

**Akademie věd České republiky  
Ústav molekulární genetiky, v.v.i.  
Oddělení molekulární virologie**

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**  
Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Autoreferát k dizertační práci

Molekulární mechanismy apoptózy vyvolané fotodynamickou  
aktivací v nádorových buňkách

Irena Moserová

Školitel: RNDr. Jarmila Králová, CSc.

Praha 2012

Předkládaná dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studia při oborové radě Molekulární a buněčné biologie, genetika a virologie na PřF UK a v Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky v.v.i.

Autor: Mgr. Irena Moserová  
Adresa: Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.  
Oddělení molekulární virologie  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4  
Telefon: (+420) 241 063 391  
Fax: (+420) 241 063 586  
E-mail: irena.moserova@img.cas.cz

Oborová rada: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie  
Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc  
Školitel: RNDr. Jarmila Králová, CSc.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

PhD thesis was elaborated at the Department of Molecular Virology of the Institute of Molecular Genetics v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic.

Author: Irena Moserová, M.Sc.  
Address: Department of Molecular Virology  
Institute of Molecular Genetics, v.v.i.  
Academy of Sciences of the Czech Republic  
Václavská 1083, 142 20 Prague 4  
Tel: 241 063 391, fax: 241 063 586  
E-mail: irena.moserova@img.cas.cz  
Supervisor: Jarmila Králová, PhD

Tato dizertační práce je založena na následujících publikacích:

Kralova J, Briza T, **Mosero**va I, Dolensky B, Vasek P, Pouckova P, Kejik Z. Glycol porphyrin derivatives as potent photodynamic inducers of apoptosis in tumor cells.

*J. Med. Chem.* 2008, *51*, 5964–5973 (IF=5.207)

**Mosero**va I, Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS ONE* 2012, *7*, e32972 (IF=4.411)

Zmíněné publikace jsou součástí dizertační práce. Úplný seznam mých publikací je uveden v kapitole 5, Seznam publikací.

## SOUHRN

Fotodynamická terapie (PDT) je terapeutický prostředek používaný při léčbě nádorů. Tato metoda je založena na aplikaci fotosenzitivní látky, která se hromadí v nádorových buňkách a po ozáření světlem způsobuje jejich usmrcení. Hlavním cílem této disertační práce bylo studium nových fotosenzitivních látek - porfyrinů s glykolovou substitucí. Porfyriny obsahující jeden až čtyři nízkomolekulární glykolové řetězce vázané éterovou vazbou v pozici meta na meso-tetrafenylporfyrin (mTPP(EG)1-4) byly porovnány s fluorinovanými (pTPPF(EG)4) a nefluorinovanými (pTPP(EG)4) deriváty majícími glykolový řetězec v para pozici. Vstup do buněk a fotodynamická aktivita byly výrazně závislé na koncových skupinách glykolových substituentů. Porfyriny s hydroxyglykolovou substitucí, na rozdíl od porfyrinů s methoxyglykolovou substitucí, byly účinněji transportovány do buněk a způsobovaly hojně apoptózu v nádorových buňkách *in vitro*. Po počátečním otestování byly vybrány a detailně analyzovány prototypy hydroxy etylenglykolových derivátů. Para deriváty pTPP(EG)4 a pTPPF(EG)4 se akumulují především v lysozomech, zatímco meta deriváty mTPP(EG)1-4 v endoplazmatickém retikulu (ER). Pozice etylenglykolového řetězce na porfyrinovém kruhu má vliv nejen na nitrobuněčnou lokalizaci ale i na účinnost fotodynamické terapie *in vivo*. PDT zprostředkovaná meta deriváty vedla u NuNu myši k úplnému vymizení nádorů (lidský karcinom prsu MDA-MB-231). Po fotoaktivaci oba typy derivátů indukují smrt nádorových buněk pomocí reaktivních druhů kyslíku (reactive oxygen species, ROS). Para deriváty pTPP(EG)4 a pTPPF(EG)4 aktivují p38 MAP kinázovou signální kaskádu, která následně spustí mitochondriální apoptickou dráhu. Na rozdíl od para derivátů, meta derivát porfyrinu mTPP(EG)4 vyvolává dramatické změny homeostázy  $Ca^{2+}$  projevující se zvýšenou hladinou  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě, aktivací kalpainů a stresových kaspáz -12 nebo -4. Stres endoplazmatického retikula vede k rozvoji tzv. unfolded protein response (UPR), jejíž součástí je PERK signální dráha aktivovaná fosforylací PERK, eIF2 $\alpha$ . Následně jsou indukovány transkripční faktory ATF4 a CHOP, které regulují geny odpovídající na stresové podněty. Úlohu PERK dráhy v mTPP(EG)4-zprostředkované buněčné smrti potvrzují pokusy, kdy vyřazení (knockdown) genu PERK nebo jeho utlumení chrání buňky před apoptózou.

Výsledky získané analýzou mechanismu buněčné smrti navozené PDT jasně dokládají, že mTPP(EG)4 představuje nový fotosenzitizér s lokalizací mimo mitochondrie, který má schopnost velmi účinně aktivovat apoptózu v rakovinových buňkách. Navíc je při odstranění experimentálních nádorů výrazně účinnější než klinicky používaný Foscan. Předkládaná práce tak ukazuje zajímavý způsob, jak dále vyvíjet fotosenzitizéry pro budoucí použití v klinické praxi.

## SUMMARY

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment modality for cancer. It combines selective accumulation of chemical compounds, called photosensitizers (PS), with light to irreversibly damage cancer cells via oxidative stress. The main goal of this thesis was to study photosensitizers represented by a unique group of newly synthesized porphyrin derivatives with glycol chain substitution. Glycol-functionalized porphyrins containing one to four low molecular weight glycol chains that are linked via ether bonds to the meta-phenyl positions of meso-tetraphenylporphyrin (mTPP(EG)1-4) were compared with fluorinated (pTPPF(EG)4) and nonfluorinated (TPP(EG)4) derivatives having glycol chains in para-phenyl positions. The cellular uptake and photodynamic activity was significantly dependent on terminal groups of the glycol substituent. Hydroxy glycol porphyrins, in contrast with methoxy glycol porphyrins, exhibited efficient intracellular transport and high induction of apoptosis in tumor cell lines in vitro. After initial testing effective prototype hydroxy ethylene glycol derivatives were selected and analyzed in detail. Para derivatives pTPP(EG)4 and pTPPF(EG)4 accumulated mainly in lysosomes whereas meta derivatives mTPP(EG)1-4 in the endoplasmic reticulum (ER). Position of ethylene glycol chain on the porphyrin ring affected not only intracellular localization but also PDT efficacy demonstrated by permanent ablation of human breast carcinoma (MDA-MB-231) in nude mice following treatment with meta derivatives. After photoactivation, both types of derivatives induced death of tumor cells via reactive oxygen species (ROS). Para derivatives pTPP(EG)4 and pTPPF(EG)4 activated the p38 MAP kinase cascade, which in turn induced the mitochondrial apoptotic pathway. In contrast, meta porphyrin derivative mTPP(EG)4 induced dramatic changes in  $Ca^{2+}$  homeostasis manifested by  $Ca^{2+}$  rise in the cytoplasm, activation of calpains and stress caspase-12 or caspase-4. ER stress developed into unfolded protein response. Immediately after irradiation the PERK pathway was activated through phosphorylation of PERK, eIF2 $\alpha$  and induction of transcription factors ATF4 and CHOP, which regulate stress response genes. PERK knockdown and PERK deficiency protected cells against mTPP(EG)4-mediated apoptosis, confirming the causative role of the PERK pathway.

Analysis of the cell-death mechanism revealed that mTPP(EG)4 represent a novel nonmitochondrially localized photosensitizer that has a profound ability to induce apoptosis in tumor cells and exhibits a superior PDT efficacy in elimination of experimental tumors in comparison to clinically used photosensitizer Foscan. The presented work thus suggests an interesting avenue for further development of photosensitizers aiming at their future clinical application.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	1
1.1	Fotodynamická terapie .....	1
1.1.1	Fotosenzitizér .....	1
1.1.2	Absorpční vlastnosti PS a prostupnost světla tkání .....	2
1.1.3	PDT – mechanismus účinku – fotofyzika a fotochemie .....	2
1.1.4	Nitrobuněčná lokalizace PS .....	2
1.2	Molekulární mechanismus buněčné smrti při PDT .....	3
1.2.1	Tři základní typy programované buněčné smrti .....	3
1.2.2	Regulační dráhy indukující apoptózu nevozenou PDT .....	4
2	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE .....	6
3	VÝSLEDKY .....	7
3.1	Vstup derivátů porfyriu do buněk .....	7
3.2	Fototoxicita <i>in vitro</i> .....	7
3.3	Nitrobuněčná lokalizace derivátů porfyriu s EG substitucí v buňkách 4T1 .....	7
3.4	Deriváty porfyriu s EG substitucí vedou k buněčné smrti apoptózou .....	8
3.4.1	Účinky derivátů porfyriu s EG substitucí v pozici meta na růst nádorů <i>in vivo</i> po PDT .....	8
3.4.2	ROS jako aktivátory buněčné smrti navozené deriváty porfyriu s EG substitucí .....	8
3.4.3	MAP kinázy (MAPK) a jejich úloha v apoptóze navozené deriváty porfyriu s EG substitucí .....	9
3.4.4	Fotoaktivací derivátu porfyriu s EG substitucí dochází ke vzniku stresu ER a změnám v homeostázi Ca <sup>2+</sup> .....	9
3.4.5	Efekt derivátu porfyriu s EG substitucí na aktivaci kalpainu a stresových kaspáz .....	10
3.4.6	mTPP(EG)4 s lokalizací v ER způsobuje vznik stresu ER a následnou aktivaci několika UPR cílových genů .....	10
4	ZÁVĚRY .....	12
5	SEZNAM PUBLIKACÍ .....	14
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	14

# 1 ÚVOD

## 1.1 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je léčebná metoda využívaná k léčbě nádorů. Tato nadějná metoda je založena na aplikaci fotosenzitivní látky (syntetická nebo přírodní látka, aktivovatelná světlem), jež se přednostně hromadí v nádorových buňkách a po ozáření světlem způsobuje jejich smrt. PDT je založena na fotochemické interakci fotosensitizeru, světla a molekuly substrátu, jejímž konečným produktem jsou tzv. reaktivní formy kyslíku (ROS). Mezi ROS patří různé formy volných kyslíkových radikálů, ale také vysoce cytotoxický singletový kyslík  $^1\text{O}_2$  (9, 10). Tento proces vede k programované buněčné smrti – apoptóze, nekróze nebo autofágii (4, 24, 42).

### 1.1.1 Fotosenzitizer

Fotosenzitizer (PS) je definován jako chemická látka, která po absorpci světla indukuje chemickou nebo fyzikální změnu jiné chemické látky. Když je fotosenzitizer obsažen v rakovinových buňkách a tyto buňky se ozáří světlem o specifické vlnové délce, dojde k jeho aktivaci a následně zahájení procesů vedoucích ke smrti těchto buněk. Ideální PS je charakterizován několika důležitými vlastnostmi. Především by to měla být chemicky čistá látka s garantovanou kontrolou kvality, s nízkými výrobními náklady a měla by vykazovat vysokou stabilitu při skladování. Dále by měla být foto- a biologicky stabilní, s absorpčním spektrem v oblasti vlnové délky 600-800 nm (červená-temně červená), jelikož absorpce fotonů o vlnové délce vyšší než 800 nm neposkytuje dostatek energie k excitaci kyslíku do jeho singletové formy a dalších reaktivních forem. Zároveň není vhodné ani světlo s nižší vlnovou délkou, jelikož nemá dostatečnou průchodnost tkáněmi (10). Odstranění PS z těla by mělo být co nejrychlejší, aby se co nejvíce snížily vedlejší fototoxické účinky. PS nesmí být toxický v nepřítomnosti světla. Dále by měl snadno vstupovat do tkání a být rozpustný v biologických médiích a musí s vysokou účinností vytvářet ROS. Navíc by mělo docházet k jeho přednostnímu hromadění v nádorové tkáni. I přes částečné úspěchy se stále hledají lepší PS, které by měly pokud možno ideální vlastnosti. Mechanismus přednostního hromadění PS v nádorové tkáni stále není plně popsán a pochopen. V rámci PDT bylo formulováno a navrženo několik hypotéz (10). Ty zohledňují specifické vlastnosti nádorové tkáně, jako například relativně propustnou až děravou vaskularizaci, která je následkem rychlého růstu a rychlé tvorby nových cév, dále nedostatečné napojení na lymfatický systém, což dohromady vede k vysoké propustnosti ale zároveň k vysoké retenci (19).

Jedny z vhodných fotosensitizerů jsou **porfyriny** (27). Porfyriny nejsou toxické, mají v přírodě velmi různorodou funkci a mohou mít úžasnou škálu rolí. To je jeden z důvodů, proč jsou hojně

studovány. Základní strukturou těchto molekul, mezi něž patří chlorofyl, hemoglobin, cytochromy nebo vitamin B12, je porfyrinový kruh soustředěný kolem centrálního atomu (v případě hemu je centrálním atomem železo, v chlorofylu hořčík). Porfyriny se přednostně hromadí v nádorových buňkách, absorbují světlo o vlnové délce v rozpětí viditelného světla. Jejich omezením je jejich hydrofobnost. Problém jejich špatné rozpustnosti a nízkého transportu do buněk může být vyřešen navázáním hydrofilních substituentů (např. hydroxyl, cukry, amino borát, sulfát, fosfonát, cyklodextrin, protein nebo PEG). Náhrada jádra struktury PS je další z modifikací, která ovlivňuje fotofyzikální vlastnosti a uspořádání chemické struktury makrocycly.

### **1.1.2 Absorpční vlastnosti PS a prostupnost světla tkání**

Pro úspěšné zahájení fotodynamické reakce je třeba ozáření fotosensitizeru světlem o určité vlnové délce. Modré světlo prochází tkání méně účinně, zatímco červené a infračervené světlo proniká do tkáně hlouběji. Většina PS je aktivována světlem o vlnové délce mezi 630 a 700 nm, což odpovídá proniknutí světla do tkáně od 0,5 cm (~630 nm) do 1,5 cm (~700 nm). K tvorbě reaktivního kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ) však dochází jen po ozáření světlem o maximální vlnové délce 800 nm.

### **1.1.3 PDT – mechanismus účinku – fotofyzika a fotochemie**

Fotosensitizer má v základním stavu ve vnějším orbitalu 2 elektrony s navzájem opačným směrem otáčením (spinem). Absorpce světla vede k přechodu jednoho elektronu do orbitalu s vyšší energií. Takto excitovaný PS je velmi nestabilní a přebytečnou energii vyzáří ve formě fluorescence a/nebo tepla. PS však může projít tzv. intersystémovým přechodem za vzniku excitovaného tripletního stavu charakterizovaný jedním elektronem s obráceným směrem otáčení. PS v tomto stavu se může buď rozpadnout bez vyzáření a vrátit se do základního stavu nebo přenést energii na molekulu kyslíku ( $\text{O}_2$ ), což vede ke vzniku unikátní molekuly, tzv. triplet v základním stavu. Tento krok vede k vytvoření singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ) a nazývá se proces typu II. Proces typu I, který může také nastat, je založen na reakci PS přímo s jakoukoli organickou molekulou v buněčném prostředí, z níž získává atom vodíku nebo elektron a dochází k tvorbě radikálu. Následná autooxidace redukovaného PS vede k tvorbě superoxidového anionového radikálu ( $\text{O}_2^-$ ). Dismutace  $\text{O}_2$  nebo redukce jeho jednoho elektronu vytváří peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), který zase prochází redukcí jednoho elektronu a většinou vytváří účinný hydroxylový radikál ( $\text{OH}$ ). Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) cestou typu II je jednodušší než typ I a předpokládá se, že většina PS působí spíše právě mechanismem typu II.

### **1.1.4 Nitrobuněčná lokalizace PS**

Je známo, že k poškození buněčných struktur v důsledku oxidativního stresu dochází pouze v místech shodných s místy lokalizace fotosensitizeru (40). To je způsobeno velmi krátkou



dobou života ROS a jejich omezenou difuzí v biologických systémech ( $<0,04 \mu\text{s}$ , akční radius  $<0,02 \mu\text{m}$ ). Je tedy zřejmé, že primární molekulární cíle PDT se nacházejí pouze několik nanometrů od molekuly senzitizeru (39). Fotosenzitizery, které účinně vyvolávají apoptózu, se přednostně akumulují v mitochondriích (verteporfin, Pc4, ALPc, CMXRos, ATX-s10 etc.) (3, 18, 20, 25, 37, 38, 52, 53, 57) nebo endoplazmatickém retikulu (Hypericin, Foscan, CPO, PPME) (14, 20, 21, 35, 36, 50), kde spouštějí apoptózu. Zatímco fotosenzitizery akumulující se v plazmatické membráně nebo lysozomech (Photofrin, Npe6, LuTex) způsobují převážně smrt buňky nekrotickou (17, 23, 45, 55). To zda dojde ke smrti buněk po PDT apoptózou nebo nekrotickou záleží na dalších faktorech, jakými jsou typ buněk, koncentrace fotosenzitizeru a dávka světla.

## 1.2 Molekulární mechanismus buněčné smrti při PDT

### 1.2.1 Tři základní typy programované buněčné smrti

Fotodynamická terapie může vyvolat 3 typy programované buněčné smrti: apoptózu, nekrotickou a autofagii. PDT je spojena s apoptózou, typu buněčné smrti, jež je vysoce kontrolovaný a energeticky náročný proces, spíše než s nekrotickou, která není již tak regulovaná často dochází ke vzniku zánětlivého procesu (1, 22, 42, 54).

#### 1.2.1.1 Apoptóza

Apoptóza je jedním z hlavních typů programované buněčné smrti. Zahrnuje sled biochemických procesů vedoucích k typickým změnám vzhledu buňky: kondenzaci chromozomů, fragmentaci DNA, smrštění buňky, změně tvaru plazmatické membrány a vytvoření apoptických tělísek. Následně dochází k šetrnému odstranění zbytků této buňky (bez přítomnosti k zánětu), čímž se apoptóza liší od nekrotické.

Kaspázy účastníci se apoptózy můžeme rozdělit na iniciátory (kaspázy-8/-10 a -9) a efekторы (kaspázy-3 a -7), tyto kaspázy se účastní dvou hlavních drah: „vnější“ a „vnitřní“ dráhy. **Vnější dráha** je iniciována navázáním ligandu (např. FasL, TNF- $\alpha$ , TRAIL) na receptor smrti – DR (např. Fas, TNF-RI, TRAIL receptor). Po navázání ligandu na receptor dojde ke vzniku tzv. DISC (“death inducing signaling complex”), který aktivuje kaspázu-8 a kaspázu-10. Kaspázy-8/-10 pak obvykle aktivují další kaspázy (kaspázy-3 a -7), které nevratně směřují ke smrti buňky [shrnutí v (5, 30)]. **Vnitřní dráha** je zprostředkována přes mitochondrie. Signální dráhy způsobující buněčnou smrt lze rozdělit na jdoucí přes / mimo mitochondrie. Mitochondrie jsou životně důležitou organelou, s vysokým metabolickým obrátem a produkcí zásob energie ve formě ATP. Překrývající se signální dráhy aktivované při poškození se sbíhají právě na mitochondriální membráně, což vede následně k její permeabilizaci. Permeabilizace mitochondriální membrány vede k uvolnění několika apoptogenních proteinů, uložených v mitochondriálním mezimembránovém prostoru, do cytozolu. Mezi proteiny lokalizované v mitochondriálním mezimembránovém prostoru, které mají důležitou roli v apoptóze, patří aktivátory kaspáz, jako

je například cytochrom c. Navázání cytochromu c v cytozolu na Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) v přítomnosti ATP nebo dATP vede aktivaci prokaspázy-9 a následnému vytvoření heptamerního komplexu zvaného apoptozóm. Apoptózu-indukující factor (AIF) a endonukleáza G se přesouvají do jádra, kde způsobují kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA nezávisle na kaspázách (32, 47). Štěpení proapoptického proteinu Bid, který je členem Bcl-2 rodiny, je zprostředkováno kaspázou-8 a představuje místo propojení mezi vnitřní a vnější dráhou apoptózy [shrnutí v (5, 30)].

### **1.2.1.2 Nekróza**

Nekróza je morfologicky charakterizována vakuolizací cytoplazmy, bobtnáním a rozpadem plazmatické membrány. To vše vede ke vzniku zánětlivé reakce způsobené uvolněním obsahu buňky včetně prozánětlivých molekul. Nekróza je považována za konečný důsledek bioenergetické katastrofy vznikající z vyčerpání ATP na úroveň neslučitelnou s přežitím buňky (11).

### **1.2.1.3 Autofágie**

Autofágie, lysozomální degradační dráha, je jedním z katabolických procesů, který buňkám umožňuje vyrovnat se s nedostatkem živin pomocí stravování vlastních cytoplazmatických komponent. Autofágie rovněž slouží k odstranění poškozených proteinů a organel (7). Charakteristickým znakem autofágie je zformování dvojmembránových struktur, které izolují cytoplazmatické komponenty a vytvářejí autofagické vakuoly, tzv. autofagozomy, které poté fúzí s lysozomy.

## **1.2.2 Regulační dráhy indukující apoptózu nevozenou PDT**

Apoptóza je bezesporu nejlépe prostudovanou formou programované buněčné smrti, a má celou řadu úloh, jak fyziologických tak i patologických a terapeutických. Apoptóza je nejrozšířenějším typem buněčné smrti navozené PDT.

### **Význam stresu ER v apoptóze navozené PDT**

Endoplazmatické retikulum má významnou roli v udržení homeostázi  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, syntéze proteinů, posttranslační modifikaci a správném složení proteinu, stejně jako jejich třídění a export. Změny v homeostázi  $\text{Ca}^{2+}$  nebo akumulace nesložených proteinů v ER může vyvolat vznik stresu (44). Stres ER může spouštět apoptózu nejméně dvěma mechanismy, zejména  $\text{Ca}^{2+}$  signalizací a odpovědí na vysoké množství nesbalených proteinů (unfolded protein response, UPR) (12, 44). Oxidativní poškození ER způsobené navozené PDT může vést k dramatickému narušení  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázi. Navíc vylití  $\text{Ca}^{2+}$  z ER může vést k aktivaci kalpainů, klíčových hráčů v přenosu signálu  $\text{Ca}^{2+}$  z ER na kaspázu-12. To následně vede k aktivaci dalších kaspáz – kaspáz-9/-3/-7 a aktivaci apoptózy nezávislé na cytochromu c a Apaf-1. Kaspáza-12, jejíž lidský

homolog je kaspáza-4, je považována za klíčovou kaspázu apoptózy v odpovědi na stres (16, 31, 41).

Hlavní funkcí ER, kromě úlohy v signalizaci a uskladnění zásoby  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, je zajištění správného složení nově syntetizovaných proteinů a jejich modifikace a sorting. Porušení jakékoli z těchto funkcí může vést ke vzniku stresu ER. Výrazné zásahy do koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v ER mohou také vést ke vzniku stresu ER, stejně tak jako poruchy ve skládání proteinů, které vedou ke vzniku UPR. Obecně je stres ER detekován třemi integrálními stresovými receptory, mezi něž patří PERK, ATF6 a IRE1 (46). Tyto transmembránové proteiny endoplazmatického retikula jsou za normálních podmínek udržovány v neaktivním stavu navázáním na chaperon Bip/GRP78 (glucose regulated protein 78 kD). Při akumulaci nesložených proteinů, se tato vazba ruší a dochází tak k jejich aktivaci. PERK fosforyluje  $\alpha$  podjednotku eukaryotického iniciačního faktoru 2, což následně vede ke zvýšené translaci transkripčního faktoru ATF4 (33). ATF4 následně zvyšuje expresi proapoptotického proteinu CHOP (13, 34).

### **Význam MAPK v mechanismu PDT**

V současnosti je známo, že mechanismus PDT není omezen pouze na jednu organelu nebo na jednu signální kaskádu. V procesu buněčné smrti navozené PDT byla popsána celá řada signálních kaskád (5).

Oxidativní stres aktivuje několik signálních drah, mezi něž patří i mitogen-aktivovaná proteinkináza (MAPK). MAPK patří do rodiny serin/threonin protein kináz, které jsou aktivovány fosforylací na tyrozinu a threoninu. Tři nejznámější MAPK z této rodiny jsou: ERK, JNK a p38 MAPK. JNK a p38 mají klíčovou úlohu v přenosu stresových signálů (15) a jsou často spojovány s apoptózou (6). Přesná úloha JNK a p38 MAPK v mechanismu apoptózy navozené PDT zůstává stále rozporuplná. Nicméně aktivace MAPK byla popsána při fotoaktivaci následujících fotosensitizerů Verteporfin (49), 5-aminolevulinat (26), Hypericin (2), Pc4 (56) a Photofrin (51). V případě Pc4, Rose Bengal a PORF-TEG (v dizertační práci označen jako pTPPF(EG)4), je aktivace p38 dávana do spojitosti přímo s apoptózou (29, 56, 58). V apoptóze indukované Hypericinem a Photofrinem však byly JNK a p38 MAPK spojeny s odolností buněk proti smrti navozené PDT (2, 51).

## 2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Rozsáhlý výzkum v minulých letech prokázal, že fotosensitizéry používané při PDT se výrazně liší ve své chemické struktuře a aktivitě. Jakákoli drobná modifikace ve struktuře výrazným způsobem mění účinnost a ovlivňuje lokalizaci v buňce. To může být prospěšné, ale může to vést i ke zvýšení toxicity a výskytu vedlejších účinků. Výsledky předchozího výzkumu vykazovaly nesrovnalosti v účinku PS v závislosti na použití různých buněčných linií. Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat unikátní skupinu nově syntetizovaných derivátů porfyrinů. Očekávalo se, že ne všechny deriváty budou účinné. Za pomoci celé řady metod molekulární biologie jsme se snažili identifikovat nadějně molekuly. Aby byly naše výsledky co nejvíce obecné a aplikovatelné, testovali jsme deriváty na myších a lidských buněčných liniích. Po počáteční fázi jsme vybrali nejslibnější deriváty a ty testovali na *in vivo* modelu a detailně popsali mechanismus jejich účinku.

Specifické cíle práce byly následující:

1. Vybrat nadějně fotosensitizéry ze skupiny nově syntetizovaných látek (připravené na VŠCHT v Praze), které v porovnání s klinicky používaným fotosensitizerem Foscan vykazovaly zlepšené vlastnosti.
2. Zjistit, jak změny v molekulární struktuře fotosensitizerů ovlivňují jejich transport do buněk.
3. Popsat buněčný transport těchto látek a jejich lokalizaci v buňce.
4. Na rakovinných buňkách analyzovat a popsat mechanismus buněčné smrti indukované fotosensitizéry po aktivaci světlem
5. Identifikovat hlavní signální dráhy zodpovědné za navození buněčné smrti.
6. Potvrdit účinnost vybraných fotosensitizerů *in vivo*.

## **3 VÝSLEDKY**

### **3.1 Vstup derivátů porfyriu do buněk**

Syntéza a základní analýza derivátů porfyriu studovaných v dizertační práci byla provedena na VŠCHT v Praze a je detailně popsána v publikaci J. Med. Chem. (28).

V první fázi bylo na 4T1 buňkách testováno, jakým způsobem se mění intracelulární koncentrace a distribuce PS v buňce v závislosti na variabilitě v pozici postranního řetězce etylenglykolu nebo jeho délce. To bylo provedeno pomocí fluorescence a zároveň byly tyto nové deriváty porfyriu testovány i spolu s „rodičovskými“ molekulami (pTHPP, mTHPP), z nichž byly nové deriváty odvozeny, ty však neměly postranní glykolový řetězec. Meta deriváty (sloučeniny mTPP(EG)1-4) vykazovaly charakteristickou difuzní fluorescenci v celé oblasti cytoplazmy již během 2 h, zatímco pro para deriváty (pTPP(EG)4, pTPPF(EG)4 a pTPPF(DEG)4, pTPPF(ETA)4) byl charakteristický spíše tečkovaný vzor, který se objevil po delší inkubaci.

### **3.2 Fototoxicita in vitro**

Abychom otestovali fotodynamický potenciál derivátů porfyriu s glykolovým řetězcem, inkubovali jsme buňky HL60 a 4T1 se zvyšující se koncentrací jednotlivých porfyriu a následně je za pomoci filtru ozářili světlem o specifické vlnové délce (500-520 nm, 2.5 J/cm<sup>2</sup>). Následující den byla barvením trypanovou modří stanovena viabilita ozářených buněk a z výsledků byla vytvořena křivka dávka/odpověď (tzv. dose/response curve). Pro každou křivku, tedy pro každý porfyriu byla vypočítána hodnota IC50, hodnota představující koncentraci látky, která je potřeba ke smrti 50 % buněk v kultuře. Hodnota IC50 porfyriu mTPP(EG)4 se symetrickou substitucí EG řetězců do všech čtyřech pozic meta byla u buněk HL60 i 4T1 dosažena při 20-krát nižší koncentraci než v případě derivátu pTPP(EG)4 se substitucemi EG řetězců do pozic para. Fluorinovaný porfyriu se substitucemi v poloze para pTPPF(EG)4 vykazoval vyšší biologickou účinnost v porovnání s jeho nefluorinovaným analogem pTPP(EG)4. Za stejných experimentálních podmínek byla do pokusů zahrnuta i sloučenina mTHPC, což je účinná látka používaná v klinické praxi pod označením Foscan. Celková fotodynamická dávka (sloučenina x dávka světla) porfyriu mTPP(EG)4 potřebná pro dosažení IC50 byla přibližně 5-krát nižší než pro mTHPC, což ukazuje na výrazně lepší účinnost a potenciál derivátu mTPP(EG)4.

### **3.3 Nitrobuněčná lokalizace derivátů porfyriu s EG substitucí v buňkách 4T1**

K identifikaci buněčných kompartmentů, ve kterých dochází k akumulaci porfyriuových derivátů, jsme použili fluorescenční próby LysoTracker Green, MitoTracker Green a ER Tracker Blue-White. Takto připravené buňky byly analyzovány pomocí konfokální mikroskopie.

Ani jeden z testovaných derivátů se nehromadil v mitochondriích. Všechny deriváty porfyriu s jedním (mTPP(EG)1), dvěma (mTPP(EG)2), třemi (mTPP(EG)3) a čtyřmi (mTPP(EG)4) EG

řetězci v poloze meta se hromadí v ER. Zatímco para deriváty jsou lokalizovány převážně v lysozomech. Pozice EG řetězce tedy zásadním způsobem ovlivňuje lokalizaci porfyrinů

### **3.4 Deriváty porfyrinu s EG substitucí vedou k buněčné smrti apoptózou**

Celá řada prací již popsala, že buňky vystavené PDT umírají regulovaným procesem, apoptózou. Jedním z charakteristických znaků apoptózy jsou změny v permeabilitě plazmatické membrány, dále přesun fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu membrány. K detekci apoptózy jsme použili barvení buněk Annexinem V-FITC/PI (propidium jodid) a jejich následnou analýzu pomocí průtokového cytometru. Tato metoda dokáže odlišit populace živých buněk, buněk nekrotických a apoptotických.

Buňky HL60 byly přes noc inkubovány s deriváty mTPP(EG)4, pTPP(EG)4, pTPPF(EG)4, pTPPF(DEG)4 a pTPPF(ETA)4, následně 4,5-6,5 h po ozáření s Annexinem V-FITC a PI. Studium kinetiky ukázalo, že v krátkém čase po ozáření se ani Annexin ani PI v buňkách téměř nevyskytuje. Nicméně s postupem času se zvyšoval počet buněk pozitivních na Annexin (časné apoptotické buňky) a později (>5 h) i na PI (pozdní apoptotické buňky). Z výsledků těchto pokusů je patrné, že všechny deriváty v určité koncentraci indukovaly apoptózu.

#### **3.4.1 Účinky derivátů porfyrinu s EG substitucí v pozici meta na růst nádorů *in vivo* po PDT**

Protirakovinné účinky PDT jsou zprostředkovány na dvou různých úrovních: (1) přímým smrtelným zásahem rakovinných buněk a (2) poškozením vaskulární sítě v místě účinku, což vede k omezení krevního zásobení (10). Pro *in vivo* analýzu byly vybrány deriváty pTPP(EG)4, pTPPF(EG)4, mTPP(EG)1-4 a byla stanovena jejich účinnost při PDT. V práci jsou uvedeny výsledky z časového intervalu 2 až 6 dní, ve kterém byla pozorována maximální redukce růstu nádoru. U myši léčených para deriváty pTPP(EG)4, pTPPF(EG)4 a meta derivátem porfyrinu s jednou EG substitucí mTPP(EG)1 bylo pozorováno pouze částečné zmenšení nádoru, od 10. dne došlo k opětovnému nárůstu nádorů. Tyto nádory vznikaly z malé populace buněk, která odolala účinku PDT. Pouze u myši léčených meta deriváty porfyrinu s dvěma a více EG řetězci (mTPP(EG)2-4) došlo k úplnému vymizení nádorů a i po delší době nedošlo ke znovuobjevení nádorů. Tyto výsledky potvrzují nejvyšší účinnost meta derivátů porfyrinů se dvěma, třemi a čtyřmi EG řetězci.

#### **3.4.2 ROS jako aktivátory buněčné smrti navozené deriváty porfyrinů s EG substitucí**

V řadě studií zaměřených na PDT bylo popsáno, že tvorba ROS je zodpovědná za iniciaci procesů buněčné smrti. Singletový kyslík vytvořený aktivací světlem má v živých systémech velice krátkou životnost a malou prostupnost, což naznačuje, že primární molekulární cíle

fotodynamických procesů musí sídlit v těsné blízkosti (několik nm) molekuly fotosensitizeru. Para deriváty se přednostně hromadí v ER a meta zejména v lysozomech, k bezprostřední tvorbě ROS tedy musí docházet také v ER a lysozomech. Pro sledování tvorby ROS indukované UV světlem jsme úspěšně použili sondu 3'-p-(aminophenyl) fluorescein (APF), která slouží k detekování tvorby radikálů  $^1\text{O}_2$  a  $\cdot\text{OH}$  (43). Již během několika sekund po vystavení UV světlu byla zachycena fluorescence APF, která se nacházela na stejném místě jako porfyriny. Tvorba ROS tedy odpovídá organelám, ve kterých se porfyriny přednostně hromadí.

### **3.4.3 MAP kinázy (MAPK) a jejich úloha v apoptóze navozené deriváty porfyriu s EG substitucí**

Apoptóza je organizovaný děj, který se skládá z celé řady procesů. Naším cílem bylo zjistit, zda existuje korelace mezi chemickou strukturou fotosensitizerů, jejich nitrobuňčnou lokalizací a aktivací signálních kaskád ozářením.

V práci, nedávno publikované naší laboratoří, se podařilo prokázat význam p38 MAP kinázové signální kaskády v indukci apoptózy derivátem porfyriu pTPPF(EG)4 v různých nádorových buněčných liniích (29). Na základě těchto výsledků jsme se snažili zjistit, jestli dochází k aktivaci MAPK i v případě námi studovaných derivátů mTPP(EG)4 and pTPP(EG)4. Pro tento účel byl použit specifický inhibitor p38 (PD169316). Za účelem porovnání byl do pokusu zahrnut i v předchozí fázi studovaný derivát pTPPF(EG)4. Otestování inhibice aktivity p38 specifickým inhibitorem bylo provedeno na buňkách 4T1 pomocí metody Western blot. Inhibice p38 MAPK nebo knockout genu *p38α* vedly v případě obou para derivátů (p-TPP(EG)4 a p-TPPF(EG)4) ke snížení úmrtnosti. U meta derivátu mTPP(EG)4 však žádné snížení pozorováno nebylo. Aktivace p38 MAPK má tedy klíčovou úlohu v indukci apoptózy navozené para deriváty (pTPP(EG)4 a pTPPF(EG)4), ale ne v případě meta derivátu mTPP(EG)4.

### **3.4.4 Fotoaktivací derivátu porfyriu s EG substitucí dochází ke vzniku stresu ER a změnám v homeostázi $\text{Ca}^{2+}$**

Apoptóza navozená ozářením meta derivátu mTPP(EG)4 je tedy pravděpodobně spuštěna jiným mechanismem než v případě para derivátů. Abychom zjistili, která signální dráha zodpovídá za aktivaci apoptózy meta deriváty, zaměřili jsme se na místo lokalizace těchto derivátů, tedy endoplazmatické retikulum. Nejprve jsme chtěli prokázat význam změn v homeostázi  $\text{Ca}^{2+}$  na buněčnou smrt. Pomocí průtokové cytometrie s použitím fluorescenční sondy Fluo-4-AM detekující hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách jsme sledovali hladiny vápníku v buňkách inkubovaných s deriváty porfyriu s EG substitucí. Nejvyšší nárůst  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  byl pozorován 1 minutu po ozářením. Výsledky experimentů ukázaly, že cytozolická hladina  $\text{Ca}^{2+}$  u buněk inkubovaných

s meta derivátem mTPP(EG)4 výrazně vzrůstala, zatímco u buněk inkubovaných s para deriváty pTPP(EG)4 nebo pTPPF(EG)4, byl tento vzestup menší.

V případě všech použitých derivátů signál Fluo-4-AM úplně vymizel, pokud byly buňky inkubovány s BAPTA-AM, látkou vychytávající volný vápník uvnitř buňky. Podobný inhibiční účinek byl pozorován i v případě použití L-histidinu, látky, která je schopna vychytat singletový kyslík,  $^1\text{O}_2$ . Tento výsledek je tedy důkazem toho, že vznik ROS je primárním spouštěčem událostí vedoucích k vzrůstu  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce. Výsledky dalších experimentů, kde byly použity inhibitory BAPTA-AM a specifický inhibitor vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  (Ru360) do mitochondrií, definitivně vyloučily účast mitochondrií v mechanismu spuštění apoptózy navozené meta derivátem.

### **3.4.5 Efekt derivátu porfyriu s EG substitucí na aktivaci kalpainu a stresových kaspáz**

Dále jsme se zabývali efektem EG-porfyriu na aktivaci kalpainu a stresových kaspáz. Aktivace kalpainu byla detekována na úrovni štěpení fodrinu, proteinu, který je štěpen kalpainem nebo kaspázou-3 a slouží tedy jako marker jeho aktivace (8). Je známo, že fodrin je kalpainy štěpen na specifické fragmenty o velikosti 150 kD, fragmenty o velikosti 120 kD vznikají působením kaspázy-3. U buněk 4T1, které byly vystaveny PDT s meta derivátem mTPP(EG)4, byl pozorován vznik fragmentů fodrinu po 0,5 h po ozáření a koreloval s aktivací kaspázy-12. V případě PDT s použitím para derivátů byla pozorována pouze nízká aktivace a téměř žádné fragmenty fodrinu, a to i v pozdější době po ozáření. Podobné výsledky byly získány i na lidských buňkách (HL60) ovšem s poněkud zpožděnou kinetikou. V tomto případě jsme testovali kaspázu-4, která představuje lidský homolog kaspázy-12.

Abychom potvrdili význam aktivace kalpainů při PDT s EG porfyriu, provedli jsme pokus se snížením exprese Capn4 pomocí specifické siRNA. Tato transfekce snížila endogenní množství proteinu Capn4/Capns1 a štěpení fodrinu. Capn4 siRNA také významně snížila množství mrtvých buněk v případě inkubace s mTPP(EG)4. Ačkoli byla transfekce spojená se snížením štěpení fodrinu pozorována i u para derivátů, nedošlo ke změnám na úrovni buněčné viability. Výsledky všech těchto experimentů potvrzují významnou roli aktivace kalpainů v buněčné smrti navozené mTPP(EG)4.

### **3.4.6 mTPP(EG)4 s lokalizací v ER způsobuje vznik stresu ER a následnou aktivaci několika UPR cílových genů**

Jakýkoli zásah, který naruší homeostázi endoplazmatického retikula může vyústit ve vznik stresu ER zejména díky hromadění nesbalených proteinů (UPR response) (48). Abychom zjistili, zda EG-porfyriu spouští UPR, zaměřili jsme se nejprve na jeden z indikátorů stresu - PERK. U 4T1 buněk inkubovaných s mTPP(EG)4 byl ihned po ozáření (čas 0) viditelný nárůst fosforylace



PERK a fosforylace jeho substrátu eIF2 $\alpha$ . Obdobná odpověď však nebyla pozorována u buněk inkubovaných s para deriváty pTPP(EG)4 a pTPPF(EG)4. V souladu s tím došlo ke zvýšení exprese transkripčních faktorů ATF4 a CHOP/GADD153 bezprostředně po ozáření (čas 0 a 0,5 h). Podobné výsledky byly zjištěny u buněk HL60. U obou typů buněk inkubovaných s para deriváty nebyl pozorován žádný výrazný efekt na změny exprese proteinů PERK signální dráhy. Tyto výsledky naznačují, že PERK signální dráha má zásadní roli v indukci apoptózy při PDT s meta derivátem.

Abychom potvrdili, že PERK signální dráha má zásadní roli ve vzniku stresu ER navozeným EG-porfyriny, pomocí siRNA jsme u buněk snížili expresi PERK. Transfekce PERK siRNA významně snížila endogenní množství PERK proteinu. Zároveň bylo zjištěno, že nedochází k indukci ATF4 a CHOP. Význam PERK jsme dále testovali na 4T1 buňkách inkubovaných s EG-porfyriny pomocí RNA interference. Bylo zjištěno, že vyřazení PERK vede k výraznému poklesu buněčné smrti indukované derivátem mTPP(EG)4, zatímco u para derivátů nedošlo k žádným změnám ve viabilitě buněk. V další fázi jsme provedli experimenty se specifickými buněčnými liniemi MEF s neporušeným genem (wt) nebo s inaktivovaným genem pro PERK (KO). Mezi těmito buňkami nebyl pozorován žádný rozdíl z hlediska vstupu derivátů do buněk, MEF-KO však vykazovaly výrazně vyšší odolnost k PDT indukované mTPP(EG)4. U buněk inkubovaných s para deriváty nebyl pozorován žádný účinek na mortalitu, což dokazuje, že aktivace PERK dráhy není potřebná k indukci apoptózy para deriváty. Všechny výsledky tedy potvrzují zásadní význam PERK dráhy v indukci buněčné smrti aktivované meta derivátem mTPP(EG)4.

## 4 ZÁVĚRY

1. V experimentech s celou řadou nízkomolekulárních meso-tetraphenylporfyrinů s glykolovou substitucí bylo dokázáno, že biologická účinnost závisí na jejich struktuře a aktivitě. Byl popsán proces syntézy porfyrinů obsahující jeden až čtyři nízkomolekulární glykolové řetězce vázané éterovou vazbou do pozice meta na meso-tetrafenylporfyrinu. Skupina para derivátů byla navíc ještě rozčleněna na fluorinované a nefluorinované deriváty, a bylo zjištěno, že přítomnost fluoru zlepšuje biologické účinky. Variace v substitucích glykolového řetězce na fenylový kruh porfyrinů dramaticky ovlivňuje vlastnosti derivátů, sledované na úrovni transportu do buněk, nitrobuněčné lokalizaci a účinnosti PDT.

Nejvyšší účinnost byla popsána u derivátu mTPP(EG)<sub>4</sub> vykazujícím pětinašobně nižší fotodynamickou dávku potřebnou pro 50% inhibici viability nádorových buněk v porovnání s klinicky používaným fotosensitizerem Foscan.

2. Vstup derivátů do buněk významně závisí na koncové skupině glykolového substituentu. Pouze porfyriny s hydroxyglykolovou substitucí (mTPP(EG)<sub>1-4</sub>, pTPP(EG)<sub>4</sub>, pTPPF(EG)<sub>4</sub>, pTPPF(DEG)<sub>4</sub> a pTPPF(ETA)<sub>4</sub>), na rozdíl od porfyrinů s methoxyglykolovou substitucí (mTPP(EGME)<sub>4</sub>, pTPP(EGME)<sub>4</sub> a pTPPF(EGME)<sub>4</sub>), vstupovaly do buněk a vykazovaly fototoxicitu.

Meta deriváty (sloučeniny mTPP(EG)<sub>1-4</sub>) vykazovaly charakteristickou difúzní fluorescenci v celé oblasti cytoplazmy již během 2 h, zatímco pro para deriváty (pTPP(EG)<sub>4</sub>, pTPPF(EG)<sub>4</sub> a pTPPF(DEG)<sub>4</sub>, pTPPF(ETA)<sub>4</sub>) byl charakteristický spíše tečkovaný vzor, který se objevil po delší inkubaci.

3. Pozice EG řetězce zásadně ovlivňuje lokalizaci derivátů porfyrinů v buňce. Všechny deriváty porfyrinů s EG substitucí v meta pozici (mTPP(EG)<sub>1-4</sub>) výrazně lépe vstupovaly do buněk a hromadily se především v ER, podobně jako jejich „rodičovská“ sloučenina mTHPP. Naproti tomu substituce EG řetězce do pozice para (pTPP(EG)<sub>4</sub>, pTPPF(EG)<sub>4</sub>, pTPPF(DEG)<sub>4</sub> and pTPPF(ETA)<sub>4</sub>) vedla k přednostnímu hromadění v lysozomech. Přítomnost fluoru ve struktuře neměla na lokalizaci žádný pozorovatelný účinek.

4. Glykolové deriváty porfyrinů velmi účinně indukují apoptózu v nádorových buňkách. Hydroxyglykolové deriváty v porovnání s methoxyglykolovými deriváty vykazují vysokou indukci apoptózy v nádorových buňkách *in vitro*. Tyto sloučeniny se přednostně

hromadí v nádorových buňkách, což dokazuje i jejich interakce s nádorovými markery (např. kyselina sialová).

5. Byl popsán molekulární mechanismus buněčné smrti navozené PDT, založené na použití porfyrinů se substitucí EG řetězce do pozic meta (mTPP(EG)4) nebo para (pTPP(EG)4 a pTPPF(EG)4). Oba typy derivátů spouští buněčnou smrt nádorových buněk cestou vzniku ROS.

Para deriváty aktivují p38 MAPK signální kaskádu, která indukuje mitochondriální apoptickou dráhu. Inhibice p38 MAPK nebo vyřazení genu pro p38 vedlo ke snížení mortality buněk indukované para deriváty (pTPP(EG)4 a pTPPF(EG)4).

Meta derivát mTPP(EG)4 indukoval dramatické změny v homeostázi  $Ca^{2+}$ , které se projevíly prudkým nárůstem koncentrace  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě, aktivoval kalpainy a kaspázy-12/-4. Dále došlo k rozvoji stresu ER, který se dále rozvinul v UPR odpověď. Ta zahrnuje aktivaci PERK signální dráhy, začínající fosforylací PERK, eIF2 $\alpha$  a indukci transkripčních faktorů ATF4 a CHOP. Vyřazení a utlumení PERK chrání buňky před apoptózou způsobenou mTPP(EG)4. Tyto výsledky potvrzují zásadní význam PERK signální dráhy v indukci apoptózy navozené mTPP(EG)4.

6. U imunodeficientních myší vedla léčba pomocí PDT zprostředkovaná mTPP(EG)2-4 k úplnému vymizení nádorů (lidský karcinom prsu MDA-MB-231). U myší léčených PDT zprostředkované deriváty mTPP(EG)1, pTPP(EG)4 nebo pTPPF(EG)4 došlo pouze k přechodnému omezení růstu nádorů.

Závěrem, předložené výsledky prokazují, že meta deriváty porfyrinů s EG substitucí mají velmi dobré vlastnosti fotosensitizeru a kromě detailního popisu molekulárního mechanismu jejich působení ukazují na jejich vysoký potenciál pro aplikaci v PDT *in vivo*.

## 5 SEZNAM PUBLIKACÍ

Kralova J, Briza T, **Moserova I**, Dolensky B, Vasek P, Pouckova P, Kejik Z. Glycol porphyrin derivatives as potent photodynamic inducers of apoptosis in tumor cells.

*J. Med. Chem.* 2008, 51, 5964–5973 (IF=5.207)

**Moserova I**, Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS ONE*, 2012, 7(3):e32972 (IF=4.411)

Briza T, Kralova J, Ciegler P, Kejik Z, Pouckova P, Vasek P, **Moserova I**, Martasek P, Kral V. Combination of two chromophores: Synthesis and PDT application of porphyrin–pentamethinium conjugate. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012, 22(1):82-4 (IF=2.661)

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, and Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1704: 59-86, 2004.
2. Assefa Z, Vantiegheem A, Declercq W, Vandenaabeele P, Vandenaabeele JR, Merlevede W, de Witte P, and Agostinis P. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem* 274: 8788-8796, 1999.
3. Belzacq AS, El Hamel C, Vieira HL, Cohen I, Haouzi D, Metivier D, Marchetti P, Brenner C, and Kroemer G. Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene* 20: 7579-7587, 2001.
4. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenaabeele JR, Heirman I, Grooten J, and Agostinis P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J* 20: 756-758, 2006.
5. Buytaert E, Dewaele M, and Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1776: 86-107, 2007.
6. Callsen D, and Brune B. Role of mitogen-activated protein kinases in S-nitrosoglutathione-induced macrophage apoptosis. *Biochemistry* 38: 2279-2286, 1999.
7. Dewaele M, Maes H, and Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy* 6: 838-854, 2010.
8. Diwakarla S, Nagley P, Hughes ML, Chen B, and Beart PM. Differential insult-dependent recruitment of the intrinsic mitochondrial pathway during neuronal programmed cell death. *Cell Mol Life Sci* 66: 156-172, 2009.
9. Dolmans DE, Fukumura D, and Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 380-387, 2003.
10. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, and Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90: 889-905, 1998.
11. Edinger AL, and Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology* 16: 663-669, 2004.
12. Hajnoczky G, Davies E, and Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 445-454, 2003.

13. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, and Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099-1108, 2000.
14. Hendrickx N, Dewaele M, Buytaert E, Marsboom G, Janssens S, Van Boven M, Vandenheede JR, de Witte P, and Agostinis P. Targeted inhibition of p38alpha MAPK suppresses tumor-associated endothelial cell migration in response to hypericin-based photodynamic therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 928-935, 2005.
15. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, and Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7: 2135-2148, 1993.
16. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, and Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165: 347-356, 2004.
17. Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, and Yu JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol* 194: 363-375, 2003.
18. Ichinose S, Usuda J, Hirata T, Inoue T, Ohtani K, Maehara S, Kubota M, Imai K, Tsunoda Y, Kuroiwa Y, Yamada K, Tsutsui H, Furukawa K, Okunaka T, Oleinick NL, and Kato H. Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na). *Int J Oncol* 29: 349-355, 2006.
19. Iyer AK, Greish K, Seki T, Okazaki S, Fang J, Takeshita K, and Maeda H. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation. *Journal of drug targeting* 15: 496-506, 2007.
20. Kessel D, and Castelli M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol* 74: 318-322, 2001.
21. Kessel D, Castelli M, and Reiners JJ. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ* 12: 502-511, 2005.
22. Kessel D, Luo Y, Deng Y, and Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 65: 422-426, 1997.
23. Kessel D, Luo Y, Mathieu P, and Reiners JJ, Jr. Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem Photobiol* 71: 196-200, 2000.
24. Kessel D, Vicente MG, and Reiners JJ, Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 38: 482-488, 2006.
25. Kim HR, Luo Y, Li G, and Kessel D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Res* 59: 3429-3432, 1999.
26. Klotz LO, Fritsch C, Briviba K, Tsacmacidis N, Schliess F, and Sies H. Activation of JNK and p38 but not ERK MAP kinases in human skin cells by 5-aminolevulinic-acid-photodynamic therapy. *Cancer Res* 58: 4297-4300, 1998.
27. Kral V, Kralova J, Kaplanek R, Briza T, and Martasek P. Quo vadis porphyrin chemistry? *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 55 Suppl 2: S3-26, 2006.
28. Kralova J, Briza T, Moserova I, Dolensky B, Vasek P, Pouckova P, Kejik Z, Kaplanek R, Martasek P, Dvorak M, and Kral V. Glycol porphyrin derivatives as potent photodynamic inducers of apoptosis in tumor cells. *J Med Chem* 51: 5964-5973, 2008.
29. Kralova J, Dvorak M, Koc M, and Kral V. p38 MAPK plays an essential role in apoptosis induced by photoactivation of a novel ethylene glycol porphyrin derivative. *Oncogene* 27: 3010-3020, 2008.
30. Kroemer G, Galluzzi L, and Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99-163, 2007.
31. Lamkanfi M, Kalai M, and Vandenabeele P. Caspase-12: an overview. *Cell Death Differ* 11: 365-368, 2004.
32. Li LY, Luo X, and Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99, 2001.
33. Lu PD, Harding HP, and Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167: 27-33, 2004.
34. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, and Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318: 1351-1365, 2002.
35. Marchal S, Francois A, Dumas D, Guillemin F, and Bezdetnaya L. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer* 96: 944-951, 2007.
36. Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolais O, Hunt DW, and Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene* 20: 4070-4084, 2001.

37. Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, McCormick T, Colussi V, Kenney ME, Cooper KD, and Oleinick NL. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 224: 290-299, 2007.
38. Minamikawa T, Sriratana A, Williams DA, Bowser DN, Hill JS, and Nagley P. Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells. *J Cell Sci* 112 ( Pt 14): 2419-2430, 1999.
39. Moan J, and Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 53: 549-553, 1991.
40. Moan J, and Berg K. Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem Photobiol* 55: 931-948, 1992.
41. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, and Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103, 2000.
42. Oleinick NL, Morris RL, and Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 1: 1-21, 2002.
43. Price M, Reiners JJ, Santiago AM, and Kessel D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 85: 1177-1181, 2009.
44. Rao RV, Ellerby HM, and Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11: 372-380, 2004.
45. Reiners JJ, Jr., Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, and Kessel D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 9: 934-944, 2002.
46. Rutkowski DT, and Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14: 20-28, 2004.
47. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, and Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184: 1331-1341, 1996.
48. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, and Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7: 880-885, 2006.
49. Tao J, Sanghera JS, Pelech SL, Wong G, and Levy JG. Stimulation of stress-activated protein kinase and p38 HOG1 kinase in murine keratinocytes following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *J Biol Chem* 271: 27107-27115, 1996.
50. Teiten MH, Marchal S, D'Hallewin MA, Guillemin F, and Bezdetnaya L. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem Photobiol* 78: 9-14, 2003.
51. Tong Z, Singh G, Valerie K, and Rainbow AJ. Activation of the stress-activated JNK and p38 MAP kinases in human cells by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 71: 77-85, 2003.
52. Usuda J, Azizuddin K, Chiu SM, and Oleinick NL. Association between the photodynamic loss of Bcl-2 and the sensitivity to apoptosis caused by phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 78: 1-8, 2003.
53. Usuda J, Chiu SM, Murphy ES, Lam M, Nieminen AL, and Oleinick NL. Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. *J Biol Chem* 278: 2021-2029, 2003.
54. Van Cruchten S, and Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia* 31: 214-223, 2002.
55. Woodburn KW, Fan Q, Miles DR, Kessel D, Luo Y, and Young SW. Localization and efficacy analysis of the phototherapeutic lutetium texaphyrin (PCI-0123) in the murine EMT6 sarcoma model. *Photochem Photobiol* 65: 410-415, 1997.
56. Xue L, He J, and Oleinick NL. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by stress kinases. *Cell Death Differ* 6: 855-864, 1999.
57. Xue LY, Chiu SM, and Oleinick NL. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene* 20: 3420-3427, 2001.
58. Zhuang S, Demirs JT, and Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 275: 25939-25948, 2000.