

**Válasz Dr. Vidóczy Tamás, az MTA doktora**  
**opponensi bírálatára**

Köszönöm Dr. Vidóczy Tamásnak dolgozatom alapos, elmélyült áttekintését. Köszönöm a Bíráló gondolatébresztő, iránymutató kritikai megjegyzéseit, észrevételeit, előremutató javaslatait a dolgozatban leírtak pontosabb értelmezésére vonatkozóan. A konstruktív kritikai elemzés ösztönöz az eredmények továbbgondolására, elősegíti témához kapcsolódó jövőbeli kutatás megtervezését. A felvetett kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

**A kísérleti munkához fűzött megjegyzések, kérdések**

**5.1. Porfirinek kölcsönhatása modellmembránokkal**

*A 15. ábrával kapcsolatban több megjegyzésem van. Az A ábra mutatja be a metanolban, illetve vizes pufferoldatban mért fluoreszcencia-spektrumokat. Látjuk, hogy metanolban jóval intenzívebb az emisszió, mint vizes oldatban – de ha a spektrum alakjának megváltozása is érdemi információt hordoz, akkor ez nem jó ábrázolás, a vizes fázisban mért értékek olyan alacsonyok, hogy nem igazán vehető ki a spektrum alakja – ahhoz normált spektrumokat kellene összehasonlítani. Amennyiben csak a fluoreszcencia-intenzitás bemutatása a cél, akkor ezen spektrumok csak illusztrációra használhatóak, de számszerű következtetések levonására az intenzitás-adatok önmagukban nem alkalmasak, hiszen az előző (53.) oldalon olvasható: „A vegyületek moláris abszorbananciája ... érzékenyen változik a molekuláris környezet polaritásával.” Következésképpen még azonos porfirin-koncentrációk mellett sem azonos az elnyelt (gerjesztő) fényintenzitás, amivel a fluoreszcencia-intenzitás egyenesen arányos. Hiába állítja Jelölt a módszer leírásánál (47. oldalon), más szerzőkre hivatkozva, hogy „a fluoreszcencia révén emittált fény intenzitása a koncentrációval arányosnak tekinthető”, ha egyszer ezt az állítását a pár sorral feljebb idézet mondattal önmaga cáfolja. Nemcsak a moláris abszorbananciák változása okozhat gondot – a fluoriméterekben a gerjesztő fényforrás általában nagynyomású xenonlámpa, melynek spektruma a 400-450 nm tartományban, épp a porfirinek Soret sávja környékén meglehetősen strukturált, így a gerjesztési hullámhossz néhány nm-es megváltoztatása érzékelhetően megváltoztathatja a rendelkezésre álló gerjesztő fényintenzitást. A liposzómákhoz történő kötődés egyensúlyi állandójának meghatározására ezért csak a fluoreszcencia-kvantumhatásfokok használhatóak, a fluoreszcencia-intenzitás adatok legfeljebb kötődési rangsor megállapítására fogadhatóak el.*

A 15. ábrával azt gondoltam szemléltetni, hogy jelentős különbség van a poláros illetve apoláros közegben lévő porfirin származék fluoreszcencia intenzitása között. A spektrumok alakjának változásából nem vontam le következtetéseket, ezért a normált spektrumok bemutatását nem láttam szükségesnek.

Egyetértek Bírálóval a kötődési állandó meghatározására alkalmazott technika korlátait illetően, azaz a fluoreszcencia-intenzitások változása alapján a kötődési rangsor állapítható meg. Ugyanakkor liposzóma jelenlétében az abszorbanancia mérésekkel járó megközelítések esetében is felmerülnek technikai nehézségek.

1. A liposzómák fényszórása miatt a porfirin tényleges abszorbanciája csak közvetetten határozható meg. A szórási görbére vonatkozó pontos korrekciót nehezíti, hogy a liposzómák nem azonos méretűek, hanem az adott mintára érvényes méreteloszlással jellemezhetők.

2. A liposzómához kötött porfirin elhelyezkedése nem mindig egyetlen módon valósulhat meg. A kötött formák moláris abszorbanciája pedig nem feltétlenül azonos. Anizotrópia méréseink eredményei alapján valószínűsítettük a kötött porfirin származékok domináns lokalizációját. Már ezeknek a méréseknek az eredményi alapján is feltételezhető, hogy bizonyos származékok elhelyezkedése a foszfolipid kettős réteg több régióját is érintheti. Ezt alátámasztó további részletes eredményeket közöltek Veres és mtsai. (Veres et al, (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 2012, 116, 32, 9644–9652.)

#### 5.2.1.1. A kötött formák azonosítása és mennyiségi meghatározása

*Teljes mértékben megértem Jelöltet, hogy a spektrumok Gauss-görbékre történő felbontása során nagy erőfeszítéseket tesz a görbék számának (vagyis az illesztendő paraméterek számának) csökkentésére – de fennáll a veszély, hogy ezen egyszerűsítések túlmennek a megengedhető mértéken. Jelölt a porfirinek Soret sávját 2 Gauss-görbe összegével közelíti (9-es egyenlet), ennek alátámasztására hivatkozik a 4. ábrára. Én úgy látom a 4. ábrán, hogy a 390-480 nm tartományokban a fő csúcson kívül legalább két váll látható (az ezeknek megfelelő töréspontot 400, illetve 420 nm-re becslem), következésképp legalább 3 Gauss-görbével tartanám indokoltnak a közelítés elvégzését. Nem ismerem az ide vonatkozó irodalmi eredmények részleteit, de nem lennék meglepve, ha ezt a kérdéskört már vizsgálták volna korábban, hiszen a porfirinek spektroszkópiájával kötetnyi közlemény foglalkozik. A másik, számomra indokolatlan közelítés, hogy a szűk hullámhossz-tartomány (390-480 nm) következtében nem végeztek hullámhossz – frekvencia konverziót. A Gauss-görbékkel történő közelítés alap-megfontolása szerint egy abszorpciós sáv azért sáv, mert az adott spektroszkópiai átmenet vonala kiszélesedik (a forgási átmenetek és az oldószer-hatás következtében). Ez a kiszélesedés azonban csak a frekvencia-skálán eredményez szimmetrikus görbét. Egyetértek Jelölttel, hogy a szűk intervallum miatt ez numerikusan nem igazán érzékelhető – de tényleg megéri egyetlen osztás-sorozat megtakarítása érdekében túllépni egy elven?*

A porfirinek oldatainak abszorpciós spektrumában Soret-sáv rövid hullámhosszú oldalán jellemzően megjelenhet 1-3 váll, amelyeket az irodalom a rövid hullámhosszak felé haladva N, L, M sávokként jegyez (J.R. Platt, Classification and assignments of ultraviolet spectra of conjugated organic molecules, J. Opt. Soc. Amer. 43 (1953) 252-256.) Az N, L, M, sávok megjelenése, relatív amplitúdójuk függ a származék szimmetriájától, központi fématom milyenségétől illetve hiányától, stb. (Moroni, L. (2008) Excited states of porphyrin macrocycles. J. Phys. Chem. A 112, 11044–1105.). Az irodalom igen kevés figyelmet fordít e sávok azonosítására, általában a spektrum UV tartományának elemzésére (Kuter, D., et al. (2012) Experimental and time-dependent density functional theory characterization of the UV-visible spectra of monomeric and  $\mu$ -oxo dimeric ferriprotoporphyrin IX. Inorganic Chemistry 51(19), 10233-10250.).

A spektrumfelbontás hullámhossztartományában a fentiek közül az N váll megjelenése valószínűsíthető. Az egyes kötött formákhoz tartozó vállak a spektrumok felbontásával szisztematikusan nem voltak elkülöníthetők egymástól.

*Ehhez a kérdéskörhöz tartozik a kétféle kötött forma vállaláshoz rendelhető Gauss-görbe azonosnak vétele. Elfogadom, hogy a numerikus illesztések során a kétféle kötött forma esetében jó közelítéssel azonosnak adódtak ezen két görbe paraméterei – de ez tényleg indokolja ezen két görbe azonosként történő kezelését? Nemcsak numerikus közelítésről van szó – ha tényleg azonos a két sáv, a kétféleképpen kötött porfirinban valami azonos spektroszkópiai átmenet kell hozzá tartozzon. A „közös váll” kifejezés először a TMPyP kötődése kapcsán szerepel – de később a BMPCP-nél, illetve TMPCP-nél is előfordul (13. táblázat, 29. ábra). E két utóbbi porfirin-származék kötődésének vizsgálatakor a szövegben nem tesz említést arról, hogy a szabad porfirin („r” érték 0) spektrumának felbontásához már 3 Gauss-görbére volt szükség – de az utóbbi esetében ugyanezzel a 3 Gauss-görbével le lehetett írni mindkét kötött forma spektrumát is. Kezd elveszni az egyes görbék hozzárendelhetősége az egyes komponensekhez? A 29. ábrán nem érthető számomra, milyen „relatív terület” van a függőleges tengelyen, kérem jelöltet mutassa be, milyen normálásról van szó.*

Megalapozott Bírálóm megfigyelése a három (TMPCP) illetve két (BMPCP) pozitív töltést hordozó származékok abszorpciós spektrumainak elemzésével és a kötött formákhoz tartozó abszorpciós sávok azonosításával kapcsolatban.

A szimmetrikus TMPyP esetében a sávok jól azonosíthatóak, a mérések pontossága a kötött formák mennyiségi meghatározását is lehetővé teszi. A TMPCP és BMPCP esetében a kötött formák számát, a hozzájuk tartozó abszorpciós sávok területének változását tudtuk meghatározni. Feltételezhetjük, hogy az aszimmetrikus TMPCP és BMPCP interkalációja illetve külső kötése nem egyféle térbeli elrendeződésben valósulhat meg. A különböző térszerkezetű, de azonos kötési formákhoz tartozó abszorpciós spektrumok különbözhetnek egymástól.

A 29. ábrán bemutatott görbék esetében a szabad porfirin származék abszorpciós spektrumának görbe alatti területét tekintettük egységnyinek, ennek arányában fejeztük ki a további spektrumok görbe alatti területét. A kötött formák hipokrómiája miatt a további spektrumok görbe alatti területe kisebb egynél.

*Őszintén szólva én másképp kezdtem volna hozzá a 20. ábrán bemutatott spektrum-sorozat numerikus kezeléséhez. Ránézve az ábrára első közelítésben elfogadnám izoszbesztikus pontnak a látszólagos izoszbesztikus pontot, és megpróbálnám két spektrum lineáris kombinációjával előállítani ezt a spektrum-sorozatot (a szabad porfirin spektruma ismert, a kötött forma spektrumát és a lineáris kombináció együtthatóit kell csak a legkisebb négyzetek módszerével megbecsülni). Ha ez nem sikerül (tendenciózus, nem véletlenszerű eltérések mutathatók ki), akkor persze neki lehet állni 3 spektrum lineáris kombinációjával elvégezni a közelítést – és ebben az esetben megalapozott lenne az a kijelentés, hogy „Az abszorpciós spektrumok elemzése alapján két kötött forma kialakulása volt kimutatható.” (tézisek 15. oldal közepe). Amíg a csak két spektrummal történő közelítés tarthatatlanságát be nem mutatja Jelölt, addig ez a kijelentés nem fogadható el. Nem azt szeretném ezzel mondani, hogy én „látom”, elég lenne a két komponens. A 3 komponens szükségességét mind az irodalmi adatok, mind a disszertáció más mérés technikával végzett mérései bőségesen alátámasztják – de ettől még pusztán az abszorpciós spektrumok alapján a 3. komponens jelenléte nem triviális, az csak a két komponenssel történő illesztés kudarcával igazolható. Hiányolom annak bemutatását, hogy a 3 komponenssel történő illesztés jól közelíti a 20. ábra szerinti spektrumokat (természetesen nem az összes, csak egy-két kiragadott spektrumon, olyan ábrára gondolok, mint a 42.).*

A 20. ábrán bemutatott abszorpciós spektrumok sorozatában látható látszólagos izoszbesztikus pont valóban kínálja a két állapot – szabad és egy kötött – egyidejű jelenlétének feltételezését. A dolgozatban rövid utalás történik „korai próbálkozások”-ra, amelyek között a Bíráló által javasolt „két spektrum” megközelítés is szerepelt, de nem vezetett meggyőző eredményre. A publikációkban és a dolgozatban csak az általunk optimálisnak ítélt megoldásokat mutattuk be. Teljes mértékben osztom a Bíráló véleményét abban is, hogy a spektrumsorozat felbontásának eredménye, ha mégoly elfogadható feltevéseken alapul és eredménye illeszkedik az irodalmi háttérhez, önmagában nem bizonyítja a kötött állapotok számát és természetét. A kötött állapotok azonosítása csak a különböző módszerek eredményeinek összevetésével mondható meggyőzőnek.

*A különböző kötött formák részarányát mutatja a 25. B ábra. Először egy technikai kérdés: az ábrafelirat egyértelműen megadja a szimbólumok jelentését, de nem szól a kihúzott görbékről. Meglepő, hogy a kis árokban kötött porfirinhez tartozó görbe nem követi a pontok menetét, hanem egy telítési görbének látszik – holott a pontokhoz hibázászlók is tartoznak, és a görbe sok pontnál kívül esik a hibázászlón.*

A 101. oldalon a hasonló tematikájú 55. ábra kapcsán szerepel a megjegyzés, miszerint „az ábrákon látható görbék csak a jobb követhetőséget szolgálják, illesztési paramétereik nem szolgáltatnak adatot a kötődésre vonatkozóan”. Sajnálom, hogy ennél az ábránál egy hasonló értelmű megjegyzés elmaradt.

*Ezen eredmények diszkusszióját véleményem szerint egyszerűbb a nagy „r” értékek tartományánál kezdeni, mert ilyen körülmények között minden bizonnyal érvényesek a kétféle kötődésre vonatkozó kémiai egyensúly feltételei. Megállapíthatjuk tehát, hogy ha bőven van kötőhely, akkor az interkaláció részaránya közel kétharmad, a szabad porfirin részaránya elhanyagolható, vagyis az interkalációval történő kötődés egyensúlyi állandója mintegy kétszerese a kis árokban történő kötődés egyensúlyi állandójának. A kérdés ezután az, hogy további porfirinek kötődése ugyanazon DNS-darabhoz mennyiben más mértékű – a kémiai egyensúlyok nyelvén fogalmazva a kötődés egyensúlyi állandója milyen irányban és milyen mértékben változik a már megkötött porfirinek hatására. Ebben a témában laikus lévén nekem nem sikerült olyan elvet, megfontolást találnom, amely indokolná bármelyik egyensúlyi állandó növekedését, vagyis azt, hogy a már kötött porfirin elősegítheti a következő porfirin kötődését. Az ellenkezőjére, a következő porfirin kötődésnek gátlására számos triviális elképzelés magyarázatot ad (pl. a kis árokban kötött porfirin sztérikus okokból nehezíti az interkalációt; bármely kötött porfirin pozitív töltései hátráltatják a következő porfirin kötődését). A 25. B. ábra szerint az interkalált porfirinek részaránya valóban mindvégig csökken a kisebb „r” értékek felé; de a kis árokban kötött porfirin részaránya kb. 7-es „r” értékig egyértelműen, a hibahatárt meghaladó mértékben növekvő tendenciát mutat. Kérem jelöltet, ossza meg elképzelését, hogy hogyan segítheti elő a már megkötött porfirin egy további porfirin kötődését, más szóval mi lehet az oka annak, hogy a kis árokban kötődő porfirin látszólagos kötődési egyensúlyi állandója megnő, ha már van kötött porfirin az adott DNS-darabon. Ez a jelenség (a kis árokban kötött porfirin mennyiségének növekedése a kis „r” értékek felé haladva) gyakorlatilag minden ilyen adatot közlő ábrán látható, a leghangsúlyosabb a 28. C ábrán, a kevés AT párt, sok G-C bázispárt tartalmazó DNS esetében, ahol ez a növekedés a kb. 3-szoros értéket is eléri.*

Nagyon izgalmas kérdést érint a Bíráló felvetése arra vonatkozóan, hogy a már kötött porfirin elősegítheti-e a következő porfirin kötődését. Megfigyelését egy saját kísérleti tapasztalatunkkal szeretném alátámasztani.

Több próbálkozást tettünk annak érdekében, hogy a vegyes bázisösszetételű polinukleotid láncon kialakuló kötött formákat szelektíven létrehozzuk. Ezen kísérleteink sorában a DNS-t ismert interkaláló vegyülettel „telítettük”, majd ezt követően elegyítettük a kationos porfirinnal és elemeztük a kötött formák kialakulását. Tapasztalatunk szerint az interkaláló ágens, például 8-MOP jelenléte nem gátolta, hanem elősegítette a porfirin kötött formáinak létrejöttét. Ennek magyarázata lehet a DNS B-konformációjának torzulása, a szerkezetet stabilizáló kölcsönhatások fellazulása. Ez különösen érintheti a külső kötés kialakulásának lehetőségét. Feltevésünket támaszthatja alá az a megfigyelés is, hogy a nukleoszómában a hisztonfehérjékre feltekeredett DNS szerkezete kedvez a külső kötött forma kialakulásának.

A külső kötött forma látszólagos mennyiségét növelheti továbbá - különösen nagy porfirin feleslegnél - a nagy árok felszínén kötött porfirinhez történő aggregálódás („self-stacking”) megjelenése (Nový et al. (2007) Electronic and vibrational circular dichroism spectroscopic study of non-covalent interactions of meso-5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin with (dG-dC)<sub>10</sub> and (dA-dT)<sub>10</sub>. Vibrational Spectroscopy 43(1), 71-77.).

*A DNS-ről a porfirinre történő energia-transzfer fluoreszcenciás eredményét mutatja a 26. ábra. Azt sem nagyon értem, hogy miért szerepel az előző oldalon az az állítás, hogy a „TMPyP emissziója DNS jelenlétében növekvő emissziót mutat”; a 26. A ábrán én nem nagyon látok intenzitásnövekedést a különböző spektrumok között (az ábrafeliratban nem esik szó normálásról), pedig a DNS hozzáadására jelentősen nőnie kellene az elnyelt fényintenzitásnak. A 26. ábra B részéhez tartozó ábrafelirat vélhetően pontatlan; nem az integrált fluoreszcencia-intenzitást, hanem a 14-es egyenlet alapján a kötött forma integrált fluoreszcencia-intenzitása számított értékeit mutatja „r” függvényében. De az A ábrán közölt görbék alatti területek becsült értéke egy nagyságrenddel nagyobb értéket ad, mint amekkora maximális érték a B ábrán szerepel – miért van ez az eltérés? Az energia-transzfer tényének igazolása a 260 nm-es gerjesztéssel mért porfirin-fluoreszcencia mérésével sem triviális – ezen a hullámhosszon a szabad porfirinnek is van elnyelése, a DNS-hez kötött porfirinnek is van elnyelése (a disszertációban 153-as sorszámmal idézett közlemény szerint), így önmagában az a tény, hogy a 260 nm-en gerjesztett minta porfirin-emissziót mutat, még nem bizonyítja az energiatranszfer létrejöttét.*

A 26.A ábra a TMPyP 260 nm-en történő gerjesztése nyomán regisztrált emissziós spektrumait mutatja különböző mennyiségű izolált DNS jelenlétében. A különböző bázispár/porfirin arányoknál a 600-770 nm-es tartományban összegzett fluoreszcencia intenzitásokból ( $\lambda_g=260$  nm) a 14. egyenlet szerint levontuk az adott bázispár/porfirin arányhoz tartozó szabad TMPyP mennyiségből várható fluoreszcencia intenzitást. A 26.B ábra tartalmazza a 14. egyenlet szerint korrigált összegzett intenzitásokat, amelyeknek értéke nő a bázispár/porfirin arány függvényében.

Az energia transzfer létrejöttét támasztja alá a 26.A és a 23. ábra összevetése. A 23. ábrán látszik, hogy a TMPyP közvetlen gerjesztésekor ( $\lambda_g=435$  nm) a fluoreszcencia intenzitás nem nő, hanem csökken a kötött porfirin mennyiségének növekedésével.

#### 5.4 Porfirin származékok genotoxicitása

*Ezeknél a méréseknél a „dózis” (porfirin koncentráció szorozva az inkubálási idővel) függvényében ábrázolták az eredményeket. Számomra nem triviális, hogy ez a szorzat értelmezhető-e ilyen egyszerűen, valóban azonos-e a hatás a kétszer magasabb koncentrációban, de fele annyi ideig inkubált mintáknál? Nem kellett volna ezt kísérletesen igazolni?*

Egyetértek Bírálóval a reciprocitási kérdés felvetésében, vagyis hogy különböző hatóanyag koncentrációk és inkubációs idők, még ha ezek szorzata azonos is, feltétlenül azonos inaktivációt eredményeznének. Ennek érvényessége véleményem szerint is feltehetően igen korlátozott. Ugyanakkor fontosnak tartottuk a korábbi, más szerzők által publikált eredményekkel, illetve más hatóanyagok genotoxicitásával való összehasonlíthatóságot. Mivel korábban számos publikáció az idő\*koncentráció dimenziójú dózis kifejezést használta (pl G. Ronto et al. (1989) Genotoxicity testing: phage T7 inactivation test of various furan and arenofuran derivatives. *Mutagenesis* 4, 471–475.; G. Rontó et al. (1992) Phage nucleoprotein-psoralen interaction: quantitative characterization of dark and photoreactions. *J Photochem Photobiol B-Biol.* 12, 9-27.) és ebből határozta meg a hatékonyságot jellemző indexet, ezért megtartottuk a dózis ilyen definícióját.

*Nem értem az 51. ábra szerinti kísérleti körülmények választását. A feltüntetett pontok szerintem alkalmatlanok a „görbe” kezdeti meredekségének meghatározására. A kezdeti meredekség definíció szerint az origóból induló egyenes meredeksége – az ábrán láthatóan nem erről van szó. Miért nem végzett a Jelölt további kísérleteket kisebb dózissal, ha egyszer a kezdeti meredekségre kíváncsi? Ha már tudott volt, hogy a görbe a nagy dózisok tartományában ellaposodik, az nem volt érdekes, hogy a kationos porfirin miért mutat ilyen képet, amikor a semleges, glikozilált porfirinek a dózis függvényében lineáris képet mutatnak?*

A bemutatott eredményeken kívül számos más porfirin koncentráció felhasználásával is történtek kísérletek. Ezek sorából igyekeztünk reprezentatív eredményeket bemutatni- Az mindig nehéz kérdés, hogy a felhalmozott adatok sorából a bemutatási lehetőségek korlátozott volta miatt melyeket választja ki a szerző, és az adott terjedelemben milyen információ bemutatására törekszik. Ebben az esetben azt is érdemesnek tartottuk bemutatni, hogy a kötőhelyek telítésével a porfirin koncentrációjának növelése nem vezet az inaktiváció fokozódásához.

Feltehetően minden hatóanyag esetében elérhető az a koncentráció, amely már nem növeli az inaktiváció mértékét. A különbség abban lehet, hogy ez milyen hatóanyag koncentrációnál következik be. A glikozilált porfirinek esetében a koncentráció növelésének határt szabott az a törekvésünk, hogy monomer formák hatékonyságát hasonlítsuk össze, vagyis ne legyen számottevő az aggregátumok mennyisége. Így a glikozilált porfirinekénél a vizsgált koncentráció tartományában a görbe ellaposodása nem következik be.

#### 5.5 Porfirin-peptid konjugátumok kötődése.

*Az 54. és 56. ábrákon (mind az A mind a B ábrákon) a görbék kezdeténél ( $r = 0$ ) azt várnám, hogy az illesztésnél használt sávok relatív területe azonos, hiszen itt az adott konjugátum spektrumának felbontásáról van szó. Ehelyett a közelítésre használt sávok maximumhelyeinek listája sem azonos, és az egyes komponensek relatív súlya is más-más a két ábrán. Hogyan lehetséges ez? Többféleképpen is felbontható ugyan az a spektrum, azonosan jó közelítéssel?*

Mint azt az 5.2.1.1. A kötött formák azonosítása és mennyiségi meghatározás fejezetben a spektrumsorozat tagjainak felbontásának feltételei kapcsán jeleztem (lásd 66. oldal) „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  $\chi^2$ -értékeket adják.” Ezért előfordulhat, hogy az egyébként azonos körülményekhez tartozó két spektrum felbontása két különböző sorozat tagjaként némileg eltérő paramétereket eredményez.

#### 5.6. Porfirin származékok in vitro sejt felvétele és sejten belüli lokalizációja.

*A peptid-konjugátumok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatával foglalkozik a 109. oldal felső része. Az utolsó bekezdésben egy szikár állítás olvasható („a ko-lokalizáció sokkal kiterjedtebb a lizoszómák esetében”) – örültem volna, ha ezt valamilyen számszerűsíthető módon is alátámasztja Jelölt. A 64. ábra D és G részeinek összehasonlításakor a sárga szín nem meggyőzően intenzívebb a D (jelölt lizoszómák) részben, mint a G (jelölt mitokondriumok) részben, bár azt még az én gyakorlatlan szemem is észreveszi, hogy a G részben több piros folt maradt, ami azt jelenti, hogy nemcsak mitokondriumban lokalizálódik a porfirin-származék – de azért távolról sem annyi, mint amennyi lizoszóma látszik a D részben. Előfordulhat, hogy az eléggé váratlan gerjesztési/detektálási hullámhossz-választás okozza ezt? Nem áll rendelkezésemre az itt használt porfirin-származékok abszorpciós és emissziós színeképe, csak a 9-es ábrán közölt abszorpciós és a 38. ábrán közölt emissziós színekép alapján látok problémát. A porfirin kimutatására 488 nm-es gerjesztést és 650- 750 nm közötti detektálási hullámhosszat választottak – a gerjesztési hullámhosszon minimális a porfirin elnyelése. A MitoTracker kimutatására 510 nm-es gerjesztést és 665 nm-es detektálást használtak. Miután 510 nm-en a porfirin legalább annyira elnyel, mint 488 nm-en, ezért a porfirin emisszió egészen biztosan „bevilágít” a MitoTracker-nek tulajdonított jelbe. Látszólag egyetlen mintán történt a kétféle ko-lokalizációs vizsgálat (a B és E képek vizuális összehasonlítás alapján azonosnak tűnnek), miért nem maradt meg a mitokondriumokba jutott porfirin-származékok pirosas nyoma a D képen?*

A felvételek elemzésekor számszerűsített összehasonlításra nem volt lehetőség.

A mikroszkópos felvételek elkészítésével elsősorban arra kerestük a választ, hogy a kationos porfirin származékok kimutathatóak-e a sejtmagban. Erre egyértelműen nemmel válaszolhatunk.

A porfirin származékok kimutathatóak voltak a mitokondriumban és a lizoszómában, de pontos lokalizációjuk és azok mennyiségi elemzése további vizsgálatokat igényel.

Elfogadom Bírálóm megjegyzését a meglepőnek tűnő  $\lambda=488$  nm-es gerjesztési hullámhossz alkalmazására vonatkozóan. Első megközelítésre ésszerű a Soret sáv maximumához közeli hullámhossz választása, mi is ezt tettük. Ekkor azonban a minta gyors foto-degradációja lehetetlenné tette a felvételek elkészítését. A technikailag lehetséges hullámhosszak közül ezért választottunk olyat, amelynél a porfirin abszorbanciája számottevően kisebb, mint a Soret tartomány maximumánál.

Sajnos a dolgozatban konzekvensen felcserélve szerepel két gerjesztési/detektálási hullámhossz, amiért elnézést kérek. MitoTracker-t  $\lambda=633$  nm-en gerjesztettük, az emisszió detektálása pedig  $\lambda=665$  nm-en történt. A MitoTracker gerjesztési hullámhosszán a porfirin abszorbanciája elhanyagolható. Így habár van átfedés a detektálási hullámhossz-tartományok között, a gerjesztés révén a két kromofór megkülönböztethető.

#### 5.7.1. A fotodinamikus reakció hatékonysága és mechanizmusa

*A szingulett oxigén keletkezése relatív kvantumhatásfokának mérése során nem értem, hogy Jelölt miért állított be ilyen extrém mérési paramétereket. A trijodid ion felhalmozódásának kezdeti sebességét kellene meghatározni, mi értelme van ezt olyan konverzióig vinni, amikor egyes esetekben a 2-t is meghaladó optikai sűrűséget kell mérni? Pusztán az abszorbancia-mérés hibája sem indokolná ezt (ez 0,4 körül minimális, 0,1 és 1 között célszerű tartani), de Jelölt is észleli, hogy a nagy konverziók miatt már jelentős a porfirin-származékok degradációja. Méri is ezt, de ezek a mérések a degradáció tényének rögzítésén túl több kérdést vetnek fel, mint amennyi választ adnak (pl. mi lehet az oka a degradáció lassulásának, lényegében véve leállításának kb. 50%-os degradáció után?). A nagy konverziók miatt nagyon kevés mérési pont jut a kezdeti szakaszra, emiatt a görbék kezdeti meredekségének meghatározása nagyon nagy hibával terhelt. Hiányolom a kezdeti meredekséget számszerűsítő táblázatot – amennyiben Jelölt ezt fontosnak érezte volna, ő is másként végezte volna a méréseket.*

*A fotodinamikus reakció mechanizmusának vizsgálata érdekében szingulett oxigén akceptort, vagy kioltót, és gyökfogót alkalmaztak. A DPBF ilyen koncentrációban (67. ábra) nem alkalmas vizes közegben a szingulett oxigén szerepének tisztázására. Egyrészt vizes környezetben nagyon rövid a szingulett oxigén élettartama (~4 ms), még ha diffúzió-kontrollált reakcióban is fogja meg a DPBF a szingulett oxigént, akkor is csak egy töredékét tudja megfogni; másrészt minden ilyen megfogás fogyasztja a DPBF-et. A jódképződés sebességén alapuló durva becslés szerint a 67. ábra szerinti körülmények között 1 kJ/cm<sup>2</sup> beeső dózis esetén a keletkezett szingulett oxigén mennyisége egy nagyságrendben van az alkalmazott DPBF koncentrációval, tehát a nagyobb konverziók esetében az adalék jelentős része már elfogyott. A nátriumazid adalék sokkal inkább alkalmazható, az legalább nem fogy, amikor kioltja a szingulett oxigént.*

Köszönöm és elfogadom a kritikai megjegyzéseket. A szingulett oxigén szerepének pontosabb tisztázása további kísérleteket igényel a metodikai repertoár kiterjesztésével.

#### **Az értekezés eredményeihez (6. Megbeszélés) fűzött megjegyzések.**

*A 129. oldalról a 130. oldalra áthúzódó bekezdésben a kísérleti eredményekből leszűrt ténymegállapításokat olvashatunk – itt, a megbeszélés részben az lenne érdekes, hogy ezekből milyen következtetések vonhatók le.*

Azt gondolom, hogy a TMPyP DNS illetve NP jelenlétében kialakuló kötött formái számának és a kötött formák spektrumparamétereinek a kérdéses bekezdésben bemutatott azonossága fontos bizonyítéka annak, hogy a TMPyP a NP komplex DNS alkotójával alakít ki kapcsolatot. Ezért az ezt alátámasztó további bizonyítékok bemutatása után a következtetés a 132. oldalon olvasható:

„A spektroszkópiai eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a TMPyP a nukleoprotein komplex DNS részével alkot komplexeket. .... Ez az eredmény igazolja a TMPyP szelektív kötődésére vonatkozó feltevésünket.”

*A genotoxicitással foglalkozó részben a 134. oldal utolsó mondatát sajnos nem értem: „... a fáginaktiváció mértéke nő, kinetikája pedig egytalálatos jellegű a telítési koncentráció eléréséig.” Történt kinetikai mérés ebben a témakörben? Az „egytalálatos” alatt mit értsünk?*

Az egytalálatos modell arra a feltevésre épül, hogy a károsodást – legyen az vírusinaktiváció, daganat keletkezése stb. – "minden vagy semmi" jellegű esemény. Például a virális DNS-ben létrejövő egyetlen sérülés a vírus inaktivációját eredményezi. Ez az „egytalálatos görbe”



exponenciális lefutású, vagyis ha a túlélési hányadost ( $N/N_0$ ) logaritmusos léptékben tüntetjük fel, akkor egyenest kapunk. Az exponenciális görbénél a leegyszerűsített találat-elmélet feltételezi, hogy az inaktivációhoz csak egy találatra van szükség.

*Egy kis hiányérzetem maradt azzal kapcsolatban, hogy a disszertáció nem mutatta meg Jelölt véleményét a PDT esetleges mellékhatásait illetően. Negyed századdal ezelőtt a PDT egyik legfontosabb erényének tartották, hogy szemben a többi daganat-terápiás eljárással káros mellékhatása nem volt ismeretes. Ezután elkezdtek megjelenni azok a közlemények, melyek felvetették a genotoxikus mellékhatás lehetőségét (elsősorban a porfirinek DNS interkalációja miatt). Bár ez a polémia nem zárható le egy egyszerű igen/nem válasszal, adódott volna a lehetőség, hogy kifejtse véleményét, látásmódját ebben a fontos kérdésben.*

A kérdés kapcsán érdemes elválasztani a porfirinek fotoaktiválás nélküli u.n. „sötét” és fotoreakciók következtében fellépő genotoxicitását.

Az irodalomban konszenzus van arra nézve, hogy a porfirin származékok, a kationos porfirineket is beleértve nem lokalizálódnak az élő sejt magjában. Azokban a közleményekben, ahol kimutatták valamely porfirin származék jelenlétét a mag környezetében, a sejteket az inkubálást megelőzően fixálták, vagy a vegyület a fotoinaktivációt követő redisztribúció révén jutott a sejtmagba (Garcia-Sampedro, A. et al. (2019) Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. J. Porphyr. Phthalocyan. 23, 11-27.) A fotoreakciók „sötét” kontrol vizsgálatai sem utalnak genotoxicitásra.

A fotodinamikus kezelést követően az eukarióta sejtekben kimutathatók a nukleáris DNS sérülései. Ezek lehetnek közvetlen oxidatív sérülések (David, O. et al. (2005) DNA damages after SIM01 photodynamic treatment. Photodiag Photodyn Therapy 2, 25-33.) illetve létrejöhetnek apoptotikus útvonalak aktiválódása révén (de Oliveira Moraes, C.D.G. et al. (2019) Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An in vitro study. Experimental Biol. Med. 244, 262-271.). Jelentőségüket nehéz általánosságban értékelni. A sejthalált ugyanis egyaránt előidézheti apoptózis, nekrozis vagy autofágia, amely folyamatok hozzájárulása a sejt pusztulásához nagymértékben függ a sejt típusától és a kezelés körülményeitől (pl. porfirin szerkezet, koncentráció, a megvilágítás dózisa és annak időbeli eloszlása) (Donohoe, C. et al. (2019) Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. BBA - Reviews on Cancer 1872, 188308.).

Álláspontom szerint a klinikai gyakorlatban alkalmazott körülmények között a nekrozisnak van döntő jelentősége, de a késleltetett folyamatok sorában feltétlenül szerepe lehet a genotoxicitásnak is, éppúgy, mint a PDT immunmoduláló hatásának valamint a tumort ellátó erek roncsolásának.

### **Apróságok, melyek nem érintik a disszertáció lényegét, mondanivalóját.**

A felvetett kérdésekre azok bírálatban megjelenő sorrendjében válaszolok.

Elnézést kérek, ha kényelmetlenséget okozott a dolgozat szerkezete. A különböző módszerekkel kapott, különböző fejezetekben tárgyalt eredmények több esetben kiegészítik, alátámasztják egymást, ezért érdemesnek láttam azokat összefüggésükben tárgyalni. Ezért választottam az eredmények bemutatásától elkülönülő diszkusszió fejezet beiktatását.

A DNS közreműködésével lejátszódó energia transzfer nagyon izgalmas kérdés, ami az utóbbi években különös jelentőséget nyert a DNS sérülések kialakulásának kutatásában és molekuláris optikai szálak tervezésében is.

A bázisok részvételével lejátszódó energia transzfer mechanizmusára nézve általánosan elfogadott, hogy nem jár töltés átadással, hanem szingulett-szingulett kölcsönhatás, amely az akceptor gerjesztett állapotának kialakulásához vezet (Nordlund, Th. (2007) Sequence, structure and energy transfer in DNA. Photochem. Photobiol. 83, 625-636.; Burr, J.G. et al. Energy transfer in fluorescent derivatives of uracil and thymine. J. Am. Chem. Soc. 97, 245-247.) Az energia transzfer létrejöhet – szekvencia függő módon – a DNS bázisai között (Xu, D-G- and Nordlund, Th. (2000) Sequence dependence of energy transfer in DNA oligonucleotides. Biophys. J. 78, 1042-1058.), de akceptor lehet a bázisokhoz interkaláció révén kötődő molekula is (Le Pecq, J.B. and Paoletti, C. (1967) A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. J. Mol. Biol., 27, 87-106.; Lerman, L.S. (1963) The structure of the DNA-acridine complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 49, 94-102.).

Hyun és mtsai felvetették annak lehetőségét, hogy a nem interkalációval történő kötődés esetén is megvalósulhat energiatranszfer (Kyung-Mee Hyun, K-M. et al. (1997) Can energy transfer be an indicator for DNA intercalation? BBA - General Subjects 1334, 312-316.), de ennek igazolására egyértelmű kísérleti bizonyítékot nem szolgáltatottak.

A hőmérsékletfüggő abszorbancia-méréskor a vezérléshez használt és az adatleolvasásnál jelzett hőmérséklet között nem volt különbség.

A készülékben a hőmérséklet mérése két helyen történt: a mintatartó blokkjában és a párhuzamosan mért hat mintahely egyikében, ahol a hőmérő a mintákkal azonos térfogatú puffer oldatba merült. A vezérlés és adatleolvasás a mintába helyezett hőmérővel összeköttetésben történt. A tényleges leolvasás és továbblépés akkor történt, amikor a minta hőmérséklete stabilan elérte a megkívánt értéket.

A küveták tartalmát mérés közben nem kevertük.

A 13. ábrán a h-1 azonosításához tartozó nyíl pontatlanul jelenik meg. Természetesen a jelzett csúcs amplitúdóját kéne mutatnia.

A 47. oldalon a 3-as és 4-es egyenletekben [P] a bemért porfirin koncentrációt jelöli. Elnézést kérek, hogy ezt nem jelöltem.

Az élettartam illesztésekhez tartozó „residuals” értékeket (pl. 24. ábra) a mérőkészülék illesztő szoftvere számította ki. Ehhez a Poisson eloszlás figyelembe vételével korrekciós faktorokat használt. A residuals görbék információ tartalma elsősorban arra vonatkozik, hogy mutatkozik-e tendenciózusan kiugró eltérés az illesztés során.

Igen, a TMPyP koncentrációja valóban nem pontosan azonos a két bemutatott kísérletsorozatban a 20. és 32. ábrákon. Mivel a kérdéses kísérletben tanulmányozott változások szempontjából a bázispár/porfirin aránynak volt jelentősége, ezt határoztuk meg a lehető pontossággal, és nem ügyeltünk a TMPyP koncentrációjának pontos egyezésére. Természetesen a koncentrációkat ésszerű, egymáshoz közeli értékre állítottuk be.

A 77. oldal mondatában elírásról van szó. Helyesen „DNS-nél illetve apoláros oldószerben látott felhasadást....”.

A 37.A ábrát a 33.B ábra összehasonlítása azt mutatja, hogy az előbbi kiindulási értékei jó egyezést mutatnak az utóbbi  $r=5$ -hoz tartozó értékeivel. Ugyanígy a 37.B ábra és a 25. B összehasonlításából azt mondhatjuk, hogy a két kötött forma relatív mennyisége mindkét esetben közel 0,4, és a szabad forma mennyisége pedig ennél valamivel kevesebb.

A 49. és a 60. ábrán valóban normált görbék láthatók, ahol a normálás a DNS láncszétválási hőmérsékletén kapott értékekre történt. Azért választottam itt ezt az ábrázolási módot, mert talán jobban mutatja a kérdéses fázisátalakulási hőmérséklet eltolódását, amit itt hangsúlyozni kívántam.

A 60. ábrán a kapszid fellazulásához köthető 55 °C körüli fázisátalakulási hőmérséklet nem mutat a láncszétválási hőmérsékletéhez hasonló tendenciózus eltolódást a bázispár/porfirin arány függvényében. Ingadozása valóban kísérleti hibaként értelmezhető, mértéke nem haladja meg a párhuzamos mérésekben tapasztalható ingadozás mértékét.

Tisztelettel kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2021. január 20.



dr. Csik Gabriella