

**MTA Doktori Értekezés Tézisei**

**A PORFIRINEK KÖLCSÖNHATÁSAINAK NÉHÁNY BIOFIZIKAI  
ASPEKTUSA**

**CSIK GABRIELLA**



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

**Budapest  
2019**

## Bevezetés

A porfirinek sokrétű és 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.

Az orvostudományban az utóbbi évtizedekben a porfirinek fotodinamikus terápiában (PDT) betöltött szerepe kapta a legnagyobb figyelmet. A fotodinamikus hatás alapja a porfirinek gerjesztése nyomán lejátszódó elektron- vagy energiatranszfer. A keletkező reaktív gyökök és szingulett oxigén sejtdestrukciónhoz vezető oxidációs folyamatokat indítanak el.

A tumorterápia mellett látunk klinikai példákat a fotodinamikus reakció (PDR) felhasználására az időskori makula degeneráció kezelésében, atheroscleroticus plakkok eltávolításában vagy nem malignus bőrgyógyászati kórképek terápiájában. A fotodinamikus reakció destruktív hatásán alapul annak antimikrobiális alkalmazása is.

A PDT-vel kapcsolatos kiterjedt klinikai vizsgálatok, kiemelten az 1970-es években kezdődtek és vezettek a Photofrin<sup>®</sup> készítmény kifejlesztéséhez, amelyet a mai napig is használnak a klinikumban. A Photofrin<sup>®</sup> hátrányos tulajdonságai, mint az elhúzódó retencia a bőrben, az aggregációs hajlandóság, a kis abszorbancia vörös tartományban vezettek további fényérzékenyítők, az u.n. „második generációs” készítmények tervezéséhez, előállításához és az azokkal kapcsolatos kutatásokhoz. A második generációs származékok közül különösen sikeresnek bizonyultak a bizonyos klorin és bakterioklorin származékok.

Számos törekvés irányult arra is, 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. A konjugált származékok közül kiemelt szerepet kaptak az aszimmetrikus szerkezet kialakítását lehetővé tevő, a hidrofób/hidrofil karakter finom szabályozására alkalmas, és így a vízzoldékonyság fokozását biztosító mezo-szubsztituált porfirin származékok, ezek között is 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 méret, elektrondenzitás, térszerkezet, hidrofób/hidrofil karakter hangolható a szacharid partner szerkezetének, méretének, a szubsztituensek orto- vagy para- pozíciójának, illetve a fenil csoportok egyéb szubsztituenseinek megválasztásával. A szénhidrát részlet jelenléte ezen felül

előnyös lehet a sejtekkel való kapcsolat kialakításában is, amennyiben sejtfelszíni receptorokhoz való kötődést tesznek lehetővé.

A porfirin típusú vegyületek célbajuttatásában kiemelkedő stratégia lehet oligopeptidek kapcsolása a fényérzékenyítő molekulához. A peptid kiválasztásában több megközelítés ismert. Történtek vizsgálatok sejtpenetráló peptid, oktaarginin konjugátumokkal, vagy a tumorok körüli erek falában elhelyezkedő vascular endothelial growth factor 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.

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 alapján feltételezhető volt, hogy ilyen kationos porfirinekkal konjugált molekulákat a porfirin segítségével a nukleinsavak környezetébe lehet juttatni, ahol megváltoztathatják a nukleinsav térszerkezetét és így befolyásolhatják működését.

### **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 háttérében az áll, hogy az indirekt fotoreakcióban megjelenő citotoxikus reaktív ágensek élettartama rövid, tipikusan 40 ns-nál rövidebb, így hatótávolságuk is korlátozott, átlagosan 20 nm. Ezért a fényérzékenyítő vegyületek sejten belüli elhelyezkedése egyúttal meghatározza a kialakuló fotokémiai sérülések helyét is.

A sejten belüli lehetséges támadáspontok közül kezdetektől különös figyelmet kapott a sejtmembrán. A membránnal kialakított kapcsolat megismerése fontos a PDT hatásmechanizmusának megértése, új fényérzékenyítő vegyületek tervezése, az eljárás hatásosságának fokozása szempontjából.

Az egyik alapvető kérdés egy porfirin származék várható kötődési készsége a membránhoz. Ez megfelelően tanulmányozható különböző összetételű liposzómák, mint membrán modellek felhasználásával. A liposzómák lehetőséget adnak a porfirin származékok asszociációját befolyásoló fiziko-kémiai paraméterek, a fotobiológia hatékonyságot módosító fotofizikai jellemzők vizsgálatára, a fotobiológiai hatásmechanizmus részleteinek feltárására.

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. 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 porfirin származékok liposzómában való lokalizációját tanulmányozhatjuk azok saját fluoreszcencia jelének detektálásával például a kötött porfirin anizotrópiájának meghatározásával vagy „site-selective” fluoreszcencia spektroszkópiával. A porfirinek saját fluoreszcens jelének kihasználásán túl alkalmazhatunk az egyes lipid régiókat specifikusan jelölő fluoreszcens vagy ESR jelet szolgáltató spinjelző molekulákat illetve ismert lokalizációjú quenchereket. Ilyenkor a jelölő molekula által szolgáltatott jel változásából következtethetünk a porfirin azonos régióban való elhelyezkedésére. Ez utóbbi módszerek előnye lehet a lokalizáció pontosabb meghatározása. Kockázatuk, hogy a jelző vagy quencher maga is módosítja az eredeti lipid környezetet.

Munkám során 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 molekulaszervezet „finom hangolására”, így a porfirin lokalizációja és a molekulaszervezet közötti kapcsolat részleteinek tanulmányozására.

### **Porfirin származékok kötődése nukleinsavakhoz**

Számos olyan kisméretű ligandum ismert, amely a nukleinsavakhoz, kitüntetetten a kettős szálú DNS-hez nem kovalens módon kötődik. 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.

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) DNS iránt mutatott affinitása több mint 30 éve ismert és kiterjedten vizsgált jelenség. Az irodalomban konszenzus van arról, hogy a TMPyP mindkét típusú, nem kovalens kötéssel kapcsolódhat a kettős szálú DNS-hez.

Kezdetektől észszerűnek mutatkozott a kötődési módok könnyebb elemzése érdekében a kétféle kötött állapotot külön mintákban előállítani és elemezni. Erre lehetőséget ad a két fő kötési mód eltérő bázispreferenciája. Az egyes kötött állapotok elkülönített jellemzésére alkalmasnak bizonyultak a csak A-T illetve csak G-C tartalmú szintetikus kettős szálú oligo- illetve polinukleotidok. A másik lehetőség az egyes kötött formák diszkrét előállítására a szabadbázisú vegyület megfelelő komplexképzése valamely fématommal.

A kötött állapot kialakulása jellegzetes változásokat idéz elő a TMPyP abszorpciós és fluoreszcencia spektrumában, fluoreszcencia élettartamában. A DNS-bázisok és a kromofór közelségére utaló bizonyíték a Förster-féle rezonancia energiatranszfer létrejötte, amikor a bázisok abszorpciós maximumán ( $\lambda=260$  nm) gerjesztve a rendszert, a TMPyP -re jellemző

emisszió jelenik meg. A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia szintén szolgáltathat bizonyítékot a kötött formák megjelenésére, az egyes kötött formák azonosítására.

A TMPyP, illetve különböző fémkomplexeinek kötődése homogén bázisszekvenciájú oligo- és polinukleotidokhoz bizonyított, és a két kötési forma azonosítása és széles körű jellemzése is megtörtént. A vegyes bázis-összetételű, természetes DNS-hez való kötődésről kevés adat áll rendelkezésre. Még inkább így van ez a kötött formák mennyiségére, mennyiségi megoszlására vonatkozóan.

Munkánk során arra kerestünk választ, hogy a kationos porfirinek ismert kötött formái 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 fotodinamikus reakció antimikrobiális alkalmazása**

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

A plazmában található vírusok fotokémiai úton történő eliminálásával az 1980-as évek elején kezdett el célzottan foglalkozni az orvostudomány. Az elsők között merült fel a fenotiazin származékok, mint fényérzékenyítők kipróbálása a vérkészítmények fotodinamikus fertőtlenítésében. A metilénkék hatékonyan szenzibilizálja több, extracelluláris, burokkal rendelkező vírus fotoinaktivációját, de mellékhatásai miatt alkalmazása csak sejtmentes környezetben engedélyezett. Európa-szerte alkalmazzák például a THERAFLEX MB-PLASMA<sup>®</sup> komplex készítményt a plazma vírusszennyeződésének inaktiválására.

A PDR potenciális támadáspontjai lehetnek a peplont alkotó telítetlen zsírsavak és fehérjék, a fehérje kapszid, a magfehérje vagy a nukleinsavak. Az a tény azonban, hogy a MB peplonnal rendelkező vírusokat képes inaktíválni 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. Több szerző részletesen vizsgálta és azonosította a fehérjékben kialakuló sérüléseket. Éppen a fehérjékben okozott fotokémiai sérülésekkel magyarázhatók a metilénkékekkel szenzibilizált fotodinamikus kezelések mellékhatásai is, így a plazma fehérjék, alvadási faktorok sérülései, a sejtes elemek fehérjekomponenseinek sérülései.

A mellékhatások kiküszöbölésének egyik lehetséges megközelítése olyan fényérzékenyítő vegyületek alkalmazása, amelyek szelektíven kötődnek a nukleinsavakhoz és szelektíven

károsítják azt. 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 alkalmas modelljei lehetnek mind a peplon nélküli (Q $\beta$ ,  $\lambda$ , 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,  $\lambda$ , PM2). A bakteriofágokon nyert adatok megalapozhatják a PDR patogén vírusokon való alkalmazását, hasznos adatokat szolgáltathatnak a kezelések hatékonyságának optimalizálásához.

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.

## Célkitűzés

### 1. A glikozilált porfirinek 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 kisárok 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.

### **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.

## **Anyagok és módszerek**

### **Pufferek**

A T7 bakteriofágok tenyésztéséhez valamint a liposzómák készítésénél foszfát puffert (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; pH 7,4;  $\mu=124$  mM) használtunk. A T7 bakteriofággal és az abból izolált DNS-sel végzett fáginaktivációs illetve spektroszkópiai méréseink során, Tris-HCl (pH 7,4) puffert 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 értük el. A pH beállításához 10 M-os sósavat használtunk. A kétértékű ionokkal

(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>) kiegészített fenti Tris-HCl pufferekben a kérdéses ionok koncentrációja, telített klorid ill. szulfát sóik oldatának megfelelő elegyítése után minden esetben 1 mM volt.

### 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)<sub>4</sub>P), az 5,10,15,20-tetrakis(4-β-D-glükózil-fenil)porfirin (TP(4-OgluOH)<sub>4</sub>P), az 5,10,15-trisz(4-β-D-glükózil-fenil),20-fenilporfirin (TP(4-OgluOH)<sub>3</sub>P), az 5,10,15-trisz(4-β-D-galaktozil-fenil),20-(2',3',4',5'-pentafluorofenil)porfirin (TPF5(4-OGalOH)<sub>3</sub>) valamint az 5,10,15,20-tetrakis(4-β-D-xilozil-fenil)porfirin (TP(4-OXylOH)<sub>4</sub>P).

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).

A BMPCP és TMPCP tetrapeptid konjugátumait: NH<sub>2</sub>-Lys(TMPCP-Ala-D-Ala-Ala)-CONH<sub>2</sub> (TMPCP-4P) és NH<sub>2</sub>-Lys[Lys(Ala-D-Ala-Ala-BMPCP-Ala-D-Ala-Ala)]-CONH<sub>2</sub> (BMPCP(4P)<sub>2</sub>) és az elágazó láncú poli[Lys-(DL-Ala)<sub>m</sub>] (AK) polipeptiddel képzett konjugátumot (TMPCP-AK) Mező Gábor és mtsai (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) készítették és jellemezték. Az elágazó láncú polipeptid polilizin gerincének átlagos polimerizációs foka  $\overline{DP}_n=250$ , a DL-Ala/Lys mol/mol aránya 2,7, a [Lys-(DL-ALA<sub>2,7</sub>)] monomer egységek átlagos móltömege 320 Da.

### Liposzómák előállítása és jelölése

A lipid-porfirin kölcsönhatások vizsgálatára kis unilamelláris liposzómákat (SUV) állítottunk elő. A foszfolipidet kloroformban oldottuk fel, majd az edényt folyamatosan forgatva az oldószert légritkított térben elpárologtattuk. Ezután a lipid filmet foszfátpufferbe szuszpendáltuk, majd a szuszpenzió kitisztulásáig kezeltük ultrahanggal (MSE Ultrasonic Disintegrator; A=8μm, f=23kHz, P=15W). A liposzómák méretét fényszórásméréssel (ALV Goniometer, Spectraphysics 124B He-Ne lézer, P=10 mW, λ=632.8 nm) ellenőriztük.

A porfirinek kötődési vizsgálatait neutrális fejcsoportú 1,2-dimirisztoil-*sn*-glicero-3-foszfatidilkolinból (DMPC) és DMPC és negatív töltésű fejcsoportú 1,2-dimirisztoil-*sn*-glicero-3-foszfatidilglicerol (DMPG) 9:1 (mol/mol) arányú keverékéből készített liposzómákon végeztük.

DMPC és DMPC/DMPG liposzómák fejcsoport régiójának illetve szénhidrogénlánc régiójának fluoreszcens jelzésére 8-anilino-1-naftalinszulfonsavat (ANS) illetve 1,6-difenil-1,3,5-hexatriént (DPH) használtunk. A jelzők fluoreszcencia élettartamának illetve anizotrópiájának mérése során a mintákat λ<sub>g</sub>=398 nm-en (ANS) illetve λ<sub>g</sub>=357 nm-en (DPH) gerjesztettük, az emittált jelet λ<sub>em</sub>=480 nm-en (ANS) illetve λ<sub>em</sub>=450 nm-en (DPH) detektáltuk.



A liposzómák lipid régójának elektron spin rezonancia spektroszkópiai vizsgálatához 1,2-dipalmitoil-*sn*-glycero-3-foszfadilkolin (DPPC) és 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-foszfadilkolin (DOPC) felhasználásával 70:30 illetve 85:15 (mol/mol) összetételű liposzómákat készítettünk. 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 valamint 16-doxyl-sztearinsav jelölőt használtunk.

### **T7 bakteriofág preparátum készítése és DNS izolálása**

T7 bakteriofág (ATCC 11303-B7) preparátumot *Escherichia coli* (ATCC 11303) gazdasejt felhasználásával készítettünk. A tenyésztést és a lizátum tisztítását Strauss és Sinsheimer (1963) módszere szerint végeztük. A fágoldatot tisztítás után CsCl gradiensen koncentráltuk, így 100 mg/ml töménységet tudunk 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 a bázisok átlagos moláris abszorbanciájának ismeretében ( $\epsilon_{260}=7,3 \cdot 10^5$  mol bázis $\cdot$ liter $^{-1} \cdot$ cm $^{-1}$ ) határoztuk meg.

A T7 bakteriofág szuszpenziót 0,5%-os nátrium-dodecil-szulfát oldattal 30 percen át 65 °C-on inkubáltuk, majd a fehérje-SDS komplexet 1M KCl oldattal 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 csapadékot két alkalommal 70 %-os etanol-oldattal mostuk. A DNS-t Tris-HCl (pH 7,4) pufferben, szobahőmérsékleten oldottuk fel. A tisztítás során nyert DNS mennyiségét spektroszkópiai úton ( $\epsilon_{260} = 6,67 \times 10^5$  mol bázis $\cdot$ liter $^{-1} \cdot$ cm $^{-1}$ ), a DNS láncok hosszát gélelektroforézissel, a kettős helikális szerkezet meglétét abszorpciós oladási mérésekkel ellenőriztük.

### **Nukleoszómák és nukleoszóma DNS izolálása HeLa sejtből**

A HeLa sejteket 10 % borjú szérummal kiegészített RPMI-640 médiumban szaporítottuk. A sejtmag illetve a mono- és oligonukleoszómákat tartalmazó frakciót Hammermann és mtsai módszere szerint izoláltuk. A nukleoszómákat tartalmazó frakciót Tris-HCl pufferrel 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 proteinek tartalmaztak. A DNS izolálását a T7 bakteriofág DNS-ének izolálására fentebb leírt módszerrel végeztük.

### **Sejtvonalak, sejtenyésztés**

A kationos porfirinek és konjugátumaik sejtbéli felhalmozódását HL-60 (ATCC: CCL-240)

sejten belüli lokalizációját HT-29 (ATCC: HTB-38) sejteken vizsgáltuk. A HL-60 sejt kultúrát 10% hőkezelt borjúsérummal (FCS; Sigma-Aldrich), L-glutammal (2 mM) és gentamicinnel (160 µg/ml; Sigma-Aldrich) kiegészített Iscove's Modified Dulbecco's tápoldatban (IMDM) (Sigma-Aldrich) növesztettük. A HT-29 sejtek tápoldata hasonló adalékokkal kiegészített RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) tápoldat volt.

### **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 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 T7 nukleoprotein komplex, valamint a T7 fágból izolált DNS szerkezeti stabilitását optikai denzitásuk hőmérséklettől függő változásán keresztül, az abszorpciós olvadási görbék felvételével vizsgáltuk. A méréseket Peltier hőmérsékletszabályozóval felszerelt Cary 4E spektrofotométerrel a nukleinsav abszorpciós maximumán ( $\lambda=260$  nm) végeztük. Meghatároztuk a simított derivált görbék maximum helyeit ( $T_m$ : fázisátalakulási hőmérséklet) és a sávok félérték szélességét ( $w$ ).

### **Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia**

A CD méréseket amino-kámforszulfonsavval kalibrált, PFD-425S Peltier hőmérsékletszabályozóval felszerelt Jasco J-810 spektro-polariméterrel végeztük. A spektrumokat  $\lambda=380$ nm és 500 nm között rögzítettük. A spektrum sávok intenzitását a maximumokhoz tartozó moláris ellipticitással ( $[\Theta]$  deg  $\times$  cm<sup>2</sup> / 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. 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.

### **Elektron spin rezonancia spektroszkópiái (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.

### **Porfirin – liposzóma kötődési állandójának és a kötődés sebességi 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 porfirinekkal 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Az alkalmazott koncentrációk esetében a fluoreszcencia révén emittált fény intenzitása a koncentrációval arányosnak tekinthető. Így a kötődési állandó rögzített porfirin koncentráció esetén az adott hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitásokból határozható meg.

A sebességi állandó meghatározásakor porfirin származékok fluoreszcencia intenzitásának változását mértük a liposzómába való beépülés során az idő függvényében. 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. A kapott görbékre a legkisebb négyzetek módszerének alkalmazásával egy, vagy két exponenciális függvényt illesztettünk.

### **Mikrokalorimetria**

A mikrokalorimetriával (DSC) a lipidek fázisátalakulásának két jellemző paraméterét határoztuk meg: a fő fázisátalakulás hőmérsékletet ( $T_m$ ), valamint a fázisátalakulás félértékszéleségét ( $T_{1/2}$ ). DMPC-t illetve a DMPC:DMPG 9:1 mol/mol arányú keverékét és a fényérzékenyítő anyagot együttesen kloroformban oldottuk fel lipid:porfirin 20:1 mól/mól arányban. A szerves oldószer 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.

### **Fényforrások**

A fotodinamikus reakciók hatásának vizsgálatokor a szenzibilizált mintákat halogén lámpával, (Tungsram – GE Lighting, 12V, 100W) illetve quartz W-halogén lámpával (Newport Oriel, 250W) 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 vízréteggel szűrtük ki.

### **Szingulett oxigén kimutatása jodometriával**

A jodometriás reagenst (0,2 M kálium-foszfát (pH 6,2), 0,12 M kálium-jodid, 10  $\mu$ M ammónium-molibdát) felhasználásig fénytől elzárva hűtőszekrényben tároltuk. A besugárzást megelőzően a reagens oldatát a kívánt koncentráció (0 - 2  $\mu$ M) eléréséhez szükséges porfirin származékkal egészítettük ki és sugároztuk be. Az oldat abszorpciós spektrumát meghatározott besugárzási idők után rögzítettük  $\lambda=220-600$  nm tartományban. A  $I_3^-$  mennyiségére az oldat  $\lambda=355$  nm-en mért abszorbanciájából következtethetünk ( $\epsilon_{355}=2,47 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **T7 bakteriofág inaktivációja**

A fág fertőzőképességét lemezöntéses élőszám 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.

Porfirinnel szenzibilizált T7 fág fotoinaktivációjának jellemzéséhez besugárzás előtt a porfirinnel szenzibilizált bakteriofág szuszpenziót sötétben 10 percreg inkubáltuk. A porfirinek koncentrációját 0,1-10  $\mu$ M között változtattuk, a porfirin/bázispár arány (1/r) 0,02-0,5 tartományban volt. A T7 bakteriofág érzékenységét az inaktivációs hatáskeresztmetszettel jellemeztük ( $\sigma$  [ $\text{cm}^2/\text{J}$ ]). A keletkező gyökök szerepének tanulmányozásakor a fenti mintákhoz 1,3-dimetil-2-tioureát (DMTU) vagy  $\text{NaN}_3$ -ot illetve 1,3-difenil-izobenzofuránt (DPBF) adtunk.

### **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 géltöltő puffer), mintánként azonos mennyiségben. A géleket etidium-bromiddal festettük, a DNS-sávokat UV-átvilágító felett figyeltük meg. Méret-standardként 1 kb DNS-keveréket vagy a  $\lambda$  fág HindIII restrikciós enzimmal emésztett fragmentumait használtuk.

### **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'-GTGCCAGCTTGACTTTCTC-3' primerek segítségével (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, U.S.A.). A reakciót mindenkor 12,5  $\mu$ l 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 gélelektroforézissel elemeztük.

### **Áramlási citometria**

A HL-60 sejtek által felvett porfirin származékok mennyiségét áramlási citometriával határoztuk meg. A sejteket RPMI-1640 médiumban oldott, 2.5-20  $\mu\text{M}$  koncentrációjú porfirin származékkal inkubáltuk 0,5-5 órát. Az inkubálási periódus végén az inkubáló elegyet eltávolítottuk, a sejteket kétszer mostuk szérumban mentes tápoldattal majd 100  $\mu\text{l}$  1 mM-os tripszinnel kezeltük. A tripszin további hatását 10% szérumban tartalmazó HEPES pufferrel gátoltuk (100 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,04 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 20 mM D-glükóz, 24 mM NaHCO<sub>3</sub> és 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4). A sejteket 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.

### **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  $\mu\text{M}$  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 Green I-gyel (inkubációs koncentráció 400 nM;  $\lambda_{\text{ex}}=488$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=520$  nm), a lizozómákat Lyso Tracker Green DND-26-tal (inkubációs koncentráció 50 nM;  $\lambda_{\text{ex}}=488$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=633$  nm), a mitokondriumokat MitoTracker Deep Red FM-mel (inkubációs koncentráció 100 nM;  $\lambda_{\text{ex}}=510$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=665$  nm) jelöltük. A kontroll mintákat csak egy festékkel, illetve jelölő nélküli tápoldatban inkubáltuk. Az adatokat ImageJ software-rel elemeztük.

### **Adatfeldolgozás**

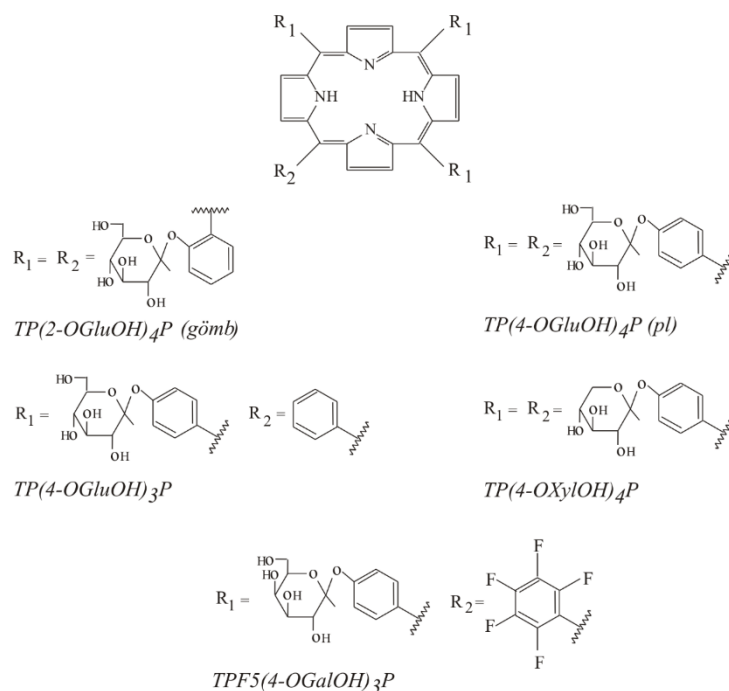
Az adatok feldolgozásához, ahol azt másképp nem jelöltük Microsoft® Excel (Microsoft, Redmond, Washington, U.S.A.) táblázatkezelő illetve Origin® 7.0 (OriginLab, Northampton, MA, U.S.A.) programot használtunk. Az abszorpciós spektrumok felbontásához a kísérleti adatok elméleti függvényekkel való illesztését 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.

## Eredmények

### 1. Porfirin származékok kötődése modellmembránhoz és lokalizációja membránban

A fotodinamikus reakció tumorelles hatásában előnyt jelenthet, ha a porfirin származék a membrán struktúrákban lokalizálódik, azaz alapvetően hidrofób karakterű. A hidrofób karakter azonban növeli az aggregátumok kialakulásának lehetőségét, ennek révén pedig előnytelenül befolyásolja a fotofizikai tulajdonságokat. Megoldást jelenthet szénhidrát oldalláncok kapcsolása a porfirin származékhoz. Kutatásunkhoz olyan mezo helyzetben glikozilált porfirin származékokat választottunk, amelyek a monoszacharid egységek kémiai szerkezete, száma, anellálása alapján különböznek egymástól. A monoszacharid egység(ek) konjugálása jelentős szerkezeti variabilitást tesz lehetővé, növeli a vegyület vízoldékonyságát, csökkenti aggregációs hajlandóságát, és kevésbé befolyásolja a fotofizikai paramétereiket.



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

Munkánk során meghatároztuk a porfirin származékok liposzóma kötődési állandóit DMPC-ből készült, valamint negatív töltésű fejcsoportú DMPG-t tartalmazó (DMPC:DMPG=9:1 mól/mól) kis unilamelláris liposzómákhoz.

Megállapítottuk, hogy a konjugátumban szimmetrikus elrendezésben négy glükózt tartalmazó származékok, a TP(2-OGluOH)<sub>4</sub>P és a TP(4-OGluOH)<sub>4</sub>P kötődési hajlandósága neutrális fejcsoportú liposzómákhoz elhanyagolható. A TP(4-OXylOH)<sub>4</sub>P és a TPF5(4-OGalOH)<sub>3</sub>P kötődési állandója a hematoporfirin származékok és klorinok esetében meghatározott állandókkal azonos nagyságrendű. Az aszimmetrikus, három glükózt tartalmazó TP(4-OGluOH)<sub>3</sub>P kötődési állandója a legnagyobb, értéke a mezoporfirin IX dimetil észteréhez és a mezoporfirin IX dihidrokloridéhoz közeli. Eredményeink azt mutatják, hogy az aszimmetrikus molekula szerkezet és amfifil karakter kedvező a modell membránokhoz való kötődés szempontjából, de a kötődési állandó értékét befolyásolja a molekula mérete és töltéseloszlása is.

Kimutattuk, hogy a fázisátalakulási hőmérséklet alatt a kötődés két sebességi állandóval jellemezhető, függetlenül a liposzóma összetételétől. Az első, gyors lépésben a porfirin kapcsolódik a membrán feji régiójához. Az azt követő, lassú lépésben történik meg a kötött porfirin pozíciójának átrendeződése és lokalizációja a hidrofób membrán régiókban. A kétlépéses kötődési folyamatot támasztja alá a sebességi állandók változása a DMPC koncentrációjával, illetve a porfirin:lipid molaránnyal.

A kötött porfirin liposzómában, a lipid kettős rétegen belüli lokalizációját az egyes lipid régiók fluoreszcens jelzésével és ESR spektroszkópiával tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a gömbszimmetrikus TP(2-OGluOH)<sub>4</sub>P nem kötődik egyik jelzett membrán régióhoz sem. A szimmetrikusan szubsztituált planáris szerkezetű TP(4-OGluOH)<sub>4</sub>P esetében feltételezhetjük annak a fejcsoportok külső felszínéhez való kötődését, a felszínnel kvázi párhuzamos elhelyezkedését.

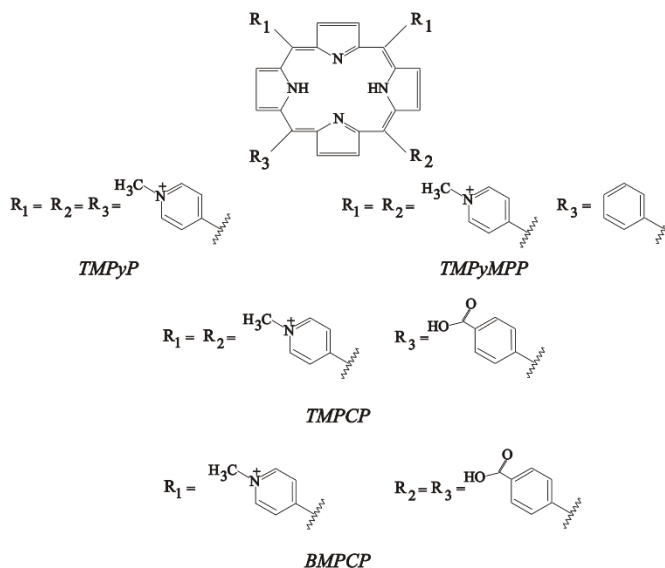
A liposzómához kötött, aszimmetrikus szerkezetű TP(4-OGluOH)<sub>3</sub>P és TPF5(4-OGalOH)<sub>3</sub>P lokalizációja érinti mind a fejcsoportok környezetét, mind az apoláros oldalláncok régióját. ESR vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a TPF5(4-OGalOH)<sub>3</sub>P a szénhidrogén lánc fejcsoportokhoz közelebbi, felső harmadában helyezkedik el.

## **2. TMPyP kötődése DNS-hez**

A négy pozitív töltéssel rendelkező TMPyP kötődését szintetikus oligonukleotidokhoz korábban sokrétűen vizsgálták. Az oligonukleotid szekvenciájának megfelelő megválasztása révén egymástól elkülönítve tanulmányozható kötött formái az interkalált és a kis árokhoz kívülről kapcsolódó TMPyP. E formák spektroszkópiai jellemzői, szerkezete ismertek. Munkánk során a kötött formák kialakulását természetes polinukleotidokon vizsgáltuk, különös tekintettel azok egymás mellett való megjelenésére; a kötődést és a kötött formák megoszlását befolyásoló tényezőkre. 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.

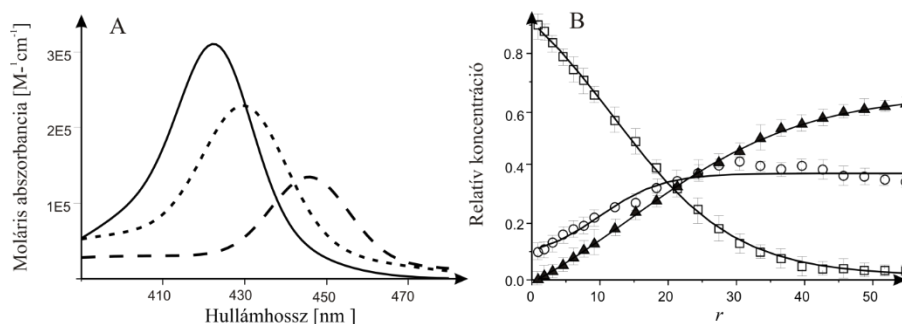
## 2.1. A kötött formák azonosítása kimutatása és mennyiségének meghatározása

A TMPyP abszorpciós spektrumait rögzítettük a T7 bakteriofágból izolált DNS jelenlétében. Az abszorpciós spektrumok Soret-sávját rögzített feltételek mellett komponens spektrumokra bontottuk fel. Meghatároztuk a komponens spektrumok paramétereit: a



2. 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

maximumokhoz tartozó hullámhossz értékét és a sávok szélességét. Az abszorpciós spektrumok elemzése alapján két kötött forma kialakulása volt kimutatható. Eredményeink szerint a komponens spektrumok maximumhelyei megegyeznek a korábban az irodalomban az interkalált illetve kötött formához rendelt spektrumok maximumhelyeivel. A TMPyP kötött



3. ábra TMPyP szabad állapotú (folytonos vonal), és T7 NP-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 molarány ( $r$ ) függvényében (B)



formáinak kialakulását bizonyítottuk fluoreszcencia lecsengési görbéik és indukált CD spektrumaik elemzésével. Az interkalált forma kialakulását bizonyítottuk továbbá a DNS és TMPyP között létrejövő energia transzfer kimutatásával.

A különböző spektroszkópai módszerekkel nyert eredmények összehasonlító elemzése alapján a kötött formákat az irodalomban korábban oligonukleotidokon kialakuló, egymástól elkülönülten vizsgált interkalált és külső kötött formaként azonosítottuk.

Az abszorpciós spektrumok és fluoreszcencia élettartamok összehasonlító elemzésével meghatároztuk a két kötött forma moláris abszorbanciáját. A moláris abszorbancia ismeretében az abszorpciós spektrumok komponens spektrumainak meghatározásával az egyes kötött formák mennyisége tetszőleges bázispár/porfirin molarányoknál kiszámítható. Megállapítottuk, hogy kis bázispár/porfirin arányoknál a külső kötés, a telítéshez közelítő bázispár/porfirin arányoknál az interkalált forma mennyisége dominál. A telítési érték körül a kötött TMPyP közelítőleg 60 % interkalált, 40% külső kötött forma kialakításában vesz részt. A bázispár arányának további növelésével további átrendeződés tapasztalható a két kötött állapot között az interkalált forma irányába.

## 2.2. TMPyP kötött formáinak megoszlását befolyásoló tényezők

További bizonyítékot szolgáltatunk TMPyP kötött formáinak korábban már feltételezett bázispreferenciájára vonatkozóan. Kimutattuk az két kötött forma arányának eltolódását a bázisösszetétel függvényében. Magasabb G-C tartalom esetén az interkaláció, míg A-T túlsúly esetén a külső komplex a preferált kötődési mód. 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 DNS-ligandum kölcsönhatásokat a környezeti ionerősség és ionösszetétel, a kétértékű ionok minemúsége és koncentrációja ismerten befolyásolja. A várakozásnak megfelelően az ionerősség növekedésével a csak egyértékű ionokat tartalmazó Tris-HCl pufferben, 67-395 mM ionerősség tartományban egyébként azonos körülmények között, csökken az összes kötött porfirin mennyisége. A kötődés csökkenéshez az egyes kötésmódok nem azonos arányban járulnak hozzá. A DNS kis árok komplexek mennyisége szignifikánsan nem változik a vizsgált ionerősség tartományban; a kötött formák mennyiségének csökkenése teljes egészében az interkaláció csökkenéséből származik.

Kimutattuk, hogy a környezet ionösszetétele, a kétértékű ionok jelenléte befolyásolhatja a DNS-ligandum kölcsönhatást, a kötődés kialakulásának lehetőségét. Azonos ionösszetételű oldatokban a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  nem befolyásolja szignifikánsan sem a telítési bázispár/porfirin arányt, sem a kötött TMPyP kötési formák közötti megoszlását. Ugyanakkor a  $\text{Ni}^{2+}$  és a  $\text{Cu}^{2+}$  gátolja a TMPyP kötődését, azon belül is az interkalált forma kialakulását.

### 3. A két illetve három pozitív töltéssel rendelkező porfirin származékok és peptid-konjugátumaik kötődése DNS-hez

A kationos porfirinek és nukleinsavak kölcsönhatásának kutatásában az irodalomban többnyire négy pozitív töltést hordozó porfirin származékokat választottak. Ugyanakkor egyes vizsgálatok alapján azt a kérdést is fel kell tennünk, hogy a pozitív töltések száma, elhelyezkedése hogyan befolyásolja a porfirin-polinukleotid kölcsönhatást. A kérdés megválaszolása érdekében kísérleteinkhez egy három (TMPCP) illetve egy két pozitív töltést hordozó (BMPCP) porfirin származékot választottunk. A pozitív töltések mellett ezek a származékok egy (TMPCP) illetve két (BMPCP) negatív töltéssel is rendelkeznek karboxilcsoportjaik révén. Ez alkalmassá teszi azokat peptid konjugátumok szintézisére (TMPCP-4P, BMPCP-4P<sub>2</sub> és TMPCP-AK), amelyek újabb lehetőségeket nyithatnak a kationos porfirinek alkalmazásában.

A porfirin származékok különböző koncentrációjú DNS-t tartalmazó oldatainak abszorpciós spektrumai és azok elemzése alapján azt figyeltük meg, hogy mind a TMPCP mind a BMPCP kötődik a T7 bakteriofágból izolált DNS-hez. A TMPCP esetében két kötött formát mutattunk ki DNS jelenlétében, amelyeket az abszorpciós spektrumok felbontásával nyert komponens spektrumok, az indukált CD spektrumok és a fluoreszcencia élettartamok alapján mint interkalált és külső kötött formát azonosítottunk. Az interkaláció kialakulását támasztotta alá az energiatranszfer megléte a DNS és a TMPCP között. Az interkalált és külső kötött formán kívül más kötött forma jelenlétét a spektroszkópiai eredmények nem támasztották alá. A BMPCP kötött formáinak azonosítása a kötött forma(ák) kis mennyisége miatt bizonytalan. Az energiatranszfer kimutatása és a spektrumkomponensek elemzése az interkalált forma jelenlétére utal.

Az a bázispár/porfirin arány, amelynél a szabad TMPCP mennyisége nullának tekinthető és a kötött állapotok mennyisége nem változik, háromszor akkora (~20), mint a TMPyP esetében. A BMPCP esetében annyit állíthatunk, hogy ez az érték > 50.

Megállapítottuk, hogy a kationos porfirinek tetrapeptid konjugátumaiban a két (BMPCP-4P<sub>2</sub>) illetve három (TMPCP-4P) pozitív töltés megléte elégséges ahhoz, hogy a porfirin származék kötődjön a DNS-hez. A kötődést bizonyítja a konjugátumok abszorpciós spektrumának változása a bázispár koncentráció növekedésével, a fluoreszcencia élettartamok fluoreszcencia emissziós spektrumok megváltozása, az indukált CD-jel megjelenés. A két kötött forma kialakulását bizonyítja az abszorpciós spektrumok komponens spektrumainak száma és azok görbe alatti területének változása a bázispár koncentráció függvényében, a fluoreszcencia lecsengési görbék komponenseinek száma és az azokból meghatározott fluoreszcencia élettartamok értéke, az indukált CD spektrumok szerkezete DNS jelenlétében.

A polilizin gerincű elágazó láncú, porfirin egységein három pozitív töltést hordozó konjugátum (TMPCP-AK) feltehetően sztérikus okokból, csak külső kötéssel kapcsolódik a DNS-hez.

A tetrapeptid konjugátumok (BMPCP-4P<sub>2</sub> és TMPCP-4P) a konjugálatlan porfirinhez viszonyított nagyobb kötődési hajlandóságát jelzi a kötött formák mennyiségének meredekebb emelkedése a bázispár koncentrációjának függvényében, és a kisebb telítési bázispár/porfirin mólarányok.

A kötődési folyamat telítési bázispár/porfirin mólarányára különböző módszerekkel kapott eredmények némileg különböznek egymástól, de a származékokra vonatkozó eredmények sorrendje minden esetben megegyezik: TMPyP  $\approx$  TMPCP-4P < TMPCP < BMPCP-4P<sub>2</sub> < TMPCP-AK << BMPCP. Láthatóan a sorrend kialakulásában a származék nettó töltése és nem mérete a meghatározó.

#### **4. A TMPyP kötődése nukleoprotein (NP) komplexhez. A kötött formák azonosítása kimutatása és mennyiségének meghatározása**

A nukleoprotein komplexek és a kationos porfirinek kölcsönhatásának kvantitatív leírására nem találtunk adatot az irodalomban, holott a természetben a DNS döntően fehérjékkel alkotott komplexeiben fordul elő. Ezért megkíséreltük a TMPyP és természetes nukleoprotein komplexek, a T7 nukleoprotein valamint a HeLa sejtéből izolált nukleoszóma közötti kölcsönhatást kimutatni, a kialakuló kötéseket elemezni, kvalitatív és kvantitatív leírását adni.

A DNS-sel végzett vizsgálatokhoz hasonlóan növekvő koncentrációjú NP jelenlétében rögzítettük a TMPyP abszorpciós spektrumait. Az abszorpciós spektrumok Soret-sávját rögzített feltételek mellett komponens spektrumokra bontottuk fel. Meghatároztuk a komponens spektrumok paramétereit: a maximumokhoz tartozó hullámhosszt és a sávok szélességét.

Az abszorpciós spektrumok felbontásával nyert komponens spektrumok maximumhelyei mindkét NP komplex esetében megegyeztek a korábban az irodalomban az oligonukleotidokhoz való kapcsolódás elemzése során azonosított, és saját munkánk során a DNS-hez való kötődés elemzése során az interkalált illetve külső kötött formához rendelt spektrumok maximumhelyeivel. Ez utóbbihoz képest eltérés mutatkozik a „váll” komponens helyében és sáv szélességében. Ezek alapján itt is két kötött forma kialakulását feltételezhetjük. A kötött formákat az irodalomból ismert interkalált és külső kötött formaként azonosítottuk.

További kötött formák megjelenését a spektroszkópiai eredmények nem támasztották alá, ami a TMPyP szelektív kötődésére mutat.

A TMPyP kötött formáinak kialakulását bizonyítottuk a fluoreszcencia élettartamok és az indukált CD spektrumaik elemzésével. Az interkalált forma kialakulását bizonyítottuk továbbá a nukleoprotein DNS alkotója és TMPyP között létrejövő energia transzfer kimutatásával.

Meghatároztuk a NP komplexekhez történő kötődéskor kialakuló kötött formák mennyiségét a bázispár/porfirin mólarány függvényében. Megállapítottuk, hogy T7 bakteriofág esetében a telítési érték körül a kötött állapotok megoszlása, hasonlóan az izolált DNS-hez való kötődéskor tapasztaltnak: ~60 % interkalált, ~40% külső kötött. Megállapítottuk, hogy kis bázispár/porfirin arányoknál a külső kötés, a telítéshez közelítő bázispár/porfirin arányoknál az interkalált forma

mennyisége dominál. Ettől eltér a nukleoszóma jelenlétében kialakuló kötött formák relatív mennyisége. Itt a teljes bázispár/porfirin arány tartományban a külső kötött forma dominál, részesevé 55% amikor a bázispár/porfirin mólarány 20. Ennél nagyobb relatív NP koncentrációnál már csak az interkalált forma további kialakulása látható.

Az ionerősség növekedésével minden esetben csökken az összes kötött porfirin mennyisége. Ez a csökkenés érinti mind az interkalált, mind a külső kötésben kapcsolódó TMPyP-t.

A TMPyP és NP közötti kölcsönhatás kialakulását 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  jelenléte – ahogy azt az izolált DNS-hez való kötődésnél is láttuk – nem befolyásolja. A  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  gátolja a TMPyP kötődését, mint azt az izolált DNS-nél is megfigyeltük. A kötődés csökkenése elsősorban az interkaláció háttérbe szorításának eredménye.

Fenti eredményeinkkel bebizonyítottuk, hogy a T7 bakteriofág kapszid fehérjének illetve a hiszton fehérjének a jelenléte nem akadályozza a TMPyP DNS-hez való kötődését, de a telítés a két NP esetében megegyezően magasabb bázispár/porfirin arányoknál következik be, mint izolált DNS-nél. Eredményeink szerint a TMPyP szelektíven kötődik a NP DNS-éhez.

## **5. A két illetve három pozitív töltéssel rendelkező porfirin származékok és peptid-konjugátumaik kötődése nukleoprotein komplexhez**

A BMPCP és a TMPCP-AK egyik általunk használt módszer által kimutatható módon sem lép kölcsönhatásba a nukleoprotein komplexekkel.

A TMPCP, a TMPCP-4P és a BMPCP-4P<sub>2</sub> kötődését jelzik a NP jelenlétében kapott abszorpciós spektrumok. A kötött formák azonosítására vonatkozóan 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 fluoreszcencia lecsengési görbéik két exponenciális komponenssel illeszthető, a kapott élettartamok jó egyezést mutatnak a két kötött formára, az interkalált és külső kötésben résztvevő formákra jellemző értékekkel. Az indukált CD spektrumokban is megjelennek a kötött formákra jellemző sávok, és az interkalált formára jellemző energiatranszfer 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-4P<sub>2</sub> esetében az abszorpciós spektrumok komponens spektrumai alapján egyféle kötött forma mutatható ki bizonyosan. A fluoreszcencia élettartam értéke és a CD spektrumok alapján is csak egyetlen kötött forma kialakulását feltételezhetjük, amely külső kötött formaként azonosítható.

Azonos bázispár/porfirin arányoknál minden esetben több a szabad porfirin származék (TMPCP-re TMPCP-4P-re BMPCP-4P<sub>2</sub>) a rendszerben, ha a partnerszabad DNS helyett a NP. Vagyis a NP-ben jelen lévő fehérje kapszid illetve a hiszton fehérjék a BMPCP és TMPCP-AK

kivételével, nem akadályozzák meg, de gátolják a DNS-porfirin származék közötti kapcsolat kialakulását.

A telítési érték alapján felállított sorrendet:  $\text{TMPyP} > \text{TMPCP} > \text{TMPCP-4P} > \text{BMPCP-4P}_2$ , a NP-porfirin származék esetében a nettó töltés és a származék mérete egyaránt befolyásolja.

## 6. A porfirin származékok kötődésének hatása a DNS/NP termikus stabilitására

A porfirin származékok jelenlétének a kettős szálú polinukleotid és a nukleoprotein komplexek termikus stabilitására gyakorolt hatását abszorpciós és CD olvadási görbék felvételével elemeztük.

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

Minden általunk vizsgált kationos porfirin és azok peptid konjugátumai növelik az izolált DNS láncszétválási hőmérsékletét. A láncszétválási hőmérséklet eltolódása még a BMPCP esetében is megfigyelhető, ami további közvetett bizonyítéka az interkalált forma kialakulásának.

A láncszétválási hőmérséklet növekedése minden porfirin származék esetében a porfirin/bázispár arány lineáris függvénye, ami az interkalált formák szerepét bizonyítja. Az azonos porfirin/bázispár molarányhoz tartozó hőmérséklet eltolódás összhangban van az interkaláció korábban látott relatív valószínűségével.

A T7 NP TMPyP és TMPCP jelenlétében rögzített abszorpciós és CD olvadási görbéiben a fehérje kapszid és DNS szerkezeti átalakulásait világosan el lehet különíteni. Eredményeink azt mutatják, hogy a TMPyP és TMPCP 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. A DNS fázisátalakulási hőmérséklete változik a porfirin származékok koncentrációjának függvényében, a növekedés lineáris függvénye a porfirin származék koncentrációjának. A spektroszkópiai adatok elemzésének eredményein kívül ezek az eredmények is bizonyítják a TMPyP és TMPCP szelektív kötődését a T7 NP komplex DNS-éhez.

A BMPCP – összhangban a kötődés hiányát bizonyító spektroszkópiai eredményekkel – nem változtatja meg a NP komplexek fázisátalakulási paramétereit.

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. Eredményeink szerint a TMPyP jelenléte destabilizálja a nukleoszóma 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.

Az abszorpciós olvadási görbék szerint a TMPCP-4P és BMPCP-4P<sub>2</sub> is növelik a kapszidbéli DNS termikus stabilitását. A TMPCP-4P nem befolyásolja a fehérje kapszid fellazulására jellemző hőmérsékletet sem. Ugyanakkor a T7 fág CD görbéi azt mutatják, hogy a tetrapeptid konjugátumok, TMPCP-4P és BMPCP-4P<sub>2</sub> koncentrációjukkal összefüggő mértékben csökkentik a fehérje heliciását. Így, egy termikus stabilitást nem befolyásoló tetrapeptid-fehérje kölcsönhatást nem zárhatunk ki.

## **7. Kationos porfirin származékok sejtfelvétele, sejten 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.

Megállapítottuk, hogy áramlási citometriával a 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. Minden porfirin koncentrációnál és minden inkubációs időtartam után a BMPCP-4P<sub>2</sub>-pozitív sejtek aránya volt a legnagyobb.

A tetrapeptid jelenléte a konjugátumban nem egyértelműen befolyásolja – a BMPCP-4P<sub>2</sub> esetében növeli, a TMPCP-4P esetében csökkenti – a sejtfelvételt.

Konfokális mikroszkóppal, kettős fluoreszcens jelzéssel készült felvételeinken a sejtmagot jelölő kromofór és a kationos porfirin származékok nem mutatnak kolokalizációt. Habár ezek a porfirin származékok nagy affinitással kötődnek izolált DNS-hez illetve nukleoprotein komplexhez, intracelluláris környezetben mégsem mutathatók ki a nukleáris DNS közelében, és nem halmozódnak fel a sejtmagban.

Kettős fluoreszcens jelzéssel készült felvételeken a kationos porfirin származékok jelenléte kimutatható 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.

## **8. A porfirin származékok genotoxicitása**

Minden hatóanyaggal kapcsolatban alapvető információ a genetikai apparátusra gyakorolt hatás, az alkalmazás genotoxicitási kockázata. A genotoxicitás jellemzésének gyors, egyszerű, jól reprodukálható megközelítése a T7 bakteriofág, mint kromoszóma modell inaktivációjának mérése. A kémiai ágensek, így a porfirin származékok kötődése a T7 bakteriofág komponenseihez a vírus funkcionális sérülését okozhatják, azaz a kölcsönhatás a bakteriofág fertőzőképességének elvesztését eredményezheti. A genotoxikus hatékonyságra jellemző érték a genotoxicitási index (MI).

A szimmetrikusan szubsztituált neutrális tetrafenil-porfirin származékoknak sötétben nincs fáginaktiváló hatása még 50  $\mu$ M koncentrációban sem. Ez az eredmény összhangban van a kötődési vizsgálatok eredményével.

Az aszimmetrikusan szubsztituált tetrafenil-porfirin származékok sötétben is kismértékben genotoxikusnak bizonyultak.

A kationos porfirinek MI értékei követik kötődési hajlandóságuk sorrendjét. A kötődés szerepét bizonyítja az is, hogy a porfirin/bázispár értéket növelve a fáginaktiváció mértéke nő, kinetikája pedig egy-találatos jellegű a telítési koncentráció eléréséig.

## 9. A porfirin származékok virális fototoxicitásának jellemzése

A porfirin származékok orvosi/biológiai alkalmazási lehetőségeinek alapja a fotodinamikus reakció. A keletkező reaktív termékek, szabadgyökök illetve szingulett oxigén a sejtekben illetve mikroorganizmusokba destruktív folyamatokat indítanak el, amelyek aztán a sejtek illetve vírusok pusztulásához vezethetnek.

Teszteltük és összehasonlítottuk az egyes származékok fototoxicitását T7 bakteriofágon, mint a peplonnal nem rendelkező patogén vírusok modelljén. A bakteriofággal szemben mutatott fototoxicitást az inaktivációs hatáskeresztmetszettel jellemeztük.

Megállapítottuk, hogy habár eltérő mértékben, de besugárzás hatására minden vizsgált porfirin származék csökkentette az aktív fágok számát. A három illetve négy töltéssel rendelkező kationos porfirinek bizonyultak a leghatékonyabbnak a fotodinamikus vírusinaktivációban. A TMPyP-vel szenzibilizált fotodinamikus reakció a víruspartikulumok számát mintegy nyolc nagyságrenddel képes csökkenteni, ami klinikai szempontból is figyelemre érdemes. Az inaktivációs hatáskeresztmetszetek alapján a következő sorrend állítható fel: TMPyP>TMPCP>BMPCP>TPF5(4-OGalOH)<sub>3</sub>P> BMPCP-4P<sub>2</sub>>TMPCP-4P>TP(4-OgluOH)<sub>4</sub>P>TP(4-OgluOH)<sub>3</sub>P.

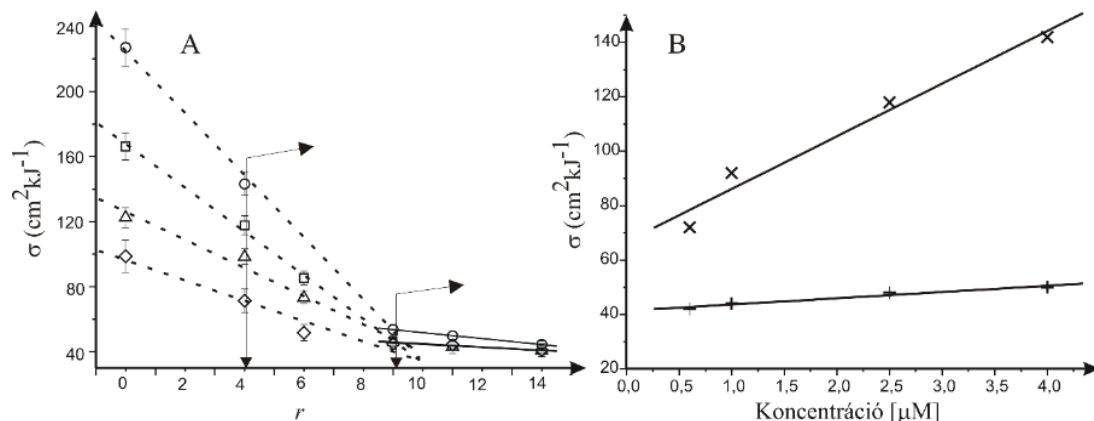
### 9.1. A fotoreakció mechanizmusa

A vírusinaktivációt eredményezheti mind az I mind a II típusú fotokémiai reakció ezért elemeztük a szabad gyökök illetve a szingulett oxigén szerepét a fotoszenzibilizált vírusinaktivációban. Jodometriás titrálással vizsgáltuk a porfirin származékok relatív szingulett oxigén termelési hatékonyságát. Ennek alapján a dolgozatban vizsgált valamennyi származék alkalmas lehet fotodinamikus reakciókban való alkalmazásra. A kationos porfirinek hatékonyabbnak bizonyultak, mint a glikozilált származékok. A glikozilált porfirinek hatékonyságát csökkentheti fotodegradációjuk, aminek egyik oka abban keresendő, hogy a fotodegradáció különösen, de nem kizárólagosan, érintheti a porfirinek aggregátumait. A tetrapeptid oldalláncok kapcsolása a TMPCP-hez illetve BMPCP-hez ugyancsak szignifikánsan csökkenti azok szingulett oxigén termelési hatékonyságát.

A relatív szingulett oxigén termelési hatékonyságot mutató görbék kezdeti meredeksége, azok sorrendje alátámasztja a származékok vírusinaktivációs hatáskeresztmetszetének különbözőségét.

Az I és II típusú fotokémiai reakció relatív szerepét vizsgálva a vírusinaktivációs kísérleteket elvégeztük az egyes reaktív termékekkel szelektíven kölcsönhatásba lépő scavengerek jelenlétében is. Megállapítottuk, hogy mind a szingulett oxigént mind a szabad gyököket kioltó scavenger jelenléte 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. Hatásuk nem additív, együttes jelenlétük fokozza a fotoszenzibilizáció hatékonyságát. A két folyamat relatív hozzájárulása a fototoxikus hatáshoz az egyes porfirin származékok esetében különböző lehet.



4. ábra (A) A TMPyP-vel szenzibilizált T7 bakteriofág inaktivációs hatáskeresztmetszete ( $\square$ ) a bázipár/porfirin molarány függvényében 4  $\mu\text{M}$  (o), 2,5  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), 1  $\mu\text{M}$  ( $\triangle$ ) és 0,6  $\mu\text{M}$  ( $\diamond$ ) 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 ( $\sigma$ ) a porfirin koncentráció függvényében  $r=9$  (+) és  $r=4$  (x) bázipár/mólarányú oldatok sorozatában (Tris-HCl puffer, pH7,4).

A kationos porfirinek – különösen TMPyP – kiemelkedő vírusinaktiváló hatékonyságával kapcsolatban joggal merül fel a kérdés, hogy ez a DNS-hez való kötődésüknek köszönhető-e. Ezért megvizsgáltuk a T7 fág kationos porfirinekkel szembeni inaktivációs hatáskeresztmetszetét olyan bázipár/porfirin arányok mellett, hogy azok egy tartományában csak kötött, más tartományában pedig kötött és szabad porfirin is legyen a rendszerben.

Eredményeink azt mutatják, hogy a nem kötött porfirin megjelenése jelentősen növeli  $\sigma$  értékét, továbbá a szabad porfirin koncentrációjának növelésével az inaktivációs hatáskeresztmetszet is meredeken nő. A DNS-hez nem kötött porfirin szignifikánsan nagyobb hatékonyságú a vírusinaktiváció szempontjából, mint a kötött forma. Megállapítható, hogy a porfirin származék kötődése a DNS-hez nem előfeltétele a fotodinamikus vírusinaktiváló hatás megjelenésének.

## 9.2. A fotoreakció támadáspontja

A kationos porfirinek által indukált fotoreakció hatására a bakteriofágban a fehérje és DNS termikus stabilitása is megváltozik. Ez, valamint a fág részecske elektroforetikus mobilitásának megváltozása arra mutat, hogy a fotokémiai sérülések mind a fehérje szerkezetét, a fehérje-DNS kölcsönhatást, mind a DNS szerkezetét módosítják. Polimeráz láncreakció és gélelektroforézis felhasználásával kimutattuk, hogy lánctörések jöhetnek létre a DNS-ben, valamint keresztkötések alakulhatnak ki a DNS és fehérje rész között.



Az inaktiváció során károsodik a fág DNS-komponense, keresztkötések alakulnak ki a DNS és a kapszid között, valamint megfigyelhető a fág szerkezetének dezorganizálódása is, ami a fehérje komponens izolált sérülésére utal.

Az eredmények azt mutatják, hogy a DNS-hez nem kötődő glikozilált porfirin származék jelenléte és besugárzás együttes hatása a bakteriofág kapszidjának stabilitását csökkenti, de a kapszidon belül elhelyezkedő DNS-t a fotoreakció nem érinti. Elmondhatjuk tehát, hogy a fehérjeburok jelenléte a fág DNS-t megóvja a fág környezetében keletkező reaktív gyökök által keltett sérülésektől.

A kationos porfirin által indukált fotoreakció destabilizálja mind a DNS, mind a kapszid szerkezetét. Mindkét hatás megfigyelhető volt akkor is, ha csak DNS-hez kötött porfirin volt jelen a rendszerben, és akkor is, amikor az előbbieket mellett, a kötőhelyek betöltésén felül, szabad porfirin is megjelent a rendszerben.

A fág inaktivációjában tehát a fehérje és a nukleinsav sérülése egyaránt szerepet játszik. Megállapítható, hogy bár a kationos porfirin szelektíven kötődik a fág nukleinsav részéhez, a szerkezeti változások lokalizációja nem korlátozódik a DNS-re.

A nukleoszómában, a fág nukleoproteinhez hasonlóan a kationos porfirinek által indukált fotokémiai reakciók érintették mind a fehérje, mind a DNS szerkezetét. Sőt, azonos porfirin koncentráció mellett az olvadási görbék paramétereinek eltolódása kifejezettebb volt. Ez a nukleoprotein komplexek eltérő szerkezetén túl magyarázható a kötött formák relatív mennyiségének különbözőségével is. Az interkalált forma hipokromicitása nagyobb, mint a kisárokba kötött porfiriné, így a külső kötés dominanciája azonos mennyiségű kötött porfirin esetén nagyobb abszorbanciát jelent.

## **Az eredmények gyakorlati jelentősége**

A porfirin származékok legfontosabb biomedicinális alkalmazása a fotodinamikus terápia. A már ismert és eredményesen alkalmazott, törzskönyvezett származékok mellett folyamatos intenzív kutatás folyik az eljárás hatékonyságát és specificitását 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.

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

A vírusfertőzések leküzdése és terjedésének megakadályozása folyamatos kihívást jelent az orvostudomány számára. A fotodinamikus vírusinaktiváció 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.

Eredményeink hozzájárultak a porfirin-DNS komplexeket tartalmazó nanorészecskék tervezéséhez és gyakorlati felhasználásának kidolgozásához is. A TMPyP és 3,3'-diethyl-2,2'-tiatrikarbocianin jodid 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.

## Közlemények

### 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., Turóczy, 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. Biophys. Chem. 155(1), 36-44. (IF:2,203)
12. 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. Chem. 177-178, 14-23. (IF 2,319)

13. Orosz, Á., Bószé, 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*

**További közlemények**

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

**Első vagy utolsó szerzős:**

1. Rontó, G., Tóth, K., Gáspár, S., Csik, 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. Csik, 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. Csik, 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., Csik, 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., Csik, 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., Csik, 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-tetrasulfonate with different types of bacterial cells. *Med. Sci. Mon.* 3(3), 294-298.
6. Szócs, 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. (IF1,835)
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. Bősze, Sz., Hudecz, F., Igaz, P., Ortutay, Zs., Csík, G., Falus, A., Tóth, S. (2003) Interleukin-6 N-terminal peptides modulate the expression of the *junB* protooncogene 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. Bősze, 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. Herenyi, L., Veres, D., Bekasi, S., Voszka, I., Modos, 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., Bősze, 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., Ayrál, A., Basa, P., Csik, G., Nagy, N., Roualdès, S., Rouessac, V., Sáfrán, G., Suhajda, Á., Zolnai, Z., Hórvölgyi, Z. (2015) Antibacterial properties of Ag–TiO<sub>2</sub> composite sol–gel coatings. *RSC Advances* 5(73), 59070-59081. (IF:3,840)
19. Vörös, Z., Csík, 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., Csík, 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., Kővér, K.E. (2018) Photochemical and structural studies on cyclic peptide models. *Molecules* 23(9), Article number 2196 (IF:3,060)
23. Vörös, Z., Csík, 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., Csík, 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. Csík, 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*