, a nukleoszóma, mint nukleoprotein komplex esetében is megfelelő illesztési pontosságot kaptunk (42. ábra). Ebben az esetben sem volt szükséges további kötött formák beillesztésére a modellbe. Hasonlóan a T7 NP-hez, a fluoreszcencia és CD spektroszkópiai elemzések is a már korábban látott két kötött forma jelenlétére utaltak.



42. ábra (A) Nukleoszómát tartalmazó ($r=5,2$) TMPyP oldat (Tris-HCl pH7,4) abszorpciós spektruma (folytonos fekete vonal), és annak a NP modell paramétereinek alapján számolt komponensei: külső kötéshez tartozó csúcs(kék), interkalált formához tartozó csúcs(zöld), közös váll (szaggatott kék), szabad TMPyP csúcs (magenta), szabad TMPyP váll (szaggatott magenta), és a komponensekből rekonstruált spektrum ($\circ$). (B) Az eredeti és a rekonstruált spektrum eltérése.

Az egyes kötött formák mennyiségét a bázispár/porfirin arány függvényében a 43. ábra mutatja. Mint azt a fág NP esetében is láttuk, a fehérje jelenléte csökkenti a DNS-hez való kötődés lehetőségét. Jelentős különbség van ugyanakkor abban, hogy a NP hogyan befolyásolja az egyes kötött formák közötti megoszlást. A T7 fág kapszid fehérje csökkentette ugyan a kötött TMPyP mennyiségét a szabad DNS-en kapott értékhez képest, de azonos r értékeket összevetve szignifikánsan nem módosította a kötött formák közötti megoszlást.



43. ábra TMPyP egyes formáinak (szabad ($\square$), külső kötött ($\circ$), interkalált ($\blacktriangle$)) megoszlása a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében HeLa nukleoszóma jelenlétében

Megállapítható, hogy a nukleoszóma szerkezet preferálja a külső kötések kialakulását. Az összes többi esetben a tipikus interkalált/külső kötött arány a telítési értéknél közelítőleg 60/40, itt ez az arány azonban megfordulni látszik és 40/60 értékkel becsülhető. A telítési érték ugyanakkor közel azonos a T7 NP-nél látottal, és szignifikánsan magasabb, mint a nukleoszómából izolált DNS esetén.

5.2.3. A környezet ionerősségének és ionösszetételének hatása a kötődésre

A DNS-ligandum kölcsönhatásokat a környezeti ionerősség és ionösszetétel, a kétértékű ionok mineműsége és koncentrációja ismerten befolyásolja. Ennek alapja lehet, hogy kötődő ligandum esetén az ionerősség növekedésével csökken a DNS lineáris töltéssűrűsége. Emiatt a kötődés során a negatív polinukleotidhoz kötött pozitív ionok részben disszociálnak. Ez a folyamat alacsony ionerő mellett nagyobb entrópia-növekedéssel jár, ami a folyamatot termodinamikailag kedvezőbbé teszi. Nagyobb ionerősség mellett ez a hatás kevésbé jelentős, ezért az ionerősség növekedésével esetünkben várhatóan csökken az egy bázispárra jutó kötött porfirin származék mennyisége [143].

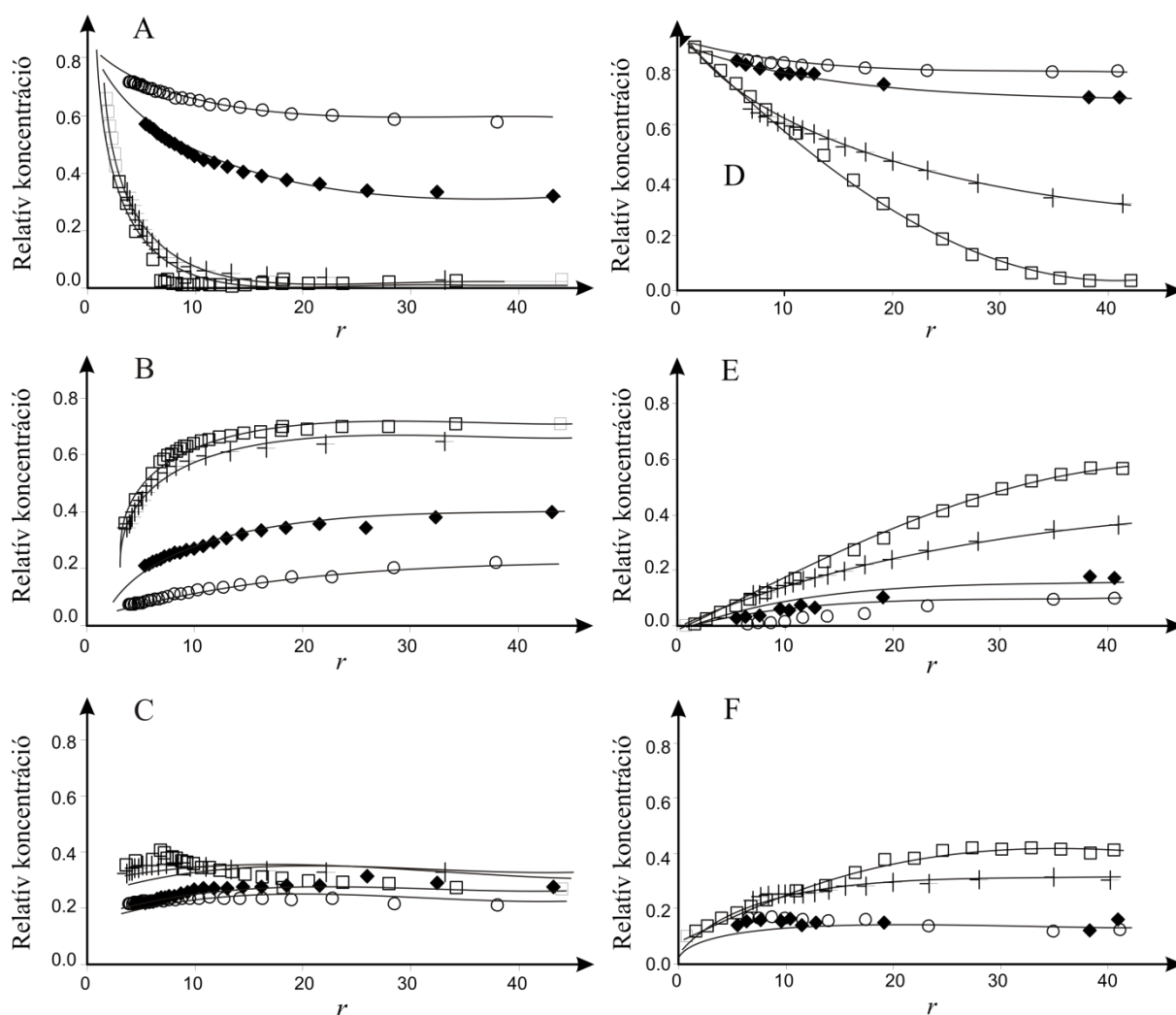
A várakozásnak megfelelően az ionerősség növekedésével a csak egyértékű ionokat tartalmazó Tris-HCl pufferben, egyébként azonos körülmények között csökken az összes kötött porfirin mennyisége (44. A és D ábra), mind izolált DNS mind pedig NP esetében. Az egyes kötésmódok közötti megoszlások összehasonlítása DNS- és NP-kötődéskor azonban árnyaltabb képet mutat.

A $I=68$ mM ionerősségű oldatban, mint fent is láttuk (25. ábra) $r=10$ értéknél már nincs jelen szabad TMPyP; ugyanez $I=135$ mM ionerősségű oldatban csak magasabb r értéknél ($r > 20$) érhető el. Az ionerősség tovább növelése drasztikusan csökkenti a kötött porfirin arányát, például $I=195$ mM esetében már csak az összes TMPyP 35%-a van kötött állapotban még $r = 70$ értéknél is.

A kötődés csökkenéséhez az egyes kötésmódok nem azonos arányban járulnak hozzá (44. B és C ábra). A DNS kis árok komplexek mennyisége szignifikánsan nem változik a vizsgált ionerősség tartományban; a kötött formák mennyiségének csökkenése teljes egészében az interkaláció csökkenéséből származik. Így $I=195$ mM ionerősségnél kiegyenlítetté válik a kötésmódok közötti megoszlás, $I=395$ mM ionerősségnél pedig már a külső kötött populáció dominanciáját látjuk.

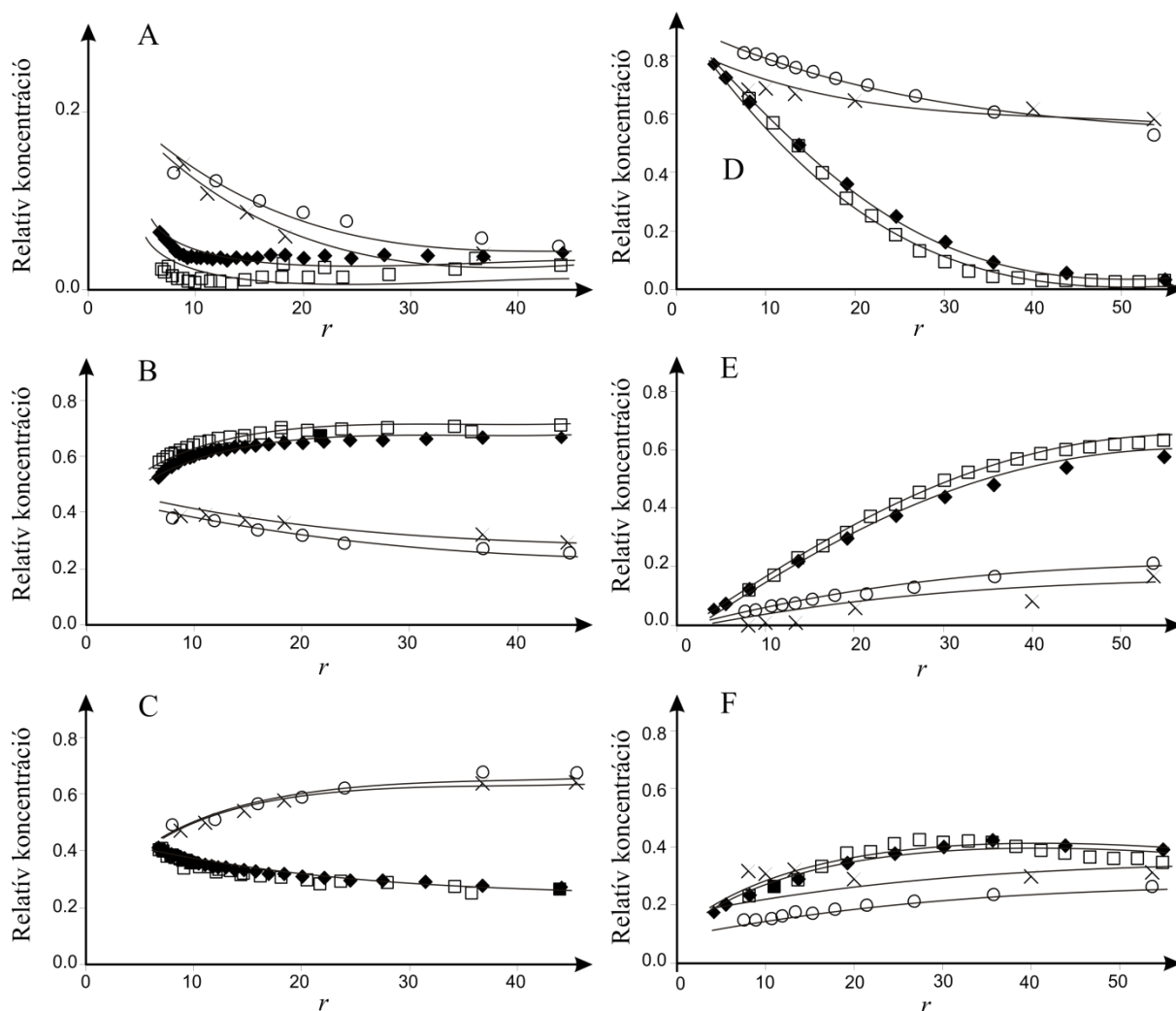
A TMPyP NP kötődését is gátolja az ionerősség növekedése, mindkét kötött forma mennyisége párhuzamosan csökken (44.D,E,F ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az

ionerősség növekedésével módosuló DNS-fehérje kölcsönhatások [270] szintén befolyásolhatják a TMPyP-DNS kötődést, különös tekintettel a külső kötések kialakulására.



44. ábra Az ionerősség hatása 4TMPyP kötődésére izolált T7 DNS-hez (A,B,C) és T7 nukleoproteinhez (D,E,F): szabad (A,D), interkalált (B,E) és külső kötött (C,F) porfirin relatív koncentrációja a bázispár/porfirin mólarány (r) függvényében 67 ($\square$), 135 (+), 195 ($\blacklozenge$) és 395 ($\circ$) mM ionerősségű Tris-HCl pufferben (pH7,4).

A kétértékű ionok jelenléte már kis koncentrációban is markánsan befolyásolhatja a 4TMPyP kötődését, a kötött formák közötti megoszlást. A kötött formák megoszlásának elemzését 1 mM alkáliföldfém (Ca^{2+} , Mg^{2+}) illetve átmeneti fém (Cu^{2+} , Ni^{2+}) iont tartalmazó I=68 mM ionerősségű Tris-HCl pufferben is elvégeztük. Habár a kétértékű ionok hozzájárulása az összes ionerősséghez csekély, hatásuk a kötődési folyamatra meghatározó lehet. A hatás mértéke azonban függ az ion típusától és attól is, hogy a DNS izolált vagy NP komplex formájában lép a kölcsönhatásba.



45. ábra Kétértékű ionok hatása 4TMPP kötődésére izolált T7 DNS-hez (A,B,C) és T7 nukleoproteinhez (D,E,F): szabad (A,D), interkalált (B,E) és külső kötött (C,F) porfirin relatív koncentrációja a bázispár/porfirin mólarány (r) függvényében 1 mM Mg^{2+} ($\square$), Ca^{2+} ($\blacklozenge$), Cu^{2+} ($\times$), Ni^{2+} ($\circ$) iont tartalmazó 67 mM ionerősségű Tris-HCl ($\text{pH}7,4$) pufferben.

A Ca^{2+} és Mg^{2+} jelenléte izolált DNS esetében nem módosítja számottevően sem a kötött 4TMPP mennyiségét, sem annak megoszlását az interkaláció és külső kötési mód között (45.A-C ábra). Az átmeneti fémionok ugyanilyen körülmények között magasabb érték felé tolják el a telítési bázispár/porfirin arányt ($r \approx 25$) és markánsan megváltoztatják a kötésmódok közötti megoszlást (45.B,C ábra), nevezetesen gátolják az interkalációt, és preferálják a külső kötődést. Mitöbb, a bázispár arány kezdeti növekedésével mintha átrendeződés menne végbe a kötött porfirinek között a külső kötési forma irányába.

A TMPyP és NP közötti kölcsönhatás kialakulását 1 mM Ca^{2+} és Mg^{2+} jelenléte szintén nem befolyásolja (45. D-F ábra). A Cu^{2+} , Ni^{2+} hatása még kifejezettebb, mint azt az izolált DNS-nél

megfigyeltük. A kötött formák összehasonlításából az is látszik, hogy a kötődés csökkenése elsősorban az interkaláció háttérbe szorításának eredménye.

5.3. A porfirin kötődésének hatása a DNS/NP termikus stabilitására

5.3.1. A DNS termikus stabilitása

Ismeretes, hogy a kettős szálú oligo- illetve polinukleotid felépülésekor csökken a nukleotid bázisok abszorbanciája a DNS-re jellemző elnyelési sávban. Ennek a hipokróm effektusnak az oka az egymással szomszédos bázisok delokalizált elektronjainak kölcsönhatása. A bázissíkok párhuzamos rendezettségének csökkenése éppen ellenkezőleg hat, növeli a rendszer abszorbanciáját. Ez a változás előidézhető például a hőmérséklet emelésével, ami a kettős szálú polinukleotid esetén a láncok szétválásához és feltekeredéséhez vezethet. Ezen a jelenségen alapul az úgynevezett abszorpciós „melting” módszer, a DNS abszorbanciájának ($\lambda=260$ nm) követése a hőmérséklet függvényében.

A DNS szerkezetének változása a láncszétválás hőmérséklettartományában a hipokróm/hiperkróm effektus mellett a DNS kiralitásának változásában is megmutatkozik. A láncok szétválása és feltekeredése a CD olvadási görbéken az adott hőmérséklettartományban jelentkező negatív csúcsot eredményez ($\lambda=280$ nm).

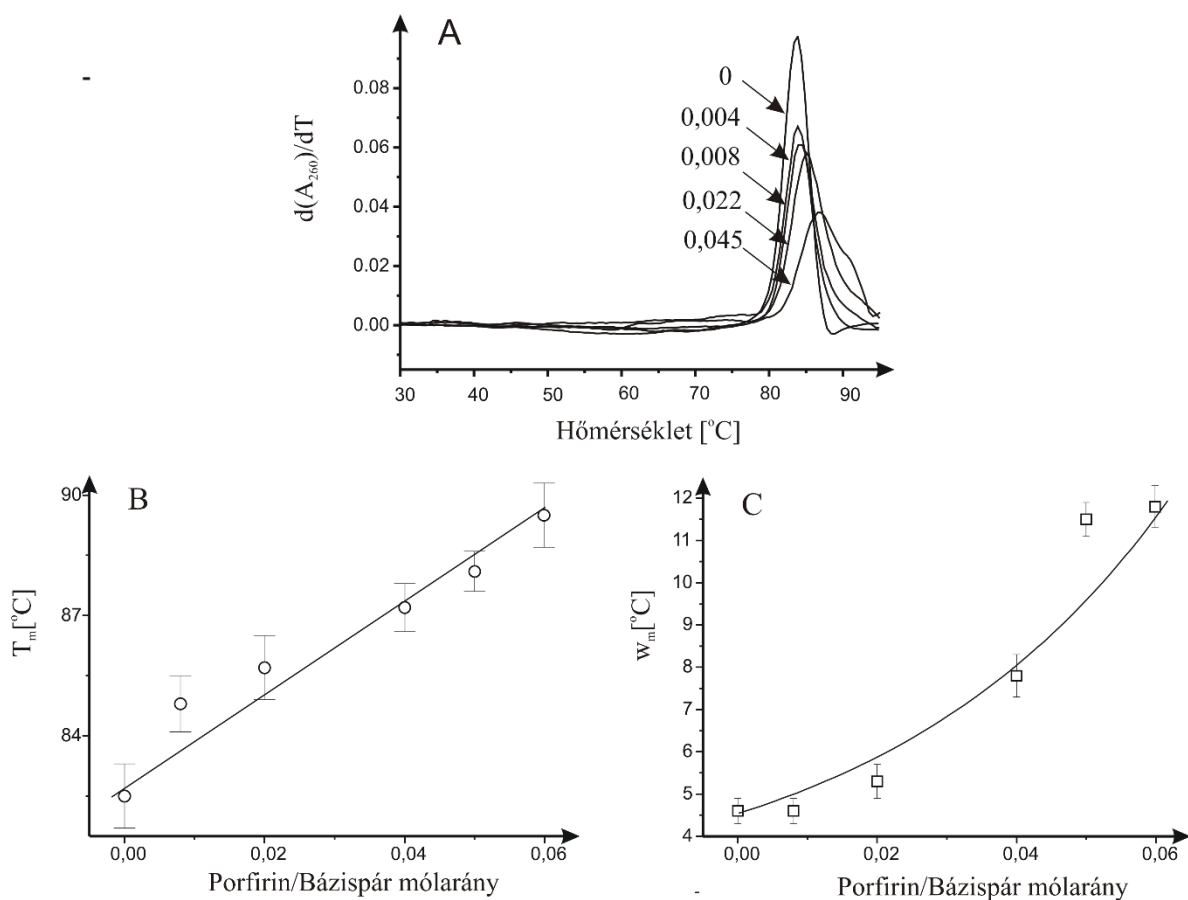
A fázisátalakulási (láncszétválási) hőmérséklet (T_m) függ a nukleotidlánc hosszától, bázisösszetételétől, de adott összetételű oligo- illetve polinukleotid esetén jellemző a szerkezet termikus stabilitására is. A láncszétválási hőmérsékletet a DNS különböző, inter- vagy intramolekuláris kölcsönhatásai csökkenthetik vagy növelhetik. Ezek alapján a módszer felhasználható a molekuláris kölcsönhatások kimutatásában és szerkezeti következményeinek tanulmányozásában.

A mezo-szubsztituált porfirin származékok jelenlétének a kettős szálú polinukleotid termikus stabilitására kifejtett hatását abszorpciós és CD olvadási görbék felvételével elemeztük – ha az ettől való eltérést a szövegben külön nem jelöljük – a T7 fágból izolált DNS felhasználásával.

A glikozilált porfirinek, tekintet nélkül a porfirinhez kapcsolt cukor komponens számára és szerkezetére, nem változtatták meg az izolált DNS láncszétválási hőmérsékletét [249]. Ez az eredmény összhangban van azzal a megfigyeléssel, amely szerint a glikozilált porfirinek fotofizikai jellemzői sem változnak meg a DNS jelenlétében.

A 46.A ábrán a DNS derivált olvadási görbéinek változását mutatom be egy reprezentatív példán TMPyP hozzáadása után különböző porfirin/bázispár molarányoknál. A mintákban a

DNS koncentrációja hibahatáron belül állandó. Meghatároztuk a derivált olvadási görbe maximumának (T_m) és félérték szélességének (w) változását a porfirin/bázispár arány ($1/r$) függvényében.

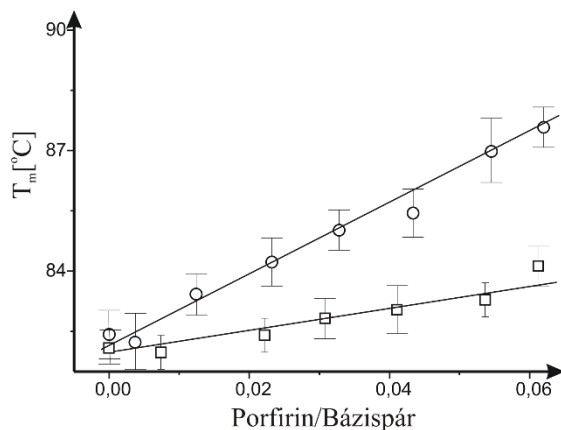


46. ábra (A) T7 fágból izolált DNS olvadási görbéinek első deriváltja TMPyP jelenlétében különböző porfirin/bázispár ($1/r$) arányoknál. (Tris-HCl puffer, pH 7,4). A bázispár koncentráció $12 \mu\text{M}$. Az $1/r$ értékeket az ábrán jelöljük. (B) A derivált görbék maximumának (T_m) és (C) félérték szélességének (w_m) eltolódása a porfirin/bázispár ($1/r$) molarány függvényében

Világosan látszik, hogy a TMPyP hatására a láncszétválási hőmérséklet emelkedik (46.A, B ábra), a porfirin kötődése stabilizálja a kettős helikális szerkezetet. A kötött porfirin származék mennyiségének növekedésével csökken a derivált görbék amplitúdója, nő a fázisátalakulás félérték szélessége (46.C ábra), azaz csökken a folyamatban részt vevő bázispárok kooperativitása. A mérési eredmények lineáris összefüggést mutatnak T_m és a porfirin/bázispár molarány között (korrelációs együttható $>0,95$; $p < 0,1\%$), ami arra utal, hogy a fázisátalakulási hőmérséklet változását interkaláció okozza.

A T7 DNS olvadási görbéin látottakhoz hasonló eltolódást, láncszétválási hőmérséklet és félérték szélesség növekedést láttunk, a HeLa nukleoszómából izolált DNS esetében is. A hasonlóság miatt ezeket a görbéket itt külön nem mutatjuk be.

A három illetve két pozitív töltést hordozó TMPCP és BMPCP jelenléte szintén növeli a DNS láncszétválási hőmérsékletét. A 47. ábrán bemutatott eredmények szerint a T_m értékek változása ebben az esetben is egyenesen arányos a porfirin/bázispár molaránnyal.



47. ábra (A) T7 fágól izolált DNS láncszétválási hőmérséklete a porfirin/bázispár (1/r) molarány függvényében TMPCP (○) és BMPCP (□) jelenlétében. (Tris-HCl puffer, pH 7,4). A mintákban a bázispár koncentráció $15 \pm 2 \mu\text{M}$.

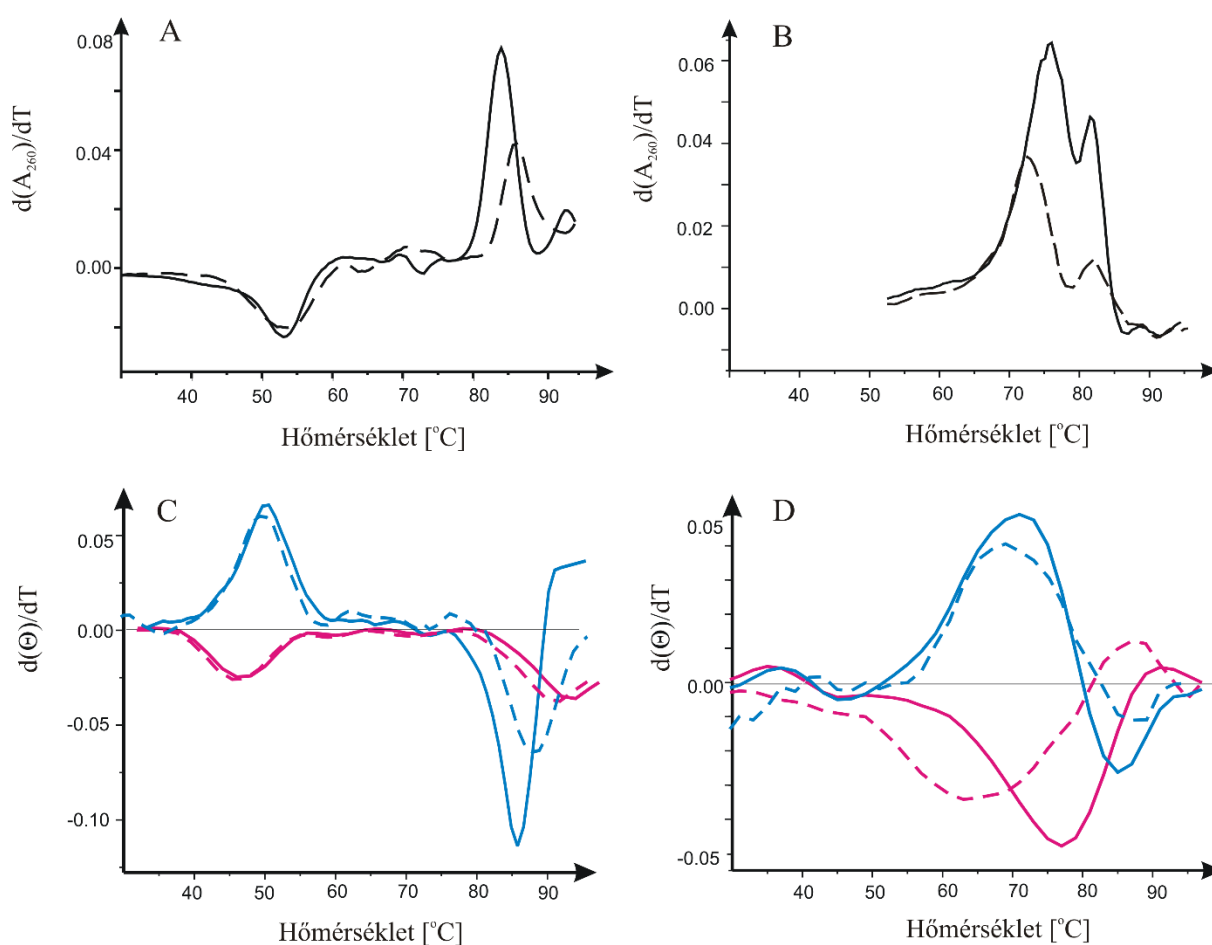
Ugyanakkor a mérési pontokra illesztett egyenesek meredeksége (46. B ábra és 47. ábra) markánsan különbözik a három különböző, négy, három illetve két pozitív töltést hordozó kationos porfirin származék esetében. Az azonos porfirin/bázispár molarányhoz tartozó hőmérséklet eltolódás a következő sorrendet követi: $\text{TMPyP} > \text{TMPCP} > \text{BMPCP}$, ami összhangban van az interkaláció korábban látott (5.2.1.1. és 5.2.1.3. fejezet) relatív valószínűségével.

5.3.2. A nukleoprotein termikus stabilitása

A T7 fág és a nukleoszóma abszorpciós olvadási görbéi ($\lambda=260 \text{ nm}$) összetettebbek, mint azt az izolált DNS-nél láttuk. A NP komplexek görbéiben világosan felfedezhető a kettős szálú polinukleotid láncszétválására jellemző hiperkróm sáv 85°C (T7 fág) illetve 75°C körül (nukleoszóma) (48.A,B ábra). Az olvadási görbék azonban NP komplexek esetében további sávokat is tartalmaznak. A T7 fág abszorpciós olvadási görbéjén a hiperkróm sáv mellett alacsonyabb hőmérséklet tartományban ($50\text{--}60^\circ\text{C}$ között) egy hipokróm sáv jelenik meg. A nukleoszóma abszorpciós olvadási görbéjén a DNS láncszétválásnak tulajdonítható sáv felhasad és kiszélesedik. Ezek a változások feltehetően a fehérje komponens szerkezeti változásainak tulajdoníthatóak. Ez a feltételezés azonban pusztán az abszorpciós görbék alapján nem igazolható.

Míg az abszorpciós olvadási görbék ($\lambda=260$ nm) alapján közvetlenül csak a DNS szerkezeti változásairól nyerünk információt, addig a CD olvadási görbék lehetővé teszik a DNS ($\lambda=280$ nm) és a fehérje ($\lambda=225$ nm) szerkezeti átalakulásának egymástól elkülönített vizsgálatát is (48.A,D ábra).

A T7 fág és a HeLa nukleoszóma abszorpciós olvadási görbéit a szokásos módon $\lambda=260$ nm-en rögzítettük (48.A,B ábra), míg CD olvadási görbéiket azonos összetételű mintákon a fehérje szerkezetének változásait mutató $\lambda=225$ nm-en és a DNS helicitásának változásait mutató $\lambda=280$ nm-en is regisztráltuk (48.C,D ábra)



48. ábra T7 fág (A,C) és HeLa nukleoszóma (B,D) abszorpciós (A,B) és CD (C,D) olvadási görbéi. A CD olvadási görbéken (C,D) a kék vonal a 280 nm-en, rózsaszín vonal a 225 nm rögzített adatokat mutatja. A folytonos vonalhoz tartozó görbék porfirin mentes, a szaggatott vonallal jelzett görbék TMPyP-t tartalmazó oldatokon rögzítettük. A nukleoprotein komplexek kezdeti optikai denzitása 0,3 (abszorpciós görbe) illetve 1 (CD görbe) volt. A porfirin/bázispár mólarány 0,22 (T7) illetve 0,2 (nukleoszóma) volt.

A T7 fág abszorpciós olvadási görbéjén 50 °C és 60 °C között egy hipokróm sáv látszik. Ezzel párhuzamosan a CD görbén $\lambda=280$ nm-nél egy pozitív, $\lambda=225$ nm-nél egy negatív sáv

jelenik meg. Fekete és mtsai [248] korábban ezt az átalakulási folyamatot kisszögű röntgenszórással vizsgálva azt állapította meg, hogy 60 °C körül az intrafág DNS szerkezetre jellemző szórási kép eltűnik, az intrafág DNS denzitása szignifikánsan lecsökken. Ezek, valamint saját eredményeink alapján azt feltételezhetjük, hogy a kérdéses hőmérséklet tartományban a kapszidot alkotó fehérjék rendezettsége (helicitása) csökken, a kapszid szerkezet fellazul, ami lehetővé teszi a DNS „kiszabadulását” a kapszidból. Ezt erősítették meg Vörös és mtsai [271] atomerő mikroszkóppal készült felvételei is. A szabaddá váló DNS az oldatban szokásos B-konformációt vesz fel.

A nukleoszóma abszorpciós olvadási görbéjének 60-80 °C közötti hiperkróm sávja összetett szerkezetű, láthatóan két átfedő sávra hasad. A fázisátalakulás folyamatát kalorimetriás módszerrel vizsgálva hasonló felhasadást írtak le korábban Bina és mtsai [272] ebben a hőmérséklet tartományban.

Az alacsonyabb hőmérsékletű maximummal megegyező hőmérsékletnél a $\lambda=280$ nm-en felvett CD olvadási görbe egy határozott pozitív csúcsot mutat, jelezve a DNS relaxációt. Az abszorpciós görbe magasabb hőmérsékletű csúcsával átfedően mind a $\lambda=225$ nm-en, mind a $\lambda=280$ nm-en regisztrált CD görbében egy-egy negatív sáv látható jelezve a hiszton szerkezet rendezettségének csökkenését és az egyszálú DNS feltekeredését. A nukleoszóma átalakulási folyamatában tehát előbb következik be a DNS letekeredése a hiszton fehérjékről, majd a hiszton fehérjék szerkezetváltozása és a DNS láncszétválása.

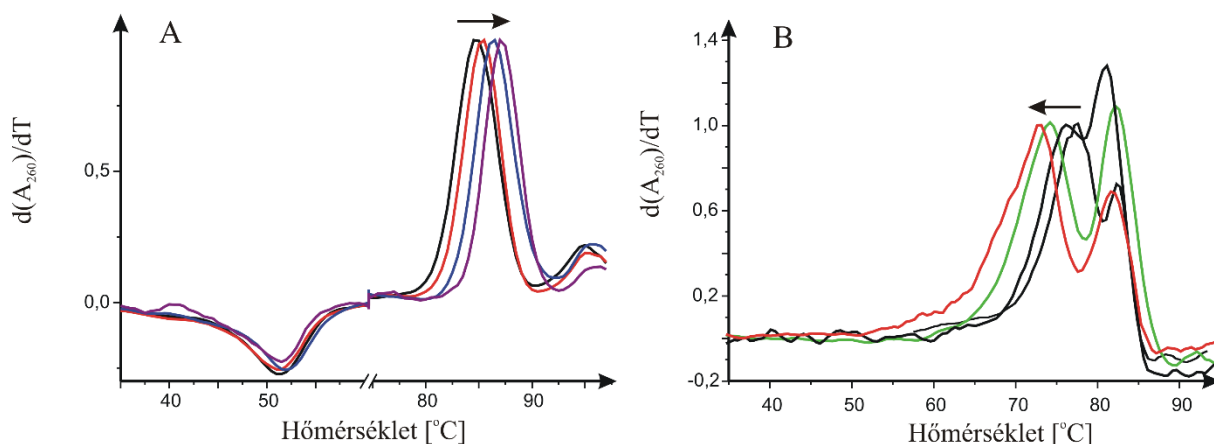
A 48.A és C ábra alapján látjuk, hogy a TMPyP jelenléte nem befolyásolja T7 kapszid fehérjék termikus stabilitását, nem változtatja meg az első fázisátalakulási lépés hőmérsékletét. A DNS láncszétváláshoz tartozó átalakulási hőmérséklet – az izolált DNS-hez hasonlóan – a NP komplexekben is szignifikánsan nő a TMPyP hatására, de a kooperativitásban változás nem mutatkozik.

A nukleoszómához kötődött TMPyP destabilizálja a hiszton-DNS kapcsolatot, ami a DNS első fázisátalakulási hőmérsékletének (70-75 °C) csökkenésében mutatkozik meg, és csökkenti a fehérje szerkezeti átmeneteihez tartozó hőmérsékleteket.

A TMPCP, a TMPyP-hez hasonlóan a növeli a T7 kapszidban elhelyezkedő (49.A ábra), míg csökkenti a nukleoszómát felépítő DNS (49.B ábra) láncszétválási hőmérsékletét. A láncszétválási folyamatban a kooperativitás egyik nukleoprotein esetében sem változik szignifikánsan a TMPCP jelenlétében.

Ugyancsak a TMPyP-hez hasonlóan, a három pozitív töltésű TMPCP nem változtatja meg a T7 hipokróm átmenetének paramétereit, azaz nem befolyásolja a kapszid stabilitását. A

nukleoszómában a fehérje-DNS kapcsolatra gyakorolt hatása nem egyértelmű, a fázisátalakulás hőmérsékletében nem mutatható ki szignifikáns, konzekvensen azonos irányú eltolódás.



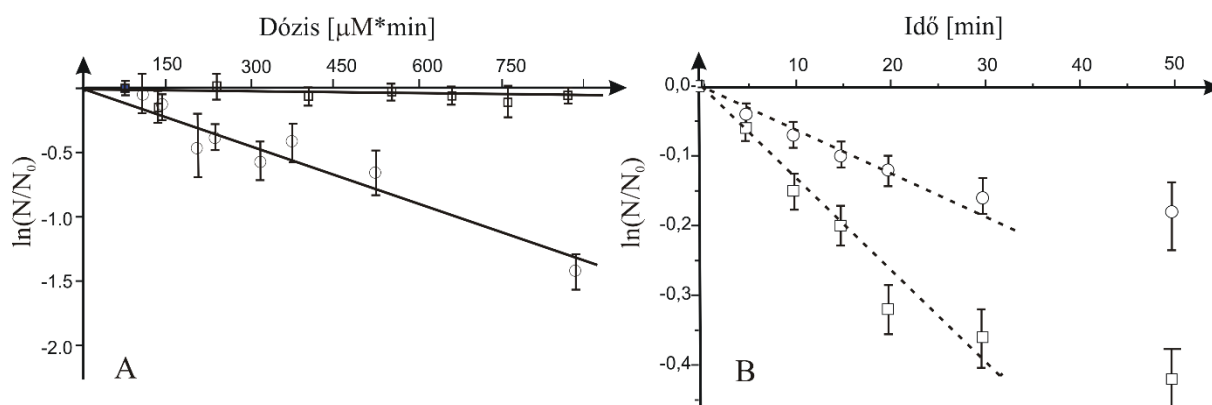
49. ábra T7 fág (A) és HeLa nukleoszóma (B) TMPCP-t tartalmazó oldatainak abszorpciós olvadási görbéi. A nukleoprotein komplexek bázispár koncentrációja $15 \pm 2,5 \mu\text{M}$ volt. A porfirin/bázispár molarány 0-0,26 (T7) illetve 0-0,22 között változott (nukleoszóma). A görbék eltolódási irányát a növekvő TMPCP koncentrációnak megfelelően az ábrán nyilak jelzik.

A két pozitív és két negatív töltést hordozó BMPCP nem változtatja meg sem a T7 fág, sem a HeLa nukleoszóma fázisátalakulási paramétereit.

5.4. Porfirin származékok genotoxicitása

Minden hatóanyaggal kapcsolatban alapvető információ a genetikai apparátusra gyakorolt hatás, az alkalmazás genotoxicitási kockázata [273]. A genotoxicitás mérésére a gyakorlatban több módszer ismeretes. Ezek között egy egyszerű, jól reprodukálható megközelítés a T7 bakteriofág, mint kromoszóma modell alkalmazása.

A kémiai ágensek, így a porfirin származékok kötődése a T7 bakteriofág komponenseihez a fág funkcionális sérülését okozhatják, azaz a kölcsönhatás a bakteriofág fertőzőképességének elvesztését eredményezheti. Ez pedig a hatóanyag, így például a porfirin származék genotoxikus hatását jelzi. Az inaktivációs görbe meredeksége alapján meghatározott genotoxicitási index (MI) [274] a genotoxikus hatékonyságra jellemző érték. A genotoxicitási indexet azzal a dózissal ($M_{\text{hatóanyag}} \cdot \text{min}$) definiálhatjuk, ami az aktív fágok számát e-ed részére csökkenti, azaz ahol $\ln(N/N_0)=1$. Minél kisebb MI értéke, annál nagyobb az adott hatóanyag genotoxicitási kockázata.

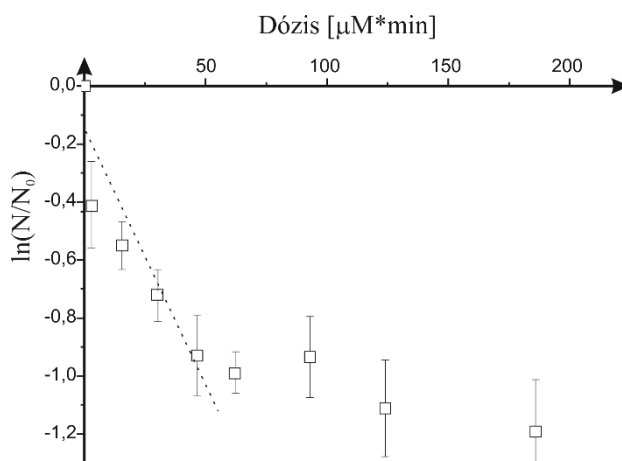


50. ábra T7 fág inaktivációja (A) a TP(4-OGluOH)₃P (o) és a TP(4-OGluOH)₄P (□) dózisának és (B) 2 μM (o) illetve 10 μM (□) koncentrációjú TP(4-OGluOH)₃P-val történő inkubáció során az inkubáció idejének függvényében. Az (A) ábrán mutatott mérésekben az inkubációs idő egységesen 30 perc volt. A szaggatott vonal az inaktivációs görbék kezdeti meredekségét jelzi. A fágpartikulumok koncentrációja 0.5 nM volt. (Tris-HCl, pH7,4)

Az 50. ábrán bemutatott eredmények alapján a TP(4-OGluOH)₃P csökkenti a fertőzőképes fágok számát [249]. A mezo-szubsztituált glikozilált porfirinek közül a TP(4-OGluOH)₃P-en kívül csak a TP(4-OGluOH)₄P okoz a hibahatárnál nagyobb mértékű fáginaktivációt, de MI értéke legalább 30-szor nagyobb, mint az aszimmetrikusan szubsztituált származéké.

A további glikozilált származékok nem mutattak a mérési hibahatárnál nagyobb inaktíváló hatást, vagyis MI értékük végtelennek tekinthető.

A kationos porfirinek mindegyike hatékonyabb a bakteriofág inaktivációjában, mint a TP(4-OGluOH)₄P. Ennek egy példáját látjuk a TMPyP esetére vonatkozóan (51. ábra);



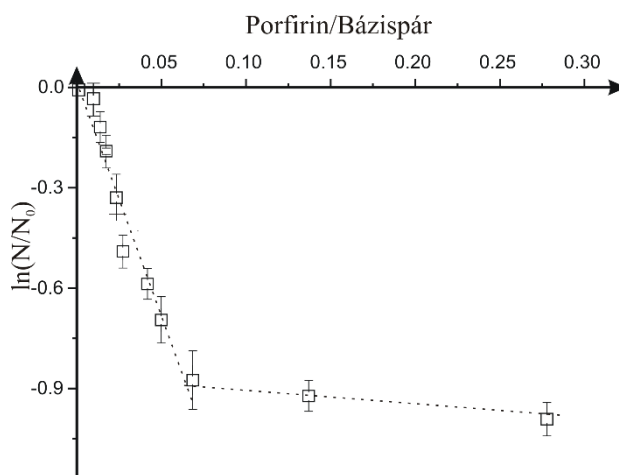
51. ábra T7 fág inaktivációja a TMPyP dózisának függvényében. A szaggatott vonal az inaktivációs görbe kezdeti meredekségét jelzi. A fágpartikulumok koncentrációja 0.5 nM volt, a bázispár koncentráció 2×10^{-5} M, az inkubációs idő egységesen 30 perc. (Tris-HCl, pH7,4)

az egyes vegyületek MI értékét a 19. táblázat foglalja össze. Az MI értékek összehasonlíthatósága érdekében azok meghatározásakor olyan kísérleti körülményeket használtunk, ahol a T7 bakteriofág koncentrációja a mintákban állandó volt.

19. táblázat Mezo-szubsztituált porfirin származékok genotoxiciási indexe ($MI \pm s$) ($\text{mól} \cdot \text{min}$)

Vegyület	MI ($\text{mól} \cdot \text{min}$)
TP(4-OgluOH) ₃ P	$7,4 \times 10^{-4} \pm 0,5 \times 10^{-4}$
TP(4-OgluOH) ₄ P	$> 2 \times 10^{-2}$
TMPyP	$4,8 \times 10^{-5} \pm 0,25 \times 10^{-5}$
TMPCP	$7,2 \times 10^{-5} \pm 0,38 \times 10^{-5}$
BMPCP	$1,5 \times 10^{-4} \pm 0,07 \times 10^{-4}$

Inaktivációs kísérleteinket megismételtük azonos porfirin és változó bakteriofág koncentrációjú minták sorozatán is (52. ábra). Eredményeink szerint az inaktiváció mértékét a porfirin származék abszolút koncentrációja mellett a porfirin/bázispár molarány is befolyásolja [238].



52. ábra T7 fág inaktivációja TMPyP hatására a porfirin/bázispár molarány függvényében. A szaggatott vonal az inaktivációs görbe kezdeti meredekségét jelzi. A bázispár koncentráció $0,5 \times 10^{-6}$ - 5×10^{-5} M között változott, az inkubációs idő egységesen 30 perc volt. (Tris-HCl, pH 7,4)

A 52. ábra a TMPyP különböző porfirin/bázispár arányoknál sötétben inkubált T7 fág inaktivációját mutatja, a T7 fág bázispár koncentrációja $0,5 \times 10^{-6}$ - 5×10^{-5} M között változott. A

bakteriofág előszáma 0,07 porfirin/bázispár arányig jelentősen csökkent, ezt követően a reakció hatékonysága $1/r$ növelésével nem bizonyult fokozhatónak. Tudjuk, hogy az $1/r = 0,07$, azaz $r = 14$ közelítőleg megfelel annak a bázispár/porfirin mólarányának, ahol a porfirinek kötődési folyamatai telítődnek (lásd 5.2.1.1 fejezet). Ennél nagyobb porfirin/bázispár mólarányoknál a szabad porfirin mennyisége növekszik, ami a bakteriofág sötét inaktivációjához már nem járul hozzá.

5.5 Porfirin-peptid konjugátumok kötődése természetes polinukleotidhoz és nukleoprotein komplexhez

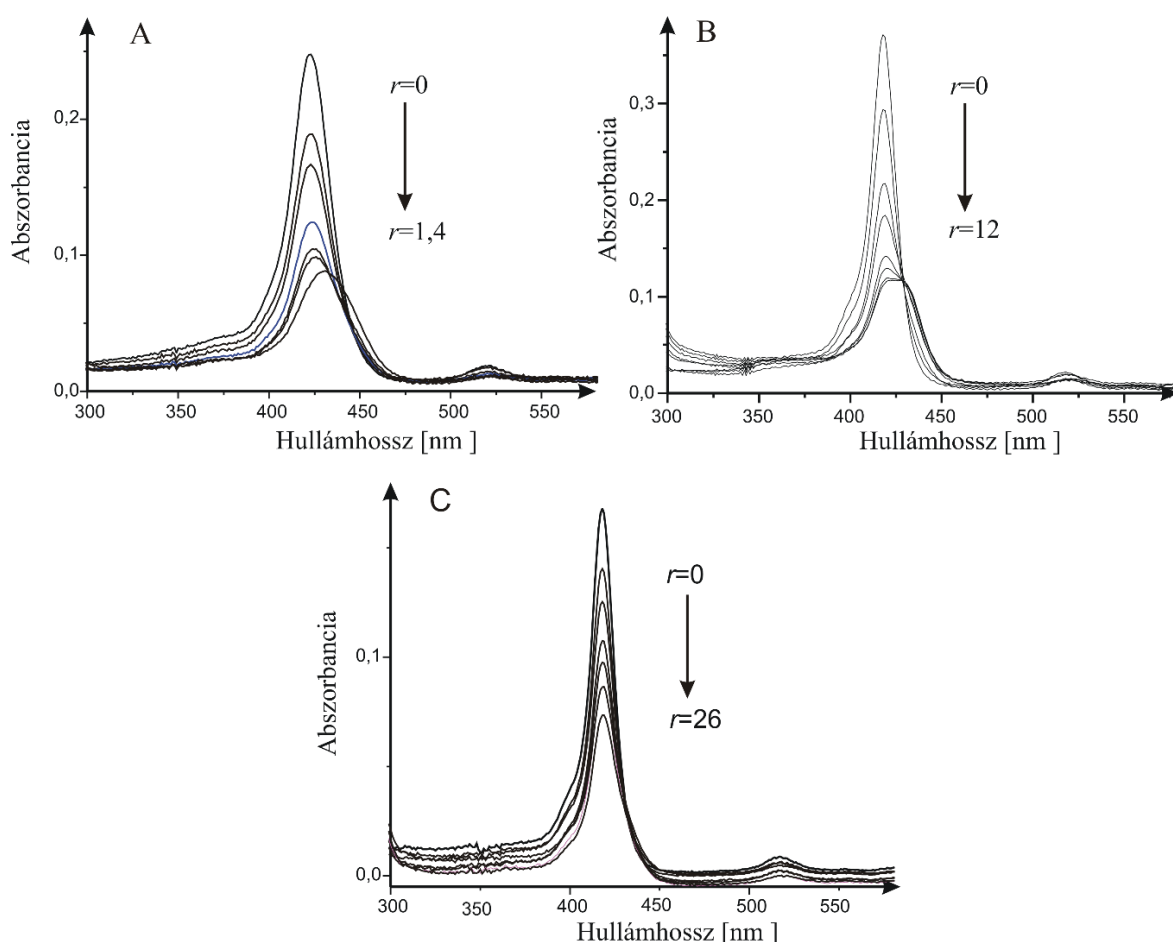
Az irodalomban számos példát látunk porfirinek és porfirin származékok természetes illetve szintetikus szerves vegyületek (pl. oligonukleotid, oligopeptid, monoszacharid, oligoszacharid) konjugátumainak előállítására [65,73,84,85,275]. A konjugátumok előállításának motivációja lehet a porfirin célzott sejtbejuttatásának elősegítése vagy sejten belüli lokalizációjának megváltoztatása. A kationos porfirin származékok és a nukleinsavak ismert kölcsönhatásának alapján ebben az esetben a konjugáció egy másik aspektusa is felmerül, nevezetesen a kationos porfirinekhez kapcsolt ligandumok eljuttatása a sejten belüli nukleinsav – például sejtmag DNS, mitokondriális DNS – környezetébe.

Munkánk során a kationos porfirinekhez kapcsolt peptid ligandumok célbejuttatásának lehetőségeit, feltételeit kívántuk vizsgálni. Ennek érdekében kationos porfirinek oligopeptid és polipeptid konjugátumait állítottuk elő. A konjugáció kémiai feltételei miatt a korábban részletesen tanulmányozott tetrakationos TMPyP közvetlenül nem alkalmas peptidkonjugátumok előállítására. Ezért egy három és egy két pozitív töltéssel rendelkező származékot, mezo-tri(4-*N*-metilpiridil)-mono-(4-carboxifenil)porfirin-t (TMPCP) és mezo-5,10-bis(4-*N*-metilpiridil)-15,20-di-(4-karboxifenil)porfirin-t (BMPCP) választottunk. E vegyületek egy illetve két, konjugálásra alkalmas karboxilcsoportot hordoznak. Ennek megfelelően a TMPCP-re egy, a BMPCP-re két peptid lánc kapcsolható. A TMPCP és BMPCP kötődését DNS-hez és nukleoprotein komplexhez a korábbi fejezetekben (lásd 5.2.1.3 és 5.2.2 fejezet) elemeztük.

Oligopeptidként egy tetrapeptidet választottunk (lásd anyag és módszer fejezet). A TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ (lásd anyag és módszer fejezet) alkalmas modelljei lehetnek porfirin-oligopeptid konjugátumoknak. Ezen túlmenően az itt használt tetrapeptid a 12. ábra szerinti alkotó egysége a széles körben használt polilizin gerincű elágazó láncú polipeptideknek (12. ábra). Az oligopeptidek mellett előállítottuk a TMPCP polipeptiddel képzett konjugátumát (TMPCP-AK, lásd 4.2. fejezet).

Vizsgáltuk az oligopeptid és polipeptid konjugátumok kötődési tulajdonságait izolált DNS-hez, nukleoprotein komplexhez, jellemeztük sejtbé jutásukat és követtük sejten belüli lokalizációjukat.

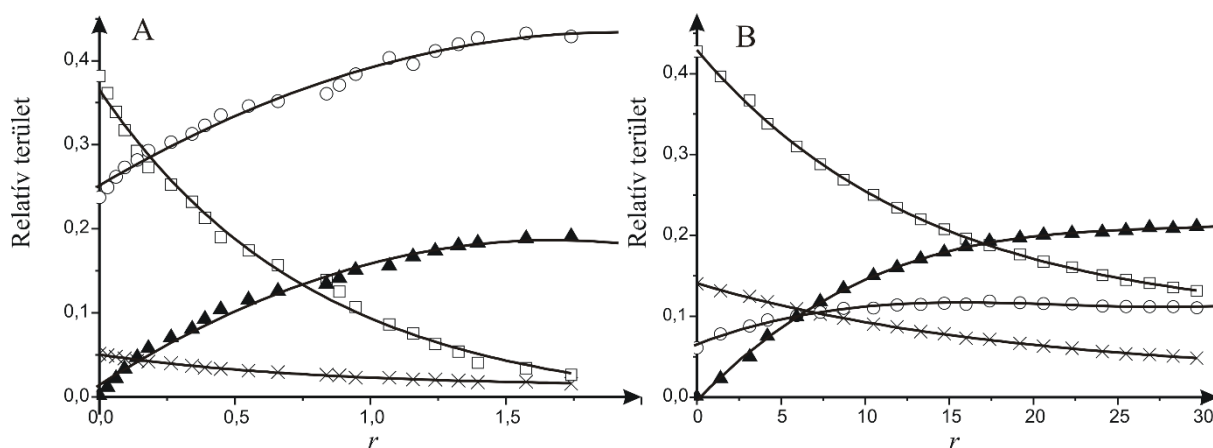
Szemléltetésül a három konjugátum izolált DNS-sel való titrálásakor regisztrált abszorpciós spektrumsorozatát mutatom az 53. ábrán. Mindhárom konjugátum elnyelési spektruma megváltozik a polinukleotid jelenlétében. A tetrapeptid konjugátumok (TMPCP-4P és BMPCP-4P₂) spektrumsorozatában mind a hipokrómiát, mind a vörös eltolódást felfedezhetjük. A polipeptid konjugátum (TMPCP-AK) spektrumsorozatában az utóbbi nem kifejezett. Ugyanakkor kötődéskor a spektrumokban a komponens sávok között a $\lambda=435$ nm-es maximummal rendelkező komponens is megjelenik, sőt ez az egyetlen sáv, amelynek területe nő a bázispár koncentráció növekedésekor. A spektrumsorozatok felbontásakor kapott komponensek maximum helyeit (λ_i nm) és sávszélességét a 20. táblázatban foglalom össze.



53. ábra TMPCP-4P (A), BMPCP-4P₂ (B) és TMPCP-AK (C) abszorpciós spektrumának változása izolált T7 DNS-hez való kötődés során (Tris-HCl, pH 7,4). Az első és utolsó spektrumhoz tartozó bázispár/porfirin arányokat az ábrákban látható r értékek, a spektrum változásának irányát a nyilak jelzik.

20. táblázat A porfirin-konjugátumok szabad és kötött állapotainak abszorpciósspektroszkópiai jellemzői $\lambda=370\text{-}490\text{ nm}$ tartományban (Tris-HCl puffer, pH 7,4): az abszorpcióssávok maximumhelyei λ_i (nm) és a sávok szélessége w_i (nm). λ_i hibája $<1\text{ nm}$, w_i hibája $<0,5\text{ nm}$.

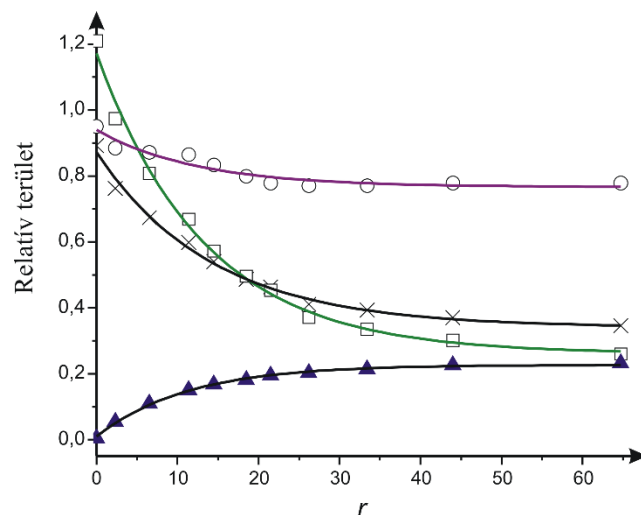
Vegyület	Partner	λ_1 (nm)	w_1 (nm)	λ_2 (nm)	w_2 (nm)	λ_3 (nm)	w_3 (nm)	λ_4 (nm)	w_4 (nm)
		közös váll		csúcs (szabad)		csúcs (kötött)			
BMPCP-4P ₂	DNS	407	17	418.5	11	429	11	435	16
	NP	410	23	418	9	422	14	426	23
	NP(65)	410	21	418	8	421	15	427	20
TMPCP-4P	DNS	402	15	422	17.5	429	25	446	25
	NP	403	15	422	16	427	25	435	27
	NP(65)	403	16	422	16	427	27	435	29
TMPCP-AK	DNS	407		418		421		435	



54. ábra A TMPCP-4P (A) és BMPCP-4P₂ (B) abszorpcióssávjainak relatív területe izolált DNS jelenlétében a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében a sávok maximumhelyeinek pozíciója szerint. TMPCP-4P: 402 nm (X), 422 nm ($\square$), 429 nm ($\circ$), 446 nm ($\blacktriangle$); BMPCP-4P₂: 407 nm (x), 418 nm ($\square$), 429 nm ($\circ$), 435 nm ($\blacktriangle$). (Tris-HCl puffer, pH 7,4)

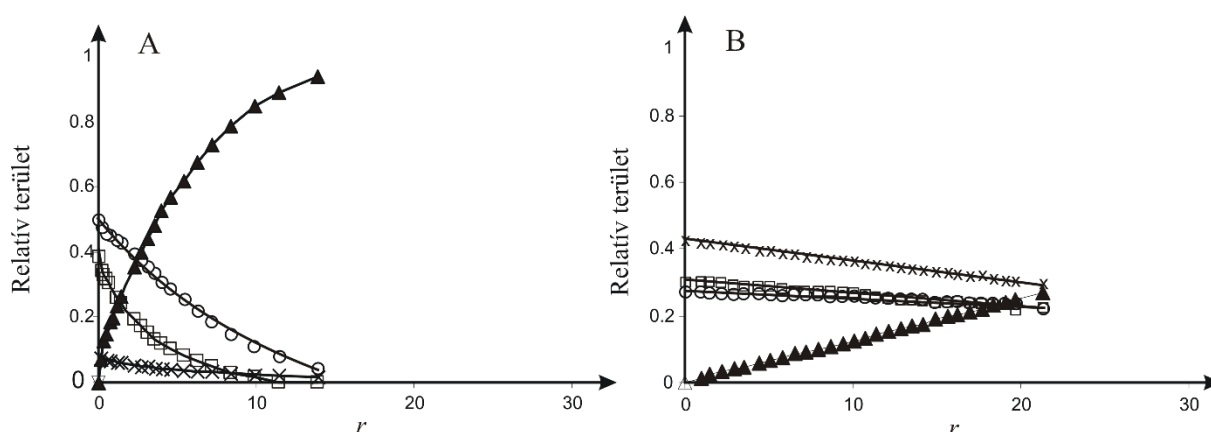
Látható, hogy akár csak az abszorpciósspektrum komponenseinek száma és maximumhelye, azok bázispár/porfirin molaránnyal mutatott változása is informatív a kötött formák számára illetve relatív mennyiségére vonatkozóan. Ennek alapján a két tetrapeptid konjugátum, a TMPCP-4P (54.A ábra) és a BMPCP-4P₂ (54.B ábra) két spektrumkomponense mutat

növekedést az r érték növekedésével, míg a TMPCP-AK konjugátum esetében (55. ábra) csak egy kötődésre utaló komponens jelenik meg. (Megjegyzem, hogy az ábrákon látható görbék csak a jobb követhetőséget szolgálják, illesztési paramétereik nem szolgáltatnak adatot a kötődésre vonatkozóan.)



55. ábra A TMPCP-AK abszorpciós sávjainak relatív területe izolált DNS jelenlétében a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében a sávok maximumhelyeinek pozíciója szerint: 407 nm (x), 418 nm (□), 421 nm, 435 nm (▲)(Tris-HCl puffer, pH 7,4)

Ugyanígy csak egy kötődési módra mutató sáv jelenik meg a tetrapeptid konjugátumok, (TMPCP-4P és BMPCP-4P₂) abszorpciós spektrumaiban nukleoprotein komplex jelenlétében (56.A és B ábra). A sáv pozíciója alapján nem dönthető el, hogy ez milyen kötött forma jelenlétére utal. A polipeptid konjugátum (TMPCP-AK) abszorpciós spektrumai nem mutatnak változást hasonló körülmények között (ábra nélküli adat).



56. ábra A TMPCP-4P (A) és BMPCP-4P₂ (B) abszorpciós sávjainak relatív területe NP jelenlétében a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében a sávok maximumhelyeinek pozíciója szerint. TMPCP-4P: 403 nm (X), 422 nm (□), 427 nm (○), 435 nm (▲); BMPCP-4P₂: 410 nm (X), 418 nm (□), 422 nm (○), 426 nm (▲). (Tris-HCl puffer, pH 7,4)

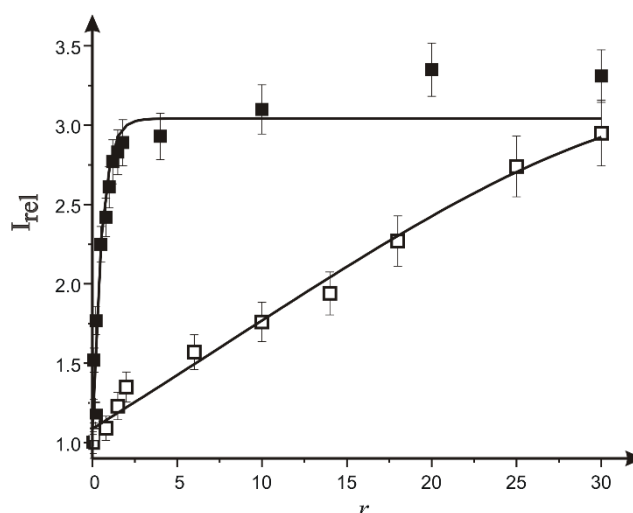
A kötődés további bizonyítéka lehet a fluoreszcencia élettartam megváltozása, kötött formákra jellemző lecsengési komponensek megjelenése (21 táblázat).

21. táblázat A BMPCP-4P₂ és TMPCP-4P fluoreszcencia élettartamának komponensei Tris-HCl pufferben (pH7,4) szabad állapotban, DNS, NP és NP(65 °C) jelenlétében (r=30).

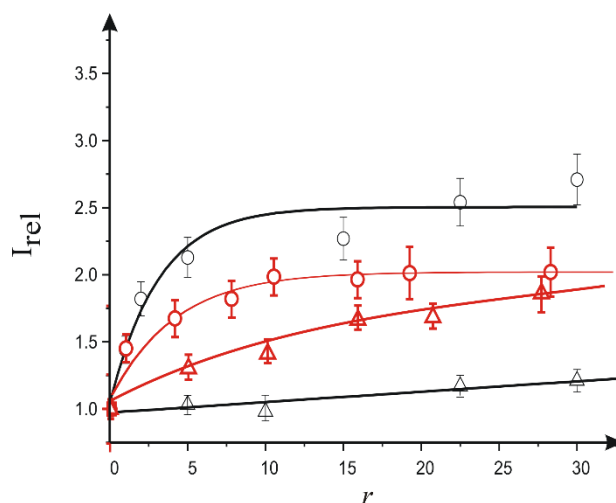
Vegyület	Partner	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
BMPCP-4P ₂	-	$8,99 \pm 0,28$	-
	DNS	$2,36 \pm 0,12$	$9,76 \pm 0,12$
	NP	-	$9,14 \pm 0,24$
	NP(65)	$3,08 \pm 0,19$	$10,25 \pm 0,27$
TMPCP-4P	-	$4,9 \pm 0,15$	
	DNS	$3,46 \pm 0,18$	$9,50 \pm 0,23$
	NP	$3,13 \pm 0,17$	$9,87 \pm 0,27$
	NP(65)	$3,19 \pm 0,25$	$9,74 \pm 0,19$

A BMPCP-4P₂ NP jelenlétében mono-exponenciális lecsengést mutat. A 21. táblázatban bemutatott többi esetben az élettartam komponensek két kötött forma meglétét támasztják alá.

A kötődés formáinak azonosítására a fluoreszcencia energia transzfer és a CD spektrumok vizsgálatát alkalmaztuk. A TMPCP-4P, mind DNS (57. ábra) mind NP (58. ábra) jelenlétében kifejezett fluoreszcencia intenzitás növekedést mutat a DNS elnyelési maximumán, $\lambda=260$ nm-en történő gerjesztéskor. NP esetében ez a növekedés kisebb, mint DNS jelenlétében, és még a NP 65 °C-előkezelése után sem éri el az izolált DNS jelenlétében látott értékeket. A BMPCP-4P₂ is akceptorként viselkedik izolált DNS és hőkezelt NP mellett, az intakt NP jelenlétében megjelenő fluoreszcencia intenzitás viszont nem bizonyító erejű az interkalációra nézve.



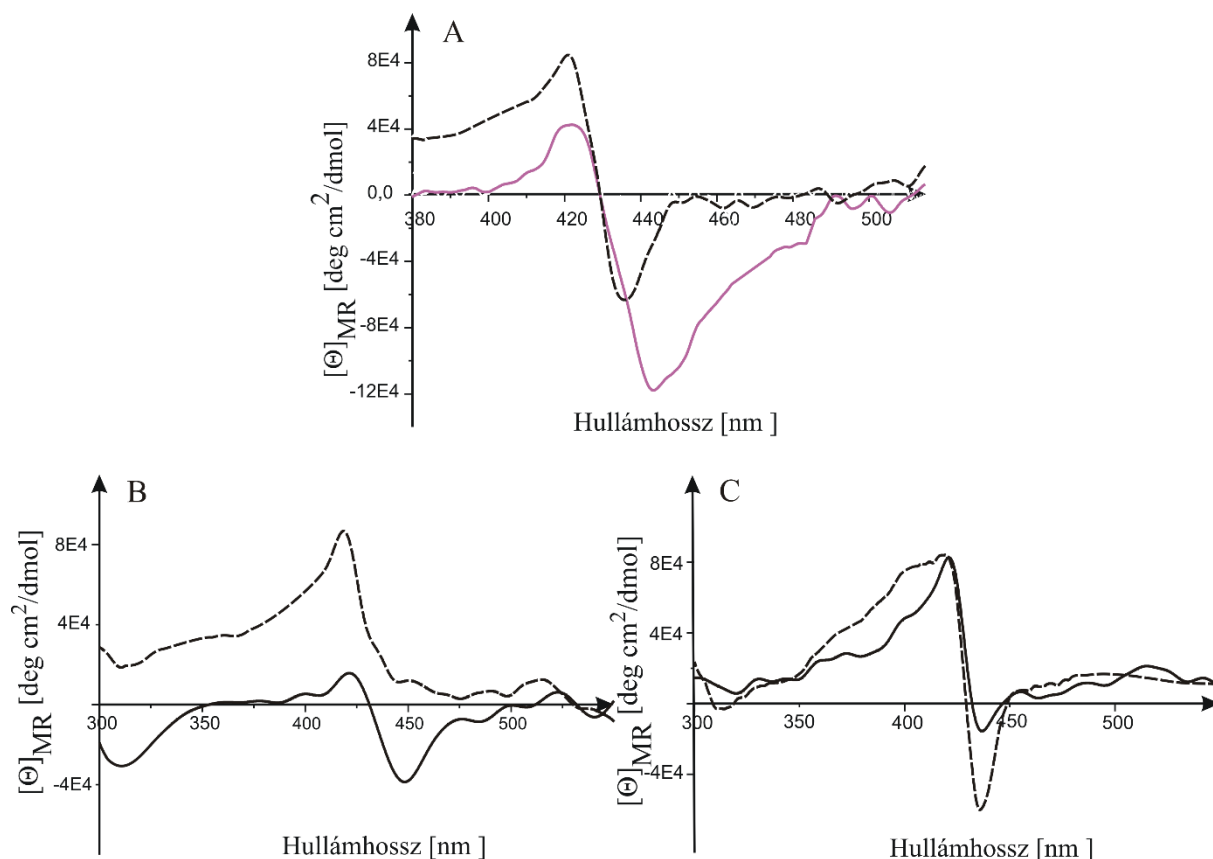
57. ábra (A) A TMPCP-4P (■) és BMPCP-4P₂ (□) integrált fluoreszcencia intenzitása ($\lambda_{em}=600-770$ nm; $\lambda_g=260$ nm) izolált T7 DNS bázispár/porfirin molarány (r) függvényében. (Tris-HCl puffer, pH 7,4)



58. ábra (A) A TMPCP-4P (○) és BMPCP-4P₂ (△) integrált fluoreszcencia intenzitása ($\lambda_{em}=600-770$ nm; $\lambda_g=260$ nm) T7 NP-hez (fekete) és 65 °C-ra felmelegített T7 NP-hez (piros) történő kötődéskor bázispár/porfirin molarány (r) függvényében. (Tris-HCl puffer, pH 7,4)

A fluoreszcencia élettartam és energiatranszfer adatokkal összhangban vannak a DNS illetve NP tartalmú oldatokban regisztrált porfirin származékok CD spektrumai (59. ábra). A TMPCP-4P CD spektrumai minden bemutatott körülmény mellett tartalmazzák a pozitív, és az interkalációra mutató negatív sávokat. A BMPCP-4P₂ spektrumában T7 NP jelenlétében nem jelenik meg a negatív sáv, de határozott a pozitív sáv a spektrumban.

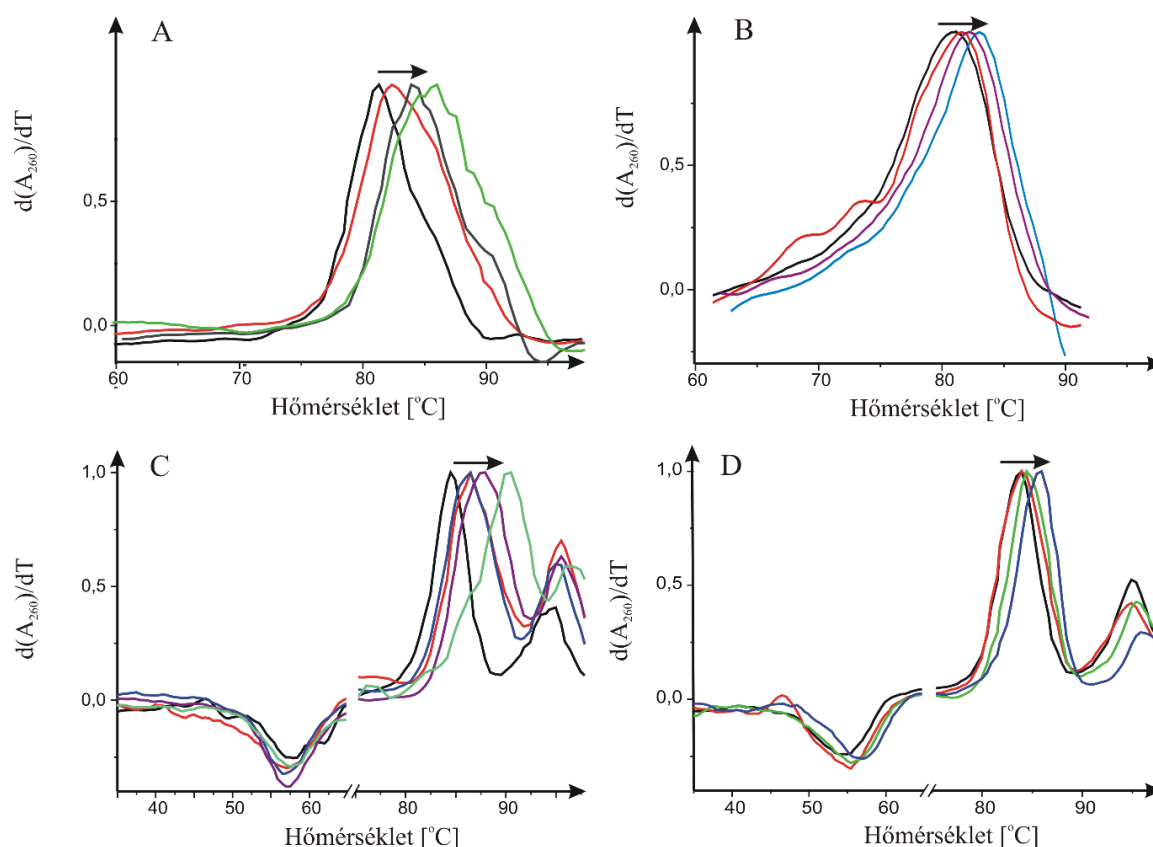
A TMPCP-AK polipeptid konjugátum esetében egyik módszerrel sem volt kimutatható az interkalált forma kialakulása.



59. ábra TMPCP-4P (folytonos vonal) és BMPCP-4P₂ (szaggatott vonal) CD spektrumai izolált DNS-hez (A) T7 NP-hez (B) és 65 °C-ra felmelegített T7 NP-hez (C) történő kötődéskor (Tris-HCl puffer, pH 7,4). A porfirin koncentráció 1 μM, $r=30$.

A DNS-en és a NP-en belüli ligandum-makromolekula kapcsolatokról adhatnak felvilágosítást az abszorpciós olvadási görbék (60. ábra).

Mindhárom peptid-konjugátum kötődése az izolált, B-konformációjú DNS-hez (Tris-HCl puffer, pH 7,4) növeli a láncszétváláshoz tartozó hőmérsékletet, azaz a konjugátumok stabilizálják a DNS szerkezetét (60.A és B ábra). Ha a fázisátalakulási hőmérsékleteket tekintjük a porfirin/bázispár ($1/r$) függvényében [276], a mérési pontokra illesztett lineáris függvény meredeksége jellemezheti a stabilizáló hatás mértékét. Az egyes kölcsönhatásokat jellemző egyenesek meredekségét a 22. táblázat mutatja.



60. ábra T7 fágból izolált DNS (A,B) és T7 fág (C,D) TMPCP-4P-t (A,C) és BMPCP-4P₂-öt (B,D) tartalmazó oldatainak abszorpciós olvadási görbéi. A minták bázispár koncentrációja $15 \pm 2 \mu\text{M}$. A porfirin/bázispár molarány 0-0,046 (A), 0-0,1 (B), 0-0,12 (C), 0-0,23 (D) között változott. A görbék eltolódási irányát a növekvő porfirin koncentrációnak megfelelően az ábrán nyilak jelzik. (Tris-HCl puffer, pH 7,4)

22. táblázat DNS láncszétválási hőmérséklet - porfirin/bázispár (1/r) molarány függvény meredeksége

Vegyület	Partner	Meredekség [°C*r]
BMPCP-4P ₂	DNS	22,72
	NP	3,3
	NP(65)	8,48
TMPCP-4P	DNS	80.58
	NP	30,4
	NP(65)	27,9
TMPCP-AK	DNS	9,23

A NP első, a kapszid fellazulásához köthető fázisátalakulási hőmérsékletet a TMPCP-4P és a TMPCP-AK konjugátum nem befolyásolja, sem az átalakulás hőmérsékletét, sem annak kooperativitását. A BMPCP-4P₂ tetrapeptid-konjugátum kismértékben megnöveli az átmenetbe tartozó hőmérsékletet, stabilizálja a kapszid szerkezetét illetve a fehérje-DNS kapcsolatot. A kapszidba zárt DNS fázisátalakulási hőmérsékletét a két tetrapeptid konjugátum növeli, míg a TMPCP-AK nem befolyásolja. A hatékonyságra jellemző meredekségeket szintén a 22. táblázat tartalmazza.

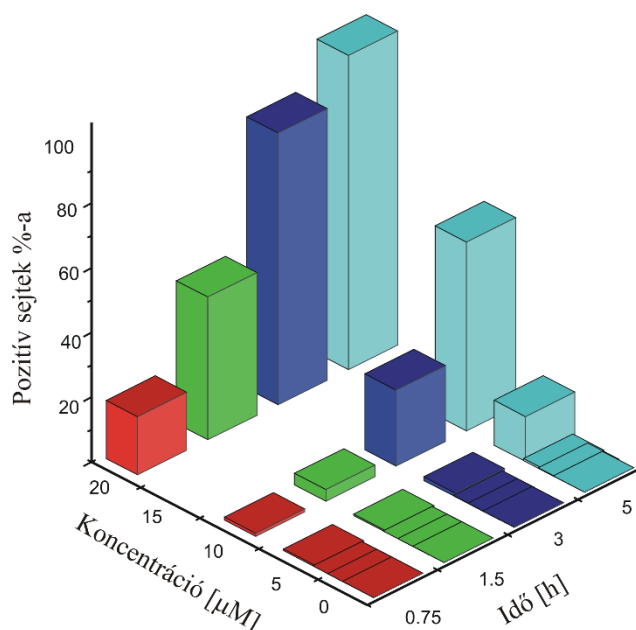
A tetrapeptid-konjugátumok stabilizáló hatása kifejezettebb az izolált DNS, mint a kapszidban elhelyezkedő DNS esetén. Ugyanakkor az is világos, hogy a fehérje kapszid csökkenti, de nem zárja ki a porfirin származék tartalmú konjugátum-DNS kölcsönhatás lehetőségét.

5.6. Porfirin származékok *in vitro* sejtfelvétele és sejten belüli lokalizációja

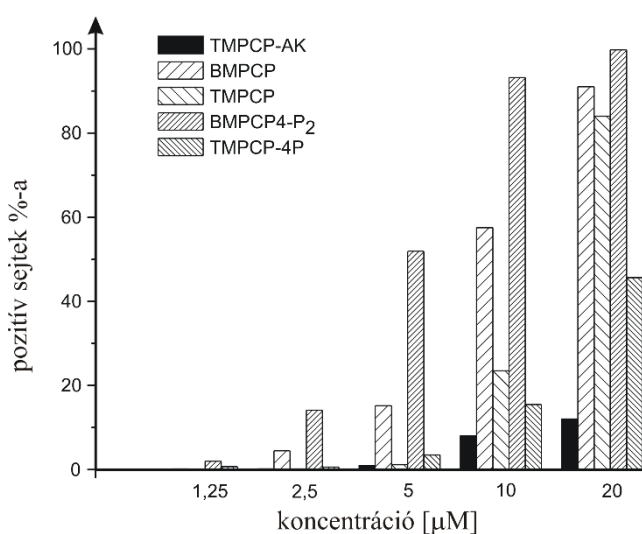
Annak, hogy a porfirin származékok illetve konjugátumaik a sejten belül kötődhessenek a nukleinsavakhoz előfeltétele bejutásuk a sejtbe. Ezért mielőtt a sejten belüli lokalizációt elemeznénk sejtbe jutásuk lehetőségét tanulmányoztuk.

A kationos porfirinek és konjugátumaik sejtfelvételét HL-60 sejteken vizsgáltuk. Áramlási citometriával meghatároztuk azoknak a sejteknek a relatív mennyiségét, amelyekben a porfirin származékokra jellemző fluoreszcencia megjelenése kimutatható volt [235]. Az egyes származékok/konjugátumok sejten belüli abszorpciós képessége és kvantumhatásfoka nem ismert, ezért pusztán a fluoreszcencia intenzitásuk összehasonlítása nem adna megbízható támpontot a porfirin származékok/konjugátumok sejten belüli mennyiségére vonatkozóan.

A 61. ábrán a TMPCP példáján mutatjuk meg, hogy a porfirin származék tápoldatbeli koncentrációja és az inkubálási idő miként befolyásolja a porfirin-pozitív sejtek arányát. Hasonlót tapasztaltunk a többi származékokra vonatkozóan is. Párhuzamos mérésekben ellenőriztük a porfirinek toxicitását a megfelelő koncentrációknál. A bemutatott körülmények között és vegyületek esetében a toxicitás elhanyagolható volt (ábra nélküli adat).



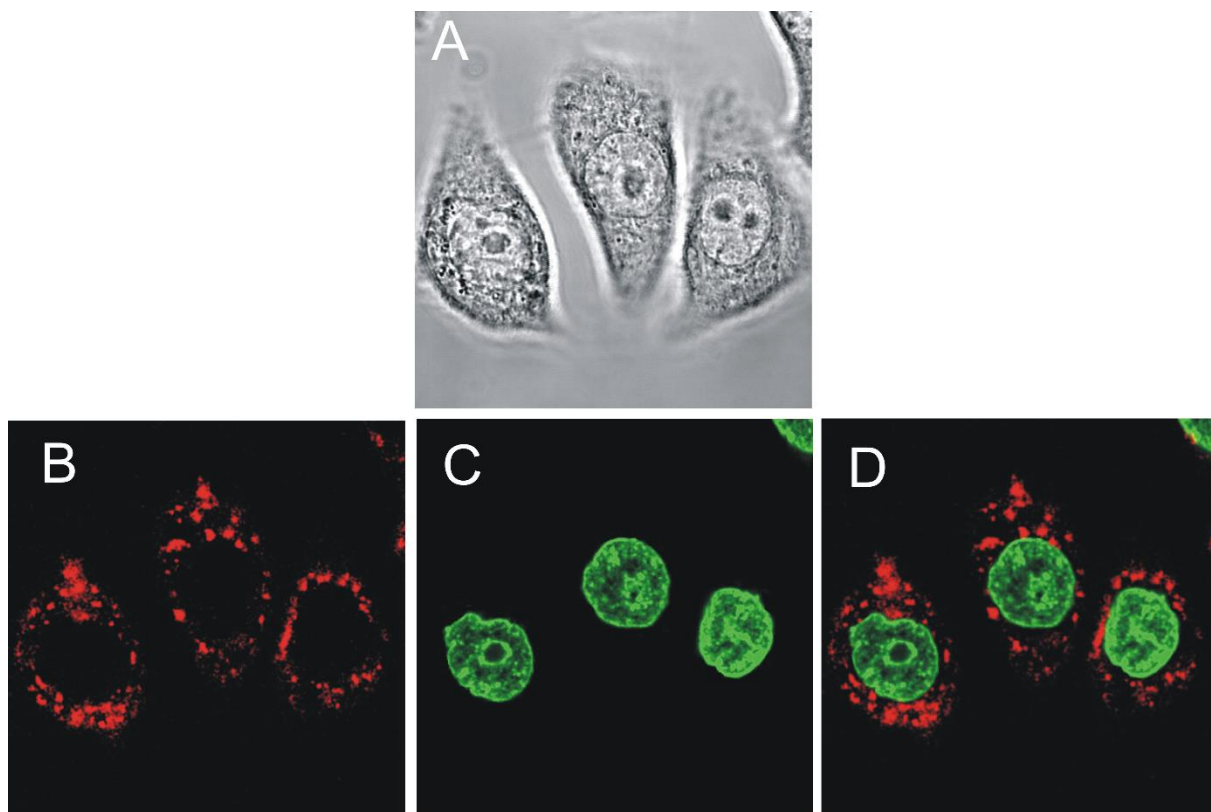
61. ábra TMPCP-pozitív sejtek aránya a porfirin koncentráció illetve inkubálási idő függvényében



62. ábra Porfirin-pozitív sejtek aránya a porfirin koncentráció függvényében 3 óra inkubálási idő után

A különböző származékok és konjugátumok jelenlétét mutató sejtek arányát 3 óra inkubációs idő után hasonlítottuk össze. Az eredményeket a 62. ábra foglalja össze. Ennek alapján markáns különbségek tapasztalhatók az egyes vegyületek között. A sejtfelvétel szempontjából kiemelkedő értéket mutat a BMPCP és annak tetrapeptid konjugátuma. A TMPyP jelenlétében 20 μM inkubálási koncentrációt alkalmazva, 3 óra inkubálási idő után a sejtek 65 %-a mutatta a porfirin jelenlétét (ábra nélküli adat).

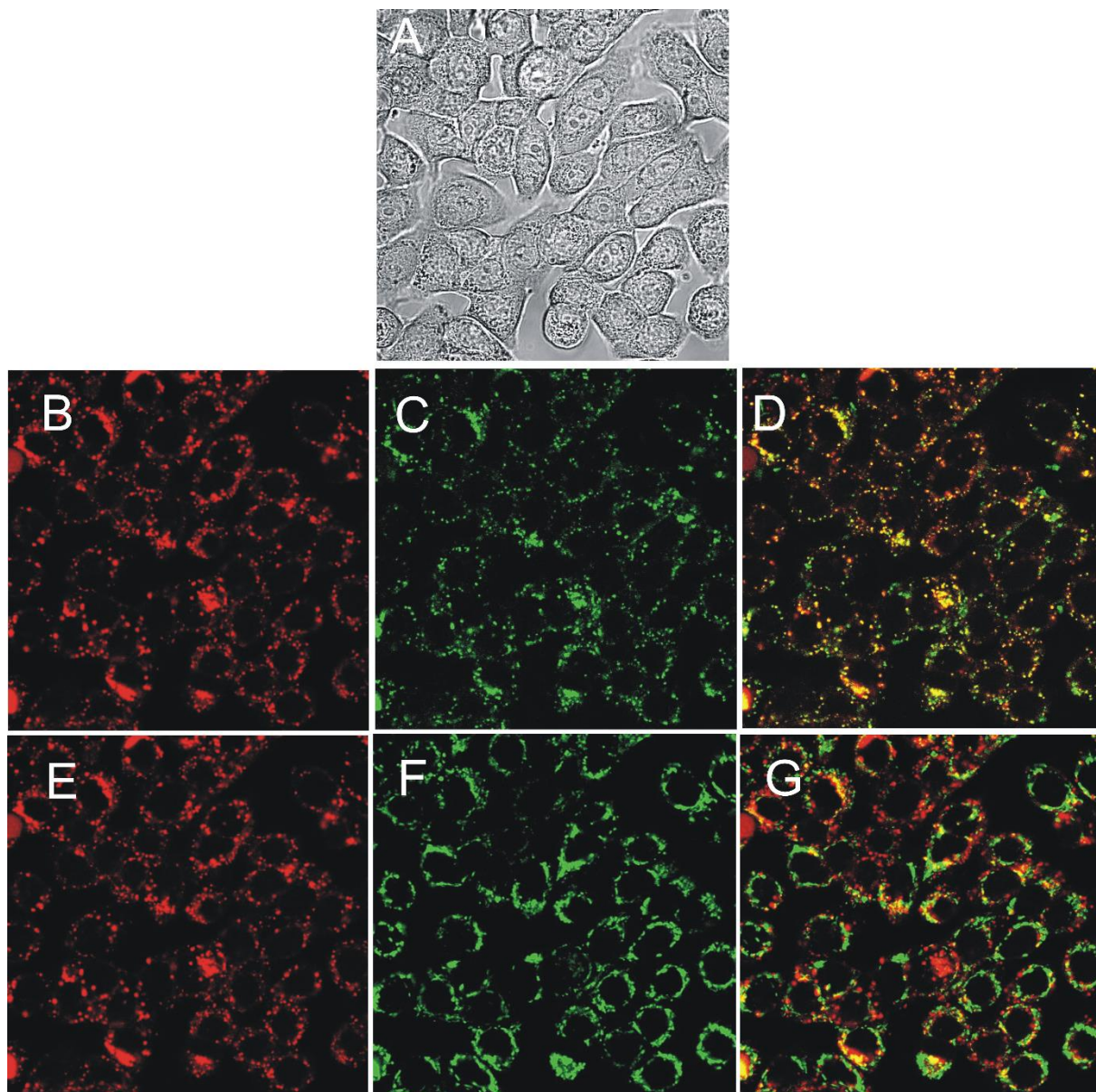
Meglepő módon az elágazó láncú polipeptid kapcsolása a porfirin származékhoz nem jelentett előnyt a sejtbe jutáskor [235], holott ezt a polipeptidet éppen a fokozott sejtpenetráció érdekében használják más esetekben [277]. Megjegyezzük, hogy az ábrán jelzetnél nagyobb koncentrációknál valóban tapasztaltunk fokozott sejtfelvételt, de a párhuzamosan megjelenő citotoxikus hatás miatt azoknak a koncentrációknak az alkalmazása már nem vehető számításba.



63. ábra A BMPCP-4P₂ és a sejtmag specifikus SYBR GREEN I festék lokalizációja. (A) Transzmissziós felvétel a HT-29-es sejtekről. (B-D) Konfokális felvételek: a BMPCP-4P₂ (B) ($\lambda_{em}=650-750$ $\lambda_g=488$ nm) és a SYBR GREEN I (C) ($\lambda_{em}=520$, $\lambda_g=488$ nm) lokalizációja. D: a BMPCP-4P₂ és SYBR GREEN I ko-lokalizációja. (Az inkubációs idő 3 óra (BMPCP-4P₂) illetve 30 perc (SYBR GREEN I) volt; a koncentrációk 20 μ M (BMPCP-4P₂) és 400 nM (SYBR GREEN I))

A fentiekben láttuk, hogy mind a vizsgált kationos porfirin származékok, mind azok tetrapeptid konjugátumai felhalmozódhatnak a sejtekben. A továbbiakban e vegyületek sejten belüli lokalizációját vizsgáltuk különös tekintettel arra a kérdésre, hogy a sejtmagon belül kimutatható-e jelenlétük, dokumentálható-e DNS-sel való kapcsolatuk? Mivel a sejtfelvételi eredmények alapján a BMPCP-4P₂ mutatta a legkedvezőbb értékeket, a vonatkozó eredményeket mutatom be.

A ko-lokalizációs vizsgálatokhoz a sejtmagot SYBR GREEN I ($\lambda_{em}=520$, $\lambda_g=488$ nm) festékkel jelöltük. A porfirin származék és a sejtmagot jelölő festék fluoreszcencia jelének elhelyezkedését hasonlítottuk össze (63 ábra). Mindkét fluorofór elhelyezkedése a sejtben



64. ábra A BMPCP-4P₂ (E,D,F,G) a lizoszóma specifikus LysoTracker Green festék (C és D) és a mitokondrium specifikus MitoTrackerfesték lokalizációja (F és G). (A) Transzmissziós felvétel a HT-29-es sejtekről. (B-G) konfokális felvételek: a BMPCP-4P₂ (B és E) ($\lambda_{em}=650-750$ $\lambda_g=488$ nm), LysoTracker Green (C) ($\lambda_{em}=633$ nm, $\lambda_g=488$ nm), és a MitoTracker (F) ($\lambda_{em}=665$ nm, $\lambda_g=510$ nm) lokalizációja. D: a BMPCP-4P₂ és a LysoTracker Green ko-lokalizációja; G: a BMPCP-4P₂ és a MitoTracker ko-lokalizációja (Az inkubációs idő 3 óra (BMPCP-4P₂) illetve 30 perc (fluoreszcens jelzők) volt; a koncentrációk 20 μ M (BMPCP-4P₂) és 50 nM (fluoreszcens jelzők))

világosan látszik. A két terület nem mutat átfedést, a SYBR GREEN I festékkell jelzett sejtmagban nem mutatkozik a porfirin-peptid konjugátumtól származó jel. Hasonló eredményt mutattak a BMPCP, TMPCP és TMPCP-4P sejten belüli eloszlásáról készült felvételek.

A sejtmagon kívüli lokalizációk részletesebb feltérképezéséhez a lizoszómákat illetve a mitokondriumokat jelöltük specifikusan felhalmozódó fluoreszcens festékekkel, LysoTracker Green-nel és MitoTracker-rel. A ko-lokalizációs vizsgálatok eredményeit ismét a BMPCP-4P₂-vel jelzett sejtekről készült felvételekkel demonstrálom (64. ábra). Az ábrán a ko-lokalizációt a sárga szín mutatja.

A BMPCP-4P₂ mutat ko-lokalizációt mindkét jelzővel, de ez sokkal kiterjedtebb a lizoszómákat jelölő LysoTracker festék esetében. A BMPCP, TMPCP és TMPCP-4P is hasonló tendenciájú eloszlást mutat. A lizoszóma számára mutató preferencia legkifejezettebb a TMPCP esetében.

5.7. Porfirin származékok fototoxicitása

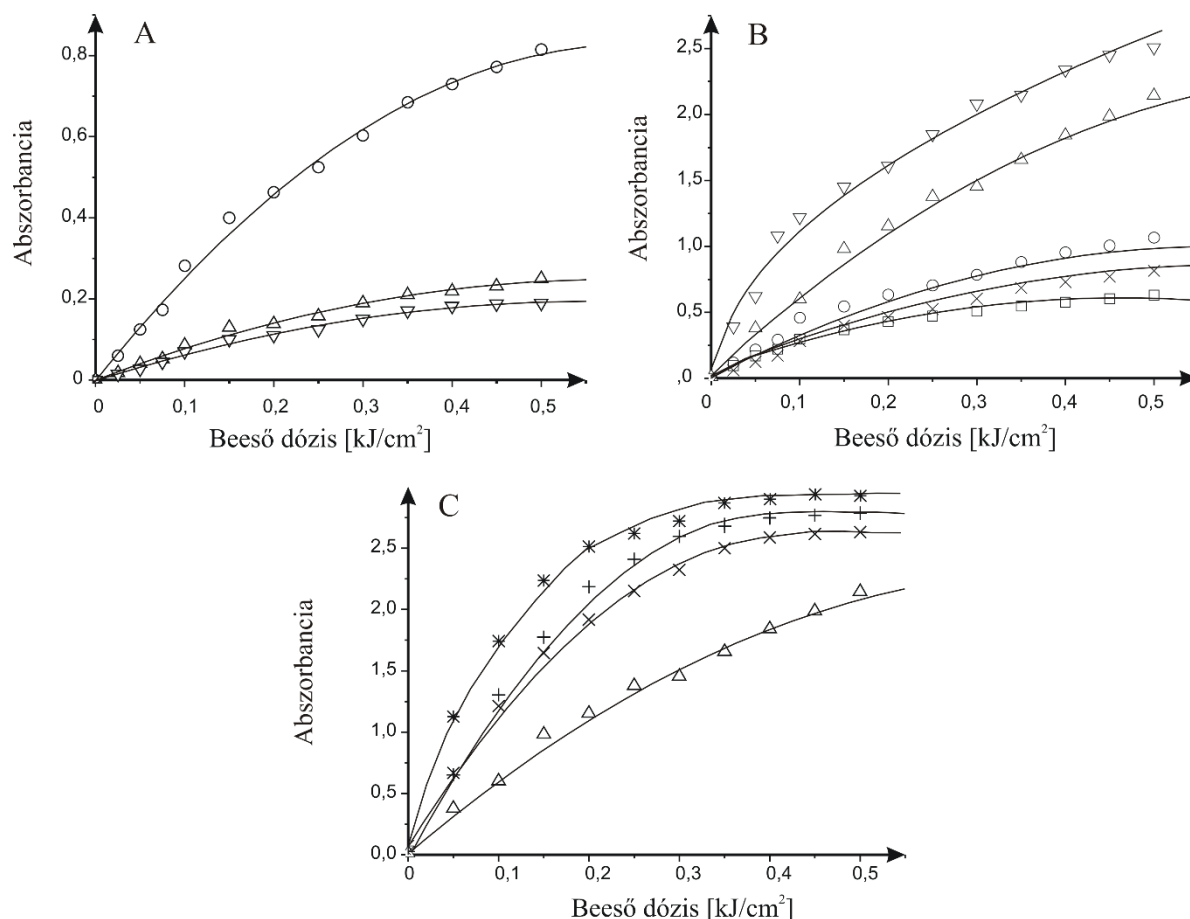
5.7.1. A fotodinamikus reakció hatékonysága és mechanizmusa

A porfirin származékok orvosi/biológiai alkalmazási lehetőségeinek alapja a fotodinamikus reakció. A keletkező reaktív termékek, szabadgyökök illetve szingulett oxigén a sejtekben destruktív folyamatokat indítanak el, amik aztán a sejtek illetve vírusok pusztulásához vezethetnek. A dolgozatban vizsgált valamennyi származék feltételezéseink szerint alkalmas lehet ilyen fotodinamikus reakciókban való alkalmazásra. Ennek lehetőségét, a reakciók mechanizmusát vizsgáltuk és összehasonlítottuk az egyes vegyületek várható hatékonyságát.

A porfirin származékok fototoxicitásának mértékét meghatározó paraméterek közül egyik legfontosabb szingulett oxigén termelési hatásfokuk.

Munkánk során jodometriás titrálással vizsgáltuk a porfirin származékok relatív szingulett oxigén termelési hatásfokát (65. ábra). A keletkező szingulett oxigén mennyiségére a keletkező ionok I_3^- abszorbanáciájából származó, $\lambda=355$ nm-en mért abszorbancia növekedésből következtethetünk. Az egyes származékok hatékonyságának összehasonlítását a 65. ábrán mutatom be.

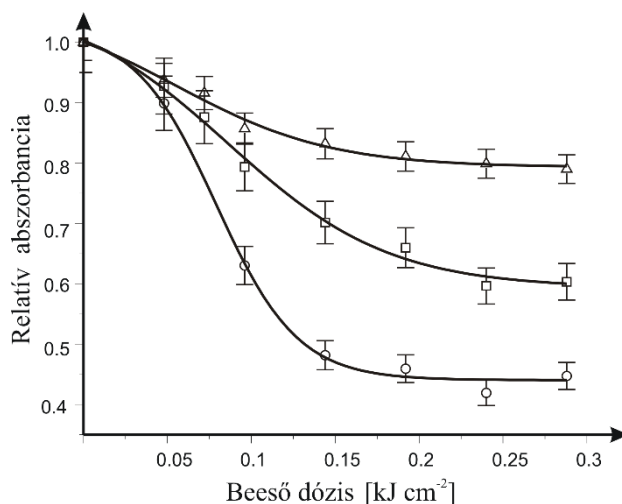
Az abszorbancia növekedése a kezdeti lineáris változás után minden esetben telítés felé hajlik. Ennek egyik oka lehet a porfirin származék fotokémiai bomlása/átalakulása. Mint ismeretes a porfirinek – molekulaszervezetüktől függően különböző mértékben – fény hatására bomlanak, illetve átalakulnak [278].



65. ábra A jodometriás reagenst és porfirin származékot tartalmazó oldatok abszorbanáciájának változása $\lambda=355$ nm-en a beeső dózis függvényében. (A): $0,5 \mu\text{M}$ TP(4-OgluOH)₄P (Δ), TP(4-OgluOH)₃P (∇), TPF5(4-OGalOH)₃P (o); (B): $0,5 \mu\text{M}$ TMPyP (∇), TMPCP(Δ), BMPCP (o), TMPCP-4P ($\square$), BMPCP-4P₂ (x); C: $0,5 \mu\text{M}$ (Δ), $1 \mu\text{M}$ (x), $1,5 \mu\text{M}$ (+), $2 \mu\text{M}$ (*) TMPCP

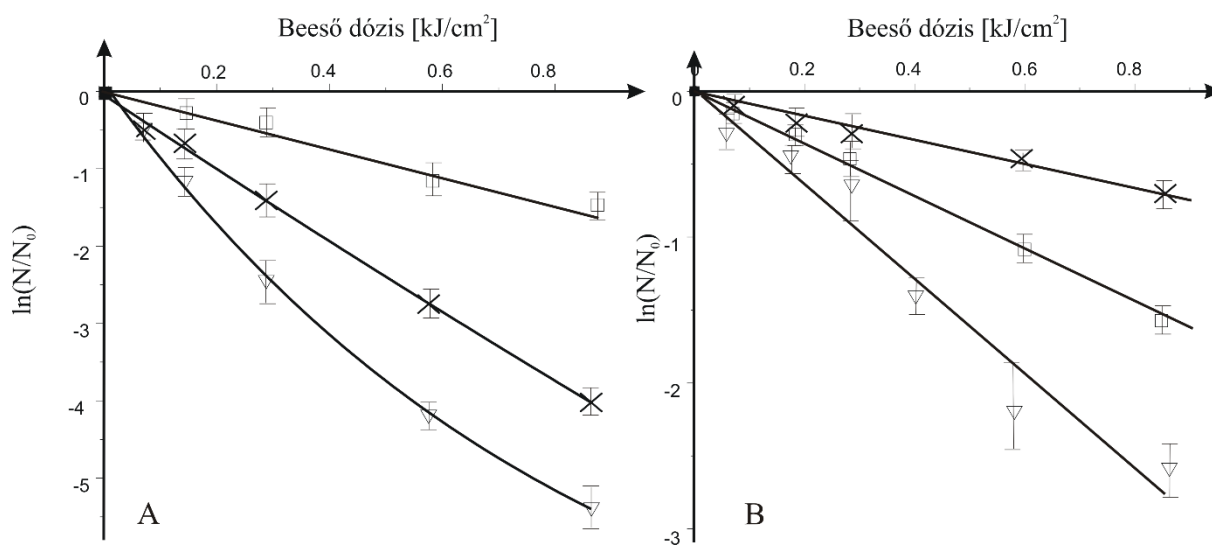
Tapasztalataink szerint a kationos porfirin származékok fotokémiai átalakulása a használt dózis tartományban elhanyagolható (nem szemléltetett adat), de számottevő lehet a glikozilált porfirinek esetében. Ennek egy példáját mutatom be a 66. ábrán a TPF5(4-OGalOH)₃P vonatkozásában.

A továbbiakban teszteltük és összehasonlítottuk az egyes származékok fototoxicitását T7 bakteriofág rendszeren. Választásunkat az indokolta, hogy a kérdéses porfirin származékok egyik fontos felhasználási területe lehet a patogén vírusok inaktíválása. Ebből a szempontból tekintve a T7 bakteriofág választásának több előnye is mutatkozik. Egyrészt a T7 modellje lehet a peplonnal nem rendelkező, akár DNS, akár RNS vírusoknak. További előny, hogy a nagy optikai tisztaságú T7 preparátumokon közvetlenül is vizsgálható a vírusinaktiváció szerkezeti háttere is.



66. ábra A TPF5(4-OGalOH)₃P fotodegradációja: a porfirin Soret-sávjának maximumán mért relatív abszorbancia 0,7 (Δ), 1,4(□) és 2,8 (○) μM koncentrációjú oldatokban . (Tris-HCl, pH7,4)

Tisztában kell lennünk ugyanakkor azzal, hogy a vírusinaktivációban észlelt hatékonyság, különösen az apoláros, membrán struktúrákban lokalizálódó porfirinekre nézve nem ad támpontot a sejtekben várható hatékonyságra nézve.



67. ábra TP(4-OgluOH)₄P-nal (A) és TP(4-OgluOH)₃P-nal (B) szenzibilizált T7 fág fotoinaktivációja scavenger nélkül (▽), illetve DPBF (x) (0,1 mM) vagy DMTU (□) (5mM) jelenlétében. A fágpartikulumok koncentrációja 0.3 nM, a porfirinkoncentráció 2 μM volt. (Tris-HCl, pH7,4)

T7 fág szuszpenziót porfirinek jelenlétében látható fénnel besugároztunk és lemezöntéssel meghatároztuk a fertőzőképes fágok számát a beeső dózis függvényében. Példaként a 67. ábrán

a TP(4-OgluOH)₄P-nal (67.A ábra) és TP(4-OgluOH)₃P-nal (67.B ábra) szenzibilizált fágok inaktivációs kinetikáját mutatom be.

Az inaktivációs kinetikából meghatározható az inaktivációs keresztmetszet (σ), vagyis annak a dózisnak a reciproka, ami az aktív fágok számát e-ed részére csökkenti ($\ln(N/N_0)=1$). Az egyes vegyületekkel szemben mutatott inaktivációs keresztmetszetre vonatkozó adatokat a 23. táblázatban foglalom össze. Mivel fotoszenzibilizáló vegyület alkalmazása mellett σ függ az alkalmazott koncentrációtól, az összehasonlíthatóság érdekében a táblázatban feltüntetett adatok egységesen 2 μM porfirin koncentrációjú oldatokra vonatkoznak.

23 táblázat A különböző porfirin származékokkal érzékenyített T7 fág inaktivációs hatáskeresztmetszete ($\sigma [\text{cm}^2/\text{kJ}]$) scavenger (NaN_3 , illetve DMTU) jelenlétében és jelenléte nélkül. A scavenger koncentrációja 1 mM, a porfirin koncentrációja 2 μM . (Tris-HCl, pH7,4) ($s_x \leq 5\%$)

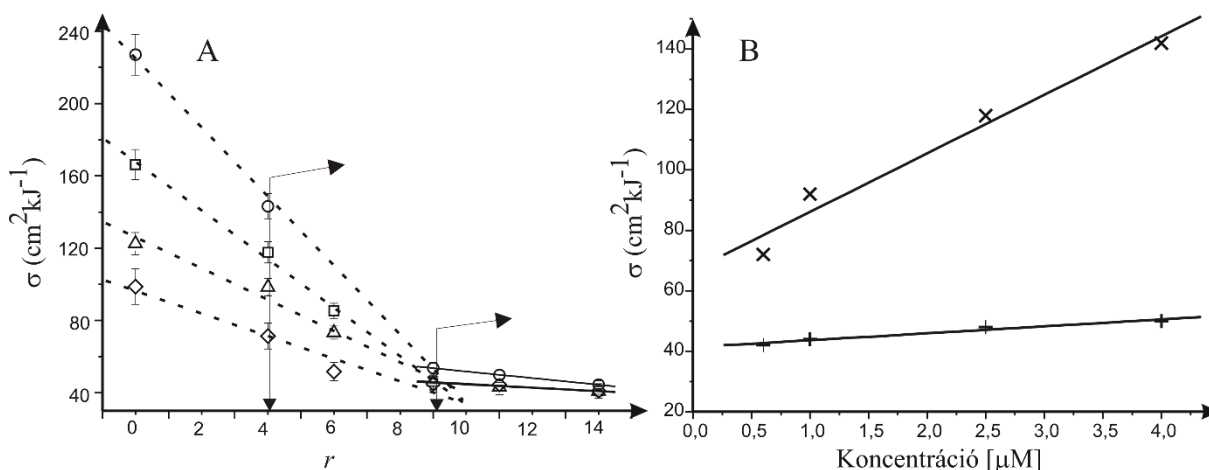
Vegyület	$\sigma [\text{cm}^2/\text{kJ}]$		
	-	NaN_3	DMTU
TP(4-OgluOH) ₄ P	8,84	5,11	1,89
TP(4-OgluOH) ₃ P	3,30	0,86	1,84
TPF5(4-OGalOH) ₃ P	38,46	30,30	7,14
TMPyP	62,51	16,00	39,07
TMPCP	50,4	15,7	30,8
BMPCP	43,5	20,28	10,45
TMPCP-4P	15	5,66	6,25
BMPCP-4P ₂	18	7,93	8,42

A fotoinaktiváció mechanizmusának vizsgálatára a fáginaktivációs méréseket elvégeztük olyan scavengerek jelenlétével a reakcióelegyben, amelyek a szingulett oxigén (DPBF illetve NaN_3) vagy a szabadgyökök (DMTU) közömbösítésére képesek. Ezek hatását szemléltetem a 67. ábrán. Az így kapott inaktivációs hatáskeresztmetszeteket pedig a 23. táblázat tartalmazza.

A táblázatban feltüntetett adatok 1 mM scavenger koncentrációkra vonatkoznak. A scavengerek hatékonysága, s ezzel a bakteriofág inaktivációs hatáskeresztmetszete függ a

scavenger koncentrációjától, de tapasztalataink szerint 1 mM felett már nem változik szignifikánsan (nem szemléltetett adat).

A kationos porfirinek – különösen TMPyP – kiemelkedő vírusinaktiváló hatékonyságával kapcsolatban joggal merül fel a kérdés, hogy ez vajon a DNS-hez való kötődésüknek köszönhető-e, vagyis annak, hogy a DNS közvetlen közelében elhelyezkedve vesznek részt reaktív ágensek létrehozásában. Ezért megvizsgáltuk a T7 fág kationos porfirinekkel szembeni inaktivációs hatáskeresztmetszetét nemcsak különböző porfirin származék koncentráció, hanem különböző bázispár/porfirin arányok mellett is [238]. A bázispár/porfirin arányokat úgy választottuk meg, hogy azok egy tartományában csak kötött, más tartományában pedig kötött és szabad porfirin is legyen a rendszerben.



68. ábra (A) A TMPyP-vel szenzibilizált T7 bakteriofág inaktivációs hatáskeresztmetszete (σ) a bázispár/porfirin mólarány függvényében 4 μM (o), 2,5 μM ($\square$), 1 μM ($\triangle$) és 0,6 μM ($\diamond$) porfirin koncentrációjú oldatokban. A mérési sorozatok pontjaira két szakaszban ($r > 9$ és $r < 9$) illesztettünk regressziós egyenest. (B) A TMPyP-vel szenzibilizált T7 bakteriofág inaktivációs keresztmetszete (σ) a porfirin koncentráció függvényében $r=9$ (+) és $r=4$ (x) bázispár/mólarányú oldatok sorozatában. (Tris-HCl puffer, pH7)

A 68.A ábra mutatja az inaktivációs hatáskeresztmetszet (σ) változását a bázispár/porfirin arány (r) függvényében különböző porfirin koncentrációk mellett. Minden koncentrációra nézve világosan látszik, hogy az $r > 9$ és $r < 9$ tartományokban a görbék meredeksége markánsan eltér egymástól. (Emlékeztetek, hogy a 5.2.2.1. fejezetben bemutatott eredmények alapján ez az érték jó egyezést mutat a telítéshez vezető bázispár/porfirin aránnyal.) Mindkét szakasz pontjaira külön-külön megfelelő korrelációval illeszthető egyenes, de az egyes szakaszokra illesztett egyenesek meredeksége szignifikánsan eltér egymástól. Két kiválasztott bázispár/porfirin aránynál ($r=4$ és $r=9$) megmutatom σ változását a koncentráció függvényében. (68.B ábra). Az $r=9$ esetben jó közelítéssel csak kötött porfirin van a rendszerben, míg $r=4$ -nél

a koncentráció növelésével nő a nem kötött porfirin mennyisége is. Ez utóbbi esetben az inaktivációs hatáskeresztmetszet koncentrációval való növekedésének meredeksége egy nagyságrenddel nagyobb.

5.7.2. A fotoreakció szerkezeti következményei

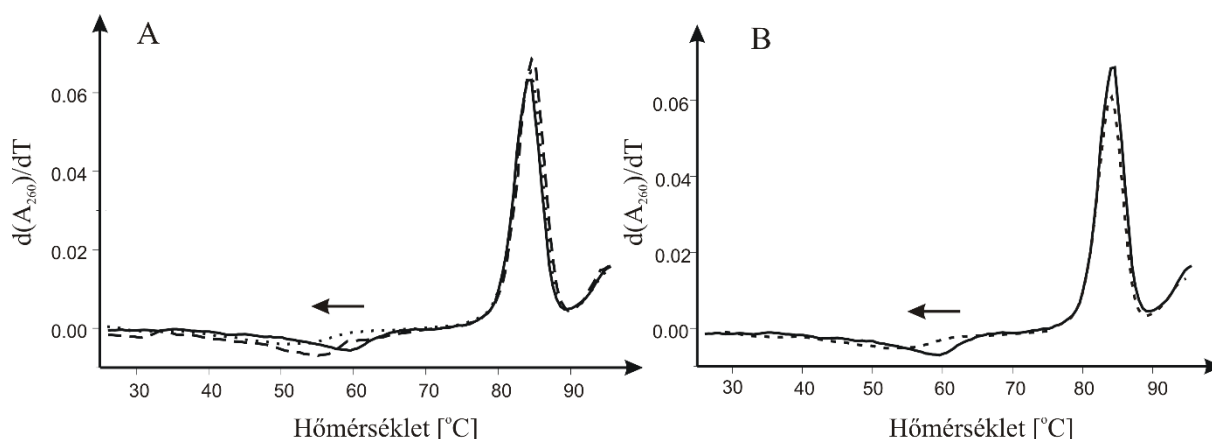
A porfirinek által kiváltott fotokémiai reakciók egyik ígéretes alkalmazási területe lehet a patogén vírusok inaktivációja. Ez a módszer kiegészítő eljárás lehet például vérkészítmények sterilizálásában [13,220]. A kezelések tervezése, a várható mellékreakciók előfordulása szempontjából fontos kérdés, hogy a víruspartikulum melyik alkotójában hoz létre sérüléseket a fotokémiai reakció; ebből a szempontból különböznek a vírus nukleoproteinhez kötődő és nem kötődő porfirin származékok. Az alkalmazási lehetőségek szempontjából az lenne kíváncsú, ha a nukleinsav szelektív sérülése vezetne a vírusinaktivációhoz.

Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy okoznak-e szerkezeti változást a DNS-ben a DNS-hez nem kötődő glikozilált porfirin származékok, illetve – megfordítva a kérdést – DNS-re korlátozódik-e vagy a fehérje kapszidot is érinti-e a DNS-hez kötődő kationos porfirin származékok fotokémiai hatása.

A 69.A és B ábra a T7 bakteriofág abszorpciós olvadási görbéjének egy-egy glikozilált származék fotoreakciója nyomán létrejövő változását mutatja. Mindkét esetben azt látjuk, hogy a DNS láncszétválásra jellemző hőmérséklet nem változik. Az első fázisátalakulásra jellemző lépcső az alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódik és amplitúdója is csökken. A fázisátalakulási hőmérséklet csökkenése a fehérje-fehérje, illetve a fehérje-DNS kölcsönhatások destabilizálódására utal. Az amplitúdó csökkenése azzal magyarázható, hogy a fázisátalakulásban résztvevő szerkezetek egy része már a termikus hatást megelőzően elveszíti rendezettségét.

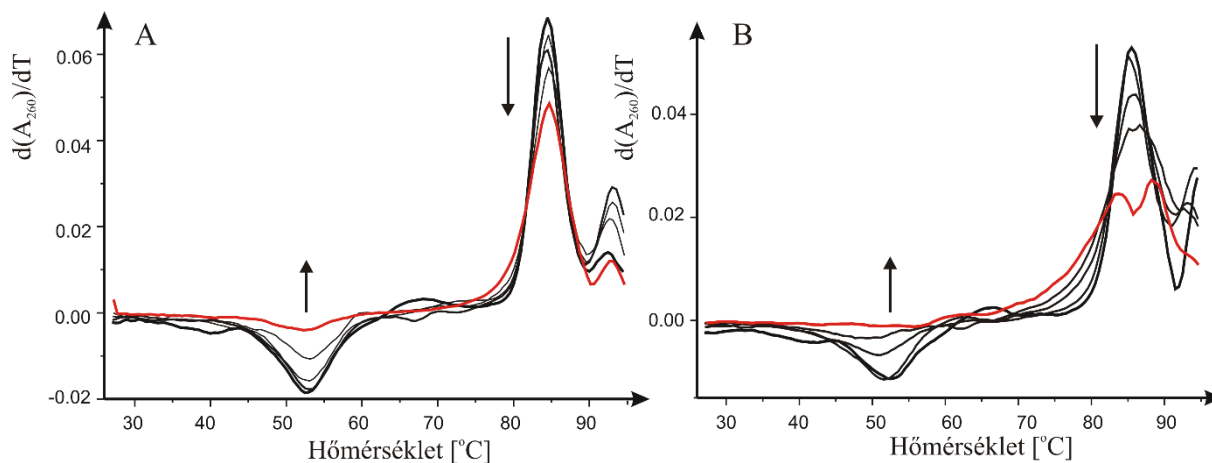
E megfigyelésből arra következtethetünk, hogy a $TP(4-OGluOH)_4P$ és a $TPF5(4-OGalOH)_3P$ által kiváltott fotokémiai reakciók a fehérje kapszidban indukálnak fotokémiai sérüléseket, de nem érintik az intrafág DNS-t. Ugyanilyen eredményt kaptunk, amikor a szenzibilizációt az ugyancsak neutrális, és a DNS-hez nem kötődő hematoporfirinnel végeztük el (nem szemléltetett adat).

Az izolált DNS hasonló kezelés után felvett olvadási görbéin kimutatható a DNS szerkezet destabilizálódása, különösen az átmenethez tartozó csúcs amplitúdójának csökkenése (nem szemléltetett adat) révén.



69. ábra (A) TP(4-OGluOH)₄P-vel és (B) TPF5(4-OGalOH)₃P-vel szenzibilizált és (A) 0, (folytonos vonal) 0,3 (--) és 0,6 (---) kJ/cm² illetve (B) 0 (folytonos vonal) és 0,6 kJ/cm² (--) beesődózissal besugárzott T7 bakteriofág abszorpciós oladási görbéinek első deriváltjai. A porfirin koncentrációja 2 μM, a fág részecskéé 0,3 nM volt. (Tris-HCl, pH7)

A T7 NP abszorpciós oladási görbéjének kationos porfirin származékok által indukált változásait a TMPyP vizsgálata során nyert adatokkal szemléltetjük (70.A és B ábra.) A porfirin és bázispár koncentrációviszonyait úgy választottuk meg, hogy az egyik esetben jó közelítéssel minden porfirin származéknak legyen esélye az intrafág DNS-hez kötődni (70.A ábra; 1/r=0,015), míg a másik esetben maradjon szabad porfirin a reakcióelegyben (70.B ábra; 1/r=0,2).



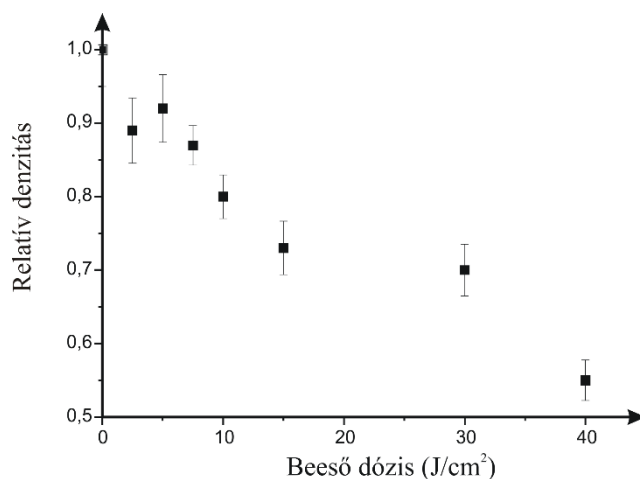
70. ábra T7 bakteriofág abszorpciós oladási görbéinek első deriváltjai TMPyP jelenlétében különböző (0,048, 0,144, 0,288, 0,576 kJ/cm²) beeső dózisoknál (A) 0,015 és (B) 0,2 porfirin/bázispár (1/r) molarányoknál. (Tris-HCl, pH7,4) A görbék eltolódási irányait a növekvő dózisnak megfelelően nyilak jelzik.

A 70.A ábra jelzi, hogy a kötött porfirin által kiváltott fotokémiai sérülések nem lokalizálódnak a DNS-re. Közelítőleg 0,6 kJ/cm² beeső dózisonál az első átalakulási lépcső szinte

eltűnik, a DNS relaxációja már a termikus hatás előtt megtörténik. A láncszétválásra jellemző csúcs nem tolódik el, de amplitúdója tendenciaszerűen csökken a dózis függvényében. A görbék kiszélesedéséből a kooperativitás csökkenése látszik.

A szabad porfirin származék által indukált fotokémiai reakciók a fentebb leírtakhoz hasonló változásokat eredményeznek, a hatások azonos dózisoknál kifejezettebbek (70.B ábra). A DNS láncszétvási folyamatában markánssá válik a görbe félérték szélességének növekedése, vagyis a folyamatban a kooperativitás csökkenése, sőt a hiperkróm átmenethez tartozó sávban a derivált görbe csúcsának felhasadása is felismerhető.

Az abszorpciós olvadási görbék alapján megállapítható, hogy a TMPyP által szenzibilizált fotokémiai reakciók nem csak a DNS-t érintik, hanem a kapszid fehérjét illetve a fehérje-DNS kapcsolatot is.



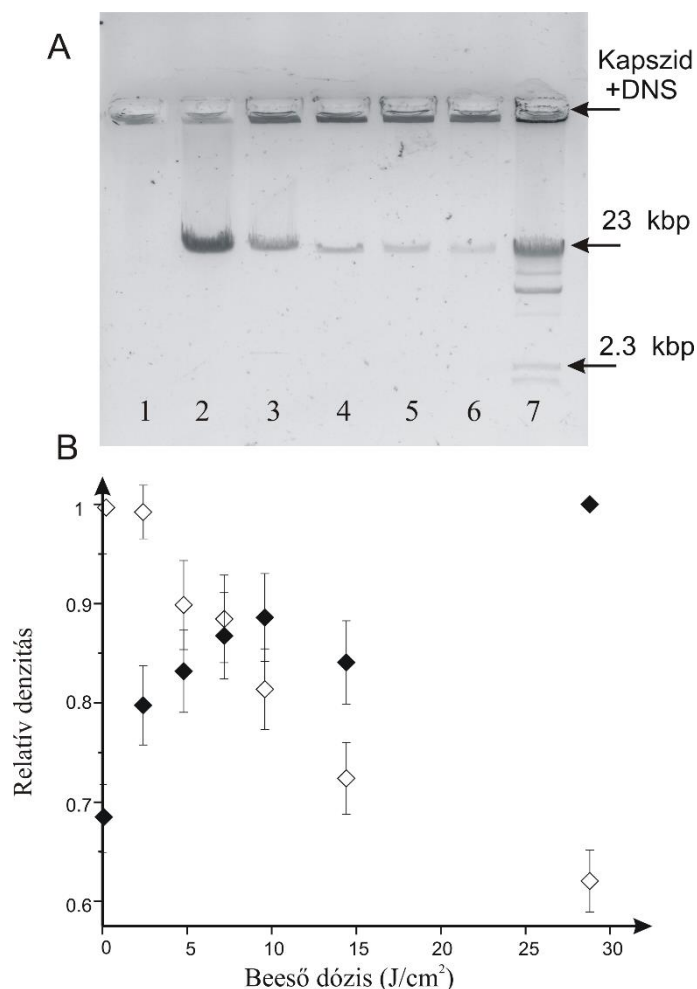
71. ábra TMPyP-vel szenzibilizált T7 bakteriofágnak megfelelő elektroforetikus sáv denzitása a beeső dózis függvényében. ($r=10$)

Mivel a zárt fágpartikulum és a szabaddá váló DNS-t is tartalmazó részecskék elektroforetikus vándorlási sebessége különböző, gél elektroforézissel képet kaphatunk a zárt kapszidok relatív mennyiségéről. A 71. ábrán az ezekhez tartozó sáv relatív denzitását mutatom be a beeső dózis függvényében. Látható, hogy a fág partikulumokat relatív mennyisége csökken a besugárzás során a dózis emelkedésekor. A 71. ábrán bemutatott kísérletekben a bázispár/porfirin arány 10 volt, azaz itt a fehérje kapszidban okozott sérülések a DNS-hez kötött porfirinnek tulajdoníthatók.

A DNS és fehérje sérülések egyik lehetséges típusa a DNS-fehérje keresztkötés kialakulás. Ennek előfordulását szintén gél elektroforézissel vizsgáltuk.

Mint azt feljebb már bemutattuk, a melegítés hatására 50-60 °C között, a fág olvadási folyamatának első lépcsőjében a kapszid fellazulása és a fehérje-DNS kapcsolat gyengülése

miatt a kapszidba zárt DNS egy része kiszabadul a kapszidból [271]. Ha a fotoreakció hatására fehérje-DNS keresztkötések alakulnak ki, akkor feltehetően a szabaddá váló DNS mennyisége csökken, a DNS-t is tartalmazó kapszidok mennyisége pedig nő a dózis függvényében. A besugárzott minta elektroforetikus elemzéséből képet kaphatunk a szabaddá váló DNS és az intakt fág partikulumok relatív mennyiségéről, illetve azok arányának változásáról.



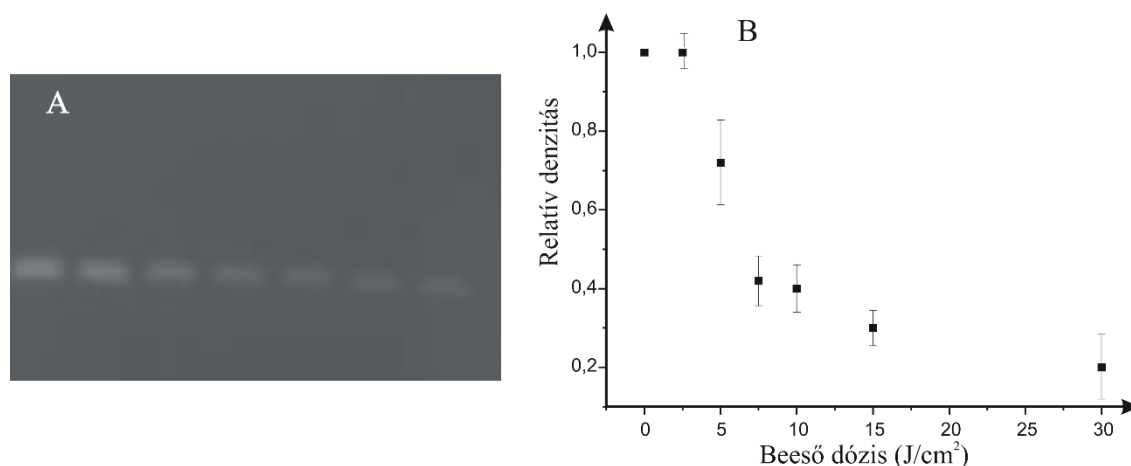
72. ábra TMPyP-vel szenzibilizált és termikusan kezelt T7 bakteriofág gél elektroforézise. (A) 0 (2), 2.4 (3), 9.6 (4), 14.5 (5) és 29 (6) J/cm² beeső dózissal besugárzott és 60 °C-on 30 percig inkubált minták elektroforetikus képe kezeletlen T7 fág (1) és Lambda DNA Hind III (7) kontroll mellett. (B) A kapszidhoz kötött DNS (◆) és szabaddá vált DNS (◇) sávjainak relatív denzitása a beeső dózis függvényében – három független mérés átlagából. Viszonyításul a kezdeti (◇) illetve végső (◆) denzitást használtuk. A mintákban a bázispár/porfirin arány 10 volt.

A 72.A ábrán egy tipikus elektroforetikus gél képét, a 72.B ábrán pedig az egyes sávok denzitásának dózistól függő relatív változását mutatom be. Referencia értéként a kapszidra nézve a legmagasabb dózisnál mért denzitást, míg DNS-re nézve a besugárzás kezdetén mért denzitást használtam. Mint a 72.B ábrán látszik, a dózis növekedésével a szabaddá váló DNS mennyisége csökken, míg a felfűtés ellenére kapszidba zárt DNS mennyisége növekszik.

Ezekben a kísérletekben a bázisár/porfirin arány 10 volt, vagyis a jelzett effektus minden valószínűséggel a DNS-hez kötött porfirinnek tulajdonítható.

A fehérje kapsziddal összefüggő változások vizsgálata mellett természetesen fontos volt a DNS sérüléseinek kimutatása is. A T7 fág DNS károsodását polimeráz láncreakcióval tanulmányoztuk.

Mivel nem a kérdéses DNS-szakasz megléte, hanem annak replikálhatósága volt a kérdés, a reakciókörülményeket úgy állítottuk be, hogy a képződött termék mennyiségét a kezdetben meglévő amplifikálható templát mennyisége határozza meg.



73. ábra TMPyP-vel szenzibilizált T7 bakteriofág DNS sérüléseinek kimutatása PCR-al. (A) A termék gél elektroforetikus sávja 0, 2.5, 9.6, 14.5 és 29 J/cm² beeső dózissal besugárzott mintákból (B) A sávok relatív denzitása a beeső dózis függvényében három független mérés átlagából. A mintákban a bázispár/porfirin arány 10 volt.

Mivel a T7 genom egy része a besugárzás során a kapszid sérülése révén szabaddá válik, arra is ügyeltünk, hogy a kimutatott sérülések a még kapszidba zárt DNS-t érintsék. Ezért a kezelt minták komponenseit először szokásos módon gélelektroforézissel elválasztottuk, majd a kapszidba zárt DNS-t tartalmazó sávot izoláltuk és az ezekben lévő DNS megfelelő szekvenciáit amplifikáltuk. A kezelt mintákban ebben az esetben is csak kötött TMPyP volt jelen. Mint az a 73.A és B ábrán látható, az amplifikálható DNS mennyisége TMPyP jelenlétében a dózis növekedésével meredeken csökken. Hasonló változásokat a glikozilált porfirinekkal szenzibilizált mintákban nem láttunk (ábrával nem szemléltetett adat).

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a fehérje kapszidban fotokémiai sérüléseket okozhatnak mind a DNS-hez nem kötődő – glikozilált –, mind a DNS-hez kötődő – kationos porfirin származékok. Ez utóbbi még akkor is igaz, ha a rendszerben csak DNS-hez kötött

porfirin van jelen. A DNS-ben okozott sérülések ugyanakkor csak a kationos porfirinek esetében járulnak hozzá a vírus inaktivációjához.

6. Megbeszélés

6.1. Porfirin származékok kötődése modellmembránhoz és lokalizációja membránban

Maillard és munkacsoportja [66,67] olyan második generációs porfirin származékok tervezését tűzték ki célul amelyek megfelelő fotokémiai aktivitással rendelkeznek és szerkezetük biztosítja a sejteken belül a membránstruktúrákban való lokalizációt. Olyan mezo helyzetben konjugált, glikozilált porfirin származékokat szintetizáltak, amelyek a monoszacharid egységek kémiai szerkezete, száma, anellálása alapján különböznek egymástól. A monoszacharid egység(ek) konjugálása amellet, hogy nagy szerkezeti variabilitást tesz lehetővé, növeli a vegyület vízdékonyságát, csökkenti aggregációs hajlandóságát, és nem, vagy csak kevésbé befolyásolja a fotofizikai paramétereket.

A glikozilált porfirinekkal kapcsolatos kutatásunk fő kérdése az volt, hogy hogyan befolyásolja a membránnal való kölcsönhatást a porfirin származék polaritása, a molekula geometriája.

A kötődési vizsgálatokat töltéssel nem rendelkező fejcsoportú DMPC-ből készült, valamint negatív töltésű fejcsoportú DMPG-t tartalmazó (DMPC:DMPG=9:1) kis unilamelláris liposzómákon, mint membrán modelleken végeztük. Meghatároztuk a porfirin származékok liposzóma kötődési állandóit és összehasonlítottuk fluoreszcencia élettartamukat liposzóma mentes és liposzómát tartalmazó oldatokban [236,261].

A kötődési állandók (K_L) összehasonlításából kitűnik, hogy a konjugátumban szimmetrikus elrendezésben négy glükózt tartalmazó származékok, a TP(2-OGluOH)₄P és a TP(4-OGluOH)₄P kötődési hajlandósága neutrális fejcsoportú liposzómákhoz elhanyagolható. Az ugyancsak szimmetrikus szerkezetű TP(4-OXylOH)₄P és a TPF5(4-OGalOH)₃P kötődési állandója a hematoporfirin származékok és klorinok esetében meghatározott állandókkal azonos nagyságrendű. Esetünkbe, a neutrális fejcsoportú liposzómákkal való kölcsönhatást vizsgálva az aszimmetrikus, három glükózt tartalmazó TP(4-OGluOH)₃P kötődési állandója a legnagyobb, értéke a mezoporfirin IX dimetil észteréhez és a mezoporfirin IX dihidrokloridéhoz közeli. K_L értéke csökken a fenilcsoportot tartalmazó szubsztituens méretének (TPF5(4-OGalOH)₃P) illetve glikozilált fenilcsoportok hidrofilitásának (TP(4-OXylOH)₄P) növelésével. A szimmetrikusan és aszimmetrikusan szubsztituált származékok közötti különbségről számoltak be Desroches és mtsai [279], akik TP(4-OGluOH)₃P illetve TP(4-OGluOH)₄P és egyrétegű foszfolipid filmek kölcsönhatását vizsgálva kimutatták, hogy a TP(4-OGluOH)₄P szerkezete gátolja a szénláncokkal való hidrofób kölcsönhatások kialakítását. A foszfolipid fejcsoportjának negatív töltése nem befolyásolja a TP(4-OGluOH)₃P

elsőségét a kötődési sorrendbe, de megnöveli a $\text{TP(4-OXylOH)}_4\text{P}$ ill. $\text{TPF5(4-OGalOH)}_3\text{P}$ kötődési hajlandóságát.

A kötődési állandókkal összhangban a $\text{TP(2-OGluOH)}_4\text{P}$ és a $\text{TP(4-OGluOH)}_4\text{P}$ fluoreszcencia élettartamát sem befolyásolja a liposzómák jelenléte. Az aszimmetrikusan szubsztituált származékok fluoreszcencia élettartama (τ_F) szignifikánsan megnő liposzómák jelenlétében (7. táblázat). Az élettartam változásának iránya mutatja a kromofór kötődés utáni környezetének hidrofób karakterét.

Összefoglalva tehát azt mondhatjuk, hogy mezo-szubsztituált glikozilált porfirinek esetében az **aszimmetrikus molekula szerkezet és amfifil karakter** kedvező a modell membránokhoz való kötődés szempontjából. Ugyanakkor megállapíthatjuk, hogy a molekula mérete (lásd $\text{TP(4-OGluOH)}_4\text{P}$ és $\text{TP(4-OXylOH)}_4\text{P}$ összehasonlítást) és töltéseloszlása (lásd $\text{TP(4-OGluOH)}_3\text{P}$ és a $\text{TPF5(4-OGalOH)}_4\text{P}$ összehasonlítást) is befolyásolja a kötődést [236].

Az amfifil karakter fontosságára, és a térszerkezet illetve töltéseloszlás szerepére vonatkozó megállapításainkat támasztják alá és egészítik ki Moylan és mtsai, valamint Ibrahim és munkatársai eredményei [280,281]. Hasonló megállapításra jutottak korábban Rotenberg és mtsai, majd Ben-Dror és mtsai. is [118,110].

Az aszimmetrikusan szubsztituált, amfifil vegyületek nemcsak fokozottabb sejtpenetrációt mutatnak *in vitro*, hanem a fototoxicitási vizsgálatokban is hatékonyabbnak bizonyultak, mint az első generációs hematoporfirin származékok (HpD) [282]. Laville és mtsai eredményesen alkalmazta az amfifil glikozilált porfirin származékokat retinoblasztóma fotodinamikus destrukciójában [283]. Hirohara és mtsai [284] szerint a monoszacharid származékokkal konjugált tetrafenil klorin származékok nagyobb mennyiségben jutnak be a HeLa sejtekbe, mint a nem szubsztituált tetrafenil származékok. Ezen belül is az aszimmetrikus szerkezet további előnyt jelenthet. Azt is kimutatták azonban, hogy a PDT-ben mutatott fototoxicitás nem feltétlenül korrelál a sejt által felvett fényérzékenyítő mennyiségével. Glikozilált porfirin származékok fototoxicitásának összehasonlító vizsgálata alapján azt mondhatjuk, hogy az függ a monoszacharid szerkezetétől és szubsztitúciós pozíciójától is [275,285].

A határozott liposzóma asszociációt matató származékok esetében érdekes megvizsgálni a kötődési folyamat kinetikáját (16. ábra, 8. táblázat). Mezőporfirin illetve hematoporfirin vizes és lipid fázisok (liposzóma vagy sejt membrán) közötti megoszlásának kinetikájára vonatkozó eredmények szerint a telítés 10-60 perc alatt érhető el [286,287]. Saját kísérleteinkben a glikozilált porfirinekre vonatkozóan meghatározott sebességi állandók jól illeszkednek az irodalmi adatokhoz. A kötődés kinetikáját, mind a fázisátalakulási hőmérséklet alatt, mind a

felett határozottan befolyásolja a porfirin szerkezete és a liposzóma összetétele. A legnagyobb sebességi állandót a fázisátalakulás alatt végbemenő kötődési folyamatban a $\text{TP(4-OGluOH)}_3\text{P}$ -hez rendelhetjük.

Eredményeink szerint a fázisátalakulási hőmérséklet alatt, függetlenül a liposzóma összetételétől a kötődés két sebességi állandóval jellemezhető, egy „gyors” és egy „lassú” lépésből áll. Hasonlóan kétlépéses kötődési folyamatról számoltak be Dellinger és mtsai [288] deuteroporfirin-DMPC liposzóma kölcsönhatásával kapcsolatban. Az első, gyors lépésben a porfirin kapcsolódik a membrán feji régiójához. Az azt követő, lassú lépésben történik meg a kötött porfirin átrendeződése és lokalizációja a hidrofób membrán régiókban. A lipid fázisátalakulás hőmérséklete alatt lejátszódó kötődésre vonatkozó vizsgálataink eredménye, a két sebességi állandó azonosítása alátámasztja Dellinger koncepcióját. A kétlépéses kötődési folyamatot támasztja alá a sebességi állandók változása a DMPC koncentrációjával, illetve a porfirin:lipid aránnyal (17. ábra). A gyors lépés sebességi állandója meredeken változik a DMPC koncentrációjának függvényében, míg a lassú lépésre vonatkozó érték változásának meredeksége egy nagyságrenddel kisebb. A foszfolipid fázisátalakulása feletti hőmérsékleten csak a $\text{TP(4-OGluOH)}_3\text{P}$ kötődése követi a kétlépésű kinetikai modellt.

A kötött porfirin liposzómán belüli lokalizációját az apoláros oldalláncok és fejcsoportok határrétegének, illetve az apoláros oldalláncok régiójának fluoreszcens jelzésével tanulmányoztuk. A két régió jelzésére sorrendben ANS-t illetve DPH-t használtunk. A jelzők élettartamának és anizotrópiájának változása mutathatja a porfirin származékának a jelzett régióval való kölcsönhatását.

Az ANS és a DPH élettartamának változatlansága a $\text{TP(2-OGluOH)}_4\text{P}$ és a $\text{TP(4-OGluOH)}_4\text{P}$ jelenlétében arra mutat, hogy szimmetrikusan szubsztituált származékok nem változtatják meg a jelzők környezetét (9. táblázat).

Az egyes membrán régiók – fejcsoportok környezete illetve apoláris láncok régiója - rendezettségét és fázisátalakulási hőmérsékletét mutató anizotrópia mérések eredményeit (18. ábra) is elemezve azt látjuk, hogy a szimmetrikusan szubsztituált gömbszerű térszerkezetű $\text{TP(2-OGluOH)}_4\text{P}$ nem változtatja meg sem a foszfolipid fázisátalakulási hőmérsékletet, sem a fázisátalakulási görbék deriváltjának az átalakulás kooperativitását tükröző szélességét. (18.A és C ábra). A $\text{TP(4-OGluOH)}_4\text{P}$ jelenléte, a $\text{TP(2-OGluOH)}_4\text{P}$ -hez hasonlóan, nem befolyásolja a DPH-val jelzett apoláros régió stabilitási paramétereit (18.C ábra) ; ugyanakkor jelenlétükben a fejcsoportok környezetében elhelyezkedő ANS hőmérsékletfüggő anizotrópiája (18.A ábra) a környezet fázisátalakulásának fokozott kooperativitását jelzi. Ezek az eredmény összhangban

van azzal, hogy a $\text{TP(4-OGluOH)}_4\text{P}$ jelenléte, a $\text{TP(2-OGluOH)}_4\text{P}$ porfirinek élettartama nem változik meg liposzómák jelenlétében (7. táblázat).

Összegezve, a $\text{TP(2-OGluOH)}_4\text{P}$ nem kötődik egyik jelzett membrán régióhoz sem, **ezzel szemben a planáris szerkezetű $\text{TP(4-OGluOH)}_4\text{P}$ esetében feltételezhetjük annak a lipid fejcsoportok külső felszínéhez való kötődését, a felszínnel kvázi párhuzamos elhelyezkedését**, ami befolyásolhatja a régió fázisátalakulásának kooperativitását, de szignifikánsan nem változtatja meg sem a porfirin, sem a régióban elhelyezkedő jelző fluoreszcencia élettartamát.

Mind az ANS mind a DPH fluoreszcencia élettartama csökken és a lecsengési görbék két exponenciális komponenssel illeszthetők az aszimmetrikusan szubsztituált glikozilált porfirin származékok jelenlétében. Ez arra mutat, hogy ezek a porfirin származékok mindkét fluoreszcens jelző molekuláris környezetét megváltoztatják. Az élettartam változások oka lehet, hogy (1) a porfirin kötődésének hatására a lipid kettősréteg rendezettsége csökken, és a fluoreszcens jelzők környezete hozzáférhetőbbé válik a vízmolekulák számára, illetve (2) az ANS/DPH közvetlenül kapcsolatba kerül a kötött porfirinnel.

A $\text{TP(4-OGluOH)}_3\text{P}$ és a $\text{TPF5(4-OGalOH)}_3\text{P}$ kötődése szignifikánsan, mintegy 2-2 °C-szal megnöveli az apoláros oldalláncok régiójára jellemző fázisátalakulási hőmérsékletet, vagyis a porfirin származék jelenléte stabilizálja a szerkezetet, de nem befolyásolja egyértelműen az átalakulás kooperativitását. Ugyanezek a származékok szignifikánsan nem változtatják meg a nyaki/fejcsoporti régió fázisátalakulási hőmérsékletét, de jelentősen csökkentik az átmenet kooperativitását.

A fluoreszcencia spektroszkópiai mérések alapján azt mondhatjuk, hogy a liposzómához kötött $\text{TP(4-OGluOH)}_3\text{P}$ és $\text{TPF5(4-OGalOH)}_3\text{P}$ lokalizációja érinti **mind a fejcsoportok környezetét, mind az apoláros oldalláncok régióját**.

A $\text{TP(4-OGluOH)}_4\text{P}$ valamint a $\text{TPF5(4-OGalOH)}_3\text{P}$ apoláros láncok mentén való elhelyezkedéséről nyújtanak további információt az ESR spektroszkópiai eredmények. Mindkét porfirin származék kötődés után a szénhidrogén lánc fejcsoportokhoz közelebbi, felső harmadában helyezkedik el. Ezt támasztja alá az 5-ös pozíciójú monitorcsoport (5-DSA) csatolási állandója által jelzett fázisátalakulási hőmérséklet megváltozása a porfirin származék jelenlétében (19.A ábra). Az átalakulási hőmérséklet eltolódása kifejezettebb $\text{TPF5(4-OGalOH)}_3\text{P}$ esetén. Az átalakulási hőmérséklet növekedése mellett a csatolási állandó mutatja az 5-DSA-val jelzett régió rigiditásának növekedését, ami szintén fokozottabb $\text{TPF5(4-OGalOH)}_3\text{P}$ jelenlétében.

A 16-DSA k paramétere nem változik meg egyik porfirin származék jelenlétében sem, kötődésük nem érinti a szénhidrogénláncok mélyebb régióit.

Herényi és mtsai [117,289] a mezoporfirin IX dihidro-klorid TP(4-OGluOH)₄P-hez és a TPF5(4-OGalOH)₃P-hez hasonló elhelyezkedését írták le site-selective fluoreszcencia spektroszkópiával. Két porfirin származék, a mezoporfirin IX dimetil-észter (MPE) ($\log P=8,32$) és a mezoporfirin IX dihidro-klorid (MPCl) ($\log P=7,48$) [109] elhelyezkedését összehasonlítva megállapították, hogy a polárosabb MPCl az apoláros láncok között, illetve az apoláros régió fejcsoportokkal határos nyaki régiójában lokalizálódik, míg az apolárosabb MPE a láncok mélyebb régiójában vagy a lipid kettős réteg határfelületén helyezkedhet el.

6.2. Porphirin származékok kötődése DNS-hez és nukleoprotein komplexekhez

6.2.1. Porphirin származékok kötődése DNS-hez

Irodalmi adatok alapján ismert jelenség a négy pozitív töltéssel rendelkező TMPyP kötődése nukleinsavakhoz. A szintetikus oligonukleotid szekvenciájának megfelelő megválasztásával már az 1980-as években azonosították majd jellemezték a például dG-dC illetve dA-dT szekvenciákon elkülönülve megjelenő kötött formákat, az interkalációt és a kis árokhoz történő külső kötődést. Ezen irodalmi ismeretek felhasználásával tovább lépve, arra kerestünk választ, hogy az interkaláció és a kis árok kötődés, mint a kationos porfirinek kötött formái kimutathatók illetve azonosíthatók-e természetes, kettős szálú polinukleotidok jelenlétében.

A T7 bakteriofágból izolált, 40 kb hosszúságú kettős szálú, G-C és A-T bázispárokat 50-50 %-ban tartalmazó, B-konformációjú DNS jelenlétében rögzítettük és elemeztük a TMPyP abszorpciós spektrumait (20 és 25 ábra). Az abszorpciós spektrumok elemzése alapján két kötött forma kialakulása volt megalapozottan valószínűsíthető. A komponens spektrumok Soret-sávjaiknak maximumai jó egyezést mutatnak az interkalált illetve külső kötött formákhoz rendelt spektrumok irodalomból ismert megfelelő maximumhelyeivel (3. és 11. táblázat).

Az irodalomban találunk kísérletet arra, hogy egyes bázisösszetételű DNS jelenlétében regisztrált abszorpciós spektrumok felbontásával azonosíthassuk a TMPyP kötött formáit [161], de a Borissevitch és Gandini módszere által meghatározott spektrális komponensek paraméterei nem feleltek meg a már ismert értékeknek.

Esetünkben az abszorpciós spektrumok komponensein túl a két ismert kötött formát bizonyítják a fluoreszcencia élettartamokra vonatkozó eredmények (24. ábra, 12. táblázat) továbbá a kötött porfirin származék indukált kiralitását mutató CD spektrumokban megjelenő sávok, (27. ábra), azok maximumhelyei és azok pozitív illetve negatív volta. Az interkalált

forma jelenlétét bizonyítja a DNS jelenlétében kimutatott energia transzfer, vagyis a DNS abszorpciós maximumán történő gerjesztés nyomán a TMPyP megnövekedett emissziós intenzitása.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy különböző spektroszkópai módszerekkel kapott, egymást alátámasztó eredményeink alapján azonosítható a két kötött – interkalált és külső kötött – forma kialakulása a TMPyP T7 kettős szálú DNS-hez való kötődésekor. Más kötött forma meglétét a spektroszkópai eredmények nem támasztják alá.

A tetrakationos porfirin származék kötődésének elemzésekor használt megközelítést alkalmazva tanulmányoztuk, hogy a pozitív töltések száma, elhelyezkedése, az oldalláncok jelenléte hogyan befolyásolja a porfirin-DNS kölcsönhatást. A három (TMPCP) illetve két pozitív töltést hordozó (BMPCP) porfirin származékokat és azok peptid-konjugátumait választottuk. A TMPCP és a BMPCP abszorpciós spektrumsorozatainak elemzése alapján (13. táblázat) ezeknek a származékoknak az esetében is két kötött formát feltételezhetünk. A Soret sáv eltolódásának mértéke és hipokromicitása az interkalált és külső kötött formák jelenlétére utal, de a spektrumfelbontások eredménye önmagában nem bizonyító erejű a kötött formák azonosítására vonatkozóan. A TMPCP két kötött formájának kialakulását igazolja a pozitív és negatív indukált sávok megjelenése a porfirin származék CD spektrumában (30. ábra), valamint a fluoreszcencia lecsengés DNS jelenlétében mutatott bi-exponenciális volta (14. táblázat), ahol a szabad formától eltérő élettartam komponensek jelennek meg. Ugyanezekkel a módszerekkel kapott eredmények nem támasztják alá a BMPCP két kötött formájának meglétét DNS jelenlétében. Ennek egyik oka lehet, hogy a kérdéses vizsgálatokban alkalmazott bázispár/porfirin arányok mellett a módszerek érzékenysége nem teszi lehetővé az esetleg kis mennyiségben jelen lévő kötött formák azonosítását. Az energiatranszfer vizsgálatok mind a TMPCP, mind a BMPCP esetében az interkalált forma jelenlétére mutatnak.

A tetrapeptid-konjugátumok, a TMPCP-4P és a BMPCP-4P₂, DNS jelenlétében létrejövő két kötött formáját egybehangzóan mutatják mind az abszorpciós spektrum elemzések (20. táblázat) mind a fluoreszcencia (21. táblázat és 57. ábra) és CD spektroszkópia (59.A ábra) eredményei. A TMPCP-AK esetében egy kötött forma mutatható ki, ami feltehetően a külső kötéssel azonosítható.

Megállapíthatjuk, hogy a két (BMPCP-4P₂) illetve három (TMPCP, TMPCP-4P) pozitív töltés megléte elégséges ahhoz, hogy a porfirin származék interkalációval és külső kötéssel kapcsolódjon a kettős szálú polinukleotid lánchoz, és ezt a három pozitív töltés mellett jelenlévő egy negatív töltés sem zárja ki (TMPCP). A porfirin egységein három

pozitív töltést hordozó TMPCP-AK feltehetően sztérikus okokból, csak külső kötással kapcsolódik a DNS-hez. A két pozitív és két negatív töltést hordozó BMPCP kötődése a DNS-hez nem zárható ki, de a kötött formák még nagy r értékeknél is kis mennyiségük miatt meggyőzően nem azonosíthatók.

Eredményeink hozzájárultak a porfirin-DNS komplexnek több gyakorlati felhasználásának kidolgozásához. Kakiuchi és mtsai koncepciója szerint a [290] TMPyP és DTTCl hatékony FRET donor-akceptor párt képezhet. Az ehhez szükséges megfelelő térbeli elhelyezkedésüket a DNS lánc biztosíthatja, amihez mindkét vegyület interkalációval kapcsolódhat. Az így kialakuló struktúra ígéretes kiindulása lehet nanorészecskék tervezésének. A porfirin származék DNS-hez kapcsolódása révén megjelenő indukált kiralitása alapot adhat kiralitás felismerő nanostruktúrák tervezéséhez, előállításához [291].

Az irodalomban több megközelítés ismeretes a kationos porfirinek kötött formáinak mennyiségi jellemzésére. Pasternack és mtsai [158] McGhee-von Hippel modellt alkalmazva meghatározták a TMPyP kötődési állandóit $(dG-dC)_n$ és $(dA-dT)_n$ kettős szálú oligonukleotidokhoz [158]. Több szerző kísérletet tett kationos porfirin származék – borjú csecsemőmirigy DNS „virtuális kötődési állandójának” meghatározására a Scatchard-megközelítést, a McGhee-von Hippel modellt, vagy speciális elemző szoftvereket használva. A kapott eredmények azonban a módszertől függően széles tartományban ($2 \times 10^5 - 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) változnak, még akkor is, ha a környezet ionerősségéből származó eltéréseket nem vesszük tekintetbe [162,292,293]. Ennek oka, hogy az egyes modellek alkalmazásainak feltételei közül valamelyik, így például az egyféle kötési mód, vagy a kötőhelyek függetlensége nem teljesül a TMPyP – DNS kölcsönhatás esetében, és ezek elhanyagolása óhatatlanul torzítja a kapott eredményeket. A kötődési állandók értékeiben nagyon különböző eredmények azonban egy tekintetben jó egyezést mutatnak: a G-C bázispárok arányának növekedése növeli a kötődési állandó értékét.

Saját megközelítésünkben inkább arra törekedtünk, hogy az egyes bázispár/porfirin arányoknál a kötött formák mennyiségét (ha erre technikai lehetőség volt), vagy azok r függvényében való változását kövessük. A TMPyP esetében a fluoreszcencia lecsengési görbék komponenseinek százalékos megoszlása révén meghatároztuk az ismert TMPyP és DNS koncentrációjú oldatokban az egyes formák mennyiségét. A megoszlásra vonatkozó adatok és az abszorpciós spektrum sávok maximumához tartozó abszorbancia értékek felhasználásával az egyes kötött formák moláris abszorbanciája kiszámítható volt (25. ábra).

A többi porfirin származék esetében a komponensekhez tartozó egyes abszorpciós sávok relatív területe alapján csak a kötött formák relatív mennyiségének változását követhettük a bázispár/porfirin arány függvényében.

Meghatároztuk a TMPyP kötött formáinak relatív mennyiségét a bázispár/porfirin mólarány (r) függvényében és a folyamat telítéséhez tartozó r értéket 67 mM ionerősségű Tris-HCl pufferben. A telítési érték az abszorpciós és CD spektroszkópiai eredmények alapján is jó közelítéssel hatnak adódik. A csak interkalációra utaló energiatranszfer esetében ez az érték közelítőleg hét.

Az abszorpciós spektrumfelbontásokkal kapott eredmények alapján a TMPyP esetében kis r értékeknél a külső kötött forma kismértékű túlsúlya mutatkozik, de a telítési értékhez közeledve ($r \approx 6$) az interkalált forma mennyisége közelítőleg kétszerese a külső kötöttének. A szabad TMPyP-t már jó közelítéssel nem tartalmazó oldatokban tovább növelve a bázispárok arányát további eltolódás tapasztalható a kötött formák között az interkaláció irányába (25. ábra). Ez megfelel annak az irodalmi megfigyelésnek, hogy az interkaláció nagyobb kötődési állandóval jellemezhető, mint a kisárok kötődés.

A kötött formák relatív mennyiségét befolyásolja a környezet ionerőssége (44.A,B,C ábra). Eredményeink szerint az ionerősség növekedése csökkenti az interkaláció lehetőségét, ugyanakkor a külső kötésre gyakorolt hatása elhanyagolható. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések [294,295], melyek szerint az ionerősség növekedése az interkalált forma mennyiségének csökkenését eredményezi, ezért a külső kötés relatív mennyisége növekszik. Ennek egyik oka lehet, hogy a kis ionerősségű oldatokban pozitív töltéssel rendelkező vegyületek interkalációja a pozitív töltések disszociációja révén nagyobb entrópia növekedéssel jár. A jelenség további magyarázatát szolgáltatják Jawad és mtsainak [296] számításai is. Az interkaláló vegyületek kötési szabadenergiájának kiszámításával kimutatták, hogy az interkaláció stabilitása növekszik az ionerősség csökkenésével. Az interkaláció valószínűségének csökkenése eredményezheti, hogy a kationos porfirin származékok látszólagos kötődési állandója csökken az ionerősség növekedésével [292,293,297,298].

Az ionerősségen túl a környezet ionösszetétele, a kétértékű ionok jelenléte is befolyásolhatja a DNS-ligandum kölcsönhatást, a kötődés kialakulásának lehetőségét. Ezért tanulmányoztuk két alkáliföldfém, a Ca és Mg, és két átmenetifém, a Ni és a Cu kétértékű ionjainak hatását a kationos porfirin származékok kötődésre, a kötött formák kialakulására és megoszlására.

Azonos ionösszetételű oldatokban a Ca^{2+} és Mg^{2+} nem befolyásolja szignifikánsan sem a telítési bázispár/porfirin arányt, sem a kötött TMPyP kötési formák közötti megoszlását (45.

ábra). Ezzel szemben úgy tűnik, hogy a Ni^{2+} és a Cu^{2+} gátolja a TMPyP kötődését, azon belül is az interkalált forma kialakulását.

Az alkáliföldfém és átmenetifém ionok eltérő hatását a DNS-sel való eltérő kölcsönhatásuk magyarázza [299]. A hidratált $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ és a DNS kölcsönhatása egyszerű elektrosztatikus kötődésnek fogható fel. Ez a kölcsönhatás döntően a kation és a foszfátsoport oxigén atomja között jön létre [300,301]. A $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ugyan kötődhet a purin bázisok N7 pozíciójához, de onnan könnyen disszociál. A $\text{Ni}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ esetében ez a kapcsolat sokkal erősebbnek tűnik. Ha a fémion/foszfátsoport molarány nagyobb, mint 0,4, (a mi kísérleti körülményeink között ez az arány nagyobb volt 1-nél) akkor kelátképződés jön létre a guanin N7 atomja és a legközelebbi foszfátsoport között [302]. (Ez alól kivételt képeznek a GpG szekvenciák.) Ennek következtében a GC bázispárok közötti H-hidak felszakadnak és a hélix destabilizálódik. Az ismert bázispreferencia miatt az intakt GC bázispárok számának csökkenésével az interkaláció lehetősége az érintett bázispárokon csökken.

A TMPyP ismert kötött formáinak bázispreferenciáját bizonyítja azok relatív mennyiségének eltolódása a DNS bázisösszetételének függvényében (28. ábra). A 72 % G-C bázispárt tartalmazó *M. luteus* DNS esetében az interkalált forma mennyisége mintegy másfélszeres a csirke vörösvérsejt DNS-hez képest, ahol a G-C arány csak 32 %.

A TMPCP, a BMPCP és konjugátumaik kötődésére vonatkozóan nem tudtuk meghatározni a kötött formák abszolút koncentrációját, csak azok mennyiségének változását a bázispár/porfirin arány függvényében. A három pozitív töltésű TMPCP esetében a telítés érték magasabb ($r \approx 20$), mint azt a TMPyP-nél láttuk (29. ábra). A BMPCP-vel kapcsolatban csak azt lehet bizonyossággal állítani, hogy 50-szeres bázispár feleslegnél is a jelenlévő BMPCP molekuláknak mintegy 10%-a lehet kötött állapotban.

A BMPCP és TMPCP tetrapeptid konjugátumainak nagyobb kötődési hajlandóságát jelzi a kötött formák mennyiségének meredekebb emelkedése a konjugátatlan származékhoz képest és a kisebb telítési r érték.

A kötődési folyamat **telítési bázispár/porfirin molarányára** különböző módszerekkel kapott eredmények némileg különböznek egymástól, de a származékokra vonatkozó eredmények sorrendje minden esetben megegyezik: **$\text{TMPyP} \approx \text{TMPCP-4P} < \text{TMPCP} < \text{BMPCP-4P}_2 < \text{TMPCP-AK} < < \text{BMPCP}$** . **Láthatóan a sorrend kialakulásában a származék nettó töltése és nem mérete a meghatározó.**

A porfirin származékok és tetrapeptid-konjugátumaik kötődését valamint interkalációjuk szerepét közvetetten alátámasztja a DNS termikus stabilitásának megváltozása azok

jelenlétében (46. és 60. ábra). Minden általunk vizsgált kationos porfirin növeli a DNS láncszétválási hőmérsékletét (T_m); a hőmérséklet növekedése a porfirin/bázispár arány lineáris függvénye. Érdeemes megjegyezni, hogy ez az eltolódás még a BMPCP esetében is megfigyelhető (47. ábra). Az eltolódás meredeksége összefüggést mutat az interkalált forma relatív mennyiségével.

Eredményeink szerint a TMPCP-4P és a BMPCP-4P₂ bővíti azon vegyületek tárházát, amelyek peptidet és DNS bázispárjai közé interkalálódó egységet is tartalmaznak [303]. Az ilyen és ehhez hasonló szerkezetek növekvő szerepet kaphatnak mint biomarkerek DNS-szerkezettel összefüggő patológiás állapotok kimutatásában [304].

6.2.2. Porfirin származékok kötődése nukleoprotein komplexekhez

A DNS a sejtekben nem izolált formában, hanem fehérjékhez kapcsolódva jelenik meg, konformációja is eltér a relaxált, B-konformációtól, mert a DNS konformációja kölcsönhatásai révén, külső erő hatására megváltozhat. A természetben ilyen erő származhat a DNS fehérjékkel való kölcsönhatásából, ami a DNS kettős hélix rövid vagy hosszú távú deformációját okozhatja. [305]. A sejtmagban a szerkezeti hierarchia eleme a DNS hiszton fehérjék körüli feltekeredésével kialakuló nukleoprotein komplex, a nukleoszóma [306].

A bakteriofágokban a DNS mag- és kapszidfehérjék által kialakított konformációja hasonló a nukleoszóma elhelyezkedő DNS térbeli elrendeződéséhez [307]. Az érett T-fágokban a DNS koaxiálisan feltekeredik a megfehérje körül [308,309]. Ez a hasonlóság az alapja annak, hogy a molekuláris kölcsönhatások tanulmányozásakor a T-fágok, így a T7 bakteriofág, mint a sejten belüli nukleoprotein komplexek modellje alkalmazható.

Célul tűztük ki a kationos porfirin származékok és természetes nukleoprotein komplexek, T7 bakteriofág és izolált nukleoszóma közötti kölcsönhatás kvalitatív és kvantitatív elemzését.

A TMPyP kötött formáinak azonosítását ugyanazon spektroszkópai módszerekkel kapott eredmények elemzésével végeztük, mint amit a DNS esetében már bemutattunk.

Az abszorpciós spektrumsorozatok (32. ábra), a fluoreszcencia élettartamok (16. táblázat) és a TMPyP indukált CD spektrumaiban megjelenő sávok (36. ábra) egybehangzóan két kötött forma kialakulását támasztják alá NP jelenlétében.

A T7 NP jelenlétében kialakuló kötött formák abszorpciós spektrumainak paramétereit összevetve a DNS esetében kapott paraméterekkel (11. és 15. táblázat) láthatjuk, hogy a „csúcsok” paraméterei, maximumhelyei és sáv szélességei pontosan megegyeznek mindhárom – szabad, interkalált, külső kötött – formára nézve. A „vállak” paraméterei azonban eltérnek

egymástól DNS- és T7 NP-kötődés esetében; NP jelenlétében a maximumhelyek a rövidebb hullámhosszak felé tolódnak és a sávok kiszélesednek.

A NP jelenlétében megjelenő élettartam komponensek egyike pontosan megegyezik a korábban külső kötöttként azonosított formáéval, a másik, a szabad állapoténál hosszabb komponens interkalált forma élettartamaként azonosítható.

A NP komplexek preparátumaiban, és különösen a T7 bakteriofág esetében, mindig jelen vannak a komplexből szabaddá vált DNS szakaszok is. Felmerülhet a kérdés, hogy a kötődési vizsgálatok során nem a TMPyP - szabad DNS kapcsolatot látjuk-e valójában, és értelmezzük tévesen, mint TMPyP - NP kölcsönhatást. Az azonos összetételű TMPyP-t és T7 NP-t tartalmazó mintákon különböző hőmérsékleten történő inkubálás után elvégzett elemzéseink azt mutatják, hogy az ép kapsziddal rendelkező T7 fágokat (20 °C) és a kapszid fellazulása után szabaddá vált DNS-t (70 °C) tartalmazó minták illesztési paraméterei illetve a kötött formák megoszlása markánsan különbözik egymástól, vagyis a kapszidba zárt illetve a szabad DNS-sel való kölcsönhatás jól elkülöníthető egymástól.

Az egyes kötött formák mennyiségének elemzésekor azt feltételeztük, hogy két, és csak két kötött forma alakul ki nukleoprotein komplex jelenlétében, a két kötött forma a DNS-sel való kölcsönhatás során kialakuló interkaláció és kis árok kötődés. Ennek megfelelően a partnerek relatív koncentrációját itt is a bázispár/porfirin aránnyal fejezzük ki.

Megállapíthatjuk, hogy mindkét NP komplexben a fehérjék jelenléte akadályozza a DNS-porfirin kölcsönhatást, a kötődési folyamat telítése sokkal nagyobb, közel tízszeres bázispár/porfirin arányoknál érhető el.

A TMPyP T7 NP és T7 DNS jelenlétében kialakuló kötött formáinak relatív mennyiségét összevetve azt látjuk, hogy a telítési értékhez közeledve mindkét esetben az interkalált forma dominál, közelítőleg 60 %-ban van jelen. Ettől markánsan eltér azonban a nukleoszóma jelenlétében kialakuló kötött formák relatív mennyisége. Itt a teljes bázispár/porfirin arány tartományban a külső kötött forma dominál és már $r=20$ -nál eléri az 55%-ot. Ennél nagyobb r értékeknél már csak az interkalált forma további kialakulása látható. Ez magyarázható azzal, hogy a nukleoszómában a DNS, elhelyezkedése miatt könnyebben hozzáférhető az árkokban való kötődés számára, míg a T7 NP-ben nincs a DNS-nek a környezete felé mutatott szabad felszíne. Ugyanakkor a nukleoszómában a DNS lánc teljes hosszában részt vesz a fehérjékkel való másodlagos kötések kialakításában. Ezért a bázispároknak az interkaláció kialakításához szükséges axiális irányú elmozdulása gátolt, ami csökkenti az interkaláció lehetőségét.

A spektroszkópiai eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a TMPyP a nukleoprotein komplex DNS részével alkot komplexeket. Eredményeink értelmezésénél nem vettük tekintetbe a fehérjékkel kialakított kötések lehetőségét. A kötődés ilyen értelmű szelektivitásának ellenőrzésére vizsgáltuk a T7 NP és nukleoszóma hőmérsékleti stabilitását porfirin származék jelenlétében. A T7 NP abszorpciós és CD olvadási görbéiben a fehérje kapszid és DNS szerkezeti átalakulásait világosan el lehet különíteni (48.A és C ábra.). Eredményeink azt mutatják, hogy a TMPyP kötődése csak a DNS láncszétválási hőmérsékletét változtatja meg, stabilizálja a DNS szerkezetet, ahogy azt az izolált DNS esetében is láttuk, de nem befolyásolja a fehérje kapszid stabilitását. **Ez az eredmény igazolja a TMPyP szelektív kötődésére vonatkozó feltevésünket.**

A nukleoszóma termikus szerkezeti átalakulásában nem különülnek el a DNS-t és a hisztonokat érintő lépések, de a fehérje és a DNS termikus átmenetei a CD olvadási görbék segítségével mégis külön-külön vizsgálhatók (48. B és D ábra). A TMPyP jelenléte destabilizálja a DNS szerkezetet, ami jól magyarázható a külső kötődés dominanciájával. Ugyancsak csökken a fehérjék fázisátalakulási hőmérséklete. Ennek oka lehet a DNS szerkezetének megváltozása és, mintegy másodlagos hatásként a DNS-fehérje kapcsolat destabilizációja.

A DNS-TMPyP kapcsolatot támasztja alá az is, hogy a DNS fázisátalakulási hőmérséklete változik a TMPyP koncentrációjának függvényében, a T7 NP esetében a növekedés lineáris függvénye a porfirin származék koncentrációjának.

További bizonyítékát szolgáltatják a TMPyP szelektív kötődésének a különböző hőmérsékleten (20–70 °C tartományban) elvégzett spektroszkópiai elemzések már a fentiekben elemzett eredményei. A 70 °C-ra melegített T7 NP mintákon kapott paraméterek (abszorpciós spektrumok maximumai, fluoreszcencia élettartamok) pontosan megfelelnek az azonos hőmérsékletű DNS mintákon kapott értékeknek. Az illesztések hibái nem jelzik a rendszerben jelen lévő fehérjékkel kialakított egy (vagy több) további kötött forma jelenlétét (37. ábra).

A BMPCP egyik általunk használt módszer által kimutatható módon sem lép kölcsönhatásba a nukleoprotein komplexekkel. A további származékokra – TMPCP, TMPCP-4P, BMPCP-4P2 – nézve az abszorpciós spektrumok felbontása nem ad a korábbiakban látottakhoz hasonlóan egyértelmű, a többi spektroszkópiai módszerrel egybehangzó eredményt, jelezve a módszer alkalmazásának korlátait.

A TMPCP és TMPCP-4P abszorpciós spektrumainak komponensei közül csak egynek a területe nő a bázispár/porfirin molarány növekedésével. Ugyanakkor a fluoreszcencia

lecsengési görbéik két exponenciális komponenssel illeszthető, a kapott élettartamok jó egyezést mutatnak a két kötött formára jellemző értékekkel. Az indukált CD spektrumokban is megjelennek a kötött formákra jellemző sávok és az interkalált formára jellemző energiáttranszfer is kimutatható mindkét esetben. Az abszorpciós spektrumok nem bizonyítják a kétféle kötött forma kialakulását. Ennek oka lehet, hogy a szabad és külső kötött forma megfelelő sávjai nem különíthetők el egymástól.

BMPCP-4P₂ esetében is csak egyféle kötött forma mutatható ki bizonyosan az abszorpciós spektrumok komponens spektrumai alapján. Itt azonban a többi módszer is csak egyetlen kötött forma kialakulását bizonyítja. Ez a fluoreszcencia élettartam és a CD spektrum alapján a külső kötött formaként azonosítható.

Az abszorpciós olvadási görbék szerint a TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ is növelik a kapszidbeli DNS termikus stabilitását (49. és 60. ábra). A TMPCP és TMPCP-4P nem befolyásolja a fehérje kapszid fellazulására jellemző hőmérsékletet. Így a porfirin-származék – fehérje kapcsolat ezekben az esetekben sem mutatható ki az abszorpciós olvadási görbék elemzésével. Ugyanakkor a T7 fág CD görbéi (nem szemléltetett adat) azt mutatják, hogy a tetrapeptid konjugátumok, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ koncentrációjukkal összefüggő mértékben csökkentik a fehérje heliciását. Így, egy termikus stabilitást nem befolyásoló tetrapeptid-fehérje kölcsönhatást nem zárhatunk ki.

A három vagy négy pozitív töltést hordozó kationos porfirin a nukloeprotein komplex DNS alkotójához az izolált DNS-sel azonos módokon kötődik. Azonos bázispár/porfirin arányoknál minden esetben több a szabad porfirin származék, ha a partner a NP, mint ha szabad DNS a partner. Vagyis a NP-ben jelen lévő fehérje kapszid illetve a hiszton fehérjék a BMPCP kivételével, nem akadályozzák meg, de gátolják a DNS-porfirin származék közötti kapcsolat kialakulását.

A telítési érték alapján felállított sorrendet: TMPyP>TMPCP>TMPCP-4P>>BMPCP-4P₂, a NP-porfirin származék esetében a nettó töltés és a származék mérete egyaránt befolyásolja.

6.3. Kationos porfirin származékok sejt felvétele, sejtben belüli lokalizációja

A kationos porfirin származékok felhasználási lehetőségei és hatásmechanizmusuk szempontjából alapvető kérdés, hogy a származék képes-e bejutni illetve felhalmozódni célsejtekben, illetve a sejtbe jutott származék mely sejtalkotó(k)ban halmozódik fel.

A munkánk során vizsgált kationos porfirin származékok mindegyike kimutatható a HL-60 sejtekben, a porfirin pozitív sejtek aránya minden esetben a porfirin koncentráció és az inkubációs idő függvénye (62. ábra). Minden porfirin koncentrációnál és minden inkubációs időtartam után (nem szemléltetett adat) a BMPCP-4P₂-pozitív sejtek aránya volt a legnagyobb. A tetrapeptid jelenléte a konjugátumban nem befolyásolja egyértelműen – a BMPCP-4P₂ esetében növeli, a TMPCP-4P esetében csökkenti – a sejtfelvételt.

Eredményünk összhangban van Jensen és mtsai megállapításával [44], miszerint az általuk tanulmányozott 4-1 pozitív töltésű porfirin származékok közül a két pozitív töltést hordozó, amfifil karakterű származék halmozódik fel legnagyobb mértékben a sejtekben. A három-három töltéssel rendelkező származékok közül a glikozilált, ugyancsak amfifil karakterűek mutattak legnagyobb sejtpenetrációt [310]. Irodalmi eredmények alapján megállapítható, hogy a porfirin származék töltése, lipofilicitása, amfifil karaktere és térszerkezete egyaránt befolyásolja a sejtekbe való bejutás lehetőségét [311].

A kationos porfirinek és konjugátumaik sejten belüli eloszlására vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak. A legfontosabb kérdés az, hogy az izolált DNS-hez kötődő származékok sejten belül is megtartják-e ezt a tulajdonságukat, és kimutathatóak-e a sejtmagban. Mások mellett Zhu és mtsai, Yoho és mtsai [312,313] kimutatták trikationos származék lokalizációját a sejtmagban.

Konfokális mikroszkóppal, kettős fluoreszcens jelzéssel készült saját felvételeinken a sejtmagot jelölő kromofór és a porfirin származékok nem mutatnak kolokalizációt, ugyanakkor e vegyületek megjelennek a mitokondriumban és a lizoszómában. A két pozitív töltésű BMPCP és tetrapeptid konjugátuma a lizoszómában, míg a három pozitív töltésű TMPCP a mitokondriumban mutatott markánsabb felhalmozódást.

Eredményeinkhez hasonlóan több szerző is kizárta a kationos származékok megjelenését a sejtmagban. A citoplazmában, pontszerű elhelyezkedésben [314,315], vagy közelebből, a pozitív töltések számától függő megoszlásban a mitokondriumban és a lizoszómában [316] azonosították a kationos porfirin származékokat [44].

A BMPCP illetve TMPCP és konjugátumaik azonos viselkedése a sejten belül összhangban van Sibrian-Vazquez és mtsai [317,318] megfigyeléseivel, amelyek szerint különböző aminosav összetételű konjugátumok eloszlását a peptidet felépítő aminosavak száma, milyensége és szekvenciája nem, csak a hozzá kapcsolt porfirin töltéseinek száma befolyásolja. Ugyanakkor ezek az eredmények ellentmondanak Silva és mtsai [310] megfigyelésének, miszerint a trikationos származékok peptid konjugátumai csak az endocitotikus

vezikulumokban jelennek meg, de a mitokondriumban nem. Az ellentmondás feloldása feltehetően a felvétel és eloszlás kinetikájában, a felvételek készítésének időzítésében rejlik.

A peptid konjugátumok sejten belüli eloszlásával kapcsolatban felmerül a kérdés, hogy a felvételeken valóban a konjugátumok megjelenését látjuk-e, vagy egy esetleges hasítás után felszabaduló szabad porfirint. A kérdés megválaszolására még további kísérleteket tervezünk.

A kationos porfirinek sejtmagban történő lokalizációját kimutató vizsgálatok módszereinek összehasonlító elemzéséből kitűnik, hogy a kísérletek fixált sejteken történtek. Alvarez és mtsai megfigyelése [319] és saját tapasztalataink szerint is, a sejt inaktivációja a sejtbe jutott porfirin származék lokalizációjának megváltozásához vezethet. A sejtek inaktivációja történhet a mintakészítés során, de – például a mikroszkópi felvételek körülményeinek nem elég gondos megválasztása miatt – okozhatja maga a porfirin a megvilágítás hatására lejátszódó fotodinamikus reakció révén [320]. Vagyis a kationos porfirinek megjelenése a sejtmag környezetében ennek a relokalizációnak lehet az eredménye.

Megállapíthatjuk tehát, hogy habár számos kationos porfirin származéknak nagy az affinitása izolált DNS-hez illetve nukleoprotein komplexhez, intracelluláris környezetben mégsem kötődnek a nukleáris DNS-hez, és nem halmozódnak fel a sejtmagban. Érdekes módon még akkor sem, ha NLS (nuclear localization signal) peptid szekvenciát tartalmazó konjugátumát juttatjuk a sejtbe [80,318]. Ez utóbbi esetben nem ismert, hogy a konjugátum hasítása megtörténik-e a lizoszómában, és az így szabaddá váló NLS eljut-e a sejtmagba.

6.4. Porfirin származékok genotoxicitás, fototoxicitása

T7 bakteriofágon vizsgáltuk a glikozilált és a kationos porfirin származékok toxicitását fénytől elzárt körülmények között, „sötétben” és meghatároztuk MI értékeiket. Az MI értékeket összehasonlítottuk más, ismert genotoxikus vegyületek hasonló körülmények között meghatározott értékeivel [274]. Habár az egyes porfirin származékok genotoxicitása között jelentős különbség van, de a fenti összehasonlítás alapján mindegyik a genotoxikus tartományban található.

A kationos porfirinek MI értékeit egymással összehasonlítva azt látjuk, hogy azok követik kötődési hajlandóságuk sorrendjét, azaz a TMPyP MI indexe a legkisebb (19. táblázat). A kötődés szerepét bizonyítja az is, hogy – mint azt a TMPyP példáján bemutattam – a porfirin/bázispár ($1/r$) értéket növelve a fáginaktiváció mértéke nő, kinetikája pedig egytalálatos jellegű a telítési koncentráció eléréséig (51. ábra).

A glikozilált szimmetrikus szubsztituált származéknak (TP(-4OgluOH)₄P) kísérleti rendszerünkben nem volt kimutatható genotoxicitása, az aszimmetrikusan szubsztituált (TP(-4OgluOH)₃P) származék MI értéke nagyobb – vagyis genotoxikus hatékonysága kisebb –, mint bármelyik kationos porfiriné. Ebben az esetben a T7 inaktivációjának mechanizmusát nem magyarázhatjuk a porfirin DNS kötődéssel. Feltételezhetjük, hogy a glikozilált tetrafenilporfirin származékok jelenléte a fehérje-DNS kapcsolatot destabilizálva fejt ki hatását.

Az irodalomban a porfirin származékok sötét toxicitására vonatkozóan kevés a szisztematikus vizsgálatból származó közlés. Ennek oka nyilván az, hogy a szerzők a porfirin származékok biológiai/klinikai hatása szempontjából elsődleges fotoreakcióra, annak hatékonyságára fordítják figyelmüket. A már gyógyszerként törzskönyvezett vegyületek sötét toxicitása a klinikai előírt dózisokban elhanyagolható [321]. Az új származékok sötét toxicitásának *in vitro* vizsgálata a fotoreakció kontrolljaként jelenik meg a közleményekben, mint például de Miranda és mtsai munkájában [322]. Ilyen esetekben a fotoreakció több nagyságrenddel hatékonyabb a sötét reakciónál, a sötét hatást elhanyagolhatónak tekintik a szerzők.

A kationos porfirinek (geno)toxicitásával kapcsolatos eredményünket támasztja alá Lopes és mtsai munkája, akik a TMPyP-t és annak Pt-komplexét toxikusnak találta mind Gram(+), mind Gram(-) baktériumokon sötétben [323]. Tovmasyan és mtsai [324] kationos porfirinek Ag-komplexeinek és ismert citotoxikus ágens (cisplatin) toxicitását tanulmányozták és hasonlították össze különböző sejtvonalakon. Azt találták, hogy az Ag-komplex toxicitása összevethető a cisplatinével, sőt meg is haladja azt. A sötét toxicitás részletes mechanizmusát egyik munkában sem tanulmányozták.

Kézenfekvő lehetne az a feltételezés, hogy a kationos porfirinek sötét hatása a DNS-sel való kölcsönhatásukkal magyarázható. Ez a feltevés igaz lehet a tesztrendszerünkben használt T7 bakteriofág esetében. Ugyanakkor az előző fejezetben láttuk, hogy a kérdéses vegyületek jelenléte nem mutatható ki a sejtmag környezetében. Nukleinsavakra irányuló hatás – ha van ilyen – csak a mitokondriális DNS-t vagy a citoplazmában található RNS-t érintheti [325,326]. Ennek a kérdésnek a megértése további vizsgálatokat tesz szükségessé.

Mindebből arra következtethetünk, hogy a kationos porfirinek bármely biológiai alkalmazásának tervezésekor ajánlott megvizsgálni a vegyületek genotoxicitását/citotoxicitását.

A porfirin származékok orvosi/biológiai felhasználásuk szempontjából egyik legfontosabb jellemzője fotokémiai hatékonyságuk. A glikozilált és kationos származékok T7 bakteriofággal szemben mutatott fototoxicitását jellemeztük inaktivációs hatáskeresztmetszetükkel (σ). Ennek alapján a nem konjugált kationos származékok mutatkoztak a leghatékonyabbnak (68. ábra, 23. táblázat). A TMPyP-vel szenzibilizált fotodinamikus reakció a víruspartikulumok számát mintegy nyolc nagyságrenddel képes csökkenteni [238], ami klinikai szempontból is figyelemre érdemes. A kationos porfirinek, különösen a TMPyP kiemelkedő antivirális hatékonysága alapján, klinikai bevezetésére vonatkozóan további kísérletek folynak [39,327].

Megjegyzem, hogy a vírusinaktivációban észlelt hatékonyság, különösen az amfifil, membrán struktúrákban lokalizálódó porfirinekre nézve nem ad megfelelő támpontot a sejtekben várható hatékonyságra és annak mechanizmusára nézve. A glikozilált porfirinek *in vitro* és *in vivo* hatékonyságát az irodalomban számos tanulmány bizonyította [328-330].

A különböző porfirin származékok hatékonyságában látott különbségek egyik oka lehet a származékok eltérő szingulett oxigén termelési hatásfoka. A referenciának tekinthető hematoporfirin szingulett oxigén termelési kvantumhatásfoka 0,64. Több glikozilált porfirin származék hatásfoka is ismert az irodalomban, ezek a 0,42-0,55 tartományban változnak [331]. A szabad bázisú tetrakationos porfirin kvantumhatásfoka ennél nagyobb (0,77), néhány fém komplexéé pedig még ennél is kedvezőbb, 0,75-0,98 [332].

A porfirin származékok jodometriás titrálással általunk meghatározott relatív szingulett oxigén termelési hatékonysága (65. ábra) összhangban van az irodalmi ismeretekkel. Az irodalmi adatoknak megfelelően a kationos porfirinek ebben az összehasonlításban is hatékonyabbnak bizonyultak, mint a glikozilált származékok. A tetrapeptid oldalláncok kapcsolása a TMPCP-hez illetve BMPCP-hez szignifikánsan csökkenti azok szingulett oxigén termelési hatékonyságát. A relatív szingulett oxigén termelési hatékonyságot matató görbék kezdeti meredeksége, azok sorrendje alátámasztja a származékok vírusinaktivációs hatáskeresztmetszetének különbözőségét.

A jodometriás titrálással kapott görbéken látott abszorbancia növekedése – vagyis a szingulett oxigén termelés - a kezdeti lineáris változás után minden esetben telítés felé hajlik. Ennek egyik oka lehet a porfirin származék fotokémiai bomlása/átalakulása.

A glikozilált porfirinek fotodegradációjának egyik oka abban keresendő, hogy a fotodegradáció különösen, de nem kizárólagosan, érintheti a porfirinek aggregátumait [333]. A vizsgált koncentráció tartományban a glikozilált származékok aggregációja nem elhanyagolható [236], míg a töltéssel rendelkező származékok nem aggregálódnak (TMPyP)

illetve aggregációs állandójuk kisebb (TMPCP, BMPCP), mint a neutrális formáké. Ez a jelenség részben magyarázhatja a kationos porfirinek nagyobb hatékonyságát is.

A szingulett oxigén keletkezését mutató görbék (65. ábra) kezdeti meredekségének csökkenését a fotodegradáció mellett okozhatja oldott alap állapotú oxigén koncentrációjának besugárzás során bekövetkező csökkenése is. Ezt támasztja alá, hogy a kationos porfirin koncentrációjának növelése növeli ugyan a görbék kezdeti meredekségét – ennek egy példáját látjuk a TMPCP példáján a 65.C ábrán –, de a telítési érték közelítése egyre kisebb beeső dózisoknál következik be. A kezdeti meredekségek azonban így is jó alapot adnak az egyes vegyületek összehasonlítására.

A szingulett oxigén közvetítésével lejátszódó I típusú fotokémiai reakció a porfirin származékok hatásának csak egyik lehetséges mechanizmusa. Az I és II reakciótípusok kimutatásának érdekében a vírusinaktivációs kísérleteket elvégeztük az egyes reaktív termékekre specifikus scavengerek jelenlétében. Mint az a 67. ábrából és a 23. táblázat adataiból kitűnik, **mindkét scavenger csökkenti a vírusinaktiváció hatáskeresztmetszetét, de egyik esetben sem kapunk 0 értéket. Vagyis mind a szingulett oxigén, mind a szabad gyökök jelenléte hozzájárul a bakteriofág fertőzőképességének elvesztéséhez.** A két folyamat relatív hozzájárulása a fototoxikus hatáshoz az egyes porfirin származékok esetében igen különböző lehet.

Az I és II típusú fotokémiai reakció vírusinaktivációban kimutatható jelentőségére közölt adatok az irodalomban nem egyértelműek. Az eredményeket befolyásolja a fényérzékenyítő szerkezete, a besugárzás körülményei, a sérülések kimutatásának módszere, de általános vélemény, hogy a két reakciótípus párhuzamosan játszódik le [215,334,335].

Eredményeink alapján érdemes észrevenni, hogy a scavengerek jelenlétében kapott inaktivációs hatáskeresztmetszetek összege rendre kisebb, mint a nélkülük kapott értékek. Tekintetbe véve σ additív jellegét ez arra mutat, hogy **a különböző reaktív termékek – szingulett oxigén és szabad gyökök – együttes jelenléte fokozza a genotoxikus hatás kialakulásának lehetőségét.**

Általánosan elfogadott feltételezés, és membránban lokalizálódó porfirin származékok esetében meggyőzően bizonyított tény, hogy a ROS termékek, különösen a szingulett oxigén rövid szabad úthossza miatt a porfirin és a cél struktúra közelsége elengedhetetlen a fotokémiai hatás kialakulása számára [336]. Ennek alapján felmerült a kérdés, hogy a kationos porfirinek vírusinaktivációban mutatott hatékonyságának – a nagyobb ROS termelési hatásfokon túl – oka lehet a DNS környezetében való elhelyezkedésük. Ennek igazolására összehasonlítottuk az

inaktivációs hatáskeresztmetszetet (σ) jó közelítéssel csak kötött, illetve kötött és szabad TMPyP-t tartalmazó oldatokban, valamint a σ változását a porfirin koncentrációjával (68. ábra). A nem kötött porfirin megjelenése jelentősen növeli σ értékét, továbbá a szabad porfirin koncentrációjának növelésével az inaktivációs hatáskeresztmetszet is meredeken nő.

A 68. ábrán szemléltetett eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a **DNS-hez nem kötött porfirin szignifikánsan nagyobb hatékonyságú a vírusinaktiváció szempontjából, mint a kötött forma.**

A DNS-hez való kötődés fotokémiai hatékonyságot csökkentő hatásának több oka lehet. Chirvony [338] kimutatta, hogy az interkalált TMPyP gerjesztett S_1 és T_1 állapotát a guanin bázisok kioltják. A kioltási folyamat hatékonysága függ a lokális oxigén koncentrációtól. Az interkalált forma elhanyagolható szingulett oxigén termelési hatásfokáról számoltak be Kruk és mtsai is [338]. A porfirin triplet gerjesztett állapotának kioltása, a kis lokális oxigén koncentráció, továbbá az interkalált TMPyP számottevő hipokromicitása együttesen eredményezhetik a kis fotokémiai hatékonyságot.

Az interkalált kationos porfirin csekély hozzájárulása a fotodinamikus inaktivációhoz nem előnyös tulajdonság. A jelenség alapján azonban a DNS – kationos porfirin kölcsönhatás új alkalmazási lehetőségének gondolatát vetették fel Gothelf és munkacsoportja [339]. Javaslatuk szerint interkaláló kationos porfirint tartalmazó elegyekben a DNS, mint a fotoszenzibilizáló hatékonyságát és mechanizmusát szabályozó partner szerepelhet. A gondolat gyakorlati megvalósítására irányuló eredményeket foglalták össze a közelmúltban Wang és mtsai [340].

A fotodinamikus vírusinaktiváció klinikai alkalmazásának szempontjából fontos az indirekt fotokémiai reakció támadáspontjának azonosítása. Elemeztük a glikozilált és kationos porfirinek a T7 bakteriofág fehérje vagy nukleinsav komponenseiben okoz-e fotokémiai sérüléseket. Feltettük a kérdést, hogy elérhető-e a specifikusan DNS támadáspontú vírusinaktiváció kationos porfirinek alkalmazásával.

Megállapíthatjuk, hogy a **glikozilált porfirin** származékok által szenzibilizált fotokémiai reakció destabilizálja a T7 kapszid szerkezetét illetve a DNS-fehérje kapcsolatot (69. ábra), de nem befolyásolja az intrafág DNS láncszétválási hőmérsékletét. A DNS sérülések hiányára utal az is, hogy a glikozilált származékokkal való kezelés hatására nem csökken az amplifikálható DNS mennyisége. A DNS-hez nem kötődő glikozilált porfirin származékok vírusinaktiváló hatásának hátterében tehát a fehérjeszerkezetben okozott sérülések keresendők.

A kationos porfirin származékok fotokémiai hatása markánsan megváltoztatja a T7 fág mindkét fázisátalakulási lépését. Csökkenti a kapszid termikus stabilitását, a kapszidra jellemző

átmenet kooperativitását, sőt a kapszid teljes széteséséhez vezet (70. ábra). A fehérje kapszid érintettségét bizonyították Majiya és mtsai, akik kimutatták [341], hogy TMPyP-vel szenzibilizált MS2 bakteriofágok fotoinaktivációjának elsődleges oka a kapszid A-proteinjének oxidatív sérülése.

A fehérje kapszidban okozott változásokon túl, a fotodinamikus kezelés érinti a DNS láncszétválasztási folyamatának kooperativitását. A megvilágító fény azonos beeső dózisainál a hatás mértéke – összhangban a szabad porfirin nagyobb vírusinaktiváló hatékonyságával – mindig nagyobb, ha szabad porfirin van a rendszerben.

A fotoszenzibilizált és megvilágított T7 fág minták gélelektroforetikus elemzése azt mutatja, hogy a dózis függvényében a szabaddá váló DNS mennyisége csökken, ami a DNS oxidatív sérülésével és/vagy DNS-fehérje keresztkötések kialakulásával magyarázható [342,343].

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a fehérje kapszidban fotokémiai sérüléseket okozhatnak mind a DNS-hez nem kötődő glikozilált, mind a DNS-hez kötődő kationos porfirin származékok. Ez utóbbi még akkor is igaz, ha a rendszerben csak DNS-hez kötött porfirin van jelen. A DNS-ben okozott sérülések ugyanakkor csak a kationos porfirinek esetében járulnak hozzá a vírus inaktivációjához.

7. Az eredmények gyakorlati jelentősége

A fényérzékenyítők közvetítésével lejátszódó fotodinamikus reakciót az orvostudomány egyre több területen alkalmazza, többek között korai stádiumban lévő malignus daganatok eltávolításában (PDT), az időskori makuladegeneráció kezelésében, az érfali plakkok eltávolításában, vagy mint antimikrobiális eljárások része [344].

A porfirin származékok legfontosabb biomedicinális alkalmazása a PDT. A már ismert és eredményesen alkalmazott, törzskönyvezett származékok mellett folyamatos intenzív kutatás folyik az eljárás hatékonyságát és specifitását növelő származékok felderítése érdekében.

A glikozilált porfirin származékok lokalizációjára vonatkozó eredményeink rámutattak arra, hogy az aszimmetrikus térszerkezet és amfifil karakter előnyösen befolyásolja a sejtmembránon belüli elhelyezkedést. Ezt figyelembe véve további glikozilált konjugátumok tervezése és szintézise valósult meg. Ezek hatékonyságát a malignus sejtek nekrozisában in vitro és in vivo kísérletek is bizonyították [328-330].

A fotodinamikus reakció hatásának szelektivitását részben biztosítja a megvilágító fény irányított alkalmazása. Tovább növelhető a szelektív hatás a fényérzékenyítő aktivitásának módosításával [345]. Kimutattuk, hogy a TMPyP fotofizikai paraméterei, fotobiológiai hatékonysága jelentősen módosul DNS-hez való kötődéskor. Ezzel a fényérzékenyítő lokális deaktiválása/aktiválása érhető el [346].

A vírusfertőzések leküzdése és terjedésének megakadályozása folyamatos kihívást jelent az orvostudomány számára. A fotodinamikus vírusinaktiváció (PDI) már eddig is szerepelt a sikerrel alkalmazott módszerek sorában. A glikozilált, de különösen a kationos porfirin származékok hatékony fényérzékenyítőknek bizonyultak a peplon nélküli modell vírus inaktivációjában. Ez jelentős előrelépés a peplon nélküli patogén vírusok elleni fellépésben. Az inaktiváció hatásmechanizmusával kapcsolatos eredményeink hozzájárulhatnak a PDI hatékonyságának növeléséhez, a vérkészítmények és víztartalékok fertőtlenítésében már alkalmazott eljárások fejlesztéséhez [39,347].

Eredményeink hozzájárultak a porfirin-DNS komplexeket tartalmazó nanorészecskék tervezéséhez és gyakorlati felhasználásának kidolgozásához is. A TMPyP és DTTCI hatékony FRET donor-akceptor párt képezhet [290]. Az ehhez szükséges megfelelő térbeli elhelyezkedésüket a DNS lánc biztosíthatja, amihez mindkét vegyület interkalációval kapcsolódhat. Az így kialakuló struktúra ígéretes kiindulása lehet nanorészecskék tervezésének. A porfirin származék DNS-hez kapcsolódása révén megjelenő indukált kiralitása alapot adhat kiralitás felismerő nanostruktúrák tervezéséhez, előállításához [291].

8. Hivatkozások jegyzéke

1. Ding, Y., Tang, Y., Zhu, W., Xie, Y. (2015) Fluorescent and colorimetric ion probes based on conjugated oligopyrroles. *Chem. Soc. Rev.* 44, 1101-1112.
2. Di Natale, C., Monti, D., Paolesse, P. (2010) Chemical sensitivity of porphyrin assemblies. *Materials Today* 13, 46-52.
3. Zenkevich, E.I., Von Borczyskowski, C. (2014) Self-organization principles in the formation of multiporphyrin complexes and semiconductor quantum dot-porphyrin nanoassemblies. *J. Porph. Phthalocyan.* 18, 1-19.
4. Korendovych, I.V., Senes, A., Kim, Y.H., Lear, J.D., Fry, C., Therien, M.J., Blasie, J.K., Walker, F.A., DeGrado W.F. (2010) De novo design and molecular assembly of a transmembrane diporphyrin-binding protein complex. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15516-15518.
5. Peacock, A.F.A. (2013) Incorporating metals into de novo proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 934-939.
6. Abrahamse, H., Hamblin, M.R. (2016) New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* 473, 347-364.
7. Santarelli, M., Diplotti, L., Samassa, F., Veritti, D., Kuppermann, B.D., Lanzetta, P. (2015) Advances in pharmacotherapy for wet age-related macular degeneration *Exp. Opin. Pharmacother.* 16, 1769-1781.
8. Kereiakes, D.J., Szyniszewski, A.M., Wahr, D., Herrmann, H.C., Simon, D.I., Rogers, C., Kramer, P., Shear, W., Yeung, A.C., Shunk, K.A., Chou, T.M., Popma, J., Fitzgerald, P., Carroll, T.E., Forer, D., Adelman, D.C., (2003) Phase I Drug and Light Dose-Escalation Trial of Motexafin Lutetium and Far Red Light Activation (Phototherapy) in Subjects With Coronary Artery Disease Undergoing Percutaneous Coronary Intervention and Stent Deployment Procedural and Long-Term Results. *Circulation* 108, 1310-1315.
9. Jain, M., Zellweger, M., Frobert, A., Valentin, J., van den Bergh, H., Wagnières, G., Cook, S., Giraud, M. (2016) Intra-arterial drug and light delivery for photodynamic therapy using Visudyne®: Implication for atherosclerotic plaque treatment. *Front Physiol.* 7, Article number: 400.
10. Tosti, G., Iacobone, A.D., Preti, E.P., Vaccari, S., Barisani, A., Pennacchioli, E., Cantisani, C. (2018) The Role of Photodynamic Therapy in the Treatment of Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *Biomed.* 6, Article Number: 13
11. Wiznia, L.E., Quatrano, N.A., Mu, E.W., Rieder, E.A. (2017) A Clinical Review of Laser and Light Therapy for Nail Psoriasis and Onychomycosis. *Dermatol. Surg.* 43, 161-172.
12. Nitzan, Y., Nisnevitch, M. (2013) Special features of Gram-positive bacterial eradication by photosensitizers *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 8, 88-99.
13. Costa, L., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Cunha, A., Almeida, A. (2012) Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses* 4, 1034-1074.
14. Moan, J. (1990) On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 6, 343-344.
15. Moore, J.V., West, C. M. L., Whitehurst, C. (1997) The biology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* 42. 913-935.

16. Skovsen, E., Snyder, J. W., Lambert, J. D. C., Ogilby, P. R. (2005). Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell. *J. Phys. Chem. B* 109, 8570-8573.
17. Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 1, 79-293.
18. Jori, G., Reddi, E. (1993) The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.* 25, 1369-1375.
19. von Tappeiner, H., Jesionek, A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 50, 2040-2051.
20. Raab, O. (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.*, 39, 524-546.
21. von Tappeiner, H., Jodlbauer, A. (1907) Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen in Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. F. G. W. Vogel, Leipzig
22. Meyer-Betz, F., (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivative des Blut- und Gallenfarbstoffs. *Deutsches Arch. Klin. Med.* 112,476-503.
23. Lipson, R., Baldes, E. (1960) The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative *Arch. Dermatol.* 82, 508-516.
24. Foote, C.S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science* 162, 963–970.
25. Henderson, B.W., Dougherty, T.J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145–157.
26. Bacellar, I.O.L., Tsubone, T.M., Pavani, Ch., Baptista, M.S. (2015) Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int. J. Mol Sci.* 16, 20523–20559.
27. Dougherty, T.J. (1974) Activated dyes as antitumor agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 1333–1336.
28. Dougherty, T.J., Kaufman, J.E., Goldfarb, A., Weishaupt, K.R., Boyle, D.G., Mittleman, A. (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 38, 2628-2635.
29. Dougherty, T. J. (1987) Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* 45, 879-889.
30. Dougherty, T. J., Weishaupt, K., Potter, W. (1987) Drugs comprising porphyrins. United States Patent No. 4649151.
31. Hueger, B. E., Lawter, J. R., Waringrekar, V. H., Cucolo, M. C. (1991) Stable freeze-dried polyhematoporphyrin ether/ester. United States Patent No. 5059619,
32. Jori, G., Reddi, E. (1991) Second generation photosensitizers for the photodynamic therapy of tumours. In: *Light in Biology and Medicine* (eds. Douglas R.H., Moan J, Rontó G, editors) New York: Plenum Press; pp. 253-266.
33. Fan, K.F., Hopper, C., Speight, P.M., Buonaccorsi, G.A., Bown S.G. (1997) Photodynamic therapy using m-THPC for malignant disease on the oral cavity. *Int. J. Cancer* 73, 25-32.

34. Newman, D.K. (2016) Photodynamic therapy: current role in the treatment of chorioretinal conditions. *Eye (Lond)*. 30, 202-10.
35. Qian, T, Li, X, Zhao, M, Xu, X. (2017) Polypoidal choroidal vasculopathy treatment options: a meta-analysis. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, 1-14.
36. Rosenthal, I. (1991) Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 53, 859-870.
37. García-Sánchez, M.A., Rojas-González, F., Menchaca-Campos, E.C., Tello-Solís, S.R., Quiroz-Segoviano, R.I., Díaz-Alejo, L.A., Salas-Bañales, E., Campero, A. (2013) Crossed and linked histories of tetrapyrrolic macrocycles and their use for engineering pores within sol-gel matrices. *Molecules* 18, 588-653.
38. Bottari, G., Herranz, M.Á., Wibmer, L., Volland, M., Rodríguez-Pérez, L., Guldi, D.M., Hirsch, A., Martín, N., D'Souza, F., Torres, T. (2017) Chemical functionalization and characterization of graphene-based materials. *Chem. Soc. Rev.* 46, 4464-4500.
39. Wainwright, M., Baptista, M.S. (2011) The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 8, 240-248.
40. Smetana, Z., Mendelson, E., Manor, J., van Lier, J.E., Ben-Hur, E., Salzberg, S., Malik, Z. (1994) Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 22, 37-43.
41. Piette, J., Legrand-Poels, S. (1994) Photoactivation of the human immunodeficiency virus type 1 involves complex signaling pathways. In: *Photobiology in Medicine* (eds. Jori, G., Pottier, R.H., Rodgers, M.A.J., Truscott, T.G.) NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 272. Springer, Boston, MA pp 143-160.
42. Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Mielcarek, J., Goslinski, T., Balzarini, J. (2015) Photosensitizers mediated photodynamic inactivation against virus particles. *Mini Rev. Med. Chem.* 15, 503-521.
43. Kessel, D., Woodburn, K., Henderson, B.W., Chang, C.K. (1995) Sites of photodamage in vivo and in vitro by cationic porphyrin. *Photochem. Photobiol.* 62, 875-881.
44. Jensen, T.J., Vicente, M.G., Luguya, R., Norton, J., Fronczek, F.R., Smith, K.M. (2010) Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2, 100-111.
45. Malatesti, N., Munitic, I., Jurak, I. (2017) Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys. Rev.* 9, 149-168.
46. Malik, Z., Ladan, H., Nitzan, Y. (1990) Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 5, 281-293.
47. Bertoloni, G., Salvato, B., Dall'Aqua, M., Vazzoler, M., Jori, G. (1984) Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *Photochem. Photobiol.* 39, 811-816.
48. Bertoloni, G., Rossi, F., Valduga, G., Jori, G., Ali, H., van Lier, J. (1992) Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Micribios.* 71, 33-46.

49. Nitzan, Y., Dror, R., Ladan, H., Malik, Z., Kimel, S., Gottfried V. (1995) Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol.* 62, 342-347.
50. Malik, Z., Ladan, H., Nitzan, Y. (1992) Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 14, 262–266.
51. Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56, 395–411.
52. Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villaneuva, A., Jori G. (1996) Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 32, 153-157.
53. Sperandio, F.F., Huang, Y.-Y., Michael R Hamblin, M.R. (2013) Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 8, 108–120.
54. Winkelman, J. (1962) The distribution of tetraphenylporphinesulfonate in the tumor-bearing rat. *Cancer Res.* 22, 589-596.
55. Zima, T., M. Jirsa, M. Jirsa Jr, M. Jiráscová, V. Bradová, B. Stádník, B. (2004) Effect of chloroquine wash-out period of photosensitizers in the skin and selected organs in rats. *Physiol. Res.* 53, 103-108.
56. Gonçalves, P.J., De Boni, L., Barbosa, Neto, N.M., Rodrigues, J.J., Zilio, S.C., Borissevitch I.E. (2005) Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra(sulfonatophenyl) porphyrin. *Chem. Phys. Lett.* 407, 236-241.
57. Yaku, H., Murashima, T., Miyoshi, D., Sugimoto, N. (2005) Specific Binding of Anionic Porphyrin and Phthalocyanine to the G-Quadruplex with a Variety of in Vitro and in Vivo Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60, 79-191.
58. Silva, I., Sansone, S., Brancalion, L. (2009) An anionic porphyrin binds beta-lactoglobulin A at a superficial site rich in lysine residues. *The Protein Journal* 28, 1-13.
59. Meerovich, I.G, Jerdeva, V., Derkacheva, V.M., Meerovich, G.A., Lukyanets, E.A., Kogan, E.A., Savitsky, A.P. (2005) Photodynamic activity of dibiotinylated aluminum sulfophthalocyanine in vitro and in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 80, 57-64.
60. Momenteau, M., Looock, B., Bisagni, E., Rougee, M. (1979) Five-coordinate iron(II) porphyrins derived from meso- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ tetraphenylporphin: synthesis, characterization, and coordinating properties. *Can. J. Chem.* 57, 1804-1813.
61. Hombrecher, H.K., Gherdan, V.M., Ohm, S., Cavaleiro, J.A.S., Graça, M., Neves, P.M.S., Condesso, M.F. (1993) Synthesis and electrochemical investigation of β -alkyloxy substituted meso-tetraphenylporphyrins. 49, 8569-8578.
62. Crossley, M.J., Govenlock, L.J., Prashar, J.K.J. (1995) Synthesis of porphyrin-2,3,12,13- and -2,3,7,8-tetraones: building blocks for the synthesis of extended porphyrin arrays. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 0, 2379-2380.
63. Ricchelli, F., Jori, G., Moreno, G., Vinzens, F., Salet, C. (1990) Factors influencing the distribution pattern of porphyrins in cell membranes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 6, 69-77.

64. Oenbrink, G., Jurgenlimke, P., Gabel, D. (1988) Accumulation of porphyrins in cells: Influence of hydrophobicity, aggregation and protein binding. *Photochem. Photobiol.* 48, 451-456.
65. Moylan, C., Eoin, M., Scanlan, E.M., Senge, M.O. (2015) Chemical synthesis and medicinal applications of glycoporphyrins. *Curr. Med. Chem.* 22, 2238-2348.
66. Maillard, Ph., Huel, C., Momenteau, M. (1992) Synthesis of new mesotetrakis (glycosylated) porphyrins. *Tetrahedron Lett.* 33, 8081-8084.
67. Maillard, P., Guerquin-Kern, J.-L., Huel, C., Momenteau, M. (1993) Glycoconjugated Porphyrins. 2. Synthesis of sterically constrained polyglycosylated compounds derived from tetraphenylporphyrins. *J. Org. Chem.* 58, 2774-2780.
68. Maillard, Ph., Hery, C., Momenteau, M. (1997) Synthesis, characterization and photocytotoxicity of a glycoconjugated meso-monoarylbenzochlorin. *Tetrahedron Lett.* 38, 3731-3734.
69. Oulmi, D., Maillard, Ph., Guerquin-Kern, J.-L., Huel, Ch., Momenteau, M. (1995) Glycoconjugated Porphyrins. 3. Synthesis of flat amphiphilic mixed meso-(glycosylated aryl)arylporphyrins and mixed meso-(glycosylated aryl)alkylporphyrins bearing some mono- and disaccharide groups. *J. Org. Chem.* 60, 1554-1564.
70. Oulmi, D., Maillard, Ph., Vever-Bizet, C., Momenteau, M., Brault, D. (1998) Glycosylated porphyrins: characterization of association in aqueous solutions by absorption and fluorescence spectroscopies and determination of singlet oxygen yield in organic media. *Photochem. Photobiol.* 67, 511-518.
71. Barge, J., Decréau, R., Julliard, M., Hubaud, J.C., Sabatier, A.S., Grob, J.J., Verrando, P. (2004) Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. *Exp. Dermatol.* 13, 33-44.
72. Taquet, J.P., Frochot, C., Manneville, V., Barberi-Heyob, M. (2007) Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* 14, 1673-87.
73. Osati, S., Ali, H., Guérin, B., Van Lier, J.E. (2017) Steroid-photosensitizer conjugates: Syntheses and applications. *J. Porph. Phthal.* 21, 701-730.
74. Shiraishi, T., Nielsen, P.E. (2011) Enhanced cellular delivery of cell-penetrating peptide-peptide nucleic acid conjugates by photochemical internalization. *Meth. Mol. Biol.* 683, 391-397.
75. Kitagishi, H., Hatada, S., Itakura, T., Maki, Y., Maeda, Y., Kano, K. (2013) Cellular uptake of octaarginine-conjugated tetraarylporphyrin included by per-O-methylated β -cyclodextrin. *Org. Biomol. Chem.* 11, 3203-3211.
76. Dosselli, R., Gobbo, M., Bolognini, E., Campestrini, S., Reddi, E. (2010) Porphyrin-apidaecin conjugate as a new broad spectrum antibacterial agent. *ACS Med. Chem. Lett.* 1, 35-38.
77. Dosselli, R., Ruiz-González, R., Moret, F., Agnolón, V., Compagnin, C., Mognato, M., Sella, V., Agut, M., Nonell, S., Gobbo, M., Reddi, E. (2014) Synthesis, spectroscopic, and photophysical characterization and photosensitizing activity toward prokaryotic and eukaryotic cells of porphyrin-magainin and -butorin conjugates. *J. Med. Chem.* 57, 1403-1415.

78. Bisland, S.K., Singh, D.a., Gariépy, J. (1999) Potentiation of chlorin e6 photodynamic activity in vitro with peptide-based intracellular vehicles. *Bioconjug. Chem.* 10, 982-992.
79. Asayama, S., Kawamura, E., Nagaoka, S., Kawakami, H. (2006) Design of manganese porphyrin modified with mitochondrial signal peptide for a new antioxidant. *Mol. Pharmac.* 3, 468-470.
80. Orosz, A., Csik G, (2016) Peptide/protein conjugates of photosensitizers. in *Amino Acids, Peptides and Proteins, Volume 40*, (eds, Ryadnov, M. and Hudecz F.) Royal Society of Chemistry, London pp 100-145.
81. Singh, D.K., Nath, M. (2015) Meso-Phenyl-triazole bridged porphyrin-coumarin dyads: Synthesis, characterization and photophysical properties. *Dyes and Pigments* 121, 256-264.
82. Cerqueira, A.F.R., Almodôvar, V.A.S., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C. (2017) Coumarin-tetrapyrrolic macrocycle conjugates: Synthesis and applications. *Molecules* 22, AN 994
83. Gianferrara, T., Bratsos, I., Iengo, E, Milani, B.b, Oštrić, A., Spagnul, C, Zangrando, E., Alessio, E. (2009) Synthetic strategies towards ruthenium-porphyrin conjugates for anticancer activity. *Dalton Transactions* 48, 10742-10756.
84. Musetti, Dr, C., Spagnul, C., Mion, G., Da Ros, S., Gianferrara, T., Sissi, C. (2015) DNA targeting by cationic porphyrin-ruthenium(II) conjugates. *ChemPlusChem* 80, 158-168.
85. Sasaki, H., Sasaki, S. (2013) B-Z transition of (dA-T)_n duplexes induced by a spermine porphyrin-conjugate via an intermediate DNA conformation. *Chem. Comm.* 49, 9024-9026.
86. Biron, E., Voyer, N. (2008) Towards sequence selective DNA binding: Design, synthesis and DNA binding studies of novel bis-porphyrin peptidic nanostructures. *Org. Biomol. Chem.* 6, 2507-2515.
87. He, H., Zhou, Y., Liang, F., Li, D., Wu, J., Yang, L., Zhou, X., Zhang, X., Cao, X. (2006) Combination of porphyrins and DNA-alkylation agents: Synthesis and tumor cell apoptosis induction. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 1068-1077.
88. Garcia, G., Sarrazy, V, Sol, V.a, Morvan, C.L., Granet, R., Alves, S., Krausz, P. (2009) DNA photocleavage by porphyrin-polyamine conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 767-776.
89. Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D, Korbelik, M.f, Moan, J., Peng, Q. (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889-905.
90. Horne, T.K., Cronjé, M.J. (2017) Mechanistics and photo-energetics of macrocycles and photodynamic therapy: An overview of aspects to consider for research. *Chem. Biol. Drug Design* 89, 221-242.
91. Santus, R., Reyftmann, J.F. (1986) Photosensitization of membrane components. *Biochimie* 68, 843-848.
92. Munday, A.D., Sriratana, A., Hills, J.S., Kahl, S.B., P. Nagley, P. (1996) Mitochondria are the functional intracellular target for a photosensitizing boronated porphyrin. *BBA - General Subjects* 1311, 1-4.
93. Zhao, H., Xing, D., Chen, Q. (2011) New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer* 47, 2750-2761.

94. Peng, Q., Farrants, G.W., Madslén, K., Bommer, J.C., Moan, J., Danielsen, H.E., Nesland, J.M. (1991) Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminium phthalocyanines in a human melanoma cell line. *Int. J. Cancer* 49, 290-295.
95. Wessels, J. M., Straub, W., Seidlitz, H.K., Rück, A., Schneckenburger, H. (1992) Intracellular localization of mesotetraphenylporphine tetrasulfonate probed by time-resolved and microscopic fluorescence spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 12, 275-284.
96. Bergstrom, L.C., Vucenik, I., Hagen, I.K., Chernomorsky, S.A., Poretz, R.D. (1994) In vitro photocytotoxicity of lysosomotropic immunoliposomes containing pheophorbide a with human bladder carcinoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 24, 17-23.
97. Sanz-Rodríguez, F. , Casas, A. , González, S. (2009) Preclinical photodynamic therapy research in Spain 4: Cytoskeleton and adhesion complexes of cultured tumor cells as targets of photosensitizers *J. Porph. Phthalocyan.* 13, 552-559.
98. Villanueva, A, Canete, M., Trigueros, C., Rodriguez-Borlado, L., Juarranz, A. (1993) Photodynamic induction of DNA-protein cross-linking in solution by several sensitizers and visible light. *Biopolymers* 33, 239-244.
99. Gantchev, T. G., Gowans, B.J., Hunting, D.J., Wagner, J.R., van Lier, J.E. (1994) DNA strand scission and base release photosensitized by metallo-phthalocyanines. *Int. J. Radiat. Biol.* 66. 705-716.
100. Kurbanyan, K., Nguyen, K.L., To, P., Riva,s E.V., Lueras, A.M.K., Kosinski, C., Steryo, M., González, A., Mah, D.A., Stemp, E.D.A. (2003) DNA-protein cross-linking via guanine oxidation: Dependence upon protein and photosensitizer. *Biochemistry* 42, 10269-10281.
101. Kessel, P. (1977) Effects of Photoactivated Porphyrins at the Cell Surface of Leukemia L1210 Cells. *Biochemistry* 16, 3443-3449.
102. Kessel, D. (2016) PDT: Death and survival pathways in *Handbook of Photodynamic Therapy: Updates on Recent Applications of Porphyrin-Based Compounds* (eds. Pandey, R.K., Kessel, D., Dougherty, T.J.) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. pp. 319-334.
103. Ricchelli, F., Jori, G., Gobbo, S. (1991) Tronchin, M. Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. *BBA - Biomembranes* 1065, 42-48.
104. Ricchelli, F., Stevanin, D., Jori, G. (1988) Porphyrin-liposome interactions: Influence of the physico-chemical properties of the phospholipid bilayer. *Photochem. Photobiol.* 48, 13-18.
105. Aramendia, P.F., Krieg, M., Nitsch, C., Bittersmann, E., Braslavsky, S.E. (1988) The photophysics of merocyanine 540. A comparative study in ethanol and liposomes. *Photochem. Photobiol.* 48, 187-194.
106. Williamson, P., Mattocks, K., Schlegel, R.A. (1983) Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *BBA - Biomembranes*, 732, 387-393.
107. Minnes, R., Weitman, H., Ehrenberg, B. (2007) The effect of lipid composition, bilayer phase and temperature on the uptake of hematoporphyrin by liposomal membranes. *J. Porph. Phthalocyan.* 11, 577-585.
108. Makky, A., Michel, J.P., Ballut, S., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V. (2010) Effect of cholesterol and sugar on the penetration of glycodendrimeric phenylporphyrins into biomimetic models of retinoblastoma cells membranes. *Langmuir* 26, 11145-11156.

109. Kępczyński, M., Pandian, R.P., Smith, K.M., Ehrenberg, B. (2002) Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water? *Photochem. Photobiol.* 76, 127-134.
110. Ben-Dror, S., Bronshtein, I., Wiehe, A., Röder, B., Senge, M.O., Ehrenberg, B. (2006) On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 82, 695-701.
111. Aveline, B.M., Hasan, T., Redmond, R.W. (1994) Photophysical and photosensitizing properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring (BPD-MA). *Photochem. Photobiol.* 59, 328-335.
112. Gillies, R., Kollias, N., Hasan, T., Diddens, H. (1996) Spectral characterization of the benzoporphyrin derivative monoacid ring-A photoproduct formed in fetal calf solutions during irradiation with 694 nm continuous-wave radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 33, 87-90.
113. Margalit, R., Shaklai, N., Cohen, S., (1983) Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin IX and its haemato derivative. *Biochem. J.* 209, 547-552.
114. Cohen, S., Margalit, R. (1986) Physicochemical studies of processes involving potential photodynamic drugs on route to their targets: Self-aggregation and membrane-binding of Zn-hematoporphyrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 57-61.
115. Mojzisova, H., Bonneau, S., Vever-Bizet, C., Brault, D. (2007) Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *BBA – Biomembranes* 1768, 2748-2756.
116. Frolov, A.A., Zenkevich, E.I., Gurinovich, G.P., Kochubeyev, G.A (1990) Chlorin e6-liposome interaction. Investigation by the methods of fluorescence spectroscopy and inductive resonance energy transfer. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 7, 43-56.
117. Veres, D., Böcskei-Antal, B., Voszka, I., Módos, K., Csík, G., Kaposi, A.D., Fidy, J., Herenyi, L. (2012) Comparison of binding ability and location of two mesoporphyrin derivatives in liposomes explored with conventional and site-selective fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 116, 9644-9652.
118. Rotenberg, M., Margalit, R. (1987) Porphyrin-membrane interactions: binding or partition? *BBA - Biomembranes* 905, 173-180
119. Cohen, S., Margalit, R. (1985) Binding of hematoporphyrin derivative to membranes. Expression of porphyrin heterogeneity and effects of cholesterol studied in large unilamellar liposomes. *BBA – Biomembranes* 813, 307-312.
120. Aharon, D., Weitman, H., Ehrenberg, B. (2011) The effect of liposomes' surface electric potential on the uptake of hematoporphyrin. *BBA- Biomembranes* 1808, 2031-2035.
121. Ehrenberg, B., Malik, Z., Nitzan, Y. (1985) Fluorescence spectral changes of hematoporphyrin derivative upon binding to lipid vesicles, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cells. *Photochem. Photobiol.* 41, 429-435.
122. Sekher, P., Garbo, G.M (1993) Spectroscopic studies of tin ethyl etiopurpurin in homogeneous and heterogeneous systems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 20, 117-125
123. Rodriguez, M.E., Awruch, J., Dicelio, L (2002) Photophysical properties of Zn(II) phthalocyaninates incorporated into liposomes. *J. Porph. Phthalocyan.* 6, 122-129.

124. Nunes, S.M.T., Sguilla, F.S., Tedesco, A.C. (2004) Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 273-284.
125. Plant, A.L. (1986) Mechanism of concentration quenching of a xanthene dye encapsulated in phospholipid vesicles. *Photochem. Photobiol.* 44, 453-459.
126. Ricchelli, F., Gobbo, S. (1995) Porphyrins as fluorescent probes for monitoring phase transitions of lipid domains in biological membranes. Factors influencing the microenvironment of haematoporphyrin and protoporphyrin in liposomes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 29, 65-70.
127. Ricchelli, F., Jori, G. (1986) Distribution of porphyrins in the various compartments of unilamellar liposomes of dipalmitoyl-phosphatidylcholine as probed by fluorescence spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 44, 151-157.
128. Gross, E., Ehrenberg, B. (1989) The partition and distribution of porphyrins in liposomal membranes. A spectroscopic study. *BBA - Biomembranes* 983, 118-122.
129. Kuszaj S., Kaszycki P., Wasylewski Z. (1996) A fluorescence quenching study on protoporphyrin IX in a model membrane system. *Chem. Phys. Lipids* 83, 153-160.
130. Wiehe, A., Simonenko, E.J., Senge, M.O., Röder, B. (2001) Hydrophilicity vs hydrophobicity - Varying the amphiphilic structure of porphyrins related to the photosensitizer m-THPC. *J. Porph. Phthalocyan.* 5, 758-761.
131. Dror, S.B., Bronshtein, I, Garini, Y.a O'Neal, W.G.b, Jacobi, P.A., Ehrenberg, B. (2009) The localization and photosensitization of modified chlorin photosensitizers in artificial membranes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 354-361.
132. Aft, R.L., Mueller, G.C. (1983) Hemin-mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.* 258, 12069-12072.
133. Nelson, S.M., Ferguson, L.R., Denny, W.A. (2007) Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. *Mutation Res. - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 623, 24-40.
134. Dabrowiak, J.C., Ward, B., Goodisman, J. (1989) Quantitative footprinting analysis using a DNA-cleaving metalloporphyrin complex. *Biochemistry* 28, 3314-3322.
135. Waring, M.J. (1965) Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269-282.
136. Pindur, U., Jansen, M., Lemster, T. (2005) Advances in DNA-ligands with groove binding, intercalating and/or alkylating activity: chemistry, DNA-binding and biology. *Curr. Med. Chem.* 12, 2805-2847.
137. Mukherjee, A., Sasikala, W.D. (2013) Chapter One - Drug-DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism. *Adv. Prot. Chem. Struct. Biol.* 92, 1-62.
138. Wainwright, M. (2001) Acridine –a neglected antibacterial chromophore. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 1-13.
139. Baguley, B.C. (1991) DNA intercalating anti-tumour agents. *Anticancer Drug Des.* 6, 1-35.
140. Lenglet, G., David-Cordonnier, M.H. (2010) DNA-Destabilizing Agents as an Alternative Approach for Targeting DNA: Mechanisms of Action and Cellular Consequences. *J Nucleic Acids.* 2010

141. Biebricher, A.S., Heller, I., Roijmans, R.F.H., Hoekstra, T.P., Peterman, E.J.G., Wuitea, G.J.L. (2015) The impact of DNA intercalators on DNA and DNA-processing enzymes elucidated through force-dependent binding kinetics. *Nat Commun.* 6, AN7304.
142. Cai, X., Gray, P.J. Jr, Von Hoff, D.D. (2009) DNA minor groove binders: back in the groove. *Cancer Treat. Rev.* 35, 437-450.
143. Bloomfield, V.A., Crothers, D.M., Tinoco, jr I. (2000) Interaction and reaction with drugs. In: *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions* (eds. Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco, jr .I.) Sausalito, California: University Science Books; 2000. pp. 535-591.
144. Nekkanti, S., Tokala, R., Shankaraiah, N. (2017) Targeting DNA Minor Groove by Hybrid Molecules as Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem.* 24, 2887-2907.
145. Ford, K.G., Pear, L.H., Neidle, S., (1987) Molecular modelling of the interactions of tetra-(4-N-methylpyridyl) porphyrin with TA and CG sites on DNA. *Nucleic Acids Res.* 15, 6553–6562.
146. Fiel, R.J. (1989) Porphyrin-nucleic acid interactions: A review. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 6, 1259-1274.
147. Strickland, J.A., Marzilli, L.G., Gay, K.M, Wilson, W.D. (1988) Porphyrin and metalloporphyrin binding to DNA polymers: Rate and equilibrium binding studies. *Biochemistry* 27, 8870-8878.
148. Lugo-Ponce, P., McMillin, D.R. (2000) DNA-binding studies of Cu(T4), a bulky cationic porphyrin. *Coord. Chem. Rev.* 208, 169–191.
149. Bailly, C., Chaires, J.B. (1998) Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues. *Bioconjug. Chem.* 9, 513–538.
150. Haq I. (2002) Thermodynamics of drug-DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 403, 1-15.
151. Meier, J.L., Yu, A.S., Korf, I., Segal, D.J., Dervan, P.B. (2012) Guiding the Design of Synthetic DNA-Binding Molecules with Massively Parallel Sequencing. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 17814–17822.
152. Sehlstedt, U., Kim, S.K., Carter, P., Goodisman, J., Vollano, J.F., Norden, B., Dabrowiak, J.C. (1994) Interaction of cationic porphyrins with DNA. *Biochemistry* 33, 417-426.
153. Fiel, R.J., Howard, J.C., Mark, E.H., Datta Gupta, N. (1979) Interaction of DNA with a porphyrin ligand: Evidence for intercalation. *Nucleic Acids Res.* 6, 3093-118.
154. Hui, X.W., Gresh, N., Pullman, B. (1990) Modelling of the binding specificity in the interactions of cationic porphyrins with DNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 1109-1114.
155. Ford, K.G., Neidle, S. (1995) Perturbations in DNA structure upon interaction with porphyrins revealed by chemical probes, DNA footprinting and molecular modelling. *Bioorg. Med. Chem.* 3, 671-677.
156. Ward, B., Skorobogaty, A., Dabrowiak, J.C. (1986) DNA binding specificity of a series of cationic metalloporphyrin complexes. *Biochemistry* 25, 7827-33.
157. Ford, K., Fox, K.R., Neidle, S., M J Waring, M.J. (1987) DNA sequence preferences for an intercalating porphyrin compound revealed by footprinting. *Nucleic Acids Res.* 15, 2221–2234.

158. Pasternack, R.F., Garrity, P., Ehrlich, B., Davis, C.B., Gibbs, E.J., Orloff, G., Giartosio, A., Turano, C. (1986) The influence of ionic strength on the binding of a water soluble porphyrin to nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 14, 5919-5931.
159. Kelly, J.M., Murphy, M.J., McConnell, D..J, OhUigin, C. (1985) A comparative study of the interaction of 5,10,15,20-tetrakis (N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin and its zinc complex with DNA using fluorescence spectroscopy and topoisomerisation. *Nucleic Acids Res.* 13, 167-184.
160. Shen, Y., Myslinski, P., Treszczanowicz, T., Liu, Y.X., Koningstein, J.A. (1992) Picosecond laser-induced fluorescence polarization studies of mitoxantrone and tetrakisporphine/DNA complexes. *J. Phy. Chem.* 96, 7782-7787.
161. Borissevitch, I.E., Gandini, S.C. (1998) Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA. *J. Photoch. Photobiol. B: Biol.* 43, 112-120.
162. Sari, M.A., Battioni J.P., Mansuy, D., Le Pecq, J.B. (1986) Mode of interaction and apparent binding constants of meso-tetraaryl porphyrins bearing between one and four positive charges with DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 141, 643-649.
163. Le Pecq, J.B., Paoletti, C. (1967) A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical-chemical characterization. *J. Mol. Biol.* 27, 87-106.
164. Hyun, K.M., Choi, S.D., Lee, S., Kim, S.K. (1997) Can energy transfer be an indicator for DNA intercalation? *BBA - General Subject* 1334, 312-316.
165. Carvlin, M.J., Datta-Gupta, N., Fiel, R.J. (1982) Circular dichroism spectroscopy of a cationic porphyrin bound to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108, 66-73.
166. Kuroda, R., Tanaka, H. (1994) DNA-porphyrin interactions probed by induced CD spectroscopy. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 13, 1575-1576.
167. Pasternack, R.F., Gibbs, E.J., Villafranca, J.J. (1983) Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry* 22, 2406-2414.
168. Pasternack, R.F., Ewen, S., Rao, A., Meyer, A.S., Freedman, M.A., Collings, P.J., Frey, S.L., Ranen, M.C., de Paula J.C. (2001) Interactions of copper(II) porphyrins with DNA. *Inorg. Chim. Acta.* 317, 59-71.
169. Bustamante, C., Gurrieri, S., Pasternack, R.F, Purrello, R., Rizzarelli, E. (1994) Interaction of water-soluble porphyrins with single- and double-stranded polyribonucleotides. *Biopolymers* 34, 10099-10104.
170. Geacintov, N.E., Ibanez, V., Rougee, M., Bensasson, R.V. (1987) Orientation and linear dichroism characteristics of porphyrin-DNA complexes. *Biochemistry* 26, 3087-92.
171. Wheeler, G.V., Chinsky, L., Miskovsky, P., Turpin, P.-Y. (1995) The interaction of copper tetrakis(4-N-methylpyridyl) porphine with polynucleotides studied by ultraviolet resonance raman spectroscopy. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 13, 399-412
172. Strickland, J.A., Marzilli, L.G., Wilson, W.D. (1990) Binding of meso-tetrakis (n-methylpyridiniumyl)porphyrin isomers to DNA: Quantitative comparison of the influence of charge distribution and copper(II) derivatization. *Biopolymers* 29, 1307-1323.
173. Gray, T.A., Marzilli, L.G., ToYue, K. (1991) Effect of N-alkyl substituents on the DNA binding properties of meso-tetrakis (4-N-alkylpyridinium-4-yl)porphyrins and their nickel derivatives. *J. Inorg. Biochem.* 41, 205-219.

174. Pasternack, R.F. (2003) Circular dichroism and the interactions of water soluble porphyrins with DNA - A minireview. *Chirality* 15, 329-332.
175. Lipscomb, L. A., Zhou, F.X., Presnell, S.R., Woo, R.J., Peek, M.E., Plaskon, R.R., Williams, L.D. (1996) Structure of DNA-porphyrin complex. *Biochemistry* 35, 2818-2823.
176. Tjahjono, D.H., Kartasasmita, R.E., Nawawi, A., Mima, S., Akutsu, T., Yoshioka, N., Inoue, H. (2006) Binding of tetrakis(pirazoliumyl)porphyrin and its copper(II) and zinc(II) complexes to poly(dG-dC)₂ and poly(dA-dT)₂. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 527-538.
177. Ghazaryan, A.A., Dalyan, Y.B., Haroutiunian, S.G., Tikhomirova, A., Taulier, N., Wells, J.W., Chalikian, T.V. (2006) Thermodynamics of interactions of water-soluble porphyrins with RNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1914-1921.
178. McMillin, D.R., Shelton, A.H., Bejune, S.A., Fanwick, P.E., Wall, R.K. (2005) Understanding binding interactions of cationic porphyrins with B-form DNA. *Coord Chem Rev.* 249, 1451-1459.
179. Scatchard G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci.* 51, 660-672.
180. McGhee, J.D., von Hippel, P.H. (1974) Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol Biol.* 86, 469-489.
181. Qin, T., Liu, K., Song, D., Yang, C., Zhao, H., Su, H. (2018) Binding Interactions of Zinc Cationic Porphyrin with Duplex DNA: From B-DNA to Z-DNA. *Int. J. Mol. Sci.* 19, AN1071
182. Choi, J.K., Reed, A., Balaz, M. (2014) Chiroptical properties, binding affinity, and photostability of a conjugated zinc porphyrin dimer complexed with left-handed Z-DNA and right-handed B-DNA. *Dalton Trans.* 43, 563-567.
183. Ghosh, S., Ucer, K.B., D'Agostino, R.Jr, Grant, K., Sirintrapun, J., Thomas, M.J., Hantgan, R., Bharadwaj, M., Gmeiner, W.H. (2014) Non-covalent assembly of meso-tetra-4-pyridyl porphine with single-stranded DNA to form nano-sized complexes with hydrophobicity-dependent DNA release and anti-tumor activity. *Nanomedicine* 10, 451-461.
184. Briggs, B.N., Gaier, A.J., Fanwick, P.E., Dogutan, D.K., McMillin, D.R. (2012) Cationic copper(II) porphyrins intercalate into domains of double-stranded RNA. *Biochemistry.* 51, 7496-7505.
185. Wheelhouse, R.T., Sun, D., Han, H., Han, F.X., Hurley, L.H. (1998) Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: The interaction of tetra- (N-methyl-4-pyridyl)porphine with quadruplex DNA(1). *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3261-3262
186. Freyer, M.W., Buscaglia, R., Kaplan, K., Cashman, D., Hurley, L.H., Lewis, E.A. (2007) Model quadruplex interactions with a cationic porphyrin. *Biophys. J.* 92, 2007-2015.
187. Wei, C., Ji, G., Zhou, J., Han, G., Li, C. (2009) Evidence for the binding mode of porphyrins to G-quadruplex DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 4025-4032.
188. Parkinson, G.N., Ghosh, R., Neidle, S. (2007) Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres. *Biochemistry* 46, 2390-2397.
189. Yaku, H., Murashima, T., Miyoshi, D., Sugimoto, N. (2014) In vitro assays predictive of telomerase inhibitory effect of G-quadruplex ligands in cell nuclei. *J. Phys. Chem. B.* 118, 2605-2614.

190. Yaku, H., Murashima, T., Tateishi-Karimata, H., Nakano, S.-I., Miyoshi, D., Sugimoto, N. (2013) Study on effects of molecular crowding on G-quadruplex-ligand binding and ligand-mediated telomerase inhibition. *Methods* 64, 19-27.
191. Perdrau, J.R., Todd, C. (1933) The photodynamic action of methylene blue on certain viruses, *Proc. Roy. Soc., B*, 112, 288-298.
192. Wallis, C., Melnick, J.L. (1965) Photodynamic inactivation of animal viruses: A review. *Photochem. Photobiol.* 4, 159-170.
193. Tomb, R.M., White, T.A., Coia, J.E., Anderson, J.G., MacGregor, S.J., Maclean, M. (2018) Review of the Comparative Susceptibility of Microbial Species to Photoinactivation Using 380-480 nm Violet-Blue Light. *Photochem. Photobiol.* 94, 445-458.
194. Maisch, T., Hackbarth, S., Regensburger, J., Felgentrager, A., Baumler, W., Landthaler, M., Roder, B. (2011) Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J. Deutschen Dermatol. Ges.* 9, 360-366.
195. Hu, X.Q., Huang, Y.Y., Wang, Y.G., Wang, X.Y., Hamblin, M.R. (2018) Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. *Front. Microbiol.* 9, Article 1299
196. Prazmo, E.J., Kwasny, M., Lapinski, M., Mielczarek, A. (2016) Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. *Adv. Clin. Exp. Med.* 25, 799-807.
197. Garcia-Fresnadillo, D. Singlet Oxygen Photosensitizing Materials for Point-of-Use Water Disinfection with Solar Reactors. *Chem. Photochem.* 2, 512-534.
198. Satake, M. (2004) Infectious risks associated with the transfusion of blood components and pathogen inactivation in Japan. *Int. J. Hematol.* 80, 306-310.
199. Sobata, R., Shinohara, N., Matsumoto, C., Uchida, S., Igarashi, S., Hino, S., Satake, M., Tadokoro, K. (2014) First report of human immunodeficiency virus transmission via a blood donation that tested negative by 20-minipool nucleic acid amplification in Japan. *Transfusion* 54, 2361-2362.
200. Lazo, A., Tassello, J., Jayarama, V., Ohagen, A., Gibaja, V., Kramer, E., Marmorato, A., Billia-Shaveet, D., Purmal, A., Brown, F., Chapman, J. (2002) Broad-spectrum virus reduction in red cell concentrates using INACTINE™ PEN110 chemistry. *Vox Sanguinis* 83, 313-323.
201. Prowse, C. (2008) Pathogen inactivation of blood components. *Transfus. Alt. Transfus. Med.* 10, 139-146.
202. Matthew, J.L., Newman, J.T., Sogandares-Bernal, F., Judy, M.M., Skiles, H., Leveson, J.E., Marengo-Rowe, A.J., Chanh, T.C. (1988) Photodynamic therapy of viral contaminants with potential for blood banking applications. *Transfusion* 28, 81-83.
203. Lambrecht, B., Mohr, H., Kniiver-Hopf, J., Schmitt, H. (1991) Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 60, 207-213.
204. OhUigin, C., McConnell, D.J., Kelly, J.M., W J van der Putten, W.J. (1987) Methylene blue photosensitised strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucleic Acids Res.* 15, 7411-7427.

205. Stockert, J.C., Del Castillo, P. (1989) Linear dichroism and polarized fluorescence of dye-complexed DNA fibers. *Histochemistry* 91, 263-264.
206. Lozano, M., Cid, J., Müller, T.H. (2013) Plasma treated with methylene blue and light: clinical efficacy and safety profile. *Transfus. Med. Rev.* 27, 235-240.
207. Mohr, H., Lambrecht, B., Knüver-Hopf, J. (1992) Virus inactivated single donor fresh plasma preparation. *Infusionstherapie* 19, 79-83.
208. Wagner, S.J., Storry, J.R., Mallory, D.A., Stromberg, R.R., Benade, L.E., Friedman, L.I. (1992) Red cell membrane alterations associated with vircidal methylene blue phototreatment. *Transfusion* 33, 30-36.
209. Seghatchian, J., Wilhelm G. Struff, W.G., Reichenberg, S. (2011) Main Properties of the THERAFLEX MB-Plasma System for Pathogen Reduction. *Transfus Med Hemother.* 38, 55-64.
210. Lavie, G., Mazur, Y., Lavie, D., Price, A.M., Pascual, D., Liebers, L., Levin, B., Meruelo, D. (1995) Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusio*, 35, 392-400.
211. Hudson, J.B., Zhou, J., Chen, J., Harris, L., Yip, L., Towers, G.H.N. (1994) Hypocrellin, from *Hypocrella bambusa*, is phototoxic to human immunodeficiency virus. *Photochem. Photobiol.* 60, 253-255.
212. Abe, H., Wagner, S.J. (1995) Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivative or merocyanine 540 photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 61, 402-409.
213. Smetana, Z., Ben-Hur, E., Mendelson, E., Salzberg, S., Wagner, P., Malik, Z. (1998) Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 44, 77-83.
214. Yin, H., Zhang, G., Chen, H., Wang, W., Kong, D., Li, Y. (2014) Preliminary safety evaluation of photodynamic therapy for blood purification: an animal study. *Artif. Organs* 38, 510-515.
215. Costa, L., Faustino, M.A.F., Tome, J.P.C., Neves, M.G.P.M.S., Tome, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, A., Almeida, A. (2013) Involvement of type I and type II mechanisms on the photoinactivation of non-enveloped DNA and RNA bacteriophages. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 120, 10-16.
216. Lytle, C.D., Budacz, A.P., Keville, E., Miller, S.A., Prodouz, K.N. (1991) Differential inactivation of surrogate viruses with merocyanine 540. *Photochem. Photobiol.* 54, 489-493.
217. Davies, M.J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 305, 761-770.
218. Bachmann, B., Knüver-Hopf, J., Lambrecht, B., Mohr, H. (1995) Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light. *J. Med. Virol.* 47, 172-178.
219. Kasturi, C., Platz, M.S. (1992) Inactivation of lambda phage with 658 nm light using a DNA binding porphyrin sensitizer. *Photochem. Photobiol.* 56, 427-429.
220. Trannoy, L.L., Lagerberg, J.W.M., Dubbelman, T.M.A.R., Schuitmaker, H.J., Brand, A. (2004) Positively charged porphyrins: A new series of photosensitizers for sterilization of RBCs. *Transfusion* 44, 1186-1196.

221. Trannoy, L.L., Terpstra, F.G., de Korte, D., Lagerberg, J.W., Verhoeven, A.J., Brand, A., van Engelenburg, F.A. (2006) Differential sensitivities of pathogens in red cell concentrates to Tri-P(4)-photoinactivation. *Vox Sang.* 91,111-118.
222. Clifton, C.E. (1931) Photodynamic action of certain dyes on the inactivation of staphylococcus bacteriophage. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 28, 745-746.
223. Welsh, J.N., Adams, M.H. (1954) Photodynamic inactivation of bacteriophage. *J. Bacteriol.* 68, 122-127.
224. Yamamoto, N. (1958) Photodynamic inactivation of bacteriophage and its inhibition. *J. Bacteriol.* 75, 443-448.
225. Specht K.G. (1994) The role of DNA-damage in PM2 viral inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 59, 506-514.
226. Schneider, J.E., Tabatabaie, T., Maidt, L., Smith, R.H., Nguyen, X., Pye, Q., Floyd, R.A. (1998) Potential mechanisms of photodynamic inactivation of virus by methylene blue - I. RNA-protein crosslinks and other oxidative lesions in Q beta bacteriophage. *Photochem. Photobiol.* 67, 350-357.
227. Jockusch, S., Lee, D., Turro, N.J., Leonard, E.F. (1996) Photo-induced inactivation of viruses: adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Qbeta bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7446-7451.
228. Martin, Ch.B., Wilfong, E., Ruane, P., Goodrich, R., Platz, M. (2005) An Action Spectrum of the riboflavin-photosensitized inactivation of Lambda phage. *Photochem. Photobiol.* 81, 474-480.
229. Majiya, H., Adeyemi, O.O., Stonehouse, N.J., Millner, P. (2018) Photodynamic inactivation of bacteriophage MS2: the A-protein is the target of virusinactivation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 178, 404–411.
230. Snow, S.D., Park, K., Kim J-H. (2014) Cationic Fullerene Aggregates with Unprecedented Virus Photoinactivation Efficiencies in Water. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 1, 290–294.
231. Costa, L., Carvalho, C.M.B., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, J.P.C., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, Â., Almeida, A. (2010) Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: influence of light parameters. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 1126–1133.
232. Toth, K., Bolard, J., Ronto, G., Aslanian, D. (1984) UV-induced small structural changes in the T7 bacteriophage studied by melting methods. *Biophys. Struct. Mech.* 10, 229-239.
233. Zupán, K., Herényi, L., Tóth, K., Egyeki, M., Csík, G. (2005) Binding of cationic porphyrin to isolated DNA and nucleoprotein complex: Quantitative analysis of binding forms under various experimental conditions. *Biochemistry* 44, 15000-15006.
234. Mező, G., Herényi, L., Habdas, J., Majer, Z., Myśliwa-Kurdziel, B., Tóth, K., Csík G. (2011) Syntheses and DNA binding of new cationic porphyrin-tetrapeptide conjugates. *Bipohys. Chem.* 155, 36-44.
235. Orosz Á., Bösze Sz., Mező G., Szabó I., Herényi L., Gabriella Csík G. (2017) Oligo- and polypeptide conjugates of cationic porphyrins: binding, cellular uptake, and cellular localization. *Amino Acids* 49, 1263–1276.
236. Csík, G., Balog, E., Voszka, I., Tölgyesi, F., Oulmi, D., Maillard, Ph., Momenteau, M., (1998) Glycosylated Derivatives of Tetraphenyl Porphyrin: Photophysical

- Characterisation, Self–Aggregation and Membrane–Binding. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 44, 216-224.
237. Zupan, K., Herényi, L., Toth, K., Majer, Z., Csik, G. (2004) Binding of cationic porphyrin to isolated and encapsidated viral DNA analyzed by comprehensive spectroscopic methods. *Biochemistry* 43, 9151-9159.
 238. Zupán, K., Egyeki, M., Tóth, K., Fekete, A., Herényi, L., Módos, K., Csík, G. (2008) Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 90, 105–112.
 239. Woodle, M.C., D. Papahadjopoulos, D. (1989) Liposome preparation and size characterization in: *Methods in Enzymology Vol. 171. Biomembranes Part R. Transport Theory: Cells and Model Membranes*, (eds: Fleischer, S., Fleischer, B.) Academic Press Inc. pp 193-216.
 240. Lasic, D.D., (1993) *Liposomes: From physics to application*. Elsevier Science Ltd, Amsterdam; New York, pp 155-172.
 241. Yguerabide, J., Foster, M.C. (1981) Fluorescence spectroscopy of biological membranes. In: *Membrane spectroscopy* (ed. by E. Grell) Springer Verlag, Berlin, pp 199-269.
 242. Voszka, I., Budai, M., Szabó, Z., Maillard, P., Csík, G., Gróf, P. (2007) Interaction of photosensitizers with liposomes containing unsaturated lipid. *Chem. Phys. Lipids* 145, 63-71.
 243. Gáspár, S., Módos, K., Rontó, Gy. (1980) Complex method for the determination of the physiological parameters of bacterium - phage systems In L. Fedina, B. Kanyár, M. Kollai, (eds) *Adv. Physiol. Sci., 34 Math. Comp. Meth. Physiol.*, Pergamon Press - Akadémiai Kiadó, pp:141-146.
 244. Strauss, Jr. J. H, Sinsheimer, R.L. (1963) Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid, *J. Mol. Biol.* 7, 43-54.
 245. Hammermann, M., Toth, K., Rodemer, C., Waldec, k W., May, R.P., Langowski J. (2000) Salt-dependent compaction of di- and trinucleosomes studied by small-angle neutron scattering. *Biophys. J.* 79, 584-594.
 246. Csík, G., Egyeki, M., Herényi, L., Majer, Z., Tóth, K. (2009) Role of structure-proteins in the porphyrin-DNA interaction. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 96, 207-215.
 247. Demas, J.N., Crosby, G.A. (1971) The measurement of photoluminescence quantum yields. A review, *J. Phys. Chem.* 75, 991-1024.
 248. Fekete, A., Rontó, Gy., Feigin, L.A., Tikhonychev, V.V., Módos, K. (1982) Temperature dependent structural changes of intraphage T7 DNA. *Biophys. Struct. Mechanism* 9, 1–9.
 249. Gábor, F., Szolnoki, J., Tóth K., Fekete, A., Maillard, Ph., Csík G. (2001) Photoinduced inactivation of T7 phage sensitized by symmetrically and asymmetrically substituted tetraphenyl porphyrin: Comparison of efficiency and mechanism of action. *Photochem. Photobiol.* 73, 304-311.¶
 250. Savitzky, A., Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Anal. Chem.* 36, 1627-1639.
 251. Aveline, B.M., Hasan T., Redmond, R.W. (1995) The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation on the photophysical properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPDMA). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 30, 161-169.

252. Margalit, R., Rotenberg, M. (1984) Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions. *Biochem. J.* 219, 445-450.
253. Brault, D., Vever-Bizet, C., Le Doan, T. (1986) Spectrofluorimetric study of porphyrin incorporation into membrane models - evidence for pH effects. *BBA - Biomembranes* 857, 238-250.
254. Lewis, R.N., Mak, N., McElhaney, R.N. (1987) A differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains. *Biochemistry* 26, 6118-6126.
255. Mosinger, J., Mosinger, B. (1995) Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia* 51, 106-109.
256. Fekete, A., Módos, K., Hegedüs, M., Kovács, G., Rontó, Gy., Péter, Á., Lammer, H., Panitz, C. (2005) DNA damage under simulated extraterrestrial conditions in bacteriophage T7. *Adv. Space Res.* 36, 303-310.
257. Estrada, O.S., Gitler, C. (1974) *Perspectives in Membrane Biology*, Academic Press, New York, pp. 373-412.
258. Ramos, T. (1983) Cell surface structures required for B-cell activation with haptenated syngeneic cells. *J. Immunol.* 17, 411-417.
259. Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., Gräslund, A. (2011) Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J. Biophysics* Article ID 414729
260. Asayama, S., Mizushima, K., Nagaoka, S., Kawakami, H. (2004) Design of metalloporphyrin-carbohydrate conjugates for a new superoxide dismutase mimic with cellular recognition. *Bioconugj. Chem.* 15, 1360-1363.
261. Voszka, I., Galántai, R., Maillard, P., Csík, G. (1999) Interaction of glycosylated tetraphenyl porphyrins with model lipid membranes of different compositions. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 52, 92-98.
262. Lakowicz, J. (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York, pp 16-17.
263. Voszka, I., Szabó, Zs., Csik, G., Maillard, Ph., Gróf, P. (2005) Interaction of tetraphenylporphyrin derivatives with DPPC-liposomes: an EPR study. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 79, 83-88.
264. Voszka I., Budai M., Szabo Z., Maillard P., Csik G., Grof P. (2007) Interaction of photosensitizers with liposomes containing unsaturated lipid. *Chem. Phys. Lipids* 145, 63-71.
265. Albon, N., Sturtevant, J.M. (1978) Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 75, 2258-2260.
266. Lang, K., Anzenbacher, P., Jr., Kapusta, P., Kral, V., Kubat, P., Wagnerova, D.M. (2000) Long-range assemblies on poly-(dG-dC)2 and poly(dA-dT)2: Phosphonium cationic porphyrins and the importance of the charge. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 57, 51-59.
267. Lee, S., Jeon, S.H., Kim, B.-J., Han, S.W., Jang, H.G., Kim, S.K. (2001) Classification of CD and absorption spectra in the Soret band of H2TMPyP bound to various synthetic polynucleotides. *Biophys. Chem.* 92, 35-45.

268. Pitié, M., Pratviel, G., Bernadou, J., Meunier, B. (1992) Preferential hydroxylation by the chemical nuclease meso-tetrakis-(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrinatomanganeseIII pentaacetate/KHSO₅ at the 5' carbon of deoxyriboses on both 3' sides of three contiguous A.T base pairs in short double-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3967–3971.
269. Serwer, P. (1978) A technique for observing extended DNA in negatively stained specimens: observation of bacteriophage T7 capsid-DNA complexes, *J. Ultrastruct. Res.* 65, 112-118.
270. Toth, K., Csik, G., Ronto, GY. (1987) Salt effects on the bacteriophage T7-II structure and activity changes. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* 19, 67-74.
271. Vörös, Zs., Csík, G., Herényi, L., Kellermayer, M. (2018) Temperature-Dependent Nanomechanics and Topography of Bacteriophage T7. *J. Virol.* 92, e01236-18.
272. Bina, M., Sturtevant, J.M., Stein, A. (1980) Stability of DNA in nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4044-4047.
273. MacGregor, J.T., Casciano, D., Müller, L. (2000) Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mut. Res.* 455, 3-20.
274. Ronto, G., Fekete, A., Grof, P., Bilger, C., Buisson, J.-P., Tromelin, A., Demerseman, P. (1989) Genotoxicity testing: phage T7 inactivation test of various furan and arenofuran derivatives. *Mutagenesis* 4, 471–475.
275. Obata, M., Hirohara, S., Sharyo, K., Alitomo, H., Kajiwar, K., Ogata, S.-I., Tanihara, M., Ohtsuki, C., Yano, S. (2007) Sugar-dependent photodynamic effect of glycoconjugated porphyrins: A study on photocytotoxicity, photophysical properties and binding behavior to bovine serum albumin (BSA). *BBA – Gen. Subj.* 1770, 1204-1211.
276. Orosz, Á., Mezo, G., Herényi, L., Habdas, J., Majer, Z., Myśliwa-Kurdziel, B., Tóth, K., Csik, G. (2013) Binding of new cationic porphyrin-tetrapeptide conjugates to nucleoprotein complexes. *Biophys. Chemis.* 177-178, 14-23.
277. Hudecz, F., Szekerke, M. (1980) Investigation of drug-protein interactions and the drug-carrier concept by the use of branched polypeptides as model systems. Synthesis and characterisation of the model peptides. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 45. 933-940.
278. Bonnett, R., Martinez, G. (2001) Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 57, 9513-9547.
279. Desroches, M-C., Kasselouri, A., Meynie, M.I, Fontaine, Ph., Goldmann, M., Prognon, P., Maillard, Ph., Rosilio, V. (2004) Incorporation of Glycoconjugated Porphyrin Derivatives into Phospholipid Monolayers: A screening method for the evaluation of their interaction with a cell membrane. *Langmuir* 20, 11698-11705.
280. Moylan, C., Sweed, A.M.K., Shaker, Y.M., Scanlan, E.M., Senge, M.O. (2015) Lead structures for applications in photodynamic therapy 7. Efficient synthesis of amphiphilic glycosylated lipid porphyrin derivatives: refining linker conjugation for potential PDT applications. *Tetrahedron* 71, 4145-4153.
281. Ibrahim, H., Kasselouri, A., Yu, Ch. Maillard, Ph., Rosilio, V., Pansu, R.B., Prognon, P. (2011) Meso-tetraphenyl porphyrin derivatives: The effect of structural modifications on binding to DMPC liposomes and albumin. *J. Photochem. Photobiol A: Chem* 217, 2011

282. Momenteau, M., Oulmi, D., Maillard, Ph., Croisy, A. (1994) In vitro photobiological activity of a new series of photosensitizers: the glycoconjugated porphyrins. *Proc. SPIE*, 2325, 13-23.
283. Laville, I., Pigaglio, S., Blais, J.C., Doz, F., Loock, B., Maillard, P., Grierson, D.S., Blais, J. (2006) Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J. Med. Chem.* 20, 2558-2567.
284. Hirohara, S., Obata, M., Ogata, S.-I., Ohtsuki, C., Higashida, S., Ogura, S.-I., Okura, I., Takenaka, M., Ono, H., Sugai, Y., Mikata, Y., Tanihara, M., Yano, S. (2005) Cellular uptake and photocytotoxicity of glycoconjugated chlorins in HeLa cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 78, 7-15.
285. Hirohara, S., Obata, M., Alitomo, H., Sharyo, K., Ogata, S.-I., Ohtsuki, C., Yano, S., Ando, T., Tanihara, M. (2008) Structure photodynamic effect relationships of 24 glycoconjugated photosensitizers in HeLa cells. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 2265-2272.
286. Christensen, T., Sandquist, T., Feren, K., Waksvik, H., Moan, J. (1983) Retention and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in cells after prolonged cultivation in the presence of porphyrin. *Br. J. Cancer* 48, 35-43.
287. Dong, P., Choi, P., Schmiedl, U.P., Nelson, J.A., Starr, F.L., R.J. Ho, R.J. (1995) Interaction of manganese-mesoporphyrin with oleic acid vesicles. *Biochemistry* 34, 3416-3422.
288. Dellinger, M., Vever-Bizet, C., Brault, D., Delgado, O., Rosenfeld, C. (1986) Cellular uptake of hydroxyethylvinyldeuteroporphyrin (HVD) and photoinactivation of cultivated human leukemia (REH6) cells. *Photochem. Photobiol.* 43, 639-647.
289. Herenyi, L., Veres, D., Békási, S., Voszka, I., Módos, K., Csík, G., Kaposi, A.D., Fidy, J., (2009) Location of Mesoporphyrin in Liposomes Determined by Site-Selective Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 113, 7716-7724.
290. Kakiuchi, T., Ito, F., Nagamura, T., (2008) Time-resolved studies of energy transfer from meso-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin to 3,3'-diethyl-2,2'-thiatricarbocyanine iodide along deoxyribonucleic acid chain. *J. Phys. Chem. B* 112, 3931-3937.
291. Hembury, G.A., Borovkov, V.V., Inoue, Y., (2008) Chirality-sensing supramolecular systems. *Chem. Rev.* 108, 1-73.
292. Kruglova, E.B., Gladkovskaya, N.A., V.Ya. Maleev, V.Ya. (2005) Use of spectrophotometric analysis to calculate the thermodynamic parameters of binding between an actinocin derivative and DNA. *Biofizika* 50, 253-264.
293. Kovaleva, O.A., Tsvetkov, V.B., Shchyolkina, A.K., Borisova, O.F., Ol'shevskaya, V.A., Makarenkov, A.V., Semeikin, A.S., Shtil, A.A., Kaluzhny, D.N. (2012) The role of carboxymethyl substituents in the interaction of tetracationic porphyrins with DNA. *Eur. Biophys J.* 41, 723-732.
294. Munson, B.R., Fiel, R.J. (1992) DNA interaction and photosensitization by cationic meso substituted porphyrins. *Nucl. Acids Res.* 20, 1315-1319.
295. Qin, T.X., Liu, K.H., Song, D., Yang, C.F., Su, H.M., (2017) Porphyrin Bound to i-Motifs: Intercalation versus External Groove Binding. *Chemistry* 12, 1578-1586.
296. Jawad, B., Poudel, L., Podgornik, R., Steinmetz, N.F., Ching, W.Y. (2019) Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21, 3877-3893,

297. Ma, H.M., Chen, X., Sun, S.T., Zhang, L.N., Wu, D., Zhu, P.H., Li, Y., Du, B., Wei, Q. (2009) Study on the Aggregation Behavior of Cationic Porphyrins and Their Interaction with ctDNA. *Spectrosc. Spect. Anal.* 29, 423-427.
298. Dezhampanah, H., Firouzi, R. (2016) Spectroscopic Studies on the Interaction of Co(II) Tetrapyridinoporphyrazine with Synthetic Polynucleotides and DNA. *Phys. Chem. Res.* 4, 161-172.
299. Šponer, J., Leszczynski, J., Hobza, P. (2001/2002) Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases. *Biopolymers* 61, 3-31.
300. Šponer, J., Burda, J.V., Sabat, M., Leszczynski, J., Hobza, P. (1998) Interaction between the guanine-cytosine watson-crick DNA base pair and hydrated group IIa (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) and group IIb (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) metal cations. *J. Phys. Chem.* 102, 5951-5957.
301. Rulišek, L., Šponer, J. (2003) Outer-shell and inner-shell coordination of phosphate group to hydrated metal ions (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) in the presence and absence of nucleobase. The role of nonelectrostatic effects. *J. Phys. Chem. B* 107, 1913-1923.
302. Tajmir-Riahi, H.-A., Naoui, M., and Ahmad, R. (1993) The effects of Cu^{2+} and Pb^{2+} on the solution structure of calf thymus DNA: DNA condensation and denaturation studied by Fourier transform IR difference spectroscopy. *Biopolymers* 33, 1819-1827.
303. Matic, J., Tumir, L.M., Stojkovic, M.R., Piantanida, I. (2016) Advances in Peptide-based DNA/RNA-Intercalators. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 17, 127-134.
304. Biscaglia, F., Gobbo, M. (2018) Porphyrin-peptide conjugates in biomedical applications. *Pept. Sci.* 110, Article Number: e24038.
305. Prévost, C., Takahashi, M., Lavery, R. (2009) Deforming DNA: From physics to biology. *Chem. Phys. Chem.* 10, 1399-1404.
306. Garcia, H.G., Grayson, P., Han, L., Inamdar, M., Kondev, C. Nelson, Ph.C., Phillips, R., Widom, J., Wiggins, P.A. (2007) Biological consequences of tightly bent DNA: The other life of a macromolecular celebrity. *Biopolymers* 85, 115-130.
307. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-260.
308. Cerritelli, M.E., Cheng, N., Rosenberg, A.H., McPherson, C.E., Booy, F.P., A. C. Steven, A.C. (1997) Encapsidated Conformation of Bacteriophage T7 DNA. *Cell* 91, 271–280.
309. Häuser, R., Blasche, S., Dokland, T., Haggård-Ljungquist, E., von Brunn, A., Salas, M., Casjens, S., Molineux, I., Uetz, P. (2012) Bacteriophage Protein-Protein Interactions. *Adv. Virus Res.* 83, 219-298.
310. Silva, J.N., Galmiche, A., Tome, J.P.C., Boullier, A., Neves, M.G.P.M.S., Silva, E.M.P., Capiod, J.C., Cavaleiro, J.A.S., Santus, R., Maziere, J.C., Filipe, P., Morliere, P. (2010) Chain-dependent photocytotoxicity of tricationic porphyrin conjugates and related mechanisms of cell death in proliferating human skin keratinocytes. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1373-1385.
311. Ezzeddine, R., Al-Banaw, A., Tovmasyan, A., Craik, J.D., Batinic-Haberle, I., Benov, L.T. (2013) Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins. *J. Biol. Chem.* 288, 36579-36588.

312. Zhu, S., Yao, S., Fengshou Wu, F., Jiang, L., Wong, K-L., Zhouc, J., Wang, K. (2017) Platinated porphyrin as a new organelle and nucleus dual-targeted photosensitizer for photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.* 15, 5764-5771.
313. Yoho, J., Wogensthal, K., Bennett, T.L., Palmer, J., Comfort, K.K., Kango-Singh, M., Swavey, S., Stuart, C.H., Gmeiner, .W.H. (2017) Water-Soluble Zinc Porphyrin Capable of Light-Induced Photocleavage of DNA: Cell Localization Studies in *Drosophila Melanogaster* and Light Activated Treatment of Lung Cancer Cells. *EurJIC* 2017, 153-159.
314. Pernot, M., Bastogne, T., Barry, N.P.E.; Therrien, B., Koellensperger, G., Hann, S., Reshetov, V., Barberi-Heyob, M. (2012) Systems biology approach for in vivo photodynamic therapy optimization of ruthenium-porphyrin compounds. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 117, 80-89.
315. McCormick, B.P.P., Pansa, M.F., Sanabria, L.N.M., Carvalho, C.M.B., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Cavaleiro, J.A.S., Vittar, N.B.R.V., Rivarola, V.A. (2014) Cationic porphyrin derivatives for application in photodynamic therapy of cancer. *Laser Physics*, 24, Article number 045603
316. Kessel, D., Luguya, R., Vicente, M.G.H. (2003) Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distribution. *Photochem. Photobiol.* 78, 431-435.
317. Sibrian-Vazquez, M., Jensen, T.J., Fronczek, F.R., Hammer, R.P., Vicente, M.G.H. (2005) Synthesis and characterization of positively charged porphyrin-peptide conjugates. *Bioconj. Chem.* 16, 852-863.
318. Sibrian-Vazquez, M., Jensen, T.J., Vicente, M.G.H. (2008) Synthesis, characterization, and metabolic stability of porphyrin-peptide conjugates bearing bifunctional signaling sequences. *J. Med. Chem.* 51, 2915-2923.
319. Alvarez, M., Villanueva, A., Acedo, P., Canete, M., Stockert, J.C. (2011) Cell death causes relocalization of photosensitizing fluorescent probes. *Acta Histochem.* 113, 363-368.
320. Garcia-Sampedro, A., Tabero, A., Mahamed, I., Acedo, P.(2019) Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *J. Porph. Phthalocyn.* 23, 11-27.
321. SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS,
https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2008/2008042345751/anx_45751_en.pdf
322. de Miranda, J.A., Machado, A.E.H., de Oliveira, C.A. (2002) Comparison of the photodynamic action of methylene blue and zinc phthalocyanine on TG-180 tumoral cells. *J. Porph. Phthalocyan.* 06, 43-49.
323. Lopes, L.Q.S., Ramos, A.P., Copetti, P.M., Acunha, T.V., Iglesias, B.A., Santos, R.C.V., Machado, A.K., Sagrillo, M.R. (2019) Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra(4-pyridyl) platinum(II) porphyrin. *Microb. Pathogen.* 128, 47-54.
324. Tovmasyan, A., Babayan, N., Poghosyan, D., Margaryan, K., Harutyunyan, B., Grigoryan, R., Sarkisyan, N., Spasojevic, I., Mamyan, S., Sahakyan, L., Aroutiounian, R., Ghazaryan, R., Gasparyan, G. (2015) Novel amphiphilic cationic porphyrin and its Ag(II) complex as potential anticancer agents. *J Inorg Biochem.* 140, 94–103.
325. Zamiri, B., Reddy, K., Macgregor, R.B., Pearson, C.E. (2014) TMPyP4 porphyrin distorts RNA G- quadruplex structures of the disease-associated r(GGGGCC)_n repeat of the

- C9orf72 gene and blocks interaction of RNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 289, 4653-4659.
326. Xodo, L.E., Cogoi, S. Rapozzi, V. (2016) Photosensitizers binding to nucleic acids as anticancer agents. *Future Med. Chem.* 8, 179-194.
 327. Phoenix, D.A., Dennison, S.R., Harris, F. (2015) Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. in *Novel Antimicrobial Agents And Strategies* (eds. Phoenix, D.A., Harris, F., Dennison, S.R.) Wiley, Germany, pp. 295-330.
 328. Maillard, Ph., Looock, B., Grierson, D.S., Laville, I., Blais, J., Doz, F., Desjardins, Ld, Carrez, D., Guerquin-Kern, J.-L., Croisy, A. (2007) In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 4, 261-268.
 329. Maillard, P., Lupu, M., Thomas, C.D., Mispelter, J. (2010) Towards a new treatment of retinoblastoma? *Ann. Pharm. Francaises* 68, 195-202.
 330. Garcia, G., Hammerer, F., Poyer, F., Achelle, S., Teulade-Fichou, M.-P., Maillard, P. (2013) Carbohydrate-conjugated porphyrin dimers: Synthesis and photobiological evaluation for a potential application in one-photon and two-photon photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 153-165.
 331. Amessou, M., Carrez, D., Patin, D., Sarr, M., Grierson, D.S., Croisy, A., Antonio, C., Tedesco, A.C., Maillard, Ph., Johannes L. (2008) Retrograde delivery of photosensitizer (TPPp-O-GluOH)₃ selectively potentiates its photodynamic activity. *Bioconjug. Chem.* 19, 532-538.
 332. Stasheuski, A.S., Galievsky, V.A., Knyukshto, V.N., Ghazaryan, R.K., Gyulkhandanyan, A.G., Gyulkhandanyan, G.V., Dzhagarov, B.M. (2014) Water-soluble pyridyl Porphyrins with N-substituents: fluorescent properties and photosensitized formation of singlet oxygen. *J. Appl. Spectroscopy* 80, 813-823.
 333. Menezes, P.F.C., Imasato, H., Ferreira, J., Bagnato, V.S., Sibata, C.H., Perussi, J.R. (2008) Aggregation susceptibility on phototransformation of hematoporphyrin derivatives. *Laser Phys. Lett.* 5, 227-235.
 334. Rywkin, S., Lenny, L., Goldstein, J., Geacintov, N.E., Margolis-Nunno, H., Horowitz, B. (1992) Importance of type I and type II mechanisms in the photodynamic inactivation of viruses in blood with aluminum phthalocyanine derivatives. *Photochem Photobiol.* 56, 463-469.
 335. Cruz-Oliveira, C., Almeida, A.F., Freire, J.M., Caruso, M.B., Morando, M.A., Ferreira, V.N.S., Assuncao-Miranda, I., Gomes, A.M.O., Castanho, M.A.R.B., Da Poian, A.T. (2017) Mechanisms of Vesicular Stomatitis Virus Inactivation by Protoporphyrin IX, Zinc-Protoporphyrin IX, and Mesoporphyrin IX. *Antimic. agent Chemoter.* 61, Article Number: e00053-17
 - 336- Juzeniene, A., Nielsen, K.P., Moan, J. (2006) Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J. Environ. Phatol. Toxicol. Oncol.* 25, 7-28.
 - 337- Chirvony, V.S. (2003) Primary photoprocesses in cationic 5,10,15,20-meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrin and its transition metal complexes bound with nucleic acids. *J. Porph. Phthalocyan.* 7, 766-774.
 338. Kruk, N.N., Dzhagarov, B.M., Galievsky, V.A., Chirvony, V.S., Turpin, P.Y. (1998) Photophysics of the cationic 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl) porphyrin bound to

- DNA, [poly(dA-dT)](2) and [poly(dG-dC)](2): interaction with molecular oxygen studied by porphyrin triplet-triplet absorption and singlet oxygen luminescence. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 42, 181-190.
339. Cló, E., Snyder, J.W., Voigt, N.V., Ogilby, P.R., Gothelf, K.V. (2006) DNA-programmed control of photosensitized singlet oxygen production. *J Am Chem Soc.* 128, 4200–4201.
 340. Wang, Y.Y., Dong, Z., Hu, H., Yang, Q., Hou, X.D., Wu, P. (2019) DNA-modulated photosensitization: current status and future aspects in biosensing and environmental monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 4415-4423.
 341. Majiya, H., Adeyemi, O.O., Herod, M., Stonehouse, N.J., Millner, P. (2018) Photodynamic inactivation of non-enveloped RNA viruses. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 189, 87-94.
 342. Onuki, J., Ribas, A.V., Medeiros, M.H.G., Araki, K., Toma, H.E., Catalani, L.H., Di Mascio, P. (1996) Supramolecular cationic tetra-ruthenated porphyrin induces single-strand breaks and 8-oxo-7,8--dihydro-2'-deoxyguanosine formation in DNA in the presence of light. *Photochem. Photobiol.* 63, 272-277.
 343. Morin, B., J. Cadet (1995) Type I benzophenone-mediated nucleophilic reaction of 5'-amino-2',5'-dideoxyguanosine. A model system for the investigation of photosensitized formation of DNA-protein cross-links. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 792-799.
 344. Huang, H., Song, W., Rieffel, J., Lovell, J.F. (2015) Emerging applications of porphyrins in photomedicine. *Frontiers in Physics* 3, Article Number: 23
 345. Lovell, J.F., Liu, T.W.B., Chen, J., Zheng, G. (2010) Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chem. Rev.* 110, 2839–285.
 346. Bugaj, A.M. (2011) Targeted photodynamic therapy - a promising strategy of tumor treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10, 1097-1109.
 347. Thandu, M., Comuzzi, C., Goi, D. (2015) Phototreatment of Water by Organic photosensitizers and comparison with inorganics Semiconductors. *Int. J. Photonics.* Article Number: 521367

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki Dr. Rontó Györgyi professzor asszonynak, aki az Intézet korábbi vezetőjeként az egyetem Biofizikai Intézetébe fogadott, és mindvégig támogatóan követte pályámat. Hálával tartozom Dr. Fidy Judit professzor asszonynak, aki a fotobiológiai kutatásokra irányította figyelmemet, és az Intézet vezetőjeként biztosította kutatómunkám háttérét. Köszönöm Dr. Kellermayer Miklós professzor úrnak, hogy kitartóan biztatott a dolgozat elkészítésére.

Hálás vagyok Dr. Tóth Katalinnak és Dr. Jörg Langowskinak, a German Cancer Research Center kutatóinak, akik mindvégig lehetővé tették kísérleti munkám folytatását, és akiktől sok építő kritikát, biztatást, tanácsot kaptam az évek során. Nemcsak szakmailag, hanem emberileg, barátilag is felbecsülhetetlen értékű támogatást kaptam tőlük, így e munka létrejöttében meghatározó szerepük volt.

Köszönettel tartozom diákjaimnak, doktorandusz hallgatóknak és diákkörösöknek érdeklődésükért, munkájukért, a tőlük kapott inspirációért és biztatásért.

Köszönöm a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet minden korábbi és jelenlegi munkatársának, akik segítettek kutatásaimat. Külön köszönöm a közös munkát közvetlen munkatársaimnak, Dr. Fekete Andreának, Dr. Gróf Pálnak, Dr. Herényi Leventének, Dr. Voszka Istvánnak, a felbecsülhetetlen technikai segítséget Drabbant Mónikának és Várszegi Mártának.

Hálás vagyok hazai és külföldi együttműködő partnereimnek, elsősorban Dr. Dietrich Averbeknek (Institut Curie, Orsay), aki mindvégig atyai támogatással figyelte és tanácsokkal segítette pályafutásomat, Dr. Giulio Jorinak (University of Padova, Padova), aki a porfirinek világába bevezetett és Dr. Philippe Maillardnak (Institut Curie, Orsay), a termékeny közös munkáért. Köszönöm Dr. Bősze Szilviának és Dr. Mező Gábornak, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport kutatóinak a mindig megbízható és gyümölcsöző együttműködést.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleim példamutatását, férjem és fiaim biztatását és szerető támogatását, barátaim figyelmét, ami nélkül e munka nem jöhetett volna létre.

10. Közlemények

10.1. A disszertáció alapjául szolgáló in extenso közlemények:

Első vagy utolsó szerzős

1. Csik, G., Balog, E., Voszka, I., Tölgyesi, F., Oulmi, D., Maillard, Ph., Momenteau, M. (1998) Glycosylated Derivatives of Tetraphenyl Porphyrin: Photophysical Characterisation, Self-Aggregation and Membrane-Binding J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 44(3), 216-224. (IF:1,365)
2. Voszka, I., Galántai, R., Maillard, Ph., G. Csik, G. (1999) Interaction of glycosylated tetraphenyl porphyrins with model lipid membranes of different composition. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 52(1-3), 92-98. (IF:1.835)
3. Gábor, F., Szolnoki, J., Tóth, K., Fekete, A., Maillard, Ph., Csik, G. (2001) Photo-induced inactivation of T7 phage sensitized by symmetrically and asymmetrically substituted tetraphenyl porphyrin: Comparison of efficiency and mechanism of action. Photochem. Photobiol. 73(3), 304-311. (IF:2.146)
4. Egyeki, M., Turoczy, G., Toth, K., Fekete, A., Maillard, Ph., Csik, G. (2003) Photodynamic inactivation of porphyrin sensitized T7 phage: Efficiency and mechanism of action. Acta Pharmac. Hungarica. 73(2), 97-102.
5. Egyeki, M., Turóczy, G., Majer, Zs., Tóth, K., Fekete, A., Maillard, Ph., Csik, G. (2003) Photosensitized Inactivation of T7 Phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses. Efficiency and Mechanism of Action. BBA-General Subj. 1624(1-3), 115-124. (IF:2,557)
6. Zupan, K., Herényi, L., Toth, K., Majer, Z., Csik, G. (2004) Binding of Cationic Porphyrin to Isolated and Encapsidated Viral DNA Analyzed by Comprehensive Spectroscopic Methods. Biochemistry 43(28), 9151-9159. (IF:4,008)
7. Zupán, K., Herényi, L., Tóth, K., Egyeki, M., Csik, G. (2005) Binding of cationic porphyrin to isolated DNA and nucleoprotein complex – quantitative analysis of binding forms under various experimental conditions. Biochemistry 44(45), 15000-15006. (IF:3,848)
8. Hudecz F., Bánóczy Z. Csik G. (2005) Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds. Med. Res. Rew. 25(6), 679-736. (IF:7.964)
9. Zupán, K., Egyeki, M., Tóth, K., Fekete, A., Herényi, L., Módos, K., Csik, G. (2008) Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 90(2), 105–112. (IF: 1,838)
10. Csik, G., Egyeki, M., Herényi, L., Majer, Z., Toth, K. (2009) Role of structure-proteins in the porphyrin-DNA interaction. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 96(3), 207-215. (IF: 1.871)
11. Mező, G., Herényi, L., Habdas, J., Majer, Z., Myśliwa-Kurdziel, B., Tóth, K., Csik G., (2011) Syntheses and DNA binding of new cationic porphyrin-tetrapeptide conjugates. Bipohys. Chem. 155(1), 36-44. (IF:2,203)

12. Orosz, Á., Mezo, G., Herényi, L., Habdas, J., Majer, Z., Myśliwa-Kurczel, B., Tóth, K., Csík, G. (2013) Binding of new cationic porphyrin-tetrapeptide conjugates to nucleoprotein complexes. *Biophys. Chem.* 177-178, 14-23. (IF 2,319)
13. Orosz, Á., Bősze, S., Mező, G., Szabó, I., Herényi, L., Csik, G. (2017) Oligo- and polypeptide conjugates of cationic porphyrins: binding, cellular uptake, and cellular localization. *Amino Acids.* 49(7), 1263-1276. (IF 2,906)

Társszerzős:

14. Voszka, I., Szabó, Zs., Csik, G., Maillard, Ph., Gróf, P. (2005) Interaction of tetraphenylporphyrin derivatives with DPPC-liposomes: an EPR study. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 79(2), 83-88. (IF:1,597)t
15. Voszka, I., Budai, M., Szabo, Z., Maillard, P., Csik, G., Grof, P. (2007) Interaction of photosensitizers with liposomes containing unsaturated lipid. *Chem. Phys. Lipids* 145 (2), 63-71. (IF 2,396)

A disszertáció alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 38,853

10.2. További közlemények

A kandidátusi (PhD) fokozat megszerzése előtti in extenso közlemények:

Első vagy utolsó szerzős:

1. Rontó, G., Tóth, K., Gáspár, S., Csík, G. (1992) Phage nucleoprotein - psoralen interaction: quantitative characterization of dark and photoreaction (Invited Review), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 12(1), 9-27. (IF:1,791)
2. Csík, G., Besson, T., Coudert, G., Guillaumet, G., Nocentini, S. (1993) Biophysical and biological properties of newly synthesized dioxinocoumarin derivatives I. Dark effect on T7 phage and HeLa cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 19(2), 119-124. (IF:1,861)
3. Csík, G., Rontó, Gy., Nocentini, S., Averbeck, S., Averbeck, D., Besson, T., Coudert, G., Guillaumet G. (1994) Biophysical and biological properties of newly synthesized dioxinocoumarin derivatives. Part II: Dark and photoinduced effects on T7 phage, yeast and HeLa cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 24(2), 129-139. (IF:1,784)

Társszerzős:

4. Rontó, Gy., Fidy, J., Fekete, A., Tóth, K., Csík, G., Gáspár, S. (1986) Structural and functional changes of bacteriophage-nucleoproteins by dark- and photoreaction with furocoumarins, *Studia Biophys.* 112(1), 63-70. (IF:0,211)
5. Tóth, K., Csík, G., Rontó, Gy. (1987) Salt effects on the bacteriophage T7 - II. Structure and activity changes, *Physiol. Chem. and Phys. and Medical NMR* 19(1), 67-74. (IF:0,295)
6. Rontó, Gy., Tóth, K., Csík, G., Feigin, L.A., Svergun, D.I., Dembo, A.T., Shtikova, E.V. (1988) Loosening of the phage structure in a low ionic strength environment, *Eur. Biophys. J.* 15(5), 293-298. (IF:1,887)
7. Tóth, K., Csik, G., Averbeck, D. (1988) Characterization of new furocoumarin derivatives by their dark and light mediated action on RNA bacteriophage MS2, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2(2), 209-220. (IF:1,784)

8. Tóth, K., Csik, G., Rontó, Gy. (1990) Dark and photoreactivity of 4'-aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen with phage T7, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 5(2), 167-178.
(IF:1,594)

A kandidátusi (PhD) értekezés előtti közlemények összesített impakt faktora: 11,207

A kandidátusi (PhD) értekezését követően megjelent in extenso közlemények:

Első vagy utolsó szerzős

1. Voszka, I., Maillard, Ph., Momenteau, M. Csik, G., (1998) Effects of tetraphenyl porphyrin derivatives on red blood cells and model systems. Med. Sci. Monitor 4(4), 600-606.
2. Gábor, F., Szocs, K., Maillard, Ph., Csik, G., (2001) Photobiological activity of exogenous and endogenous porphyrin derivatives in Escherichia coli and Enterococcus hirae cells, Rad. Environ. Biophys. 40(2), 145-151 (IF:1,776)
3. Egyeki, M., Tóth, K., Waldeck, W., Schmezer, P., Langowski, G. Csik, G. (2006) DNA damaging capability of hematoporphyrin derivative towards DNAs of various accessibilities. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 84(2), 119-127. (IF:1,909)

Társszerzős:

4. Valduga, G., Bianco, G., Csik, G., Reddi, E., Masiero, L., Garbisa, S., Jori, G. (1996) Interaction of hydro and lipophilic phthalocyanines with cells of different metastatic potential, Biochem. Pharmacol. 51(5), 585-590. (IF:2,612)
5. Gábor, F., Csik, G., Ronto, G. (1997) Interaction of Zn-phthalocyanine-tetrasuphonate with different types of bacterial cells. Med. Sci. Mon. 3(3), 294-298.
6. Szöcs, K., Gábor, F., Csik, G., Fidy, J. (1999) delta-Aminolaevulinic acid-induced porphyrin synthesis and photodynamic inactivation of Escherichia coli B. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 50(1), 8-17. (IF:1,835)
7. Koczan, G., Csik, G., Csampai, A., Balog, E., Bosze, S., Sohar, P., Hudecz, F. (2001) Synthesis and characterisation of 4-ethoxy-methylene-2-[1]-naphthyl-5(4H)-oxazolone and its fluorescent amino acid derivatives. Tetrahedron 57(21), 4589-4598. (IF: 2,276)
8. Szocs, K., Csik, G., Kaposi, A.D., Fidy, J. (2001) In situ detection of ALA-stimulated porphyrin metabolic products in Escherichia coli B by fluorescence line narrowing spectroscopy. BBA – Mol. Cell Res. 1541(3), 170-178. (IF:3,000)
9. Bösze, Sz., Hudecz, F., Igaz, P., Ortutay, Zs., Csik, G., Falus, A., Tóth, S. (2003) Interleukin-6 N-terminal peptides modulate the expression of the junB protooncogen and the production of fibrinogen on HepG2 cells. Biol. Chem. 384(3), 409-421. (IF:2,606)
10. Bosze, S., Igaz, P., Toth, S., Csik, G., Szabo, R., Ortutay, Zs., Falus, A., Hudecz, F. (2003) Effect of synthetic IL-6 peptides on junB expression and fibrinogen production of HepG2 cells. Chimica Oggi – Chem. Today 21(6), 27-34. (IF: 0,257)
11. Bösze, Sz., Csik, G., Kóczán, Gy., Hudecz, F. (2006) Synthesis and spectroscopic properties of 4-ethoxymethylene-2-(1)-naphthyl-5(4H)-oxazolone labelled fluorescent peptides. Biopolymers 81(2), 81-91. (IF:2,480)
12. Reményi, J., Csik, G., Kovács, P., Reig, F., Hudecz, F. (2006) The effect of the structure of branched polypeptide carrier on intracellular delivery of daunomycin. BBA - Biomembranes 1758(3), 280-289. (IF: 3,587)

13. Herényi, L., Veres, D., Bekasi, S., Voszka, I., Módos, K., Csik, G., Kaposi, A.D., Fidy, J. (2009) Location of Mesoporphyrin in Liposomes Determined by Site-Selective Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 113(21), 7716-7724. (IF: 3,471)
14. Miklán, Z., Orbán, E., Csik, G., Schlosser, G., Magyar, A., Hudecz, F. (2009) New daunomycin-oligoarginine conjugates: synthesis, characterization, and effect on human leukemia and human hepatoma cells. *Biopolymers* 92(6), 489-501. (IF: 2,605)
15. Orbán, E., Mezo, G., Schlage, P., Csik, G., Kulić, Z., Ansorge, P., Fellingner, E., Möller, H.M., Manea, M. (2011) In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino Acids* 41(2), 469-483. (IF:4,106)
16. Orbán E., Manea M, Marquadt A., Bánóczy Z., Csik, G., Fellingner, E., Bösze, S., Hudecz F. (2011) A new daunomycin-peptide conjugate: Synthesis, characterization and the effect on the protein expression profile of HL-60 cells in vitro. *Bioconj. Chem.* 22(10), 2154-2165. (IF:4,930)
17. Veres, D., Böcskei-Antal, B., Voszka, I., Módos, K., Csik, G., Kaposi, A.D., Fidy, J., Herényi, L. (2012) Comparison of binding ability and location of two mesoporphyrin derivatives in liposomes explored with conventional and site-selective fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 116(32), 9644-9652. (IF:3,696)
18. Albert, E., P. Albouy, A., Ayral, A., Basa, P., Csik, G., Nagy, N., Roualdès, S., Rouessac, V., Sáfrán, G., Suhajda, Á., Zolnai, Z., Hórvölgyi, Z. (2015) Antibacterial properties of Ag-TiO₂ composite sol-gel coatings. *RSC Advances* 5(73), 59070-59081. (IF:3,840)
19. Vörös, Z., Csik, G., Herényi, L., Kellermayer, M.S.Z. (2017) Stepwise reversible nanomechanical buckling in a viral capsid. *Nanoscale* 9(3), 1136-1143. (IF:7,233)
20. Hornyák, I., Csik, G., Lukacs, M., Herke, V., Balazs Horvathy, D., Lacza, Zs. (2017) Sustained release of a biodegradable alginate coating covering chemically unbound gentamicin on human bone allograft; and a method for colorimetric drug release measurement. *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sci.* 4(1), 1-6. (IF:1,922)
21. Kellermayer, M.S.Z., Vörös, Z., Csik, G., Herényi, L. (2018) Forced phage uncorking: Viral DNA ejection triggered by a mechanically sensitive switch. *Nanoscale* 10(4), 1898-1904. (IF:6,970)
22. Nagy, T.M., Knapp, K., Illyés, E., Timári, I., Schlosser, G., Csik, G., Borics, A., Majer, Z., Kövér, K.E. (2018) Photochemical and structural studies on cyclic peptide models. *Molecules*. 23(9), Article number 2196 (IF:3,060)
23. Vörös, Z., Csik, G., Herényi, L., Kellermayer, M. (2018) Temperature-dependent nanomechanics and topography of bacteriophage T7. *J. Virology* 92(20), Paper e01236-18 (IF 4,324)

A kandidátusi (PhD) fokozat megszerzését követő egyéb közlemények összesített impakt faktora: 64,664

Könyvfejezetek

1. Tóth, K., Csik, G., Rontó Gy. (1991) Quantitative characterization of photosensitizer - nucleoprotein interaction In *Light in Biology and Medicine*, Vol. 2. (eds. by Douglas, R.H., Moan, J., Ronto, G.). Plenum Press pp. 211-218.

2. Bősze, Sz., Kóczán, Gy., Csik, G., Falus, A., Hudecz, F. (1999) A new fluorophore for peptide labelling: Synthesis and analysis of its interaction with interleukin-6 receptor. In Innovation and perspectives. in solid phase synthesis and combinatorial libraries, ed. by R. Epton, Mayflower (Birmingham) pp. 189-192.
3. Bősze, Sz., Csik, G., Illyés, E., Kóczán, Gy., Sebestyén, F., Hudecz, F. (2001) Synthesis and spectroscopic characterisation of tryptophan containing peptides labelled with 4-ethoxymethylene-2-[1]-naphthyl-5(4h)-oxazolone or 4-[7-hydroxycoumarin]acetic acid. In Peptides 2000: Proceedings of the 26th European Peptide Symposium (eds. Martinez, J., Fehrentz, J.A.) Paris, Franciaország : Éditions EDK, pp. 605-606.
4. Csik, G., Gróf, P., Knapp, K., Nemes, A., Majer, Zs. (2014) Trp-mediated photoreduction of disulfide bonds modelling by peptides. In: Peptide Science 2013 Proceedings of the 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, 50th Japanese Peptide Symposium (eds. Nishiuchi, Y., Teshima, T.) Tokyo, Kyoto: Japanese Peptide Society, pp. 185-188.
5. Orosz, A., Csik, G. (2016) Peptide/protein conjugates of photosensitizers. in Amino Acids, Peptides and Proteins, SPR Volume 40, (eds. Ryadnov, M. and Hudecz, F.) Royal Society of Chemistry, London pp 100-145.

Tudományos összesítés:

Összes első vagy utolsó szerzős közlemény impakt faktora: 43,981

Az összes közlemény impakt faktora: 118,555

Független hivatkozások száma: 566