

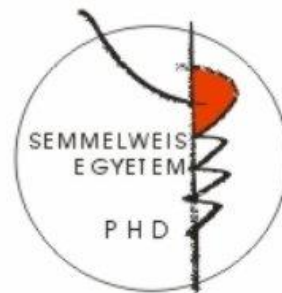
DNS-támadáspontú molekulák kölcsönhatásainak jellemzése

Doktori értekezés

Dr. Orosz Ádám Péter

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csík Gabriella, CSc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Budai Livia, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Uray Katalin, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Zelkó Romána, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Grama László, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Kukor Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés, irodalmi háttér	6
2.1. DNS támadáspontú hatóanyagok	6
2.2. Kationos porfirinek és konjugátumaik	7
2.2.1. Jellemzők és kötődés polinukleotidhoz.....	7
2.2.2. Fotokémiai reakciók.....	9
2.2.3. Fotodinamikus terápia (PDT).....	10
2.2.4. Porfirin konjugátumok	11
2.3. Daunorubicin és konjugátumai.....	15
2.3.1. Jellemzők és kötődés polinukleotidhoz.....	15
2.3.2. Daunorubicin konjugátumok.....	17
2.4. Vizsgálati lehetőségek.....	18
2.5. A T7 bakteriofág	22
3. Célkitűzések	24
3.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumok	24
3.2. Daunorubicin aminosav konjugátumok	24
4. Módszerek	25
4.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik	25
4.2. Ac-Lys-(H-Ala-D-Ala-Ala)-NH ₂ tetrapeptid szintézise.....	26
4.3. Ac-Lys-(H-Ala-D-Ala-Ala)-NH ₂ konjugálása porfirinekhez.....	27
4.4. Poliipeptid porfirin konjugátum szintézise	28
4.5. Daunorubicin aminosav konjugátumok és szintézisük	29
4.6. T7 bakteriofág	30
4.7. T7 bakteriofág DNS izolálása	31
4.8. Abszorpciós spektroszkópia	31
4.9. Fluoreszcencia spektroszkópia	33
4.10. Fluoreszcencia élettartam	34
4.11. Cirkuláris dikroizmus.....	34
4.12. Abszorpciós és cirkuláris dikroizmus olvadási görbék	35
4.13. Porfirin származékok bezárása liposzómákba.....	36
4.14. Sejtkultúrák az in vitro vizsgálatokhoz	37

4.15. Áramlási citometria	37
4.16. Konfokális mikroszkópia	38
5. Eredmények.....	40
5.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik	40
5.1.1. Szintézis	40
5.1.2. Spektroszkópai tulajdonságok.....	41
5.1.3. Kötődés izolált DNS-hez	44
5.1.3.1. Abszorpciós spektroszkópia - TMPCP, TMPCP-4P, BMPCP, BMPCP-4P ₂	44
5.1.3.2. Abszorpciós spektroszkópia - TMPCP-AK	49
5.1.3.3. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia	51
5.1.3.4. Fluoreszcencia energia transzfer	52
5.1.3.5. Fluoreszcencia élettartam.....	54
5.1.3.6. Cirkuláris dikroizmus.....	55
5.1.4. Kötődés nukleoprotein komplexhez.....	60
5.1.4.1. Abszorpciós spektroszkópia.....	60
5.1.4.2. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia	66
5.1.4.3. Fluoreszcencia energia transzfer	67
5.1.4.4. Fluoreszcencia élettartam.....	68
5.1.4.5. Cirkuláris dikroizmus.....	69
5.1.4.6. Abszorpciós és cirkuláris dikroizmus olvadási (melting) görbék	74
5.1.5. A porfirin származékok kölcsönhatása liposzómákkal	78
5.1.6. Sejtfelvétel.....	79
5.1.7. Sejten belüli elhelyezkedés	81
5.2. Daunorubicin aminosav konjugátumok	85
5.2.1. Szintézis	85
5.2.2. Spektroszkópai tulajdonságok.....	85
5.2.3. Kötődés izolált DNS-hez	87
5.2.3.1. Abszorpciós spektroszkópia.....	87
5.2.3.2. Abszorpciós olvadási (melting) görbék	88
5.2.3.3. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia	90
5.2.3.4. Cirkuláris dikroizmus.....	91

5.2.4. Kötődés nukleoprotein komplexhez.....	94
5.2.4.1. Abszorpciós spektroszkópia.....	94
5.2.4.2. Abszorpciós olvadási (melting) görbék	95
5.2.4.3. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia	96
5.2.4.4. Cirkuláris dikroizmus.....	98
6. Megbeszélés	99
6.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik kölcsönhatása izolált DNS-sel és nukleoprotein komplexszel	100
6.1.1. Abszorpciós spektrumok	100
6.1.2. Fluoreszcencia emissziós spektrumok	102
6.1.3. Fluoreszcencia energia transzfer	103
6.1.4. Fluoreszcencia élettartam	104
6.1.5. Indukált cirkuláris dikroizmus	104
6.1.6. Izolált DNS és T7 fág szerkezeti változásai.....	105
6.1.7. Olvadási görbék, kölcsönhatás kapszidfehérjével.....	106
6.1.8. Összegzés	107
6.2. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik kölcsönhatása modellmembránnal, sejtek általi felvétele, sejteken belüli elhelyezkedése	109
6.3. Daunorubicin aminosav konjugátumok kölcsönhatása izolált DNS-sel és nukleoprotein komplexszel	111
6.3.1. Abszorpciós spektrumok	112
6.3.2. Olvadási görbék, kölcsönhatás kapszidfehérjével.....	112
6.3.3. Fluoreszcencia emissziós spektrumok	113
6.3.4. Izolált DNS és T7 fág szerkezeti változásai.....	114
6.3.5. Összegzés	114
7. Következtetések.....	115
7.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik	115
7.2. Daunorubicin aminosav konjugátumok	117
8. Összefoglalás.....	118
9. Summary.....	119
10. Irodalomjegyzék.....	120
11. Saját közlemények jegyzéke.....	134
12. Köszönetnyilvánítás	135

1. Rövidítések jegyzéke

A - abszorbancia; adenin

A^{rel.} - komponens görbe alatti relatív terület

Ala - alanin

BMPCP - mezo-5,10-bisz(4-N-metilpiridil)-15,20-di-(4-karboxifenil)porfirin

BMPCP-4P₂ - BMPCP tetrapeptid konjugátuma

BOC - tert-butiloxikarbonil

BOP - (1H-benzotriazol-1-iloxi)[tris(dimetilamino)]foszfonium hexafluorofoszfát

bp/Dau - bázispár/daunorubicin molarány

C - citozin

CD - cirkuláris dikroizmus

Dau-Arg - daunorubicin arginin konjugátum

Dau/bp - daunorubicin/bázispár molarány

Dau-Gly - daunorubicin glicin konjugátum

Dau-Leu - daunorubicin leucin konjugátum

DIEA - N,N-diizopropiletilamin

DMF - dimetil-formamid

DNáz - deoxiribonukleáz enzim

DNS - deoxiribonukleinsav

DPPC - dipalmitoilfoszfatidilkolin

ϵ - moláris extinkciós koefficiens

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid

EDTA - etilén-diamin-tetraacetát

ESI-MS – elektropray ionizációs tömegspektrometria

FCS - fetal calf serum

Fmoc - 9-fluorenilmetoxikarbonil

G - guanin

Gly - glicin

GnRH - gonadotropin-releasing hormone (gonadotropin felszabadító hormon)

gp - gene protein (T7 fág)

HL-60 - humán akut promyelocytás leukémia sejtvonala

HOMO - legmagasabb betöltött molekula pálya
HT-29 – humán colon adenocarcinoma sejtvonal
 λ - hullámhossz
 λ_i - komponens görbe csúcsának hullámhossza (spektrumfelbontás)
Leu - leucin
Lys - lizin
LUMO - legalacsonyabb betöltetlen molekula pálya
M - mol/dm³
MBHA - 4-metilbenzhidrilamin
M_w - molekulatömeg
PDT - fotodinamikus terápia
r - bázispár/porfirin molarány
1/r - porfirin/bázispár molarány
RNS - ribonukleinsav
mRNS - messenger RNS
RP-HPLC - fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia
rpm – fordulatszám
SUV - small unilamellar vesicle (kis unilamelláris vezikulum)
T - timin; hőmérséklet
TFA - trifluorecetsav
TMPCP - mezo-tri(4-N-metilpiridil)-mono-(4-karboxifenil)porfirin
TMPCP-4P - TMPCP tetrapeptid konjugátuma
TMPCP-AK -TMPCP polipeptid konjugátuma
TMPyP - tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirin
Tris-HCl - tris(hidroximetil)-aminometán puffer oldat
UV - ultraibolya
w_i - teljes szélesség (Gauss függvény)
y₀ - alapvonal (spektrumfelbontás)

2. Bevezetés, irodalmi áttekintés

2.1. DNS támadáspontú hatóanyagok

Az onkológiai kemoterápiás kezelések során jelentős részben olyan hatóanyagok kerülnek alkalmazásra, melyek hatásmechanizmusában fontos szerepet játszik az örökítőanyag. Közvetlenül hatást fejthetnek ki a DNS-en vagy pedig közvetett módon, a DNS stabilitását és alkotó elmeinek szintézisét befolyásoló enzimek gátlása vagy reaktív gyökök képzése révén érhetnek el tumorelles hatást. A legtöbb esetben kötődés jön létre a hatóanyag és a DNS-között, mely lehet kovalens és nem kovalens, az utóbbinak gyakorta előforduló módja az interkaláció a bázispárok közé vagy a DNS kis árkába történő külső kötődés. (1,2)

Jóllehet a különféle kemoterápiás eljárások során használt molekulákkal kapcsolatban esetenként több évtizedes tapasztalat áll rendelkezésre, hatékonyságuk növelése mind a mai napig nem kellően megoldott. Mellékhatásaik sokrétűek és esetenként súlyosak, továbbá a kezelést követően maguk is okozhatják másodlagos tumorok kialakulását. A nem kívánatos következményeik legtöbbje is DNS károsító hatásukból és a rákos sejtekre való szelektivitás hiányából eredeztethető. Ebből következik, hogy a hatóanyag kutatás és fejlesztés egyik iránya azokra a molekulákra összpontosít, amelyek közvetlenül nem károsíthatják a DNS-t, illetve specifikusabb módon jutnak be a célsejtekbe. A konvencionális terápia alternatíváiként megjelentek olyan módszerek is, ahol a kóros szövetek szelektív károsítása a kezelés technikai elrendezéséből ered. Erre példa a fotodinamikus terápia, aminek egy úgynevezett fényérzékenyítő molekula képezi az alapját. Ez a megfelelő frekvenciájú fény hatására reaktív oxigénszármazékokat hoz létre, amelyek károsítják a közelben található sejtalkotókat és ez a sejt pusztulásához vezet. A teljes testben kialakuló fényérzékenység, az esetenként nem kielégítő hatékonyság következtében a klinikai gyakorlatba a fotodinamikus terápia eddig csak szerényebb mértékben került bevezetésre, így a fényérzékenyítők fejlesztése ezen a területen jelenleg is az érdeklődés középpontjában van. A fényérzékenyítő vegyület leggyakrabban a ciklikus tetrapirrolok családjába tartozó valamely apoláros porfirin származék. A

tudományos érdeklődés azonban egyre több figyelmet szentel a kationos porfirineknek is, melyek izolált DNS-hez való kötődési képességükről ismertek. (3,4)

A hatóanyag tervezést és szintézist követően igen lényeges annak megértése, hogy a DNS és különféle új vagy módosított vegyületek között pontosan milyen kölcsönhatás alakul ki, hogy megbecsülhessük élettani és terápiás hatásait. Első lépésben elengedhetetlen az izolált DNS-hez és a szerkezeti fehérjékkel együtt jelenlévő polinukleotidhoz, azaz nukleoprotein komplexhez való kötődés részletes *in vitro* jellemzése, hogy megfelelő alapot teremthessünk a további molekulatervezési lépések számára.

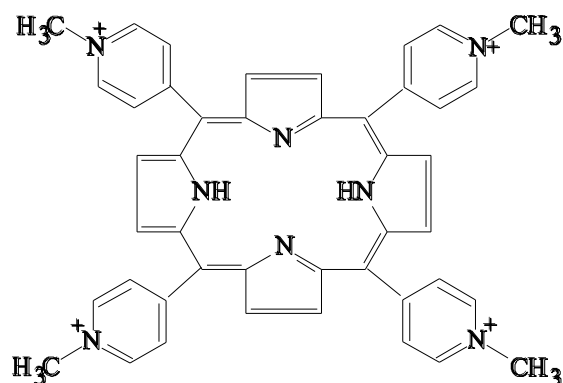
Jelen dolgozat a DNS támadáspontú molekulák két fajtájával foglalkozik, a kationos porfirinekkel és az antraciklinek közé tartozó daunorubicinnel, és ezek módosított származékainak kölcsönhatási profilját kívánja elemezni.

2.2. Kationos porfirinek és konjugátumaik

2.2.1. Jellemzők és kötődés polinukleotidhoz

Évtizedekkel ezelőtt felfigyeltek a kationos porfirinek azon tulajdonságára, hogy nagy affinitással kötődnek DNS-hez és nem kellett sok időnek elteltéig ahhoz, hogy a tudományos érdeklődés homlokterébe kerüljenek (5). A kationos porfirinek tulajdonságai közt igen előnyös, hogy amfifil molekulák, vízben jól oldódnak, és különböző kötődési komplexeket alakítanak ki polinukleotidokkal. Több tanulmány foglalkozott a kötődési folyamat vizsgálatával és leírásával, legtöbb esetben nukleinsav oligomerek vagy polimerek és kationos porfirin származékok kölcsönhatásának elemzésén keresztül (6-11).

Alapvegyületként gyakran vizsgálják a négy pozitív töltéssel rendelkező tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirint (TMPyP), amely a *mezo*-szubsztituált porfirinek közé tartozik, tehát a négy metilpiridil szubsztituens a pirrolgyűrűket összekötő metin-hidak szénatomjához kapcsolódik. Szerkezetét az 1. ábrán láthatjuk.



1. ábra Az egyik legtöbbet vizsgált mezo-szubsztituált porfirin származék, a TMPyP szerkezeti képlete.

Amint már említettük, kisméretű molekulák és kettősszalú DNS között többféle módon létrejöhet kötődés, ezek közül TMPyP esetében a kölcsönhatás két formáját sikerült kimutatni: az interkalációt és a külső kötődést. Az interkaláció során a porfirin molekula beékelődik a DNS bázisai közé, és azokkal jelentős hidrofób kölcsönhatásokat alakít ki. Hatására nő a DNS molekula hossza, és a kettős hélix menetmagassága is megváltozik. Kimutatták, hogy interkaláció gyakorta a guaninban és citozinban gazdag régiókban alakul ki, tehát adódik bizonyos szelektivitás ezen szekvenciák iránt (9). Ennek magyarázatát molekuláris modellezés segítségével dolgozták ki, amely szerint a timin metil csoportja feltehetően sztérikus gátat jelent az interkaláció kialakulása szempontjából (10).

A kötődés másik formája során nem jön létre beékelődés és a DNS szerkezetének jelentős átalakulása, hanem külső elhelyezkedésű komplex képződik a polinukleotid és a porfirin molekula között. Ez a fajta külső kötődés jellemzően a két polinukleotid szál által képzett kis árokban alakul ki, bázispreferenciájára pedig főként az adenin/timin túlsúlyú régiók dominanciája jellemző. A kölcsönhatás ezen formájában elsődleges szerepet játszanak azok az elektrosztatikus kölcsönhatások, amelyek a DNS cukor-foszfát váza és a porfirinek pozitív töltésű csoportjai közt jönnek létre (9).

Az eltérő bázispreferenciát kiaknázták a korai vizsgálatok során, ugyanis gyakran csak A-T vagy csak G-C tartalmú szintetikus kettősszalú oligonukleotidokat használtak a kísérletekhez, tehát a két kötési formát a könnyebb értelmezhetőség kedvéért külön mintákban állították elő (5-8).

A kötődés mennyiségi leírására, a kötődési képesség jellemzésére többféle modellt alkalmaztak, ezek között említhető a Schatchard-féle (12) vagy a daunorubicin származékok tárgyalásánál később részletesebb kifejtett McGhee - von Hippel közelítés (13). Ezen modellek alkalmazhatósága többféle kötőhely illetve kötődési mód esetében, mint például a vegyes bázis-összetételű természetes kétszálú T7 DNS és porfirinek kölcsönhatása azonban meglehetősen pontatlanná és ezért korlátozottá válik. Az ilyen rendszerek esetén számított kötődési állandók a választott modell függvényében igen különbözők lehetnek (14). A probléma feloldására célszerű többféle optikai spektroszkópiás módszert párhuzamosan alkalmazni és a kapott spektrumok elemzésén keresztül megkísérelni a kölcsönhatás jellemzését (15).

2.2.2. Fotokémiai reakciók

A porfirin származékok képesek a környezetükben lévő molekulák fényérzékenyítésére. Ez a tulajdonság több UV és látható tartományban fényelnyeléssel rendelkező anyagra jellemző, és azon alapszik, hogy az elnyelt energiát átadják a közelben lévő molekuláknak, amelyek ezáltal aktiválódnak, reakcióképesé válnak (16). A képződött reaktív vegyületek környezetükre gyakorolt hatását fotodinamiás hatásnak nevezzük. A fogalom alatt legtöbbször károsító folyamatokat értünk, elkülönítve ezzel az energia biológiai rendszerekbe történő asszimilációjától, a fotoszintézistől. A reaktív vegyületek módosíthatják a membránalkotókat, a fehérjéket és a nukleinsavakat, befolyásolva és általában megszüntetve ezzel biológiai funkciójukat (17-20).

A fotokémiai reakciók két fajtáját különíthetjük el: a direkt és az indirekt folyamatokat. Direkt reakció esetén a fény által aktiválódott érzékenyítő vegyület közvetlenül lép reakcióba a környezetében lévő molekulákkal. Az indirekt reakciók során viszont köztitermékek jönnek létre, és további két csoportra oszthatók: I-es és II-es típusra. Az I-es típusú fotokémiai reakció elektron és hidrogéntranszferrel jár, melyek során szabadgyökök képződnek. A II-es típusú reakció esetében pedig spinváltás játszódik le: eredményeként az alapállapotban triplett O_2 -ből szingulett

állapotú O_2 képződik. A fotokémiai reakciók ezen altípusát tekinthetjük a legfontosabbnak, így a fényérzékenyítő molekulák tulajdonságai közül a szingulett O_2 képzés kiemelt jelentőségű (16, 21). A szingulett állapotú O_2 rövid diffúziós úthosszal rendelkezik, ezért lényeges kérdés a fényérzékenyítő molekula helyzete a károsítani kívánt sejtalkotóhoz képest.

2.2.3. Fotodinamikus terápia (PDT)

Fotodinamikus terápia alatt manapság legnagyobb részben a fotokémiai reakciók tumor-kezelésben való alkalmazását értik (22). Porfirinek használata ilyen indikációban Thomas J. Dougherty vizsgálatai óta tett szert érdeklődésre, ugyanis kimutatta, hogy a tumoros sejtek sokkal nagyobb mértékben veszik fel a hematoporfirin keveréket a környező szöveteknél, és tekintettel arra, hogy a porfirinek fényérzékenyítő képességgel rendelkeznek, továbbá a toxicitásuk szisztémás alkalmazás során elfogadhatónak bizonyult, a vegyületcsalád iránti érdeklődés fokozódott (21). Klinikai alkalmazás során először a hematoporfirin keverék tisztított változatát (Photofrin) kezdték alkalmazni, majd intenzív kutatási tevékenység kezdődött kedvezőbb, második generációs fotoszenzibilizátorok iránt. A fejlesztések során fontosnak tartották, hogy a molekulák rendelkezzenek bizonyos szelektív felhalmozódással malignus sejtekben, gyorsan távozzanak a szervezetből, bírjanak kielégítő vízoldékonysággal, fény hiányában toxicitásuk minimális legyen, és minél szélesebb hullámhossz tartományban rendelkezzenek fényelnyeléssel (23).

A második generációs porfirinek közé tartozik a tetrakis-(4-N-metilpiridil)porfirin (TMPyP) is, amely a porfirin-DNS kölcsönhatást vizsgáló kutatások során az egyik leggyakrabban alkalmazott vegyületté vált. Kimutatták felhalmozódását a sejtmagban, illetve bizonyos esetekben a mitokondriumban is. Tumoros sejtek nagyobb mértékben veszik fel az egészséges szövetekhez képest, így remélhető némi szelektivitás (24,25).

A malignus sejtek károsodása PDT során bekövetkezhet a sejtmembrán, a mitokondrium és a lizoszómák sérülésén keresztül, mely végső soron nekrozishoz vezet (26), de egyes esetekben nem kizárt a környező szövetekre nézve kedvezőbb

apoptózis (programozott sejthalál) eshetősége sem (27). A fotokémiai reakciókat eddig elsősorban endobronchiális (28), gasztrointesztinális (29,30) és nem-festékes bőrdaganatok (22) terápiájában használták ki.

Fotodinamikus hatás kiaknázása porfirin-származékok alkalmazásán keresztül azonban nem csak az onkológia területén, hanem a mikrobiológiában is ígéretesnek tűnik (31). Kationos porfirinek egyaránt képesek a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok károsítására (32,33). Lényeges terület még a fotokémiai vírusinaktiváció is (18). Ennek jelentősége egyes vérkészítmények sterilizálásában lehet, ugyanis a fotokémiai inaktiváció előnyösen használható ki olyan esetekben, amikor a vírus DNS-én kívül nincsen jelen egyéb nukleinsav (34). Tekintettel a porfirinek örökítő anyag iránti jelentékeny affinitására, vörösvértest koncentrátumok fertőtlenítésében is szerepük lehet (35).

2.2.4. Porfirin konjugátumok

A közelmúltban a porfirin származékokkal kapcsolatos kutatásokban jelentőségre tettek szert azok az irányzatok, amelyek során a porfirin-gyűrűhöz különböző funkciójú molekulákat kapcsoltak. Célként merült fel a porfirinek sejtek általi felvételének fokozása, a tumoros sejtek iránti szelektivitás növelése a makrociklus szerkezetmódosításán keresztül (36). A kationos porfirinek iránti érdeklődést ugyanis tovább növelte, hogy fény derült guanin-kvadruplexek iránt tanúsított affinitására. Ezek a struktúrák a kromoszómák végein a telomer-régiókban, és egyes onkogének transzkripcióját szabályozó területeken található meg. A guanin-kvadruplexekkel való kölcsönhatás következménye lehet az adott DNS szakasz stabilizálódása. Ilyen módon a kötést kialakító vegyületek gátolhatják a telomeráz enzimet, amely szintén fontos lehet a daganatterápiában (37).

Konjugátumok szintetizálása annak a lehetőségét is felveti, hogy a porfirinek nukleinsavak iránt tanúsított erős kötődési képessége egyéb molekulák DNS közelébe juttatására is kiaknázható legyen, például génterápia esetében (38). Végző soron tehát olyan porfirin származékok előállítása a cél, amelyek jelentős előnyöket tudnak felmutatni az egyszerűbb vegyületekkel szemben, a PDT-ben alkalmazott

molekulák új generációját jelenthetik, de más terápiás eljárásoknak is alapjai lehetnek. Különböző molekulák kapcsolásával kísérleteztek a porfirin-alapvegyületekhez, vizsgálatok történtek egyebek mellett antrakinon (39), fenilpiperazin (40), polietilénlikol (41) és különböző cukor konjugátumokkal (42, 43), illetve szteroidok (44), folsav (45), oligonukleotidok (46) és antitestek kapcsolásával (47).

Ismert, hogy azok a porfirinek, melyek több aril-csoporttal is rendelkeznek, hidrofób tulajdonságaik következtében nagyobb mennyiségben kerülnek be rákos sejtek intracelluláris terébe. Szelektív, specifikus felvételtől azonban korántsem beszélhetünk, a malignus átváltozáson átesett szövetekben a felgyorsult metabolizmus és a megváltozott pH következményeként alakul ki magasabb hatóanyag-koncentráció (43). Ezért a további kutatások már amfipatikus származékokkal végzett kísérletekre összpontosítottak, tervbe véve egyfajta „célzóberendezés” kifejlesztését. Kísérletek történtek cukormolekulákkal kapcsolt porfirinokkal, hiszen jól ismert a szacharidok szerepe a sejtszintű felismerési folyamatokban. Figyelemreméltó eredmények születtek négy glükóz molekulával konjugált pentafluorofenil-porfirinek esetében, sikerült kimutatni azt, hogy emlőrákos sejtvonalak sokkal nagyobb mértékben veszik fel az új származékot, mint az egészséges fibroblastok. Kiderült, hogy a molekulák amfipatikus tulajdonsága lényeges elem mind a felvétel, mind pedig az elimináció során, tehát megfelelő arányban kell alkalmazni a hidrofíli/hidrofób csoportokat a molekulák tervezésekor (43). Releváns irány lehet még nukleinsavak kapcsolása is a porfirinekhez. Duarte és munkatársai mRNS szekvencia-specifikus oxidatív károsítását érték el úgy, hogy egy antiszenz oligonukleotid 5'-végéhez kapcsoltak porfirint. (48).

A konjugátumok többsége amid, észter vagy éter kötés kialakításával jön létre a porfirin és a kapcsolt molekula közt, ezek a kötések pedig a szervezetben hidrolízist szenvedhetnek. Ez egyszerre lehet hasznos és jelentősen akadályozó tényező. Ha a kötéshasadás már a sejten belül történik meg, akkor könnyen létrejöhet a kötődés a porfirin alapp molekula és a DNS között, anélkül, hogy számolni kellene a szerkezetmódosításból fakadó esetleges gátló tényezőkkel; azonban ha a célsejthez jutás előtt elbomlanak a konjugátumok, az előnyös tulajdonságok elvesznek.

Vizsgálták a konjugátumok sejtekbe való bejutásának mechanizmusát is. Fény derült arra, hogy noha beszélhetünk bizonyos fokú aktív transzportról rákos sejtek és porfirin konjugátumok esetében (például az említett glükóz konjugátumoknál), de a felvétel nagyobb része mégis diffúzió útján következik be. Ennek mértéke kisebbnek bizonyult a négyszeres pozitív töltésű porfirinek esetében, mint a konjugátumoknál (43,49). Azonban a sejtekbe történő nagyobb mértékű bejutás nem jelenti automatikusan a fotodinamikus hatás erősödését. A porfirin makrociklus megváltozása a DNS-kötődés módosulását is okozhatja, a molekulák töltéseloszlása és a különböző szterikus hatások kedvezőtlenebbé válhatnak a kölcsönhatás szempontjából, de kialakulhat jelentősebb aggregációs hajlam is, vagy pedig más sejtorganellumokban, egyebek mellett a lizoszómákban, mitokondriumokban történhet feldúsulás (43, 49-51). Említésre méltó azonban, hogy a jelenleg használatban lévő fényérzékenyítők többsége nem a sejtmagban halmozódik fel legnagyobb mértékben, a lizoszómák illetve a mitokondriumok is a PDT fontos célpontjai lehetnek (52).

A konjugátumok talán legintenzívebben vizsgált csoportját a peptidekhez kapcsolt származékok jelentik. Több tanulmány igazolta, hogy a polipeptidekkel konjugált porfirinek sokkal nagyobb arányban kerülnek be a célsejtekbe anyavegyületeiknél, és ígéretes alternatívák lehetnek PDT során (53-56). Ismeretes, hogy bizonyos peptidek hordozómolekulaként funkcionálhatnak olyan vegyületek számára, amelyek különböző okok miatt nem képesek kellő mértékben penetrálni a sejtekbe, így alkalmazásukra számos új terápiás eljárás – egyebek mellett a génterápia - során tettek kísérleteket. Peptidek konjugációjával megfelelően alakítható a molekulák hidrofil/hidrofób csoportjainak aránya, illetve lehetőség nyílik olyan peptidszekvenciák beépítésére is, amelyeket a transzportfehérjék felismernek, így megnyílhat az út a porfirinek aktív transzportja előtt. Itt említendő Sibirian-Vazquez és csoportjának munkája, ugyanis egy sejtbe való bejutást elősegítő motívumot és egy sejtmag lokalizációs szignált tartalmazó peptidet állítottak elő, melyet porfirin származékokhoz kapcsoltak, és az új molekulák fokozott sejt felvételét tapasztalták (54).

Számos különféle, a fényérzékenyítőkhöz kapcsolt oligo- és polipeptid közül a polilizin vázzal rendelkező elágazó vagy nem elágazó láncú polipeptidek ígéretes

hordozómolekulának bizonyultak sejtekbe való bejutás fokozására. Eredmények születtek olyan gyógyszerekkel, mint a metotrexát, a daunorubicin, vagy a GnRH antagonisták, de bizonyos radiofarmakonokkal és szintetikus antigénekkkel is (57,58). Három pozitív töltésű porfirin ilyen típusú konjugátuma esetében a sejtekbe történő felvétel fokozódása kimutathatóan növelte a fotodinamikus eljárás hatékonyságát keratinocitákban (56).

Klorin alapú konjugátummal pedig HeLa sejtekben érték el kedvező változást, a fényérzékenyítő molekula ebben az esetben a sejtmagban is kimutatható volt. A hatóanyag sejtmagba való bejutása nem előfeltétele a fotodinamikus hatás elérésének, de a terület érzékenységből kifolyólag a sejtmagban való feldúsulás a hatékonyság növekedéséhez vezet (59).

A polilizin vázas peptidekhez kapcsolt hatóanyagok fokozottabb bejutása valószínűleg annak köszönhető, hogy a sejtmembrán felszínének negatív töltései elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek a polipeptid ϵ -aminocsoportjaival. Kutatócsoportunk kationos oldallánccal bíró, polilizin-vázis peptidek rákos sejtekbe való bejutását összehasonlító kísérletei során fény derült arra, hogy felvételüket jelentősen befolyásolja az oldalláncok aminosav összetétele és a hidrofób jelleg. Membránon való átjutásuk döntően makropinocitózissal, illetve kaveolák és lipid raftok által közvetített endocitózissal történik. Porfirin-konjugátumok létrehozása polilizin-vázis peptidekkel tehát ígéretes lehetőségnek tűnik mind PDT-ben való alkalmazás, mind pedig más, DNS-kötődésen alapuló módszerek számára. Azonban a porfirin származékok ezen csoportjának nukleinsavakkal való kölcsönhatása még nem került részletes leírásra, noha a konjugáció jelentős változást okozhat a molekulák tulajdonságaiban, átalakul a töltéseloszlás és megnövekszik a molekula mérete is. Ezeknek a tényezőknek pedig számottevő következményei lehetnek a kötődés folyamatára. Fel kell tehát térképezni, hogy miként módosul a porfirinek kötődési tulajdonsága ha polipeptidhez kapcsolódnak, illetve ha csak kisebb oligopeptidek csatlakoznak a hatóanyaghoz.

2.3. Daunorubicin és konjugátumai

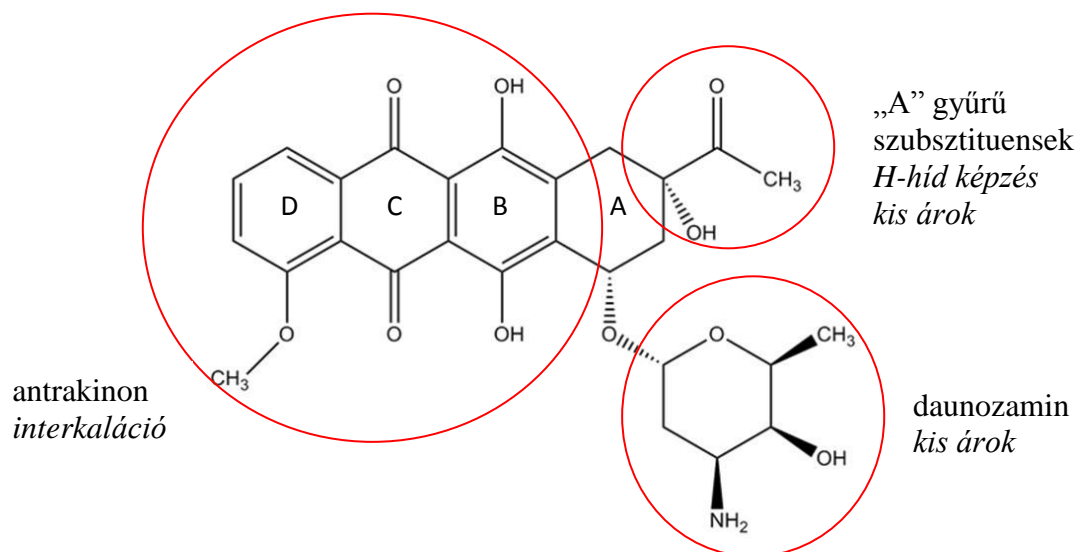
2.3.1. Jellemzők és kötődés polinukleotidhoz

Az antraciklinek közé tartozó vegyületek a legtöbbet kutatott DNS-interkaláló molekulák közé tartoznak. Terápiás alkalmazásuk az emlőrákra, különféle típusú leukémiákra és a Kaposi szarkómára terjed ki. Károsító hatással vannak a csontvelőre, a bőr és a tápcsatorna gyorsan osztódó sejtjeire illetve a szívműködésre. Ez utóbbi következményeként kialakuló kardiomiopátia esetenként súlyos mértékű lehet (1).

Hatásukat azáltal fejtik ki, hogy beékelődésük a DNS bázispárjai közé megakadályozza a topoizomeráz II enzim működését, melynek feladata a DNS szupertekercsek fellazítása replikáció, illetve transzkripció során. A legelfogadottabb elmélet szerint az interkaláció következtében a DNS kettős hélix kitekeredik, és ez feltehetően kedvez a hatóanyag/enzim kölcsönhatás létrejöttének. A daunorubicin jelenléte stabilizálja a DNS/topoizomeráz II komplexet. Ebből kifolyólag az enzim által katalizált reakció - a DNS szálak elvágása majd újraegyesítése - az elválasztás lépése után félbemarad, és ezáltal törések jönnek létre a DNS láncban. Említésre érdemes, hogy a két középső gyűrűn lévő kinon-hidroxikinon-csoport elektront továbbító szerepet tölt be, és aktív gyökök képzését teszi lehetővé. Feltételezhető, hogy a DNS-hez történő kötődés határozza meg a daganatgátló hatást, míg a kardiotoxicitásért az aktív szabad gyökök képződése tehető felelőssé (61,62).

Számos röntgen krisztallográfián alapuló tanulmány vizsgálta a daunorubicin és társvegyületeinek kölcsönhatását különféle nukleotidokkal, termodinamikai és reakciókinetikai leírások is elérhetőek (63-65). Ebből a szempontból az antraciklinek a DNS és kismolekulák között létrejövő interakció általános modellvegyületeinek is tekinthetők.

A 2. ábrán a daunorubicin szerkezeti képletét láthatjuk.



2. ábra A daunorubicin szerkezeti képlete a DNS-sel való kölcsönhatásában fontos elemek és funkciójuk kiemelésével.

A daunorubicin molekula három fontos részletét érdemes kiemelni a polinukleotidhoz való kötődésének tárgyalásakor. Az első az antrakinon gyűrűrendszer, a molekulának ezen része ékelődik be a DNS bázisai közé. A második, kötődésben szerepet játszó molekularész a daunozamin, amely a kis árok iránt mutat affinitást. Végül pedig az „A” gyűrű másik szubsztituense említendő, mely hidrogénkötések kialakítására alkalmas, amelyek mintegy horgonyként stabilizálják a kialakuló DNS/daunorubicin illetve daunorubicin/enzim komplexeket. A DNS kötődés termodinamikáját elemző tanulmány különféle módosított származékok vizsgálata alapján megállapítja, hogy mindhárom régió fontos szerepet játszik a kölcsönhatás kialakításában (65).

Tekintettel arra, hogy a daunorubicin esetében a DNS-hez való kötődés mechanizmusa az interkaláció, – ellentétben a porfirinek bonyolultabb kötődésével – a kötődési állandó, a kölcsönhatásra való készség jó közelítéssel becsülhető korábban kidolgozott modellek segítségével. Ebben a tekintetben a legalkalmasabb a McGhee és von Hippel által kidolgozott „szomszéd kizárásos” (neighbour exclusion) modell (13). A statisztikai modell során egy „kötődési izoterma” (telített kötőhelyek/szabad molekulák aránya a telített kötőhelyek függvényében) illesztése szükséges nemlineáris elméleti függvénnyel. A DNS kötődés leírásába beépíthető az átfedő kötőhelyek illetve a kooperatív hatások lehetősége is.

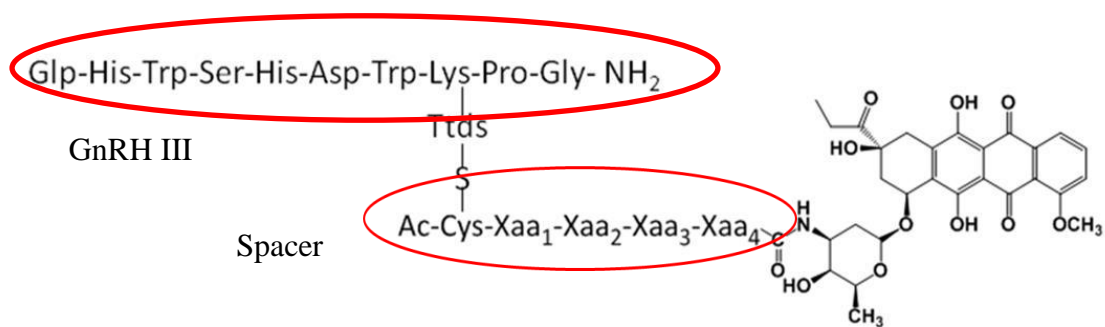
2.3.2. Daunorubicin konjugátumok

Annak érdekében, hogy csökkenthetőek legyenek a daunorubicin által okozott nemkívánt hatások, megkerülhető legyen a multidrog rezisztencia és fokozható legyen a tumorsejtekre való specificitás, a kutatások a hatóanyag módosítására fókuszáltak (66-69). A daunorubicint konjugálták oligo- és polipeptidekhez, proteinekhez, poliszacharidokhoz, polimerekhez és dextránhoz is (70-75).

Hordozó illetve célzó vegyület konjugálása a daunorubicin molekula több pontján is elvégezhető, de a leggyakrabban alkalmazott pozíciók a daunozamin aminocsoportja és az „A” gyűrű másik szubsztituensének valamelyik eleme. Mindkét pozíció a hatóanyag olyan részét érinti, amely hozzájárul a DNS-hez és az enzimhez való kötődéshez, ebből következik, hogy a konjugátumokat oly módon kell megtervezni, mely a sejtbbe történő bejutás után lehetővé teszi a daunorubicin felszabadulását. Ehhez egy „enzimlabilis spacer” szekvencia beépítése szükséges, amelyet például lizoszómális enzimek bontani képesek. Az esetek többségében azonban még így is marad egy-két aminosav az anyavegyületen és az ilyen formában jut el támadáspontjához. Ezért minden új konjugátumot létrehozó szintetikus megoldás után kulcskérdéssé válik, hogy a módosított daunorubicin tud-e kötődni a DNS-hez, és ha igen, az anyavegyülethez képest milyen mértékben.

Kutatócsoportunk többféle lehetséges célzó-peptidet vizsgál, melyek alkalmas alanyai lehetnek a daunorubicin szelektívebb konjugátumai szintézisének. Ezek közé tartoznak a fág könyvtárakból kiválasztott, sejtípus-specifikus oligopeptidek és a GnRH-III. Utóbbi azért tarthat számot érdeklődésre, mert a GnRH receptort bizonyos rákos sejtek fokozott mértékben expresszálják. A GnRH III előnye, hogy emlősökben csak enyhe hormonhatással bír (76-78). A korábbi vizsgálatok során ezeket a peptideket a megfelelő spaceren keresztül oxim kötéssel konjugálták a hatóanyaghoz.

Jelen munkában a daunozamin aminocsoporthoz amidkötéssel konjugált származékokat vizsgáljuk, a konjugátum szemléltetése látható a 3. ábrán.



3. *ábra* Daunorubicin GnRH III konjugátumának képlete az egyes komponensek jelölésével. A „spacer” peptid aminosav-szekvenciája többféle lehet.

A konjugátumok szintézise során olyan „spacer” kerül a molekulába, amely érzékeny a lizoszómák proteázára, a katepszin B enzimre, és a hasítást követően már csak egyetlen aminosav marad a daunorubicin molekulán. Mivel ez az aminosav a DNS-kötődés szempontjából lényeges pozícióban található, kötődési vizsgálatok segítségével kell döntést hozni a legkedvezőbb aminosav kiválasztásáról.

2.4. Vizsgálati lehetőségek

Számos DNS-hez kötődő molekula kiterjedt delokalizált π -elektronrendszerrel rendelkezik, így számottevő fényabszorpciót mutatnak az UV és a látható fény hullámhossztartományában. Ez lehetőséget teremt a folyamatok optikai spektroszkópiai követésére. Spektroszkópiai vizsgálatok során a molekulák esetleges aggregációja, a többféle kötőhely spektrális jellemzőinek elkülönítése, és a kötődés optikai tulajdonságainak koncentrációval történő változásai azok a körülmények, amelyek kihívást jelenthetnek kiértékelés során (79).

Bár az abszorpciós spektroszkópia egy egyszerű, napjainkban mindinkább háttérbe szoruló spektroszkópiai módszer, megfelelő kísérleti körülmények között a DNS-kötődési folyamatok során mégis előnyös lehet a használata. Ismeretes, hogy az interkaláció kialakulása általában a spektrum vörös irányú eltolódását eredményezi,

hiszen a nukleinsav bázisok és a kromofór elektronrendszere ilyenkor igen közeli kontaktusba kerülnek (6,9). A külső kötődést kevésbé határozott eltolódás jellemzi, azonban van lehetőség arra, hogy a spektrum alapos elemzése során a két kötési forma hozzájárulását a teljes spektrumhoz elkülönítsük egymástól (11, 15, 79).

A fluoreszcencia spektroszkópai módszereknek, a gerjesztési és emissziós színeképek felvételének haszna a nagyobb specificitásban nyilvánul meg. Adott hullámhosszú gerjesztő fény hatására kibocsátott fluoreszcencia jellemzői, a hullámhossz és az intenzitás, a kérdéses anyagra nézve egyediebbek az elnyelési színekép paramétereinél, így lehetőség nyílt komplexebb rendszerekben is a kiértékelés elvégzésére. A fluoreszcencia spektrum szintén változik kötődés létrejötte nyomán (80,81). Daunorubicin és származékai esetében ez lehetőséget teremt kötődési állandók számítására (82).

A fluoreszcencia időbeli lecsengése is fontos mérendő paraméter lehet - különösen a porfirinek esetében - és az egyes kötött formák jelenlétének kimutatására használható, hiszen DNS-sel való kölcsönhatás következtében a fluoreszcencia élettartama is változáson megy át (80).

A lumineszcencián alapuló eljárások további válfaja az energiatranszfer vizsgálata, ekkor a gerjesztést az UV-C tartományban, vagyis a DNS abszorpciós sávjában végezzük, miközben a kötődő molekula színeképének változását figyeljük meg. Kötődés létrejöttét mutatja, ha a vizsgált molekula fluoreszcencia kvantumhatásfoka megnő DNS jelenlétében. A DNS-től a kötődő molekulák felé megvalósuló energiatranszfer kialakulásához a nukleinsav bázisok és a ligandum elektron-rendszerének közeli kapcsolatára van szükség, ezért a jelenséget leginkább interkalációval kötődő molekulák esetében figyelték meg (10, 83).

Alkalmazható a kromofórok optikai aktivitását vizsgáló spektroszkópia is, a cirkuláris dikroizmus. Egyes anyagok a síkban polarizált fény két, ellentétes irányba forgó komponensére nézve eltérő törésmutatót és extinkciós koefficienszt mutatnak, ennek következtében az eredetileg lineárisan poláros fény áthaladás közben elliptikusan polárossá válik. Az ellipticitás mértéke a két gyengítési együttható különbségéből adódik, és hullámhossztól való függésének vizsgálata értékes anyagszerkezeti megállapításokra ad lehetőséget. Porfirin-DNS rendszerek elemzésekor kihasználható a kötődés kimutatására az, hogy az önmagukban

optikailag inaktív porfirinek a DNS-spirálhoz kötődve optikai aktivitásra tesznek szert, tehát az indukált cirkuláris dikroizmus jelenségét mutatják. A mérések legtöbb esetben a kötési formák elkülönítésére is alkalmat adnak (10, 84-86). CD spektrometria segítségével a DNS és nukleoprotein komplexek szerkezetváltozása is követhető válik a kötődési folyamatok során, mely további értékes információt jelent.

Indukált optikai aktivitást felhasználó eljárás még a lineáris dikroizmus is, mely segítségével az abszorbeáló elektronrendszer és a nukleinsav makromolekulák tengelyének szöge határozható meg (87).

A vizsgáló módszerek némileg külön szegmensét jelentik az optikai olvadási görbék („melting”) felvétele. Melting vizsgálatok során a DNS abszorpciójának vizsgálatára kerül sor a hőmérséklet függvényében. A DNS fényelnyelése $\lambda=260$ nm-en megnő a kettős hélix szétválása következtében, tehát a módszer pontosan meghatározhatóvá teszi a denaturáció hőmérsékletét. Ehhez az abszorbancia vagy az extinkciós együttható változását az idő függvényében ábrázoló derivált olvadási görbe elemzésére van szükség. A denaturáció hőmérséklete megváltozhat a különböző kötődő molekulák hatására, még pedig annak függvényében, hogy az egy- vagy kétszálú DNS iránt mutatnak nagyobb affinitást. Ha a ligandum a kétszálú DNS-hez kötődik jelentősebb mértékben, akkor a stabilizáció következtében nő a polinukleotid denaturációjának hőmérséklete, míg ha az egyszálú DNS segíti elő jobban a kötődést, akkor a denaturációs hőmérséklet értelemszerűen csökken. Nukleoprotein komplexek vizsgálata során lehetőség nyílik a fehérjék denaturációjának megfigyelésére is, ezáltal jelezheti a hatóanyag-fehérje kölcsönhatásokat (88, 89).

Különböző kalorimetriás módszerek is alkalmazhatók nukleinsavakhoz történő kötődés vizsgálatára, meghatározható a reakció során felszabadult vagy elnyelődött hőmennyiség, termodinamikai összefüggések alapján kötődési állandók kerülhetnek meghatározásra (90).

A vizsgálatok külön csoportját képezik a röntgen-krisztallográfiás mérések és a molekuláris modellezés. Röntgen-krisztallográfiával oligonukleotid-ligandum komplexek térszerkezete, az egyes atomok relatív helyzete és egymáshoz viszonyított távolsága határozható meg. A módszer jelentős hátránya azonban, hogy csak a megfelelő méretű és minőségű kristály alkalmazható a mérés során, így

csupán speciális körülmények közt érvényes megállapítások tehetők a kötődést illetően. Születtek eredmények porfirin-DNS komplexek térszerkezetének leírását célzó kísérletek alkalmával, amelyek oligonukleotidok és TMPP-fémkomplexek kötődését elemezték. Megállapították az interkaláció és a külső kötődés térbeli viszonyait, továbbá a nukleotid-láncre gyakorolt hatásukat: interkaláció során jelentős konformációváltozás tapasztalható, nukleinsav bázisok láncon kívülre szorulásával és a hélix csavarodási szögének megváltozásával, míg a külső komplex során a porfirin hidat képez a kisárokban, és csak kisebb mértékű torzulást okoz az oligonukleotid szerkezetében (91, 92).

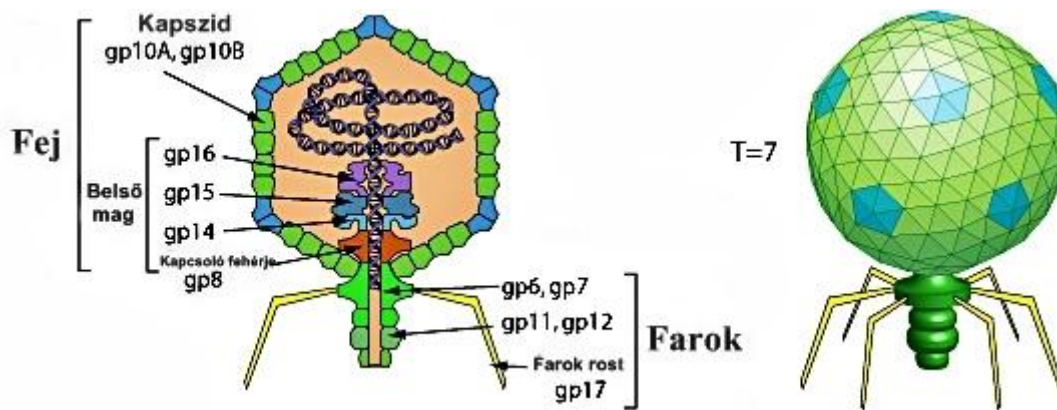
Molekuláris modellezéssel szintúgy oligonukleotidok és ligandum kötődésének elméleti analizésére nyílik lehetőség. Kezdeti feltételezésekből kiindulva megkísérelhető egy hipotetikus molekula-komplex viszonyainak leírása. Azonban a módszer határait jelenti, hogy nehézségek adódhatnak nagyobb nukleinsav láncok, komplexebb rendszerek esetén számítási korlátokból következően. Az eddigi modellezési eredmények a porfirinek esetében a kétféle kötési forma jelenlétét, továbbá az ezek esetében kimutatott bázispreferenciát és a kötődés formáinak elméleti energetikai leírását adják meg (93-96).

Végezetül említésre méltó még a molekuláris biológiai eljárások alkalmazása a kölcsönhatás vizsgálatára. Ilyen módszer a DNS-hasításán alapuló „footprinting” és az affinitáson alapuló lánchasítás. Footprinting során egy ismert hasító anyag DNS-degradációs hatásának megváltozása kerül elemzésre nukleinsavakhoz kötődő molekulák jelenlétében. A DNS hasítását általában methidium-propil-EDTA, KMnO_4 , DNáz I ágensek egyikének adagolásával végzik, a fragmentumok elkülönítésére elektroforézist alkalmaznak (95, 97). Affinitáson alapuló lánchasítás során pedig magának a ligandumnak a hasítási képességéből vonhatók le következtetések a molekula kötőhelyeiről és a szekvencia-specifitástról. Ismert például, hogy a TmPyP mangán komplexe rendelkezik DNS hasító képességgel (98).

2.5. A T7 bakteriofág

A bakteriofágokat széles körben alkalmazzák ionizáló és nem ionizáló sugárzások hatásának, gyógyszerek és vegyszerek genotoxicitásának vizsgálatokor, hiszen nukleoprotein komplexként jól modellezik biológiailag fontos kémiai és fotokémiai reakciók támadáspontját, a DNS-t és az azt körülvevő fehérjéket (79). A jelen dolgozatban bemutatott kísérletek során nukleoprotein komplexként T7 bakteriofágot használtunk, ezért szükséges főbb jellemzőinek bemutatása.

Felépítését tekintve a T7 bakteriofág egy kettős szálú DNS-t tartalmazó, ikozaédres szimmetriával rendelkező, peplon nélküli vírus. Gazdasejtként az *Escherichia coli* baktériumot használja. A fágpartikulum tömege 52 MDa, melynek 50%-át fehérje, 50%-át nukleinsav teszi ki. A fágpartikulum natív átmérője hozzávetőlegesen 40-60 nm (79, 99). Szerkezetét és az azt felépítő fehérjéket az 4. ábra szemlélteti vázlatosan.



4. Ábra A T7 bakteriofág felépítése (gp: gene protein).

A DNS konformációja eltér a hagyományos Watson-Crick modelltől, torzult-B konformációban van jelen; összetételét tekintve 39936 bázispárból áll, jól ismert a bázisszekvenciája, a gének elhelyezkedése. Egyenlő arányban található a bázispárok között guanin-citozin és adenin-timin pár (79, 100-102). A vizsgálatok azt mutatják,

hogy a DNS elsősorban a fehérjeburokkal van szoros kapcsolatban, nem pedig a belső maggal (99, 102).

Kötődési vizsgálatok során való felhasználása szempontjából a T7 bakteriofág lényeges tulajdonsága, hogy a kapszid és DNS közti kölcsönhatások 50 °C felett meggyengülnek, további melegítés során pedig a burok jórészt elválik az örökítőanyagtól. A DNS ekkor konvencionális B konformációt vesz fel és hozzáférhetőbbé válik. A kapszid részei azonban továbbra is kapcsolatban maradhatnak a DNS-sel, rendezetlen aggregátum formájában (79, 100, 101). Előnyei közé tartozik, hogy a kevés lehetséges kötőhely egyszerűbbé teszi a fághoz kötődő részecskék megoszlásának követését, viszonylag könnyen tenyészthető és az emberi szervezetre veszélytelen vírus. Optikai tisztaságú preparátumok állíthatók elő belőle, ezért megfelelő választásnak tekinthető spektroszkópiai vizsgálatokhoz (101, 103).

3. Célkitűzések

Munkánk célja kationos porfirinek és peptid konjugátumaik, illetve daunorubicin aminosav konjugátumok kölcsönhatásainak jellemzése annak érdekében, hogy alapot teremtsünk a hatóanyag tervezés további lépései számára. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

3.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumok

1. Kötődnek-e az új származékok izolált DNS-hez és nukleoprotein komplexhez?
2. Mely kötődési formák jellemzőek a kölcsönhatásra?
3. Hogyan befolyásolja a töltések száma, eloszlása illetve a molekula mérete a kötődést?
4. Hogyan változik meg a DNS és a nukleoprotein komplex szerkezete a kölcsönhatás során?
5. Létre jön-e kötődés a kapszidfehérjék és a porfirinek közt?
6. Milyen mértékben jutnak be az új származékok a sejtekbe? A töltés és a molekulaméret hogyan befolyásolja a vegyületek felvételét?
7. A sejten belül hol dúsulnak fel a legnagyobb mértékben?

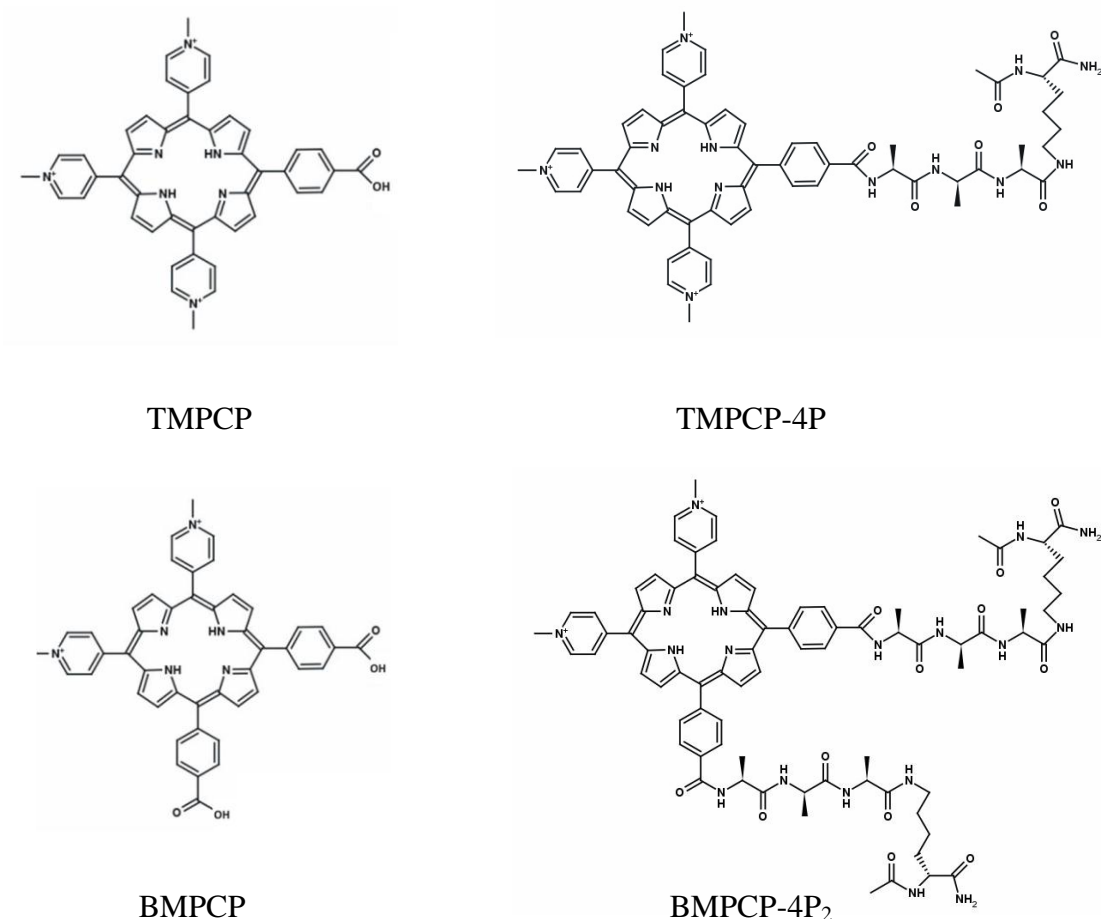
3.2. Daunorubicin aminosav konjugátumok

1. Kötődnek-e az új származékok izolált DNS-hez és nukleoprotein komplexhez?
2. Hogyan befolyásolja a konjugátum szerkezete a kölcsönhatást?
3. Hogyan változik meg a DNS és a nukleoprotein komplex szerkezete a kölcsönhatás során?
4. Létre jön-e kötődés a kapszidfehérjék és a daunorubicin származékok közt?
5. A tervezett daunorubicin-spacer-hordozó peptid rendszerben melyik aminosavat válasszuk a spacer szekvencia kialakításakor?

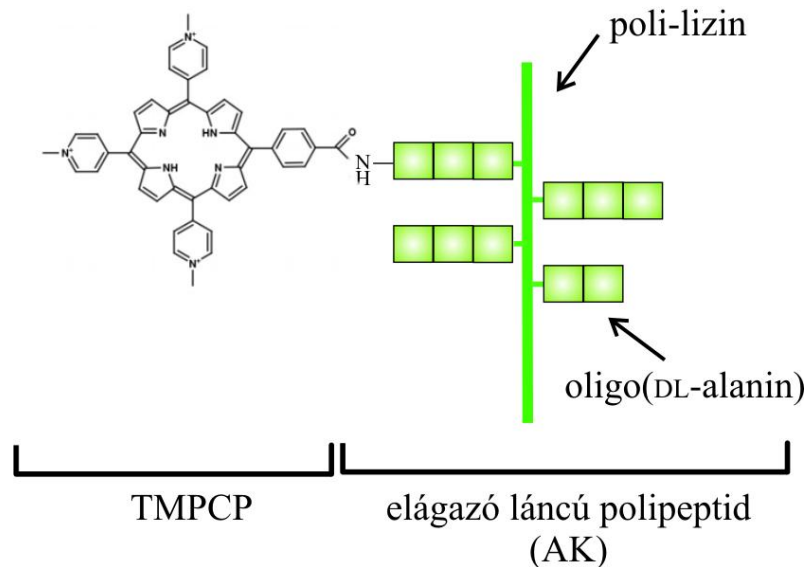
4. Módszerek

4.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik

Méréseinkhez öt vegyületet használtunk: a mezo-tri(4-N-metilpiridil)-mono-(4-karboxifenil)porfirin-t (továbbiakban TMPCP), ennek tetrapeptid konjugátumát (továbbiakban TMPCP-4P) és polipeptid konjugátumát (továbbiakban TMPCP-AK); a mezo-5,10-bisz(4-N-metilpiridil)-15,20-di-(4-karboxifenil)porfirin-t (BMPCP) és tetrapeptid konjugátumát (BMPCP-4P₂). A vegyületek szerkezeti képlete a 5. ábrán, a TMPCP-AK illusztrációja a 6. ábrán látható.



5. Ábra A felhasznált porfirin alapvegyületek (TMPCP, BMPCP) és tetrapeptid konjugátumaik (TMPCP-4P, BMPCP-4P₂).



6. Ábra A TMPCP elágazó láncú polipeptiddel kialakított konjugátumának (TMPCP-AK) szemléltetése.

Lényeges kiemelni, hogy a TMPCP három, míg a BMPCP két pozitív töltéssel bír a metil-piridil csoport kvaterner nitrogénjén. Mint látható, a tetrapeptid konjugátumok esetében olyan oligopeptid kapcsolódik az alapvegyületekhez, mely 3 alanint és egy lizint tartalmaz. A konjugáció a karboxil csoporton keresztül valósul meg, és ennek megfelelően a TMPCP-hez egy, a BMPCP-hez két tetrapeptid kapcsolódik. A BMPCP és a TMPCP beszerzése a Frontier Scientific-től (Carnfort, UK) történt. A porfirineket 4°C-on tároltuk por formájában illetve törzsoldatként desztillált vízben vagy metanolban oldva. A kísérletek előtt a törzsoldatokat 20 mM Tris-HCl és 50 mM NaCl tartalmú, pH=7,4-re beállított puffer oldattal hígítottuk.

4.2. Ac-Lys-(H-Ala-D-Ala-Ala)-NH₂ tetrapeptid szintézise

Az Ac-Lys-(H-Ala-D-Ala-Ala)-NH₂ tetrapeptidek előállítása szilárd fázisú peptid szintézissel történt 4-metilbenzhidrilamin (MBHA) gyantán, standard Boc-stratégiával. A peptidet folyékony hidrogén fluoriddal p-krezol (0,5 mg/10 ml HF) jelenlétében távolítottuk el a gyantáról 0°C-on 1 óra alatt. A termék tisztítását RP-

HPLC-vel végeztük, szerkezetét pedig HPLC és tömegspektrometria (ESI-MS) segítségével ellenőriztük.

4.3 Ac-Lys-(H-Ala-D-Ala-Ala)-NH₂ konjugálása porfirinekhez

A tetrapeptidek konjugálása a porfirinekhez DMF oldatban történt kapcsoló ágens segítségével, amely vagy (1H-benzotriazol-1-iloxi)[trisz(dimetilamino)]foszfonium hexafluorofoszfát (BOP-reagens) volt, vagy pedig 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC). A TMPCP-4P előállításánál BOP reagenssel, a BMPCP-4P₂ esetében EDC-vel értünk el jobb hatásfokot. A konjugátumok tisztítása RP-HPLC-vel, szerkezetük ellenőrzése ESI-MS-sel történt.

Az analitikai RP-HPLC méréseket egy Knauer (H. Knauer, Bad Homburg, Németország) rendszeren Phenomenex Jupiter C18 oszloppal (250 mm× 4.6 mm) végeztük 5 µm szilika (300 Å pórusméret) (Torrance, CA) állófázissal. Lineáris gradiens elúciót alkalmaztunk (0 perc 0% B; 5 perc 0% B; 50 perc 90% B) eluens A (0,1% trifluorecetsav vízben) és eluens B (0.1% trifluorecetsav acetonitril-vízben (80:20, v/v)), áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A csúcsokat λ= 220 nm-en és λ= 280 nm-en detektáltuk a konjugálatlan porfirineknél. A durva termékeket Phenomenex Jupiter C18 oszloppal (250 mm× 10 mm) tisztítottuk 10 µm szilika állófázissal (300 Å pórusméret). Izokratikus elúció 10% eluens B-vel 0-tól 5 percig került alkalmazásra azután 5–50 perc gradiens elúció következett 10–55% eluens B-vel 4 ml/perc áramlási sebességgel. A csúcsokat λ= 220 nm-en detektáltuk.

A tömegspektrometriás vizsgálatot egy Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus (Bréma, Németország) ioncsapdás tömegspektrométerrel végeztük el, folyamatos mintainjektálással 4 µl/perc áramlási sebességgel. A peptidkonjugátumoka 50% acetonitril/víz elegyben oldottuk. A spektrumokat pozitív ion módban az m/z 200–1500 tartományban vettük fel.

4.4. Polipeptid porfirin konjugátum szintézise

A poli[Lys-(DL-Ala)_m], későbbiekben „AK” (A - alanin, K - lizin), elágazó láncú polilizin vázas polipeptid szintézise a következő módon történt: a poli[L-Lys] előállítását az N-karboxi-N-benziloxikarbonil-lizin anhidrid polimerizációjával történt olyan körülmények között, hogy a polimerizáció foka közelítőleg 250 legyen. A védő csoportokat HBr segítségével hasítottuk és DL-alanin oligomereket kapcsoltunk a polilizin lánc ε-aminocsoportjaihoz N-karboxi-DL-alanin anhidrid polimerizációjával. A minták desztillált víz ellenében kerültek dializálásra. A polilizin átlagos polimerizációs fokát és az átlagos moláris tömeget viszkozimetriás mérés alapján számítottuk ki. Az elágazó láncú AK átlagos moláris tömegének becslését a polilizin váz polimerizációs fokának és az oldalláncok aminosav összetételének ismeretében becsültük.

32 mg AK-t oldottunk 500 µl desztillált vízben majd hígítottunk 5 ml DMF-fel. 20,3 mg három pozitív töltéssel rendelkező meso-tri(4-N-metilpiridil)-mono(4-karboxifenil)porfirint és (TMPCP) 44,2 mg BOP reagenst 4,5 ml DMF-ben elegyítettünk. Ez után 34 µl DIEA (*N,N*-diizopropiletilamint) került az oldatba. Az AK-t és a porfirint tartalmazó oldatokat ezek után összeöntöttük és egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük. Ezek után az el nem reagált TMPCP-t és a melléktermékeket dialízis segítségével távolítottuk el majd a termék liofilizálásra került. 29 mg TMPCP-AK-t eredményezett a szintézis. A konjugátum TMPCP tartalmát spektrofotometriásan határoztuk meg a TMPCP-4P moláris extinkciós együtthatóját alkalmazva $\lambda=426$ nm-en ($\epsilon=4,62 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Feltételeztük, hogy az AK oldalláncainak α -amino csoportjaihoz konjugált TMPCP ugyanazzal az extinkciós együtthatóval rendelkezik, mint abban az esetben, ha az Ac-Lys(H-Ala-D-Ala-Ala)-NH₂ tetrapeptid α -amino csoportjához kapcsolódik.

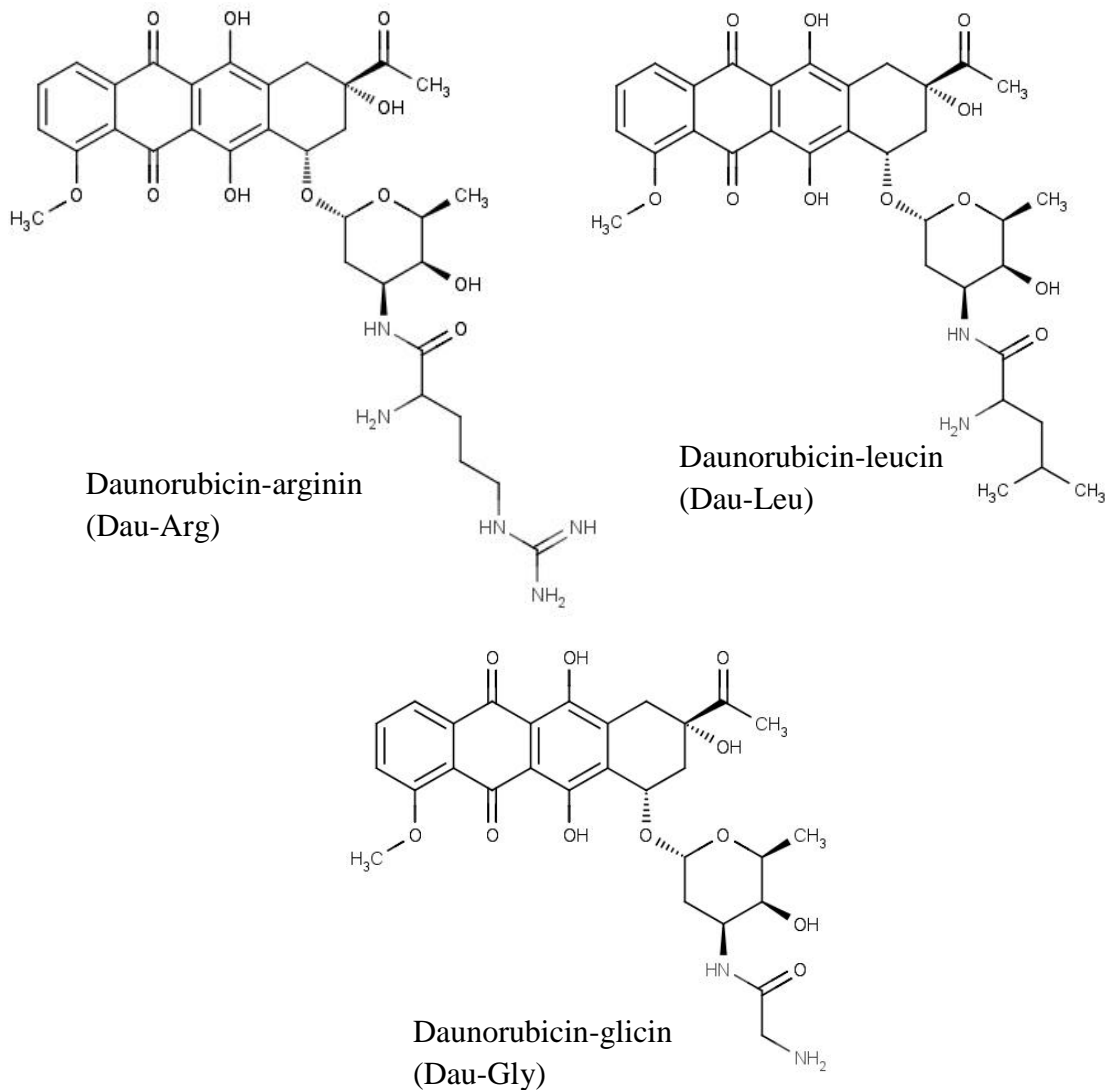
4.5. Daunorubicin aminosav konjugátumok és szintézisük

A daunorubicin-aminosav konjugátumokat az álabbi módon szintetizáltuk: az Fmoc (9-fluorenilmetoxikarbonil) védőcsoporttal ellátott aminosavakat (Fmoc-Leu-OH) (Fmoc-Arg-OH) (Fmoc-Gly-OH) ekvivalens mennyiségű daunorubicinnel reagáltattuk szobahőmérsékleten. Kapcsolószerként arginin és leucin esetében BOP-ot (benzotriazol-1-il-oxi-trisz(dimetilamino)-foszfónium hexafluorofoszfát), glicin-nél PyBOP-ot (benzotriazol-1-il-oxi)-tripirrolidinofoszfónium-hexafluorofoszfát), bázisként DIEA-t (*N,N*-diizopropiletilamint) alkalmaztunk. A reakció oldószere DMF, a koncentráció az aminosav származékra nézve 10 mg/ml volt. Az aminosavak α -aminocsoportját védő Fmoc védőcsoportot 10% piperidin/DMF hasító eleggyel távolítottuk el. Jeges hűtés után 300 μ l TFA, 700 μ l piridin, 2 ml DMF elegyet adtunk hozzá és reakcióelegyet vákuumban bepároltuk.

A nyerstermék RP-HPLC-vel került tisztításra, a frakciókat liofilizáltuk. A hasítás közben létrejött dibenzofulvén-piperidin addukt miatt szükség volt többszöri tisztításra, különböző körülmények között. A terméket ESI-MS-sel azonosítottuk, tisztaságát analitikai RP-HPLC-vel vizsgáltuk. A reakció követését és a reakcióelegy tisztítását Knauer HPLC-vel (H. Knauer, Bad Homburg, Németország) rendszeren Phenomenex Jupiter C18 oszloppal (250 mm \times 4,6 mm) végeztük 10 μ m szilika állófázissal (100 Å pórusméret). Lineáris gradiens elúciót alkalmaztunk (0 perc 30% B; 5 perc 30% B; 60 perc 90% B) eluens A (0,1% trifluorecetsav vízben) és eluens B (0,1% trifluorecetsav acetonitril-vízben (80:20, v/v)), áramlási sebesség 4 ml/perc volt. A csúcsokat $\lambda = 280$ nm-en detektáltuk.

A tömegspektrometriás mérések elektropray ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus típusú készülékkel történtek. A vegyületeket 50% acetonitril-víz elegyében oldottuk fel. Folyamatos mintaadagolás mellett (sebesség 240 μ l/h) 50-2000 m/z tartományban, pozitív üzemmódban vettük fel a spektrumokat.

A 7. ábrán látható a három új aminosav konjugátum szerkezeti képlete.



7. *Ábra* A vizsgált daunorubicin aminosav konjugátumok (Dau-Arg, Dau-Leu, Dau-Gly) szerkezeti képlete

4.6. A T7 bakteriofág

Tenyésztése és tisztítása laboratóriumunkban a Strauss és Sinsheimer által leírt módszer szerint történt (104). A fág-szuspenziót CsCl gradiensen töményítettük és 20 mM Tris-HCl és 50 mM NaCl (pH=7,4) puffer oldattal szemben dializáltuk. A bakteriofág koncentrációját az oldatok optikai denzitásából, az $\epsilon_{260}=7,3 \cdot 10^3$ (mol nukleotid bázis \cdot l⁻¹ \cdot cm⁻¹) moláris extinkciós koefficiens

használva határoztuk meg. Vizsgálataink során felhasználtuk a 65°C-on hőkezelt T7 bakteriofágot is, ugyanis ebben a fehérjeburok meglazulásával a DNS jobban hozzáférhetővé válik, és átmeneti rendszer jön létre az izolált DNS és a natív bakteriofág között.

4.7. T7 bakteriofág DNS izolálása

A DNS elválasztása a bakteriofág fehérjekomponenseitől a következő módon történt: a fág tartalmú oldatot 30 percig inkubáltuk 0,5% nátrium-dodecil-szulfáttal 65°C-on, majd 1M KCl oldattal történt a csapadékképzés 10 percig, jeges hűtés alkalmazása közben. Ezt követte a kétszeri 10 perces centrifugálás Eppendorf centrifugával 13000 rpm fordulatszámon. A DNS kicsapása etanollal történt a felülúszóból, végül a bakteriofág szuszpenziót pH=7,4-es tris-(hidroximetil)-aminometán puffer oldattal készítettük el (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl). A DNS mennyiségét abszorpciós spektrofotometria segítségével állapítottuk meg $\lambda=260$ nm-en, a minőségi ellenőrzést gélelektroforézis és a spektrum vizsgálata alapján végeztük el.

4.8. Abszorpciós spektroszkópia

A vizsgált vegyületek spektrumát szobahőmérsékleten Tris-HCl pufferben (pH=7,4) vettük fel Cary 4E (Varian, Mulgrave, Australia) spektrofotométerrel 1 nm-es lépésközzel, 2 nm-es sávszélességgel $\lambda=200-750$ nm tartományban, állandó hatóanyag és változó nukleinsav koncentráció mellett. A porfirinek koncentrációja a mérések során $c=1 \mu\text{M}$, a daunorubicinéké $c=10 \mu\text{M}$ volt. Az oldatok összetételét a bázispárok és a porfirin koncentrációjának molarányával fejeztük ki, az arányszám a következőkben az „r” jelölést kapja (I. képlet):

$$r = \frac{[\text{bázispár}]}{[\text{porfirin}]} \quad \text{I.}$$

A daunorubicines méréseknél pedig az alábbi aránnyal dolgoztunk (II. képlet):

$$bp/Dau = \frac{[bázispár]}{[daunorubicin]} \quad \text{II.}$$

Abszorpciós spektrumok felbontása porfirinek esetében:

Ellenőriztük, hogy az alkalmazott koncentrációban a porfirin vegyületek monomer formában vannak jelen, ugyanis az abszorbancia a koncentrációval egyenes arányban növekedett a kérdéses tartományban. Megemlítendő, hogy a porfirinek képesek adszorbeálódni a kuvetta falára, ami módosíthatja a kapott eredményeket. Ellenőrző kísérleteink azt mutatták, hogy 30 perces vizsgálati időtartamon belül maradv a adszorpcióból fakadó veszteség kevesebb, mint 5%. Ez a spektrumok értékelhetősége szempontjából elhanyagolhatónak tekinthető.

A spektrumfelbontást a Microcal Origin program segítségével végeztük el. Alapvető cél volt, hogy a lehető legkevesebb számú komponenst használjuk fel az illesztéshez, ezért csak egy viszonylag szűk hullámhossz tartományt ($\lambda=370-490$ nm) elemeztünk.

Az illesztés hibáját az alábbiak szerint számítottuk (III. képlet):

$$\chi^2 = \frac{\sum_{\lambda=370}^{490} [A(\lambda)_{mért} - A(\lambda)_{számított}]^2}{\sum_{\lambda=370}^{490} A(\lambda)_{mért}} \quad \text{III.}$$

Ennek értéke egyik esetben sem volt több 0,5 nm-nél.

Az illesztett Gauss-komponensek az alábbi függvénnyel írhatók le (IV. képlet):

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{w_i \sqrt{\pi/2}} \exp\left(\frac{-2(\lambda - \lambda_i)^2}{w_i^2}\right) + y_0 \quad \text{IV.}$$

Az egyes állapotokat jellemző Gauss-komponenseket az egyenletből következően az alábbi paraméterekkel jellemeztük: a függvények maximumhelyeivel (λ_i), a szélességükkel (w_i), valamint a görbe alatti területekkel (A_i). y_0 az alapvonalat jelöli. Úgy találtuk, hogy az egyetlen paraméter, mely megváltozik az adott porfirin

populáció mennyiségének változásával a görbe alatti terület, a többi paraméter konstansnak vehető.

4.9. Fluoreszcencia spektroszkópia

A gerjesztési és emissziós spektrumokat Fluorolog 4 (Jobin Yvon, France) spektrofluoriméter segítségével mértük ki $c=1 \mu\text{M}$ porfirin illetve $c=10 \mu\text{M}$ daunorubicin és változó DNS vagy fág koncentrációknál Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$). Az emissziós spektrumok felvételénél a gerjesztést az egyes származékok abszorpciós maximumának megfelelő hullámhosszúságú fényvel végeztük ($\lambda=423 \text{ nm}$ porfirineknél és $\lambda=480 \text{ nm}$ daunorubicineknél). Az emisszió detektálásának tartománya $\lambda=600-800 \text{ nm}$ (porfirin) és $\lambda=495-800 \text{ nm}$ (daunorubicin).

A daunorubicin-származékok kötődési állandóit az emissziós spektrumok alapján számítottuk a „neighbour exclusion model” szerint (13, 82). Ehhez az integrált fluoreszcencia intenzitások arányát használtuk DNS jelenléte nélkül (I_0) és DNS jelenlétében (I) mérve. Az alábbi egyenlet (V. képlet) felhasználásával számítottuk ki a kötött daunorubicin mennyiségét:

$$c_{szabad} = c_{teljes} (I/I_0 - P)/(1 - P) \quad \text{V.}$$

ahol c_{teljes} a kiindulási Dau koncentráció, $P = I_\infty/I_0$ pedig a legnagyobb DNS mennyiségnél (I_∞) és szabad Dau-val (I_0) mért intenzitások aránya.

A kötött daunorubicin mennyiségét a kiindulási érték és a szabad formára kapott érték különbségeként kaptuk meg.

A kötődési állandó számításához az alábbi (VI.) képletet használtuk:

$$\frac{r}{c_{szabad}} = K (1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - r(n - 1)} \right]^{n-1} \quad \text{VI.}$$

ahol r a kötött daunorubicin és a bázispárok molaránya, n a kizárási paraméter bázispárban mérve és K a kötődési állandó. A DNS koncentrációt a $\lambda=260 \text{ nm}$ -en mért fényelnyelés alapján számítottuk.

Porfirinek esetében a fluoreszcencia energia transzfer mérése során a gerjesztést $\lambda=260$ nm-en, a DNS abszorpciós maximumának megfelelő hullámhosszon végeztük, az emisszió detektálásának tartománya pedig $\lambda=525-800$ nm volt, növekvő bázispár/porfirin molarány mellett. A porfirin koncentráció $c=1$ μM , oldószer: Tris-HCl (pH=7,4). Mivel a porfirinek szabad formájukban is mutatnak fluoreszcencia emissziót a $\lambda=260$ nm-es gerjesztésnél, ezért a kötött formára vonatkozó intenzitást a korrekció elvégzése után kaptuk meg. Ehhez a porfirin DNS-mentes oldataról készült spektrumot integráltuk és ezt az értéket levontuk a nukleinsav jelenlétében mért spektrumokból.

4.10. Fluoreszcencia élettartam

Porfirinek esetében az egyes kötött formák további azonosítására fluoreszcencia élettartam mérések is történtek, amelyeket az ISS Chronos BH spektrofluorométerrel végeztük. A fluoreszcencia jelek $\lambda=550$ nm fölött kerültek detektálásra Tris-HCl (pH=7,4) pufferben, az egyes származékok abszorpciós maximumának megfelelő hullámhosszúságú fényvel való gerjesztés mellett. Az izolált DNS-sel végzett mérések egységesen $r=6$ bázispár/porfirin aránynál készültek, a porfirinek koncentrációja $c=2$ μM volt. Az intenzitás csökkenésének adatait az ISS kiértékelő számítógépes programja segítségével függvényillesztéssel elemeztük. Az élettartamok megállapítása a szabad porfirin, az izolált DNS-porfirin, és a bakteriofág-porfirin rendszerekben egyaránt megtörtént, az oldatok koncentrációját a telítési értékeknek megfelelően állítottuk be.

4.11. Cirkuláris dikroizmus

A cirkuláris dikroizmus (CD) méréseket Jasco-810 dikrográffal végeztük szobahőmérsékleten Tris-HCl pufferoldatban (pH=7,4), 1 cm optikai úthosszúságú kvarc küvettát alkalmazva. A porfirin indukált CD jeleinek mérésekor a

spektrumokat $\lambda=380-500$ nm között vettük fel, állandó porfirin ($c=1 \mu\text{M}$) és növekvő DNS és fág koncentrációk mellett.

A kölcsönhatás következtében kialakuló DNS és nukleoprotein komplex szerkezet változások követésére a spektrumokat állandó DNS vagy fág és változó porfirin koncentrációk mellett regisztráltuk 200 és 500 nm között. A DNS és a fág bázispárra vonatkoztatott koncentrációja $c=250 \mu\text{M}$ volt. A koncentrációarányokat porfirin/bázispár ($1/r$) (VII. képlet), illetve daunorubicin/bázispár (Dau/bp) (VIII. képlet) molarányokban fejeztük ki:

$$1/r = \frac{[\text{porfirin}]}{[\text{bázispár}]} \quad \text{VII.}$$

$$Dau/bp = \frac{[\text{daunorubicin}]}{[\text{bázispár}]} \quad \text{VIII.}$$

Alapvonalként az oldószer referencia spektrumát használtuk, amely a mérés közben automatikusan levonásra került a minták spektrumából.

4.12. Abszorpciós és cirkuláris dikroizmus olvadási görbék

Az optikai olvadási (melting) mérések Cary 4E spektrofotométerrel, illetve Jasco-810 dikrográffal készültek, egy Peltier hőmérséklet-szabályozó használatával. A T7 bakteriofágot tartalmazó minták koncentrációja bázispárban kifejezve $c=50 \mu\text{M}$, a fűtés sebessége pedig $0,5^\circ\text{C}/\text{perc}$ volt. Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$) mérve. A kísérletek a $25-98^\circ\text{C}$ hőmérséklet tartományban történtek. Abszorpciós melting esetében $\lambda=260$ nm-en mértük az abszorbancia változását, CD melting esetében $\lambda=220$ és 283 nm-en. Párhuzamosan öt minta mérésére került sor, referenciaként pedig az üres puffer oldatban mért adatokat használtuk. A minták hőmérséklet-ingadozását adekvát szigeteléssel küszöböltük ki. A görbék kiértékelése a Microcal Origin programmal történt, melynek segítségével derivált melting görbék állítottunk elő. A kapott görbéket először szobahőmérsékletre normalizáltuk, majd elvégeztük a differenciálást. A derivált melting görbe csúcsához tartozó adatot tekintettük a fázisátalakulás hőmérsékletének.

4.13. Porfirin származékok bezárása liposzómákba

Kis unilamelláris vezikulumokat (SUV) készítettünk L- α -dipalmitoil-foszfátidilkolinból (DPPC). A DPPC klorformos törzsoldatát filmrétegre szárítottuk rotációs szárító-berendezéssel. A lipideket foszfátpufferrel hidratáltuk. A szonikációt MSE Ultrasonic Desintegrator segítségével végeztük, a frekvencia 20 kHz, a hullám amplitúdó 8 μm , a teljesítmény 150 W volt. Tiszta oldatokat 15-20 perc alatt kaptunk. A liposzómák átlagos átmérője 80 nm volt a dinamikus fényszórásmérés alapján. A foszfolipid koncentráció a törzsoldatban $c=1,5$ mM volt.

A porfirin-származékokat $c=0,1$ μM -os koncentrációban inkubáltuk a DPPC liposzómákkal foszfát pufferben ($\text{pH}=7,4$). A foszfolipid koncentrációt úgy változtattuk, hogy megfelelő legyen a porfirin teljes bezáródásához. Ha a hatóanyaghoz képest magas a foszfolipidek koncentrációja, akkor feltételezhető, hogy a vezikulumok betöltöttségi állapota nincs ráhatással a további molekulákkal való kölcsönhatásra. Ilyen módon a rendszer leírható úgy, hogy csak a hatóanyagra és annak környezetére összpontosítunk (105).

Ezen megfontolások figyelembe vételével az asszociációs egyensúlyi állandó (K_L) a következő módon definiálható:

$$K_L = \frac{[P_b]}{[P_{sz}][DPPC]} \quad \text{IX.}$$

ahol P_b és P_{sz} a bezárt és a szabad porfirint jelentik. Az alkalmazott koncentráció tartományban feltételezhető, hogy mindkét forma által emittált fluoreszcencia intenzitás egyenesen arányos a koncentrációval (106). Egy adott porfirin koncentráció mellett az asszociációs állandó megállapítható a fluoreszcencia intenzitás segítségével az alábbi módon:

$$I = I_0 + (I_\infty - I_0) \frac{K_L [DPPC]}{1 + K_L [DPPC]} \quad \text{X.}$$

ahol I_0 és I_∞ a nem liposzómában lévő és a teljesen bezárt porfirinhez tartozó fluoreszcencia intenzitások.

4.14. Sejtkultúrák az in vitro vizsgálatokhoz

Az in vitro sejtfelvételi vizsgálatokhoz kétféle sejtípust, a HL-60-at (107) és HT-29-et (108) választottuk ki. A HL-60-at, mely egy humán akut promyelocytás leukémia sejt vonal 10% hő által inaktivált FCS, L-glutaminnal (2 mM) és gentamicinnel (160 µg/ml) kiegészített Iscove Modified Dulbecco Mediumban tartottuk. A HT-29 humán vastagbél adenocarcinoma sejteket 10% FCS, L-glutamin és gentamicin elegyével kiegészített RPMI-1640-ben tenyésztjük. A sejteket műanyag sejttenyésztő edényekben tartottuk 37°C-on 5% CO₂/95% levegő keverékben.

4.15. Áramlási citometria

Az in vitro sejtfelvételi vizsgálatokat áramlási citométer (BD LSR II, BD Biosciences, USA) segítségével végeztük HL-60-as sejtekkel. A sejtek a növekedés logaritmikus fázisában kerültek begyűjtésre majd egy 24 lyukkal rendelkező szövetkultúra-lemezre helyeztük őket 105 sejt/1 ml médium arányban üregeként, egy nappal a mérések előtt. A vizsgálandó vegyületeket szérumentes RPMI-1640 médiumban oldottuk fel és a további hígítások során is ezt a médiumot alkalmaztuk. A sejteket 2,5-20 µM koncentráció tartományban kezeltük a hatóanyagokkal, az inkubációs idők fél órától 5 óráig terjedtek. Kontrollként az előbbiekkal azonos módon, de hatóanyag nélküli médiummal kezelt sejteket használtunk. Az inkubációs idő letelte után a kezelő oldatokat eltávolítottuk majd a sejteket kétszer mostuk szérumentes médiummal (109-111). A mosási lépéseket követően 100 µl 1 mM-os tripszinoldatot juttattunk a sejtekre. A tripszin hatását 10% FCS-t tartalmazó 900 µl Hepes pufferrel állítottuk le (HPMI; 100 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,4 mM MgCl₂, 0,04 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 20 mM glükóz, 24 mM NaHCO₃ és 5 mM Na₂HPO₄ pH=7,4-en) (112). A sejteket citometriás csövekbe helyeztük át és centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc, 4°C) majd a felülúszót eltávolítottuk. Ezt követően a sejteket 500 µl HPMI-ben szuszpendáltuk és az áramlási citométer segítségével meghatároztuk az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást. A kontroll sejtek autofluoreszcenciájához

képeket mért relatív fluoreszcencia intenzitás került mérésre, és ennek alapján történt a fluoreszcenciát mutató sejtek számlálása. A gerjesztéshez $\lambda=488$ nm-en emittáló lézert használtunk és a fluoreszcencia intenzitást $\lambda=670-735$ nm között detektáltuk. Az adatokat a FACSDiVa 5.0 szoftver segítségével értékeltük ki. Minden mérést ellenőrzés céljából megismételtünk.

4.16. Konfokális mikroszkópia

A porfirin származékok sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM-710, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Németország) vizsgáltuk annak 63-szoros nagyítású olaj immerziós objektívjét alkalmazva. A HT-29 sejteket Lab-Tek II 8 üregű lemezekre helyeztük 30 000 sejt/üreg arányban 24 órával a mérés kezdete előtt. A felvételek elkészítése előtt a sejteket 3 órán keresztül inkubáltuk a porfirinszármazékokat $c=20$ μ M koncentrációban tartalmazó RPMI médiummal. A kolokalizációs vizsgálatokhoz a Molecular Probes-tól (Eugene, Orgeon, USA) beszerzett sejtorganellum specifikus fluoreszcens festékeket használtunk. A DNS megjelölésére a nukleinsavakhoz kötődő SYBR Green I-et alkalmaztuk $c=400$ nM-os inkubációs koncentrációban, a lizozómákat a Lyso Tracker Green DND-26-tal festettük $c=50$ nM-os oldat segítségével, míg a mitokondriumokat $c=50$ nM MitoTracker Deep Red FM használatával azonosítottuk. A festékeket RPMI médiummal hígítottuk a kívánt koncentráció eléréséig, figyelembe véve a sejteken található inkubáló médium további hígító hatását, és a porfirinekkal egy időben kezeltük a sejteket, azonban az inkubáció ideje a festékekkel 30 perc volt. A sejteket RPMI médiummal kétszer mostuk majd azonnal elkészítettük a konfokális mikroszkópos felvételeket.

Az 1. táblázatban a vizsgált anyagok és festékek gerjesztésére használt lézerek és a detektálás hullámhosszai láthatók.

1. Táblázat A konfokális mikroszkópiás mérések során vizsgált anyagok gerjesztésére és fluoreszcencia emissziójuk detektálására használt hullámhosszak.

kromofór	gerjesztés (nm)	detektálás (nm)
porfirin	488	650-750
SYBR Green	488	520
Lyso Tracker Green	488	510
Mito Tracker Deep Red	633	665

Kontroll mintaként az egyes festékekkel külön illetve festék mentes médiummal kezelt sejteket használtunk. A mikroszkópos felvételeket az ImageJ szoftver segítségével dolgoztuk fel.

5. Eredmények

5.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik

5.1.1. Szintézis

Az Ac-Lys(H-Ala-D-Ala-Ala)-NH₂ elágazó tetrapeptidet - mely a poli[Lys(DL-Ala_m)] (AK) polipeptid egy alkotóelemének tekinthető – szilárd fázisú fehérjeszintézissel állítottuk elő MBHA gyantán 84 %-os kitermeléssel. A tetrapeptid N-terminális végén található α -amino csoportot a porfirin származékok karboxil csoportjához konjugáltuk. Két kapcsolási eljárást alkalmaztunk különböző reagensekkel. A BOP reagens használata viszonylag jó eredménnyel járt TMPCP esetében (53%-os kitermelés), míg a BMPCP esetében több melléktermék is létrejött a konjugáció során. A BOP reagens lecserélése vízben oldódó karbodiimid EDC reagensre jelentősen javított ezen a problémán és így sikerült 47%-os kitermeléssel előállítani a BMPCP konjugátumát, ez a módszer viszont a TMPCP esetében nem fokozta a hatékonyságot. Elmondható tehát, hogy BOP alkalmazása előnyösebb a TMPCP esetében, míg a BMPCP-4P₂ szintézise során az EDC ajánlott. Az elkészült vegyületeket fordított fázisú HPLC-vel és tömegspektrometriával (ESI-MS) jellemeztük. A 2. táblázat foglalja össze a mérések adatait.

2. Táblázat A tetrapeptid, a porfirin alapvegyületek és tetrapeptid konjugátumaik HPLC retenciósi ideje, számított és mért molekulatömege (M_w). A mérések RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel történtek.

vegyület	RP-HPLC retenciósi idő (perc)	M_w (számított)	M_w (mért)
Ac-Lys(Ala-D-Ala-Ala)-NH ₂	12,8	400,5	400,4
BMPCP	29,2	734,8	734,8
BMPCP-4P ₂	24,2	1499,8	1500,0
TMPCP	29,8	706,8	706,8
TMPCP-4P	28,3	1089,3	1089,3

TMPCP konjugálását az AK polipeptidhez a karbodiimid eljárás segítségével végeztük, a TMPCP karboxil csoportja és az AK oldalláncainak α -amino csoportjai közt hoztunk létre amidkötést. Viszkózimetriás mérések alapján a polilizin lánc átlagos polimerizációs foka 250 volt. Az aminosav analízis alapján a polimer Ala/Lys aránya 2,7 ($M_{\text{Ala}}/M_{\text{Lys}}$). A monomer egység [Lys-(DL-Ala_{2,7})] átlagos tömege 320 Da. Az átlagos porfirin/ monomer szubsztitúciós arány ($M_{\text{TMPCP}}/M_{\text{monomer}}$ %) 17,8%.

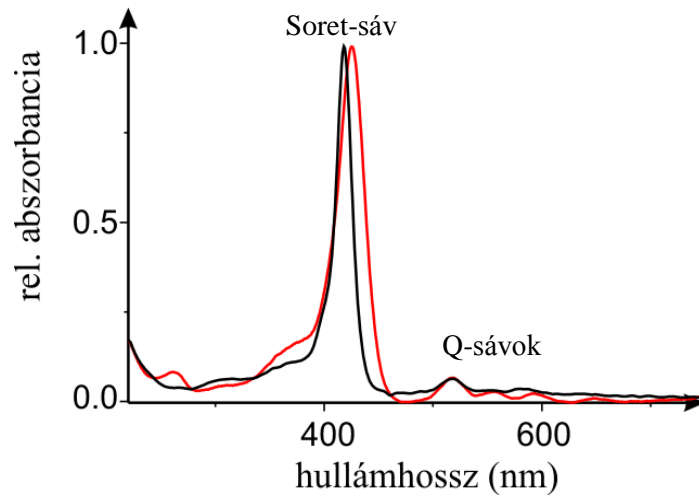
5.1.2. Spektroszkópiai tulajdonságok

A kötődési vizsgálatok előtt szükséges volt az új vegyületek jellemzése. Vizsgálatunk során többféle optikai spektroszkópia módszer segítségével jellemeztük az új porfirin származékok kölcsönhatásait. Méréseink gerincét az abszorpciós spektrometria képezte, amelyet kiegészítettünk abszorpciós olvadási görbék felvételével, és - amennyiben az mélyebb megértési lehetőségekkel kecsegtetett - lumineszcencia spektrometriás alkalmazásokkal és cirkuláris dikroizmus mérésével.

A porfirinek fényelnyelése a látható tartomány jelentős hányadában ($\lambda=660$ nm-ig) és az ultraibolya egy részében is mérhető. A spektrum alakját a következőkkel jellemezhetjük: a $\lambda=400-450$ nm-es tartományban található abszorpciós maximum sávjával, amelyet az irodalom Soret-sávként említ, és az ettől vörös irányban található Q-sávokkal, amelyek fémmentes porfirineknél négy csúcsból állnak. A jelen munka során vizsgált porfirin származékok a piridil-csoportok jelenléte következtében a DNS-bázisokra jellemző $\lambda=250-260$ nm-es tartományban is rendelkeznek szerényebb mértékű abszorpcióval.

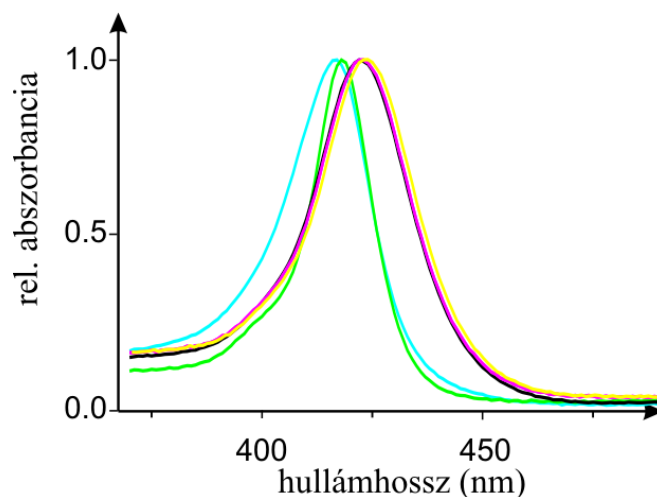
Az elnyelési színkép a négy orbitál modell segítségével értelmezhető. Ezen leírás szerint a Soret- és Q-sávok $\pi-\pi^*$ átmenetektől származnak, a két legmagasabb betöltött (HOMO = highest occupied molecular orbitals) és a két legalacsonyabb betöltetlen (LUMO = lowest unoccupied molecular orbital) nívó közötti elektron-átmenetnek feleltethetők meg (113). Az általunk használt származékok abszorpciós spektrumát metanolban és pH=7,4-es Tris-HCl pufferben is felvettük.

Szemléltetésként a TMPCP spektrumai láthatók a két különböző oldószerben a 8. ábrán.



8. *Ábra* TMPCP normalizált abszorpciós spektruma metanolban (piros) és Tris-HCl pufferben (pH=7,4) (fekete)

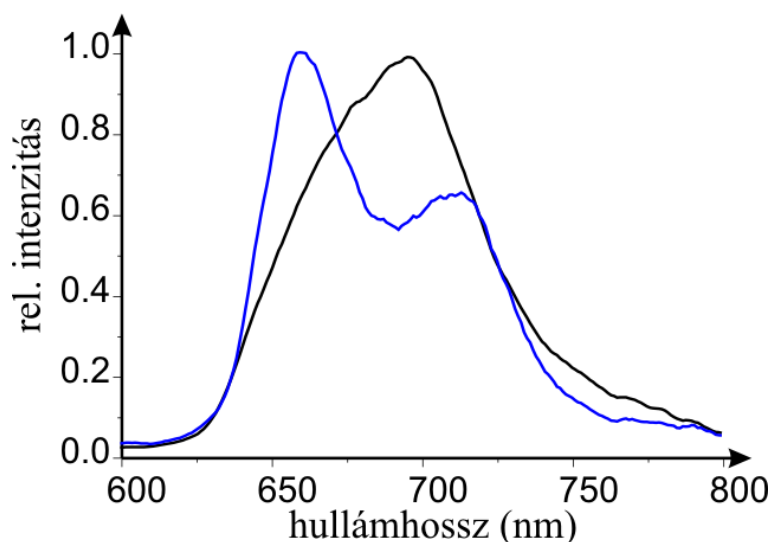
A felvett spektrumok mindkét oldószerben a monomer formában jelenlévő porfirinek jellemzőit mutatja. $\lambda=400$ nm körül intenzív Soret-sávot láthatunk majd ettől magasabb hullámhosszakon a Q_x és Q_y sávokat, $\lambda=500-700$ nm között pedig ezek vibrációs komponenseit. 10 μ M-ig a Soret-sáv kiszélesedése nem volt tapasztalható. A kétszeresen, illetve háromszorosan pozitív töltésű származékok spektrumai igen hasonlóak egymáshoz, a négy lehetséges Q-sáv közül csak kettő figyelhető meg. A 9. ábrán az alapvegyületek és konjugátumaik Soret-sávjának összevetése látható.



9. *Ábra* A normalizált Soret-sávok összehasonlítása Tris-HCl pufferben (pH=7,4): TMPCP (fekete); TMPCP-4P (bíbor); TMPCP-AK (sárga); BMPCP (kék); BMPCP-4P₂ (zöld)

Megfigyelhető, hogy a TMPCP spektruma nem változik számottevő módon a konjugáció hatására, míg a BMPCP Soret-sávjának szélessége lecsökken. A Q-sávok struktúrájában egyik esetben sem következett be változás. Az új származékok más mezo-szubsztituált porfirinekhez hasonló abszorpciós tulajdonságokkal rendelkeznek, míg a hematorfirinektől némileg nagyobb intenzitású jeleket adnak (114-116).

A fluoreszcencia emissziós spektrumok vizsgálata szintúgy ajánlatos lehet porfirinek kötődésének elemzése során. A 10. ábrán a TMPCP-4P emissziós spektrumait láthatjuk Tris-HCl puffer oldatban, illetve metanolban. A minta gerjesztése a Soret-sáv maximumának megfelelő hullámhosszon történt.



10. Ábra TMPCP-4P ($c=1 \mu\text{M}$) normalizált fluoreszcencia emissziós spektruma metanolban (kék), Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$) (fekete). Gerjesztés: $\lambda=423 \text{ nm}$.

Látható, hogy a vizes oldatban az új származék spektruma egy széles és strukturálatlan sávból áll, melynek maximuma $\lambda=695\text{-}700 \text{ nm}$ közé esik. A többi származék is hasonló színekkel rendelkezett. A jel alakja megfelel az irodalomban korábban közölt kationos porfirinek színeképeinek. Szerves oldószerben a spektrum megváltozik és egy kétsávós szerkezet jelenik meg a $\lambda=600\text{-}800 \text{ nm}$ -ig terjedő tartományban (81).

Amennyiben DNS koozadására is változások látszanak az emissziós spektrumokban, az felveti annak lehetőségét, hogy részletesebb információkat szolgáltató fluoreszcens vizsgálati módszereket is bevethessük a mérések során. Ezek

közé tartozik a fluoreszcencia élettartam és az energia transzfer mérése is, melyek segíthetnek a kötési formák tisztázásában.

A lumineszcencián alapuló módszerek után meg kell említenünk még a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiát is. A polipeptid konjugátumot leszámítva a többi négy vegyület önmagában nem rendelkezik CD spektrummal.

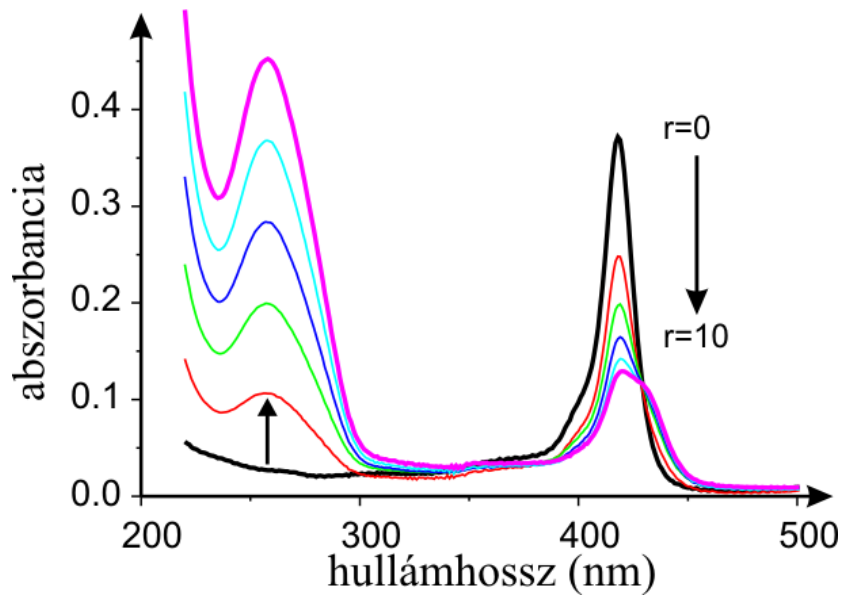
Az említett módszerek közül célszerű minél többet bevetni az egyes származékok polinukleotidhoz való kötődésének vizsgálatánál, hiszen a különböző módszerek eredményei jól kiegészítik egymást, így jellemezhető lesz az új származékok örökítő anyaggal való kölcsönhatása anélkül, hogy kilépnénk az optikai spektroszkópiás módszerek területéről. Természetesen az, hogy mely vizsgálati módszerek használhatók sikeresen, erősen függ a kölcsönhatásban részt vevő molekulák szerkezetétől, a rendszer komplexitásától.

5.1.3. Kötődés izolált DNS-hez

A BMPCP, BMPCP-4P₂, TMPCP és TMPCP-4P izolált DNS-hez való kötődésének vizsgálatát tudományos diákköri és szakdolgozati munkám során bemutattam (117). Az új eredmények értelmezéséhez és megfelelő kontextusba helyezéséhez azonban elengedhetetlen ezen eredmények tárgyalása a doktori dolgozatban is.

5.1.3.1. Abszorpciós spektroszkópia – TMPCP, TMPCP-4P, BMPCP, BMPCP-4P₂

Amennyiben nukleinsavat adunk katinos porfirinek oldatához, majd fokozatosan növeljük annak mennyiségét, batokróom (vörös irányú) eltolódás és hipokróom (csökkenő elnyelésű) effektus tapasztalható a Soret-régióban, melyhez a Q-sávok struktúrájának változása is társul. Ezek az átalakulások a kötődés létrejöttéről tanúskodnak. A kötődési folyamat egy bizonyos DNS koncentrációnál megáll, tehát telítési érték érhető el (11, 83, 118). Szemléltetésként a 11. ábrán a TMPCP-4P abszorpciós spektruma látható $c=1 \mu\text{M}$ porfirin és növekvő DNS koncentráció mellett. $\lambda=370\text{-}490$ nm között megfigyelhető a Soret-sáv változása, $\lambda=260$ nm-es maximummal pedig a DNS abszorpciós sávja.



11. Ábra BMPCP-4P₂ abszorpciós spektruma növekvő bázispár/porfirin arány mellett. $c=1 \mu\text{M}$ BMPCP-4P₂ önmagában (fekete); különböző kötőhely koncentrációknál (pirostól bíborig $r=1-10$) Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$).

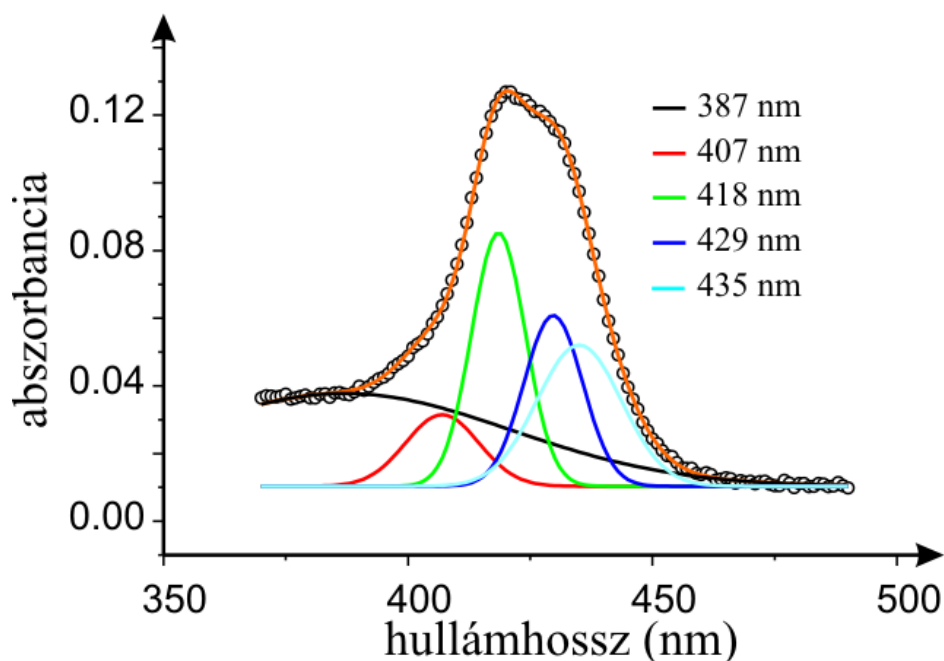
Részletesebb információ is nyerhető az abszorpciós spektrumokból a kutatócsoportunk által korábban kidolgozott, a Soret-sáv komponens spektrumokra történő felbontását alkalmazó matematikai módszer segítségével (11). A módszert az elmúlt évtizedekben leggyakrabban vizsgált, négyszeresen pozitív töltésű tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirin (TMPyP) DNS-hez való kötődésének elemzésére dolgozták ki. A Soret-sáv Gauss komponensekkel történő illesztése során abból a feltevésből indultak ki, hogy a porfirint és DNS-t tartalmazó oldatban a porfirin abszorpciós spektruma három porfirin populáció jeleiből áll: a szabad állapot és a kétféle kötött forma (interkaláció és külső kötődés) elnyelési színekéből. Az irodalomból ismert adatok alapján a szabad porfirin Soret-sáv maximumához képest történő, hozzávetőleg 5 nm-es batokróom eltolódás a külső kötődést jelöli, míg a nagyobb, 10-20 nm-es eltolódás az interkalációhoz rendelhető. (7, 11, 84).

Jelen munka során nem tételeztünk fel rögzített mennyiségű komponens spektrumot, a spektrumfelbontást csak annak figyelembevételével végeztük, hogy a legkevesebb számú komponenssel érjünk el megfelelő illesztést. Minden esetben a

$\lambda=370-490$ nm között található tartományt elemeztük. Ennek oka, hogy a tetra- illetve polipeptid konjugátumok a korábbi TMPyP/DNS rendszerhez képest nehezebben értelmezhető kölcsönhatásokat hozhatnak létre.

A TMPCP, BMPCP és tetrapeptid konjugátumaik DNS jelenléte nélkül felvett abszorpciós spektrumát három Gauss-komponenssel illesztettük meg, melyek közül az egyik függvény paraméterei (λ_k és w_k) hasonlóan adódtak mindegyik vegyület esetében, míg a másik kettő (λ_{1-2} és w_{1-2}) a kémiai szerkezet függvényében különbözött egymástól. A közös komponens ($\lambda_k=387$ nm) állandó háttérnek tekinthető, a változásokról hasznos információt nem szolgáltat, így az átláthatóság kedvéért a továbbiak csak a 12. ábrán szerepeltetjük. Polinukleotid hozzáadása után rögzített spektrumok ugyanakkor további két görbét tettek szükségessé a kielégítő pontosságú illesztés érdekében (λ_{3-4} és w_{3-4}).

A Soret-sáv felbontását komponens görbékre a 12. ábra mutatja be BMPCP-4P₂ estében.



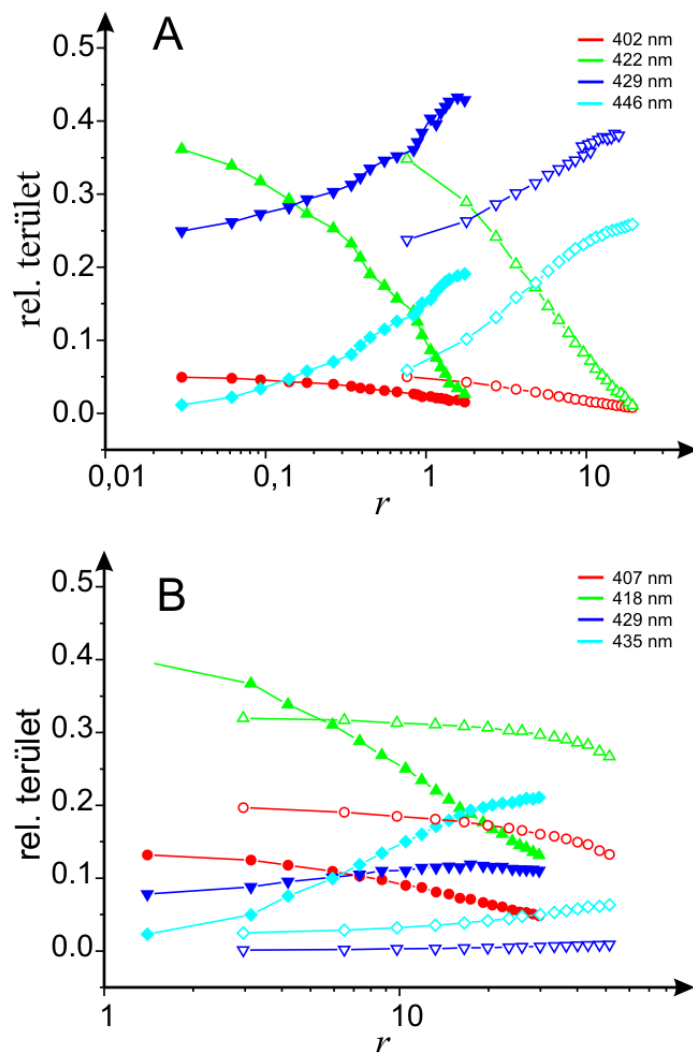
12. Ábra BMPCP-4P₂ abszorpciós spektrumának felbontása a Soret-régióban izolált DNS jelenlétében $r=10$ molaránynál. A komponenseket a csúcsuknak megfelelő hullámhosszal jelöljük. A narancssárga vonal a komponensek összegét mutatja.

A komponens függvények számának növekedése, és a spektrum alakjának általános megváltozása egyértelműen alátámasztotta feltételezésünket, hogy a kötődés létrejön az új porfirinek és DNS között, és a szabad porfirin molekulák csoportjától különböző, kötődést kialakító populációk jönnek létre. A továbbiakban rögzítettük az öt komponens maximumhelyét és a sávok teljes szélességét - melyeket a 3. táblázat mutat be - így csak a görbék alatti terület változhatott a bázispár/porfirin molarány növelésével.

3. Táblázat Az abszorpciós spektrumok Soret sávjának ($\lambda=370-490$ nm) illesztéséhez használt görbék paraméterei: λ_i (nm) az adott görbe csúcsának hullámhossza, w_i (nm) az adott görbe teljes szélessége. (A számított hiba λ_i esetén kisebb, mint 1 nm; w_i esetén kisebb, mint 0,5 nm.)

vegyület	λ_1	w_1	λ_2	w_2	λ_3	w_3	λ_4	w_4
BMPCP	407	17	418,5	13,5	429	7	435	14
BMPCP-4P ₂	407	15	418,5	11	429	11	435	16
TMPCP	402	15	422	17,5	429	25	446	25
TMPCP-4P	402	15	422	17,5	429	25	446	25

A komponens görbék alatti relatív területeket ($A_i^{rel.}$) meghatároztuk különböző bázispár/porfirin molarányoknál (r). A területek megváltozása összhangban van az egyes porfirin populációk relatív koncentrációjának megváltozásával, így ha ábrázoljuk ezeket a területeket a bázispár/porfirin molarány függvényében, követhetővé válnak a változások. Az 13. ábra a relatív görbe alatti terület – bázispár/porfirin arány függvényeket mutatja izolált DNS esetében.



13. Ábra Az abszorpciós spektrum Soret sávjának illesztése során kapott komponensek relatív görbe alatti területei a bázispár/porfirin molarány (r) függvényében, izolált DNS-sel való kölcsönhatás esetében. „A”: TMPCP-4P (telt szimbólumok), TMPCP (üres szimbólumok). „B”: BMPCP-4P₂ (telt szimbólumok), BMPCP (üres szimbólumok). Az egyes komponensek maximumhelyeinek hullámhossza az ábrák jobb felső sarkában látható.

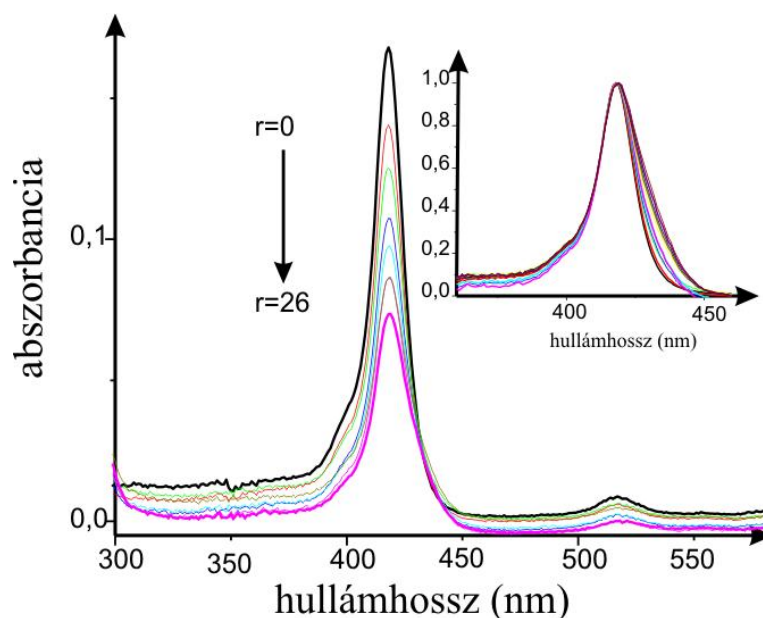
Növekvő kötőhely koncentráció hatására mind a négy porfirin származék esetében a szabad formához rendelt görbék területe csökkenést mutat ($A_1^{\text{rel.}}$ ($\lambda_1=402$ és 407 nm), $A_2^{\text{rel.}}$ ($\lambda_2=422$ és 418 nm)), mialatt a kötött formákat jellemző komponensek $A_3^{\text{rel.}}$ ($\lambda_3=429$ nm), $A_4^{\text{rel.}}$ ($\lambda_4=446$ és 435 nm) különböző mértékben ugyan, de növekednek, így feltehetően egyre nagyobb lesz az örökítő anyaggal kölcsönhatásba lépő porfirinek mennyisége. A négy vegyület esetében $\lambda=429$ nm-es csúccsal jelentkező görbe kapcsolható a külső kötődésben részt vevő porfirin-populációhoz; míg a TMPCP-nél és konjugátumánál $\lambda=448$ nm-es, a BMPCP-nél és konjugátumánál

$\lambda=435$ nm-es csúccsal rendelkező komponens az interkalálóra jellemző hullámhossztartományba esik. Megfigyelhető a 13. ábrán, hogy a bázispár/porfirin mólarány emelése TMPCP és konjugátuma esetében mindkét kötött formához rendelhető komponens területének növekedésével jár. BMPCP-4P₂ esetében viszont csak az interkalációhoz rendelhető komponens területe növekszik határozottan, míg a $\lambda=429$ nm-es maximumú görbe változása kevésbé kifejezett. A gyengén kötődő BMPCP-nél pedig még magas r értékek esetében is csak kisebb emelkedés látható, mégpedig az interkalációhoz köthető komponens területében.

Az alapvegyületek, tetrapeptid konjugátumaik és izolált T7 DNS esetében a porfirinek kötődési készségéről a bázispár/porfirin arányok (r) alapján a következő összefoglalás tehető: TMPCP-4P > TMPCP > BMPCP-4P₂ > BMPCP

5.1.3.2. Abszorpciós spektroszkópia - TMPCP-AK

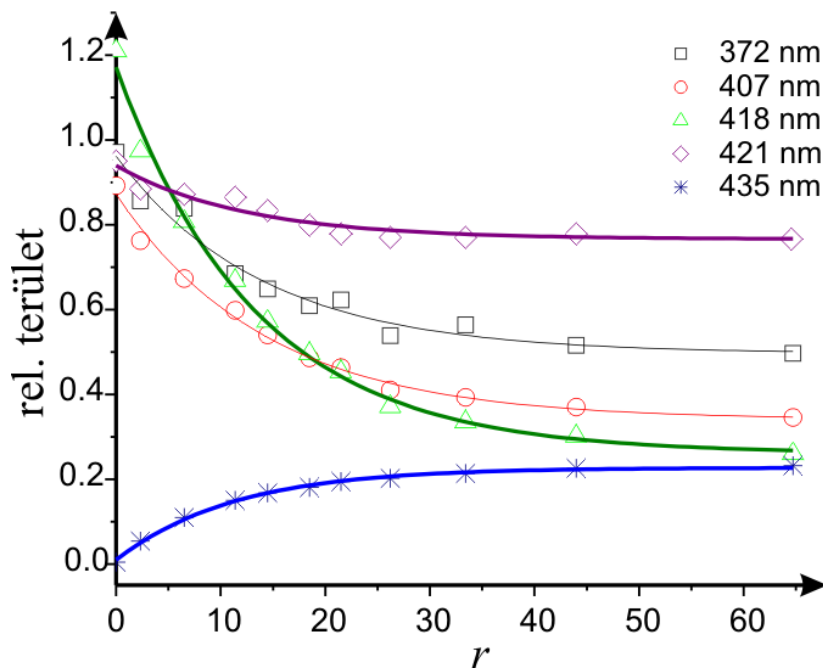
Külön érdemes tárgyalni a polipeptid-konjugátummal kapott eredményeket. A TMPCP-AK spektrumait állandó porfirin és változó DNS koncentrációk mellett vettük fel. A 14. ábrán látható spektrumsorozat növekvő bázispár/porfirin mólarány (r) mellett, izolált DNS jelenlétében kialakuló változásokat szemlélteti.



14. Ábra TMPCP-AK abszorpciós spektruma ($c = 1 \mu\text{M}$, oldószer Tris-HCl puffer) önmagában (fekete) és növekvő bázispár/porfirin mólarányánál ($r=2,5-26$, pirostól bíborig). A kiegészítő ábra a normalizált Soret-sávot mutatja.

A TMPCP-AK koncentrációját a TMPCP moláris extinkciós együtthatója alapján határoztuk meg a Lambert-Beer törvény szerint. A kötőhely koncentrációjának növelésére hipokróm változás, néhány nanométeres vörös irányú eltolódás és a Soret-sáv kiszélesedése figyelhető meg.

Elvégeztük a spektrumok felbontását is a $\lambda=370-490$ nm-es tartományban. Érdekes kiemelni, hogy eltérően az eddig vizsgált porfirin származékoktól, a TMPCP-AK Soret-sávjának közepét két Gauss komponenssel ($\lambda=418$ nm és $\lambda=421$ nm) tudtuk közelíteni már abban az esetben is, amikor még nem adtunk nukleinsavat az oldathoz. Lehetséges magyarázat lehet erre a jelenségre, hogy a polipeptiden található porfirinek egyedi mikrokörnyezete eltérhet egymástól. Az illesztés során kapott fő komponenseken kívül még két függvény elkülönítésére került sor a spektrum váll régiójában, melyek csúcsa $\lambda=372$ nm-nél és $\lambda=407$ nm-nél található. A DNS jelenlétében felvett spektrumok felbontásánál egyetlen új Gauss komponens kellett hozzáadnunk a komponensek sorozatához, ennek csúcsa $\lambda=435$ nm-nél található. Meghatároztuk a Gauss komponensek alatti relatív területet a különféle bázispár/porfirin molarányoknál, ennek bemutatása látható a 15. ábrán.

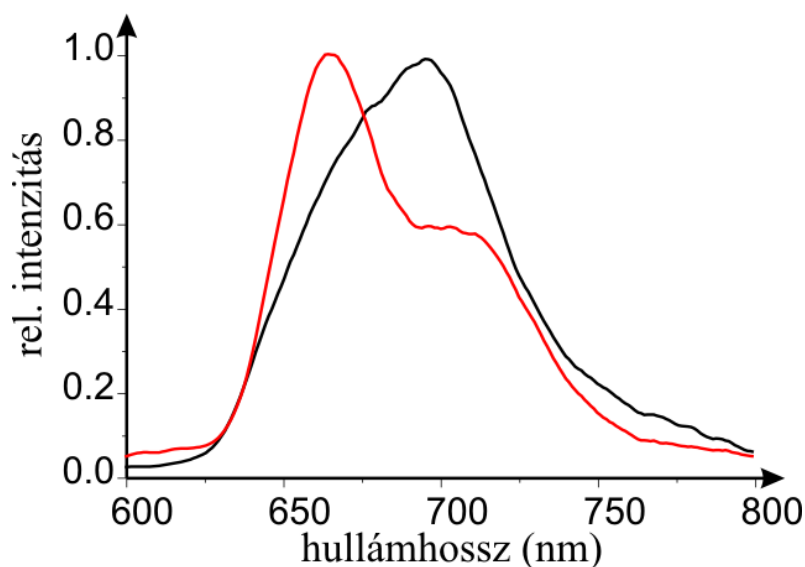


15. Ábra Az abszorpciós spektrum Soret-sávjának illesztése során kapott komponensek relatív görbe alatti területei a bázispár/porfirin molarány függvényében, TMPCP-AK és izolált DNS kölcsönhatása esetében. Az egyes komponensek maximumhelyeinek hullámhossza az ábrák jobb felső sarkában látható.

A szabad porfirinhez tartozó spektrális komponensek területei egyértelmű csökkenést mutatnak a kötőhely koncentráció emelése következtében, míg a $\lambda=435$ nm-en maximummal rendelkező komponens területe növekszik. Ennek alapján elmondható, hogy a TMPCP-AK konjugátum részét képező porfirinek kötődnek a DNS-hez, a szabad konjugátumok csoportjából a nukleinsav jelenlétében egy jól elkülöníthető kötött populáció jön létre. A másik négy vegyület spektrumfelbontás alapján feállított kötődési készség szerinti sorrendjébe a polipeptid konjugátum az alábbi módon illeszthető be: TMPCP-4P > TMPCP > BMPCP-4P₂ > TMPCP-AK > BMPCP

5.1.3.3. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia

A fluoreszcencia emissziós spektrumokat a porfirinek DNS-sel való titrálása közben vettük fel. A gerjesztés a Soret-sáv maximumának megfelelő hullámhosszon történt. Kötődés létrejötte a porfirinek és nukleinsavak között a porfirin spektrumának megváltozását eredményezi, a jellegtelen, széles emissziós sáv két csúcsra hasad fel, és a fluoreszcencia intenzitás is csökken. A sávok relatív amplitúdója a bázispár/porfirin aránytól függ. A változásokat a 16. ábrán látható spektrum szemlélteti.

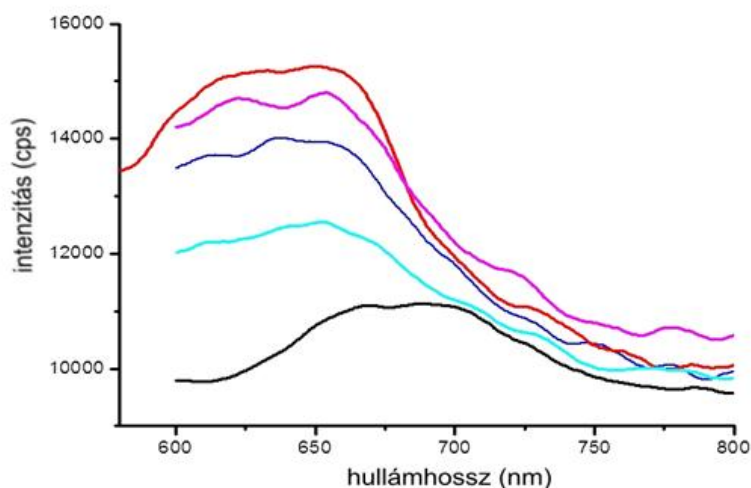


16. Ábra TMPCP-4P fluoreszcencia emissziós spektruma szabad formában, $c=1 \mu\text{M}$ koncentrációnál Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$), gerjesztés: $\lambda=423$ nm (fekete); és izolált DNS jelenlétében $r=15$ bázispár/porfirin mólarányánál (piros).

Mind az öt származék esetében hasonló tendenciájú spektrális átalakulás következett be, azonban a változások nagysága különbözött az egyes vegyületeknél. A változások mértéke összhangban volt az abszorpciós spektrumok felbontása alapján felállított kötődési készég szerinti sorrenddel.

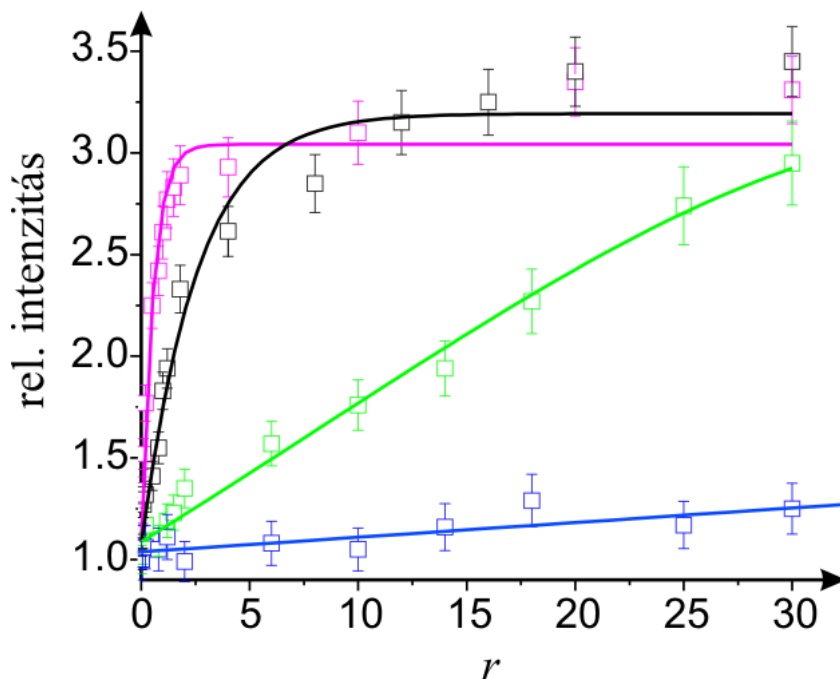
5.1.3.4. Fluoreszcencia energia transzfer

A fluoreszcencia energia transzfer mérése kiegészítő információval szolgálhat a kötődési módokat illetően. Amikor a kationos porfirinek nem a Soret-sávban gerjesztjük, hanem $\lambda=260$ nm-en, a DNS abszorpciós maximumának megfelelő hullámhosszon, a hagyományos emissziós spektrumoktól eltérő alakú jelet kapunk. Amennyiben DNS-t is adunk a rendszerhez, a színek alakja és intenzitása megváltozik, amely a DNS bázisaival létrejövő közeli kontaktus eredménye. Ekkor energia transzfer alakul ki a nukleinsavak bázisai és a porfirinek között. A jelenség csak szoros kapcsolódás esetén következhet be, ezért ezt az interkaláció igazolásának tekinthetjük (83). $\lambda=260$ nm-en végzett gerjesztés mellett a porfirint és DNS-t tartalmazó minták emissziós spektrumait $\lambda=525-800$ nm között vettük fel. A 17. ábra szemlélteti a kvantumhatásfok növekedését a TMPCP emissziós görbéinek sorozatával.



17. Ábra TMPCP ($c=1 \mu\text{M}$) emissziós spektruma növekvő bázispár/porfirin mólarány mellett $\lambda=260$ nm-en való gerjesztésnél Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$). TMPCP szabad formában (fekete) és $r=1-13$ esetén (kéktől pirosig.)

Megfigyelhető, ahogy $\lambda=260$ nm-es gerjesztés mellett jelentkező kisebb intenzitású görbe határozottan megnő DNS hozzáadására, és egy telítési értékig növekszik. A különböző DNS koncentrációk mellett felvett emissziós spektrumok $\lambda=525-800$ nm-es tartományban integrált intenzitásait a bázispár/porfirin mólarány függvényében ábrázoltuk. Ezt mutatja be a 18. ábra (A porfirinek szabad állapotban mérhető emissziós intenzitása levonásra került.)



18. Ábra Integrált relatív fluoreszcencia intenzitás a bázispár/porfirin mólarány függvényében TMPCP (fekete), TMPCP-4P (bíbor), BMPCP-4P₂ (zöld) és BMPCP (kék) esetében. TMPCP-AK DNS jelenlétében nem mutatott változást. A porfirin koncentráció $c=1 \mu\text{M}$. Gerjesztés: $\lambda=260$ nm; detektálás: $\lambda=525-800$ nm; oldószer: Tris-HCl (pH=7,4).

Jelentős intenzitás növekedés figyelhető meg a DNS koncentrációjának növelésekor a TMPCP-4P, TMPCP és a BMPCP-4P₂ esetén, viszont az ábráról leolvasható az is, hogy a telítés különböző koncentrációknál következik be (TMPCP-4P $r=2$; TMPCP $r=13$; BMPCP-4P₂ $r>30$). BMPCP vizsgálatokor azonban nem tapasztaltunk látványos változást az emittált fluoreszcencia intenzitás értékeiben még magas r értékeknél sem, a TMPCP-AK fluoreszcencia emissziója pedig egyáltalán nem növekedett.

5.1.3.5. Fluoreszcencia élettartam

A fluoreszcencia emisszió időbeli lecsengésének méréséről korábbi vizsgálatok során kiderült, hogy ezzel a módszerrel megerősíthető a külső kötődés és az interkaláció jelenléte (11, 80). A szabad porfirinek fluoreszcencia lecsengési görbéi egy exponenciális függvénnyel közelíthetők. Nukleinsav jelenlétében már bi-exponenciális függvénnyel kaphatunk jó illesztést. Tehát két új élettartam komponens jelenik meg, melyek hozzárendelhetők a két kötési formához. Négyyszeresen pozitív töltésű porfirinek kapcsán megállapított irodalmi adatokból ismert, hogy a rövidebb élettartam komponens az interkaláció létrejötté nyomán jelenik meg, míg a hosszabb a külső kötődés kialakulásának következménye (80).

Az izolált DNS-sel végzett mérések egységesen $r=6$ bázispár/porfirin aránynál készültek, a porfirinek koncentrációja $c=2 \mu\text{M}$ volt. A gerjesztést a Soret-sáv maximumán végeztük, a jeleket $\lambda=550$ nm feletti tartományban detektáltuk.

A BMPCP esetében az emissziós lecsengési görbe egyetlen exponenciálissal volt megfelelően illeszthető, és ez az egyedüli élettartam-komponens (8,84 ns) csak kis mértékben különbözik a DNS-mentes minta esetén mért adattól (8,76 ns). Magasabb bázispár/porfirin molarányoknál is elvégeztük a mérést, de az élettartam érték nem változott.

TMPCP-AK fluoreszcencia jelének lecsengése jelentősen eltért a korábban vizsgált porfirinekétől, nem találtunk két jól elkülöníthető komponenset. Magyarázata lehet ennek az, hogy a polipeptiden több TMPCP molekula is található, egymástól eltérő mikro környezetben, amelyek aztán különböző fluoreszcencia lecsengéssel rendelkeznek.

A további három vegyületnél minden esetben bi-exponenciális függvény illeszkedett legpontosabban a mért élettartam adatokra, egy hosszabb és egy rövidebb élettartamú komponens szolgáltatva. Az élettartam-értékek a 4. táblázatban láthatók.

4. Táblázat A porfirinszármazékok fluoreszcencia élettartama τ (ns) szabad formában és izolált DNS jelenlétében $r=6$ molarányánál. Oldószer: Tris-HCl ($pH=7,4$), porfirin koncentráció $c=1 \mu M$.

vegyület	szabad porfirin	izolált DNS	
	τ_1 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
BMPCP	8,76	8,84	
BMPCP-4P ₂	8,99	2,36	9,76
TMPCP	4,20	2,38	8,64
TMPCP-4P	4,90	3,46	9,50

BMPCP-4P₂ esetében a nagyobb élettartamú komponens (9,76 ns) még igen közelinek tekinthető a nukleinsav nélkül felvett görbéből nyert értékhez (8,99 ns). Így nem zárható ki a lehetősége annak, hogy a módszerrel nem különíthető el teljesen a külső kötődéshez rendelhető komponens a szabad formától. TMPCP és TMPCP-4P esetében viszont a DNS jelenlétében kapott adatok egyértelműen elkülöníthetőek a szabad porfirinek fluoreszcencia élettartamától. Az eredmények azt mutatják, hogy kétféle kötési forma alakul ki ezen származékoknál, és a szabad formához rendelhető élettartam nem jelenik meg nukleinsav jelenlétében.

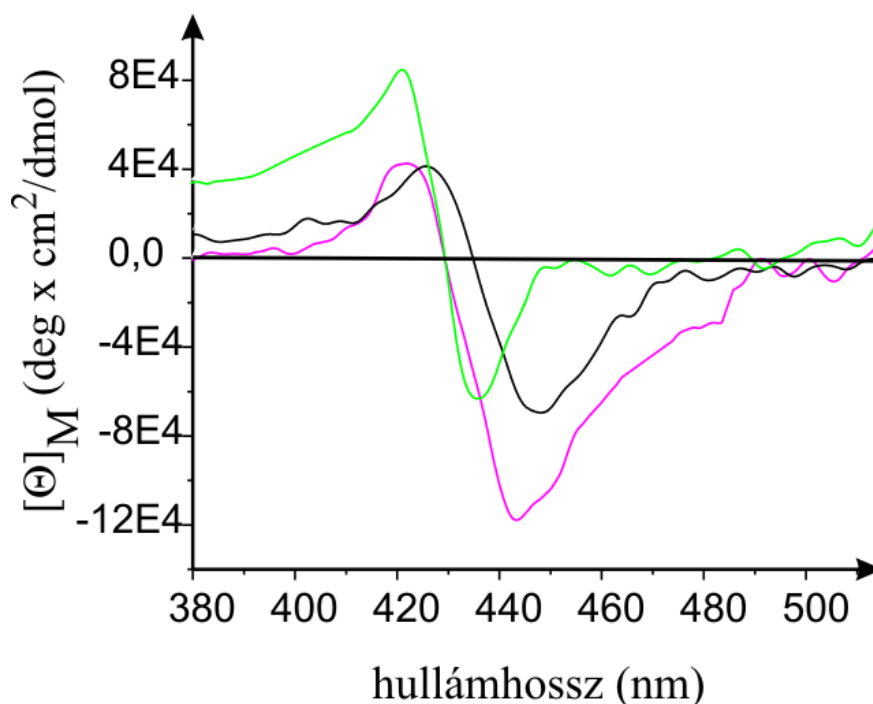
5.1.3.6. Cirkuláris dikroizmus

A CD spektroszkópia gyakran alkalmazott módszer különféle molekulák polinukleotidokkal való kölcsönhatásának elemzése során. Több kutatócsoport beszámolt különféle porfirin származékok és nukleinsavak kötődésének CD spektroszkópiás jellemzőiről, és röntgendiffrakciós eredményekkel végzett összehasonlítások alapján kimutatták, hogy szelektív módszere lehet a különböző kötési formák azonosításának. Hozzárendelések tehetők a kötődési formák és a megjelenő CD sávok pozíciója között, továbbá az egyes rendszerekben jelen lévő formák relatív arányát is megbecsülhetjük. A külső kötődés különböző, stacking kölcsönhatással fellépő, illetve anélküli formáit is elkülönítették vele és az esetleges porfirin-porfirin aggregáció kialakulását is jelezheti. Az általunk használt porfirinek nem királis molekulák, azonban a királis DNS kettős hélixhez való kötődésük következtében indukált CD jelet szolgáltatnak a Soret-sávban. A porfirinek Soret-

sávbeli CD görbéje nukleinsav jelenlétében egy pozitív és egy negatív sávból állhat, amelyek külön-külön és egyszerre is felléphetnek. Korábbi, több spektroszkópiai módszert is magába foglaló vizsgálatok során megállapították: a pozitív indukált CD sáv megjelenése a külső kötődés, míg a negatív sáv az interkaláció jelenlétére utal. Amennyiben aggregáció, vagy a külső kötődés stackinggel járó formái alakulnak ki, abban az esetben a CD jelek pozíciója, sorrendje változik (84, 85, 119-124).

Az új származékok CD spektrumát izolált DNS jelenlétében vettük fel, $c=1$ μM porfirin és különböző bázispár/porfirin molarányok mellett. Méréseink során a BMPCP ezzel a módszerrel sem szolgáltatott jelet. A TMPCP-AK DNS nélküli oldatban is rendelkezik CD spektrummal, a polipeptid jelei mellett a Soret-sávban is mérhető változás tapasztalható. Ezen körülmények nem teszik lehetővé a polinukleotiddal való kölcsönhatás következtében kialakuló spektrális változások egyértelmű analizését. Izolált DNS esetében a másik három vegyület viszont mind pozitív, mind negatív sávval jelentkezett. A pozitív sávok maximuma: $\lambda=421$ nm a BMPCP-4P₂ és TMPCP-4P, $\lambda=425$ nm a TMPCP spektrumán, míg a negatív sávok maximumainak helye: BMPCP-4P₂ $\lambda=436$ nm-en, TMPCP-4P $\lambda=442$ nm-en, és TMPCP $\lambda=447$ nm-en található.

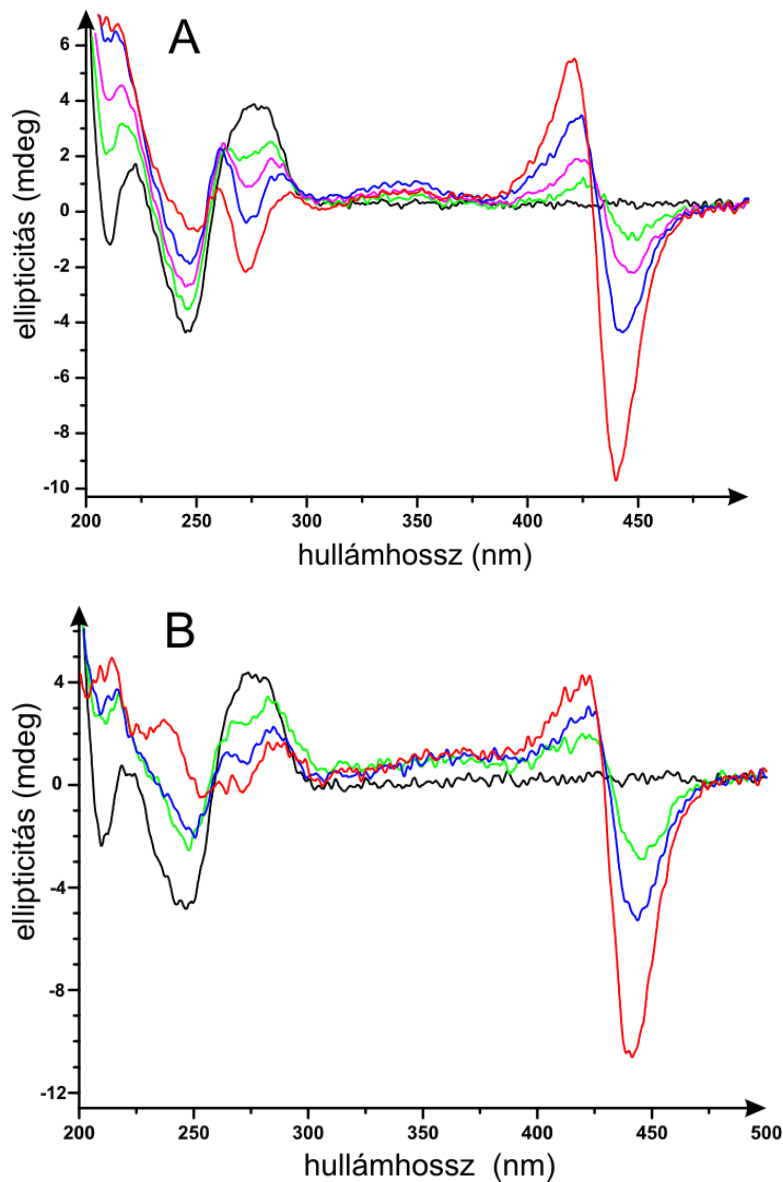
A porfirin/bázispár arány növelésével a CD sávok növekedése tapasztalható, a kötődési folyamat nyomon követhető egészen a telítési koncentráció eléréséig. A telítési érték alapján itt is felállíthatunk egy, a porfirin DNS iránti affinitását jellemző sorrendet: a TMPCP-4P esetében a folyamat már $r=3$ -nál telítődik, a TMPCP görbéje csak valamivel magasabb, $r=12$ bázis/porfirin arányt követően nem mutat további változást, míg a BMPCP-4P₂ esetében csupán jóval magasabb, $r=30$ körüli értéknél következik ez be. Tehát a pozitív és negatív sávok amplitúdója a porfirin-molekulák struktúrájának függvényében változik. A három vegyület Soret sávban rögzített CD spektrumát $r=30$ -nál a 19. ábra mutatja be.



19. Ábra Izolált DNS jelenlétében rögzített CD spektrumok ($r=30$). TMPCP (fekete), TMPCP-4P (bíbor), BMPCP-4P₂ (zöld). A porfirinek koncentrációja $c=1 \mu\text{M}$, az oldószer Tris-HCl puffer ($\text{pH}=7,4$). A CD sáv intenzitását moláris ellipticitásban fejeztük ki.

Jelen doktori értekezésben kerül először bemutatásra, hogy a porfirinek kötődése milyen változásokat idéz elő a DNS szerkezetében. A B konformációjú DNS CD spektruma három fontos sávval rendelkezik: $\lambda=220$ nm-en pozitív, $\lambda=245$ nm környékén negatív és $\lambda=280$ nm körül pozitív sávval. A sávok pontos helyzete, amplitúdója a bázis összetételtől és a szekvenciától függ (120, 125).

A mérések során állandó DNS mennyiség mellett növeltük a porfirin koncentrációját. Az arányokat $1/r$ -ben, vagyis porfirin/bázispár molarányban adtuk meg. TMPCP és TMPCP-4P titrálási sorozatának spektrumait a 20. ábra mutatja.

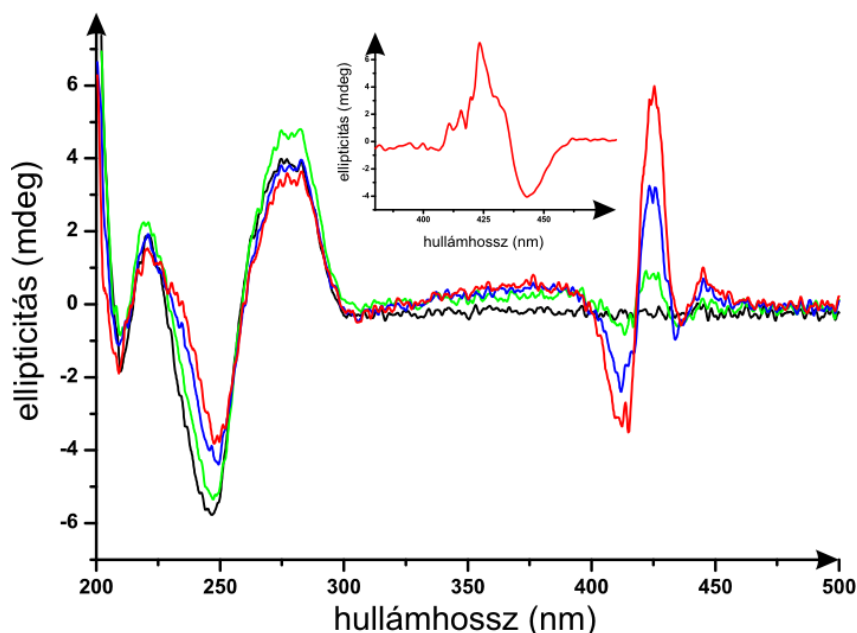


20. Ábra Izolált DNS CD spektruma szabad formában (fekete) és növekvő porfirin/bázispár molarány ($1/r$) mellett TMPCP („A”, zöldtől pirosig $1/r=4-18$) és TMPCP-4P („B” zöldtől pirosig $1/r=6-25$) esetében, Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$). A DNS-re jellemző sávok $\lambda=210-300$ nm között találhatóak, a porfirinek indukált CD jeleinek tartománya $\lambda=300-490$ nm közé esik. A sávok intenzitását ellipticitásban fejeztük ki.

Ha megfigyeljük a spektrum TMPCP hozzáadására bekövetkező változásait, akkor láthatjuk, hogy a porfirin mennyiségének növelésével a DNS pozitív CD jele

felhasad két kisebb amplitúdójú pozitív és egy negatív sávra, míg $\lambda=245$ nm-en maximummal rendelkező negatív CD jel amplitúdója csökken, és a maximuma $\lambda=250$ nm-re tolódik. A TMPCP tetrapeptid konjugátumánál némileg eltérő átalakulást tapasztalhatunk, amennyiben a pozitív DNS sáv csak egy kisebb amplitúdójú, $\lambda=290$ nm-re eltolódott pozitív sávra változik. Az előbb vázolt spektrális változások a B konformáció elvesztését jelzik a kötődés hatására, mely folyamat során a szomszédos bázisok közti stacking kölcsönhatások megszűnnek és a DNS-kettős hélix kiegyenesedik. Látható az is, hogy a tetrapeptid jelenléte hatással van a kötődésre, de nem akadályozza meg azt.

Érdekes megfigyelnünk a BMPCP-4P₂ spektrumát is, melyet a 21. ábra mutat be.



21. Ábra Izolált DNS CD spektruma szabad formában (fekete) és növekvő porfirin/bázisár molarány ($1/r$) mellett BMPCP-4P₂ (zöldtől pirosig $1/r=5-23$) esetében. A DNS-re jellemző sávok $\lambda=210-300$ nm között találhatóak, a porfirin indukált CD jeleinek tartománya $\lambda=300-490$ nm közé esik. A sávok intenzitását ellipticitásban fejeztük ki. A kiegészítő ábra a DNS-sel és DNS nélkül felvett spektrum különbségét mutatja a Soret sávban az $1/r=23$ aránynak megfelelő koncentrációknál.

Látható, hogy DNS sávjai csak kisebb amplitúdó-csökkenést szenvednek, de jelentős konformációváltozásra utaló jel nem található. Ennek magyarázatát megtalálhatjuk,

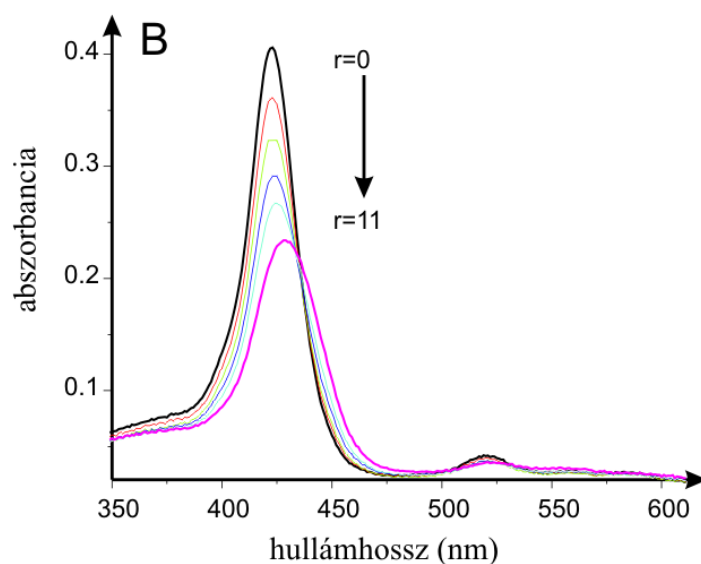
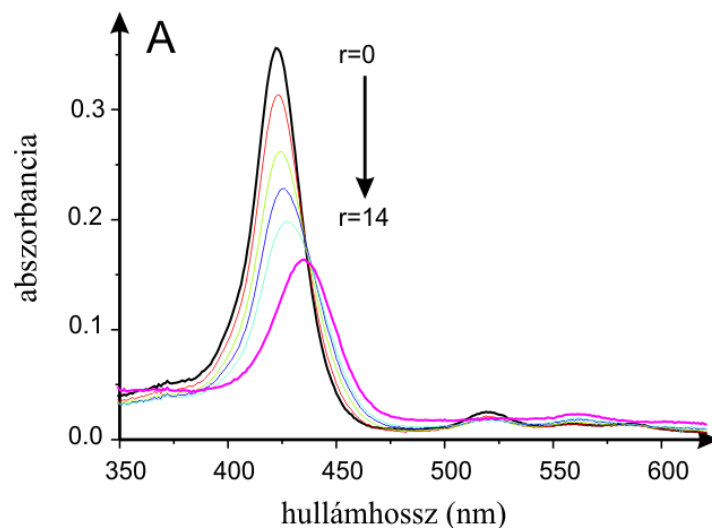
ha a Soret régió CD jeleit is kielemezzük. Szembetűnő a különbség a három pozitív töltéssel rendelkező származékokhoz képest: a Soret-sáv negatív és pozitív jelei fordított sorrendben követik egymást. $\lambda=410$ nm-en egy negatív sáv látható, ezt követi $\lambda=425$ nm-en egy nagyobb amplitúdójú pozitív sáv illetve $\lambda=440$ nm-nél egy kisebb pozitív sáv. A BMPCP-4P₂ DNS jelenléte nélkül is nagyon hasonló CD jelet mutatott. Ezen adatok és korábbi irodalmi példák (126-127) alapján megállapítható, hogy a BMPCP-4P₂ aggregálódott a vizsgált koncentráció tartományban. A kiegészítő ábrán látható $1/r=23$ esetében a Soret CD különbségi jele, melyet a csak porfirint tartalmazó minta azonos koncentráción felvett CD spektrumának a DNS jelenlétében regisztrált jelből való kivonásával szerkesztettünk meg. Ezen megfigyelhető egy, a DNS-sel való kölcsönhatásra jellemző CD spektrum, és ez azt mutatja, hogy az aggregáció ellenére is létrejön bizonyos kölcsönhatás a nukleinsavak és BMPCP-4P₂ között.

5.1.4. Kötődés nukleoprotein komplexhez

5.1.4.1. Abszorpciós spektroszkópia

Az abszorpciós spektrumokat állandó porfirin ($c=1 \mu\text{M}$) és változó nukleoprotein komplex koncentráció mellett vettük fel. A baketrio-fágot mind natív formájában, mint pedig 65°C -on hőkezelt és ezért fellazult kapsziddal bíró állapotában alkalmaztuk a mérések során.

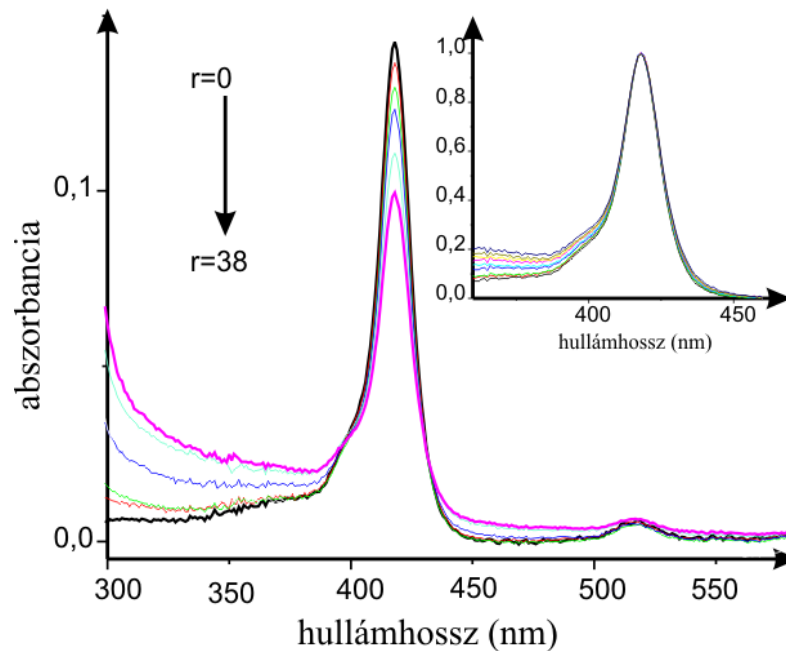
A 22. ábrán a TMPCP-4P abszorpciós spektrumai láthatók natív és hőkezelt fág növekvő mennyiségei mellett. A kötőhelyek és a porfirin koncentrációjának viszonyát továbbra is a bázispár/porfirin molaránnyal fejeztük ki.



22. Ábra A TMPCP-4P abszorpciós spektruma különböző nukleoprotein komplex (A) illetve 65 °C-on hőkezelt nukleoprotein komplex koncentrációk esetében (B). A bázispár /porfirin molarány $r=0 - 14$ (A) illetve $r=0 - 11$ között változik (B). Oldószer: Tris-HCl (pH=7,4), porfirin koncentráció $c=1 \mu\text{M}$.

Látható, hogy a konjugátum spektruma a kationos porfirin/nukleinsav kölcsönhatásra jellemző módon változott meg. A bemutatott spektrumsorozathoz hasonlóan regisztráltunk TMPCP és BMPCP-4P₂ esetében is. BMPCP esetében azonban nem tapasztaltunk változást.

A 23. ábra TMPCP-AK és T7 bakteriofág kölcsönhatására bekövetkező spektrális változásokat szemlélteti.



23. Ábra. A TMPCP-AK abszorpciós spektruma különböző nukleoprotein komplex koncentrációk esetében. A bázispár /porfirin molarány $r=0 - 38$ között változik. Oldószer: Tris-HCl (pH=7,4), porfirin koncentráció $c=1 \mu\text{M}$.

A fág nukleoprotein komplex jelenléte csak kisebb mértékű hipokróm változást idéz elő, vörös irányú eltolódás nem mérhető.

Az izolált DNS-hez hasonlóan, a nukleoprotein komplexszel végzett mérések során is elvégeztük a spektrumfelbontást. T7 bakteriofág hozzáadása után rögzített spektrumok öt görbe illesztését tették szükségessé BMPCP-4P₂, TMPCP és TMPCP-4P esetén. BMPCP és TMPCP-AK spektrumainak felbontásához azonban nukleoprotein komplex jelenlétében nem kellett új komponenseket alkalmaznunk a szabad állapot színeképehez képest.

A legalacsonyabb hullámhosszú komponens minden származék esetében azonosnak adódott, állandó háttérnek tekinthető, így ezt a továbbiakban a nem ábrázoljuk. Rögzítettük az öt komponensgörbe maximumhelyét illetve a sávok teljes szélességét, így csak a görbék alatti terület változhatott a bázispár/porfirin arány függvényében. Az elemzés során kapott paramétereket, úgy mint a Gauss komponensek maximumhelyét (λ_i) és teljes szélességét (w_i) az 5. táblázat mutatja be BMPCP-4P₂, TMPCP és TMPCP-4P esetén.

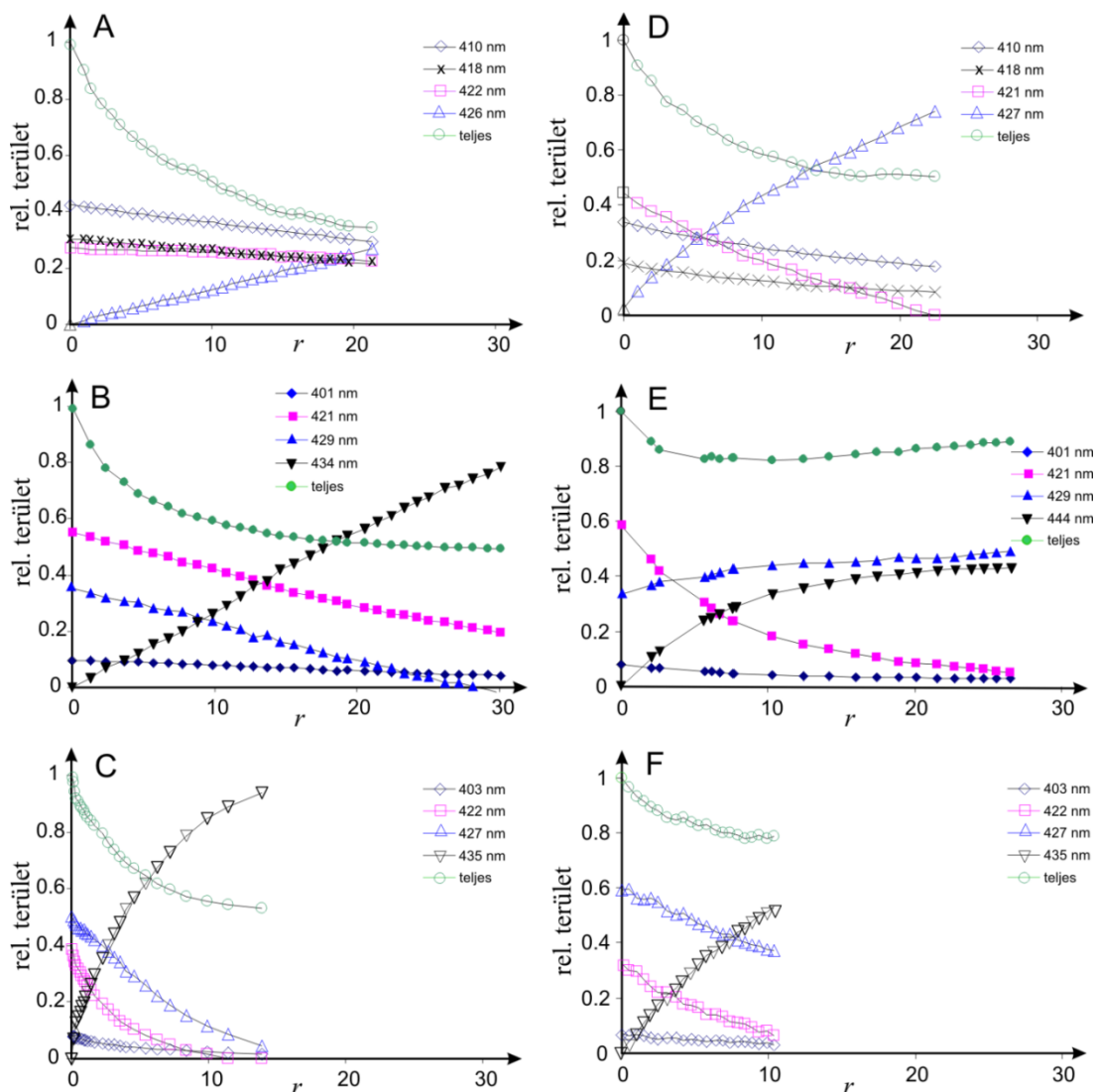
5. Táblázat Az abszorpciós spektrumok Soret sávjának ($\lambda=370-490$ nm) illesztéséhez használt görbék paraméterei natív és hőkezelt bakteriofággal való kölcsönhatás esetén: λ_i (nm) az adott görbe csúcsának hullámhossza, w_i (nm) az adott görbe teljes szélessége. (A számított hiba λ_i esetén kisebb, mint 1 nm; w_i esetén kisebb, mint 0,5 nm.)

vegyületek	T7 fág	λ_1	w_1	λ_2	w_2	λ_3	w_3	λ_4	w_4
BMPCP-4P ₂	NP	410	23	418	9	422	14	426	23
	NP(65°C)	410	21	418	8	421	15	427	20
TMPCP	NP	401	16	421	17	429	25	434	30
	NP(65°C)	401	14	421	19	429	26	444	24
TMPCP-4P	NP	403	15	422	16	427	25	435	27
	NP(65°C)	403	16	422	16	427	27	435	29

A megfigyelhető eltéréseket csoportunk korábbi eredményeihez hasonlítva valószínűsíthető, hogy a vizsgált oldatokban a TMPCP, TMPCP-4P és a BMPCP-4P₂ kötődik a nukleoprotein komplexhez. Azonban a kötődés módja a felbontás alapján nem állapítható meg egyértelműen, ahogyan az hamarosan látható lesz.

Elemeztük az egyes sávokhoz tartozó görbe alatti területek változását a bázispár/porfirin mólarány függvényében.

Ezt mutatja a 24. ábra BMPCP-4P₂, TMPCP és TMPCP-4P esetében mind az ép T7 fág, mind pedig a 65°C-on hőkezelt, meglazult struktúrájú fágpartikulum jelenlétében.



24. Ábra Az abszorpciós spektrum Soret sávjának ($\lambda=370-490$ nm) illesztése során kapott komponensek relatív görbe alatti területei a bázispár/porfirin mólarány függvényében, natív és 65°C -on hőkezelt fág esetében. BMPCP- $4P_2$ (felső sor, „A” és „D”), TMPCP (középső sor, „B” és „E”), TMPCP- $4P$ (alsó sor, „C” és „F”). Natív fág (bal oszlop, „A”, „B”, „C”), hőkezelt fág (jobb oszlop, „D”, „E”, „F”). Az egyes komponensek maximumhelyeinek hullámhossza az ábrák jobb felső sarkában látható.

Ha megfigyeljük a BMPCP- $4P_2$ spektrumának felbontásából származó adatokat, láthatjuk, hogy az első három komponens görbe területei ($A_1^{\text{rel.}}$ ($\lambda_1=410$ nm), $A_2^{\text{rel.}}$ ($\lambda_2=418$ nm) és $A_3^{\text{rel.}}$ ($\lambda_3=421-422$ nm)) egyöntetűen csökkennek a bázispár/porfirin arány növekedésével. Mindeközben csak egyetlen sáv területe növekszik: $A_4^{\text{rel.}}$ ($\lambda_4=426-427$ nm). Ezek alapján tehát elmondhatjuk, hogy BMPCP- $4P_2$ esetében

spektrumfelbontással csak egyetlen kötött forma különíthető el, és a növekvő területtel rendelkező sáv maximumának 5 nm-es vörös irányú eltolódása alapján valószínű, hogy ez a sáv a külső kötődési formához rendelhető. A TMPCP és TMPCP-4P esetében az új sáv viszont $\lambda=434-435$ nm-en jelentkezik, és jól láthatóan növekszik a fág koncentrációjának emelésével. Ez a szabad állapothoz képesti 10 nm-es eltolódással jelentkező komponens az interkaláció kialakulását jelzi, mint a kölcsönhatás domináns formáját.

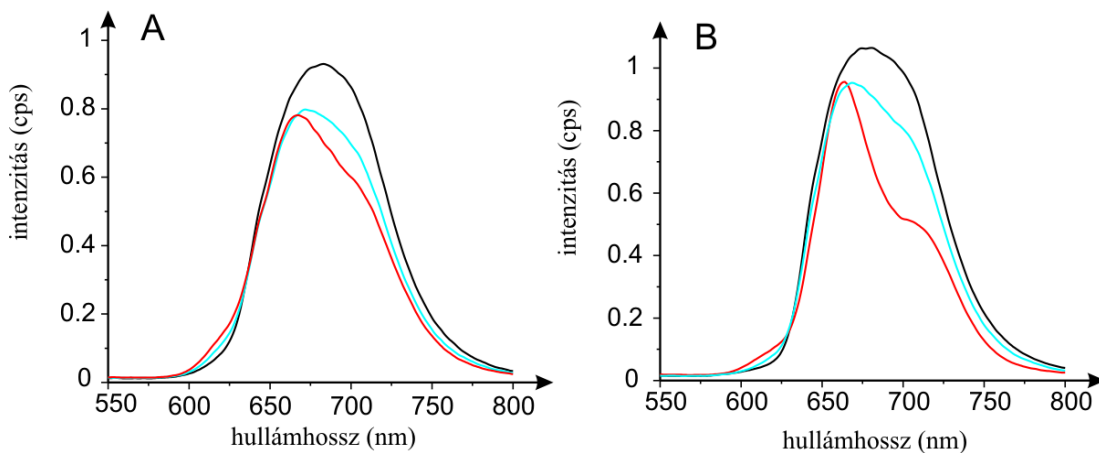
Ha összehasonlítjuk a különböző származékok esetén kapott ábrákat, kitűnik a $\lambda=426-429$ nm-en maximummal rendelkező görbe területének heterogén változása. TMPCP mellett növelve a nukleoprotein komplex mennyiségét a natív fág és a hőkezelt fág esetén eltérő tendenciát kapunk, előbbinél csökken, az utóbbinál enyhén növekszik. BMPCP-4P₂ kötődésekor viszont kizárólag ezen görbe alatti terület az, mely növekedésnek indul. Ennek magyarázata lehet, hogy az említett komponens valójában két állapot átlapolásaként jön létre, vagyis a szabad és kötött porfirin populációkból. Ebben az esetben kézenfekvő megoldás lenne újabb komponens görbéket bevezetni. Azonban az erre tett kísérletek során az illesztés egészének hibája növekedett meg és jelentősen pontatlanabb felbontás jött létre, így ez nem jelentett reális alternatívát.

Bakteriofág esetében tehát a kötődés spektrumfelbontás segítségével kimutatható, viszont a kapott eredmények kevésbé egyértelműek, mint a kutatócsoportunk által eddig vizsgált egyszerűbb rendszerekben, jóllehet a kétféle kötési forma közül az egyiket ki lehet mutatni. TMPCP és TMPCP-4P esetében azonban nem zárható ki a másik forma jelenléte sem.

A kötődési affinitás szempontjából eltérnek a molekulák, azonban a telítési értékek nem állapíthatók meg egyértelműen, hiszen egyes komponensek görbe alatti területei magas r értékek mellett sem hajlanak telítésbe. A kapott eredmények szerint TMPCP-4P kötődési készsége a legnagyobb, hozzávetőlegesen $r=10$ -nél érhető el a telítési érték, a másik két vegyületnél ez csak nagyobb bázispár koncentrációknál következik be. Megállapítható az is, hogy a hőkezelt, és ezért megbomlott szerkezetű nukleoprotein komplex esetében alacsonyabb r értékeknél érhetjük el a telítést, mint az ép T7 bakteriofág esetében. Viszont egyértelmű kötődési sorrend pusztán a felbontás alapján nem állítható fel.

5.1.4.2. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia

A fluoreszcencia emissziós spektrumokat szintén növekvő bakteriofág koncentráció jelenlétében vettük föl. Kötődés létrejötte a porfirinek és nukleinsavak között a porfirin spektrumának megváltozását eredményezi, a széles emissziós sáv felhasad, és a fluoreszcencia intenzitás is csökken. A TMPCP esetében felvett spektrumokat a 25. ábra mutatja be natív fág és 65°C-on hőkezelt nukleoprotein komplex esetében.



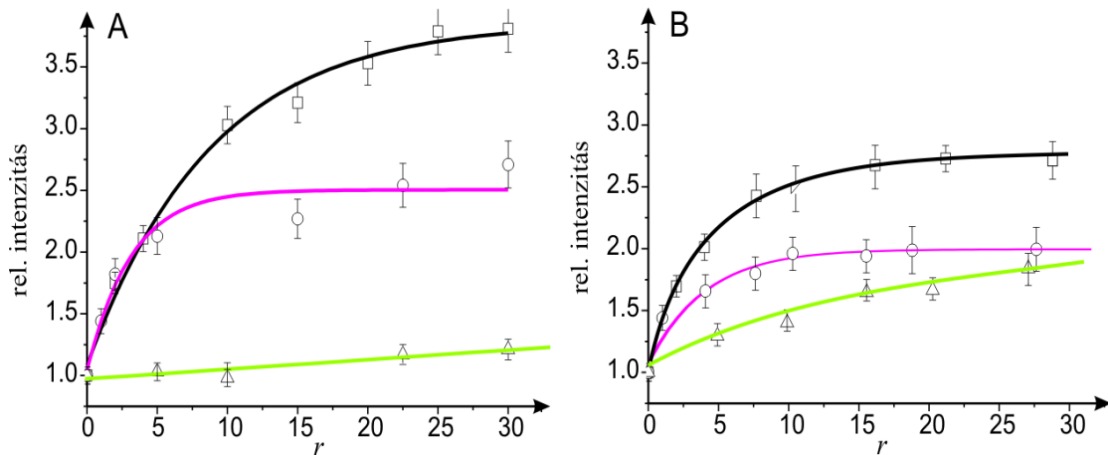
25. Ábra TMPCP fluoreszcencia emissziós spektruma $\lambda=423$ nm-es gerjesztésnél, natív fág („A”) illetve 65°C-on hőkezelt fág („B”) jelenlétében. TMPCP ($c=1 \mu M$) szabad formában (fekete), $r=10$ (kék) és $r=20$ (piros) molarányoknál, Tris-HCl pufferben ($pH=7,4$).

A változások mértéke a bázispár/porfirin aránytól függ. Minden származék esetében telítési érték érhető el, amely fölött a spektrum alakja már nem változik. Minél kisebb ez az érték, az adott származék kötődési képessége annál nagyobb. Az így nyert sorrend jó összhangban van az abszorpciós spektrumoknál kapott értékekkel, és noha a pontos telítési értékek némileg eltérnek az abszorpciós spektroszkópiával mértékétől, mégis az ott kapott eredmények megerősítéseként szolgálnak. BMPCP és TMPCP-AK esetében nem tapasztaltuk a spektrum alakjának változását.

A fágpartikulumhoz kötődni képes származékok kisebb affinitással kötődnek nukleoprotein komplexhez, mint izolált DNS-hez, és a peptidkonjugáció nem jelent előnyt a kötődés szempontjából. A fellazult kapszidburokkal rendelkező fággal való titrálás okozta változások nagysága a natív fág és az izolált DNS eredményeihez képest köztes helyet foglal el.

5.1.4.3. Fluoreszcencia energia transzfer

A kötési formák tisztázása érdekében megvizsgáltuk a fluoreszcencia energiáttranszfert. Ahogyan arról már szó esett, a DNS bázisaival közeli kontaktusba lépő porfirinek a fluoreszcencia intenzitás növekedése jellemző. Ez akkor lehetséges, ha az energia átadódik a nukleinsavak bázisairól a porfirinre. Ehhez szoros kapcsolódás szükséges, ezért az interkaláció igazolásának tekinthetjük. (83). A különböző nukleoprotein komplex koncentrációk mellett felvett emissziós intenzitást a bázispár/porfirin mólarány függvényében értékeltük, hiszen így jól összehasonlíthatóak a különböző származékok eredményei. A kiértékelésnél figyelembe vettük, hogy a porfirinek fág nélküli mintája is mérhető fluoreszcencia emisszióval rendelkezik $\lambda=260$ nm-es gerjesztésnél, ezt levontuk fág jelenlétében mért jelekből. A 26. ábrán natív T7 fág és hőkezelt fág jelenlétében felvett adatok ábrázolása látható.



26. Ábra Integrált relatív fluoreszcencia intenzitás a bázispár/porfirin mólarány függvényében TMPCP (fekete), TMPCP-4P (bíbor), BMPCP-4P₂ (zöld) natív fág (A) és 65 °C-on hőkezelt fág (B) esetében. BMPCP, TMPCP-AK nem mutatott változást. A porfirin koncentráció $c=1 \mu\text{M}$. Gerjesztés: $\lambda=260$ nm; detektálás: $\lambda=550-800$ nm; oldószer: Tris-HCl (pH=7,4).

Az egyes vegyületek eredményeinek összevetésekor a következő megállapításokra juthatunk: konstans porfirin koncentráció és növekvő bakteriofág mennyiség mellett jelentős az emittált intenzitás növekedése TMPCP és TMPCP-4P esetében, azonban a konjugátum emissziójának növekedése elmarad az anyavegyületétől. A BMPCP-4P₂ spektruma még kisebb intenzitás emelkedést mutat, noha hőkezelt fág

jelenlétében a változás meredekebb, mint natív fág esetén. Mindhárom vegyület esetében igaz, hogy a telítési értékek magasabbnak adódnak, mint az izolált DNS-el végzett kísérletek során. BMPCP és TMPCP-AK jele itt sem mérhető. Az eredmények alapján képet alkothatunk arról, hogy az interkalált kötődési forma mely származékok esetében van jelen az alapvegyületek, illetve tetrapeptid konjugátumaik fággal való kölcsönhatásában.

5.1.4.4. Fluoreszcencia élettartam

A porfirinek egyetlen exponenciális függvénnyel illeszthető lecsengési görbéje polinukleotid jelenlétében már bi-exponenciális függvénnyel volt pontosan illeszthető. Két új élettartam jelenik meg, melyek hozzárendelhetők a két kötési formához. Az új származékok szabad formában és nukleoprotein komplex jelenlétében is mérésre kerültek. A kapott adatok a 6. táblázatban láthatók.

6. Táblázat A porfirinszármazékok fluoreszcencia élettartama τ (ns) szabad formában és natív illetve 65°C-on hőkezelt fág jelenlétében $r=20$ molarányánál. Oldószer: Tris-HCl (pH=7,4), porfirin koncentráció $c=1 \mu\text{M}$.

vegyület	szabad porfirin	natív fág		hőkezelt fág	
	τ_1 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
BMPCP-4P ₂	8,99	9,14		3,08	10,25
TMPCP	4,20	3,14	10,56	3,52	10,10
TMPCP-4P	4,90	3,13	9,87	3,19	9,74

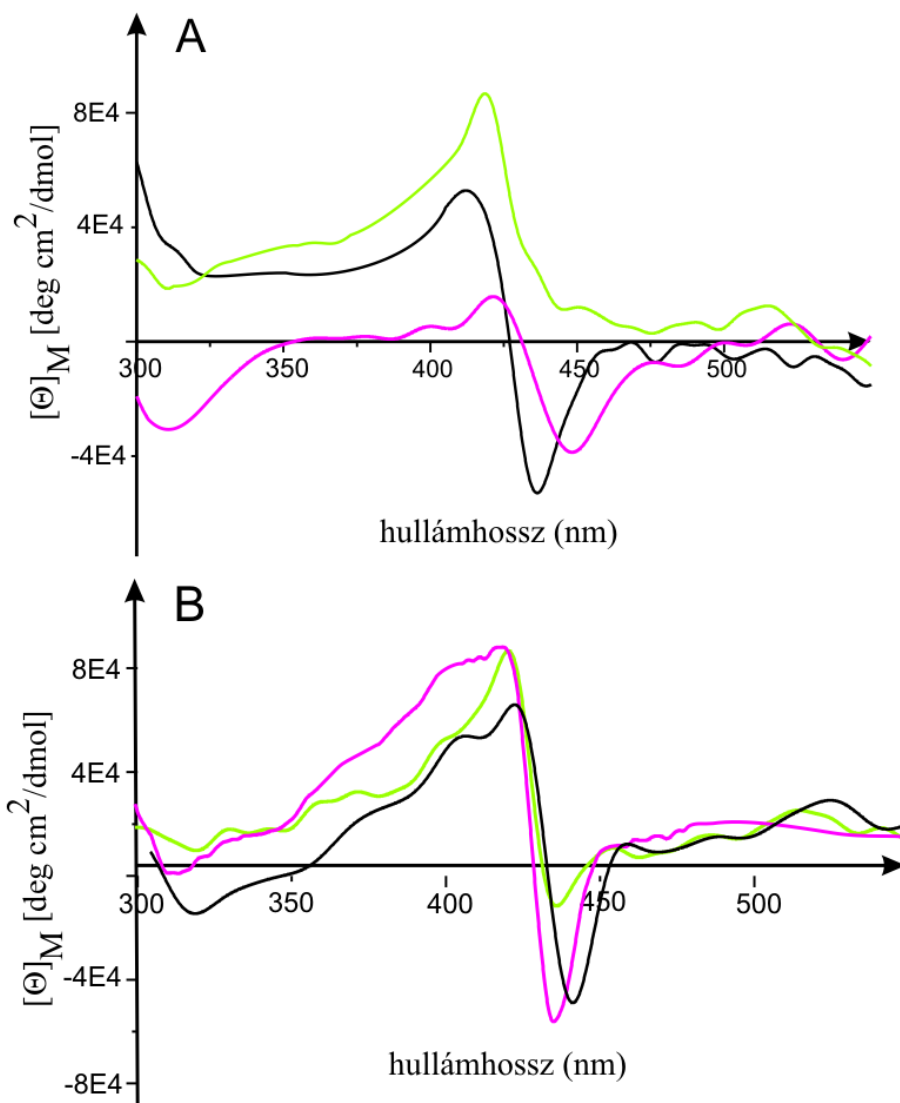
Irodalmi adatokból ismert, hogy négyszeresen pozitív töltésű porfirinek esetében a kisebb élettartam komponens az interkaláció létrejötte nyomán jelenik meg, míg a nagyobb a külső kötődés kialakulása következtében jön létre (80). Az új származékok vizsgálata során kapott eredmények jó korrelációt mutattak ezekkel a megállapításokkal, így értékes megfigyelések tehetők az egyes kötődési formák jelenlétéről.

A méréseket $r=20$ bázispár/porfirin arányoknál végeztük, figyelembe véve a többi módszer során tapasztalt magasabb telítési értékeket. A hosszabb élettartam-komponensek a 9,1 – 10,5 ns-os, míg a rövidebbek a 2,3 – 3,5 ns-os tartományba esnek, így ezek jó korrelációt mutatnak az irodalmi és saját korábbi adatainkkal. BMPCP esetében nem mutatható ki a szabad formától eltérő élettartam, TMPCP-AK esetében pedig nem illeszthető a görbe egyértelműen. Ennek oka feltételezhetően a polipeptiden található TMPCP molekulák egymáshoz képest eltérő mikro környezetében és ennek következtében eltérő lecsengési tulajdonságaiban keresendő. A BMPCP-4P₂ emissziós intenzitásának lecsengési görbéje egyetlen exponenciális függvénnyel bizonyult illeszhetőnek a natív fág esetében, viszont a 65°C-on hőkezelt és ezért meglazult kapszidburokkal rendelkező fág partikulum mellett már bi-exponenciális függvényillesztés volt csak kielégítő. TMPCP és TMPCP-4P esetében natív fágnál is mindkét kötési forma jelen van, hiszen az élettartam komponensek jelentősen eltérnek a szabad formáétól.

5.1.4.5. *Cirkuláris dikroizmus*

Az általunk vizsgált porfirinek a királis DNS kettős hélixhez való kötődésük következtében indukált CD jelet mutatnak a Soret-sávban. A pozitív indukált CD sáv megjelenése a külső kötődés, míg a negatív sáv az interkaláció jelenlétére utal. (84,85). Amennyiben aggregáció, vagy a külső kötődés stackinggel járó formái alakulnak ki, abban az esetben a CD jelek pozíciója, sorrendje változik.

T7 bakteriofág és annak 65°C-on hőkezelt formája jelenlétében is megvizsgáltuk a CD spektrumokat, amelyeket a 27. ábra szemléltet $r=30$ bázispár/porfirin molaránynál. BMPCP esetében nem kaptunk indukált CD jelet.



27. Ábra Natív fág („A”) és annak 65°C-on hőkezelt formája („B”) jelenlétében rögzített CD spektrumok ($r=30$). TMPCP (fekete), TMPCP-4P (bíbor), BMPCP-4P₂ (zöld). A porfirinek koncentrációja $c=1 \mu\text{M}$, az oldószer Tris-HCl puffer (pH=7,4). A CD sáv intenzitását moláris ellipticitásban fejeztük ki.

Látható, hogy mindhárom vegyület adott CD spektrumot nukleoprotein komplexszel való kölcsönhatásuk következtében. Főbb jellemzőik a $\lambda=410\text{-}420$ nm-es tartományban megmutatkozó pozitív sáv, a TMPCP és tetrapeptid konjugátuma esetében pedig $\lambda=440\text{-}450$ nm környékén egy negatív sáv. BMPCP-4P₂ csak pozitív sávval jelentkezik, melynek maximuma $\lambda=420$ nm körül van. A sávok maximumhelyeinek pozíciója, illetve az amplitúdók a kémiai szerkezet függvényében némileg eltérőek. A pozitív és negatív sávok egymáshoz viszonyított aránya különbözik az izolált DNS-sel végzett vizsgálat eredményeitől is.

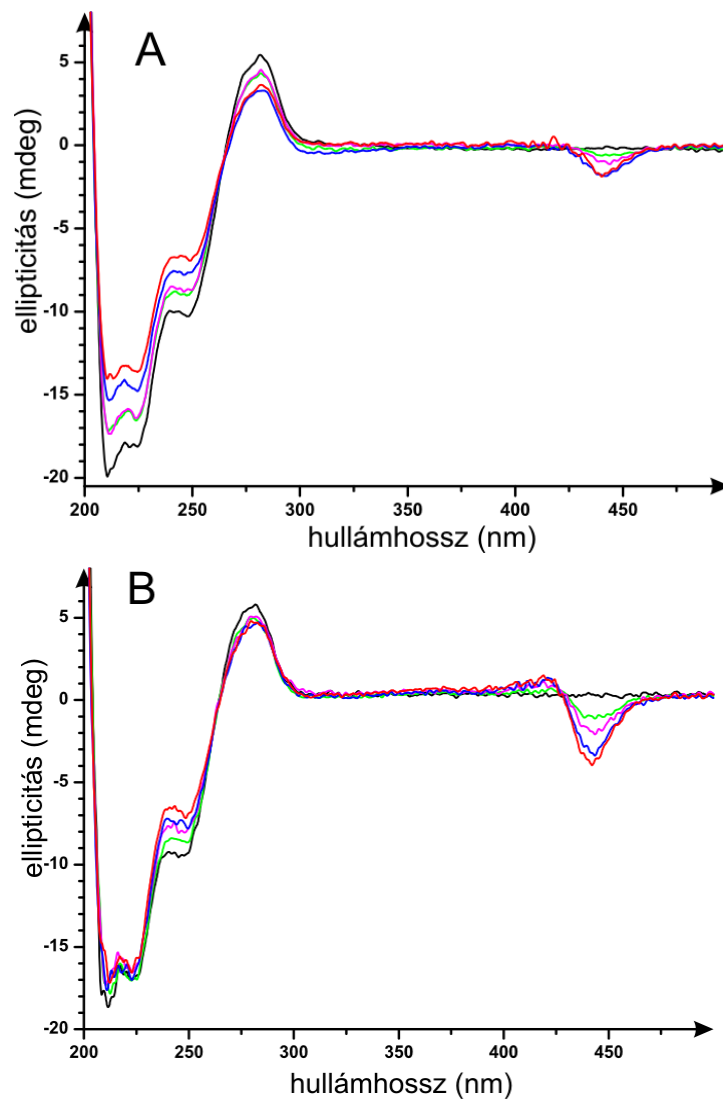
TMPCP esetében a negatív sáv valamivel dominánsabbnak bizonyult a pozitívénál. Ez a tendencia érvényes a TMPCP-4P-re is, noha kisebb moláris ellipticitású mindkét sáv, mint az anyavegyületnél. Hőkezelt nukleoprotein komplex jelenlétében a sávok amplitúdója növekszik, különösen szembetűnő ez TMPCP-4P esetében.

Az adatok vizsgálata jó kiindulási pont a kötési formák arányának, továbbá a kötődési hajlandóságnak a becsléséhez. A vizsgálat megfigyelhetővé teszi azt a jelenséget, hogy komplexebb harmadlagos nukleinsav-szerkezet következtében a konjugáció nem jelent egyértelmű előnyt a kötődésnél, különös tekintettel a bázispárok közé történő beilleszkedéssel járó interkaláció esetében. 65°C-on meglazított kapszid burok és ezért jobban hozzáférhető DNS esetében a három származék jelei egységesebbé válnak.

A BMPCP-4P₂ CD spektrometriás módszerrel vizsgálva nem is adja jelét interkalációs kölcsönhatás létrejöttének natív fág esetében és csak a hőkezelt formánál jelenik meg egy kisebb negatív jel. Ez egyáltalán nem meglepő, ha figyelembe vesszük a két tetrapeptid sztérikus hatását a kölcsönhatás kialakulására, hiszen ez a három származék közül a legnagyobb mértű molekula.

Megvizsgáltuk a natív T7 fágpartikulum porfirin kötődés hatására bekövetkező szerkezeti változásait is. A mérések során állandó nukleoprotein komplex mennyiség mellett növeltük a porfirin koncentrációját. A mintákban a fág abszorbanciáját A=2-re állítottuk $\lambda=260$ nm-en. Az arányokat 1/r-ben, vagyis porfirin/bázispár mólarányban adtuk meg.

A T7 nukleoprotein komplex CD spektrumának általunk vizsgált tartományában három elkülöníthető szakaszt fedezhetünk fel: a $\lambda=209-225$ nm között található sávot, mely az α -hélix szerkezetű kapszid fehérjékre jellemző, a $\lambda=245-255$ nm közötti régiót, mely a fehérjék és a DNS hélix jelének keveredéséből jön létre, továbbá a polinukleotidra jellemző, $\lambda=280$ nm-en maximummal rendelkező pozitív CD sávot. A mérések során kapott spektrumsorozatok láthatóak a 28. ábrán TMPCP és tetrapeptid konjugátuma esetében.

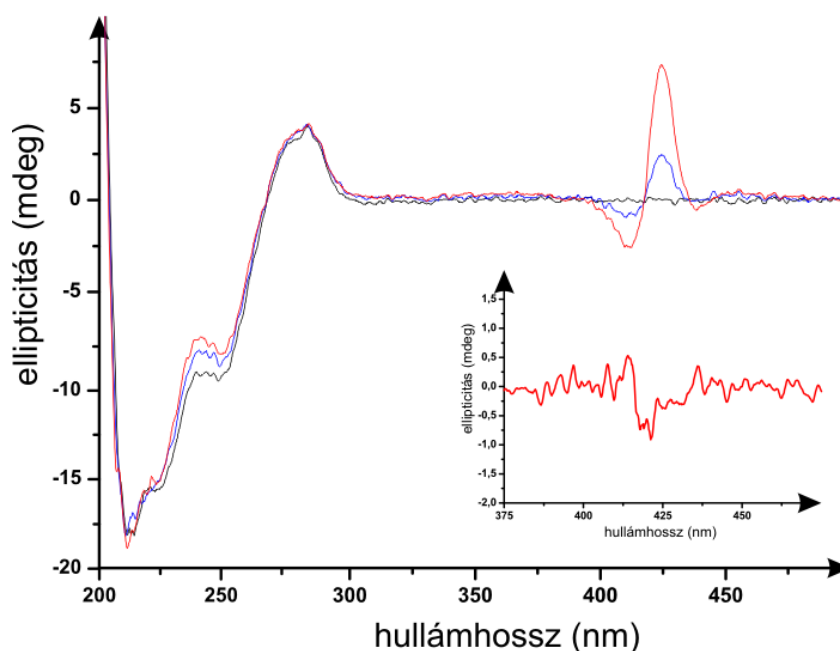


28. Ábra Natív T7 bakteriofág spektruma szabad formában (fekete) és növekvő porfirin/bázispár molarány ($1/r$) mellett TMPCP („A”, zöldtől pirosig $1/r=2-20$) és TMPCP-4P („B” zöldtől pirosig $1/r=2-19$) esetében, Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$). A fásra jellemző sávok $\lambda=200-300$ nm között találhatóak, a porfirinek indukált CD jeleinek tartománya $\lambda=370-490$ nm közé esik. A sávok intenzitását ellipticitásban fejeztük ki.

Megfigyelhetjük, hogy a TMPCP oldatbeli mennyiségének növelésével mindhárom bakteriofágra specifikus CD sáv amplitúdója csökken, a porfirin királisan perturbálja a kapszid fehérjét és a DNS-t is. A Soret-sáv indukált CD tartományában döntő módon a negatív jel amplitúdójának növekedését látjuk. Mint az előbbieken kimutattuk, alacsonyabb koncentrációjú TMPCP oldat faggal történő titrálása során

pozitív és negatív indukált CD sáv is megjelent a Soret sávban. TMPCP-4P esetében az alapvegyülettől eltérő változásokat láthatunk. A fág CD sávjai közül csak a $\lambda=245-255$ nm tartományban figyelhetünk meg változást a titrálás során, míg a tisztán a fehérjéktől és DNS-től származó jelek csak kisebb mértékben térnek el a konjugátum nélkül felvett spektrumuktól. Érdekes a Soret-sáv, ugyanis itt nagyobb amplitúdójú sávok jönnek létre, mint a konjugátlan TMPCP esetében, továbbá fontos különbség, hogy pozitív jel is kialakul.

A 29. ábrán a natív fág BMCP-4P₂ jelenlétében felvett spektrumai láthatóak.



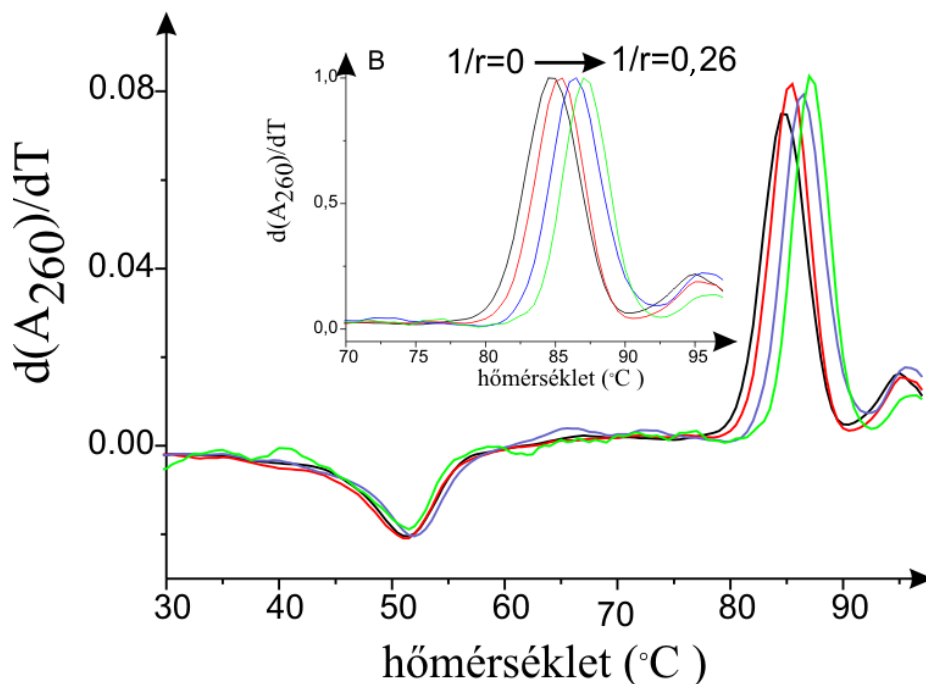
29. Ábra Natív bakteriofág CD spektruma szabad formában (fekete) és növekvő porfirin/bázipár molarány ($1/r$) mellett BMPCP-4P₂ ($1/r=8$ kék; $1/r=24$ piros) esetében, Tris-HCl pufferben ($pH=7,4$). A fágra jellemző sávok $\lambda=200-300$ nm között találhatóak, a porfirin indukált CD jeleinek tartománya $\lambda=370-490$ nm közé esik. A sávok intenzitását ellipticitásban fejeztük ki. A kiegészítő ábra a fággal és fág nélkül felvett spektrum különbségét mutatja a Soret sávban az $1/r=24$ aránynak megfelelő koncentrációknál.

BMPCP-4P₂ a fágos mérések során is a korábban látott aggregáció jeleit mutatta a titrálás koncentráció-tartományában, királis perturbáció a fágra jellemző tartományban csak $\lambda=240-250$ nm közt jelentkezett. A differencia spektrum alapján a Soret sávban nincs jelentős változás mely a DNS-kötődéshez lenne köthető.

5.1.4.6. Abszorpció és cirkuláris dikroizmus olvadási (melting) görbék

Annak megállapítása érdekében, hogy az új porfirin-származékok és kapszid fehérjék között létrejön-e tényleges kölcsönhatás, vagy pedig a fehérje CD változása csakis a DNS-kötődés következtében alakul ki, a fág abszorpció olvadási görbéit is elemeztük. Amennyiben létrejön kölcsönhatás a porfirinszármazékok és DNS illetve nukleoprotein komplex között, az hatással van a DNS és a fág stabilitására. Ha a hőmérséklet növelése mellett követjük a fényelnyelés változását 260 nm-en, a DNS abszorpció maximumán, a denaturációs folyamat megfigyelése további információval gazdagíthatja ismereteinket. Négyszeresen pozitív porfirinnel végzett korábbi vizsgálataink során az olvadási görbék alapján sikerült kizárnunk a fehérjekötődés lehetőségét (11, 89). Peptidek konjugációja a porfirinekhez természetesen felveti a lehetőségét az új származékok esetleges fehérjékkel kialakuló kölcsönhatásának. Az abszorpció spektrumok felbontása során a konjugátumok esetében sem tapasztaltuk a DNS kötődéshez köthető görbéken felüli komponensek megjelenését, azonban – mint azt láttuk – a spektrumfelbontás bonyolultabb rendszerekben nem ad teljesen kielégítő eredményt.

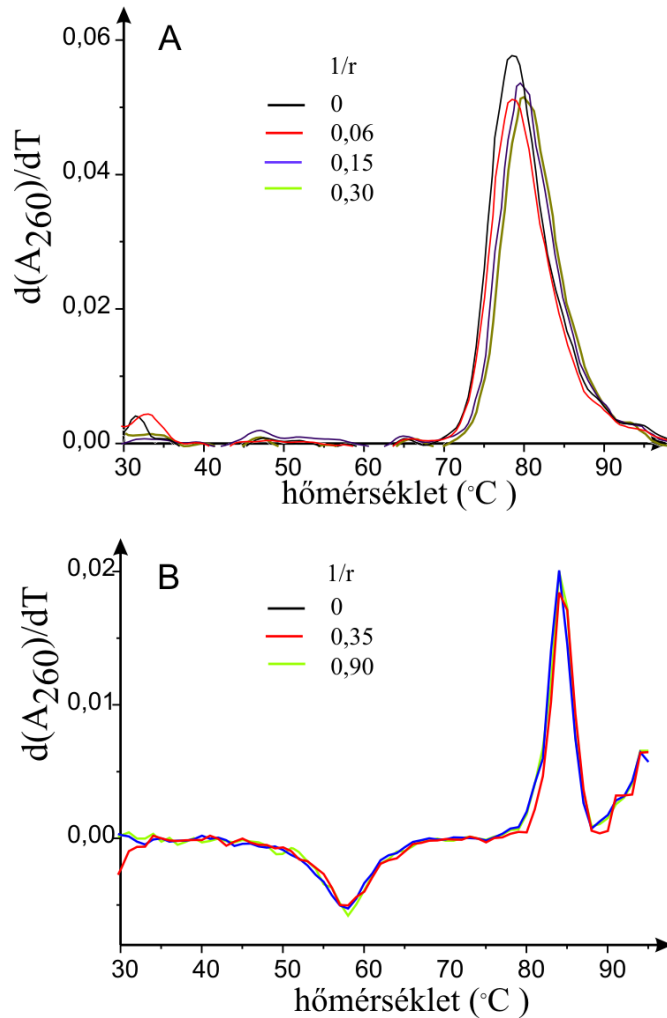
A porfirinek és konjugátumaik nukleoprotein komplexszel való kölcsönhatása során bekövetkező, a fág szerkezeti stabilitását érintő változásokat abszorpció olvadási görbék felvételével vizsgáltuk. T7 bakteriofág $\lambda=260$ nm-en, a DNS abszorpció maximumán felvett derivált abszorpció olvadási görbéje két jól elkülöníthető régióból áll. Az első egy negatív sáv 50 és 60°C között, mely a fágpartikulum kapszid burkának fellazulásához rendelhető. Ennek során a DNS részben kitéremkedik a kapszidból, és felveszi a standard B konformációt, elvesztve magasabb rendű szerveződését. A második egy pozitív sáv 85°C környékén, amely pedig a DNS kettős hélix fázisátalakulásának következménye: a H-kötések és egyéb „stacking” kölcsönhatások felbomlanak, a polinukleotid két szála elválik egymástól (89). Ha a fág kapszidfehérjei vagy polinukleotidja kölcsönhatásba lép egy új molekulával, az a fent említett melting hőmérsékletek eltolódását okozza. Így a porfirinek jelenléte mellett létrejövő esetleges változások alapján következtethetünk a fágpartikulumhoz történő kötődésre. Az 30. ábrán a T7 bakteriofág TMPCP-4P jelenlétében felvett derivált melting görbéje látható.



30. Ábra T7 bakteriofág $\lambda=260$ nm-en detektált derivált abszorpciós olvadási görbéje szabad formában (fekete) és növekvő porfirin/bázispár molarányok ($1/r$) mellett TMPCP-4P esetében (pirostól zöldig $1/r=0,06 - 0,26$). Oldószer: Tris-HCl puffer ($pH=7,4$). A kiegészítő ábra a 70-100 °C közötti tartomány normalizált görbéit mutatja.

Megfigyelhető, hogy porfirin/bázispár molarány növelésével a DNS fázisátalakulási hőmérséklete emelkedik, tehát TMPCP-4P jelenlétében stabilizálódik a kettőszálú DNS. Ez egyértelműen a kötődés következménye. Nem látható eltolódás viszont a fehérjék denaturációját jelző 50°C körüli negatív sáv esetében. Az abszorpciós melting alapján a kapszid stabilitása porfirin-konjugátum jelenlétében sem változik. Hasonló eredményeket kaptunk BMPCP-4P₂ vizsgálata során, továbbá a TMPCP esetében is.

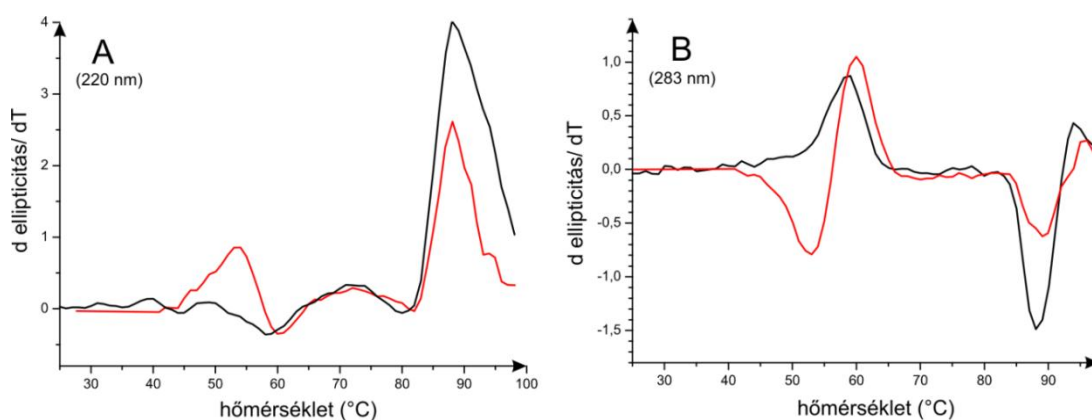
A TMPCP-AK jelenlétében bekövetkező változásokat is vizsgáltuk, és izolált DNS-sel is elvégeztük az abszorpciós olvadási görbék mérését. Az eredményeket a 31. ábra mutatja be.



31. Ábra Izolált DNS („A'”) és T7 bakteriofág („B'”) $\lambda=260$ nm-en detektált derivált abszorpciós oladási görbéje szabad formában (fekete) és növekvő porfirin/bázispár mólarányok ($1/r$) mellett TMPCP-AK esetében (pirostól zöldig $1/r=0,06 - 0,30$ illetve $0 - 0,90$). Oldószer: Tris-HCl puffer (pH=7,4).

A DNS két szálának szétválása TMPCP-AK jelenlétében enyhén magasabb hőmérsékletre tolódik. Ez nagyjából 1°C növekedést jelent még 0,8 porfirin/bázispár arány ($1/r$) mellett is. A kapszidba zárt DNS denaturációs hőmérsékletére viszont a TMPCP-AK jelenlétének nincs számottevő befolyása. Nincs változás a fág kapszid fellazulásának hőmérséklettartományában magasabb TMPCP-AK koncentrációk mellett sem. Ez a porfirin-származék nincs hatással a fehérjeburok stabilitására, illetve a kapszid-DNS kölcsönhatásra, és a DNS fázisátalakulási hőmérsékletét sem változtatja meg.

A denaturáció folyamatát CD spektrométerrel is követtük TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ kölcsönhatása során. A CD melting előnye az abszorpciós méréshez képest, hogy a fehérje és a DNS fázisátalakulásai külön-külön vizsgálhatóak. Két hullámhosszon végeztünk mérést: $\lambda=220$ nm-en a kapszid fehérjék sávjában illetve $\lambda=283$ nm-en a DNS pozitív CD jelének maximumhelyén. A 32. ábra a két mérési beállítással felvett spektrumok derivált görbéit mutatja be.



32. Ábra T7 bakteriofág derivált CD olvadási görbéi $\lambda=220$ nm-en („A”) és $\lambda=283$ nm-en („B”) detektálva, szabad formában (fekete) és $1/r=0,3$ porfirin/bázispár molaránynál TMPCP-4P esetében (piros) Oldószer: Tris-HCl puffer (pH=7,4).

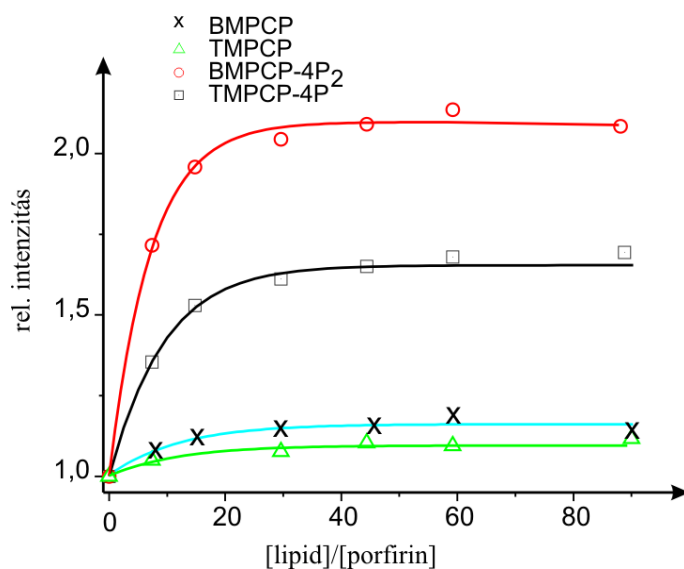
A csak fágot tartalmazó oldatról felvett spektrumokon látható, hogy mindkét hullámhosszon CD jel változás következik be 50-60°C és 80-90°C között is. Ha megnézzük a TMPCP-4P jelenlétében mért derivált olvadási görbéket egyértelmű változást láthatunk mindkét hullámhosszon és mindkét hőmérséklet tartományban. Hasonló spektrumokat regisztráltunk TMPCP illetve BMPCP-4P₂ és fág kölcsönhatásakor is. Ez eltér az abszorpciós olvadási görbék változásától. Úgy tűnik az a módszer nem rendelkezett kellő érzékenységgel a fehérjeburok kölcsönhatásait illetően.

5.1.5. A porfirin származékok kölcsönhatása liposzómákkal

A biológiai membránok lipid komponenseinek egyszerű modelljeként unilamelláris liposzómákat használtunk. A lipid és vizes fázis közötti megoszlás vizsgálata alapot szolgáltat arra, hogy megbecsülhessük a biológiai membránok relatív permeabilitását a porfirin származékokra nézve.

Kis unilamelláris vezikulumokat (SUV) ikerionos fejcsoporttal (DPPC) rendelkező foszfolipidekből állítottunk elő. Ezen modellrendszer kölcsönhatását porfirinekkel fluorimetriásan követtük. A mérések során a porfirin koncentráció $0,1 \mu\text{M}$ volt, ekkor még a molekulák jelentős része monomer formában van jelen az oldatban.

Ahogy az a 33. ábrán látszik, a TMPCP, BMPCP és tetrapeptid konjugátumaik fluoreszcencia intenzitása növekedést mutat a liposzómák jelenlétében. Ez egyértelmű jele a vezikulumok és a kationos porfirinek között kialakuló kölcsönhatásnak. TMPCP-AK intenzitása csak kis mértékben változott, az ábrán nem szerepeltetjük.



33. Ábra A porfirinek relatív fluoreszcencia intenzitása az emissziós maximumon mérve a DPPC/porfirin molarány függvényében. BMPCP (kék), TMPCP (zöld), BMPCP-4P₂ (piros), TMPCP-4P (fekete). Gerjesztés: $\lambda=422 \text{ nm}$.

A porfirinek asszociációs állandóit a IX. és X. képlet alapján határoztuk meg az értékek pedig az 7. táblázatban láthatók.

7. Táblázat A porfirinszármazékok asszociációs állandói DPPC liposzómákhoz, foszfát pufferben (pH=7,4).

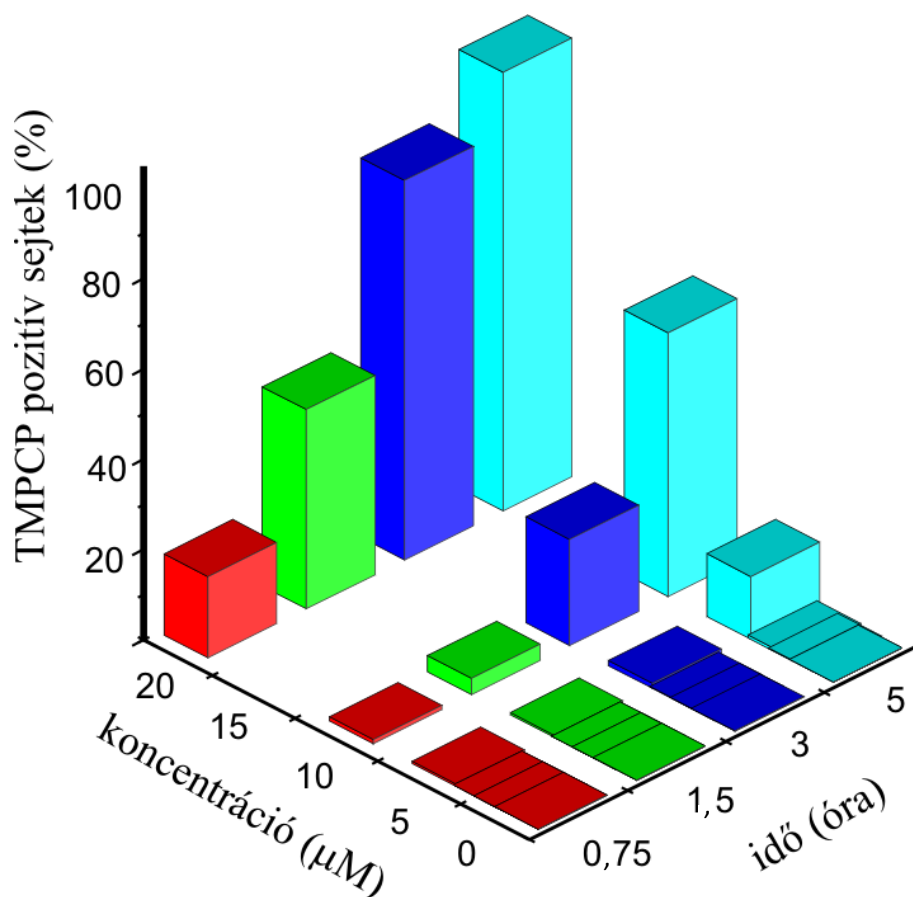
vegyület	K_L (M^{-1})
BMPCP	$5,2 \cdot 10^4$
BMPCP-4P ₂	$2,5 \cdot 10^5$
TMPCP	$3,7 \cdot 10^4$
TMPCP-4P	$1,6 \cdot 10^5$
TMPCP-AK	$<10^3$

5.1.6. Sejtfelvétel

HL-60 sejteket 200 μ M-ig terjedő koncentráció tartományban kezeltük a porfirin származékokkal különböző inkubációs időket alkalmazva. A sejtekbe jutott porfirineket fluoreszcenciájuk alapján követtük áramlási citométerrel.

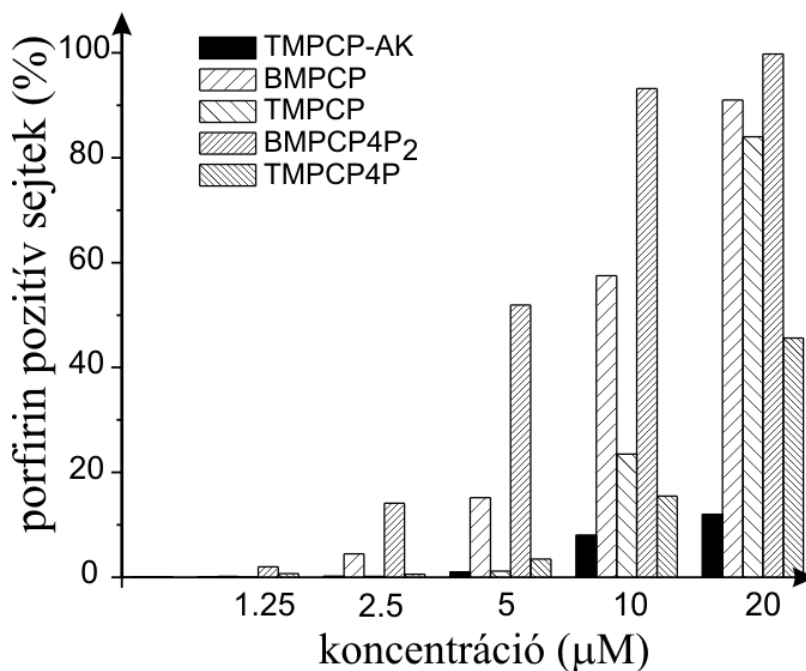
Első lépésben toxicitási vizsgálatokat végeztünk, mely során fény derült arra, hogy a vizsgált vegyületek közül egyik sem toxikus 50 μ M és 5 órás inkubációs időtartamig. 50 μ M felett a TMPCP-AK toxicitása a koncentráció függvényében fokozatosan növekszik.

Ahogy az 34. ábrán látszik a TMPCP esetében, a porfirinre jellemző fluoreszcenciát kibocsátó sejtek aránya a koncentrációtól és az inkubációs időtől függő módon növekszik.



34. Ábra TMPCP pozitív sejtek százalékos aránya HL-60 sejtekben különböző TMPCP inkubációs időknél és koncentrációknál.

3 óra eltelte után a 20 μM TMPCP-t tartalmazó médiummal kezelt sejtek szinte 100 %-a felvette a vizsgált vegyületet. BMPCP, BMPCP-4P₂, TMPCP és TMPCP-4P esetében is hasonló mintázatot találtunk, míg a telítési értéket különböző koncentrációknál értük el. A 35. ábrán látható az öt különböző származék sejt felvételének összehasonlítása 3 órás inkubációt követően és különböző koncentrációknál.



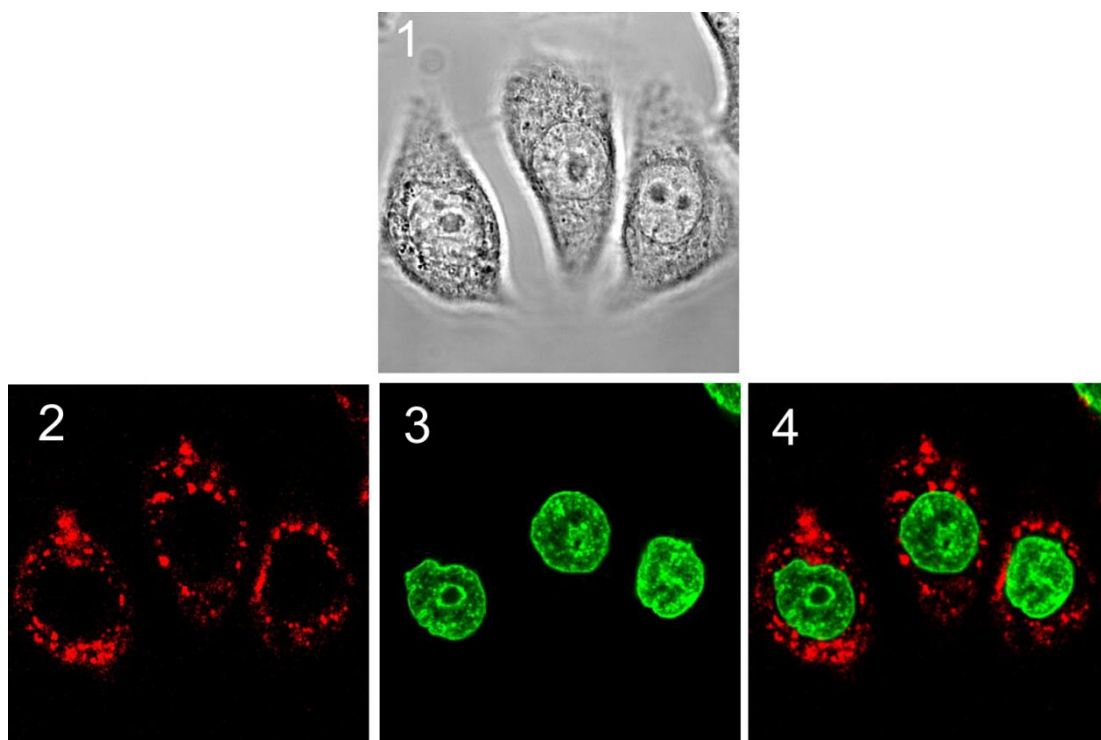
35. Ábra A porfirin származékok sejtfelvételének összehasonlítása különböző inkubációs koncentrációk esetében. Az inkubáció időtartama 3 óra volt.

A legnagyobb arányban a BMPCP-4P₂ jutott be, a többi származék pedig az alábbi sorrendben követte: BMPCP > TMPCP > TMPCP-4P >> TMPCP-AK

5.1.7. Sejten belüli elhelyezkedés

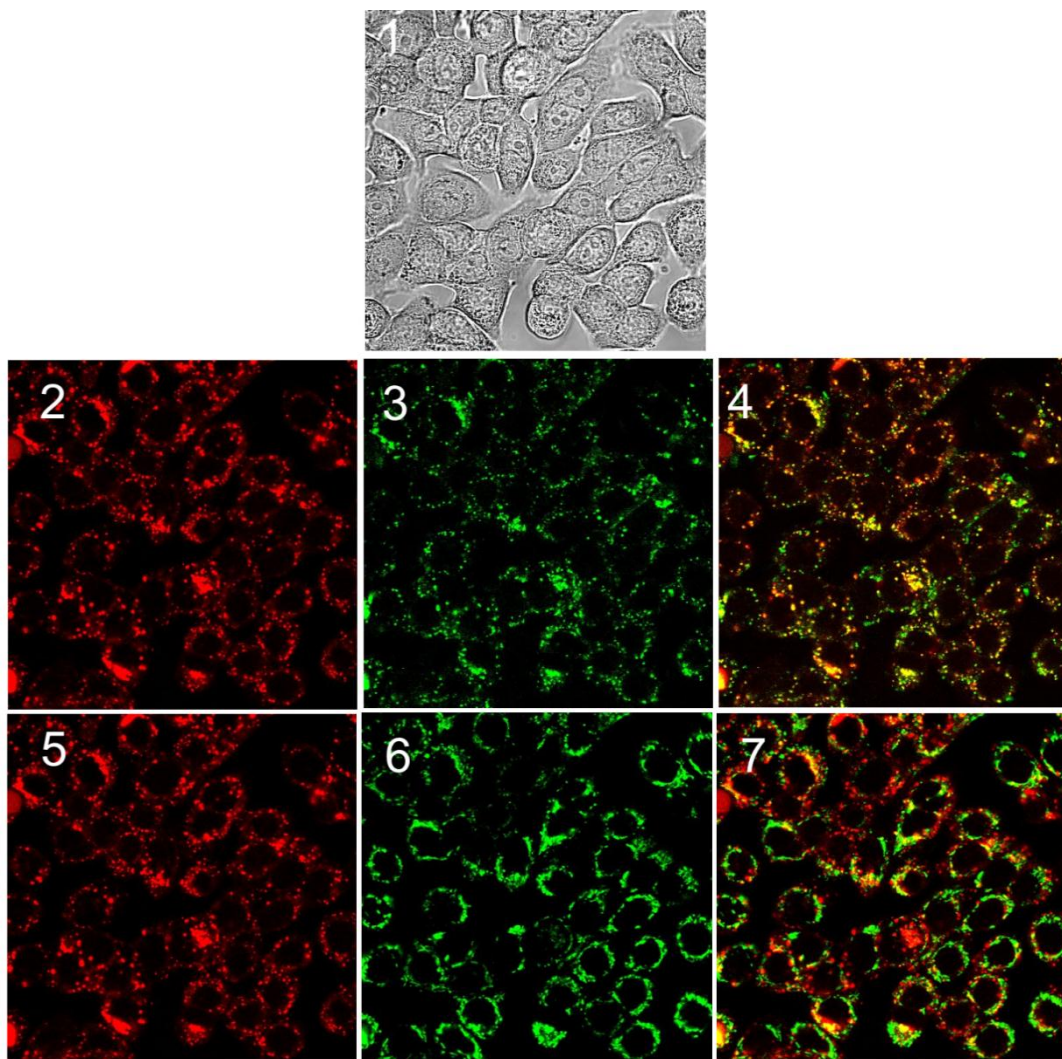
A porfirin származékok sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkópia segítségével állapítottuk meg 3 órás inkubációt követően. A médium porfirin koncentrációja egyöntetűen 20 μM volt. A sejtmagot, a lizozómákat és a mitokondriumokat organellum-specifikus fluoreszcens festékekkel jelöltük meg.

Sem a szabad kationos porfirinek, sem pedig tetrapeptid konjugátumaik nem mutattak kolokalizációt a sejtmagban szelektíven feldúsuló SYBR Green I festékkel. Ezt szemlélteti a 36. ábra BMPCP-4P₂ esetében.

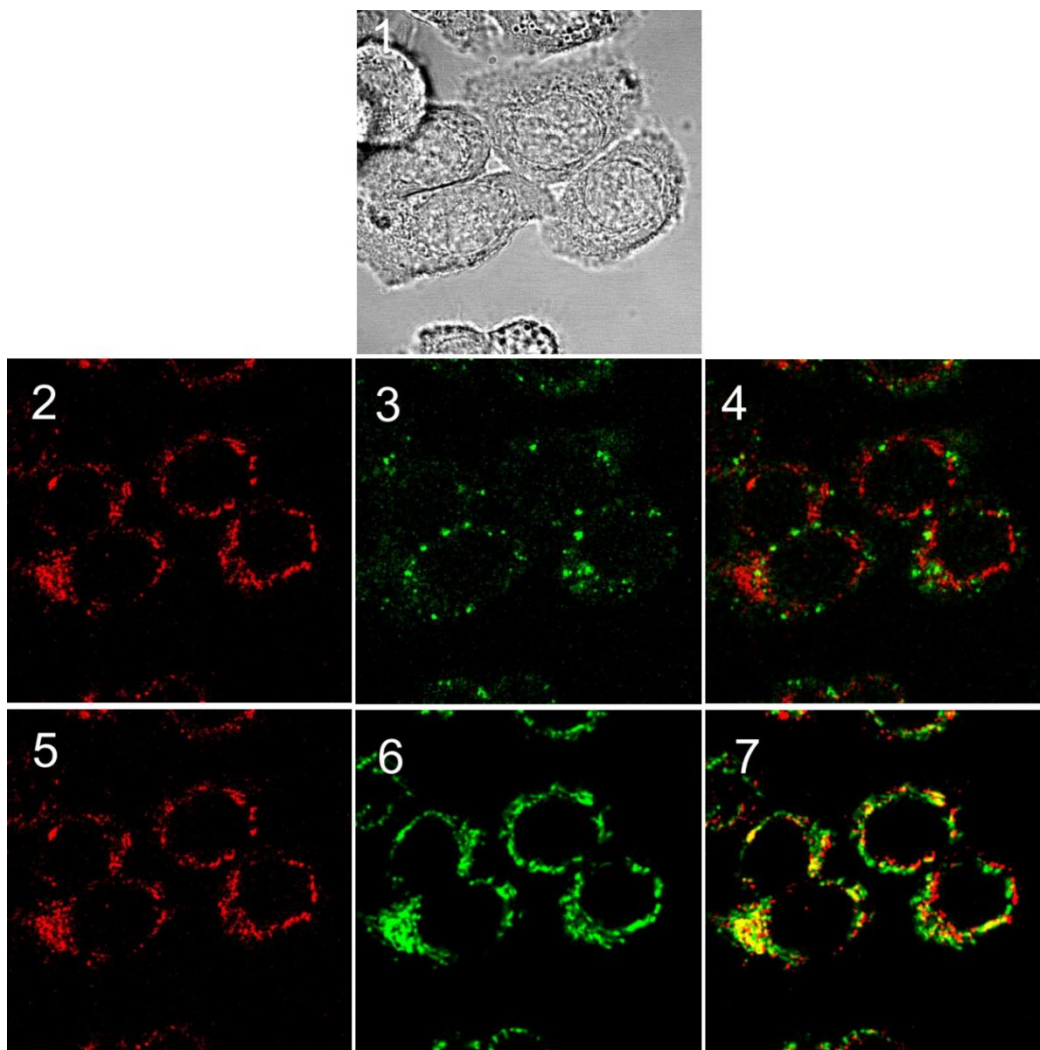


36. Ábra BMPCP-4P₂ és SYBR Green I sejtmag specifikus festék intracelluláris elhelyezkedése HT-29 sejtekben. (1) transzmissziós kép; (2) BMPCP-4P₂ fluoreszcenciája; (3) sejtmagok SYBR Green I festékkel jelölve; (4) BMPCP-4P₂ és SYBR Green I jelei együtt. Az inkubációs idő BMPCP-4P₂ esetében 3 óra, SYBR Green I esetében 30 perc volt. Inkubációs koncentráció: BMPCP-4P₂ c=20 μM; SYBR Green I c=400 nM.

A BMPCP, TMPCP és tetrapeptid konjugátumaik a lizoszóma specifikus LysoTracker Green DND-26 és a mitokondrium szelektív MitoTracker Deep Red FM festékekkel mutattak közös feldúsulást. A 37. ábrán ennek az eloszlásnak egy példája látható BMPCP-4P₂ esetében HT-29 sejteken. A porfirint piros, míg a festékeket zöld szín jelzi, a kolokalizáló képletek ebből következően sárga színnel jelennek meg. A 38. ábra pedig TMPCP-AK eloszlását mutatja.



37. Ábra BMPCP-4P₂ és LysoTracker Green DND-26 lizoszómafesték illetve MitoTracker Deep Red FM mitokondriumfesték intracelluláris elhelyezkedése HT-29 sejtekben. (1) transzmissziós kép; (2) BMPCP-4P₂ fluoreszcenciája; (3) lizoszómák LysoTracker Green DND-26 festékkal jelölve; (4) BMPCP-4P₂ és LysoTracker Green DND-26 jelei együtt; (5) BMPCP-4P₂ fluoreszcenciája; (6) mitokondriumok MitoTracker Deep Red FM festékkal jelölve; (7) BMPCP-4P₂ és MitoTracker Deep Red FM jelei együtt. Az inkubációs idő BMPCP-4P₂ esetében 3 óra, a festékek esetében 30 perc volt. Inkubációs koncentráció: BMPCP-4P₂ c=20 μM; fluoreszcens festékek c=50 nM.



38. Ábra TMPCP-AK és LysoTracker Green DND-26 lizoszómafesték illetve MitoTracker Deep Red FM mitokondriumfesték intracelluláris elhelyezkedése HT-29 sejtekben. (1) transzmissziós kép; (2) TMPCP-AK fluoreszcenciája; (3) lizoszómák LysoTracker Green DND-26 festékekkel jelölve; (4) TMPCP-AK és LysoTracker Green DND-26 jelei együtt; (5) TMPCP-AK fluoreszcenciája; (6) mitokondriumok MitoTracker Deep Red FM festékekkel jelölve; (7) TMPCP-AK és MitoTracker Deep Red FM jelei együtt. Az inkubációs idő TMPCP-AK esetében 3 óra, a festékek esetében 30 perc volt. Inkubációs koncentráció: TMPCP-AK $c=20 \mu\text{M}$; fluoreszcens festékek $c=50 \text{ nM}$.

A képeken látható, hogy a BMPCP-4P₂ nagyobb részben a lizoszómákat jelölő festékekkel található azonos helyen, míg a mitokondriumokra jellemző mintázattal csak korlátozott egyezés fedezhető fel. A lizoszómákban való elhelyezkedés a konjugátlan TMPCP esetében adódott a leghatározottabbnak. A TMPCP-AK az előbbiekkal szemben alig mutatott egyezést a lizoszómákkal, inkább a mitokondriumokban és egyéb a citoplazmában található képletekben dúsult fel.

5.2. Daunorubicin aminosav konjugátumok

Kutatócsoportunk többféle célzó-és hordozópeptidet vizsgál, melyeket lizoszómális enzimekre érzékeny „spacer” peptideken keresztül tervezünk daunorubicinhez kapcsolni. Ezek a peptid-konjugátumok a lizoszómákban elbomlanak és felszabadul a daunorubicin, azonban legalább egy aminosav kötve marad a hatóanyaghoz. A daunorubicin a sejtmagban dúsul fel, de tisztázni szükséges, vajon megtartja-e a biológiai hatáshoz szükséges DNS-kötési képességét.

5.2.1. Szintézis

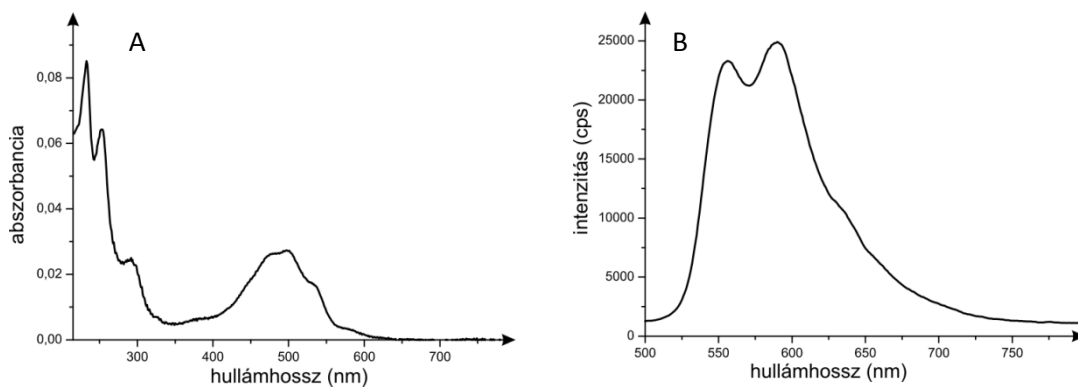
Három daunorubicin konjugátumot hoztunk létre arginin, leucin és glicin felhasználásával (Dau-Arg, Dau-Leu, Dau-Gly). Az aminosavakat amidkötésen keresztül kapcsoltuk a hatóanyag daunosamin molekuláris részének aminocsoportjához BOP vagy PyBOP reagens segítségével a korábban leírtak szerint. A termékeket RP-HPLC és ESI-MS segítségével tisztítottuk, azonosítottuk és jellemeztük. A három új származék nagyobb daunorubicin peptid konjugátumok lehetséges metabolitjai.

5.2.2. Spektroszkópiai tulajdonságok

A kutatócsoportunk által előállított új daunorubicin aminosav konjugátumok (Dau-Arg, Dau-Leu, Dau-Gly) spektrális tulajdonságai nem tértek el jelentősen az anyavegyület spektrumától (77, 78, 128).

Abszorpciós spektrumukra pH=7.4-es Tris-HCl pufferoldatban, kölcsönhatásoktól mentes állapotban jellemző, hogy mind az ultraibolya, mind pedig a látható tartományban rendelkeznek elnyelési sávokkal. Jellemző abszorpciós csúcsokat találhatunk $\lambda=234$, 252 és 290 nm-en, a látható tartományban jelentkező intenzív elnyelési sáv maximuma elnyújtott, két kisebb csúccsal $\lambda=480$ és 500 nm-en, továbbá említésre érdemes még az $\lambda=532$ nm-en található töréspont az előbbi abszorpciós sáv leszálló ágán. A kötődési vizsgálatok során a $\lambda=400$ és 600 nm közötti sávot figyeltük meg részletesen.

A kötődések jellemzése szempontjából elengedhetetlen a daunorubicin származékok fluoreszcencia emissziós spektrumának vizsgálata. $\lambda=480$ nm-en való gerjesztés hatására széles emissziós spektrumot mérhetünk az új származékok esetében $\lambda=495$ nm és $\lambda=800$ nm között, melyen két markáns csúcsot különíthetünk el $\lambda=555$ és $\lambda=595$ nm-en. Amennyiben polinukleotidhoz kötődik a vegyület, a széles tartományban detektálható emisszió drasztikus csökkenése tapasztalható. Az abszorpciós és emissziós spektrumok szemléltetése Dau-Arg esetében a 39. ábrán látható.



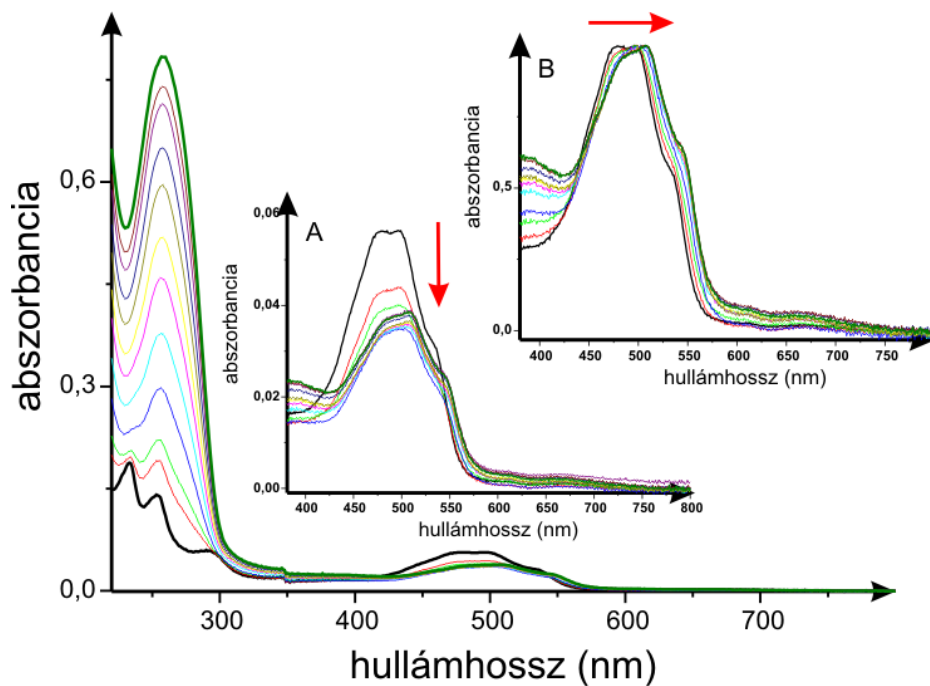
39. Ábra Dau-Arg abszorpciós („A”) és emissziós („B”) spektruma $c=10 \mu\text{M}$ koncentrációnál, Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$). Az emissziós spektrum felvételéhez a gerjesztés $\lambda=480$ nm-en történt.

Az előbbieket kiegészítésére cirkuláris dikroizmus méréseket is érdemes végezni. A daunorubicin és származékai kölcsönhatásmentes állapotban mérhető CD jelet adnak az ultraibolya és a látható tartományban is, $\lambda=225$ és 265 nm között egy intenzív pozitív jelet, $\lambda=275$ és 310 nm között egy kisebb negatív sávot és $\lambda=325$ - 550 nm tartományban egy elnyújtott, két csúccsal rendelkező jelet. Polinukleotidhoz történő kötődés során a CD jelek komplex változást szenvednek, ezért a kiértékelésük nehezebb és kevésbé szemléletes, mint az a porfirinek esetében volt.

5.2.3. Kötődés izolált DNS-hez

5.2.3.1. Abszorpciós spektroszkópia

A daunorubicin kölcsönhatása DNS-sel fontos lépése annak a molekuláris folyamatnak, amelyen keresztül gátolni képes a DNS replikációját. Ezért a szerkezetmódosításon átesett származékok esetében lényeges megvizsgálni azt, hogy a változtatások mennyiben befolyásolják a kötődést. Az ehhez vezető úton első lépésben az abszorpciós spektrumokat vizsgáltuk meg. A spektrumokat egyöntetűen $c=10\ \mu\text{M}$ -os daunorubicin koncentráció és változó DNS mennyiség mellett vettünk fel. Szemléltetésként a 40. ábrán láthatjuk a Dau-Arg konjugátum spektrumát növekvő DNS koncentráció mellett. A kiegészítő ábrák a $\lambda=400-600\ \text{nm}$ közti tartományt emelik ki.



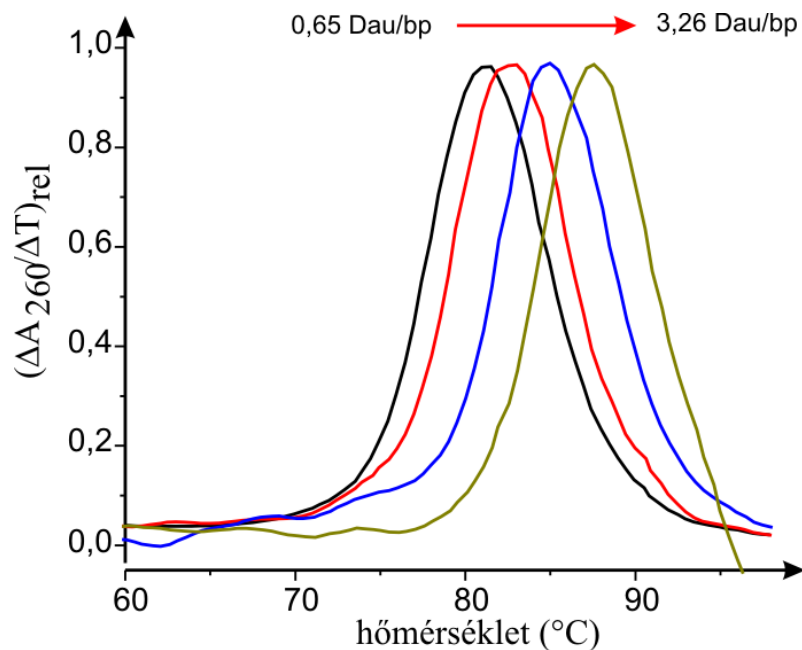
40. Ábra Dau-Arg abszorpciós spektruma növekvő izolált DNS koncentráció mellett Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$). Dau-Arg önmagában $c=10\ \mu\text{M}$ (fekete); különböző izolált DNS mennyiségek esetében (pirostól zöldig) bázispár/Dau-Arg molarány = 0,5-4. „A” kiegészítő ábra: 400-600 nm tartomány lévő sáv kiemelése. „B” kiegészítő ábra: maximumra normált spektrumok.

A 40. ábra „A” és „B” részén láthatjuk, hogy növekvő bázispár/Dau molarány mellett batokróóm és hipokróóm változás tapasztalható a vegyület $\lambda=400-600\ \text{nm}$ tartományban jelentkező abszorpciós sávjában. Ez a kötődés létrejöttét mutatja.

Mindhárom új származék elnyelési színe hasonló módon viselkedett, és a változás jellege nem tért el a velük párhuzamosan vizsgált konjugátlan daunorubicin spektrumától sem, azonban az egyes származékok közt némi különbség mutatkozott az eltolódások mértékében.

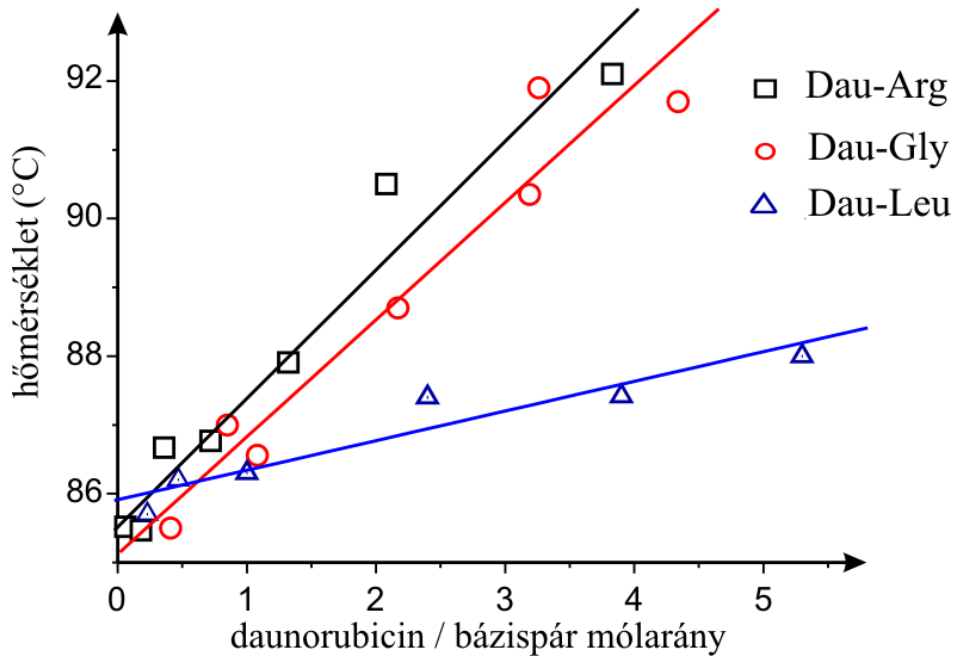
5.2.3.2. Abszorpciós olvadási (melting) görbék

260 nm-en, a DNS abszorpciós maximumán figyeltük meg a fényelnyelés hőmérséklet hatására bekövetkező változását daunorubicin származék jelenléte nélkül illetve különböző hatóanyag koncentrációk mellett. A derivált melting görbén markáns pozitív irányú változást figyelhetünk meg 80-85°C környékén, amikor a DNS két szála elválik egymástól. Amennyiben molekulák kötődnek a polinukleotidhoz, stabilizálják a kettős szálú struktúrát és az említett melting csúcs néhány fokkal magasabb hőmérsékletre tolódik. Ennek lehetünk tanúi a 41. ábrán a glicines konjugátum esetében, állandó DNS és növekvő daunorubicin koncentráció mellett. A koncentráció-arányokat daunorubicin/bázispár molarányként fejeztük ki.



41. Ábra A DNS derivált abszorpciós olvadási görbéje Dau-Gly nélkül ($c_{bázispár}=3 \mu M$, fekete) és növekvő Dau-Gly koncentráció esetében (pirostól zöldig).

Láthatjuk, hogy a kötődő hatóanyag jelentős mértékben megváltoztatja a DNS denaturációjának hőmérsékletét, mely nagy valószínűséggel az interkalációs kötődés eredménye. A hőmérséklet-eltolódás mértéke a kémiai összetétel függvényében változott. Ennek összevetése látható a 42. ábrán.

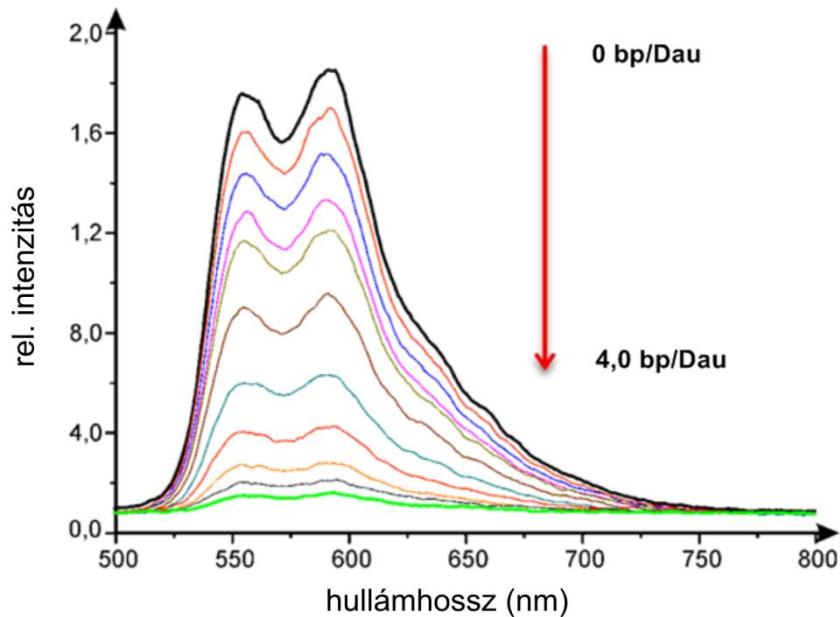


42. Ábra A DNS fázisátalakulási hőmérsékletének eltolódása a három konjugátum esetén a daunorubicin/bázispár molarány függvényében. Dau-Arg (fekete négyzet); Dau-Gly (piros kör); Dau-Leu (lila háromszög)

A daunorubicin arginines és glicines konjugátuma közel hasonló mértékben volt hatással a polinukleotid két láncának stabilitására, míg a leucinos konjugátum enyhébb mértékben befolyásolta azt. Ezek alapján közelítő képet alakíthatunk ki a kötődési affinitásokról, azonban a pontosabb meghatározáshoz további módszerekre van szükség.

5.2.3.3. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia

Annak érdekében, hogy az abszorpciós spektrumoknál észlelt eltéréseket kvantitatív módon is megfogalmazhassuk, az fluoreszcencia emissziós színeképeket is regisztráltuk.



43. ábra Dau-Arg floureszcencia emissziós spektruma szabad formában, $c=10 \mu\text{M}$ koncentrációnál Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$), $\lambda=480 \text{ nm}$ -es gerjesztésnél (fekete); és izolált DNS jelenlétében $\text{bp/Dau}=0,5-4,0$ bázispár/daunorubicin mólarányánál (pirostól zöldig) Tris-HCl pufferben ($\text{pH}=7,4$).

A daunorubicin és DNS kölcsönhatását a legjobb közelítéssel leíró modell a McGhee és Von Hippel által megfogalmazott „szomszéd-kizárásos modell” (neighbour exclusion model) (13). A modell segítségével a kísérletes adatokból meghatározható a kötődési állandó (4.9. fejezet). Ennek alapján kiszámítottuk a kötődési állandókat mind az anyavegyület, mind pedig a konjugátumok esetében, ezt foglalja össze a 8. táblázat.

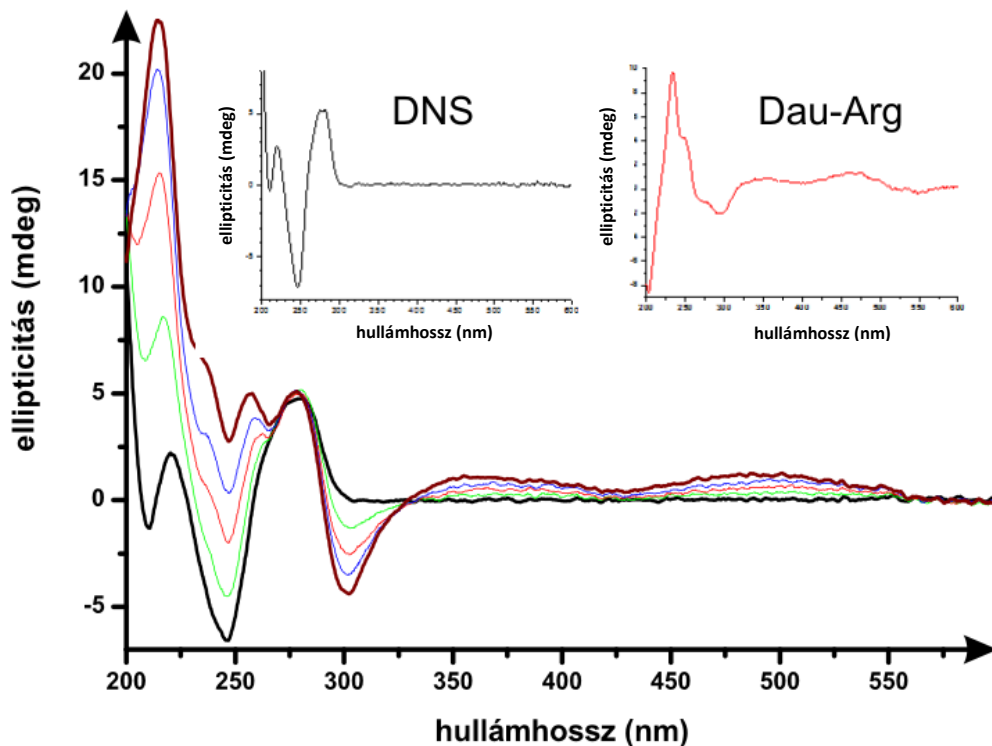
8. Táblázat Konjugálatlan daunorubicin és Dau-Arg, Dau-Leu, Dau-Gly egyensúlyi kötődési állandója (K_a) izolált DNS esetében.

Vegyület	$K_a (M^{-1})$
Dau	$1,2 \times 10^6$
Dau-Arg	$6,1 \times 10^5$
Dau-Leu	$3,6 \times 10^5$
Dau-Gly	$3,2 \times 10^5$

Ahogy az látható, a szabad daunorubicin mutatta a legnagyobb affinitást a DNS-hez, míg az aminosav konjugátumok egy nagyságrenddel gyengébben kötődnek. Ezek közül az arginines konjugátum rendelkezik a legnagyobb kötődési állandóval, míg a leucinos és glicines származék ettől némileg kisebb és egymáshoz hasonló affinitással rendelkezik.

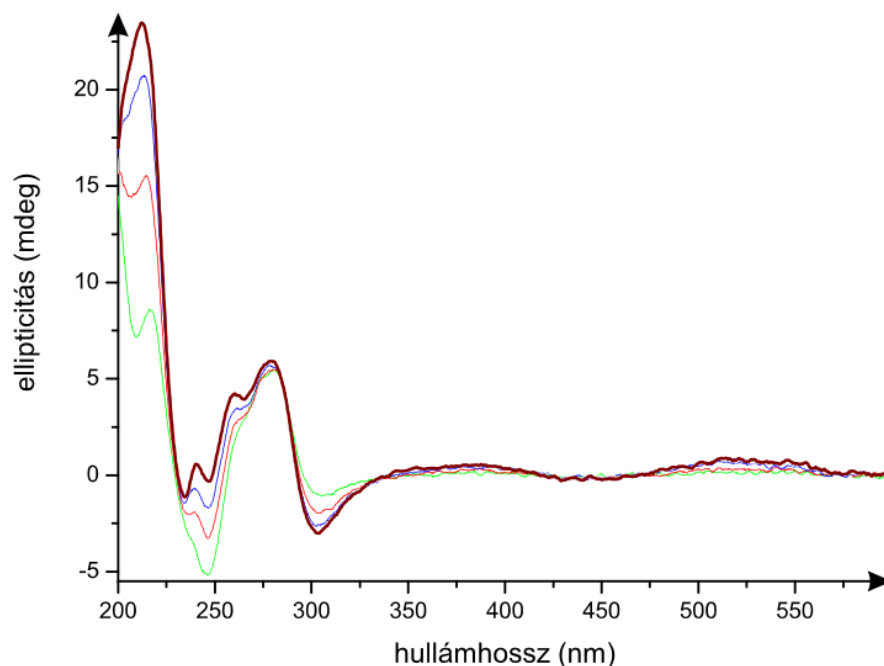
5.2.3.4. Cirkuláris dikroizmus

A cirkuláris dikroizmus görbék felvételével arra kerestük a választ, hogy milyen változás következik be a DNS szerkezetében a daunorubicin konjugátumok kötődésének következtében. Fontos azonban kiemelni, hogy ellentétben az általunk vizsgált porfirin származékokkal, a daunorubicinek szabad állapotukban is intenzív CD jelet adnak, mely a DNS-re jellemző tartományt is érinti. A 44. ábrán látható spektrumsorozat növekvő daunorubicin/bázispár molarány mellett került kimérésre.



44. Ábra Izolált DNS és Dau-Arg tartalmú oldatok CD spektrumai. DNS szabadon (fekete) és Dau/bp=0,5-4,0 daunorubicin/bázispár arányoknál (zöldtől barnáig) Tris-HCl pufferben (pH=7,4). Segédábraként látható a DNS illetve a Dau-Arg CD spektruma önmagában.

A titrálási sorozat spektrumain látható, hogy a kötődés hatására a DNS jelek jelentős átalakulása tapasztalható. A segédábrákon viszont megfigyelhetjük, hogy a daunorubicin-származék határozott saját CD sávval rendelkezik a B-konformációjú DNS-re karakterisztikus tartományban. Antraciklin típusú hatóanyagok DNS-sel való kölcsönhatását vizsgáló korábbi tanulmányoktól eltérően (129,130) - melyek során a mért spektrumot közvetlenül elemezték - differencia spektrumok számítását végeztük el, hogy a spektrális változásokat kiemelhessük. Ehhez felvettük mind a három származék CD spektrumsorozatát DNS jelenléte nélkül, majd hozzáadtuk a szabad DNS spektrumához. Ennek és a ténylegesen megmért DNS/daunorubicin spektrumoknak a különbségét ábrázolja a differencia spektrum, mely Dau-Arg esetében a 45. ábrán látható.



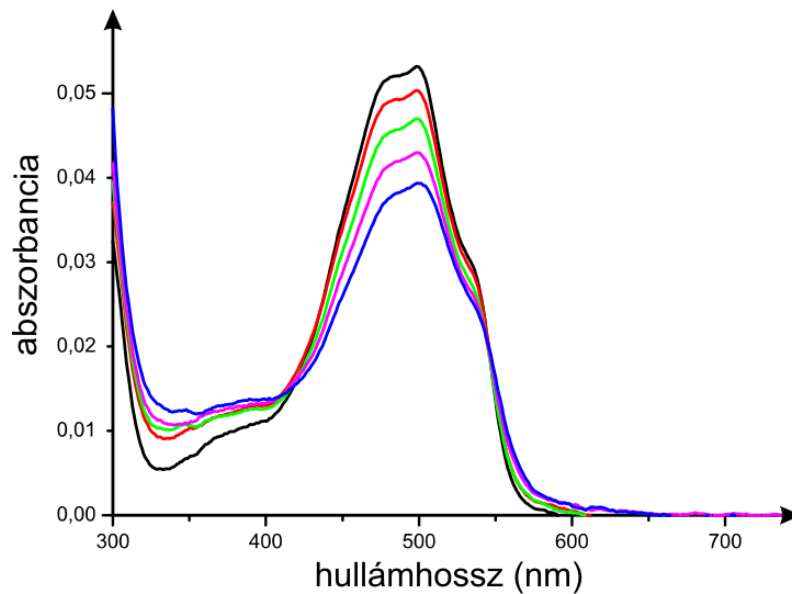
45. Ábra *Dau-Arg/DNS differencia CD spektrum $Dau/bp=0,5-4,0$ daunorubicin/bázispár arányoknál (zöldtől barnáig).*

A különbségi spektrum alapján könnyebben azonosíthatóvá válnak a DNS CD spektrumát érintő változások. A két legfontosabb DNS CD jel közül a $\lambda=245$ nm-en maximummal rendelkező sáv intenzitása csökken a kötődés hatására, míg a $\lambda=280$ nm-es csúccsal bíró sáv amplitúdója számottevően nem változik. A $\lambda=220$ nm-en található harmadik karakterisztikus csúcs viszont jelentősen növekszik és enyhén a kisebb hullámhosszak felé tolódik. $\lambda=305$ nm-en új negatív csúcs alakul ki. A DNS CD spektrumának korábbi irodalmi értelmezései alapján a változásokról elmondható, hogy a daunorubicin származékok kötődése során a DNS helicitása lecsökken és a hatóanyag kellően magas koncentrációja esetében meg is szűnik, míg a stacking kölcsönhatások és a kétszálú struktúra megmarad (131,132).

5.2.4. Kötődés nukleoprotein komplexhez

5.2.4.1. Abszorpciós spektroszkópia

Bakteriofág jelenlétében is felvettük az abszorpciós spektrumokat $c=10 \mu\text{M}$ -os daunorubicin koncentráció és változó nukleoprotein komplex mennyiség mellett. Szemléltetésként a 46. ábrán láthatjuk a Dau-Arg konjugátum spektrumát növekvő kötőhely koncentráció mellett.

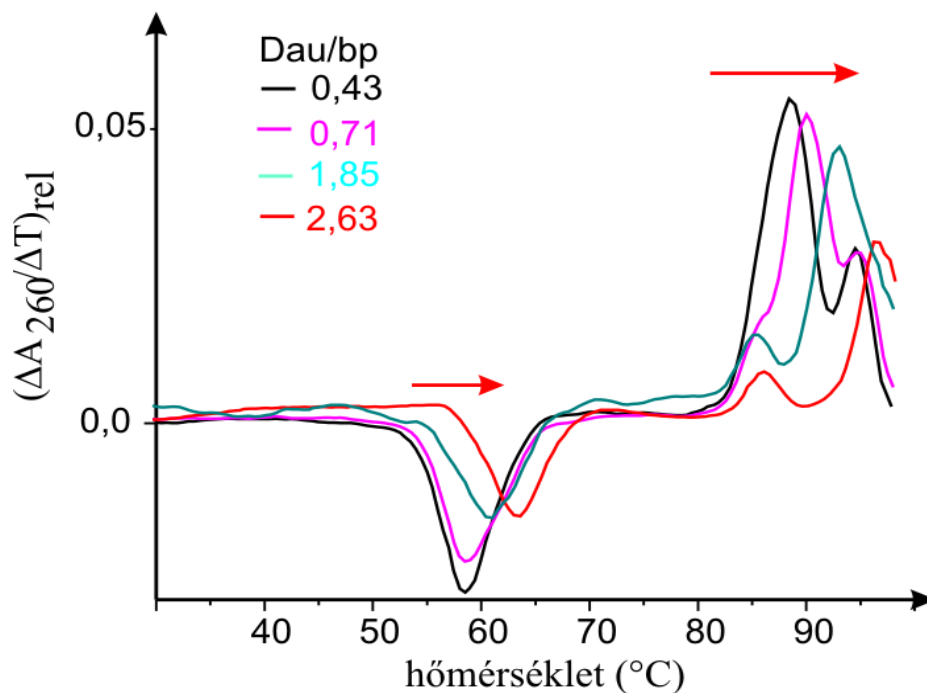


46. Ábra Dau-Arg abszorpciós spektruma növekvő bakteriofág koncentráció mellett: Dau-Arg önmagában $c=10 \mu\text{M}$ (fekete); különböző fág mennyiségek esetében (pirostól kékig) bázispár/Dau-Arg molarány = 0,5-4. Oldószer: Tris-HCl (pH=7,4).

Növekvő bázispár/Dau molarány mellett hipokróm és enyhe batokróm változás tapasztalható a vegyület $\lambda=400\text{-}600 \text{ nm}$ -es tartományban jelentkező abszorpciós sávjában. Mindhárom új származék elnyelési színe hasonlóan változott, azonban az egyes származékok közt némi különbség mutatkozott az eltolódások mértékében. Létrejön kötődés a bakteriofág örökítőanyag és az konjugátumok közt, de a spektrális változások kisebb amplitúdójúak, mint izolált DNS-nél.

5.2.4.2. Abszorpciós olvadási (melting) görbék

T7 fágpartikulummal való kölcsönhatás során is felvettük az abszorpciós olvadási görbéket $\lambda=260$ nm-en, a DNS abszorpciós maximumán. Nukleoprotein komplex esetében, ahogyan azt már a porfirinek tárgyalásánál láttuk, két tartomány különíthető el a derivált görbéken. Az első, negatív csúcs 60°C környékén, amely a kapszidburok meglazulását és a DNS kitüremkedését jelzi, mely során az örökítő anyag felveszi a hagyományos B konformációt, illetve a 85°C körül fellépő hiperkróm változás, amely a DNS szálak szétválásának következménye. A 47. ábra szabad állapotban és növekvő Dau-Arg koncentráció mellett felvett fág melting görbéket ábrázol.



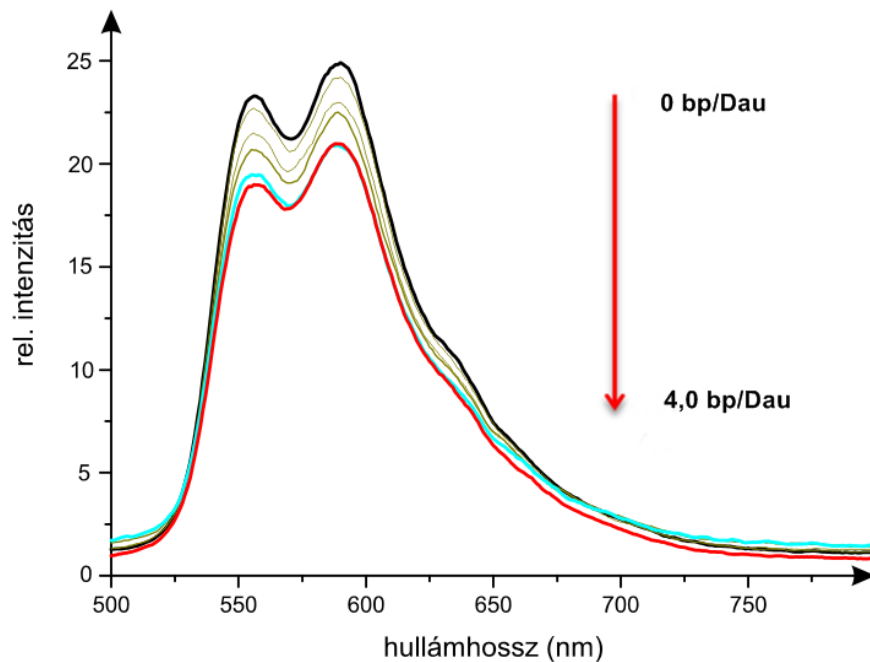
47. ábra T7 fág abszorpciós olvadási görbék. Bakteriofág önmagában (fekete); továbbá 0,52 Dau-Arg/bázispár (bíbor); 1,13 Dau-Arg/bázispár (kék) és 1,75 Dau-Arg/bázispár arány mellett (piros).

Megfigyelhetjük, hogy a Dau-Arg jelenlétében megnövekszik a T7 bakteriofág DNS-ének denaturációs hőmérséklete, hasonló módon, mint azt az izolált polinukleotid esetében láttuk. Feltételezhetjük tehát, hogy a kapszidburok ellenére is létrejön a kötődés az új származék és a fág DNS-e közt. Ugyanakkor érdemes kiemelni, hogy a

kapszid fellazulásának hőmérséklete is a nagyobb értékek felé tolódik, mely indirekt bizonyítéka lehet a hatóanyag fehérjékkel való kölcsönhatásának is.

5.2.4.3. Fluoreszcencia emissziós spektroszkópia

A nukleoprotein komplex és az aminosav konjugátumok kölcsönhatásának kvantitatív összehasonlítása érdekében a fluoreszcencia emissziós spektrumokat mértük meg. Az 48. ábrán látható az arginines konjugátum emissziós spektruma növekvő T7 fág mennyiség mellett.



48. ábra Dau-Arg fluoreszcencia emissziós spektruma szabad állapotban (fekete) illetve növekvő T7 fág koncentráció mellett $r=4,8$ -ig (zöldtől a kékig). A piros görbe a 65°C -on hőkezelt fágpartikulummal felvett spektrumot mutatja. Gerjesztés: $\lambda=480\text{ nm}$.

A nukleoprotein komplexszel való kölcsönhatás csak szerényebb mértékű daunorubicin emisszió-csökkentést eredményez. Ha összevetjük a kapott spektrumokat az izolált DNS esetében mért görbékkel (43. ábra), akkor láthatjuk, hogy $4,0$ bázispár/Dau-Arg aránynál az izolált DNS-hez való kötődés szinte teljesen kioltotta a hatóanyag fluoreszcenciáját.

Megvizsgáltuk a spektrumsorozatot abban az esetben is, ha a fágot 65 °C-ra melegítettük. Ekkor már bekövetkezik a DNS kitüremkedése a kapszidból és hozzáférhetőbbé válik a hatóanyag számára. Ennek ellenére szinte nem tapasztalható változás a daunorubicin emissziós spektrumában a natív fághoz képest.

McGhee és Von Hippel modellje (13) alapján a nukleoprotein komplex esetében is meghatároztuk a látszólagos kötődési állandókat, mind az anyavegyület, mind pedig az aminosav konjugátumok kölcsönhatására. Ezeket foglalja össze a 9. táblázat.

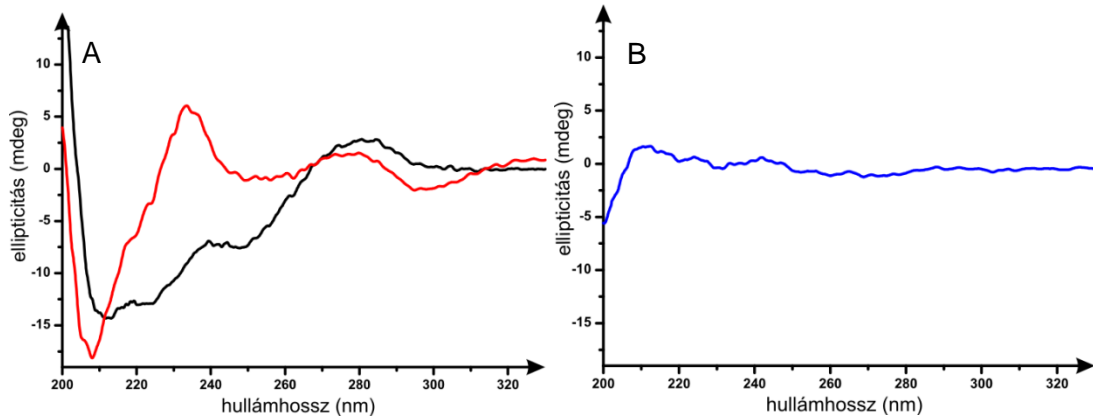
9. Táblázat Konjugálatlan daunorubicin és *Dau-Arg*, *Dau-Leu*, *Dau-Gly* egyensúlyi kötődési állandója (K_a) natív fág esetében.

Vegyület	K_a^* (M^{-1})
Dau	$3,3 \times 10^5$
Dau-Arg	$7,4 \times 10^4$
Dau-Gly	$5,8 \times 10^4$
Dau-Leu	$4,4 \times 10^4$

Az értékek összességében egy nagyságrenddel kisebbnek adódtak, mint izolált DNS-hez való kötődés során. Nukleoprotein komplexhez is a konjugálatlan daunorubicin kötődik a legnagyobb affinitással, ezt követi az arginines konjugátum. Míg a DNS esetében a másik két konjugátum, a *Dau-Gly* és a *Dau-Leu* igen hasonló kötődési állandókkal rendelkeztek, a fág partikulummal való kölcsönhatás során a glicines származék affinitása bizonyult nagyobbak.

5.2.4.4. Cirkuláris dikroizmus

A 49. ábrán a CD mérések eredményei láthatók Dau-Arg és T7 fág partikulum esetében.



49. ábra CD spektrumok a nukleoprotein komplex jellegzetes sávjainak tartományában $\lambda=200-320$ nm között, Tris-HCl pufferben (pH=7,4). „A” T7 fág önmagában (fekete); T7 fág és Dau-Arg oldatának spektruma, Dau-Arg/bázispár= 4 (piros). „B” differencia spektrum (kék), amely T7 fág és Dau-Arg kölcsönhatásakor létrejövő spektrum eltéréseit mutatja szabad T7 fág és Dau-Arg spektrumának matematikai összegéhez képest (Dau/bp=4).

A T7 nukleoprotein komplex CD spektrumának általunk vizsgált tartományában három elkülöníthető szakaszt fedezhetünk fel: a $\lambda=209-225$ nm között található sávot, mely az α -hélix szerkezetű kapszid fehérjékre jellemző, a $\lambda=245-255$ nm közötti régiót, mely a fehérjék és a DNS hélix jelének keveredéséből jön létre, továbbá a polinukleotidra jellemző, $\lambda=280$ nm-en maximummal rendelkező pozitív CD sávot.

A 49. ábra „B” részén feltüntetett differencia spektrum alapján elmondható, hogy a Dau-Arg csak kisebb tényleges átalakulást okoz a fág CD jeleiben és ez a változás a fehérjére jellemző hullámhosszokon következik be. A polinukleotid bázisai által létrehozott $\lambda=280$ nm-es maximumú CD sávban kötődés hatására bekövetkező eltérés a differencia spektrum által nem mutatható ki.

6. Megbeszélés

Munkánk során a DNS-hez kötődni képes kationos porfirinek és az antraciklinek csoportjába tartozó daunorubicin módosított származékait hoztuk létre. Az előbbi csoportból kettő illetve három pozitív töltéssel rendelkező porfirineket választottunk ki alapvegyületként, amelyekhez tetrapeptidet és polilizin vázas polipeptidet kapcsolunk; a daunorubicinnek pedig egyetlen aminosavval konjugált származékait szintetizáltuk.

Kis molekulák peptidekkel történő kapcsolásának két főbb célja van: a hatóanyag célsejtekbe történő bejutásának fokozása és a szelektivitás növelése (53, 54, 56, 70, 71, 77, 78), illetve - a kis molekulát mintegy horgonyként használva - olyan hordozó rendszerek kialakítása, melyekkel a DNS közelébe juttathatók az örökítőanyagot befolyásoló további molekulák (55, 133). A sejtfelvétel mértékét és a tumorsejt specifikusságot fokozó hordozópeptidek leggyakrabban olyan „spacer” aminosavakon keresztül kapcsolódik a hatóanyaghoz, amely a sejtben található enzimek hatására bomlik és így az örökítőanyaghoz csak a kisebb metabolitok jutnak el. Amikor pedig a DNS iránti affinitás kiaknázása a cél az örökítőanyag befolyásolására, értelemszerűen nagyobb konjugátumok jelenlétével kell számolnunk. Kationos porfirinek esetében mindkét cél elérése érdeklődésre tarthat számot, míg a daunorubicinnél elsősorban a mellékhatások mérséklése és a hatékonyság növelése merül fel igényként. Ezért a porfirinek esetében oligo- és polipeptid konjugátumok kölcsönhatását is vizsgáltuk a célmolekulákkal, ezzel modellezve a különböző céllal megalkotott konjugátumokat. Ezt követően pedig sejtfelvételi és sejtben belüli elhelyezkedést feltérképező méréseket is végeztünk.

Daunorubicin esetében olyan, elsősorban a lizoszómákban képződő metabolitok DNS kötődését elemeztük, amelyek a hordozópeptid leszakadása után jönnek létre. Minden további molekulatervezés szempontjából fontos annak feltérképezése, hogy az alapvegyületek különféle módosításai mi módon hatnak ki a DNS-hez történő kötődésre. Jelen munkánk során e célból különféle optikai spektroszkópai technikákat választottunk.

6.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik kölcsönhatása izolált DNS-sel és nukleoprotein komplexszel

Az új származékok, a TMPCP és BMPCP DNS-től mentes oldószerben felvett spektrumai megfelelnek a porfirinekre jellemző általános színeképeknek, amelyek alakján a tetrapeptid illetve a polipeptid kapcsolása sem változtat jelentősen. Izolált polinukleotiddal való titrálás következtében azonban markáns változások figyelhetők meg a vegyületek spektroszkópiai tulajdonságaiban, amelyek a DNS és az új származékok között létrejövő kölcsönhatás következménye.

6.1.1. Abszorpciós spektrumok

Az abszorpciós spektrumok változásainak értelmezéséhez a kutatócsoport által korábban kidolgozott spektrumfelbontási modellt alkalmaztuk. Ennek lényege, hogy a különféle bázispár/porfirin molarányoknál felvett színeképeket Gauss komponensekkel illesztjük meg, majd kísérletet teszünk az egyes komponensek és a szabad illetve kötött állapotban lévő porfirin populációk megfeleltetésére. Megközelítésünk érvényesnek bizonyult az alapvegyületek és tetrapeptid konjugátumaik izolált T7 DNS-sel való kölcsönhatása esetében: a DNS hozzáadásakor két új komponens függvény illesztése vált szükségessé. Az egyik új komponens maximuma $\lambda=429$ nm-en található, míg a másik a három pozitív töltésű porfirineknél $\lambda=446$ nm-en, a két pozitív töltésűeknél $\lambda=435$ nm-en. Amennyiben növeltük a bázispár/porfirin molarányt, az új komponens görbék alatti terület növekedett. Korábbi analógiák alapján ezeket a görbéket hozzá is rendelhetjük a porfirinek kötődésének két formájához: a szabad állapotú vegyület abszorpciós maximumához képest 5 nm-es vörös irányú eltolódással jelentkező komponens görbe a külső kötődésű porfirinek jellemzője, míg a 10-20 nm-es batokróm eltolódás az interkaláló porfirinek csoportjára utal (7,11, 84).

A TMPCP-AK abszorpciós spektruma is egyértelmű változást mutat, amennyiben izolált DNS-t növekvő mennyiségben adunk oldatához. Spektrumfelbontás alapján az emelkedő bázispár/porfirin arány hatására megjelenő eltolódásért a szabad konjugátum arányának csökkenése, és a DNS-hez kötött forma

gyarapodása a felelős. Amennyiben összevetjük ezt a TMPCP-nek és tetrapeptid konjugátumának hasonló körülmények között felvett spektrumaival, akkor határozott eltéréseket láthatunk, mégpedig a kötési formák számát illetően. Míg a TMPCP-re és TMPCP-4P-re két kötési formát tudtunk elkülöníteni, addig TMPCP-AK esetében csak egyetlen új komponens jelenik meg, amelynek maximuma $\lambda=435$ nm-en található. Ennek a sávnak az elhelyezkedése és a kisebb mértékű hipokróm változás alapján valószínű, hogy a TMPCP-AK külső kötődés formájában érintkezik a nukleinsavakkal. Meg kell említeni, hogy a TMPCP-AK esetében a kötött formára megállapított Gauss komponens pozíciója nem egyezik egyik korábban vizsgált származék kötött állapotot jellemző görbéjével sem. Ennek lehetséges magyarázata, hogy az AK polimeren található TMPCP molekulák mikrokörnyezete eltérő a szabad formától vagy a tetrapeptidhez konjugált állapottól, ezért az illesztés során megállapított abszorpciós maximum is különbözőnek adódik ugyanazon kötődési forma esetében is. Annak alapján, hogy a spektrális változások mely koncentrációaránynál hajlanak telítésbe, a kötődési készség különbözőnek adódik az öt új származéknál. Az elnyelési színeképek elemzésével a $\text{TMPCP-4P} > \text{TMPCP} > \text{BMPCP-4P}_2 > \text{TMPCP-AK} > \text{BMPCP}$ sorrend állítható fel. A spektrumfelbontás bizonyult az egyetlen olyan módszernek, mellyel sikerült igazolni, hogy a BMPCP is kötődik - jóllehet korlátozott mértékben - izolált bakteriofág DNS-hez.

Teljes fágpartikulum vizsgálatok már jelentkeztek az illesztési modell korlátai. A legmegfelelőbb illesztést ebben az esetben is öt Gauss függvénnyel lehetett elvégezni, azonban a különböző porfirin populációk és az egyes komponensek között összefüggés nem minden esetben látható. Növekvő bázispár/porfirin molarány mellett a TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ esetében egyetlen növekvő területtel rendelkező komponens különíthető el. Ezen komponens BMPCP-4P₂ esetében $\lambda=426$ nm-nél, tehát a szabad porfirin abszorpciós maximumához képest enyhe vörös irányú eltolódással jelentkezik, abban a tartományban, ahol a korábbi vizsgálataink során a külső kötődésnek megfeleltethető komponens jelent meg. TMPCP és konjugátuma illesztésekor viszont az új komponens $\lambda=434$ nm-en (TMPCP) és $\lambda=435$ nm-en (TMPCP-4P), vagyis nagyjából 10 nm-es batokróm eltolódással jelentkezik, mely az interkalációs kölcsönhatás kialakulását mutatja.

A korábbiakhoz képest korlátozott kiértékelhetőség abban mutatkozik meg, hogy az izolált DNS esetében a külső kötési formához rendelhető, enyhén vörös irányba tolódott komponens TMPCP és konjugátuma spektrumfelbontásakor a nukleoprotein komplex koncentrációjának növelésére csökken, míg BMPCP-4P₂-nél ez az egyetlen komponens, amelynek területe gyarapodik. Paradox változása figyelhető meg a háromszorosan pozitív származékoknál: natív fág mellett csökken, viszont hőkezelt fág mellett - amelyben a polinukleotid a fágkapszidból kitüremkedő formában található meg - enyhén növekszik a bázispár/porfirin mólarány növelésével. Kísérletet ettünk újabb komponensek illesztésére a kérdéses tartományban, azonban ez sem hozta el a probléma feloldását, mivel az illesztés egészében jött létre így nagyobb pontatlanság. A felbontással nem kimutatható forma feltehetőleg túlságosan alacsony koncentrációban van jelen, vagy pedig az ellentmondásos komponens a szabad és kötött állapothoz egyszerre tartozik. Feltételezhető viszont, hogy a markánsan megjelenő komponens által reprezentált kötési forma lehet a domináns az adott származék és nukleoprotein komplex kölcsönhatásában.

TMPCP-AK-val végzett méréseknél szintén tapasztalható interakciót jelző abszorbancia-csökkenés a porfirin spektrumában, azonban nem bizonyítható egyértelműen, hogy a kölcsönhatás a porfirin és a nukleinsavak közt jön létre. Kiértékelhető spektrumfelbontásra a polipeptid konjugátum esetében nem volt lehetőség. Bakteriofággal történő titrálás során a konjugátatlan BMPCP spektrumában változás gyakorlatilag nem figyelhető meg, így feltehetően ez a származék nem kötődik a kapszidban található DNS-hez. Kötődési hajlandóság sorrendje az abszorpciós mérések alapján tehát a következő: TMPCP > TMPCP-4P > BMPCP-4P₂

6.1.2. Fluoreszcencia emissziós spektrumok

Hasonló módon a kötődés kimutatására szolgált a fluoreszcencia emissziós spektrumok megváltozása. Ennek során a gerjesztést az adott porfirin származék Soret sáv maximumán végeztük, polinukleotid adagolására a széles és jellegtelen porfirin színkép felhasadt két elkülöníthető sávra. Ez a jelenség izolált DNS esetében mind az öt származékra jellemző volt, a natív T7 fág jelenlétében pedig a TMPCP,

TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ kötődésének eredményeképpen tapasztaltunk spektrális változást.

6.1.3. Fluoreszcencia energia transzfer

A nukleinsavak abszorpciós maximumán, $\lambda=260$ nm-en történő gerjesztésnél a gerjesztő fény energiája csak akkor adódik át a DNS-ről a porfirin molekulákra, ha az szoros kapcsolatba került a DNS bázisaival. Ilyen közeli kapcsolatnak tekinthető a bázisok közé történő beékelődés, az interkaláció. Tehát az energia transzfer bizonyíthatja a porfirin molekulák bázispárok közé történő beilleszkedését.

Izolált DNS-sel való kölcsönhatás során az energia transzfer mérésével sikerült kimutatni, hogy TMPCP és TMPCP-4P esetében a fluoreszcencia intenzitása határozott emelkedést mutat, és a BMPCP-4P₂ származékot szintén jól látható változás jellemzi, noha csak jelentősen magasabb DNS koncentrációk mellett következik be a telítés. TMPCP-AK esetében viszont nem tapasztaltunk mérhető energiáttranszfert, még jelentősebb DNS mennyiség mellett sem. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a polipeptid konjugátum döntően külső kötődésen keresztül érintkezik a DNS-sel. A konjugátatlan BMPCP-ről nagyrészt ugyanez mondható el, ez esetben $r=30$ körüli bázispár/porfirin molarányoknál mérhető kis mértékű energia transzfer. Az abszorpciós mérések alapján felvázolt kötődési affinitás sorrendet nagyrészt az energia transzfer mérések megerősítik (egyedül a TMPCP-AK esetében nem mérhető jel), és az interkalációt kialakító porfirinek aránya is ennek a sorrendnek megfelelően változik az egyes származékok esetében, tehát TMPCP-4P-re tűnik legjellemzőbbnek, míg BMPCP esetében alig mutatható ki a megléte.

Nukleoprotein komplexet tartalmazó rendszerekben megfordult a TMPCP és konjugátumának sorrendje, az anyavegyület mind a natív fág, mind pedig a hőkezelt fág esetében a legjelentősebb intenzitás-emelkedést mutatta, a TMPCP-4P pedig a második helyre szorult. A legnagyobb kiterjedésű tetrapeptid konjugátum, a BMPCP-4P₂ fluoreszcencia intenzitása alig emelkedik natív T7 fág adagolása mellett, a hőkezelt vírus partikulumnál viszont már kifejezettebb a jelnövekmény, de ahogyan az várható, nem éri el az izolált DNS esetében tapasztalt meredekséget. A TMPCP-AK bakteriofág esetében sem mutat energiáttranszfert, ami nem meglepő, hiszen már az abszorpciós mérések alapján sem egyértelmű a kötődése.

Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a növekvő molekulaméret megnehezíti a bázispárok közé történő beilleszkedést.

6.1.4. Fluoreszcencia élettartam

A fluoreszcencia emisszió lecsengésének vizsgálata során a szabad porfirinekre jellemző élettartam értékektől eltérő komponenseket kerestünk a függvények illesztésekor, korábbi eredményekre támaszkodva, amelyek szerint nukleinsav jelenlétében két új élettartam-komponens jelenik meg, melyből a rövidebb az interkalációhoz, a hosszabb a külső kötődéshez rendelhető.

A többi vizsgálat során határozottan kölcsönhatásba lépő TMPCP és TMPCP-4P esetében feltételezéseinknek megfelelően el tudtunk különíteni két, a szabad formától jól megkülönböztethető élettartam-komponenst az illesztés során, izolált DNS és nukleoprotein komplex esetében is. A kétszeresen pozitív származékoknál azonban már eltérések adódtak: a BMPCP-4P₂-nek izolált bakteriofág DNS-sel való kölcsönhatása során ugyan még elkülöníthető a két új élettartam, azonban teljes fágpartikulum jelenlétében már csak egy élettartam adódik az illesztésből. Ugyanez elmondható a BMPCP-DNS rendszerről is, ahol a szabad forma élettartamához képest csak kis mértékben eltérő komponens adódik nukleinsav jelenlétében, teljes bakteriofágnál pedig - hasonlóan a többi módszerhez - változás egyáltalán nem mutatható ki. TMPCP-AK esetében nem tudunk elkülöníteni egy vagy két komponenst, aminek feltételezhetően az az oka, hogy a polipeptiden található TMPCP molekulák egyedi mikrokozonyezete különböző és ennek következtében a lecsengési paramétereik is eltérnek. Az élettartam mérések tehát azt mutatják, hogy a háromszoros pozitív töltéssel rendelkező származékok izolált DNS illetve nukleoprotein komplex jelenlétében is mindkét kölcsönhatási formán keresztül kötődnek az örökítőanyaghoz, míg ez a két pozitív töltésűeknél csak a BMPCP-4P₂- DNS rendszerre igaz.

6.1.5. Indukált cirkuláris dikroizmus

Az indukált cirkuláris dikroizmus vizsgálatokor szemléletes képet alkothatunk a kötődési formák arányáról, ugyanis a pozitív sáv megléte a külső kötődés, míg a negatív sáv az interkaláció kialakulását bizonyítja. Izolált DNS

jelenlétében a BMPCP-4P₂, TMPCP és TMPCP-4P esetében pozitív és negatív sáv is egyértelműen megjelenik a CD spektrumon. A kétszeresen pozitív konjugátum pozitív sávja a legintenzívebb, míg a háromszorosan pozitív származékok esetében a negatív sáv bizonyul dominánsabbnak a TMPCP-4P görbén.

Nukleoprotein komplex jelenlétében az eltérések markánsabbakká válnak, a BMPCP-4P₂ már csak pozitív sávval rendelkezik, tehát külső kötődésre jelét mutatja, és ez megfeleltethető az abszorpciós spektrumfelbontás, illetve az élettartam mérések eredményeinek. TMPCP és konjugátuma esetén mindkét sáv megmarad, azonban fontos eltérés, hogy a konjugátum sávjai kisebb intenzitásúnak adódnak, mint az anyavegyületéi, tehát ezen módszer szerint is bekövetkezik egy affinitásbeli „helycsere” konjugátum és alapvegyület közt a háromszorosan pozitív molekuláknál. A TMPCP-AK vizsgálatát a molekula saját CD jele nem tette lehetővé.

6.1.6. Izolált DNS és T7 fág szerkezeti változásai

A DNS és a fágpartikulum kötődés hatására bekövetkező szerkezetváltozásait is követtük CD segítségével, ebben az esetben állandó polinukleotid mennyiség mellett növeltük a porfirinek koncentrációját. Az B konformációjú izolált DNS három jellegzetes CD sávval rendelkezik az ultraibolya tartományban $\lambda=220, 245$ és 280 nm-es maximummal. Ez a struktúra az adott konformációban jelen lévő helicitásra és stacking kölcsönhatásokra jellemző, ebből következően bármely DNS-t érintő kölcsönhatásnak jól megfigyelhető következményei lesznek ezen sávok struktúrájában. TMPCP és TMPCP-4P kötődésének következtében a DNS CD sávjai felhasadnak, illetve amplitúdójuk lecsökken. A DNS bázisai közt lévő stacking kapcsolatok megszűnnek és a kettős hélix kitekeredik. A BMPCP-4P₂ esetében a CD spektroszkópia arra is rámutatott, hogy ez a származék aggregációra hajlamos, ami jelentősen csökkenti kötődési hajlandóságát.

A T7 nukleoprotein komplex CD spektrumának általunk vizsgált tartományát három elkülöníthető szakaszt találhatók: az α -hélix szerkezetű kapszid fehérjékre jellemző $\lambda=209-225$ nm közötti sáv, a fehérjék és a DNS hélix jelének keveredéséből létrejövő $\lambda=245-255$ nm közötti régiót, továbbá a polinukleotidra 280 nm-en maximummal rendelkező pozitív CD sávja.

TMPCP királisan perturbálja mind a kapszid fehérjét, mind pedig a DNS-t. A Soret sávban döntő módon a negatív jel amplitúdójának növekedését láttuk. Alacsonyabb koncentrációjú TMPCP oldat fággal történő titrálása során pozitív és negatív indukált CD sáv is megjelent a Soret sávban. A jelenség magyarázata lehet, hogy a porfirinre nézve magasabb koncentrációjú oldatokban a kölcsönhatás túlnyomó részben interkaláción keresztül valósul meg. TMPCP-4P jelenléte csak a 245-255 nm tartományban okozott változást, míg a tisztán a fehérjéktől és DNS-től származó jelek csak kisebb mértékben tértek el a szabad fág spektrumától. A Soret sávban pozitív és negatív jel is kialakult. BMPCP-4P₂ az aggregáció jeleit mutatta a titrálás koncentráció-tartományában és nem volt megfigyelhető királis perturbáció a fágra jellemző tartományban. A fentiekből láthatjuk, hogy már egyetlen tetrapeptid konjugálása is mérhető különbségeket okoz a kötődés során létrejövő szerkezeti változásokban és a kötődés módja is némileg módosul.

6.1.7. Olvadási görbék, kölcsönhatás kapszidfehérjékkel

Kérdésként merült fel, hogy az új porfirin-származékok és kapszid fehérjék között létrejön-e tényleges kölcsönhatás, vagy pedig a fehérje CD jelének változása csakis a DNS-kötődés következtében alakul ki. Ezért a fág partikulum hő hatására bekövetkező fázisátalakulásait is követtük az abszorpciós és CD olvadási görbék mérésével. Különböző peptidek konjugációja a porfirinekhez felveti a fehérjék iránt mutatott affinitását esetleges növekedését. Láthattuk, hogy az abszorpciós spektrumok felbontásakor erre utaló jelet nem találtunk, azonban érdemes egy érzékenyebb módszer eredményeit is figyelembe venni. A T7 bakteriofág derivált melting görbéje két jól elkülöníthető régióból áll: egy hipokróm sávból 50-60°C között és egy hiperkróm sávból 85°C környékén. Az első a kapszid burok fellazulásához rendelhető, a DNS részben kitüremkedik a kapszidból, és felveszi a standard B konformációt. A második a DNS kettős hélix fázisátalakulásának következménye, a polinukleotid két szála elválik egymástól. Ha a fág kapszidfehérjei vagy polinukleotidja kölcsönhatásba lép egy új molekulával, az a fent említett olvadási hőmérsékletek eltolódását okozza. TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ kötődése esetében a derivált olvadási görbéken a polinukleotid szálainkat szétválására jellemző hőmérsékleten tapasztaltunk eltolódást szabad DNS-hez

képeket, azonban a fehérjeburok fellazulásához köthető tartomány változatlan maradt. BMPCP és TMPCP-AK jelenléte egyik tartomány jeleire sem volt hatással. TMPCP-AK esetében izolált DNS-sel is elvégeztük a melting mérést. A DNS szálainak szétválása némileg magasabb hőmérsékleten következik be az AK porfirin jelenlétében a szabad örökítőanyaghoz képest, azonban ez az eltolódás jelentősen kisebb, mint a hasonló porfirin/bázis pár arányok mellett összehasonlításként megvizsgált, interkalációval is kötődő többi származék esetében. Nem áll fenn lineáris korreláció a DNS átalakulására jellemző hőmérséklet és a porfirin/bázis pár arány között, mely interkaláció kialakulására utalna. Az olvadási görbék tehát alátámasztják a spektrumfelbontás és az energiatranszfer eredményeket, melyek alapján csak külső kötődési formát tudtuk azonosítani.

A bakteriofág CD spektrumán elkülöníthető fehérje és DNS jelekből következik a CD olvadási görbék felvételének előnye: elkülönítve figyelhetjük meg a kapszid és a DNS ellipticitásának változását a hőmérséklet függvényében. Mind a $\lambda=220$ nm-en (fehérje) mind a $\lambda=283$ nm-en (DNS) mért CD melting görbéken a változásoknak két tartománya található, 50-60°C illetve 85-100°C között, melyek az abszorpciós olvadási görbéken azonosított fázisátalakulásoknak feleltethetők meg. Mindkét hullámhosszon regisztrált derivált görbe mindkét tartományában a jel változását láthattuk TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ esetében. Ezen három származék tehát a CD jelek alapján kölcsönhatásba lép a kapszid fehérjeburkával. Ennek kimutatására a spektrumfelbontás és az abszorpciós melting nem bizonyult kellő érzékenységgű módszernek.

6.1.8. Összegzés

Végző soron tehát elmondható, hogy a vizsgált vegyületek estén megállapítottunk hasonló tulajdonságokat, azonban lényeges különbség mutatkozott a kötődési folyamat telítési értékét illetően. A különböző módszerek során meghatározott bázispár/porfirin molarányok némileg eltérnek, de a sorrend minden esetben megegyezik. Az alábbi két kötődési sorrend kristályosodott ki a komplex mérésorozat nyomán:

Izolált T7 bakteriofág DNS

TMPCP-4P > TMPCP > BMPCP-4P₂ > TMPCP-AK > BMPCP

Nukleoprotein komplex

TMPCP > TMPCP-4P >> BMPCP-4P₂

A sorrendek elméleti megfontolásokkal jól magyarázhatók. Izolált DNS esetében meghatározó a molekulák töltéseloszlása, és az ebből fakadó elektrosztatikus kölcsönhatások, hiszen a célmolekula a cukorfoszfát váz következtében negatív töltésű. Minél több pozitív töltés van jelen a porfirin molekulán, a DNS iránti affinitás annál nagyobb. Megerősíthetjük ezt, ha a sorrendbe illesztjük a korábbi vizsgálatok eredményeit a négyszeresen pozitív porfirin-származékról. A TMPyP ugyanis a TMPCP-4P-vel mutat közel azonos affinitást. Jól látszik az is, hogy mivel a tetrapeptiddel való konjugáció a karboxil csoportok átalakulásával jár, az így eltűnő negatív töltések szintén a kötődési készség növelésének irányába hatnak. Izolált DNS-nél a negatív töltések eltűnése nagyobb előnyökkel jár, mint amennyire a megnövekvő molekulaméret esetleg gátolná a kötődést. A sztérikus gátló hatások viszont a TMPCP-AK kötődését jelentősen befolyásolják. Izolált DNS és TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ kölcsönhatásakor mind a két kötési forma jellemző az új származékokra, jóllehet ezek dominanciája eltér az egyes vegyületek esetében. BMPCP-4P₂ kötődésében a külső komplex dominánsabb, míg TMPCP és TMPCP-4P esetében az interkaláló porfirinek populációja nagyobb. A polipeptid konjugátum TMPCP molekulái feltételezhetően csak külső kötődéssel érintkeznek az örökítőanyaggal. BMPCP nagyon gyenge kölcsönhatása a spektrumfelbontás adatai szerint interkaláció formájában valósul meg.

Nukleoprotein komplexszel való kölcsönhatás esetében azonban átalakul a sorrend. BMPCP és a TMPCP-AK kötődése nem mutatható ki. Kitűnik továbbá, hogy a konjugátumok a kötődési sorrend végére szorulnak. Ennek alapján kézenfekvő, hogy a töltés mellett a kisebb konjugátumoknál is meghatározó faktorrá válik a molekulaméret. A TMPCP-4P gyengébben kötődik anyavegyületénél, a két tetrapeptidet tartalmazó, következésképpen a legnagyobb méretű BMPCP-4P₂ kötődése pedig nagyságrendekkel elmarad a másik két vegyületétől. Megállapítható az a tendencia is, hogy a növekvő molekulamérettel egyre hangsúlyosabbá válik a

külső kötődési forma: míg az egy tetrapeptiddel konjugált TMPCP-4P interkalációval is kölcsönhatásba lép a teljes bakteriofág örökítő anyagával, addig a két tetrapeptiddel kapcsolt BMPCP-4P₂ kizárólag külső kötődéssel. A CD spektroszkópia alapján láthattuk, hogy magasabb koncentrációknál a BMPCP-4P₂ hajlamos az aggregációra, amely a kötődési képességét szintén csökkenti. A TMPCP és a TMPCP-4P bakteriofággal való kölcsönhatásában a porfirinek magasabb mennyiségeinél az interkalációs kötődési mód kerül előtérbe.

Az elvégzett vizsgálatokból az is látszik, hogy minél komplexebb szerkezettel bíró vegyületek kötődésének vizsgálatát tűzzük ki célul, annál kevésbé lesz célravezető pusztán egyetlen vizsgálati módszer alapján következtetnünk a molekuláris folyamatokra, és mindinkább előtérbe kerül a probléma komplex spektrometriás megoldása. A korábbi vizsgálatok során a négyszeresen pozitív modell porfirin és DNS kölcsönhatásával kapcsolatban csupán az abszorpciós spektrumok felbontásával kellő pontosságú következtetések voltak levonhatók. Bizonyos feltételek mellett még kvantitatív elemzést is elvégezhető volt (15). Jelen munka – noha támaszkodik a korábbi eredményekre – megmutatja, hogy bonyolultabb kapcsolódási partnerek esetén a korábbi megközelítés már csak részben alkalmazható.

6.2. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik kölcsönhatása modellmembránnal, sejtek általi felvétele, sejteken belüli elhelyezkedése

Az általunk vizsgált kationos porfirinek és peptid konjugátumaik idő- és koncentrációfüggő módon jutnak be a HL-60 sejtekbe. Több korábbi tanulmány kimutatta, hogy a kationos porfirinek sejtek által történő felvételére jelentős hatással bír a pozitív töltések száma, a töltések molekulán belüli eloszlása, a molekulaméret illetve a vegyületek hidrofil/lipofil karaktere is (134, 135, 136).

Jelen munka során felmérésre került származékok közül a sejtekben a BMPCP-4P₂ dúsult fel a legnagyobb arányban. Az eredmények összevetése után pedig megfigyelhető, hogy a két pozitív töltéssel rendelkező származékok (BMPCP

és BMPCP-4P₂) jelentősebb akkumulációt mutattak a három pozitív töltésű porfirinekhez (TMPCP és TMPCP-4P) képest. A polikationos TMPCP-AK sejtfelvételének mértéke határozottan alacsonyabb, mint a négy alapvegyületé. Ezek az eredmények összhangban vannak Jensen és kollégái (134) következtetéseivel, melyek szerint két pozitív töltés *mezo*-pozícióban a legelőnyösebb a sejtekbe történő bejutás szempontjából. A porfirin származékok relatív hidrofób tulajdonságának a sejtekbe történő bejutásban betöltött szerepét ikerionos fejcsoportú foszfolipidekből előállított liposzómákon tanulmányoztuk. A meghatározott asszociációs konstansok hasonló tartományba estek az irodalomban korábban közölt kationos porfirinek értékeivel (137). Jó egyezést találtunk a sejtfelvételi vizsgálatok eredményeivel, ugyanis méréseink alapján a két pozitív töltéssel rendelkező származékok nagyobb asszociációs konstanssal rendelkeznek három pozitív töltéssel bíró porfirineknél. A polikationos TMPCP-AK jelentősen alacsonyabb K_L értéke szintén magyarázatul szolgál szerényebb mértékű endocitózisára. Tetrapeptid konjugálása a porfirinekhez nincsen azonos hatással az endocitózisra és az asszociációs konstans értékére. BMPCP-4P₂ esetén mindkettő növekszik az alapvegyületekhez képest, míg például a TMPCP-4P sejtfelvétele kisebb mértékű, mint a konjugálatlan TMPCP esetében. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a sejtfelvétel szempontjából az amfifil tulajdonságú molekulák a legkedvezőbbek, de emellett egyéb faktorok is szerepet játszanak, úgymint a töltéseloszlás, a molekula mérete és geometriája. Korábbi tanulmányok is megerősítik ezt a feltételezést (135, 136). A TMPCP-AK gyengébb szereplését vizsgálataink során nagy valószínűség szerint polikationos tulajdonsága és jelentősen nagyobb mérete magyarázza. Ezek a paraméterek jelentősen befolyásolják a felvétel mechanizmusát. Kutatócsoportunk egy másik vizsgálat során kimutatta, hogy a szabad AK makropinocitózissal és kaveola/ lipid raft mediált endocitózis révén jut a sejtekbe, és az AK különböző töltéseloszlással rendelkező származékai eltérő hatásokkal kerülnek át a sejtmembránon belüli kompartmentekbe (60).

Mivel a különböző szerkezetű kationos porfirinek DNS-hez való kötődésével több tanulmány is részletesen foglalkozott, felmerült annak az ötlete is, hogy oligo- és polipeptideknek az örökítő anyag közelébe való juttatására használják őket (138). Ennek megvalósíthatóságának jártunk utána, amikor az általunk vizsgált

származékok sejtekben történő eloszlását tanulmányoztuk lézergerjesztésű konfokális mikroszkópiával. A kolokalizációs felvételek azonban nem mutatták ki sem a szabad porfirinek, sem pedig a konjugátumok jelenlétét a sejtmagban. Ezek a molekulák inkább a citoplazmában található sejtorganellekben dúsultak fel. Korábban néhány tanulmány foglalkozott már különböző porfirinek intracelluláris eloszlásával. Ezek eredményei alapján úgy tűnik, hogy a hidrofíli, amfifíli vagy zwitterionos vegyületek hajlamosak a lizoszómákba kerülni, míg a hidrofób tulajdonságúak inkább az endoplazmás retikulumban, a Golgi apparátusban és a mitokondriumokban dúsulnak fel. A mitokondriumot illetően nem egyeznek az eredmények, kimutatták azt is, hogy egyes pozitív töltésű porfirinek is ide kerülhetnek (134). Sibrian-Vazquez és munkatársai által vizsgált porfirin-peptid konjugátumok döntően a lizoszómákban helyezkedtek el (53). Ezen korábbi megállapításokkal az általunk kapott eredmények összhangban voltak. A kétszeres pozitív töltésű BMPCP, a három pozitív töltéssel rendelkező TMPCP, illetve ezek tetrapeptid konjugátumai a lizoszómákat és a mitokondriumokat festő fluoreszcens jelző molekulákkal mutattak kolokalizációt. Az eredmények alapján elmondható, hogy a töltéseloszlás fontos szerepet játszhat abban, hogy a kationos porfirinek bejuthatnak-e a mitokondriumokba (51, 134). A TMPCP-AK a többi származéktól eltérő intracelluláris mintázatot mutat, leginkább a citoplazmában található egyéb vezikuláris képletekben található.

6.3. Daunorubicin aminosav-konjugátumok kölcsönhatása izolált DNS-sel és nukleoprotein komplexszel

Az antraciklinek családjába tartozó, tumorellenes kemoterápiában használt antibiotikumok célsejtek iránti szelektivitásának fokozása és mellékhatásainak csökkentése feltehetően elérhető lenne oly módon, hogy a hatóanyagot egy alkalmasan megtervezett hordozópeptidhez kapcsolják. Ilyen peptid lehet a GnRH III, hiszen a GnRH receptorokat egyes tumorsejtek fokozott mértékben expresszálják, vagy pedig meghatározott sejt típusra specifikus célzó peptidek. Annak érdekében, hogy a hatóanyag kifejthesse hatását a célmolekulán - antraciklinek

esetében a DNS-en – célszerű, ha sejtekbe történő bejutást követően a hordozópeptid lehasad a gyógyszermolekuláról. Ezt oly módon érhetjük el, hogy egy lizozómális enzimekre érzékeny „spacer” szekvenciát építünk a célzópeptid és a hatóanyag közé. Az ilyen módon kialakított konjugátumok esetében sem szabadul fel az enzimátikus bontást követően a tiszta hatóanyag, általában egy aminosav hátramarad a spacer peptidből. Peptidek kapcsolása doxorubicinhez, daunorubicinhez csak olyan csoportokon keresztül lehetséges, amelyek fontos szerepet játszanak az örökítő anyaggal való kölcsönhatásban. Ezért vizsgálatunk során arra kerestük a választ, hogy egy ilyen hátramaradó aminosav miként befolyásolja a hatóanyag kötődését. Az antraciklinek közül a daunorubicint választottuk modellvegyületnek, és a molekula daunozamin részének aminocsoportjához három fajta aminosavat, glicint, leucint és arginint kapcsoltunk. Abszorpciós, fluoreszcencia és CD spektroszkópia illetve abszorpciós olvadási görbék elemzésével jellemeztük a kötődési folyamatot izolált DNS-hez és nukleoprotein komplexhez.

6.3.1. Abszorpciós spektrumok

Első lépésben az abszorpciós spektrumokat vizsgáltuk meg oly módon, hogy adott daunorubicin konjugátum koncentráció mellett növeltük a DNS és a fág mennyiségét. Ekkor a daunorubicin származékok $\lambda=400-575$ nm tartományban található abszorpciós sávjában batokróm és hipokróm változások következtek be, ami az interkalációs kötődés kialakulásának jele. A változások az izolált DNS esetében intenzívebbek voltak, mint a nukleoprotein komplexnél. Az egyes származékok közt is láthattunk kisebb eltéréseket, a Dau-Arg esetében voltak az eltolódások a legnagyobbak, a Dau-Gly és Dau-Leu ettől némileg elmaradt.

6.3.2. Olvadási görbék, kölcsönhatás kapszidfehérjével

Az abszorpciós olvadási görbék részletesebb adatokkal gazdagították a DNS-sel és bakteriofággal való kölcsönhatásról kialakuló képet. Hőmérséklet hatására a DNS-ben és a bakteriofágban bekövetkező fázisátalakulásokat a kötődő molekulák befolyásolják, és az új származékok esetében is ez történt. Az izolált DNS két szálának szétválása 80-85°C közt következik be kötődésmentes esetben, azonban a daunorubicin konjugátumok jelenlétében határozottan a magasabb hőmérsékletek

felé tolódott, és minél nagyobb a hatóanyag koncentrációjú oldatot vizsgáltunk, az eltolódás annál nagyobb volt. A DNS fázisátalakulási hőmérsékletének több fokkal való eltolódása az interkaláció kialakulására vezethető vissza, ugyanis a DNS bázisai közé beékelődő molekula stabilizálja a kettősszalú struktúrát. Természetesen az eltolódás mértékében volt különbség az egyes származékok közt, a Dau-Arg és Dau-Gly közel hasonló mértékű eltolódást okoztak, míg a Dau-Leu hatása szerényebb volt.

A teljes bakteriofág olvadási görbéjén a DNS-szétválás tekintetében az izolált DNS-sel kapott eredményekhez igen hasonló eltolódást tapasztaltunk, úgy tűnik tehát, hogy a kapszidburok nem akadályozza meg a daunorubicin származékok DNS közelébe jutását. Figyelemre méltó a 60°C körül jelentkező negatív csúcs is a derivált görbén, amely a kapszidburok fellazulásához köthető: jól megfigyelhető eltolódást mértünk mind a három származék esetében. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a vizsgált vegyületek a kapszidfehérjékkel is kölcsönhatásba lépnek.

6.3.3. *Fluoreszcencia emissziós spektrumok*

A kötődés kvantitatív jellemzését a fluoreszcencia emissziós spektrumok felhasználásával végeztük el. Tekintettel arra, hogy a daunorubicin csak egyféle kötődési formán keresztül lép kapcsolatba a polinukleotiddal, amely során a hatóanyag emissziója jelentősen lecsökken, a McGhee és Von Hippel által megfogalmazott modell (13) alapján végzett számítások jó közelítést adhatnak a kötődési állandókra. Méréseink alapján számolt állandók közül izolált DNS esetén a szabad daunorubiciné a legnagyobb, míg az aminosav konjugátumok egy nagyságrenddel gyengébben kötődnek. Ezek közül az arginines konjugátum bír a legnagyobb kötődési állandóval, míg a leucinos és glicines származék ettől némileg kisebb és egymáshoz hasonló affinitással rendelkezik.

A teljes fággal kapott spektrumok alapján összességében egy nagyságrenddel kisebb kötődési állandókat számítottunk. Nukleoprotein komplexhez is a konjugátatlan daunorubicin kötődik a legnagyobb affinitással, ezt követi az arginines konjugátum. Míg az izolált DNS esetében a másik két konjugátum, a Dau-Gly és a Dau-Leu igen hasonló kötődési állandókkal rendelkeztek, a fág partikulummal való kölcsönhatás során a glicines származék affinitása bizonyult nagyobbak.

Arról, hogy a kötődési készség alapján milyen jóslatokba bocsátkozhatunk a biológiai hatást illetően, megoszlanak a vélemények. Egyes szerzők szerint a daunorubicin kötődési affinitása és biológiai hatása közt direkt összefüggés található (139), míg mások véleménye szerint nem beszélhetünk egyszerű korrelációról (140).

6.3.4. Izolált DNS és T7 fág szerkezeti változásai

A kötődés következtében létrejövő DNS és bakteriofág konformáció-változásokat CD spektroszkópiával követtük. A kötődés hatására az izolált DNS jeleinek jelentős átalakulása tapasztalható. Azonban a daunorubicin szabad állapotában is intenzív CD jellel bír, amely a DNS tartományát is érinti. Ezért differencia-spektrumokat ábrázoltunk, hogy a spektrális változásokat kiemelhessük. A DNS CD spektrumának korábbi irodalmi értelmezései alapján a változásokról elmondható, hogy a daunorubicin származékok kötődése során a DNS helicitása lecsökken és a hatóanyag kellően magas koncentrációja esetében meg is szűnik, míg a stacking kölcsönhatások és a kétszálú struktúra megmarad.

Nukleoprotein komplex esetében a különbségi spektrumok alapján csak kisebb tényleges spektrális változás figyelhető meg a három új származékkal való kölcsönhatás során. A változás a fehérjére jellemző tartományt érinti. A polinukleotid bázisai által létrehozott CD sávban kötődés hatására nem jön létre változás.

6.3.5. Összegzés

A különféle spektroszkópiai módszerek összevetése alapján úgy tűnik, hogy a három új származék közül az argininnel létrehozott konjugátum kötődik legerősebben a DNS-hez. Ennek alapján az olyan konjugátumok tervezése során, ahol a peptid kapcsolása a daunozamin amin csoportján keresztül valósul meg, célszerű a spacer peptid szekvenciáját úgy kialakítani, hogy az enzimatis bontás után a daunorubicinen maradó aminosav arginin legyen.

7. Következtetések

Jelen dolgozatban két vegyületsoporttal foglalkoztunk. A bemutatott új tudományos eredmények a következőekben foglalhatók össze:

7.1. Kationos porfirinek és peptid konjugátumaik

1. Kettő (BMPCP) illetve három (TMPCP) pozitív töltéssel rendelkező porfirinek tetrapeptid konjugátumait hoztuk létre, továbbá a TMPCP-t egy elágazó láncú polilizin-vázis polipeptidhez is konjugáltuk. Kimutattuk, hogy az új molekulák kötődnek izolált T7 DNS-hez. A teljes bakteriofág esetében azonban csak a TMPCP, a TMPCP-4P és a BMPCP-4P₂ kötődését sikerült igazolnunk.
2. TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ interkalációval és külső kötődési móddal egyaránt kölcsönhatásba lép izolált örökítőanyaggal, míg a TMPCP-AK kizárólag külső kötődéssel kapcsolódik. Az igen gyenge affinitással rendelkező BMPCP feltételezhetően interkalálódik a bázispárok közé. Teljes bakteriofág esetében a két tetrapeptiddel kapcsolt BMPCP-4P₂ csak külső kötődéssel kapcsolódik a fehérjeburokban lévő DNS-hez, interkalációra csak hőkezelt fág esetében képes. Magasabb koncentrációknál aggregáció jelenségét mutatja, ez pedig jelentősen csökkenti kötődésének mértékét. A TMPCP-re és TMPCP-4P-re mindkét kötési forma jellemző nukleoprotein komplex jelenlétében is, melyek közül magasabb koncentrációknál az interkaláció válik dominánssá.
3. Az alapmolekulák és tetrapeptid konjugátumaik közül a három pozitív töltésű vegyületek nagyobb affinitással kötődtek izolált polinukleotidhoz a kétszeresen pozitív származékokhoz képest. Tetrapeptid kapcsolása növeli a kötődési képességet, ugyanis ez a molekulán található negatív töltések eltűnésével jár. Nagyobb méretű polipeptid kapcsolása gátló tényező, a

TMPCP-AK kötődési affinitása elmaradt a TMPCP-től és tetrapeptid konjugátumától, sőt BMPCP-4P₂-től is. A konjugátatlan BMPCP a leggyengébben kötődő származék. DNS környezetében lévő szerkezeti fehérjék hatását is vizsgáltuk nukleoprotein komplexhez való kötődés során. TMPCP, TMPCP-4P és BMPCP-4P₂ kötődését nem akadályozza meg a kapszidburok, de a kötődési affinitás lecsökken izolált DNS-hez képest. Több pozitív töltés továbbra is előnyös a kötődés szempontjából, a tetrapeptid jelenléte viszont hátránnyá válik, így a TMPCP nagyobb affinitást mutat tetrapeptid konjugátumánál. Nem mutatható ki kölcsönhatás BMPCP illetve TMPCP-AK és nukleoprotein komplex között.

4. Interkaláció következtében az izolált DNS konformációja megváltozik, a stacking kölcsönhatások felbomlanak és a helicitás lecsökken. T7 bakteriofágban a kötődés hatására a fehérjeburok szerkezete és a polinukleotid helicitása is változik.
5. A kapszidfehérjék és a porfirinek közt feltételezhetően kölcsönhatás alakul ki.
6. A sejtekbe történő felvétel tekintetében a BMPCP-4P₂ bír a legelőnyösebb tulajdonságokkal. A két pozitív töltésű származékok nagyobb asszociációs állandóval rendelkeznek ikerionos fejcsoportú foszfolipideket tartalmazó modellmembránokhoz, és fokozottabb mértékben kerültek a sejtekbe, mint a háromszorosan pozitív porfirinek. A több TMPCP molekulát – és ezért több pozitív töltést – tartalmazó TMPCP-AK sejtfelvételének mértéke lényegesen alacsonyabb a többi vegyülethez képest.
7. Egyik konjugátum sem jut be számottevően a sejtmagba, hanem a lizoszómákban és kisebb mértékben a mitokondriumokban dúsulnak fel. Egyedül a TMPCP-AK rendelkezik némileg eltérő intracelluláris elhelyezkedéssel, endocitózist követően a mitokondriumokban és a citoplazmában található vezikulumokba jut.

7.2. Daunorubicin aminosav konjugátumok

1. Daunorubicin három aminosav konjugátumát állítottuk elő; glicint, leucint illetve arginint kapcsoltunk amidkötésen keresztül az alapvegyülethez. A konjugátumok kötődnek izolált DNS-hez és nukleoprotein komplexhez, és a spektroszkópai elemzés alapján az interkalációs kötődési forma azonosítható.
2. A nukleoprotein komplex esetében számított kötődési állandók egy nagyságrenddel kisebbek, mint amelyet izolált DNS-nél kaptunk. A konjugátumok mindkét esetben egy nagyságrenddel kisebb kötődési állandóval rendelkeznek, mint a konjugátatlan daunorubicin.
3. A konjugátumok kötődése megváltoztatja a DNS helikális szerkezetét, míg a kétszálú struktúra megmarad. A T7 fág szerkezetében kötődés hatására bekövetkező jelentős változását nem tudtuk kimutatni.
4. Az új származékok kötődnek a kapszidfehérjékhez.
5. A daunorubicin argininnel képzett konjugátuma rendelkezik a legnagyobb affinitással a polinukleotid iránt, így ezt a származékot javasoljuk további molekulatervezési lépések során.

8. Összefoglalás

Jelen munka során két, a DNS-hez való kötődéséről nevezetes molekulacsoportot vizsgáltunk: kationos porfirineket és a daunorubicint. A kationos porfirinek és konjugátumaik fokozott tudományos érdeklődést élveznek fotodinamikus terápiában betöltött szerepük és az örökítőanyag iránti nagy affinitásuk miatt. A daunorubicint leukémia és mellrák kezelése során használják, azonban nem rendelkezik célsejtek iránti szelektivitással, ezért súlyos mellékhatások léphetnek fel a kezelés során. Csoportunk többféle szelektivitást fokozni képes hordozópeptidet vizsgál, azonban a hatóanyag kémiai módosítása jelentősen megváltoztathatja kötődési képességeit, ezért elengedhetetlen az új származékok kölcsönhatásainak elemzése.

Vizsgálatunkhoz kétszeresen pozitív töltésű porfirin tetrapeptid konjugátumát, háromszorosan pozitív porfirin tetrapeptid és polipeptid konjugátumát szintetizáltuk, továbbá háromféle daunorubicin aminosav konjugátumot állítottunk elő. Többféle spektroszkópiás módszer alkalmazásával feltérképeztük ezen molekulák DNS-hez és nukleoprotein komplexhez való kötődésének jellemzőit. A porfirin származékok esetében a sejt felvételt és az intracelluláris elhelyezkedést is vizsgáltuk.

Porfirin tetrapeptid konjugátumok kétféle kötési mód által kapcsolódnak izolált DNS-hez: külső kötődéssel és interkalációval, míg a polipeptid konjugátum csak külső komplexet alakít ki. Három pozitív töltés jelenléte és tetrapeptid kapcsolása előnyös a kötődés szempontjából. A daunorubicin származékok esetében az interkaláció a kötődés egyetlen módja. Kötődés hatására a DNS konformációja jelentősen megváltozik, a kétszálú struktúra azonban stabilizálódik.

A nukleoprotein komplex kapszidburka megakadályozza a polipeptid-konjugátum kötődését, míg a tetrapeptid-konjugátumok képesek kölcsönhatásba lépni a kapszidba zárt DNS-sel, jóllehet kisebb affinitással. A daunorubicin-konjugátumok is csak gyengébb interkalációt mutatnak az izolált DNS-hez képest. Mindkét molekulacsoport esetében feltételezhető kötődés a kapszidfehérjékhez is. A két pozitív töltésű porfirinek nagyobb arányban jutnak be a sejtekbe a háromszorosan pozitív töltésű társaiknál. A polipeptid konjugátum csak kis mértékben kerül a sejtekbe. Egyik porfirin sem mutatható ki a magban; a lizoszómákban, mitokondriumokban, illetve citoplazmában található vezikulumokban dúsultak fel.

9. Summary

In this work, our attention focused on the characterization of two group of molecules known for their DNS binding ability: cationic porphyrins and daunorubicin. Research on cationic porphyrins and their conjugates is a subject of growing interest because of their application in photodynamic therapy and as delivery agents to the vicinity of DNA. Daunorubicin is used in the treatment of leukemia and breast cancer, however its lack of selectivity can induce serious side effects. Our group studies several carrier peptides to facilitate selective targeting of drugs. Modifications of DNA binding molecules can have a strong impact on their interactions, therefore the binding properties of newly synthesized conjugates must be assessed to aid further design.

In the present study we synthesized tetrapeptide conjugate of bi-cationic, tetrapeptide and polypeptide conjugates of tri-cationic porphyrins; as well as lysine, arginine and leucine conjugates of daunorubicin. DNA and nucleoprotein binding of the aforementioned compounds was investigated with comprehensive spectroscopic methods. For the porphyrin derivatives we also analyzed cellular uptake and intracellular localization.

The porphyrin tetrapeptide conjugates bind to isolated DNA through two distinct binding modes: external binding and intercalation, while the polypeptide conjugate demonstrates external binding. Tri-cationic structure and tetrapeptide conjugation enhances the binding ability. For daunorubicin conjugates intercalation alone seems to be the mode of interaction. DNA conformation is significantly altered upon binding, and the interaction leads to the stabilization of the double-stranded structure. Capsid shell of the nucleoprotein complex pose a hindrance for polypeptide porphyrin conjugate, whereas tetrapeptide conjugates bind to encapsidated DNA through both binding modes, albeit with lower affinity. Daunorubicin conjugates also show weaker intercalative binding compared to isolated DNA. Binding to capsid proteins is assumed for both groups of molecules. Bi-cationic porphyrins show better accumulation in cells than their tri-cationic counterparts, the uptake of polypeptide conjugate was low. No porphyrin localized in the nucleus but instead accumulated in the lysosomes, mitochondria, or cytoplasmic vesicles.

10. Irodalomjegyzék

1. Jeney A, Kralovánszky J. Citotoxikus gyógyszerek. In: Gyires K, Füst Zs (szerk.), A farmakológia alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2011: 960-978.
2. Gurova K. (2009) New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. *Future Oncol*, 5:1685-1704.
3. Pindur U, Jansen M, Lemster T. (2005) Advances in DNA-ligands with groove binding, intercalating and/or alkylating activity: chemistry, DNA-binding and biology. *Curr Med Chem*, 12:2805–2847.
4. Strekowski L, Wilson B. (2007) Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutat Res*, 623:3–13.
5. Fiel RJ, Howard JC, Mark EH, Datta Gupta N. (1979) Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation, *Nucleic Acids Res*, 6:3093–3118.
6. Pasternack RF, Gibbs EJ, Villafranca JJ. (1983) Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry*, 22:2406–2414.
7. Pasternack RF, Bustamante C, Collings PJ, Giannetto A, Gibbs EJ. (1993) Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique. *J Am Chem Soc*, 115:5393–5399.
8. Strickland JA, Marzilli LG, Gay KM, Wilson WD. (1988) Porphyrin and metalloporphyrin binding to DNA polymers: rate and equilibrium binding studies. *Biochemistry*, 22:8870-8878.
9. Fiel RJ. (1989) Porphyrin-nucleic acid interactions: a review. *J Biomol Struct Dyn*, 6:1259–1273.
10. Shelstedt U, Kim SK, Carter P, Goodisman J, Vollano JF, Norden B, Dabrowiak, JC. (1994) Interaction of cationic porphyrins with DNA. *Biochemistry*, 33:417-426.
11. Zupán K, Herenyi L, Toth K, Majer Zs, Csik G. (2004) Binding of Cationic Porphyrin to Isolated and Encapsidated Viral DNA Analyzed by Comprehensive Spectroscopic Methods. *Biochemistry*, 43:9151–9159.
12. Schatchard G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci*, 51:660-72.

13. McGhee JD, von Hippel PH. (1974) Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol*, 86:469-89.
14. Pasternack RF, Garrity P, Ehrlich B, Davis CB, Gibbs EJ, Orloff G, Giartosio A, Turano C. (1986) The influence of ionic strength on the binding of a water soluble porphyrin to nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 14:5919-31.
15. Zupán K, Herényi L, Tóth T, Egyeki M, Csík G. (2005) Binding of cationic porphyrin to isolated DNA and nucleoprotein complex – quantitative analysis of binding forms under various experimental conditions. *Biochemistry*, 44:15000–15006.
16. Spikes JD. Photosensitization. In: Smith KC (ed.) *The Science of Photobiology*. New York, Plenum Press 1989:79-110.
17. Dubbelman TM, De Goejic AF, Van Steveninck J. (1980) Protoporphyrin-induced photodynamic effects on transport processes across the membrane of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 595:133-139.
18. North J, Neyndorff H, Levy JG. (1993) Photosensitizers as virucidal agents. *J Photochem Photobiol B*, 17:99-108.
19. Kvam E, Berg K, Steen HB. (1994) Characterization of singlet oxygen-induced guanine residue damage after photochemical treatment of free nucleosides and DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1217:9-15.
20. Kwanishi S, Inoue S, Sano S, Aiba H. (1986) Photodynamic guanine modification by hematoporphyrin is specific for single-stranded DNA with singlet oxygen as a mediator. *J Biol Chem*, 261:6090-6095.
21. Jori G. Molecular and cellular mechanisms in photomedicine: Porphyrins in cancer treatment. In: Douglas RH, Moan J, Dall'Acqua F (ed.), *Light in Biology and Medicine*. Plenum Press, New York, 1988:381-389.
22. Szeimies RM, Calzavara-Pinton P, Karrer S, Ortel B, Landthaler M. (1996) Topical photodynamic therapy in dermatology. *J Photochem Photobiol B*, 36:213-219
23. Jori G, Reddi E. Second generation photosensitizers for the photodynamic therapy of tumours. In: Douglas, RH, Moan J, Rontó Gy, (ed.), *Light in Biology and Medicine*. Plenum Press, New York, 1991:253-266.

24. Georgiou GN, Ahmet MT, Houlton A, Silver J, Cherry RJ. (1994) Measurement of the rate of uptake and subcellular localization of porphyrins in cells using fluorescence digital imaging microscopy. *Photochem Photobiol*, 59:419-422.
25. Villanueva A, Caggiari L, Jori G, Milanesi C. (1994) Morphological aspects of an experimental tumour photosensitized with a meso-substituted cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B*, 23:49-56.
26. Henderson BW, Dougherty TJ. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*, 55:145-157.
27. Webber J, Luo Y, Crilly R, Fromm D, Kessel D. (1996) An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in vivo. *J Photochem Photobiol B*, 35:209-211.
28. Henderson BW, Busch TM, Vaughan LA, Frawley NP, Babich D, Sosa TA, Zollo JD, Dee AS, Cooper MT, Bellnier DA, Greco WR, Oseroff AR. (2000) Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Res*, 60:525-529.
29. Ackroyd R, Brown NJ, Davis MF, Stephenson TJ, Marcus SL, Stoddard CJ, Johnson AG, Reed MW. (2000) Photodynamic therapy for dysplastic barrett's oesophagus: A prospective, double blind, randomised, placebo controlled trial. *Gut*, 47:612-617.
30. Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, Hatfield AR, Bown SG. (1995) Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX -a pilot study. *Gut*, 36:67-75.
31. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. (1990) Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B*, 5:281-293.
32. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. (1996) Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 32:153-157.

33. Merchat M, Spikes JD, Bertoloni G, Jori G. (1996) Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B*, 35:149-157.
34. Grandadam M, Ingrand D, Huraux JM, Aveline B, Delgado O, Vever-Bizet C, Brault D. (1995) Photodynamic inactivation of cell-free HIV strains by a red-absorbing chlorin-type photosensitizer. *J Photochem Photobiol B*, 31:171-177.
35. Trannoy LL, Lagerberg JW, Dubbelman TM, Schuitmaker HJ, Brand A. (2004) Positively charged porphyrins: A new series of photosensitizers for sterilization of RBCs. *Transfusion*, 44:1186-1196.
36. Far S, Kossanyi A, Verchere-Béaur C, Gresn N, Taillandier E, Perrée-Fauvet M. (2004) Bis- and tris-DNA intercalating porphyrins designed to target the major groove: Synthesis of acridylbis-arginyl-porphyrins, molecular modelling of their DNA complexes, and experimental tests. *Eur J Org Chem*, 8:1781–1797.
37. Dixon IM, Lopez F, Esteve JP, Tejera AM, Blasco MA, Pratviel G, Meunier B. (2005) Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *Chem Biol Chem*, 6:123-132.
38. Shieh MJ, Peng CL, Lou PJ, Chiu CH, Tsai TY, Hsu CY, Yeh CY, Lai PS. (2008) Non-toxic phototriggered gene transfection by PAMAM-porphyrin conjugates. *J Control Release*, 7:200–206.
39. Zhao P, Xu LC, Huang JW, Zheng KC, Liu J, Yu HC, Ji LN. (2008) DNA binding and photocleavage properties of a novel cationic porphyrin-anthraquinone hybrid. *Biophys Chem*, 134:72–83.
40. Jia T, Jiang ZX, Wang K, Li ZY. (2006) Binding and photocleavage of cationic porphyrin-phenylpiperazine hybrids to DNA. *Biophys Chem*, 119:295–302.
41. Kim WJ, Kang MS, Kim HK, Kim Y, Chang T, Ohulchanskyy T, Prasad PN, Lee KS. (2009) Water-soluble porphyrin-polyethylene glycol conjugates with enhanced cellular uptake for photodynamic therapy. *J Nanosci Nanotechnol*, 9:7130-7135.
42. Chen X, Hui L, Foster DA, Drain CM. (2004) Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: Targeting and incapacitating cancer cells. *Biochemistry*, 43:10918–10929.

43. Drain CM, Singh S, Samaroo D, Thompson S, Vinodu M, Tome JPC. (2009) New porphyrin glyco-conjugates. In: Photodynamic Therapy: Back to the Future, David H. Kessel (ed.). Proc of SPIE, 7380:2K1-9
44. Taba F, Sum TH, Sintic PJ, Lundmark AH, Crossley MJ. (2014) Synthesis of Steroid–Porphyrin Conjugates from Oestradiol, Oestrone, and Lithocholic Acid. *Aust J Chem*, 67:1632-1645.
45. Li D, Li P, Lin H, Jiang Z, Guo L, Li B. (2013) A novel chlorin-PEG-folate conjugate with higher water solubility, lower cytotoxicity, better tumor targeting and photodynamic activity. *J Photochem Photobiol B*, 127:28-37.
46. Kolevzon N, Yavin E. (2010) Site-specific DNA photocleavage and photomodulation by oligonucleotide conjugates. *Oligonucleotides*, 20:263-75.
47. van Dongen GA, Visser GW, Vrouenraets MB. (2004) Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 56:31-52.
48. Duarte V, Sixou S, Favre G, Pratviel G, Meunier B. (1997) Oxidative damage on RNA mediated by cationic metalloporphyrin-antisense oligonucleotides conjugates. *J Chem Soc, Dalton Trans*, 21:4113–4118.
49. Orosz A, Csík, G. (2016) Peptide/protein conjugates of photosensitizers. *Amino Acids, Peptides and Proteins*. 40:100-145.
50. Jensen TJ, Vicente MGH, Luguya R, Norton J, Fronczek FR, Smith KM. (2010) Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells. *J Photochem Photobiol B*, 100:100-111.
51. Odeh AM, Craik JD, Ezzeddine R, Tovmasyan A, Batinic-Haberle I, Benov LT (2014) Targeting Mitochondria by Zn(II)N-Alkylpyridylporphyrins: The Impact of Compound Sub-Mitochondrial Partition on Cell Respiration and Overall Photodynamic Efficacy, *PLoS ONE* 9: e108238.
52. Berg K. Mechanisms of cell damage in photodynamic therapy. In: Young A, Honigsmann H, Jori G. (ed.) *The fundamental bases of phototherapy*. OEMF, Milan 1996:181-207.
53. Sibrian-Vazquez M, Jensen TJ, Fronczek FR, Hammer RP, Vicente MGH. (2005) Synthesis and characterization of positively charged porphyrin-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem*, 16:852–863.

54. Sibrian-Vazquez M, Jensen TJ, Vicente MGH. (2008) Synthesis, characterization, and metabolic stability of porphyrin-peptide conjugates bearing bifunctional signaling sequences. *J Med Chem*, 51:2915–2923.
55. Chaloin L, Bigey P, Loup C, Marin M, Galeotti N, Piechaczyk M, Heitz F, Meunier B. (2001) Improvement of porphyrin cellular delivery and activity by conjugation to a carrier peptide. *Bioconjugate Chem*, 12:691–700.
56. Nuno Silva J, Haigle J, Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Mazière JC, Mazière C, Santus R, Cavaleiro JAS, Filipe P, Morlière P. (2006) Enhancement of the photodynamic activity of tri-cationic porphyrins towards proliferating keratinocytes by conjugation to poly-S-lysine. *Photoch Photobiol Sci*, 5:126–133.
57. Hudecz F, Szekerke M. (1980) Investigation of drug-protein interactions and the drug-carrier concept by the use of branched polypeptides as model systems. Synthesis and characterization of the model peptides. *Colect Czech Chem Comm*, 45: 933–940.
58. Hudecz F. (1995) Design of synthetic branched-chain polypeptides as carriers for bioactive molecules. *Anti-Cancer Drugs* 6:171–193.
59. Ogura S, Yazaki K, Yamaguchi K, Kamachi T, Okura I. (2005) Localization of poly-L-lysine-photosensitizer conjugate in nucleus. *J Control Release*, 103:1-6.
60. Szabó R, Sebestyén M, Kóczán G, Orosz Á, Mező G, Hudecz F. (2017) Cellular Uptake Mechanism of Cationic Branched Polypeptides with Poly[l-Lys] Backbone. *ACS Comb Sci*, 19:246-254.
61. Potmesil M. DNA topoisomerase II as an intracellular target in cancer chemotherapy by anthracyclines. In: Lown JW (ed.), *Anthracyclines and Anthracenedione Based Anticancer Agents*. Elsevier Inc., Amsterdam, 1988:XII/447-474.
62. Bodley A, Liu LF, Israel M, Seshadri R, Koseki Y, Giuliani FC, Kirschenbaum S, Silber R, Potmesil M. (1989) DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. *Cancer Res*, 49:5969-78.
63. Wang AHJ. (1992) Intercalative drug binding to DNA. *Curr Opin Struct Biol*, 2: 361–368.
64. Kennard O, Salisbury SA. (1993) Oligonucleotide X-ray structures in the study of conformation and interactions of nucleic acids. *J Biol Chem*, 268:10701-4.

65. Chaires JB, Satyanarayana S, Suh D, Fokt I, Przewloka T, Priebe W. (1996) Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry*, 35:2047-53.
66. Meyer-Losic F, Quinonero J, Dubois V, Alluis B, Dechambre M, Michel M, Cailler F, Fernandez AM, Trouet A, Kearsley J. (2006) Improved therapeutic efficacy of doxorubicin through conjugation with a novel peptide drug delivery technology (Vectocell). *J Med Chem*, 49:6908–6916.
67. Banoczi Z, Peregi B, Orban E, Szabo R, Hudecz F. (2008) Synthesis of daunomycin-oligoarginine conjugates and their effect on human leukemia cells (HL-60). *ARKIVOC*, 3:140–153.
68. Wong BK, Defeo-Jones D, Jones RE, Garsky VM, Feng DM, Oliff A, Chiba M, Ellis JD, Lin JH. (2001) PSA specific and non-PSA-specific conversion of a PSA-targeted peptideconjugate of doxorubicin to its active metabolites. *Drug Metab Dispos*, 29:313–318.
69. Rousselle C, Clair P, Lefauconnier JM, Kaczorek M, Scherrmann JM, Temsamani J. (2000) New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptidevector-mediated strategy. *Mol Pharmacol* 57:679–686.
70. Gaal D, Hudecz F. (1998) Low toxicity and high antitumour activity of daunomycin by conjugation to an immunopotential amphoteric branched polypeptide. *Eur J Cancer*, 34:155–161.
71. Szabó R, Bánóczy Z, Mező G, Láng O, Kőhidai L, Hudecz F. (2010) Daunomycin-polypeptide conjugates with antitumor activity. *Biochim Biophys Acta*, 1798:2209–16.
72. Baurain R, Masquelier M, Deprezde CD, Trouet A. (1983) Targeting of daunorubicin by covalent and reversible linkage to carrier proteins-lysosomal hydrolysis and antitumoral activity of conjugates prepared with peptidic spacer arms. *Drugs Exp Clin Res*, 9:303–311.
73. Nogusa H, Yano T, Kashima N, Yamamoto K, Okuno S, Hamana H. (2000) Structure-activity relationships of carboxymethylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates - systematic modification of peptide spacers. *Bioorg Med Chem Lett*, 10: 227–30.

74. Shiah JG, Sun YG, Peterson CM, Straight RC, Kopecek J. (2000) Antitumor activity of N-(2-hydroxypropyl)- methacrylamide copolymer-mesochlorin e(6) and adriamycin conjugates in combination treatments. *Clin Cancer Res.* 6:1008–1015.
75. Kamada H, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. (2004) Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 10:2545–2550.
76. Mező G, Manea M, Szabó I, Vincze B, Kovács M. (2008) New derivatives of GnRH as potential anticancer therapeutic agents. *Curr Med Chem*, 15:2366-79.
77. Orbán E, Mezo G, Schlage P, Csík G, Kulić Z, Ansorge P, Fellingner E, Möller HM, 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*, 41:469-83.
78. Orbán E, Manea M, Marquadt A, Bánóczy Z, Csík 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. *Bioconjugate Chem*, 22:2154-65.
79. Zupán K. (2008) A fotoaktiváció szerepe gyógyszerek, vegyszerek genotoxicitásában – DNS és nukleoproteid komplex fotoszenzibilizációja kationos porfirinszármazékkal. Doktori Értekezés, Semmelweis Egyetem, Budapest. 827.
80. Shen Y, Myslinski P, Treszczanowicz T, Liu YX, Koningstein JA. (1992) Picosecond laser-induced fluorescence polarization studies of mitoxantrone and tetrakisporphine/DNA complexes. *J Phys Chem*, 96:7782-7787.
81. Kelly JM, Murphy MJ, McConnell DJ, Uigin C. (1985) A comparative study of the interaction of 5,10,15,20-tetrakis(Nmethylpyridinium-4-yl)porphyrin and its zinc complex with DNA using fluorescence spectroscopy and topoisomerisation. *Nucleic Acids Res*, 13:167–184.
82. Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM. (1982) Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 21:3933-40.

83. Sari MA, Battioni JP, Dupre D, Mansuy D, Le-Pecq JB. (1990) Interaction of cationic porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum structural requirements for intercalation. *Biochemistry*, 29:4205–4215.
84. Lee S, Jeon SH, Kim BJ, Han SW, Jang HG, Kim SK. (2001) Classification of CD and absorption spectra in the Soret band of H₂TMPyP bound to various synthetic polynucleotides. *Biophys Chem*, 92:35–45.
85. Chen X, Liu M. (2003) Induced chirality of binary aggregates of opposite charged water-soluble porphyrins on DNA matrix. *J Inorg Chem*, 94:106-113.
86. Nový J, Urbanová M. (2007) Vibrational and electronic circular dichroism study of the interactions of cationic porphyrins with (dG-dC)₁₀ and (dA-dT)₁₀. *Biopolymers*, 85:349–358.
87. Geacintov NE, Ibanez V, Rougee M, Bensasson RV. (1987) Orientation and linear dichroism characteristics of porphyrin-DNA complexes. *Biochemistry*, 26:3087-3092.
88. Tóth K, Bolard J, Rontó Gy, Aslanian D. (1984) UV-induced small structural changes in the T7 bacteriophage studied by melting methods. *Biophys Struct Mech*, 10:229–239.
89. Csík G, Egyeki M, Herényi L, Majer Zs, Tóth K. (2009) Role of structure-proteins in the porphyrin-DNA interaction. *J Photochem Photobiol B*, 96:207–215.
90. Haq I, Lincoln P, Suh D, Norden B, Chowdhry BZ, Chaires JB. (1995) Interaction of DELTA.-and LAMBDA.-[Ru(phen)₂DPPZ]₂₊ with DNA: A Calorimetric and Equilibrium Binding Study. *J Am Chem Soc*, 117:4788-4796.
91. Bennett M, Krah A, Wien F, Garman E, McKenna R, Sanderson M, Neidle S. (2000) A DNA-porphyrin minor-groove complex at atomic resolution: The structural consequences of porphyrin ruffling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:9476-9481.
92. Lipscomb LA, Zhou FX, Presnell SR, Woo RJ, Peek ME, Plaskon RR, Williams LD. (1996) Structure of DNA-porphyrin complex. *Biochemistry*, 35:2818-2823.
93. Hui X, Gresh N, Pullman B. (1990) Modelling of the binding specificity in the interactions of cationic porphyrins with DNA. *Nucleic Acids Res*, 18:1109-1114.
94. Ford KG, Pearl LH, Neidle S. (1987) Molecular modelling of the interactions of tetra-(4-N-methylpyridyl)porphin with TA and CG sites on DNA. *Nucleic Acids Res*, 15:6553-6568.

95. Ford KG, Neidle S. (1995) Perturbations in DNA structure upon interaction with porphyrins revealed by chemical probes, DNA footprinting and molecular modelling. *Bioorg Med Chem*, 3: 671-677.
96. Mohammadi S, Perree-Fauvet M, Gresh N, Hillairet K, Taillandier E. (1998) Joint molecular modeling and spectroscopic studies of DNA complexes of a bis(arginyl) conjugate of a tricationic porphyrin designed to target the major groove. *Biochemistry*, 37:6165–6178.
97. Ward B, Skorobogaty A, Dabrowiak JC. (1986) DNA binding specificity of a series of cationic metalloporphyrin complexes. *Biochemistry*, 25:7827-7833.
98. Dabrowiak JC, Ward B, Goodisman J. (1989) Quantitative footprinting analysis using a DNA-cleaving metalloporphyrin complex. *Biochemistry*, 28:3314-3322.
99. Stroud RM, Serwer P, Ross MJ. (1981) Assembly of bacteriophage T7. Dimensions of the bacteriophage and its capsids. *Biophys J*, 36:743-57.
100. Fekete A, Rontó G, Feigin LA, Tikhonychev VV, Módos K. (1982) Temperature dependent structural changes of intraphage T7 DNA. *Biophys Struct Mech*, 9:1-9.
101. Serwer P. (1976) Internal proteins of bacteriophage T7. *J Mol Biol*, 107:271-91.
102. Serwer P, Hayes SJ, Watson RH. (1992) Conformation of DNA packaged in bacteriophage T7. Analysis by use of ultraviolet light-induced DNA-capsid cross-linking. *J Mol Biol*, 223:999-1011.
103. Dunn JJ, Studier FW, Gottesman M. (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J Mol Biol*, 166: 477–535.
104. Strauss JH, Sinsheimer RL. (1963) Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid. *J Mol Biol*, 7:43-54.
105. Clarke RJ, Appel HJ. (1989) A stopped-flow kinetic study of the interaction of potential-sensitive oxonol dyes with lipid vesicles. *Biophys Chem*, 34:225-237.
106. Margalit R, Rotenberg M. (1984) Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions. *Biochem J*, 219:445-450.

107. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54:713-733.
108. von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M, Fogh J. (1975) Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst*, 55: 555-560.
109. Estrada S, Gitler O, Gitler C. *Perspectives in Membrane Biology*, Academic Press, New York, 1974.
110. Ramos T. (1983) Cell surface structures required for B-cell activation with haptened syngeneic cells. *J Immunol*, 17:411-417.
111. Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A. (2011) Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J. Biophys*, 2011:414729
112. Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, Orlowski J. (1994) Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem*, 269:23544-23552.
113. Gouterman M. (1961) Spectra of porphyrins. *J Molec Spectrosc*, 6:138-163.
114. Ito AS, Azzellini GC, Silva SC, Serra O, Szabo AG. (1992) Optical absorption and fluorescence spectroscopy studies of ground state melanin-cationic porphyrins complexes. *Biophys Chem*, 45:79–89.
115. Reddi E, Ceccon M, Valduga G, Jori G, Bommer JC, Elisei F, Latterini L, Mazzucato U. (2002) Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol*, 75:462–70.
116. Momenteau M, Looock B, Bisagni E. (2009) Preparation and characterization of a new meso-substituted tetrapyrrole macrocycle: Meso-tetra[2-(3-carboxyethyl)furyl]porphine, [TFCO2 EtP]. *J Heterocyclic Chem*, 16:191–192.
117. Orosz ÁP. (2013) Fotokemoterápiás hatásmechanizmusok vizsgálata modellrendszereken. Kationos porfirinek kölcsönhatása nukleinsavakkal. Szakdolgozat, Semmelweis Egyetem, Budapest.

118. Mező G, Herényi L, Habdas J, Majer Zs, Mysliwa-Kurdziel B, Tóth K, Csik G. (2011) Synthesis and DNA binding of new cationic porphyrin-tetrapeptide conjugates. *Biophys Chem*, 155:36-44.
119. Pasternack RF, Giannetto A. (1991) Self-assembly of porphyrins on nucleic acids and polypeptides. *J Am Chem Soc*, 113:7799–7800.
120. Pasternack RF. (2003) Circular dichroism and the interactions of water soluble porphyrins with DNA - A minireview. *Chirality*, 15:329–332.
121. Jin B, Ahn JE, Ko JH, Wang W, Han SW, Kim SK. (2008) Effect of position and number of positive charges on the intercalation and stacking of porphyrin to poly[d(G-C)2], poly[d(A-T)2], and native DNA. *J Phys Chem B*, 112:15875–15882.
122. Jung JA, Lee SH, Jin B, Sohn Y, Kim SK. (2010) Effect of number and position of positive charges on the stacking of porphyrin along poly[d(A-T)2] at high binding densities. *J Phys Chem B*, 114:7641–7648.
123. Lee YA, Kim JO, Cho TS, Song R, Kim SK. (2003) Binding of meso-tetrakis(N-methylpyridium-4-yl)porphyrin to triplex oligonucleotides: Evidence for the porphyrin stacking in the major groove. *J Am Chem Soc*, 125:8106–8107.
124. Jin B, Lee HM, Lee YA, Ko JH, Kim C, Kim SK. (2005) Simultaneous binding of meso-tetrakis(N-methylpyridium-4-yl)porphyrin and 4',6-diamidino-2-phenylindole at the minor groove of poly(dA)•poly(dT) and poly[d(A-T)2]: Fluorescence resonance energy transfer between DNA bound drugs. *J Am Chem Soc*, 127:2417–2424.
125. Kypr J, Kejnovská I, Renčíuk D, Vorlíčková M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res*, 37:1713–1725.
126. Ohno O, Kaizu Y, Kobayashi H. (1993) J-aggregate formation of a water-soluble porphyrin in acidic aqueous media. *The Journal of Chemical Physics*, 99: 4128.
127. El-Hachemi Z, Escudero C, Arteaga O, Canillas A, Crusats J, Mancini G, Purrello R, Sorrenti A, D'Urso A, Ribo JM. (2009) Chiral sign selection on the J-aggregates of diprotonated tetrakis-(4-sulfonatophenyl)porphyrin by traces of unidentified chiral contaminants present in the ultra-pure water used as solvent. *Chirality*, 21:408-12

128. Agrawal V, Paul MK, Mukhopadhyay AK. (2005) 6-mercaptopurine and daunorubicin double drug liposomes-preparation, drug-drug interaction and characterization. *J Liposome Res*, 15:141-55.
129. Qu X, Trent JO, Fokt I, Priebe W, Chaires JB. (2000) Allosteric, chiral-selective drug binding to DNA. *PNAS*, 97:12032-12037.
130. Charak S, Mehrotra R. (2013) Structural investigation of Idarubicin DNA interaction: Spectroscopic and Molecular Docking study. *Int J Biol Macromol*, 60:213-8.
131. Johnson WC. Determination of the Conformation of Nucleic Acids by Electronic CD. In: Fasman GD (ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Springer, Boston, 1996:433-468.
132. Gray DM, Ratliff RL, Vaughan MR. (1992) Circular Dichroism Spectroscopy of DNA. *Methods Enzymol*, 211:389-406.
133. Dozzo P, Koo MS, Berger S, Forte TM, Kahl SB. (2005) Synthesis, Characterization, and Plasma Lipoprotein Association of a Nucleus-Targeted Boronated Porphyrin, *J Med Chem*, 48:357–359.
134. Jensen TJ, Vicente MGH, Luguza R, Norton J, Fronczek FR, Smith KM. (2010) Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells, *J Photochem Photobiol B*, 100:100-111.
135. Rajaputra P, Nkepan G, Watley R, You Y. (2013) Synthesis and in vitro biological evaluation of lipophilic cation conjugated photosensitizers for targeting mitochondria. *Bioorg Med Chem*, 21:379-387.
136. Ezzeddine R, Al-Banaw A, Tovmasyan A, Craik JD, Batinic-Haberle I, Benov LT. (2013) Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(2) N-Alkylpyridylporphyrin. *J Biol Chem*, 288:36579-36588.
137. Angeli NG, Lagorio MG, San Román EA, Dicelio LE. (2000) Meso-substituted cationic porphyrins of biological interest. Photophysical and physicochemical properties in solution and bound to liposomes. *Photochem Photobiol*, 72:49-56.

138. Biron E, Voyer N. (2008) Towards sequence selective DNA binding: Design, synthesis and DNA binding studies of novel bis-porphyrin peptidic nanostructures. *Org Biomol Chem*, 6:2507-2515
139. Valentini L, Nicoletta V, Vannini E. (1985) Association of anthracycline derivatives with DNA: a fluorescence study. *Farmaco Sci*, 40:377–390.
140. Krohn K. (2008) Interaction of natural and synthetic anthracyclines with DNA. *Curr Bioact Compounds*, 4:175–188.

11. Saját közlemények jegyzéke

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Orosz Á**, Mező G, Herényi L, Habdas J, Majer ZS, Mysliwa-Kurdziel B, Tóth K, Csík G. Binding of new cationic porphyrin–tetrapeptide conjugates to nucleoprotein complexes. *BIOPHYSICAL CHEMISTRY* 177-178: pp. 14-23. (2013), IF: 2,319
2. **Orosz Á**, Bősze Sz, Mező G, Szabó I, Herényi L, Csík G. Oligo- and polypeptide conjugates of cationic porphyrins: binding, cellular uptake, and cellular localization. *AMINO ACIDS* 49:(7) pp. 1263-1276. (2017), IF: 2,906
3. **Orosz Á**, Csík G. Peptide/protein conjugates of photosensitizers. In: Maxim Ryadnov, Ferenc Hudecz (szerk.) *Amino Acids, Peptides and Proteins*. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing, 2016. pp. 100-145. (40.) (ISBN:978-1-78262-059-4)

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

1. Szabó R, Sebestyén M, Kóczán G, **Orosz Á**, Mező G, Hudecz F. Cellular Uptake Mechanism of Cationic Branched Polypeptides with Poly[1-Lys] Backbone. *ACS COMBINATORIAL SCIENCE* 19:(4) pp. 246-254. (2017), IF: 3,5

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Csík Gabriellának, tudományos diákköri és doktori témavezetőmnek, hogy másodéves korom óta nagy lelkesedéssel, hatalmas szakmai tudással és példamutató emberséggel egyengette utamat a tudományos munkában való elmélyülés felé. Nélküle nem érhettem volna el az elmúlt kilenc évem szakmai eredményeit. Példakép számomra.

Dr. Herényi Leventének, hogy a sikeresen teljesített Biofizika szigorlat végén TDK-munkára hívott, elindítva azon az úton, amelyen egyetemi éveim legszebb élményeit élhettem át. Hálás vagyok a spektrumfelbontások rejtelmeibe való bevezetésért, a rengeteg jótanácsért, segítségért. Elemzéseit és az általa ajánlott koncertek nélkül nem szerettem volna meg Bach zenéjét. Kedves emlékeim között tartom számon a filozófiai, vallási és művészeti témájú beszélgetéseinket.

Dr. Mező Gábornak a konjugátumok szintéziséért és a közös munka lehetőségéért, értékes tanácsaiért.

Dr. Bősze Szilviának és Dr. Szabó Ildikónak, hogy laborukban megismerkedhettem a sejtekkel végzett munkával, és az áramlási citometria technikájával.

Dr. Horváth Péternek, a Gyógyszerészi Kémia Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette a CD méréseket, segítőkészségéért és a remek hangulatú közös mérésekért.

Dr. Kellermayer Miklósnak, a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet igazgatójának, hogy mindig támogatta munkám rangos nemzetközi konferenciákon való bemutatását.

Dr. Liliom Károlynak és Dr. Mártonfalvi Zsoltnak, hogy a kéziratot gondosan és alaposan átolvasták, észrevételeik és javaslataik nyomán a szöveget több helyen gördülékenyebbé és világosabbá tehettem.

Drabbant Mónikának a laboratóriumi munkám során nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban **családomnak**, szeretetükért és minden támogatásukért.