

Dr. Csík Gabriella „A profirinek kölcsönhatásainak néhány biofizikai aspektusa” című MTA doktori munkájának a bírálata

Dr. Csík Gabriella „A profirinek kölcsönhatásainak néhány biofizikai aspektusa” című 169 oldalas dolgozattal pályázik az MTA doktori címre. A dolgozat kiváló minősége és a dolgozat alapjául szolgáló közlemények mutatják, hogy Dr. Csík Gabriella egész tudományos munkásságát egy témának a porfirinek szerkezetének és biológiai hatásainak vizsgálatának szentelte.

Dr. Csík Gabriella kutatásai során a különböző profirinek, profirin származékok kötődését és lokalizációját modell membránokon vizsgálta. Kutatási, érdeklődési területe központjában a glikolizált és kationos porfirinek tulajdonságainak meghatározása, vizsgálata állt. Doktori munkájában a mezo-pozícióban monoszaharidot tartalmazó glikozált porfirinek és modellmembránok közötti kölcsönhatásokról, az egyes származékok membránon belüli elhelyezkedéséről és fotokémiai hatékonyságuk vizsgálatának eredményeiről számol be, illetve meghatározta, hogy a kationos porfirinek ismert kötött formái kimutathatók illetve azonosíthatók-e természetes, kettős szálú polinukleotidok jelenlétében.

A dolgozat formai értékelése:

A dolgozatban a rövid bevezetést követően a Jelölt egy huszonöt oldal hosszúságú irodalmi áttekintés során a profirin típusú fényérzékenyítők szerkezetét jellemzi, a profirinek kötődését és modell membránokban a lokalizációját, a nukleinsavakhoz történő kötődését ismerteti. Részletesen leírja a fotodinamikus reakciók antimikrobiális alkalmazási területeit. A Célkitűzések fejezetben a Jelölt logikusan, célratorően végig vezeti a kutatási területet érintő problémákat és a megválaszolandó kérdéseket. Az Anyagok és módszerek fejezet pontosan részletesen leírja az alkalmazott technikákat.

Az Eredmények fejezet 67 oldal hosszúságú, mely 7 alfejezetre tagolódva írja le részletesen a Jelölt az elvégzett vizsgálatok eredményeit, mely értelmezését sok ábra és táblázat segíti. A Jelölt kimutatta, hogy milyen tényezők befolyásolják a fényérzékenyítő kötődését a membránhoz, illetve a profirin szerkezete és a modellmembrán lipidösszetétele milyen hatással van a fényérzékenyítő kötődéséhez, illetve a profirin származék szerkezete miként befolyásolja annak a

lipid kettős rétegen belüli lokalizációját. A Jelölt jellemezte a kationos porfirin származékok és peptid konjugátumainak kötődését a DNS-hez és a nukleoprotein komplexhez. A kötődést kvantitatív módon az interkaláció és kisárok kötődés jellemzésével illetve kvalitatív módon a kötött porfirin megoszlását mind a természetes kettős szálú DNS, mind az azt tartalmazó nukleoprotein komplex jelenlétében is jellemezte. A Jelölt leírta továbbá a kationos profirineknek a kötődési módok közötti megoszlását befolyásoló tényezőket a DNS bázis összetételét, a porfirin származék töltését, a környezet ionösszetételét és az ionerősségének hatását. A Jelölt az Eredmények fejezetben továbbá jellemzi a profirin származékok kötődése és fotóreakciója által okozott szerkezeti és funkcionális változásokat, a glikozilált és kationos porfirin származékok, porfirin-peptid konjugátumok DNS és nukleoprotein komplex szerkezeti stabilitására gyakorolt hatását. Leírja a T7 bakteriofág profirin származékok kötődése által, de a fény közreműködése nélkül (ú.n. sötét reakció révén) okozott inaktivációt és kvantitatívan jellemzi azt. A Jelölt meghatározta a szabad gyökök és a szingulett oxigén szerepét a vírusinaktivációban, továbbá meghatározta a glikozilált és kationos porfirin származékok fotokémiai reakciói által indukált fáginaktiváció mértékét, a DNS-hez kötődő származékok esetén a kötött és szabad formák fotokémiai hatékonyságát. Elemezte a fotokémiai reakció következtében a T7 bakteriofág és a nukleoszóma nukleinsav komponenseinek termikus stabilitásában bekövetkezett változásokat. A Jelölt meghatározta tovább a kationos profirinek és peptid-konjugátumaik sejten belüli lokalizációját, ismerteti, hogy miként befolyásolja a profirin töltése és a konjugátum szerkezete a sejtekben való felhalmozódást.

A 20 oldal hosszúságú Megbeszélés részben a Jelölt a saját eredményeit értelmezi és az eredmények nemzetközi irodalommal történő összevetése megtörténik. A Jelölt a porfirin származékok modellmembránhoz történő kötődésének és membrán lokalizációjának vizsgálata során kimutatta, hogy a mezo-szubsztituált glikolizált profirinek esetében az aszimmetrikus molekula szerkezet és amfil karakter fontos tulajdonság a modell membránokhoz való kötődés szempontjából, ugyanakkor a molekula mérete és töltéseloszlása is befolyásolja a kötődést. Az eredményeket analizálva a Jelölt kimutatta, hogy a planáris szerkezetű TP(4-OGluOH)₄P esetében a lipid fejcsoportok külső felszínhez történő kötődése, a felszínnel kvázi párhuzamos elhelyezkedése befolyásolja a régió fázisátalakulásának kooperativitását, de szignifikánsan nem változtatja meg sem a profirin, sem a régióban elhelyezkedő jelző fluoreszcencia élettartamát. A

liposzómához kötött TP(4-OGluOH)₃P és TPF5(4-OGalOH)₃P lokalizációja érinti mind a fejcsoportok környezetét, mind az apoláros oldalláncok régióját.

A jelölt kimutatta, hogy a profirin származékok DNS-hez történő kötődésében az interkalált és a külső kötött forma kialakulása a jellemző. Két (BMPCP-4P₂) illetve három (TMPCP, TMPCP-4P) pozitív töltés megléte elégséges ahhoz, hogy a profirin származék interkalációval és külső kötéssel kapcsolódjon a kettős szálú polinukleotid lánchoz, és ezt a három pozitív töltés mellett jelenlevő egy negatív töltés sem zárja ki (TMPCP). A porfirin egységein három pozitív töltést hordozó TMPCP-AK feltehetően szterikus okokból, csak külső kötéssel kapcsolódnak a DNS-hez. A három vagy négy pozitív töltést hordozó kationos profirin a nukleoprotein komplex DNS alkotójához az izolált DNS-sel azonos módon kötődik. Azonos bázispár/ profirin arányoknál minden esetben több a szabad profirin származék nukleoprotein esetében. A telítésiérték alapján felállított sorrendet: TMPyP>TMPCP>TMPCP-4P>BMPCP-4P₂, a NP-porfirin származék esetében a nettó töltés és a származék mérete egyaránt befolyásolja.

Számos kationos porfirin származéknak nagy az affinitása izolált DNS-hez illetve nukleoprotein komplexhez, intracelluláris környezetben mégsem kötődnek a nukleáris DNS-hez, és nem halmozódnak fel a sejtmagban.

A Jelölt megállapította, hogy a kationos porfirinek biológiai alkalmazása során mind a szingulett oxigén, mind a szabad gyökök jelenléte hozzájárul a bakteriofág fertőzőképességének elvesztéséhez, azonban ezek együttes jelenléte fokozza a genotoxikus hatás kialakulásának lehetőségét. A DNS-hez nem kötött porfirin szignifikánsan nagyobb hatékonyságú a vírusinaktiváció szempontjából, mint a kötött forma.

Az eredményeket összefoglalva a Jelölt megállapította, hogy a fehérje kapszidban fotokémiai sérüléseket okozhatnak mind a DNS-hez nem kötődő glikolizált, mind a DNS-hez kötődő kationos porfirin származékok. Ezutóbbi még akkor is igaz, ha a rendszerben csak DNS-hez kötött porfirin van jelen. A DNS-ben okozott sérülések ugyanakkor csak a kationos porfirinek esetében járulnak hozzá a vírus inaktivációjához.

A Megbeszélést követő „Az eredmények gyakorlati jelentősége” című fejezet elegáns befejezése a doktori értekezésnek, hiszen az elméleti kutatások „kézzel fogható” gyakorlati alkalmazását mutatja be. A kutatási téma jelentőségét mutatja, hogy az orvostudományban a porfirin származékok jelenlegi két legfontosabb

alkalmazási területe a daganatok fotodinamikus terápiája (PDT) és a mikroorganizmusok fotodinamikus inaktivációja (PDI). Mindkét területen a hatékonyság és a hatásmechanizmus szempontjából meghatározó a porfirin származékok lokalizációja és a környezetben lévő molekulákkal kialakított kapcsolata. Ezeknek a kölcsönhatásoknak az elemzéséhez és a továbbfejlesztéshez járult hozzá Dr. Csík Gabriella kutatása.

Dr. Csík Gabriella MTA doktori munkájának nyilvános vitára bocsájtását, annak elfogadását és az MTA doktori cím odaítélését messzemenően támogatom.

Kérdéseim a Jelölthöz:

1. A bázisösszetétel szerepe a kötött formák közötti eloszlásban című 5.2.1.2. fejezetben a Jelölt azt vizsgálta, hogy az egyes kötőmódok hogyan befolyásolják egymást, milyen arányban jönnek létre a különböző kötődések kevert bázisösszetételű, természetes polinukleotidokban. A Jelölt a T7 fág, csirke vörörsvérsejt és *Micrococcus luteus* esetében vizsgálta a TMPyP kötődését a különböző bázisösszetételű DNS-hez. Milyen szempontok alapján esett éppen a *Micrococcus luteus-ra* a Jelölt választása?

2. A toxicitási vizsgálatok során a hemolízis vizsgálatokat citotoxikus paraméterként is alkalmazzák bármely vegyület vagy készítmény biztonsági profiljának igazolására. A Jelölt vizsgálatai során a különböző porfirinek származékok különböző szintű toxicitását bizonyította. Történtek-e hemolízis vizsgálatok a különböző porfirin származékok vizsgálata során, illetve a nemzetközi irodalomban a porfirinek esetében milyen erre vonatkozó adatok vannak?

3 A mikroorganizmusok növekvő antibiotikum rezisztenciája miatt egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik más, potenciális antibakteriális eljárások, így a fotodinamikus reakciók felhasználása irántis. A Gram-pozitív baktériumok inaktivációjában számos első- illetve második generációs fényérzékenyítő hatékonyra bizonyult. Ugyanakkor a Gram-negatív baktériumokkal szemben ezek hatástalanok voltak. A Gram-negatív baktériumok fal szerkezete indokoltta tette a kationos porfirinekkal történő próbálkozást. Van-e arra vonatkozó adat, hogy a Gram-negatív baktériumokkal szemben, hogyan viselkednek a porfirinek,

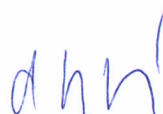
különös tekintettel a kationionos porfirinek, hiszen a multi-rezisztens Gram-negatív baktériumok okozta fertőzések világszerte komoly problémát jelentenek.

3. Mi a Jelölt véleménye arról, hogy a porfirin származékok membránra kifejtett hatását nem lehet-e felhasználni COVID-19 pandémiával kapcsolatos védekezésben?

4. A T7 fág a modell ép kapszidos és a kapszid felszabadulása után szabaddá válta DNS minták illesztési paraméterei illetve a kötött formák megoszlása markánsan különbözik egymástól, vagyis a kapszidba zárt illetve a szabad DNS-sel való kölcsönhatás jól elkülöníthető egymástól. Lát-e a Jelölt esélyt arra, hogy burkos vírusok esetében, pl.: SARS-Cov-2 esetében is a porfirinek felhasználhatóak legyenek a vírus elleni harcban?

5. Kérem a Jelöltet, hogy mivel a porfirinek egyik legfontosabb felhasználási területe a vérképzőművek kezelése, ismertesse azokat a mikrobákat, melyek a vérképzőművekben előfordulhatnak, és ismertesse ezeknek a mikrobáknak a porfirinekkal szembeni érzékenységüket.

Budapest, 2020.01.04.



Dr. Szabó Dóra, az MTA doktora