

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

**Mgr. Marie Kostelanská**

Studium fotodynamické inaktivace prionů ftalocyaniny

Study of the photodynamic inactivation of prions by phthalocyanines

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 8.6.2020

Marie Kostelanská

**Identifikační záznam:**

KOSTELANSKÁ, Marie. *Studium fotodynamické inaktivace prionů ftalocyaniny. [Study of the photodynamic inactivation of prions by phthalocyanines]*. Praha, 2020. Počet stran 84. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav imunologie a mikrobiologie. Vedoucí závěrečné práce Holada, Karel.

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. Ing. Karlu Holadovi, Ph.D. za navržení zajímavého tématu, odborné rady a jeho pomoc při zpracování této problematiky. Děkuji mu za finanční podporu, která mi umožnila se plnohodnotně věnovat doktorskému studiu.

Velmi děkuji Mgr. Jakubovi Soukupovi za jeho připomínky a kritické zhodnocení této disertační práce.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům a příteli Janu Endelovi za oporu a pomoc během vysokoškolského studia.

Děkuji Mgr. Adamu Schröfelovi, Ph.D. z Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK za pomoc s pořízením obrázků na konfokálním mikroskopu, RNDr. Tiboru Moškovi, Ph.D., za analýzu vzorků metodou RT-QuIC. Aleně Pšeničkové a Mgr. Bačkovské Hanusové děkuji za technickou pomoc. Děkuji také kolektivu prionové laboratoře za vytvoření povzbudivého a velmi kamarádského pracovního prostředí.

Ráda bych také poděkovala za finanční podporu tohoto výzkumu Grantové agentuře Univerzity Karlovy, grant číslo 140215; Grantové agentuře České republiky, grant GA16-15020S; Agentuře pro zdravotnický výzkum České republiky, grant NV18-04-00179 a Ministerstvu školství, tělovýchovy a mládeže s programem Specifický vysokoškolský výzkum, SVV 260 369.

## Abstrakt

Transmisivní spongiformní encefalopatie neboli prionové choroby jsou smrtelná neurodegenerativní onemocnění postihující savce. U postižených jedinců se v CNS hromadí ložiska patologického prionového proteinu ( $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ ), která jsou příčinou smrti. Priony vykazují afinitu k různým povrchům a odolnost ke konvenčním sterilizačním procedurám. To zvyšuje riziko nosokomiálního přenosu prostřednictvím chirurgických nástrojů použitých při lékařských zákrocích na jedincích v subklinickém stádiu prionového onemocnění. V disertační práci posuzujeme použitelnost metody fotodynamické inaktivace (PDI) pro dekontaminace prionů. PDI byla iniciována deriváty ftalocyaninu (Pc):  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ ,  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  nebo  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  pro dekontaminace prionů. Světlem aktivované Pc generují reaktivní formy kyslíku, zejména singletní kyslík ( $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ), který jsme detekovali pomocí jodidové metody, inhibičního testu s  $\text{NaN}_3$  a oxidační degradací kyseliny močové. PDI v suspenzi infekčního mozkového homogenátu vedla k eliminaci signálu PrPres (fragment  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  rezistentní proteináze K) pod detekční limit western blotu při nanomolární koncentraci  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ . Úplná eliminace signálu PrPres byla doprovázena 20% redukcí koncentrace proteinů mozkového homogenátu, nedocházelo k fragmentaci ani agregaci proteinů.

PDI indukovaná deriváty Pc eliminovala PrPres signál prionových kmenů ME7, 22L, mFu, RML, mBSE, mvCJD, 139A s rozdílnou účinností. Nejvyšší účinnosti PDI bylo dosaženo při použití  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  následovaný  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$ .  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  byl v indukci fotodynamické eliminace účinný nejméně.

Pokles infekivity RML prionů pomocí PDI byl evaluován na myším modelu, který je extrémně citlivý k prionové infekci. U myši inokulovaných PDI RML priony došlo k signifikantnímu prodloužení délky života, která odpovídala redukcí prionové infekivity o 4 řády. Účinnost PDI na RML priony sorbované k plastovému povrchu byla sledována pomocí CAD5 buněčné linie, která je citlivá k prionovým onemocněním. Infektivita sorbovaných RML prionů byla po PDI snížena o 3 řády. Věříme, že tato metoda může být účinným nástrojem k dekontaminaci prionů, pokud by byla zavedena do sterilizačního protokolu v nemocničních zařízeních.

## Klíčová slova:

prion, ftalocyanin, singletní kyslík, fotodynamická inaktivace, dekontaminace

## **Abstract**

Transmissible spongiform encephalopathies, also called prion disorders, are fatal neurodegenerative diseases affecting mammals. In patients, the pathological prion protein (PrP<sup>TSE</sup>) accumulates in CNS and causes death. Prions possess high binding affinity to surfaces. Moreover, they are highly resistant to conventional sterilization procedures which rise the risk of nosocomial transmission from patients in subclinical stage of prion disease through medical tools. In the thesis, we evaluate the efficiency of photodynamic inactivation (PDI) for prion decontamination. The PDI is induced by photoactivation of phthalocyanine (Pc) derivatives AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, SiPc(OH)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub> or ZnPc(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub>. Pc exposed to light generate reactive oxygen species, mainly singlet oxygen (O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>)). Production of O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) in aqueous solution was confirmed by iodide method, quenching by NaN<sub>3</sub> and oxidative degradation of uric acid. The photoactivation of Pc in infectious brain homogenate led to elimination of PrPres signal (= proteinase K-resistant PrP<sup>TSE</sup> fragment) below the detection limit of western blot by using nanomolar AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> concentration. The complete elimination of PrPres signal was accompanied with total protein concentration decrease by a maximum of 20% in brain homogenate. No signs of protein fragmentation or aggregation were observed.

The PDI induced by Pc derivatives eliminated PrPres of prion strains ME7, 22L, mBSE, 139A, mvCJD, RML and mFu with various efficiency. The PDI was most efficient when induced by AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, followed by ZnPc(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub>. SiPc(OH)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub> was the least effective for induction of PDI.

Reduction of RML prion infectivity induced by PDI was evaluated on mouse model which is extremely sensitive to prion infection. The mouse bioassay revealed that the PDI in presence of AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> reduced the infectivity of RML prions by four orders of magnitude. Efficiency of PDI on RML prions bound to plastic surface was monitored by CAD5 cell line susceptible to prion infection. The PDI decreased infectivity of bound RML prion by three orders of magnitude. To summarize, the PDI successfully reduce prion infectivity in suspension and bound to surface. We believe the method can be a powerful tool for prion decontamination if introduced as a part of conventional sterilization procedure in medical facilities.

## **Keywords:**

prion, phthalocyanine, singlet oxygen, photodynamic inactivation, decontamination

## Obsah

<b>Seznam zkratk a vzorců .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Úvod .....</b>	<b>13</b>
1.1 Priony .....	13
1.1.1 Prionový protein .....	13
1.1.2 Prionová onemocnění .....	14
1.1.3 Prionové kmeny .....	15
1.1.4 Prionové epidemie .....	17
1.1.5 Dekontaminace prionů.....	17
1.1.6 Nebezpečí přenosu chybně sbalených proteinů.....	19
1.2 Reaktivní formy kyslíku.....	20
1.2.1 Zástupci ROS.....	20
1.2.2 Způsoby dekontaminace prionů s využitím ROS.....	21
1.3 Ftalocyaniny .....	22
1.3.1 Struktura a vlastnosti .....	22
1.3.2 Aplikace.....	23
1.3.3 Interakce s priony .....	24
1.4 Fotosenzitizéry .....	25
1.4.1 Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti senzitizerů .....	25
1.4.2 Deaktivace fotosenzitizéru v tripletním stavu fotochemickou reakcí ....	26
1.5 Singletní kyslík.....	27
1.5.1 Fotochemie singletního kyslíku.....	27
1.5.2 Deaktivace singletního kyslíku.....	27
1.5.3 Interakce s proteiny .....	28
<b>2. Cíle práce .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Metody a materiály .....</b>	<b>30</b>
3.1 Světelné zdroje .....	30
3.2 Zkumavky pro PDI experimenty.....	30
3.3 Fotosenzitizery .....	30
3.4 Chromatografie derivátů Pc na tenké vrstvě .....	31
3.5 Detekce ROS.....	31
3.5.1 Detekce $O_2(^1\Delta_g)$ jodidovou metodou.....	31
3.5.2 Detekce $O_2(^1\Delta_g)$ pomocí kyseliny močové.....	32

3.5.3	Detekce $O_2^{\bullet-}$ a $H_2O_2$ .....	32
3.6	Mozkové homogenáty .....	32
3.7	Fotodynamická inaktivace .....	33
3.8	Oxidace PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>TSE</sup> a PrPres působením $H_2O_2$ .....	33
3.9	Stanovení koncentrace proteinů .....	34
3.10	Frakcionace PDI RML homogenátu na sacharózovém gradientu.....	34
3.11	SDS-PAGE a Western blot .....	34
3.11.1	Imunodetekce PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>TSE</sup> a PrPres .....	35
3.11.2	Denzitometrická analýza .....	35
3.11.3	Barvení proteinů roztokem $AgNO_3$ .....	35
3.12	Testování aktivity PrP <sup>TSE</sup> po PDI při konverzi rPrP .....	36
3.13	PDI RML prionů v suspenzi testovaná na myším modelu.....	36
3.14	Buněčné eseje.....	37
3.14.1	Studium AlPcOH(SO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> v buňkách.....	37
3.14.1.1	Průtoková cytometrie.....	37
3.14.1.2	Konfokální mikroskopie.....	38
3.14.1.3	Detekce cytotoxicity AlPcOH(SO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	38
3.14.2	PDI RML prionů sorbovaných na plastovém povrchu .....	38
3.15	Statistická analýza .....	39
<b>4.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>40</b>
4.1	Charakterizace zdrojů a diod .....	40
4.2	Charakterizace zkumavek pro PDI experimenty.....	41
4.3	Charakterizace ftalocyaninů.....	42
4.4	Detekce ROS .....	43
4.5	Fotoprodukce singletního kyslíku $O_2(^1\Delta_g)$ .....	46
4.6	Modifikace epitopů v molekule PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>TSE</sup> působením $O_2(^1\Delta_g)$ .....	48
4.7	Průběh fotodynamické eliminace signálu PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>TSE</sup> a PrPres .....	49
4.8	Účinnost derivátů Pc při fotodynamické eliminaci PrP <sup>TSE</sup> prionových kmenů ....	53
4.9	Účinek PDI pomocí Pc na proteiny.....	55
4.10	Aktivita PDI PrP <sup>TSE</sup> při konverzi rPrP .....	59
4.11	Redukce prionové infekitivity v suspenzi při PDI testovaná na myším modelu ...	60
4.12	Buněčné eseje.....	62
4.12.1	Charakterizace AlPcOH(SO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> v CAD5 linii.....	62

4.12.2	Redukce infekitivity PDI prionů sorbovaných na povrch .....	63
<b>5.</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>74</b>
<b>8.</b>	<b>Příloha.....</b>	<b>84</b>

## Seznam zkratek a vzorců

139A	prionový kmen – izolát z ovce, pasáž přes kozu a myš
22L	prionový kmen – izolát z ovce, pasáž přes ovci a následně myš
AlPcOH(SO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	disulfonovaný hydroxyhlinitý ftalocyanin
A $\beta$	amyloid $\beta$
BCA	bicinchoninová kyselina (bicinchoninic acid)
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium
CAD5	buněčná linie derivovaná z Cath. a-differentiated neuronálních nádorových buněk mozku
CCK-8	kit pro hodnocení počtu živých buněk (Cell Counting Kit-8)
CNS	centrální nervová soustava
Cy3	fluorofor s $\lambda_{\text{ex}} \sim 550$ nm a $\lambda_{\text{em}} \sim 570$
CWD	chronické strádání jelenovité zvěře
DALS	diodový zdroj světla (diode array light source)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMA	9,10-dimethylantracen
DMSO	dimethyl sulfoxid
DPIBF	1,3-difenylisobenzofuran
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F(ab') <sub>2</sub>	IgG protilátka bez Fc části
fCJD	familiární/genetická Creutzfeldt-Jakobova choroba
FSC	rozptyl světla s vlnovou délkou $\sim 488$ nm (forward scatter)
HOO•	hydroperoxylový radikál
I <sub>3</sub> <sup>-</sup>	trijodid
iCJD	iatrogení/získaná Creutzfeldt-Jakobova choroba
IgG	imunoglobulin G
<i>k</i>	rychlostní konstanta reakce (reakce 1. řádu: s <sup>-1</sup> ; 2. řádu: M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
KI	jodid draselný
KM	sodná sůl kyseliny močové
mBSE	prionový kmen – izolát z krávy postižené bovinní spongiformní encefalopatií (bovine spongiform encephalopathy) pasážovaný v myši
ME7	prionový kmen – izolát z ovce, pasáž na myš

mFu	prionový kmen – izolát z pacienta s Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndromem pasážovaný v myši
mvCJD	prionový kmen – izolát z pacienta trpícího variantní Creutzfeldt Jakobovou chorobou pasážovaný v myši
M <sup>x</sup> Pc(SO <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	univerzální vzorec sulfonovaného ftalocyaninu, n – počet sulfonových skupin, M – kov, x – oxidační číslo kovu
NaN <sub>3</sub>	azid sodný
O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> )	singletní kyslík (94,1 kJ mol <sup>-1</sup> )
O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> Σ <sub>g</sub> )	singletní kyslík (156,9 kJ mol <sup>-1</sup> )
O <sub>2</sub> ( <sup>3</sup> Σ <sub>g</sub> <sup>-</sup> )	tripletní stav kyslíku
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	superoxidový radikál
PBS	solný roztok pufrovaný fosfátem (phosphate-buffered saline)
Pc	ftalocyanin (phthalocyanine)
PDI	fotodynamická inaktivace (photodynamic inactivation)
PI	propidium jodid (propidium iodide)
PK	proteínáza K
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
<i>PRNP</i>	gen pro prionový protein
PrP	prionový protein obecně
PrP <sup>C</sup>	buněčný prionový protein
PrPres	fragment patologického prionového proteinu rezistentní k proteínáze K
PrP <sup>TSE</sup>	patologický prionový protein
RML	prionový kmen – izolát z ovce, pasáž přes kozu a myš
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
rPrP	rekombinantní prionový protein
RT-QuIC	metoda detekce aktivity prionů konverujících rPrP do fibril (Real-Time Quaking-Induced Conversion)
<i>s</i>	celkový spin elektronů molekuly
sCJD	sporadická Creutzfeldt-Jakobova choroba
SD	standardní odchylka (standard deviation)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (sodium

	dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)
SiPc(OH) <sub>2</sub> (SO <sub>3</sub> ) <sub>1-3</sub>	mono-, di- nebo tri-sulfonovaný dihydroxykřemičitý ftalocyanin
SSC	boční rozptyl světla o vlnové délce ~488 nm (side scatter)
S <sub>x</sub>	singletní stav molekuly, x značí excitované stavy (0 – základní stav, 1 – 1. excitovaný stav, ...)
TBS	solný roztok pufovaný pomocí Tris (Tris-buffered saline)
TBST	TBS kondiciovaný 0.05% (v/v) Tween-20
TBSTM	5% (w/v) Blotting-Grade Blocker rozpuštěný v TBST
ThT	thioflavin T
TLS	trubkový zdroj světla (tube light source)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
T <sub>x</sub>	tripletní stav molekuly x značí excitované stavy (0 – základní stav, 1 – 1. excitovaný stav, ...)
vCJD	variantní Creutzfeldt-Jakobova choroba
$\lambda_{em}$	vlnová délka emise
$\lambda_{ex}$	excitační vlnová délka
ZnPcOH(SO <sub>3</sub> ) <sub>1-3</sub>	mono-, di- nebo tri-sulfonovaný zinečnatý ftalocyanin

# 1 Úvod

## 1.1 Priony

### 1.1.1 Prionový protein

Prionový protein je kódován jednou kopií *PRNP* genu, který je lokalizován na krátkém raménku lidského chromozomu 20 (20p13). Gen *PRNP* sestává ze dvou exonů. První exon slouží jako místo iniciace transkripce a v druhém exonu je kódován celý čtecí rámec aminokyselinové sekvence buněčného prionového proteinu ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) (Imran a Mahmood 2011). Čerstvě translatovaný prionový protein je tvořen 253 aminokyselinami. N-terminální signální sekvence tvořená 22 aminokyselinami je v endoplazmatickém retikulu odštěpena a C-terminální signální sekvence (23 aminokyselin) je nahrazena glykofosfatidylinositolovou kotvou díky níž je  $\text{PrP}^{\text{C}}$  směřován na vnější membránu buňky. Zralý buněčný prionový protein je tvořen 208 aminokyselinami, které odpovídají kodonům 23-231 (23-230 pro myši PrP).  $\text{PrP}^{\text{C}}$  je post-translačně modifikován připojením až 2 oligosacharidových řetězců k Arg181 a/nebo Arg197 (u myšičího PrP: Arg180 a Arg196) N-glykosidickou vazbou (Kupfer, et al. 2009). Přítomnost oligosacharidu na molekule snižuje její elektroforetickou mobilitu, což na membráně western blotu vede k detekci tří signálů odpovídajících neglykosylované, mono- a di-glykosylované formě  $\text{PrP}^{\text{C}}$  (Parchi, et al. 2009) (Obr. 1e, Obr. 14a).

$\text{PrP}^{\text{C}}$  může podléhat změně sekundární a terciální struktury za vzniku patologické formy prionového proteinu ( $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ ) při zachování identické aminokyselinové sekvence. 3D struktura  $\text{PrP}^{\text{C}}$  byla precizně určena rentgenovou strukturní analýzou a nukleární magnetickou rezonancí, zatímco přesná struktura  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  nebyla doposud zcela objasněna. (Surewicz a Apostol 2011).  $\text{PrP}^{\text{C}}$  obsahuje vysoký podíl  $\alpha$ -helixů, molekula  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  naopak disponuje vyšším podílem struktury  $\beta$ -skládaného listu. Tato struktura u  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  formuje velmi stabilní a kompaktní jádro zahrnující střed a C-terminální část proteinu (Kupfer, et al. 2009). Naproti tomu N-terminální část  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  je flexibilní a přístupná pro štěpení proteinázou K (PK). Kompaktní jádro  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  je rezistentní k působení PK a umožňuje tak diskriminaci mezi  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  a  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Molekula  $\text{PrP}^{\text{C}}$  je zcela rozštěpena a z  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  zůstává rezistentní fragment PrPres (z angl. proteinase K-resistant **PrP**) (Brown a Mastrianni 2010) (Obr. 14a).

$\text{PrP}^{\text{C}}$  je primárně exprimován na nervových buňkách centrální nervové soustavy (CNS), ale v menším množství se nachází u většiny typů buněk (Bendheim, et al. 1992).

Otázka jednoznačné fyziologické funkce PrP<sup>C</sup> nebyla doposud uspokojivě zodpovězena, usuzuje se však na možnou roli při diferenciaci a proliferaci buněk (Fremuntova, et al. 2020), buněčné signalizaci, ochraně proti apoptóze (Watts, et al. 2018) nebo při metabolismu mědi díky specifické sekvenci pěti oktapeptidových repetitivních aminokyselin v N-terminální části, která je schopná vázat dvojmocné kovy (Haigh a Brown 2006).

### 1.1.2 Prionová onemocnění

Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) neboli prionové choroby jsou smrtelná neurodegenerativní onemocnění, která postihují savce včetně člověka. Patogeneze zmíněných onemocnění spočívá v autokatalytické konverzi PrP<sup>C</sup> na PrP<sup>TSE</sup>. Tato konverze většinou vyžaduje přímý kontakt molekul PrP<sup>C</sup> a templátního PrP<sup>TSE</sup> (Kupfer, et al. 2009). Agregáty PrP<sup>TSE</sup> se ukládají v lymforetikulární a mozkové tkáni. V CNS se agregáty ukládají ve formě amyloidních plaků, které způsobují spongiformní změny mozkové tkáně. To vede k závažným neurodegenerativním změnám, které jsou příčinou smrti (Caughey a Baron 2006).

K prionovým onemocněním, která postihují lidskou populaci, patří Creutzfeldt-Jakobova nemoc, Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom, fatální familiární insomnie a kuru. Mezi prionová onemocnění postihující zvířata patří bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) neboli „nemoc šílených krav“ u dobytka, klusavka neboli „scrapie“ u ovcí, chronické strádání jelenovité zvěře (CWD) a raritní případy jako spongiformní encefalopatie kočkovitých (Imran a Mahmood 2011) a velbloudů (Babelhadj, et al. 2018).

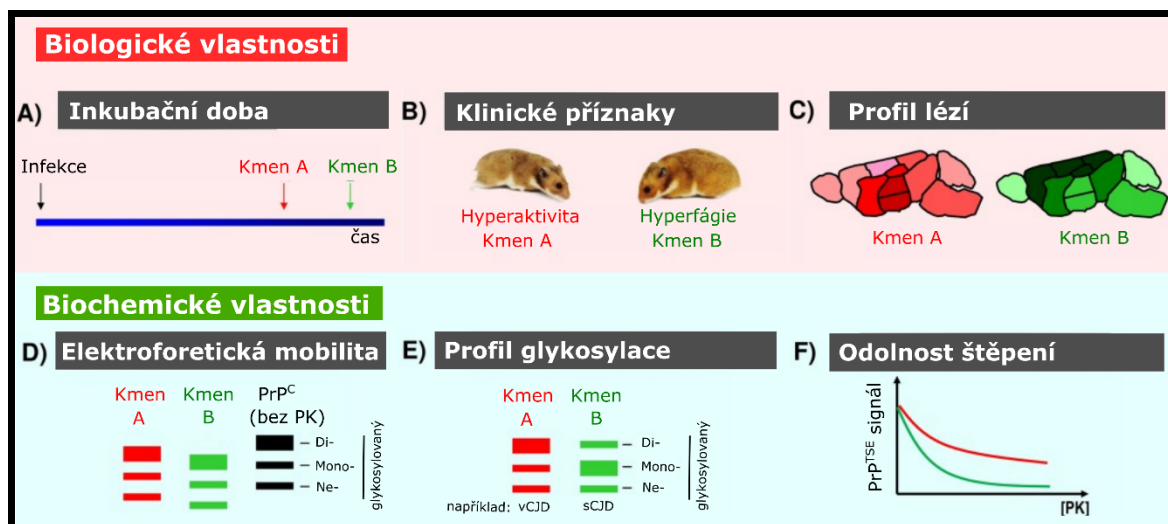
Prionová onemocnění mohou být vyvolána sporadicky, geneticky nebo mohou být získaná. Sporadická forma vzniká samovolnou konverzí PrP<sup>C</sup> bez zjevné přítomnosti templátního PrP<sup>TSE</sup>, příkladem je sporadická Creutzfeldt-Jakobova nemoc (sCJD). Geneticky podmíněné onemocnění je vyvoláno přítomností autosomálně dominantní mutace v genu *PRNP*. V důsledku této mutace je exprimována aminokyselinová sekvence PrP<sup>C</sup> s vyšší pravděpodobností konverze na patogenní formu. Příkladem genetické formy onemocnění je familiární Creutzfeldt-Jakobova nemoc (fCJD), u níž je glutamát na pozici 200 substituován lysinem (Imran a Mahmood 2011). Získaná forma onemocnění je vyvolána vnesením infekčního agens do organismu například konzumací kontaminovaného masa, které stálo za šířením variantní Creutzfeldt-Jakobovi nemoci (vCJD) (Weissmann, et al. 2002), anebo iatrogení transmisí (iCJD) prostřednictvím kontaminovaných lékařských

nástrojů (Bonda, et al. 2016; Thomas, et al. 2013) nebo při léčbě kontaminovanými hormony, při transplantaci kontaminované oční rohovky a dalších případech diskutovaných v kapitole 1.1.5 (Bonda, et al. 2016; Llewelyn, et al. 2004).

Značnou roli ve vnímavosti osob k prionovým chorobám hrají také polymorfismy v genu *PRNP*, které jsou specifické pro konkrétní typ onemocnění. U CJD je významný polymorfismus na kodonu 129, který může být kódován aminokyselinami methionin (M) nebo valin (V). Jedinci, kteří jsou homozygoti 129MM nebo 129VV, se vyznačují vyšší senzitivitou k onemocnění (Imran a Mahmood 2011).

### 1.1.3 Prionové kmeny

Prionové kmeny vznikají přenesením a pasáží prionového izolátu na živočišný druh odlišný od původce izolátu (Wemheuer, et al. 2017). Z biologického hlediska se kmeny odlišují délkou inkubační doby, klinickými projevy a také profilem lézí – místem, kde se ukládají amyloidní plaky (Obr. 1) (Morales 2017). Z biochemického hlediska se kmeny mohou lišit elektroforetickou mobilitou, která je způsobena rozdílnou délkou PrPres. Délka peptidového řetězce PrPres se odvíjí od přístupnosti N-terminálního konce PrP<sup>TSE</sup> k působení PK. Prionové kmeny se mohou lišit glykosylačním profilem, kdy u jednoho kmene, například vCJD, převažuje zastoupení diglykosylované formy PrPres, zatímco u sCJD je majoritně zastoupená monoglykosylovaná forma PrPres (Obr. 1e) (Morales, et al. 2007; NCJDRSU 2017). Kmenová specifita se dále projevuje v rozdílné sedimentaci agregátů PrP<sup>TSE</sup> a odolnosti vůči štěpení PK (Bessen a Marsh 1992), denaturačním činidlům (Safar, et al. 1998) či teple (Marín-Moreno, et al. 2019).



**Obrázek 1.** Biologické a biochemické charakteristiky prionových kmenů. Kmeny jsou z biologického hlediska určeny (a) inkubační dobou onemocnění, které vyvolají, (b) manifestací rozličných klinických znaků, (c) spongiformními změnami v rozdílných oblastech mozku. Na biochemické úrovni jsou kmeny charakteristické (d) elektroforetickou mobilitou rezistentního PrPres (e) zastoupením di-, mono- a neglykosylované formy PrPres, (f) odlišnou resistencí proteolytickému štěpní při rostoucí koncentraci proteinázy K. Převzato z (Morales 2017).

V této disertační práci jsme do experimentů zahrnuli sedm prionových kmenů mFu, mvCJD, mBSE, ME7, 22L, 139A a RML. Jedná se o izoláty z různých živočišných druhů, které byly následně adaptovány na myš. Kmen mFu (Fukuoka) byl izolován z jedince postiženého Gerstmann-Sträussler-Scheinkerovým syndromem (Tateishi, et al. 1988) a pasážován na myš. Jedná se o genetickou formu prionového onemocnění nejčastěji vyvolanou záměnou leucinu za prolin v kodonu 102 genu *PRNP* (Imran a Mahmood 2011). Kmen mvCJD byl extrahován z pacienta postiženého variantní Creutzfeldt-Jakobovou chorobou a pasážován na myš. Ze skotu trpícího BSE byl izolován a pasážován v myši kmen mBSE (Hill, et al. 1997). Kmeny 139A, RML, 22L a ME7 jsou izoláty z ovce postižené klusavkou. Kmeny 139A, RML a 22L pochází z téhož izolátu. 139A a RML postupně prošly sérií pasáží přes kozy, zatímco kmen 22L byl pasážován na ovce. Finálně byly tyto kmeny pasážovány na myš (Giles, et al. 2015). 139A a RML jsou považovány za totožné kmeny, jejichž pasáž v myších probíhala v odlišných laboratořích (Oelschlegel, et al. 2012). Kmen ME7 pochází z nezávislého izolátu klusavky (Giles, et al. 2015; Zlotnik a Rennie 1963) a

vyznačuje se zvýšenou stabilitou PrPres vůči působení guanidin hydrochloridu či N-lauryl sarkosinátu sodnému v porovnání s RML (Thackray, et al. 2007).

#### 1.1.4 Prionové epidemie

Současná incidence prionových onemocnění se pohybuje mezi 1 – 2 diagnostikovanými případy na milion obyvatel za rok v ČR i celosvětově (Rohan, et al. 2015). Avšak v 80. a 90. letech ve Velké Británii výrazně vzrostla incidence prionového onemocnění nazvaného „variantní Creutzfeldt-Jakobova nemoc“ (vCJD) a rozšířila se do několika dalších zemí. Epidemiologická data naznačují, že za příčinou onemocnění byla konzumace produktů ze skotu, který trpěl BSE (Wall, et al. 2017). Až do roku 2017 byli všichni pacienti s vCJD homozygoti pro M v kodonu 129 genu *PRNP* (129MM). V roce 2017 se objevil první pacient, který byl heterozygotem 129MV v *PRNP* genu s výrazně delší inkubační dobou vCJD. To vyvolalo počáteční obavy z propuknutí druhé vlny vCJD (Mok, et al. 2017), které se vzhledem k neexistenci dalších případů zatím nepotvrdily.

V současnosti se hojně diskutuje prionové onemocnění u jelenovité zvěře tzv. chronické strádání jelenovitých (CWD). Hlavní obavy rostou z expozice lidské populace prionům CWD, neboť je zřejmé, že mezidruhovú bariéru nemusí být dostatečnou ochranou proti zvířecím prionozám (Belay, et al. 2004). V porovnání s BSE dochází u CWD k přímému horizontálnímu přenosu ze zvířete na zvíře (Miller a Williams 2003). Kontaminované jsou nejenom CNS, orgány imunitního systému, maso a vnitřní orgány, ale také sliny, exkrementy a moč (Haley, et al. 2011). Kontaminace prostředí těmito produkty může zvýšit riziko přenosu CWD na jiný živočišný druh. U skotu, který byl intracerebrálně inokulován CWD priony, se prionové onemocnění projevilo u 38 % zvířat, což jednoznačně poukazuje na prolomení mezidruhovú bariéry v laboratorních podmínkách (Hamir, et al. 2005). V *in vitro* podmínkách byla demonstrována schopnost CWD prionů iniciovat konverzi lidského PrP<sup>C</sup> (Raymond, et al. 2000). Je otázkou, zda tyto okolnosti povedou k propuknutí nové vlny prionových chorob.

#### 1.1.5 Dekontaminace prionů

Priony jsou vysoce odolné vůči standardním chemickým a tepelným sterilizačním procedurám (Taylor 2004). Autoklávování (134°C, 18 min), enzymatické čističe (Klenzyme, 0,8% (v/v), 43°C, 5 min) (Fichet, et al. 2004), 5% SDS, kyselina peroctová (Lemmer, et al.

2008), 0,15 M NaOH (1 hod, 25°C) (McDonnell, et al. 2013) jsou vůči prionům účinné jen částečně. Dekontaminace pomocí UV nebo ionizujícího záření jsou neúčinné (Sakudo, et al. 2011), protože priony ve své struktuře nenesou nukleové kyseliny (Prusiner 1998). Sterilizace alkoholem nebo aldehydy, které se používají například k dezinfekci endoskopů (Park, et al. 2013), může strukturu prionů stabilizovat a tím zvýšit riziko nákazy (Taylor 1999). Značné riziko přenosu prionů spočívá ve vazebné afinitě prionů k povrchům z různých materiálů (Flechsigt, et al. 2001; Zobeley, et al. 1999). Jedná se zejména o nerezovou ocel (Flechsigt, et al. 2001; Lemmer, et al. 2004), titanové (Berberidou, et al. 2013), plastové a skleněné povrchy (Fichet, et al. 2007b). Tyto materiály se běžně používají při lékařských zákrocích v nemocnicích. U sorbovaných a zaschlých prionů byla prokázána vyšší odolnost vůči dekontaminačním metodám (Lipscomb, et al. 2007; Secker, et al. 2015; Zobeley, et al. 1999).

Dokumentovány jsou iatrogenní případy přenosu prionových onemocnění v nemocničních zařízeních prostřednictvím chirurgických nástrojů (Thomas, et al. 2013), nitromozkových elektrod, transplantované rohovky nebo štěpů tvrdé pleny mozkové od asymptotických pacientů (Bonda, et al. 2016). Zajímavým případem byl přenos prionů tvrdými plenami mozkovými značky Lyodura používaných pro překrytí ran po operacích mozku. Pleny odebrané mrtvým jedincům byly kontaminovány při zpracování, kde jedním z kroků bylo promývání plen v nerezové nádobě (Brooke, et al. 2004). Následně se využívaly pro překrytí rány po operacích mozku. Další případy nálezů byly způsobeny kontaminacemi v růstovém hormonu extrahovaném z hypofýzy, kontaminacemi gonadotropinu nebo krevní transfuzí (Bonda, et al. 2016; Holada, et al. 2000; Llewelyn, et al. 2004). Rezidua PrP<sup>TSE</sup> nalezená v mandlích, apendixu, slezině (Wadsworth, et al. 2001; WHO 2010) a svalech CJD pacientů (Peden, et al. 2006) upozorňují na potenciální riziko nákazy také při tonzilektomii, břišní chirurgii (Wadsworth, et al. 2001) nebo v zubním lékařství (Porter 2002; Sushma, et al. 2016).

Světová zdravotnická organizace vydala opatření pro nakládání s materiálem kontaminovaným priony. Pro běžné nástroje, u kterých je podezření na kontaminace priony při použití na asymptotických pacientech, je doporučováno jejich uložení do 2% NaOCl nebo 1 až 2 M NaOH po dobu 1 hodiny. Následovat by měla tepelná sterilizace při 134°C minimálně 1 hodinu a rutinní nemocniční sterilizační procedura (WHO 2000). Světová zdravotnická organizace současně doporučuje použití jednorázových nástrojů při zákrocích na vysoce infekčních tkáních u pacientů s příznaky prionového onemocnění (WHO 2000;

WHO 2010). V současné době jsou prionová onemocnění definitivně prokázána až *post mortem* a není výjimkou, že v době chirurgického zákroku byl pacient v subklinickém stádiu onemocnění. Průzkum z roku 2013 poukázal na skutečnost, že chirurgické nástroje v nemocničních zařízeních nejsou často indexovány a neexistuje evidence chirurgických sad s vazbou na konkrétního operovaného pacienta (Belay, et al. 2013). V důsledku toho není možné identifikovat potenciální oběti nosokomiální nákazy priony (Belay, et al. 2013; Bonda, et al. 2016). Metody dekontaminace doporučené Světovou zdravotnickou organizací nejsou použitelné pro všechny nástroje. Jedná se většinou o nástroje, které nejsou odolné k doporučené agresivní dekontaminaci nebo podléhají korozivním změnám. Vysoké pořizovací náklady některých citlivých nástrojů navíc znemožňují jejich jednorázové použití. (Brown, et al. 2005; McDonnell a Burke 2003). Zejména pro tyto nástroje je důležité hledat nové způsoby dekontaminace

#### 1.1.6 Nebezpečí přenosu chybně sbalených proteinů

V roce 2015 skupina Dr. Collinge analyzovala post-mortem mozkovou tkáň jedinců zemřelých na iCJD, kterým byl v dětství podáván růstovým hormonem extrahovaným z hypofýzy mrtvých lidí a kontaminovaný priony. U těchto jedinců byla v překvapivě mladém věku (36-51) nalezena také depozita amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ), která jsou příčinou Alzheimerovy choroby (AD) postihující především starší populaci. Protože raná forma AD byla genotypizací rizikových genů vyloučena, lze se domnívat, že růstový hormon mohl být kontaminován také  $A\beta$  (Jaunmuktane, et al. 2015). Při další z retrospektivních studií byla u jedinců, kterým byl podán priony kontaminovaný růstový hormon, nalezena také depozita patologické formy tau proteinu (Duyckaerts, et al. 2018). Inokulace myši  $A\beta$  extrahovaným z lidskému mozku iniciovala tvorbu  $A\beta$  depozit v myších mozcích (Meyer-Luehmann, et al. 2006). Tyto studie naznačují, že Alzheimerova choroba by mohla mít svou iatrogenní variantu jako je tomu u prionových onemocnění (Jaunmuktane, et al. 2015). Riziko je umocněno faktem, že stejně jako prion i  $A\beta$  se vyznačuje vazebnou afinitou k materiálům jako je nerezová ocel, ze kterých jsou vyrobeny chirurgické nástroje, a značnou odolnost vůči sterilizačním metodám (Eisele, et al. 2009).

Neurodegenerativních chorob vyvolaných agregací proteinů je celá řada. K nejznámějším patří Parkinsonova choroba, tauopatie nebo amyotrofická laterální skleróza. Pro studium jejich nosokomiálního přenosu by byla zapotřebí rozsáhlá retrospektivní studie

s dobře zpracovanou anamnézou pacientů, které zatím nejsou dostupné. Aby se předešlo potenciálnímu přenosu chybně sbalených proteinů, je důležité hledat účinné dekontaminační metody pro eliminaci chybně sbalených proteinů.

## 1.2 Reaktivní formy kyslíku

### 1.2.1 Zástupci ROS

#### Superoxidový radikál ( $O_2^{\bullet-}$ )

$O_2^{\bullet-}$  vzniká jednoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku. Reakce  $O_2^{\bullet-}$  s většinou biomolekul jsou pomalé ( $k < 0,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pro Met) (Davies 2016). Výjimku tvoří reakce s cytochromem c nebo superoxiddismutázou ( $k \sim 10^5\text{-}10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), která je také zodpovědná za deaktivaci  $O_2^{\bullet-}$  a uvolnění  $H_2O_2$ . Konjugovanou kyselinou  $O_2^{\bullet-}$  je hydroperoxylový radikál ( $HOO^{\bullet}$ ), který je výrazně reaktivnější a podílí se například na oxidaci nenasycených lipidů ( $k \sim 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Collin 2019).

#### Hydroxylový radikál ( $^{\bullet}OH$ )

V buňkách je produkován redukcí  $H_2O_2$  přechodným kovem Fentonovou reakcí (Schieber a Chandel 2014).  $^{\bullet}OH$  je vysoce reaktivní oxidační činidlo ( $k \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pro Met) s krátkou dobou života. Proto je působení  $^{\bullet}OH$  lokalizováno do bezprostřední blízkosti místa jeho vzniku.  $^{\bullet}OH$  je reaktivní vůči širokému spektru biomolekul a vůči všem aminokyselinám (Davies 2016).

#### Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ )

Peroxid vodíku je výsledným produktem dismutace  $O_2^{\bullet-}$ , má dlouhý poločas života a může difundovat membránami (Schieber a Chandel 2014). Jeho reakce jsou pomalé, rychlostní konstanta pro oxidaci aminokyseliny Met je  $2 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Primárním cílem pro  $H_2O_2$  v proteinech je dále Cys a selenocystein (Davies 2016). V přítomnosti přechodných kovů se podílí na tvorbě  $^{\bullet}OH$ .

## Singletní kyslík ( $O_2(^1\Delta_g)$ )

Za fyziologických podmínek byla produkce  $O_2(^1\Delta_g)$  popsána u neutrofilů a makrofágů. Uplatňuje se při oxidačním vzplanutí jako ochranná reakce těchto fagocytů proti napadajícím mikroorganismům (Steinbeck, et al. 1993).

Vzhledem k zastoupení biomolekul v buňce jsou za hlavní oxidační cíl  $O_2(^1\Delta_g)$  považovány proteiny, konkrétně postranní řetězce aminokyselin Tyr, Trp, His, Cys a Met, pro které byla detekována rychlostní konstanta v řádu  $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Met  $k \sim 1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Davies 2003; Davies 2016). Mechanismus působení  $O_2(^1\Delta_g)$  je blíže popsán v kapitole 1.5.

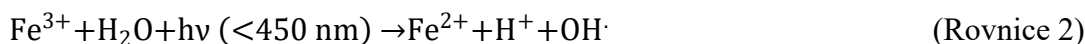
### 1.2.2 Způsoby dekontaminace prionů s využitím ROS

Progresivním přístupem pro dekontaminace prionů se staly metody založené na oxidační degradaci reaktivními formami kyslíku. Solassol a kol. (2006) využil pro dekontaminaci prionů Fentonovu reakci, jejíž podstatou je redukce dvojmocného přechodného kovu působením  $H_2O_2$  za současného uvolnění hydroxylových radikálů ( $\bullet OH$ ) (Rovnice 1). Foto-Fentonova reakce probíhá při expozici UV, která zajišťuje regeneraci dvojmocného kovu (Rovnice 2) a produkci nových  $\bullet OH$ . Reakce musí běžet v kyselém roztoku (pH 3,5), při kterém je  $Fe^{3+}$  dostatečně rozpustný pro redukci na  $Fe^{2+}$  (Paspaltsis, et al. 2009).

Fentonova reakce:



Regenerace katalyzátoru:



Další přístup využívá  $TiO_2$  jako semikonduktor aktivovaný UV, který v roztoku  $H_2O_2$  produkuje  $\bullet OH$  (Paspaltsis, et al. 2006). Obě metody eliminovaly PrPres signál v suspenzi mozkového homogenátu detekovaný western blotem. Myší bioesej demonstrovala, že Fentonova reakce a účinky fotoaktivace  $TiO_2$  snížily infekční dávku prionů v suspenzi mozkového homogenátu. Nicméně onemocnění propuklo u všech zvířat, ale po delší inkubační době (Paspaltsis, et al. 2006; Solassol, et al. 2006). Metoda foto-Fentonovi reakce navíc vedla k úplné eliminaci prionové infekivity, která byla vázána k povrchu drátků z nerezové oceli. To se nepotvrdilo pro titanový povrch (Berberidou, et al. 2013). Tyto

postupy produkce  $\bullet\text{OH}$  jsou běžně aplikovány při čištění vod a vzduchu kontaminovaného organickými látkami.

Dekontaminační účinky  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,2% - 60%) nejsou dostatečné pro eliminaci PrPres signálu pod detekční limit western blotu (Fichet, et al. 2007a; Panigaj, et al. 2011; kapitola 4.4). Expozice kontaminovaných drátků 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 hod, 20°C) s následnou implementací myším nevedla k redukci prionové infekitivity (Fichet, et al. 2007a). Aplikace 59%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 – 20 min) výrazně prodloužila délku života myši a prionové onemocnění se projevilo pouze u 30 – 40% zvířat (Yan, et al. 2004). Jako velmi účinná metoda redukující PrPres signál na western blotu a zcela inaktivující infektitivitu prionů je sterilizace pomocí plazmatu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (90%, 53°C) (Rogez-Kreuz, et al. 2009). Tato metoda vyžaduje speciální zařízení, které elektromagnetickým polem generuje směs nabitých jader a elektronů v komoře obsahující plynný  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sakudo, et al. 2011).

Dekontaminační účinky  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  vůči prionům jsou demonstrovány v této disertační práci.  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  byl generován fotoaktivací senzitizeru, konkrétně derivátů ftalocyaninu, a jeho účinky vedly k fotodynamické eliminaci PrPres signálu pod detekční limit western blotu a také k fotodynamické inaktivaci prionové infekitivity (Janouskova, et al. 2012; Kostelanska, et al. 2019).

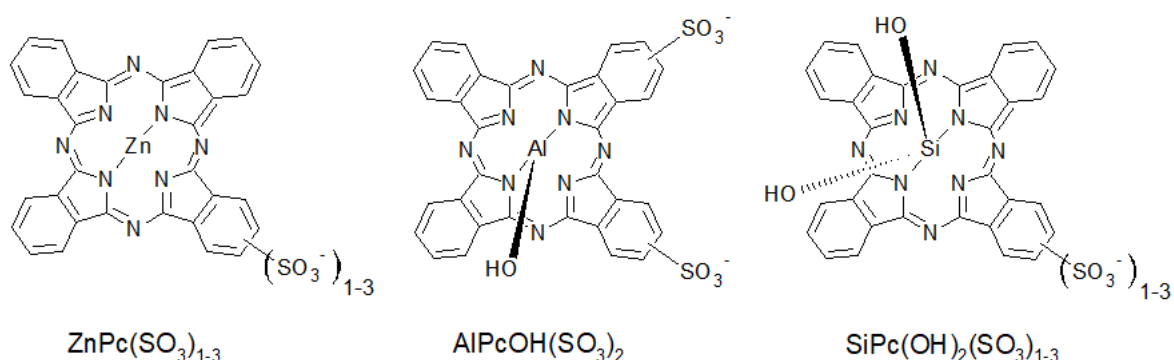
### 1.3 Ftalocyaniny

#### 1.3.1 Struktura a vlastnosti

Pc je cyklická tetrapyrolová molekula, v níž je ke každému pyroлу kondenzován benzenový kruh tvořící periferii molekuly. Syntéza Pc je velmi dobře popsána a umožňuje výrobu širokého spektra rozličných variant molekuly (Kobayashi 2002).

Na periferii molekuly mohou být vázané záporně nabitě karboxylové či sulfonové skupiny, glykosyly, uhlovodíkové zbytky a další. V centrální části molekuly může být koordinován atom kovu Al(III), Zn(II), Si(IV), který může nést axiální ligandy ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{Cl}$  nebo komplexnější molekuly) (Obr. 2). Variace axiálních a periferních substituentů determinuje vlastnosti Pc zahrnující míru agregace, rozpustnost (Palewska, et al. 2012), biodistribuci (Boyle a Dolphin 1996), spektrální, fotofyzikální a fotochemické vlastnosti (Kuznetsova, et al. 2012). Pc se řadí mezi fotosenzitizery, které po absorpci světla o specifické vlnové délce generují toxické ROS (Ben-Hur, et al. 1985; Plaetzer, et al. 2009).

U Pc převažuje produkce  $O_2(^1\Delta_g)$ , na níž se podílí pouze monomery Pc (Kuznetsova, et al. 2012).



**Obrázek 2.** Strukturní vzorec mono-, di- a tri-sulfonovaného ftalocyaninu zinečnatého ( $ZnPcOH(SO_3)_{1-3}$ ), disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého ( $AlPcOH(SO_3)_2$ ) a mono-, di- a tri-sulfonovaného ftalocyaninu dihydroxykřemičitého ( $SiPc(OH)_2(SO_3)_{1-3}$ ). Strukturní vzorce Pc byly vytvořeny v ACD/ChemSketch softwaru.

### 1.3.2 Aplikace

Pc jsou běžně využívány jako modrá a zelená barviva v textilním a papírenském průmyslu (Gregory 2000). Využití mají také v elektrotechnice, kde se testují jako absorbátory světla ve fotovoltaických článcích (Petritsch, et al. 1999). Pro svou schopnost absorbovat červené světlo a blízké infračervené vlnění se staly významnou nadějí pro aplikaci ve fotomedicině, protože světlo o vyšší vlnové délce penetruje hlouběji do tkáně (Plaetzer, et al. 2009). Jako kontrastní látky se Pc používají ve fluorescenčních zobrazovacích metodách nebo pozitronové emisní tomografii (Zhang a Lovell 2017). Zajímavou aplikací je využití při fotochemické internalizaci, kde Pc hraje roli fotosenzitizéru lokalizovaného v membráně váčku, který nese terapeutická léčiva. V cílové buňce dojde k prasknutí váčku působením světlem aktivovaného Pc a k lokálnímu uvolnění léčiva (Norum, et al. 2009). Pc se testují také v oblasti antimikrobiální fotochemoterapie (Jori, et al. 2006) a fotodynamické terapie maligních nádorů (Plaetzer, et al. 2009). ZnPc (obchodní název: CGP55847) je v klinickém testování pro redukci karcinomu horního aerodigestivního traktu (Josefsen a Boyle 2008), Si Pc (obchodní název: Pc 4) je používán pro eliminaci kožních a podkožních lézí (Baron, et al. 2010; Kinsella, et al. 2011) a směs různě

sulfonovaného Al Pc (obchodní název: Photosens) je testována pro použití k redukci tumorů krku a hlavy (Plaetzer, et al. 2009).

### 1.3.3 Interakce s priony

S rostoucí evidencí případů prionových chorob a nozokomiálních nákaz vzrostl také zájem o nalezení efektivního terapeutického činidla. Ke klinickému testování léčby prionů bylo použito antimalarikum quinacrin (Collinge, et al. 2009) a pentosan polysulfát (PPS) používaný také pro léčbu intersticiální cystitidy (Todd, et al. 2005). Účinnost těchto látek pro léčbu prionových onemocnění nebyla prokázána (Stewart, et al. 2008). Další studie identifikovaly široké spektrum molekul s antiprionovou aktivitou *in vitro* i *in vivo* (Charveriat, et al. 2009; Kocisko, et al. 2003; Kocisko, et al. 2005). Patří sem výše zmíněný quinacrin a PPS, dále fosforothioátové oligonukleotidy (Karpuj, et al. 2007), barvivo Congo red (Caspi, et al. 1998) a suramin (Nunziante, et al. 2005)), antibiotikum amphotericin B (Pocchiari, et al. 1987). Antiprionovou aktivitu vykazovaly také cyklické tetrapyroly, mezi něž se řadí porfyriny a Pc (Abdel-Haq, et al. 2009; Caughey, et al. 1998; Priola, et al. 2000).

Pc v buněčné kultuře propagující priony významně redukovaly akumulaci patologického PrP<sup>TSE</sup> (Caughey, et al. 2007; Caughey, et al. 1998). Inhibice tvorby PrP<sup>TSE</sup> při *in vitro* konverzi bez přítomnosti buněk stála za hypotézou, že antiprionový účinek Pc je založen na přímé interakci s molekulou PrP než na ovlivnění biologických procesů buňky (Caughey, et al. 1998). Podání ftalocyaninů myším inokulovaným priony vede k prodloužení jejich života (Caughey, et al. 2007; Priola, et al. 2003; Priola, et al. 2000). Pro studium přímého vlivu Pc na PrP bylo infekční inokul preinkubováno s Pc. Výsledkem bylo prodloužení života myši vůči kontrolním myším a také vůči myším, které obdržely stejnou dávkou Pc podanou profylakticky (Priola, et al. 2003; Priola, et al. 2000). Biofyzikální analýza vazebných interakcí odhalila na molekule rekombinantního křeččího PrP (zkrácená forma 90-292) nejméně dvě vazebné oblasti pro Pc. Vazebná afinita derivátů Pc k rekombinantnímu PrP (rPrP) klesá v pořadí  $Pc(SO_3)_4 \approx ZnPc(SO_3)_4 \gg AlPc(SO_3)_4$  (Dee, et al. 2012). Schopnost těchto derivátů Pc inhibovat akumulaci PrP<sup>TSE</sup> (= antiprionová aktivita) kmenů 22L a RML v buněčné kultuře klesá v analogickém pořadí. Odpověď na otázku, čím je determinovaná antiprionová aktivita derivátů Pc, byla nalezena při porovnání antiprionové aktivity derivátů Pc a jejich tendencí k agregaci. Účinnějšími antiprionovými sloučeninami byly Pc s výrazným sklonem k tvorbě agregátů jako  $Pc(SO_3)_4$  (Caughey, et al.

2007). Oligomerizace Pc závisí na jejich struktuře, koncentraci a charakteru rozpouštědla (Palewska, et al. 2012). Afinita mezi molekulou PrP a Pc je zprostředkována  $\pi$ - $\pi$  interakcemi aromatického kruhu Pc a postranních aromatických řetězců aminokyselin PrP (Caughey, et al. 2007; Dee, et al. 2012). Mono-, di- a tetra-sulfonované ftalocyaniny vykazovaly identický antiprionový účinek. Lze tedy předpokládat, že iontové interakce sulfonových skupin Pc a nabitých postranních řetězců aminokyselin PrP se v antiprionové aktivitě Pc neuplatňují (Caughey, et al. 2006; Caughey, et al. 2007). Počet sulfonových skupin na periferii molekuly Pc ovlivňuje jejich rozpustnost a distribuci v organismu (Boyle a Dolphin 1996).

## 1.4 Fotosenzitizéry

### 1.4.1 Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti senzitizerů

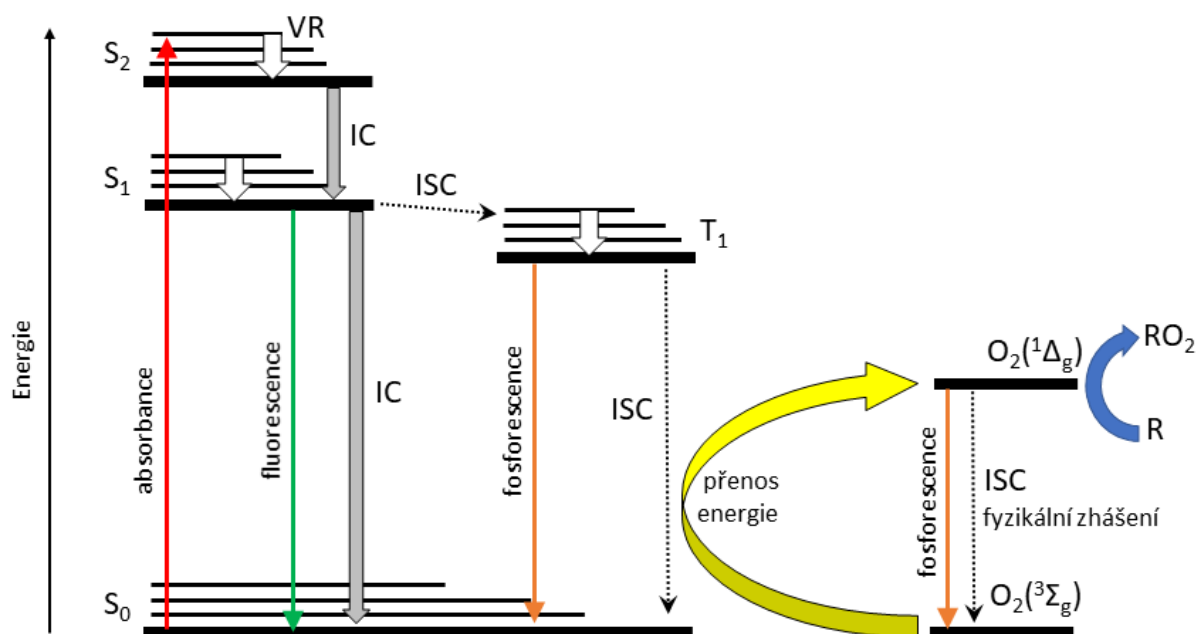
Molekula fotosenzitizéru má v základním stavu ( $S_0$ ) všechny elektrony v energeticky nejnižší položené orbitalech. Všechny elektrony jsou v párech a celkový spin elektronů molekuly ( $s$ ) je tedy 0. Multiplicita definována vztahem  $2 \times s + 1$  je rovna 1 a tento stav molekuly je označován jako singletní (Lang, et al. 2005). Absorpcí fotonů o dostatečné energii dochází k posunu jednoho elektronu do orbitálních hladin s vyšší energií a molekula přechází do excitovaného stavu  $S_1$ ,  $S_2$ , ... (celkový spin molekuly je 0, singletní stav). Nastává vibrační relaxace (VR), kdy elektron klesá po vibračních hladinách každého excitovaného stavu  $S_n$ . Přejít mezi excitovanými stavy  $S_n \rightarrow S_{n-1}$  probíhá vnitřní konverzí (IC) až elektron dosáhne  $S_1$  (Obr. 3) (Lang, et al. 2005; Plaetzer, et al. 2009). Deaktivace  $S_1$  stavu a přechod molekuly do základního stavu ( $S_0$ ) může proběhnout těmito způsoby:

- a) Vnitřní konverzí za současného uvolněním tepla
- b) Chemickou reakcí
- c) Uvolněním fotonu. Tento děj se označuje fluorescenční emise.
- d) Intersystémovým přechodem (ISC) na tripletní stav  $T_1$ . Přejít je doprovázeným změnou spinu elektronu. Do stavu  $S_0$  může molekula přejít fosforescencí tedy zpožděným uvolněním fotonů (Obr. 3). Alternativní cestou deaktivace  $T_1$  stavu molekuly je fotochemická reakce. Takovýmto způsobem deaktivace se vyznačuje skupina látek označovaná fotosenzitizéry. Ty se vyznačují vysokou pravděpodobností přechodu do tripletního stavu, v němž mohou setrvávat až řádu sekund (Ochsner 1997).

### 1.4.2 Deaktivace fotosenzitizéru v tripletním stavu fotochemickou reakcí

Světlem aktivované fotosenzitizéry iniciující fotochemickou reakci probíhající paralelně dvěma mechanismy, které mezi sebou soutěží. Do jaké míry jeden z mechanismu převládne závisí na typu fotosenzitizéru, excitační vlnové délce a podmínkách reakce (Foote 1991). U I. typu mechanismu je elektron přenesen na molekulární kyslík v tripletním (základním) stavu ( $O_2(^3\Sigma_g^-)$ ) (Plaetzer, et al. 2009). Produktem reakce je superoxidový radikál ( $O_2^{\bullet-}$ ), který se nachází v rovnováze s hydroperoxylovým radikálem ( $\bullet OOH$ ) (Baptista, et al. 2017) a podléhá disproportionaci na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Působením UV nebo v přítomnosti dvojmocných kovů se z  $H_2O_2$  uvolňují hydroxylové radikály (Fentonova reakce) (Paspaltsis, et al. 2009). Hydroxylové radikály vznikají také při vysokých koncentracích  $H_2O_2$  reakcí s  $O_2^{\bullet-}$  (Haber-Weissova reakce) (Plaetzer, et al. 2009).

Při mechanismu II. typu je fotosenzitizér v tripletním stavu deaktivován přenosem energie na  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  za vniku dvou singletního stavů kyslíku  $O_2(^1\Delta_g)$  a  $O_2(^1\Sigma_g)$  (Foote 1968; Lang, et al. 2005).



**Obrázek 3.** Jablonského diagram.  $S_x$  – singletní stav,  $T_x$  – tripletní stav,  $x$  definuje konkrétní excitovaný stav; VR – vibrační relaxace; IC – vnitřní konverze; ISC – intersystémový přechod; R – chemický zhášeč. Převzato z (Pimenta, et al. 2012).

## 1.5 Singletní kyslík

### 1.5.1 Fotochemie singletního kyslíku

$O_2(^3\Sigma_g^-)$  má v základním stavu ve valenční vrstvě dva nepárové elektrony se stejným spinem umístěné v degenerovaných orbitalech. Celkový spin  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  molekuly je 1, což odpovídá multiplicitě 3 ( $=2 \times (1/2 + 1/2) + 1$ ).  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  se tak běžně vyskytuje v tripletním stavu (Lang, et al. 2005). Absorbuje-li  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  energii, dojde ke změně spinu jednoho z elektronů. Celkový elektronový spin molekuly se změní na 0 s multiplicitou 1 a molekula se přejde do singletního stavu. Konkrétně  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  přechází do dvou singletních stavů  $O_2(^1\Delta_g)$  a  $O_2(^1\Sigma_g)$ . Oba stavy se liší uspořádáním elektronů a tomu odpovídající energií.  $O_2(^1\Delta_g)$  má dvojici elektronů s opačným spinem v jednom orbitalu ( $\Delta E = 94,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), zatímco  $O_2(^1\Sigma_g)$  má tyto elektrony v různých orbitalech ( $\Delta E = 156,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (Lang, et al. 2005; Plaetzer, et al. 2009). Doba života  $O_2(^1\Sigma_g)$  je velmi krátká, protože dochází k rychlé deaktivaci (rychlostní konstanta:  $k \sim 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ) na  $O_2(^1\Delta_g)$ . Tato reakce je upřednostňována před rolí  $O_2(^1\Sigma_g)$  v oxidačních reakcích (Davies 2003), které pro  $O_2(^1\Sigma_g)$  nebyly doposud prokázány (Lang, et al. 2005).

### 1.5.2 Deaktivace singletního kyslíku

$O_2(^1\Delta_g)$  může být deaktivován několika způsoby. Při fosforescenci je uvolněna energie odpovídající vlnové délce 1270 nm a molekula se navrací do základního stavu  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  (Obr. 3) (Nonell a Braslavsky 2000). Alternativní cestami navrácení  $O_2(^1\Delta_g)$  do základního stavu je fyzikální a chemické zhášení, při kterém dochází k interakci s okolními molekulami (Davies 2003). Fyzikální zhášení označuje děj, při kterém energie  $O_2(^1\Delta_g)$  přenesena na molekulu zhášeče, kterou je například  $\beta$ -karoten (Lang, et al. 2005) nebo  $\text{NaN}_3$  (Hall a Chignell 1987). Tyto metody se používají pro průkaz  $O_2(^1\Delta_g)$  v komplexních reakcích (Lang, et al. 2005). Při chemickém zhášení dochází k chemické reakci  $O_2(^1\Delta_g)$  se zhášečem (R) a vzniká nový oxidovaný produkt  $\text{RO}_2$ . Chemickým zhášečem může být kyselina močová (Fischer, et al. 1998; Rabello, et al. 2012), histidin (Min a Boff 2002), 9,10-dimethylantracen (DMA) nebo 1,3-difenyliisobenzofuran (DPIBF) (Černý, et al. 2010).

### 1.5.3 Interakce s proteiny

$O_2(^1\Delta_g)$  reaguje s celou řadou biomolekul jako jsou proteiny, steroly, lipidy, antioxidanty nebo nukleové kyseliny. Proteiny jsou vzhledem k majoritnímu zastoupení v buňce nejčastějším cílem působení  $O_2(^1\Delta_g)$  (Davies 2005). Navíc reakce  $O_2(^1\Delta_g)$  s postranními řetězci aminokyselin mají v porovnání s dalšími molekulami buňky vyšší rychlostní konstanty ( $k$ ) (Wilkinson, et al. 1995). Deaktivace  $O_2(^1\Delta_g)$  proteinů může probíhat dvěma typy zhášení (kapitola 1.5.2), ale preferovaná je chemická reakce (Davies 2003). Krátká doba života  $O_2(^1\Delta_g)$  umožňuje jeho působení pouze v bezprostředním okolí jeho vzniku (30 nm v buňce (Moan 1990)). Elektrofilní  $O_2(^1\Delta_g)$  preferuje jako cíl molekuly bohaté na elektrony jako jsou aromatická jádra Trp, Tyr, His nebo nevazebné elektronové páry na atomu síry Cys a Met (Davies 2016; Min a Boff 2002). Rychlostní konstanty oxidace postranních řetězců volných aminokyselinami jsou  $k \sim 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pro Trp, His  $k \sim 3,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , Tyr  $k \sim 0,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , Met  $k \sim 1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a Cys  $k \sim 0,89 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Ostatní aminokyseliny reagují výrazně pomaleji s rychlostní konstantou  $< 0,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . V důsledku toho dochází k selektivní oxidaci postranních řetězců jmenovaných aminokyselin (Davies 2003). Oxidace postranních řetězců aromatických aminokyselin probíhají za tvorby endoperoxidu a následným otevřením aromatického kruhu za vzniku hydroperoxidu. Tyto změny byly pozorovány u Trp, Tyr i His a jsou pouze meziproduktem fotochemické reakce. Jako finální produkt oxidace postranního řetězce Trp byly v proteinech detekovány N-formylkynurenin a kynurenin (Balasubramanian, et al. 1990), postranní řetězec Met byl oxidován na sulfoxid (Liu, et al. 2016) a Cys na disulfid (To, et al. 2016). Oxidace His a Tyr zahrnuje otevření jejich postranních aromatických kruhů s nejednoznačně definovaným finálním produktem (Davies 2003; Lang, et al. 2005). Meziprodukty oxidace postranního řetězce His mohou reagovat s postranními řetězci Lys, Cys nebo His za vzniku intra- či intermolekulární vazby (Shen, et al. 1996; Verweu a Steveninck 1982). Oxidace proteinu působením  $O_2(^1\Delta_g)$  vedou ke změnou citlivosti k proteolytickým enzymům, ke změnám sekundární a terciální struktury proteinu, v jehož důsledku může docházet k nevratnému poškození proteinu projevující se například konformačními změnami či změny afinity ke kofaktorů (Davies 2003; Michaeli a Feitelson 1997; Prinsze, et al. 1990; Silva, et al. 2000)

## 2 Cíle práce

Vysoká rezistence prionů vůči standardním sterilizačním procedurám spolu s jejich vysokou afinitou k různým materiálovým povrchům výrazně zvyšuje riziko nozokomiálního přenosu infekce při invazivních lékařských zákrocích u asymptotických pacientů. Tyto případy jsou dokumentovány v odborné literatuře.

Naším cílem bylo posoudit použitelnost fotodynamické inaktivace pro vývoj ekonomicky dostupné metody dekontaminace prionů.

Dílčí cíle této disertační práce byly následující:

1. Charakterizace fotodynamického procesu ftalocyaninů ve vodném roztoku
2. Optimalizace a charakterizace mechanismu fotodynamické eliminace prionů v suspenzi homogenizované mozkové tkáně
3. Ověření účinnosti fotodynamické eliminace vůči PrP<sup>TSE</sup> různých prionových kmenů
4. Ověření redukce infekivity PrP<sup>TSE</sup> u fotodynamicky inaktivovaných prionů s využitím myšího modelu
5. Ověření účinnosti fotodynamické inaktivace na redukci infekivity PrP<sup>TSE</sup> sorbovaných na plastový povrch

### 3 Metody a materiály

#### 3.1 Světelné zdroje

Trubkový zdroj světla (z angl. *tube light source*, TLS) a 96-diodový zdroj (z angl. *diode array light source*, DALs) byly vyrobeny ve spolupráci s Ing. Jaroslavem Freislebenem, PhD. ze Západočeské univerzity v Plzni. TLS byl vybaven čtyřmi diodami LZ1-00R200 (výkon: 2,5 W; LedEngin, USA) s úhlem osvitu 110°. TLS byl navržen pro osvit velkoobjemových vzorků (< 63 ml, Ø 4 cm, délka 5 cm). DALs byl osazen 96 diodami typu W53SRC/E (výkon: 100 mW; Kingbright, Taiwan) s úhlem osvitu 20°. Uspořádání diod je uzpůsobeno rozložení jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky. Bližší charakteristika světelných zdrojů byla provedena Ing. J. Freislebenem, PhD. a je součástí Přílohy č. 1.

#### 3.2 Zkumavky pro PDI experimenty

K experimentům pro PDI byly použity polypropylenové Eppendorf Safe-Lock mikrozkušavky (1,5 ml, cat. no. 0030123.328) nebo 96-jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky s plochým dnem (cat. no. 3595, Costar). Pro zachování maximální homogenity experimentu byly nevyužité krajní jamky při experimentech plněny ekvivalentním objemem pufry a nebyly využity pro PDI.

#### 3.3 Fotosenzitizery

K produkci ROS byl použit disulfonovaný hydroxyhlinitý ftalocyanin (AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), směs mono-, di- a tri-sulfonovaného ftalocyaninu dihydroxykřemičitého (SiPc(OH)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub>) a směs mono-, di- a tri-sulfonovaného ftalocyaninu zinečnatého (ZnPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub>), (Obr. 2). Ftalocyaniny byly získány na základě spolupráce s Centrem Organické chemie v Rybitví (Ing. Jan Rakušan, CSc). Zásobní roztoky derivátů Pc o koncentraci 100 µg.ml<sup>-1</sup> v PBS byly skladovány ve tmě při 4°C. Spektra derivátů byla zaznamenána pro koncentrace 10 µg.ml<sup>-1</sup> v PBS a pro vyhodnocení míry agregace také v DMSO (Kuznetsova, et al. 2012) (cat. no. D8418, Sigma Aldrich).

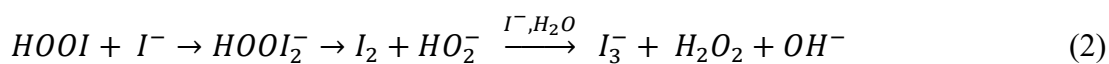
### 3.4 Chromatografie derivátů Pc na tenké vrstvě

Pro zjištění míry sulfonace byly deriváty Pc v PBS nanесeny po kapkách vedle sebe na spodní část destičky pokryté silikagelem (Silufol, Kavalier, Československo). Destička byla vložena do vyvíjecí nádoby saturované parami mobilní fáze acetonitrilu a NH<sub>3</sub> (aq., 25%) v poměru 7:2.

### 3.5 Detekce ROS

#### 3.5.1 Detekce O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) jodidovou metodou

Produkce O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) byla měřena nepřímo prostřednictvím spektrofotometrické detekce produkovaného trijodidu (I<sub>3</sub><sup>-</sup>) při vlnové délce 287 nm. Absorbance I<sub>3</sub><sup>-</sup> je úměrná koncentraci produkovaného O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) dle schématické rovnice (převzato z (Mosinger a Mosinger 1995)):



Deriváty ftalocyaninů v PBS byly ředěny do jodidového činidla (0,018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,03 M KI; 10 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) na finální koncentraci 1; 0,5 a 0,1 μg.ml<sup>-1</sup>. Alikvoty byly vystaveny červenému světlu v TLS po dobu 5 min nebo v DALs 90 min. Pro sledování kinetiky produkce O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) na délce osvitů bylo exponováno 0,5 μg.ml<sup>-1</sup> roztoku ftalocyaninu po dobu 1, 2, 3, 4, 5 a 6 min v TLS a 15, 30, 45, 60, 75 a 90 min v DALs.

V inhibičním testu produkce O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) byl do jodidového činidla přidán 10 mM NaN<sub>3</sub> jako specifický fyzikální zhašeč O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) (Hall a Chignell 1987).

Jodidové činidlo bez ftalocyaninů exponované světlu ani jodidové činidlo s ftalocyaniny držené ve tmě nevykazovaly falešně pozitivní signál. Absorpční spektra roztoků byla měřena v kyvetách UV Cuvette s optickou délkou 10 mm (Brand GmbH + CO) na spektrometru Eppendorf BioSpectrometer® kinetic.

### 3.5.2 Detekce $O_2(^1\Delta_g)$ pomocí kyseliny močové

Produkce a průkaz oxidačních vlastností  $O_2(^1\Delta_g)$  byly monitorovány prostřednictvím oxidační degradace kyseliny močové (KM; chemický zhášec  $O_2(^1\Delta_g)$ , je monitorována poklesem absorbance KM při 220 nm a námi sledovaných 291 nm (Fischer, et al. 1998; Rabello, et al. 2012)). KM nereaguje ve fosfátovém pufru s  $H_2O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$  (Becker 1993).

AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> byl ředěn do roztoku  $2 \times 10^{-4}$  M sodné soli kyseliny močové v PBS na finální koncentraci 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Míra oxidace KM byla měřena v duplikátech v 1 min intervalech v TLS a v triplikátech v 15 min intervalech v DALS. Pokles absorbance při 291 nm nebyl pozorován pro zásobní roztok KM s AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> držený ve tmě, ani pro KM bez AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> vystavené světlu po testované expoziční čase (v TLS a DALS).

### 3.5.3 Detekce $O_2^{\bullet-}$ a $H_2O_2$

$O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  byly detekovány jodidovou metodou s modifikovaným postupem. AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> byl nejprve ředěn v pufru bez KI (0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10  $\mu\text{M}$  (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, pH 6,2). Alikvoty byly exponovány světlu standardně 5 min v TLS a 90 min v DALS. Po 5 min stání ve tmě, kdy  $O_2(^1\Delta_g)$  s krátkým poločasem života vyhasl, byly alikvoty smíchány 1:2 s pufrem obsahujícím KI (0,12 M KI, 0,072 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40  $\mu\text{M}$  (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, pH 6,2). Spektrofotometricky byl analyzován přírůstek absorbance při vlnové délce 287 nm indikujících přítomnost I<sub>3</sub><sup>-</sup>.

K určení detekčního limitu metody byla desítková ředění 3%  $H_2O_2$  analyzována na přítomnost I<sub>3</sub><sup>-</sup> stejným přístupem, ale s vynecháním osvětlení.

## 3.6 Mozkové homogenáty

Zdrojem PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>TSE</sup> byly mozky myši, které byly usmrceny v terminálním stádiu prionového onemocnění. Zahrnuty byly tyto kmeny prionů adaptované na myši: RML, ME7, 22L, mFu, mBSE, mvCJD a 139A. Mozková tkáň v PBS (1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4) s 1 mM PMSF a 2 mM EDTA byla homogenizována skleněnými kuličkami ( $\varnothing$  1,0 mm, cat. no. 11079110, BioSpec Products, USA) v Mini-BeadBeater-8 (BioSpec Products, USA) po dobu  $2 \times 5$  s. Výsledná suspenze 10% (w/v) mozkového homogenátu byla uchovávána v -80°C.

### 3.7 Fotodynamická inaktivace

RML mozkový homogenát rozmražený na ledu byl ředěn na 1% (w/v) a homogenizován jehlou o průměru 29G. Směs mozkového homogenátu a roztoku Pc v poměru 90:10 (μl) byla krátce promíchána a exponována červenému světlu v aparatuře DALŠ nebo TLS. Úbytek signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres byl sledována pro koncentrace 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 a 0,5 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> při expozici v TLS (5 min) a koncentrace 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 a 1 μg.ml<sup>-1</sup> v DALŠ (90 min). Vliv délky světelné expozice na úbytek signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres při koncentraci 0,5 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> byl sledován pro časové intervaly 0,5; 1; 2 a 3 min v TLS a 15, 30, 45, 60, 75 a 90 min v DALŠ. Účinnost PDI vůči prionovým kmenům ME7, 22L, mFu, mBSE, mvCJD a 139A byla testována při koncentraci 1 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ZnPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub> nebo SiPc(OH)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub> a expozici v DALŠ po dobu 90 min. Pro vyloučení vlivu samotného ftalocyaninu či samotného světla na stabilitu vzorků byly zahrnuty kontroly: mozkový homogenát s Pc ponechaný ve tmě, mozkový homogenát s PBS exponovaný světlu a držení ve tmě.

Při inhibičních experimentech produkce O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) byl do reakční směsi přidán NaN<sub>3</sub> o finální koncentraci 10, 100 a 500 mM.

Vzorky byly následně lyzovány 0,5% (w/v) deoxycholátem sodným a 0,5% (v/v) Tritonem X-100. Polovina objemu vzorku byla štěpena proteinázou K (50 μg.ml<sup>-1</sup>; cat. no. 647-014-00-9, Merck KGaA) po dobu 30 min při 37°C. Štěpené vzorky obsahující PrPres a neštěpené vzorky obsahující PrP<sup>C</sup> a zároveň PrP<sup>TSE</sup> byly denaturovány v ekvivalentním objemu nanášecího pufru (125 mM Tris, pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 20% (v/v) glycerol; 0,01% (w/v) bromfenolová modř) při teplotě 96°C, 5 min.

Se vzorky infekčních mozkových homogenátů bylo manipulováno v laboratořích s bezpečnostní klasifikací BSL-2.

### 3.8 Oxidace PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres působením H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

1% (w/v) RML mozkový homogenát byl smíchán 9:1 s desítkovými ředěními 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebo s PBS. Směs byla inkubována 90 min při laboratorní teplotě. Vzorky byly následně lyzovány detergenty, štěpeny proteinázou K a připraveny pro SDS-PAGE postupem popsáným v kapitole 3.7.

### 3.9 Stanovení koncentrace proteinů

Obsah proteinů v kontrolních a PDI vzorcích byl detekován komerčním kitem Pierce™ BCA Protein Assay. Metoda je založena na redukci  $\text{Cu}^{2+}$  peptidovými vazbami proteinů na  $\text{Cu}^+$ , který vytváří s kyselinou bicinchoninovou (BCA) barevný komplex. 15  $\mu\text{l}$  vzorku bylo inkubováno s 200  $\mu\text{l}$  BCA roztoku při 37°C, 40 min ve tmě. Absorbance komplexu byla detekována v oblasti 450/8 nm pomocí spektrofluorometru Perkin Elmer 1420 Victor3 (model 1420-012). Koncentrace proteinu byla stanovena z kalibrační křivky ředící řady hovězího sérového albumin (frakce V, cat. no. 8076.2, Carl Roth GmbH, Germany).

### 3.10 Frakcionace PDI RML homogenátu na sacharózovém gradientu

Směs RML homogenátu a  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  o finální koncentraci 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byly osvíceny v TLS po dobu  $3 \times 6$  min. Analogicky byla připravena kontrola RML s 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  ve tmě. Jako kontrola agregace byl připraven RML mozkový homogenát s 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  ve tmě (Priola, et al. 2003). Jako negativní kontrola byl použit neovlivněný RML.

150  $\mu\text{l}$  vzorku bylo nanášeno na horní vrstvu zónového sacharózového gradientu (10 – 60%, zóna 2 ml, krok 10%) a centrifugováno 1 hod při 33 500 rpm a 4°C (Optima LE-80K, rotor SW40 Ti, Beckman Coulter). Frakce o objemu 1 ml byly sbírány ode dna zkumavky. Proteiny ve frakcích byly precipitovány ve 4-násobném objemu ledového methanolu po dobu 12 hod při -20°C a následně sedimentovány při 18 000×g, 4°C po dobu 30 min. Peleta byla rozpuštěna v nanášecím pufru. Proteiny byly detekovány na gelu barveném roztokem  $\text{AgNO}_3$ .  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  byl vizualizován na membráně western blotu směsí protilátek AH6 a DC2.

### 3.11 SDS-PAGE a Western blot

Proteiny byly separovány elektroforeticky v 10% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1% (w/v) dodecylsírany sodného (SDS-PAGE; 105 V, 90 min). Poté byly barveny roztokem  $\text{AgNO}_3$  nebo přeneseny na 0,2  $\mu\text{m}$  nitrocelulosovou membránu (Western blot; Mini-PROTEAN System, Bio-Rad; 200 mA, 120 min).

### 3.11.1 Imunodetekce PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres

Po western blotu byla membrána promyta v TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) s 0,05% (v/v) Tween-20 (TBST) a blokována v 5% (w/v) sušeném mléce (Blotting-Grade Blocker, cat. no. 1706404, Bio-Rad) rozpuštěném v TBST (TBSTM). K detekci prionového proteinu byly použity myší monoklonální protilátky (0,5 µg.ml<sup>-1</sup>) AG4, BE12, AH6, GE8 (cat. no. RC059, RC060, RC058, RC061, TSE Resource Center, UK), DC2 (Blood Transfusion Center of Slovenia), 6D11 (cat. no. 808002, BioLegend), 6H4 (cat. no. 7500996, Thermo Fisher Scientific) nebo lidská protilátka D18 (Burton D., The Scripps Research Institute, USA). Membrána byla inkubována s protilátkami rozpuštěnými v 1% (w/v) TBSTM po dobu 2 hod při laboratorní teplotě. Po opláchnutí v TBST a opětovné blokaci byla membrána inkubována v 1% (w/v) TBSTM, 1 hod při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou: oslí F(ab')<sub>2</sub> fragment cílený proti myšimu IgG (0,3 µg.ml<sup>-1</sup>, cat. no. 715-056-150, Jackson ImmunoResearch, USA) nebo myší protilátkou proti lidskému IgG (0,25 µg.ml<sup>-1</sup>, cat. no. 9042-04, Southern Biotech). Přebytek protilátek byl odmyt v TBS a protilátky vázané na povrch PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres byly vizualizovány kolorimetrickou reakcí fosfatázy se substrátem BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-nitro blue tetrazolium chloride; Millipore). Membrána byla digitalizována na skeneru CanoScan LiDE 220 (Canon). Nespecifická interakce sekundární protilátky nebyla v oblasti prionového proteinu na membráně detekována.

### 3.11.2 Denzitometrická analýza

Intenzita signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres na membráně western blotu byla odečtena v softwaru ImageJ (verze 1.52a).

### 3.11.3 Barvení proteinů roztokem AgNO<sub>3</sub>

Proteiny v gelu byly barveny roztokem AgNO<sub>3</sub> podle Chevallet et al. (Chevallet, et al. 2006). Gel byl fixován ve směsi ethanol:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (=3:1:6) přes noc, promyt 2× v 20% (v/v) ethanolu, dále 2× v H<sub>2</sub>O, krátce senzitivován v 0,8 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O a opláchnut v H<sub>2</sub>O. Po inkubaci v 12 mM AgNO<sub>3</sub> po dobu 2 hod byl přebytek Ag<sup>+</sup> opláchnut H<sub>2</sub>O a gel byl ponechán ve vyvolávacím roztoku (217 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,

0,009% (v/v) formalin, 0,05 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O) až do zbarvení separovaných proteinů, kdy byl přenesen do roztoku zastavujícího další barvení (330 mM Tris, 2% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH).

### 3.12 Testování aktivity PrP<sup>TSE</sup> po PDI při konverzi rPrP

Příprava PDI RML homogenátů byla analogická jako u frakcionace na sacharózovém gradientu (kapitola 3.10). Pro detekci aktivity PrP<sup>TSE</sup> (je součástí homogenátu) při konverzi rPrP byla použita metoda RT-QuIC (z angl. Real-Time Quaking-Induced Conversion). Vzorky po PDI (ředění 10<sup>-2</sup>=1%) byly sonikovány 15 s (750W, 20 kHz, 30% amplituda, cup horn, Cole-Parmer) a ředěny v rozsahu 10<sup>-6</sup> až 10<sup>-8</sup>. V uspořádání 96-jamkové mikrotitrační destičky (černé stěny, průhledné dno, Nunc, cat. no. 2102.0372, Thermo Fisher Scientific) bylo smícháno vždy 98 μl reakční směsi (300 mM NaCl, 0,002% (w/v) SDS, 10 μM thioflavin T (ThT), 100 μg.ml<sup>-1</sup> rekombinantního křeččího PrP90-231) a 2 μl ředěných PDI nebo kontrolních vzorků. Reakční směs byla inkubována ve FLUOstar Omega fluorometru (BGM) při teplotě 55°C po dobu 60 hodin, ve kterých se opakovaly cykly třepání (60 s, 700 rpm) a klidu (60 s). Fluorescence ThT v agregátech rekombinantního proteinů (rPrP) byla detekována každých 15 min v rozsahu vlnových délek 480/10 nm. Excitační filtr propouštěl světlo o vlnové délce 450/10 nm. Čas, při kterém dojde k prvnímu prudkému nárustu ThT fluorescence (rozdíl sousedních hodnot > 6%) je považován za počátek konverze rPrP (v angl. *reaction lag time*).

### 3.13 PDI RML prionů v suspenzi testovaná na myším modelu

1,3% (w/v) infekční RML nebo neinfekční CD1 mozkový homogenát byl vystaven PDI ve třech sekvencích. Osvit v každé sekvenci trval 6 min v TLS a finální koncentrace AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v sekvencích byla postupně 7,4; 16,7 a 25 μg.ml<sup>-1</sup> (AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-PDI). Kontrolní inokulum bylo připraveno analogicky, ale bez expozice světlu (AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-tma). Finální koncentrace mozkového homogenátu v inokulu byla 1% (w/v). V zaslepeném experimentu byly intracerebrálně inokulovány 2 skupiny CD1 myši (n=10, samice, stáří 6-8 týdnů, Charles River, Německo) 25 μl AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-PDI RML mozkovým homogenátem a AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-tma RML homogenátem.

Kontrolními skupinami byly myši inokulované PDI CD1 homogenátem (n=5); směsí CD1 homogenátu a AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> drženou ve tmě; neovlivněným CD1 homogenátem. Neovlivněný 1% RML byl desítkovou řadou titrován do 1% CD1 mozkového homogenátu a jednotlivá ředění (1%=10<sup>-1</sup> až 10<sup>-6</sup>) byla inokulována skupinám myším (n=5). Myši vykazující terminální stádium nemoci (nízká váha, porucha motoriky, nezájem o kožíšek) byly utraceny. Odebrané orgány (ledviny, játra, plíce a slezina) byly zamraženy na suchém ledu a uchovávány při -80°C pro další analýzu. Polovina mozku byla fixována v 3,7% (v/v) formalinu v PBS pro následnou imunohistopatologickou analýzu a zbylá část byla zpracována na 10% mozkový homogenát využitý k potvrzení prionové diagnózy western blotem.

Experiment na zvířecím modelu probíhal se souhlasem Etické komise Univerzity Karlovy (protokol 661/18).

### 3.14 Buněčné eseje

#### 3.14.1 Studium AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v buňkách

##### 3.14.1.1 Průtoková cytometrie

Myší katecholaminergní CAD5 buňky (darované Ch. Weissmannem, The Scripps Research Institute, USA) byly kultivovány v médiu Opti-MEM (Gibco) suplementovaným 10% (v/v) bovinním růstovým sérem a 100 U.ml<sup>-1</sup> penicilinu/streptomycinu při 37°C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Při dosažení konfluence byly buňky pasážovány 1:9. Buňky byly inkubovány 80 min se vzrůstající koncentrací AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,0001 - 10 μg.ml<sup>-1</sup>) v médiu nebo s konstantní koncentrací 1 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> po dobu 10 min - 20 hod. Pro analýzu dynamiky inkorporace AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> do buněk byla použita průtoková cytometrie (BD FACSCanto™ II, Becton Dickinson). Buňky byly resuspendovány v PBS, promyty (500×g, 5 min) a analyzovány na cytometru. Nejprve byla diskriminována populace buněk na základě jejich velikosti na grafu FSC vs. SSC, populace mrtvých buněk byla od živých odlišena barvením propidium jodidem (1,7 μg.ml<sup>-1</sup>, λ<sub>ex</sub>=488 nm), jehož fluorescence byla detekována v rozsahu 585/42 nm. Intenzita fluorescence živých buněk s absorbovaným AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> byla měřena v kanálu 710/20 nm (λ<sub>ex</sub>=633 nm).

### 3.14.1.2 Konfokální mikroskopie

Pro monitorování distribuce  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  v CAD5 buňkách byla využita konfokální mikroskopie (Leica TCS-SP5, Leica Microsystems). Buňky rostoucí na skleněných podložních sklíčkách (tloušťka 0,17 mm, Ø 13 mm) byly inkubovány s  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  po dobu 80 min při  $37^\circ\text{C}$ , fixovány 30 min v 4% (w/v) paraformaldehydu, opláchnuty  $2\times$  v PBS a blokovány 5 min v 0,1% (v/v) glycinu. Pro vizualizaci membránově vázaného  $\text{PrP}^{\text{C}}$  byly buňky barveny protilátkou D18 v 5% (v/v) kozím séru 1 hod. Poté byly opláchnuty PBS a blokovány 30 min 5% kozím sérem. Buňky byly následně inkubovány 35 min se sekundární protilátkou proti myši IgG značenou Cy3, promyty v PBS a  $\text{H}_2\text{O}$ . Sklíčka s buňkami byla montována do montovacího média s 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI, Fluoroshield™, cat. no. F6057, Sigma Aldrich).

### 3.14.1.3 Detekce cytotoxicity $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$

Životaschopnost buněk kultivovaných 20 hod v přítomnosti  $1 - 50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  byla sledována komerčním kolorimetrickým kitem Cell Counting kit-8 (CCK-8, Dojingo). Kit detekuje aktivitu buněčných dehydrogenáz, která je přímo úměrná počtu živých buněk. Ke  $100 \mu\text{l}$  media s buňkami bylo přidáno  $10 \mu\text{l}$  CCK-8 roztoku, směs byla inkubována 2 hod při  $37^\circ\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . Absorbance barevného produktu (formazan) byla detekována při 450/8 nm na spektrofluorometru Perkin Elmer 1420 Victor3 (model 1420-012).  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  se CCK-8 neinterferoval.

### 3.14.2 PDI RML prionů sorbovaných na plastovém povrchu

Byla připravena desítková ředění 0,5% (w/v) RML v neinfekčním 0,5% CD1 mozkovém homogenátu. Alikvoty ( $50 \mu\text{l}$ ) těchto ředění byly sorbovány na dno 96-jamkové mikrotitrační destičky po dobu 10 hod při  $4^\circ\text{C}$ . Jamky byly promyty  $3\times 200 \mu\text{l}$  sterilního PBS a pro účely PDI naplněny  $100 \mu\text{l}$  PBS nebo  $100 \mu\text{l}$   $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  v PBS a exponovány v DAL5 90 min. Kontrolní destička byla ponechána ve tmě. Po PDI byly jamky znovu promyty  $3\times 200 \mu\text{l}$  PBS a do jamek bylo vyseto 5000 CAD5 buněk, které jsou senzitivní k prionovému onemocnění. Po dosažení konfluence byly buňky přeneseny na 24-jamkovou kultivační destičku a při konfluenci pasážovány v poměru 1:5. Experiment byl proveden ve dvou biologických replikátech a každý z nich v duplikátu. Úroveň rozšíření prionové infekce byla detekována pomocí buněčného blotu kultury ve 3. pasáži. Buňky

kultivované na plastových sklíčkách (Ø 12 mm) byly obtisknuty na 0,45 µm nitrocelulosovou membránu (Bio-Rad) navlhčenou v lyzačním roztoku (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% (w/v) deoxycholát sodný, 0,5% (v/v) Triton X-100, pH 7,5). Membrána byla inkubována s proteinázou K (90 min, 7 µg.ml<sup>-1</sup>), která byla následně inhibována 2 mM PMSF v PBS. Sorbované Proteiny sorbované na membráně byly denaturovány 3 M guanidin thiokyanátem, promyty H<sub>2</sub>O a membrána byla blokována v 5% TBSTM. PrPres byl vizualizován směsí protilátek AH6 a 6D11 analogicky postupem uvedeným v kapitole 3.11.1.

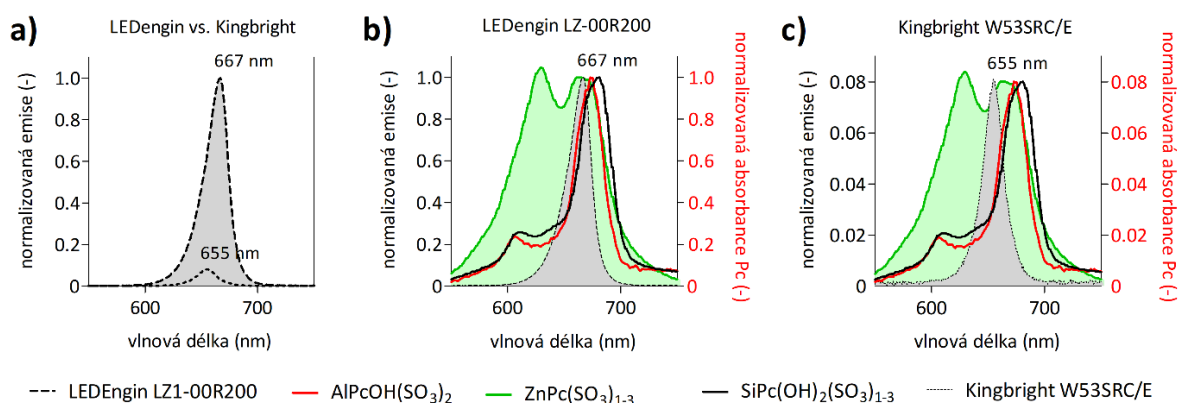
### 3.15 Statistická analýza

Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) dat z alespoň dvou opakování experimentu. Počet opakování experimentu je vždy uveden. Signifikance rozdílů byla hodnocena pomocí nepárového dvouvýběrového t-testu. Signifikance byla určena podle p-hodnoty, pro níž  $p < 0,001$  značí vysokou signifikanci (\*\*\*) . Statistika bylo provedena v softwaru GraphPad Prism 5.03.

## 4 Výsledky

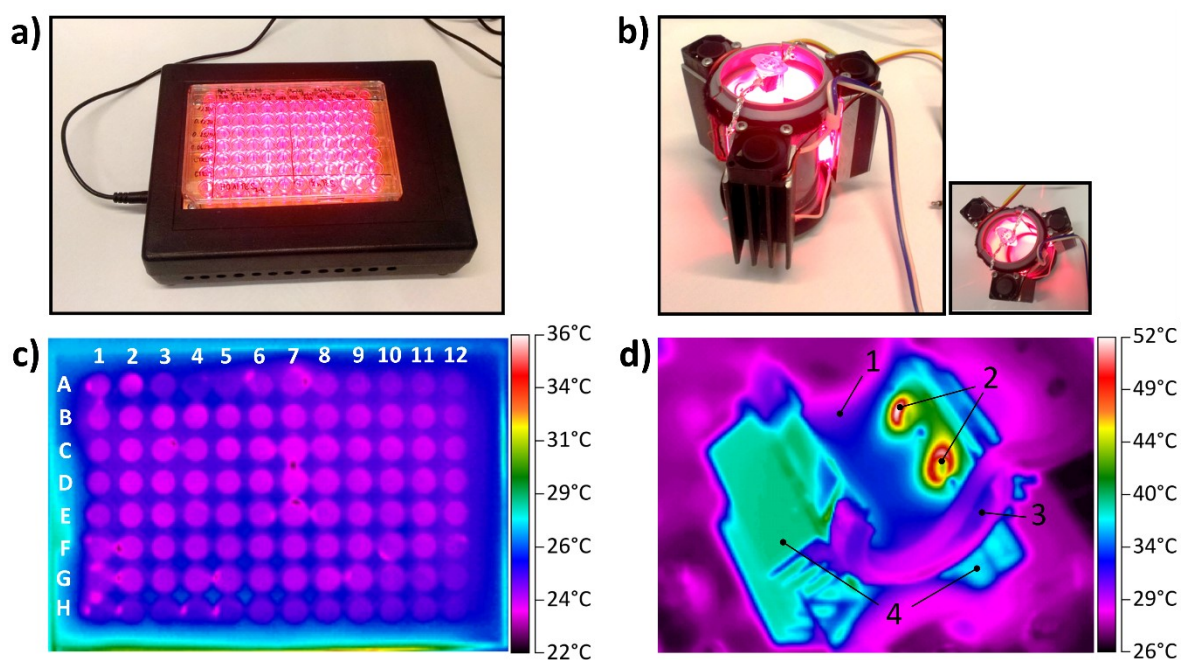
### 4.1 Charakterizace zdrojů a diod

Diody s emisí oblastí nad 650 nm byly vybrány s ohledem na absorpční spektra Pc a kvůli hlubší penetraci takového světla do tkáně (Jawad, et al. 2011; Plaetzer, et al. 2009), kterou byl v našem případě mozkový homogenát. Emisní maxima diod byla detekována při 667 nm pro LZ1-00R200 v TLS a 655 nm pro W53SRC/E v DALŠ, přičemž dioda LZ1-00R200 dosahovala 12,4× vyšších hodnot emise vůči diodě W53SRC/E (Obr. 4a). V oblasti 600 až 700 nm se absorpční spektra  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ ,  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  i  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  překrývala s emisními spektry obou typů diod (Obr. 4b).



**Obrázek 4.** Překryv emisních spekter diod a absorpčních spekter Pc. (a) Porovnání emisních spekter diod LEDEngin LZ1-00R200 (v TLS) a Kingbright W53SRC/E (v DALŠ). Překryv absorpčních spekter derivátů Pc s emisními spektry diod (b) LEDEngin LZ1-00R200 a (c) Kingbright W53SRC/E diodou. Absorpční spektra Pc byla normalizována k hodnotě emisního maxima diod.

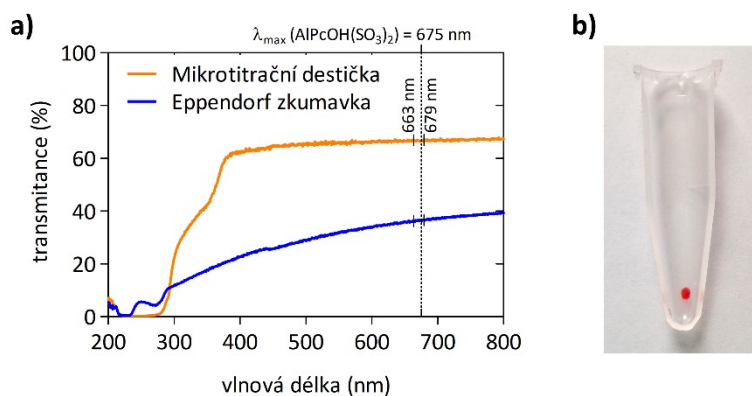
Zdroje TLS a DALŠ (Obr. 5a, b) byly testovány na ustálení konstantní pracovní teploty, které bylo dosaženo po 60 min od zapnutí. Teplota kapaliny v jamkách mikrotitrační destičky v DALŠ se po 90 min osvitu pohybovala v rozsahu 23,8 – 25,2°C (Obr. 5c). Teplota kapaliny v Eppendorf mikrozkuhavce v TLS po 5 min osvitu stoupla na 38°C, i přes použití chladičů zabudovaných v TLS. Povrchová teplota diod při provozu TLS byla chladiči redukována na teplotu 51.8°C. Teplota chladičů se při provozu TLS zvýšila na ~ 41°C (Obr. 5d).



**Obrázek 5.** Fotografie zdrojů (a) DALS a (b) TLS. Distribuce teploty po 60 min provozu na (a) DALS (pohled shora) a (d) TLS (boční pohled). 1 – horní část TLS, 2 – diody, 3 – spodní část TLS, 4 – chladiče.

#### 4.2 Charakterizace zkumavek pro PDI experimenty

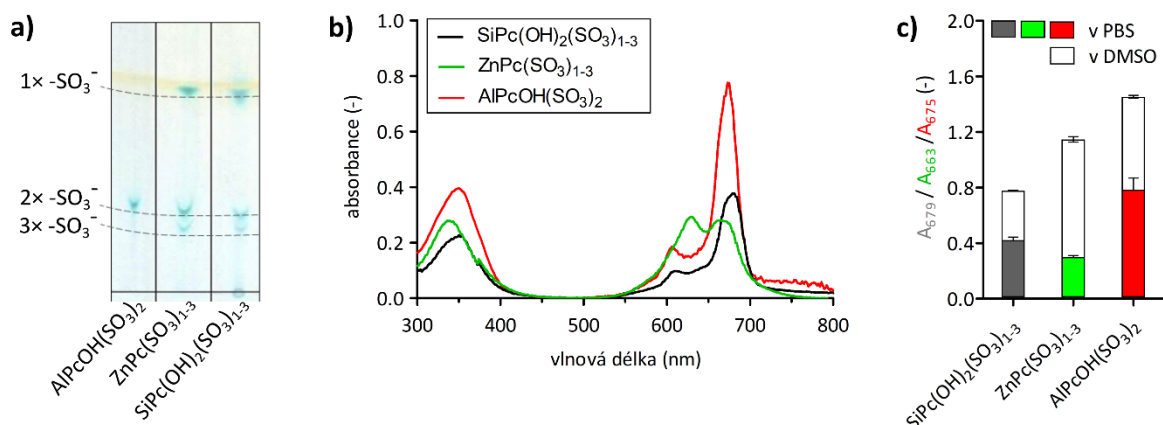
Fotoaktivace senzitizerů je závislá na dodané světelné energii, proto byla měřena intenzita světla procházející plastovým materiálem používaným pro PDI experimenty. Polystyrenové dno mikrotitrační destičky propustilo 67 % dopadajícího světla při vlnové délce absorpčního maxima  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ , zatímco kónická část polypropylenové Eppendorf mikrozkušavky užívaná pro TLS propustila 36 % dopadajícího světla (Obr. 6a, b). Při vlnové délce absorpčního maxima  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  663 nm a  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  679 nm byla transmitance materiálů analogická. Transmitance dna destičky činila 67 % dopadajícího světla a skrze stěnu mikrozkušavky prošlo 36 % (Obr. 6a)



**Obrázek 6.** (a) Transmittance dna polystyrenového mikrotitrační destičky a kónické stěny polypropylenové Eppendorf mikrozkuřavky použitých pro experimenty. Vyznačeny jsou maxima vlnových délek derivátů Pc. (b) Podélný řez Eppendorf mikrozkuřavkou (1,5 ml) s vyznačeným bodem, ve kterém byla měřena transmittance.

#### 4.3 Charakterizace ftalocyaninů

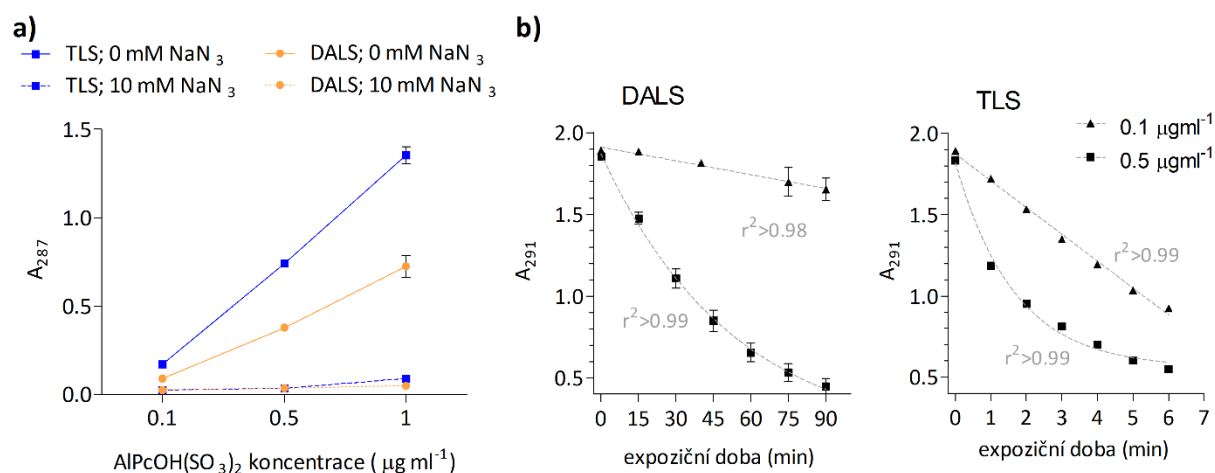
Deriváty Pc vybrané pro tuto studii se lišily centrálním atomem kovu (Si, Al, Zn), počtem OH ligandů vázaných na kov (2, 1, 0) a úrovní sulfonace na periferii molekuly. Tenkostěnná chromatografie na silikagelu potvrdila přítomnost 2 sulfonových skupin na  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a 1-3 sulfonových skupin u  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  a  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  (Obr. 7a). Absorpční maximum monomerní formy  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  bylo naměřeno při 679 nm, maximum  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  při 675 nm a maximum  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  při 663 nm.  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  vykazoval vysokou absorbanci při 630 nm, která odpovídá dimerní formě (Brewis, et al. 2000). U  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  byl detekován pík s maximem při vlnové délce 615 nm, který odpovídá vibrační stavům molekuly (Obr. 7b) (Krichevsky, et al. 2017). Pc mají ve vodném roztoku tendence k tvorbě agregátů, jejichž přítomnost lze monitorovat spektrofotometricky jako pokles absorbance monomerní formy (Kuznetsova, et al. 2012). Pro posouzení míry agregace Pc v PBS byly deriváty rozpuštěny v DMSO, kde se nachází v monomerní formě. Absorbance monomerní formy v DMSO byla  $1,8\times$  vyšší u  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$ ,  $1,9\times$  u  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a  $3,8\times$  u  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  v porovnání s absorbancí v PBS (Obr. 7c).



**Obrázek 7.** Charakterizace derivátů Pc. (a) Chromatografie derivátů Pc na silikagelu podle stupně sulfonace. (b) Absorpční spektra derivátů Pc o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . (c) Rozdíl absorbance monomerní formy derivátů Pc v DMSO a PBS. Rozdíl absorbancí indikuje míru agregace ( $n=2$ ).

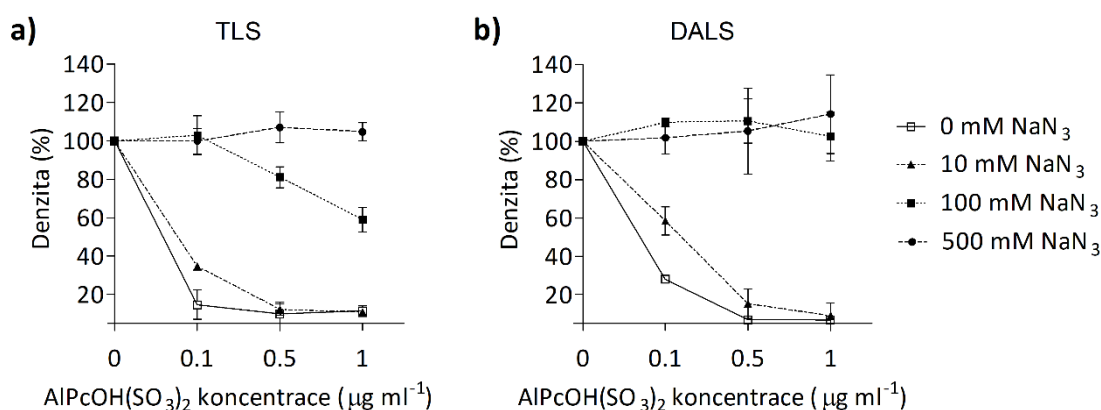
#### 4.4 Detekce ROS

Produkce a oxidační vlastnosti  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  při fotoaktivaci 0,1; 0,5 a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v jodidovém činidle byly na obou zdrojích zcela inhibovány NaN<sub>3</sub> o koncentraci 10 mM (Obr. 8a). Přítomnost a oxidační vlastnosti  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  byly potvrzeny reakcí s KM, která byla doprovázena poklesem absorbance KM při 291 nm (Obr. 8b).



**Obrázek 8.** Potvrzení produkce a oxidačních vlastností  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  produkovaného fotoaktivací AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. (a) Zhášení  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  pomocí NaN<sub>3</sub> porovnaný s produkcí  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  bez inhibitoru v DALSi a TLS ( $n=2$ ). (b) Degradace KM působením  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ .

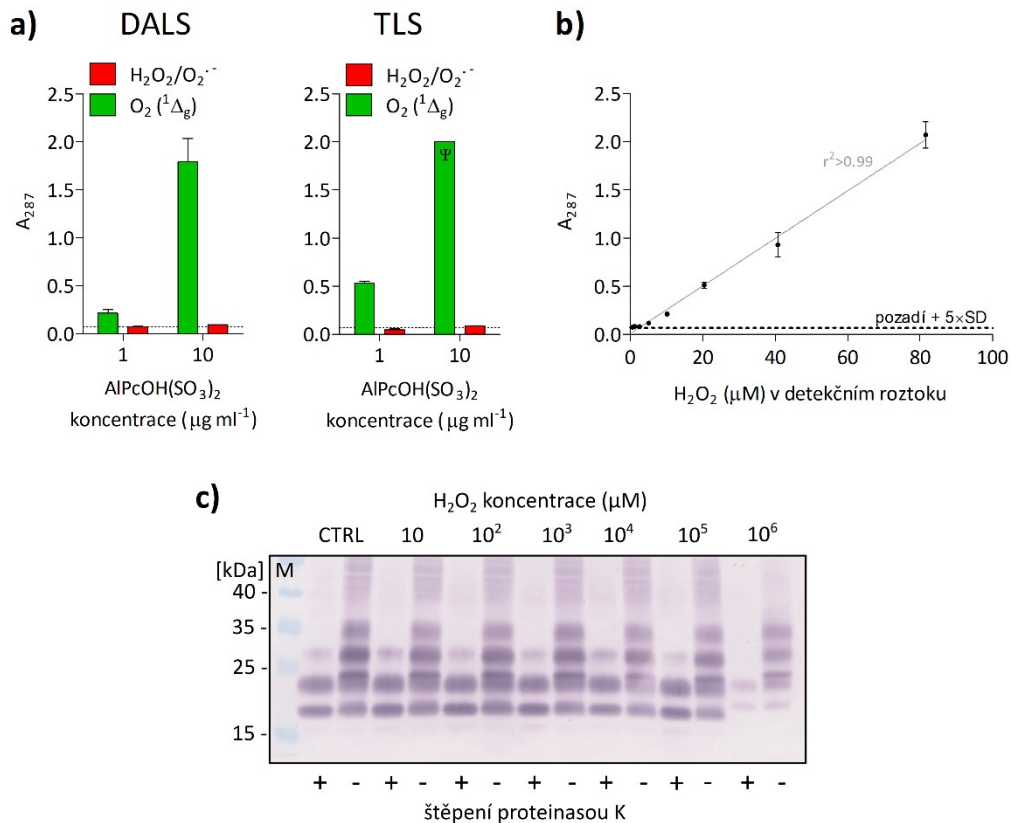
V suspenzi 1% RML homogenátu byl sledován vliv  $\text{NaN}_3$  na zhášení  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  jako pokles účinnosti fotodynamické eliminace signálu PrPres na western blotu (signál PrPres na western blotu reprezentuje  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ , na nějž byla aplikována fotodynamická eliminace). Koncentrace  $\text{NaN}_3$  nutná k zastavení poklesu signálu PrPres byla závislá na koncentraci  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a na typu použitého zdroje. Při fotoaktivaci  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  v TLS (5 min) byla eliminace signálu PrPres zastavena při použití 100 mM  $\text{NaN}_3$ . Při koncentraci 0,5 nebo  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  bylo stejného efektu dosaženo použitím 500 mM koncentraci  $\text{NaN}_3$  (Obr. 9a). Pokles signálu PrPres v DALIS (90 min) byl zcela utlumen pomocí 100 mM  $\text{NaN}_3$  u všech testovaných koncentrací  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  (Obr. 9b). 10 mM  $\text{NaN}_3$  vedl jen k částečnému potlačení účinnosti fotodynamické eliminace PrPres signálu na obou zdrojích (Obr. 9a, b).



**Obrázek 9.** Inhibice fotodynamické eliminace signálu PrPres pomocí  $\text{NaN}_3$ . Fotodynamická eliminace byla provedena pro rostoucí koncentrace  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a  $\text{NaN}_3$  po dobu (a) 5 min v TLS a (b) 90 min v DALIS. Denzita signálu PrPres na membráně je vyjádřena vůči neovlivněnému RML mozkovému homogenitu (= 100 %,  $n=2$ ).

Při detekci  $\text{O}_2\cdot^-$  bylo využito jeho schopnosti dismutovat v kyselém prostředí na  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který byl detekován modifikovanou jodidovou metodou. Do roztoku Pc byl po expozici světlu přidán roztok KI až po vyprchání  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  reaguje s přidáním KI za vzniku měřitelného  $\text{I}_3^-$ . Hodnoty  $\text{I}_3^-$  detekované pro  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tedy i  $\text{O}_2\cdot^-$ , nepřekročily signál pozadí použité metody a to ani při koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  ( $10\times$  vyšší v porovnání se

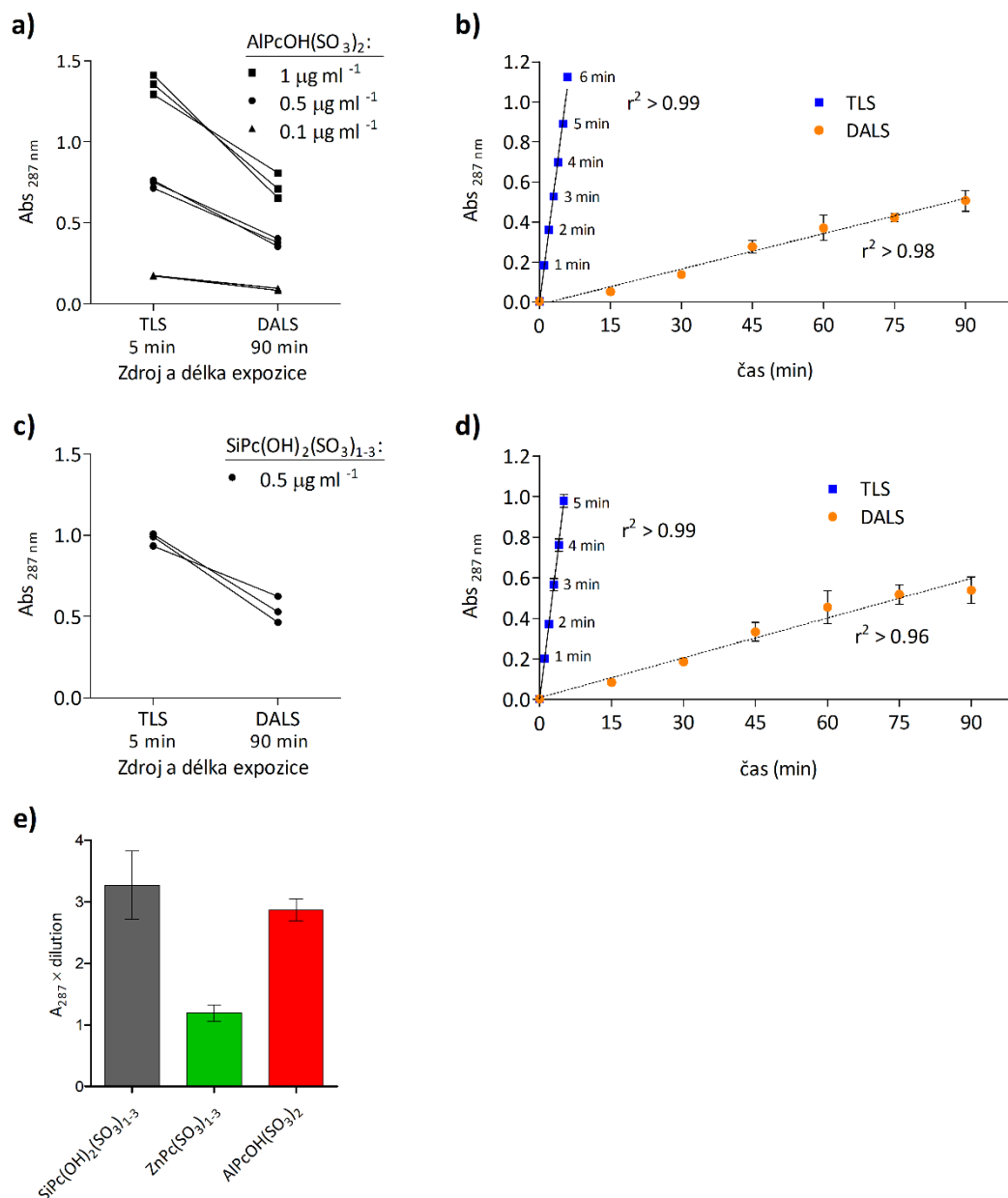
standardním PDI) u obou zdrojů (Obr. 10a).  $H_2O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$  tedy nejsou Pc produkovány nebo je jejich koncentrace pod detekčním limitem metody ( $5,1 \mu M H_2O_2$ , Obr. 10b) a vůči produkci  $O_2(^1\Delta_g)$  zanedbatelná (Obr. 10a). Navíc na signál PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres na western blotu mají zjevný vliv až koncentrace  $H_2O_2 \geq 1 M$  (= 3,4 %  $H_2O_2$ ) (Obr. 10c). Případná produkce  $H_2O_2$  tak neovlivňuje PDI prionů zprostředkovanou  $O_2(^1\Delta_g)$ . Účinky  $O_2^{\bullet-}$  na PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> nebyly zatím experimentálně provedeny.



**Obrázek 10.** Produkce dalších ROS fotoaktivací AIPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a jejich vliv na signál PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup>. (a) Srovnání produkce  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  vůči produkci  $O_2(^1\Delta_g)$  ( $n=3$ ). Hodnota pozadí je vyznačena tečkovanou čarou.  $\Psi$  značí hodnotu přesahující měřitelnou škálu. (b) Detekční limit metody byl  $5,1 \mu M H_2O_2$  ( $n=2$ ) a byl určen jako nejnižší koncentrace  $H_2O_2$  detekovaná nad průměrem hodnot pozadí +  $5 \times SD$ . (c) Vliv vzrůstající koncentrace  $H_2O_2$  na signál PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres. První snížení signálu bylo detekováno při koncentraci  $10^6 \mu M$  (= 3,4 %)  $H_2O_2$ . CTRL, mozkový homogenát bez  $H_2O_2$ ; M, standard molekulových hmotností.

#### 4.5 Fotoprodukce singletního kyslíku $O_2(^1\Delta_g)$

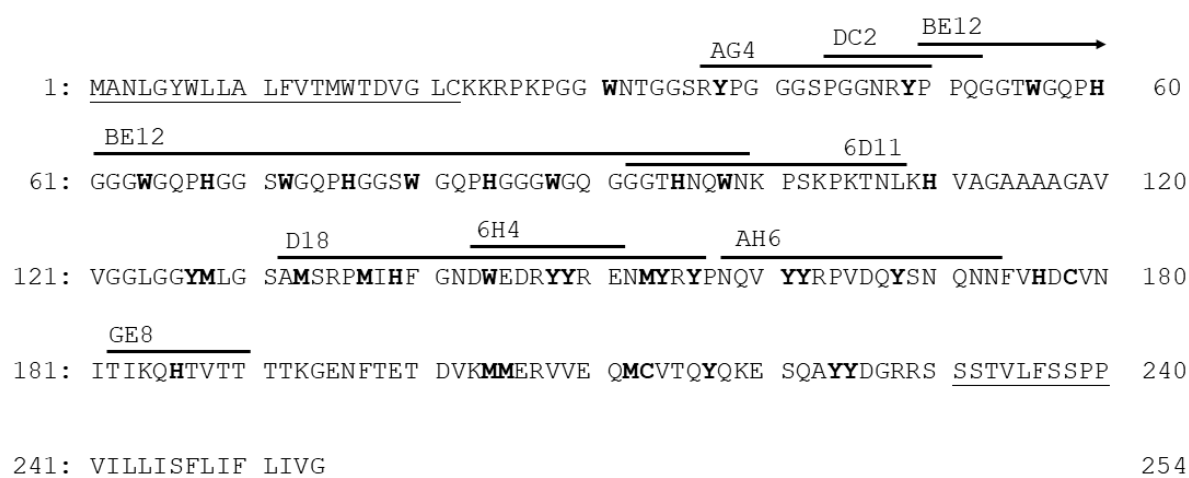
U všech Pc byla ověřena schopnost produkovat  $O_2(^1\Delta_g)$  na obou zdrojích. K popisu kinetiky produkce  $O_2(^1\Delta_g)$  byly použity dva deriváty ftalocyaninu, abychom prokázali, že sledované trendy nejsou vázané na specifický derivát. TLS generoval fotoaktivací Pc po 5 min osvitu větší množství  $O_2(^1\Delta_g)$  než DALŠ po 90 min. 0,1; 0,5 a 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  generoval v TLS 1,88 $\times$  vyšší množství  $O_2(^1\Delta_g)$  oproti DALŠ (Obr. 11a). U  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  byla naměřena 1,81 $\times$  vyšší produkce  $O_2(^1\Delta_g)$  v TLS než v DALŠ (Obr. 11c). Kinetika produkce  $O_2(^1\Delta_g)$  v čase měla lineární průběh pro oba deriváty Pc na obou zdrojích. Hodnota směrnice přímky pro  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  byla 0,183 při expozici v TLS ( $r^2 > 0,99$ ) a 0,006 při expozici v DALŠ ( $r^2 > 0,98$ ). V daném čase se pomocí TLS produkuje 31 $\times$  vyšší množství  $O_2(^1\Delta_g)$  než pomocí DALŠ (Obr. 11b). Pro  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  měla směrnice přímky hodnoty 0,193 ( $r^2 > 0,99$ ) při expozici v TLS a 0,007 při expozici v DALŠ ( $r^2 > 0,96$ ). TLS je tedy v produkci  $O_2(^1\Delta_g)$  fotoaktivací  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  28 $\times$  účinnější než DALŠ (Obr. 11d). Množství vyprodukovaného  $O_2(^1\Delta_g)$  jednotlivými deriváty Pc v DALŠ klesalo v pořadí  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3} > \text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2 \gg \text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  a byly v poměru 2,7:2,4:1 po 90 min v DALŠ (Obr. 8e).



**Obrázek 11.** Produkce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  fotoaktivací Pc v DALS a TLS sledovaná jodidovou metodou při (a) rostoucí koncentraci  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a definované délce osvitů, (b) rostoucí expoziční době  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  o koncentraci  $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ( $n=3$ ), (c) koncentraci  $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$   $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  a dané délce osvitů a (d) rostoucí expoziční dobu  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  o koncentraci  $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ( $n=3$ ). (e) Porovnání produkce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  deriváty Pc v jodidovém činidle při jejich fotosenzitizaci v DALS po dobu 90 min ( $n=3$ ).

#### 4.6 Modifikace epitopů v molekule PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> působením O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>)

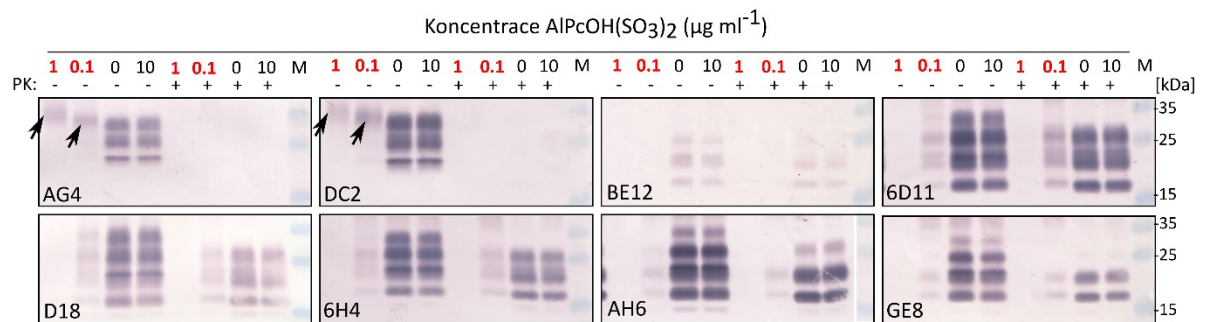
O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) byl identifikován jako jediný ROS generovaný při fotoaktivaci ftalocyaninů. Za primární cíl O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) jsou považovány postranní řetězce aminokyselin tyrosin (Y), histidin (H), tryptofan (W), methionin (M) a cystein (C) (Davies 2016). Aminokyselinová sekvence prionového proteinu (UniProtKB-P04925) odhalila přítomnost těchto aminokyselin v cílových epitopech použitých protilátek AG4, DC2, BE12, 6D11, D18, 6H4, AH6, GE8. Tyto epitopy jsou rozmístěny po celé délce molekuly PrP (Obr. 12).



**Obrázek 12.** Sekvence aminokyselin v myším prionovém proteinu, převzato z (UniProtKB-P04925). Vyznačeny jsou cílové epitopy pro protilátky AG4 (Arg37-Pro50), DC2 (Pro44-Gly52), BE12 (Gly50-Gln99), 6D11 (Gly93-Met109), D18 (Ser132-Arg156), 6H4 (Asp144-Glu152), AH6 (Asn159-Asn174), GE8 (Thr183-Thr191). Tučně vtištěná písmena označují aminokyseliny oxidovatelné O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). Podtržená písmena značí signální sekvence.

AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o koncentracích 1 μg.ml<sup>-1</sup> a 0,1 μg.ml<sup>-1</sup> byl použit pro fotodynamickou modifikaci PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> v RML homogenátu a následnou detekci PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres protilátkami. Žádná z protilátek BE12, 6D11, D18, 6H4, AH6, GE8 mířených proti centrální a C-terminální části PrP molekuly nedetkovala signál PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres po PDI při koncentraci 1 μg.ml<sup>-1</sup> Pc (Obr. 13). Za stejných podmínek protilátky DC2 a AG4, mířené proti N-terminálnímu konci PrP molekuly, detkovaly signál pouze diglykosylované formy PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> (Obr. 13). Intenzita tohoto signálu tvořila ~10 % původního signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup>

v 1% RML homogenátu (Obr. 16). Tato reziduální diglykosylovaná forma PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> vykazovala mírně sníženou elektroforetickou mobilitou. PrPres a jeho případnou reziduální diglykosylovanou formu nelze protilátkami DC2 a AG4 detekovat. Peptidový úsek s epitopy těchto protilátek byl rozštěpen proteinázou K. Přítomnost Pc v RML homogenátu ponechaném ve tmě neměla vliv na intenzitu signálu ani elektroforetickou mobilitu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres (Obr. 13).



**Obrázek 13.** Fotodynamická eliminace způsobuje ztrátu epitopů na PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres. Použitá protilátka je uvedena v levém dolním rohu příslušné membrány. Červené koncentrace Pc = vzorky byly exponovány světlu; černá barva koncentrací Pc = vzorky ponechané ve tmě. Černé šipky u membrán barvených protilátkami AG4 a DC2 označují signál diglykosylovaného PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup>, který ostatní protilátky nedetekují. PK+/-, proteinázou K štěpeno/neštěpeno; M, standard molekulových hmotností.

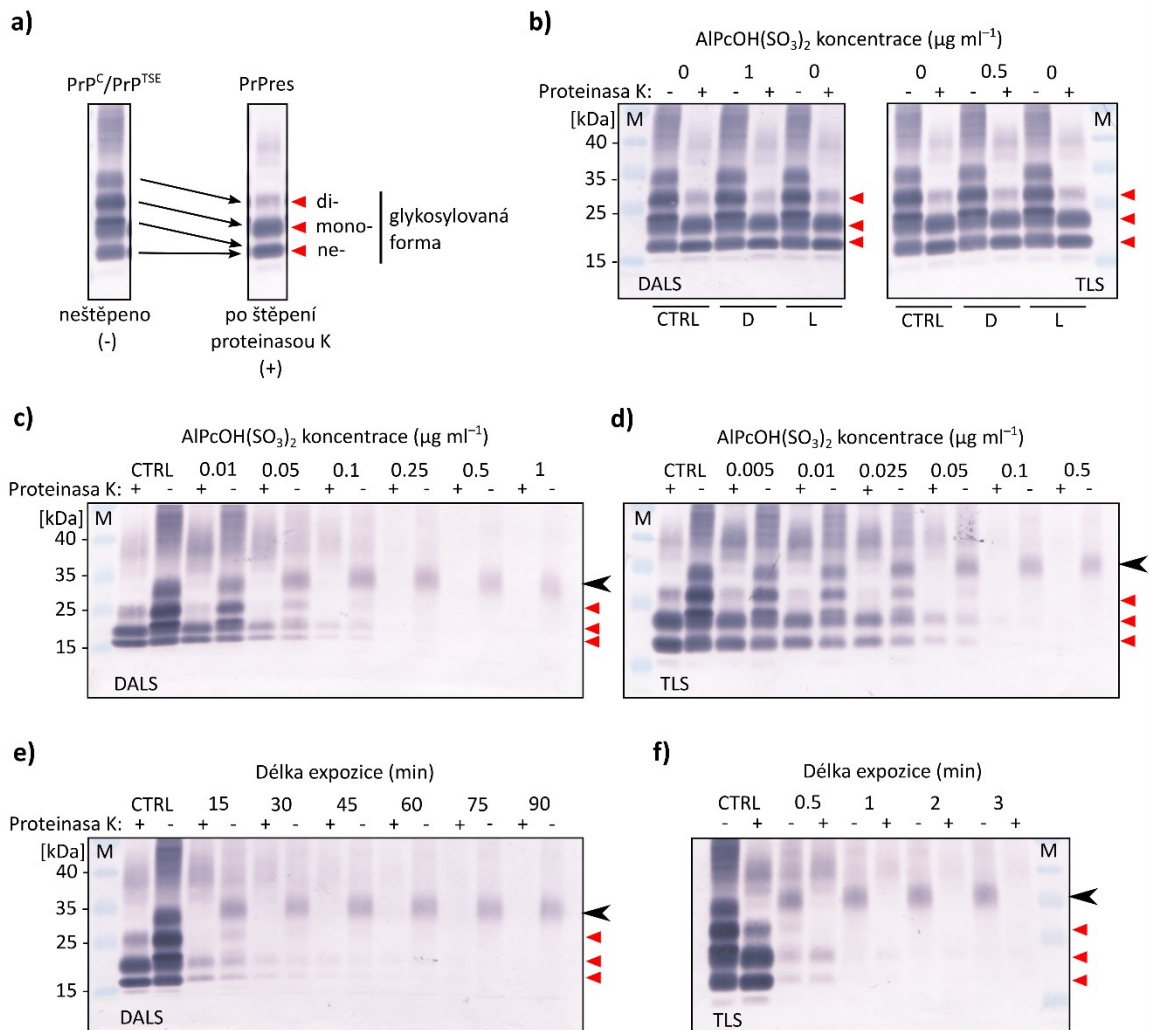
#### 4.7 Průběh fotodynamické eliminace signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres

Účinnost fotodynamické eliminace signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres vzrůstala s koncentrací AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Obr. 14c, d). Denzitometrická analýza závislosti úbytku PrPres signálu na membráně western blotu měla průběh klesající exponenciální křivky v DALS i TLS (Obr. 15a). Z rovnice popisující tyto křivky byly zjištěny rychlostní konstanty (*k*) reakcí. Porovnáním konstant bylo zjištěno, že k úbytek signálu PrPres v TLS (*k* ~ 40,82) docházelo 1,7× účinněji než v DALS (*k* ~ 24,79; Tab. 1). V TLS bylo k redukci 50% signálu původního signálu PrPres v 1% RML homogenátu zapotřebí ~ 0,017 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a v DALS ~ 0,028 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. K redukci PrPres signálu pod detekční limit western blotu došlo při 0,1 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v TLS a 0,25 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v DALS. Detekční limit western blotu v našich experimentech odpovídá signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres v 0,015% (w/v) RML homogenátu.

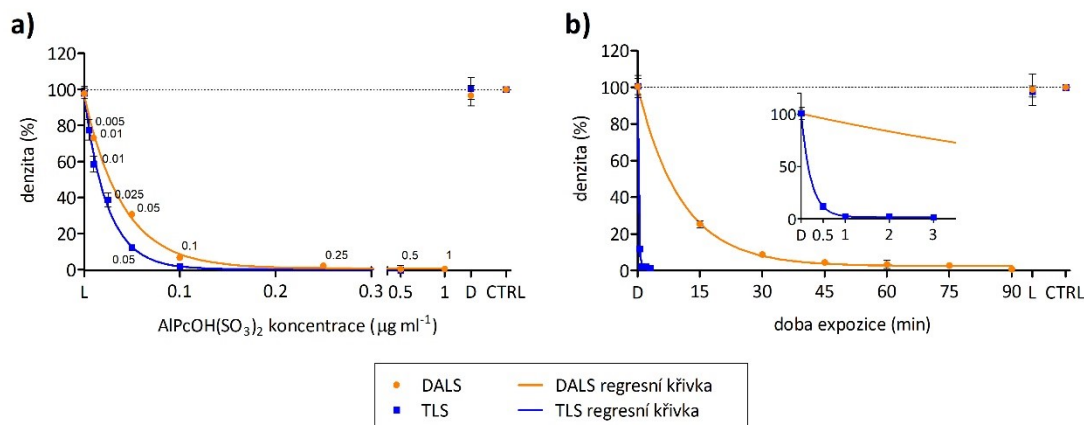
Prodloužení délky osvitu při konstantní koncentraci  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  vedlo k postupnému snižování signálu  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  a  $\text{PrPres}$  (Obr. 14e, f) na membráně. Kinetika redukce  $\text{PrPres}$  signálu tvořila klesající exponenciální křivku pro oba zdroje (Obr. 15b). Z rovnice křivky průběhu reakce plyne, že ke snížení signálu  $\text{PrPres}$  na polovinu počáteční hodnoty bylo při expozici v TLS dosaženo za 9,2 sekund, zatímco v případě DALŠ za 7,3 min. Konstanta  $k$  popisující rychlost redukce signálu  $\text{PrPres}$  byla  $47,6\times$  vyšší pro fotodynamickou eliminaci v TLS než v DALŠ (Tab. 1). K eliminaci signálu  $\text{PrPres}$  pod detekční limit western blotu došlo po 3 min osvitů v TLS a po 90 min v DALŠ při koncentraci  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  (Obr. 14e, f).

K fotodynamické eliminaci signálu  $\text{PrPres}$  pod detekční limit došlo po kratší době expozice a při nižších koncentracích  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  než signálu  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$ . Při použití koncentrace  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2 \geq 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a expozici 90 min v DALŠ nebo  $\geq 2$  min v TLS byl po fotodynamické eliminaci detekován výhradně signál diglykosylované formy  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  (Obr. 16). Tento reziduální signál diglykosylovaného  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  činil  $\sim 10\%$  počátečního signálu  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  v RML homogenátu (Obr. 16; Tab. 1, limita C). Reziduální signál diglykosylované formy  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  se vyznačoval sníženou elektroforetickou mobilitou (Obr. 14c, d, e, f).

Směs RML homogenátu a  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  ponechaná ve tmě a RML homogenát exponovaný světlu bez přítomnosti  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  byly použity jako kontrolní vzorky. Intenzita signálu  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  a  $\text{PrPres}$  v kontrolních vzorcích byla srovnatelná se signálem nalezeným v neovlivněném RML homogenátu. (Obr. 14b; Obr. 16).



**Obrázek 14.** Fotodynamická eliminace signálu  $PrP^C/PrP^{TSE}$  a  $PrPres$  pomocí  $AlPcOH(SO_3)_2$  na western blotu. (a) Profil signálu  $PrP^C/PrP^{TSE}$  a  $PrPres$  v RML mozkovém homogenátu. (b) Kontrolní vzorky. Signál  $PrP^C/PrP^{TSE}$  a  $PrPres$  nebyl při expozici světlu bez Pc (L; 90 min pro DAL5 a 5 min pro TLS) ani přítomností  $AlPcOH(SO_3)_2$  ve tmě (D) ovlivněn. Závislost redukce signálu  $PrP^C/PrP^{TSE}$  a  $PrPres$  na rostoucí koncentraci  $AlPcOH(SO_3)_2$  v (c) DAL5 (90 min) nebo (d) TLS (5 min). Časová závislost redukce signálu  $PrP^C/PrP^{TSE}$  a  $PrPres$  při koncentraci  $0,5 \mu g \cdot ml^{-1}$   $AlPcOH(SO_3)_2$  pro (e) DAL5 a (f) TLS. Membrány byly barveny směsí protilátek AH6 a DC2. Černá šipka značí signál diglykosylovaného  $PrP^C/PrP^{TSE}$ . Červené šipky značí signál di-, mono- a neglykosylovaného  $PrPres$ . CTRL, neovlivněný mozkový homogenát; PK+/-, štěpeno/neštěpeno proteinázou K; M, standard molekulových hmotností.



**Obrázek 15.** Densitometrická analýza fotodynamické eliminaci signálu PrPres na membráně western blotu při (a) rostoucí koncentraci  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a délce osvitu 90 min v DALS a 5 min v TLS ( $n=3$ ), (b) vzrůstající délce světelné expozice a koncentraci  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  ( $n=3$ ). Vložený obrázek v (b) ukazuje zvětšenou osu x průběhu prvních 3 min eliminace signálu PrPres v TLS a DALS. Klesající posloupnost bodů byla interpolována exponenciální funkcí. Hodnota signálu PrPres (CTRL) neovlivněného RML homogenátu je považována za 100 %. Signál PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres nebyl při expozici světlu bez Pc (L; 90 min pro DALS a 5 min pro TLS) ani přítomnosti  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  ve tmě (D) ovlivněn. Signál pozadí membrány byl odečten od každé hodnocené oblasti.

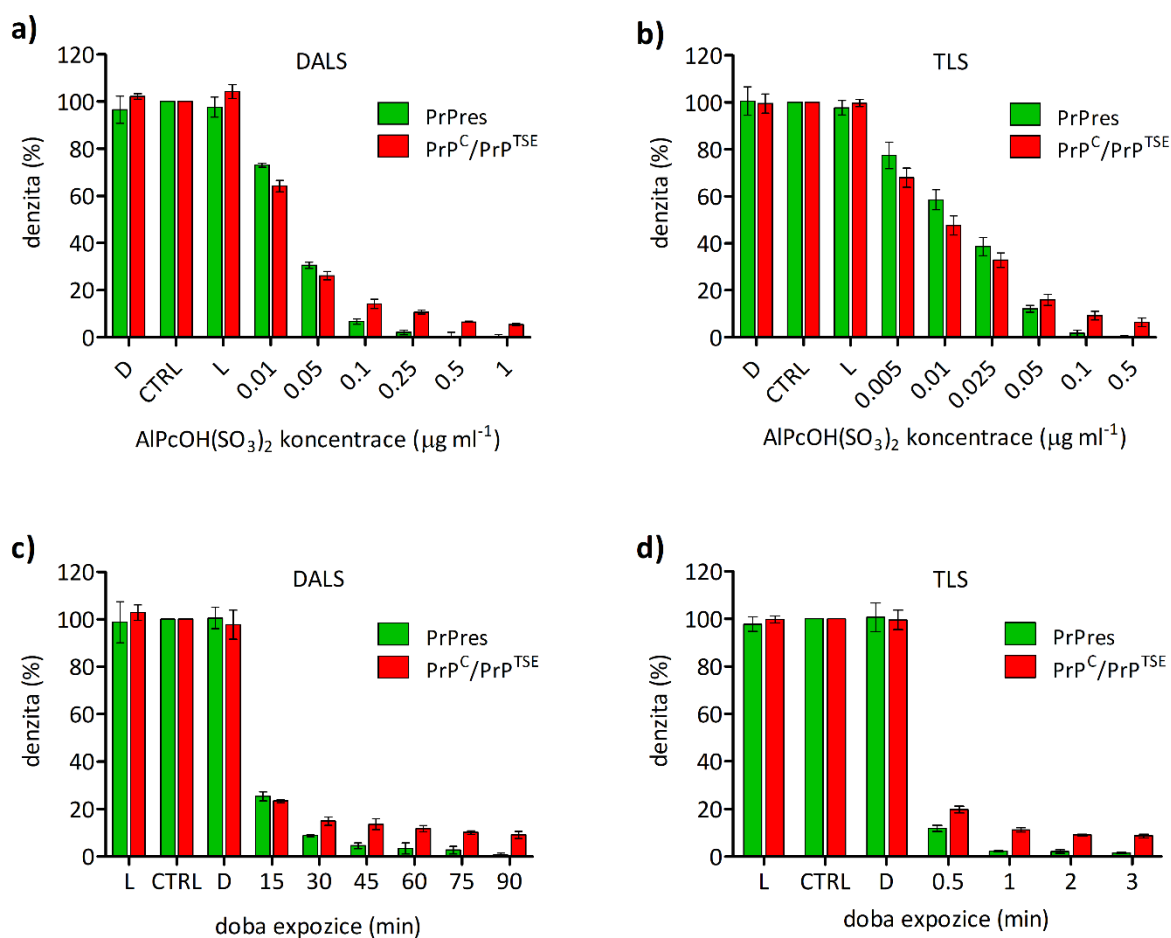
**Tabulka 1.** Parametry popisující křivku fotodynamické eliminace signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres při časové a koncentrační závislosti.

Koncentrační závislost	PrPres				PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>TSE</sup>			
	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	A (%)	C (%)	<i>K</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	A (%)	C (%)
TLS	40,82	>0,99	95,6	0,17	70,25	>0,98	96,4	10,5
DALS	24,79	>0,99	96,4	0,61	41,77	>0,98	101,1	9,6

Časová závislost	PrPres				PrP <sup>C</sup> /PrP <sup>TSE</sup>			
	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	A (%)	C (%)	<i>K</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	A (%)	C (%)
TLS	4,543	>0,99	100,5	1,5	4,246	>0,99	99,6	9,1
DALS	0,0955	>0,99	100,6	2,5	0,1277	>0,99	97,7	11,4

Rovnice křivky:  $Y = Ae^{-kx} + C$ . *k*, konstanta účinnosti/rychlosti eliminace; *Y*, denzita signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> nebo PrPres na western blotu; *X*, délka světelné expozice nebo koncentrace  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ ; *A*, počáteční hodnota signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> nebo PrPres na y-ose; *C*, hodnota, ke které se křivka limitně blíží; *r*<sup>2</sup>, koeficient spolehlivosti.

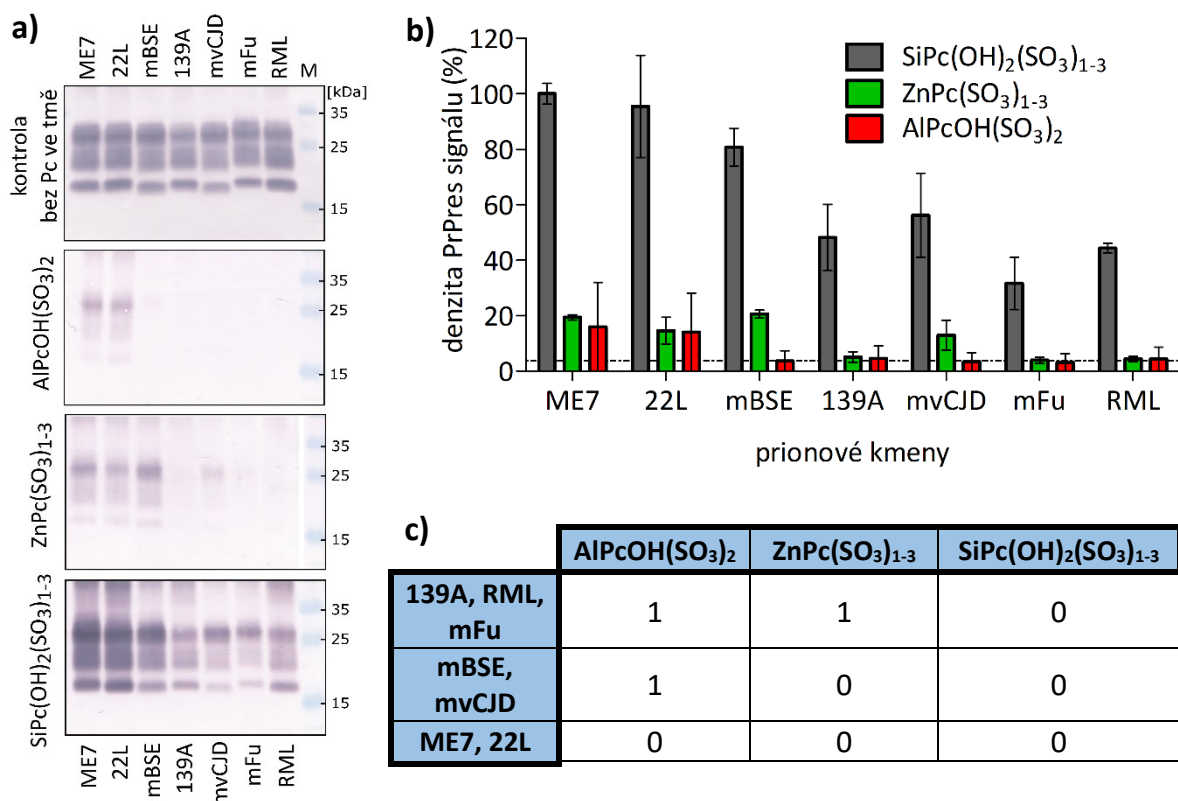


**Obrázek 16.** Rozdíly v průběhu fotodynamické eliminace signálu  $PrP^C/PrP^{TSE}$  a signálu  $PrPres$ . Densita signálu diglykosylované formy  $PrP^C/PrP^{TSE}$  tvoří 10% počátečního signálu  $PrP^C/PrP^{TSE}$  při fotodynamické eliminaci za podmínek, že koncentrace  $AlPcOH(SO_3)_2 \geq 0,5 \mu g \cdot ml^{-1}$  a doba expozice je (a, c) 90 min v DALS nebo (b, d)  $\geq 2$  min v TLS. Densita 100 % reprezentuje hodnotu signálu neovlivněného  $PrP^C/PrP^{TSE}$  nebo  $PrPres$  (CTRL). L, vzorek exponovaný světlu bez Pc; D, vzorek s  $AlPcOH(SO_3)_2$  drženy ve tmě.

#### 4.8 Účinnost derivátů Pc při fotodynamické eliminaci $PrP^{TSE}$ prionových kmenů

Účinnost fotodynamické eliminace  $PrPres$  signálu byla testována na souboru prionových kmenů ME7, 22L, 139A, mBSE, mvCJD, mFu, RML. Současně byla testována účinnost fotodynamické eliminace při použití  $SiPc(OH)_2(SO_3)_{1-3}$ ,  $AlPcOH(SO_3)_2$  nebo  $ZnPc(SO_3)_{1-3}$ . Fotodynamická eliminace pomocí  $AlPcOH(SO_3)_2$  a  $ZnPc(SO_3)_{1-3}$  vedla k redukci signálu  $PrPres$  všech prionových kmenů výrazně účinněji než pomocí  $SiPc(OH)_2(SO_3)_{1-3}$  (Obr. 17a). Použití  $AlPcOH(SO_3)_2$  vedlo k eliminaci  $PrPres$

signálu pod detekční limit western blotu u kmenů mBSE, 139A, mvCJD, mFu a RML. Fotodynamická eliminace pomocí  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_2$  byla méně účinná a vedla k eliminaci signálu PrPres u prionových kmenů 139A, mFu a RML. Za stejných experimentálních podmínek nebyla fotodynamická eliminace pomocí  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  dostatečně účinná pro úplnou eliminaci signálu PrPres všech testovaných prionových kmenů. Kmeny ME7 a 22L byly k fotodynamické eliminaci nejvíce rezistentní a nastavené podmínky ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Pc, 90 min, DALS) nevedly k úplnému odstranění jejich PrPres signálu. Kmeny mBSE a mvCJD vykazovaly vůči fotodynamické eliminaci stejnou senzitivitu. Kmeny 139A, mFu a RML nebyly k fotodynamické inaktivaci rezistentní (Obr. 17b). Lze shrnout, že prionové kmeny se odlišují v rezistenci  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  vůči účinkům fotodynamické eliminace. Podle míry rezistence k účinkům fotodynamické eliminace mohou být prionové kmeny rozděleny do tří skupin (Obr. 17c). Kmen je považován za rezistentní, pokud průměr hodnot signálů PrPres snížený o směrodatnou odchylku překročil hodnotu signálu pozadí membrány.



**Obrázek 17.** Fotodynamická eliminace signálu PrPres prionových kmenů pomocí  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ ,  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  nebo  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  detekovaná (a) na western blotu protilátkou 6D11. (b) Denzitometrická analýza signálu PrPres na membráně western blotu ( $n=3$ ). Tečkovaná čára ukazuje hodnotu signálu pozadí membrány. Hodnota signálu PrPres neovlivněného homogenátu je považována za 100 %. (c) Rozlišení prionových kmenů na základě jejich rezistence vůči účinkům fotodynamické eliminace. „0“ / „1“ značí kmen rezistentní/senzitivní k fotodynamické eliminaci při  $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  Pc a 90 min v DALS.

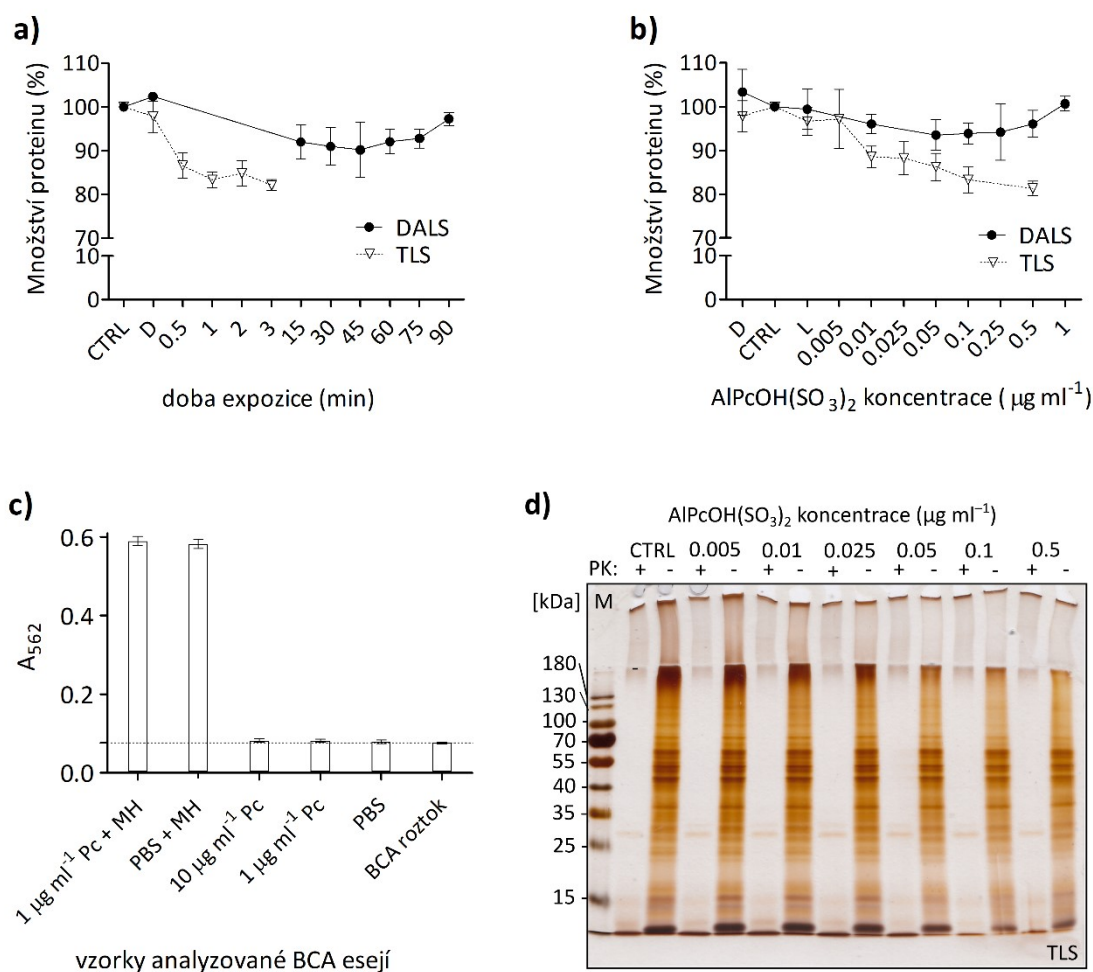
#### 4.9 Účinek PDI pomocí Pc na proteiny

Celkový obsah proteinu byl měřen komerčním kitem Pierce™ BCA Protein Assay, který detekuje aktivitu peptidové vazby při redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ . Koncentrace proteinů v 1% RML homogenátu byla při fotodynamické eliminaci v DALS ovlivněna v nižší míře než v TLS. V případě DALS poklesla koncentrace proteinů maximálně o 10 % počáteční hodnoty při standardních podmínkách: 90 min osvit (Obr. 18a) a maximální koncentraci  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$   $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  (Obr. 18b). Při osvit v TLS (5 min,  $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ ) poklesla koncentrace proteinů v 1% RML homogenátu o maximálně 20% (Obr. 18a, b).

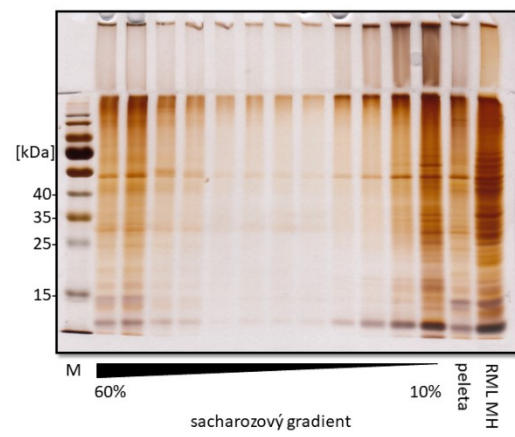
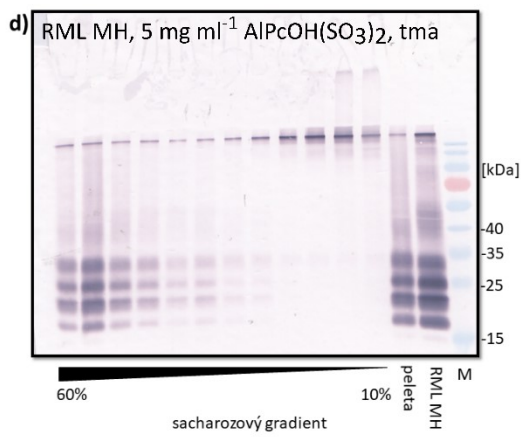
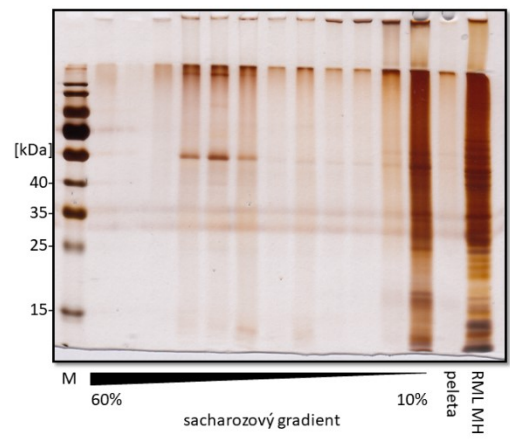
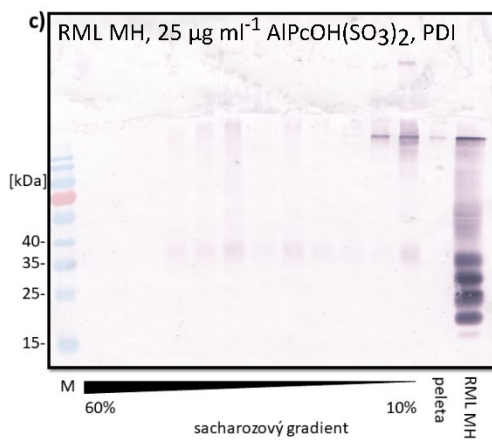
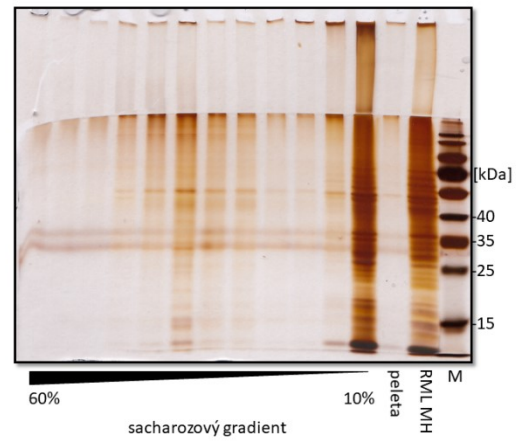
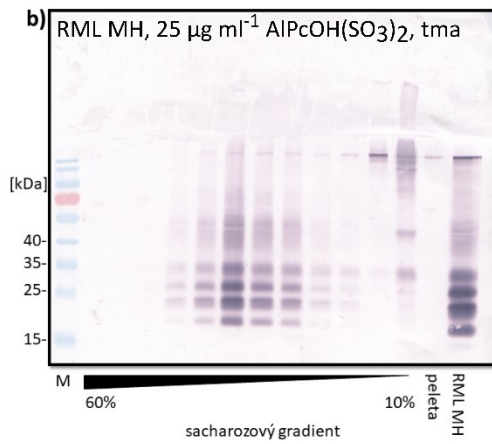
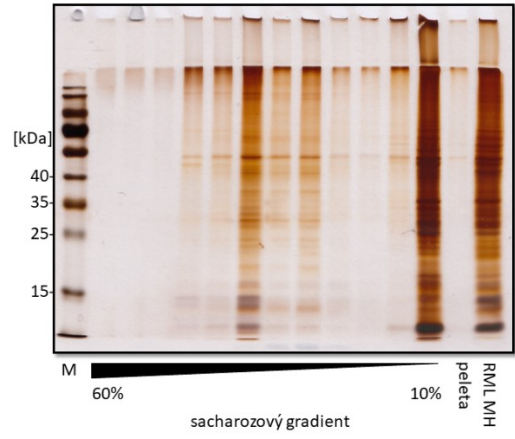
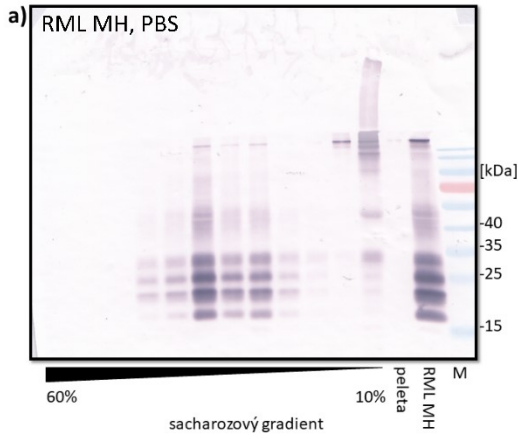
Přítomnost  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  neovlivnila výsledky BCA testu (Obr. 18c). Roztok  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  dosahoval stejných hodnot jako PBS pufr a nepřesáhl signál pocházející z roztoků BCA kitu. Směs  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  s RML homogenátem měla totožný signál jako RML homogenát bez Pc.

Analýza proteinů byla také provedena na gelu barveném roztokem  $\text{AgNO}_3$ . Fotodynamická eliminace při vzrůstající koncentraci  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  byla doprovázena pouze mírným snížením denzity zabarvení proteinů na gelu (Obr. 18d). Elektroforetický profil proteinů RML homogenátu po fotodynamické eliminaci byl stejný jako u kontrolního neovlivněného RML a bez známek vzniku větších proteinových struktur a agregátů.

Vznik agregátů proteinů a  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  v důsledku působení fotodynamické eliminace nebyl při analýze frakcí sacharózového gradientu (10-60%) detekován. RML homogenát a směs RML homogenátu s  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  ponechaná ve tmě měly identické rozložení proteinů a signálu  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  ve frakcích (Obr. 19a, b). Zastoupení fotodynamicky eliminovaného signálu  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  (RML,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ , 18 min, TLS) ve frakcích bylo detekováno pomocí signálu jejich reziduální diglykosylované formu, jejíž rozložení kopírovalo zastoupení  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  u kontrol (Obr. 19c). Směs RML homogenátu s  $5 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  byla zvolena jako pozitivní kontrola na přítomnost agregátů (Priola, et al. 2003). Po frakcionaci se u tohoto vzorku část proteinů a majoritní část  $\text{PrP}^{\text{C}}/\text{PrP}^{\text{TSE}}$  nacházela ve formě agregátů ve frakcích o vyšší hustotě sacharózy nebo v peletě (Obr. 19d).



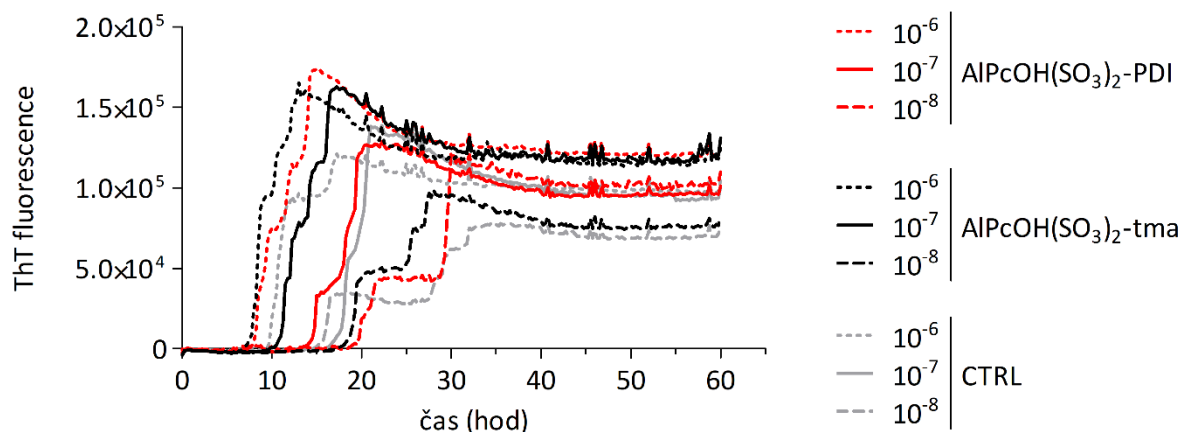
**Obrázek 18.** Vliv fotodynamické eliminace na množství proteinů v 1% RML mozkovém homogenátu při (a) vzrůstající době osvětlení a koncentraci 0,5 µg.ml<sup>-1</sup> ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (b) rostoucí koncentraci ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a 90 min v DALS a 5 min v TLS (n=3). K detekci byla použita BCA esej. Počáteční množství proteinů bylo považováno za 100 % (CTRL). (c) ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v roztoku ani v mozkovém homogenátu (MH) s BCA esejí neinterferoval (n=3). (d) Profil a množství proteinů v 1% RML homogenátu po fotodynamické eliminaci při vzrůstající koncentraci ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a 5 min v TLS Proteiny byly detekovány v gelu barveném AgNO<sub>3</sub>. CTRL, mozkový homogenát; D, mozkový homogenát s ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ve tmě; L, mozkový homogenát exponovaný světlu bez ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.



**Obrázek 19.** *Frakcionace proteinů a PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> RML homogenátu na sacharózovém gradientu. Signál PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> byl detekován protilátkami AH6 a DC2 na membráně western blotu (vlevo) a proteiny v gelu byly barveny roztokem AgNO<sub>3</sub> (vpravo). Signál PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a proteinů po inkubaci (a) s PBS, (b) 25 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ve tmě, (c) s 25 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a fotodynamické eliminaci (18 min TLS) a (d) s 5 mg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ve tmě.*

#### 4.10 Aktivita PDI PrP<sup>TSE</sup> při konverzi rPrP

Metoda RT-QuIC měří schopnost prionů konvertovat solubilní formu rPrP do nerozpustných fibril, ve kterých se akumuluje fluorescenční barva – thioflavin T. Pozitivní signál (ThT+) byl nalezen u všech vzorků obsahujících RML homogenát (obsahuje PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup>), vzorky obsahující neinfekční CD1 homogenát (obsahuje PrP<sup>C</sup>) zůstaly ThT negativní (ThT-). Ačkoli PDI RML homogenátu pomocí AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-PDI) vedla k vymizení signálu PrPres na western blotu, její aktivita při konverzi rPrP se neodlišovala od aktivity kontrolního RML homogenátu (CTRL) nebo směsi RML homogenátu s AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ponechané ve tmě (AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-tma; Obr. 20). Aktivita vzorků mozkových homogenátů při konverzi rPrP byla testována v několika ředěních (10<sup>-6</sup> – 10<sup>-8</sup>). S postupným ředěním vzorků se prodlužoval počátek konverze rPrP. Mezi časem počátku konverze rPrP působením AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-PDI, AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-tma a CTRL o stejném ředění nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Kontrolní směs neinfekčního CD1 homogenátu s AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> exponovaná světlu nebo ponechaná ve tmě zůstala po celou dobu reakce ThT-. To znamená, že neobsahovala částice způsobující konverzi rPrP (data neuvedena). AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> samotný bez přítomnosti homogenátu byl také ThT-. To znamená, že přítomnost AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> neinterferovala s konverzí rPrP (data neuvedena).



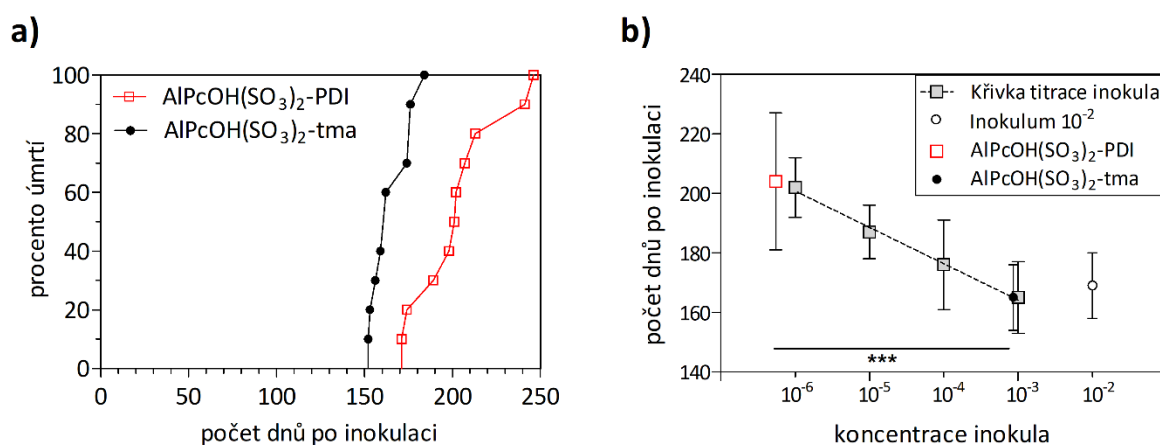
**Obrázek 20.** Srovnání aktivity PDI RML mozkového homogenátu ( $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-PDI}$ ) při konverzi  $r\text{PrP}$  vůči aktivitě neovlivněného RML (CTRL) a směsi RML homogenátu s  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  držené ve tmě ( $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-tma}$ ). Křivky reprezentují ředění vstupního materiálu  $10^{-6} - 10^{-8}$  ( $10^{-2} = 1\%$  mozkový homogenát), každá křivka je průměrem ze čtyř technických opakování. Obrázek znázorňuje reprezentativní experiment ( $n=3$ ).

#### 4.11 Redukce prionové infekitivity v suspenzi při PDI testovaná na myším modelu

Ke stanovení míry redukce prionové infekitivity v PDI RML homogenátu byl využit myší model. Skupina myší ( $n = 10$ ), která byla inokulována PDI RML homogenátem ( $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-PDI}$ ) v ředění  $10^{-2}$ , přežila po inokulaci  $204 \pm 23$  dní. Skupina myší ( $n = 10$ ), která byla inokulována směsí RML homogenátu s  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  drženou ve tmě ( $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-tma}$ ), žila po inokulaci  $165 \pm 11$  dní (Obr. 21a). Myši inokulované  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-PDI}$  žily významně déle ( $p < 0,001$ ) než myši s  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-tma}$ . Délka doby přežití  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-PDI}$  myší byla signifikantně delší než u skupin myší inokulovaných ředěními neovlivněného RML homogenátu:  $10^{-2}$  s průměrnou délkou života  $169 \pm 11$  ( $n = 5$ ,  $p = 0,011$ ),  $10^{-3}$  s průměrnou délkou života  $165 \pm 12$  ( $n = 5$ ,  $p = 0,006$ ) a  $10^{-4}$  s průměrnou délkou života  $176 \pm 15$  ( $n = 5$ ,  $p = 0,038$ ). Míra redukce prionové infekitivity u  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2\text{-PDI}$  byla určena ze závislosti délky života myší na ředění neovlivněného RML homogenátu (Obr. 21b, křivka titrace inokula). PDI při finální koncentraci  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a době osvětlení 18 min v TLS snížila prionovou infekitivity obsaženou v 1% RML homogenátu o 4 řády. U všech skupin myší, které obdržely RML inokulum se finálně rozvinulo prionové onemocnění. Tyto myši ztrácely hmotnost, trpěly poruchou motoriky a nejevily zájem o srst. To je chování charakteristické pro

prionové onemocnění. Jejich diagnóza byla potvrzena *post mortem* detekcí signálu PrPres na western blotu z mozkových homogenátů. Dále byla diagnóza potvrzena také imunohistopatologickou analýzou mozků a slezin, kde byla nalezena depozita PrPres. V mozcích byly nalezeny rozsáhlé spongiformní změny typické pro prionová onemocnění (emailová komunikace s prof. MUDr. Radoslav Matěj, PhD, Thomayerova nemocnice v Krči).

Při PDI vzniká pro myší tělo zřejmě cizorodý oxidovaný produkt, proto byla kontrolní skupina myší ( $n = 5$ ) inokulovaná neinfekčním CD1 homogenátem fotodynamicky inaktivovaným pomocí  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ . Jako kontrola pro toxický vliv Pc sloužila skupina myší ( $n = 5$ ) inokulovaná směsí neinfekčního CD1 homogenátu s  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  drženou ve tmě. Po celou dobu experimentu tyto myši prosperovaly stejně jako myši ( $n = 5$ ) inokulované neovlivněným CD1 homogenátem. Kontroly byly usmrceny po ukončení experimentu bez nálezu PrPres či jiného zřejmého poškození.

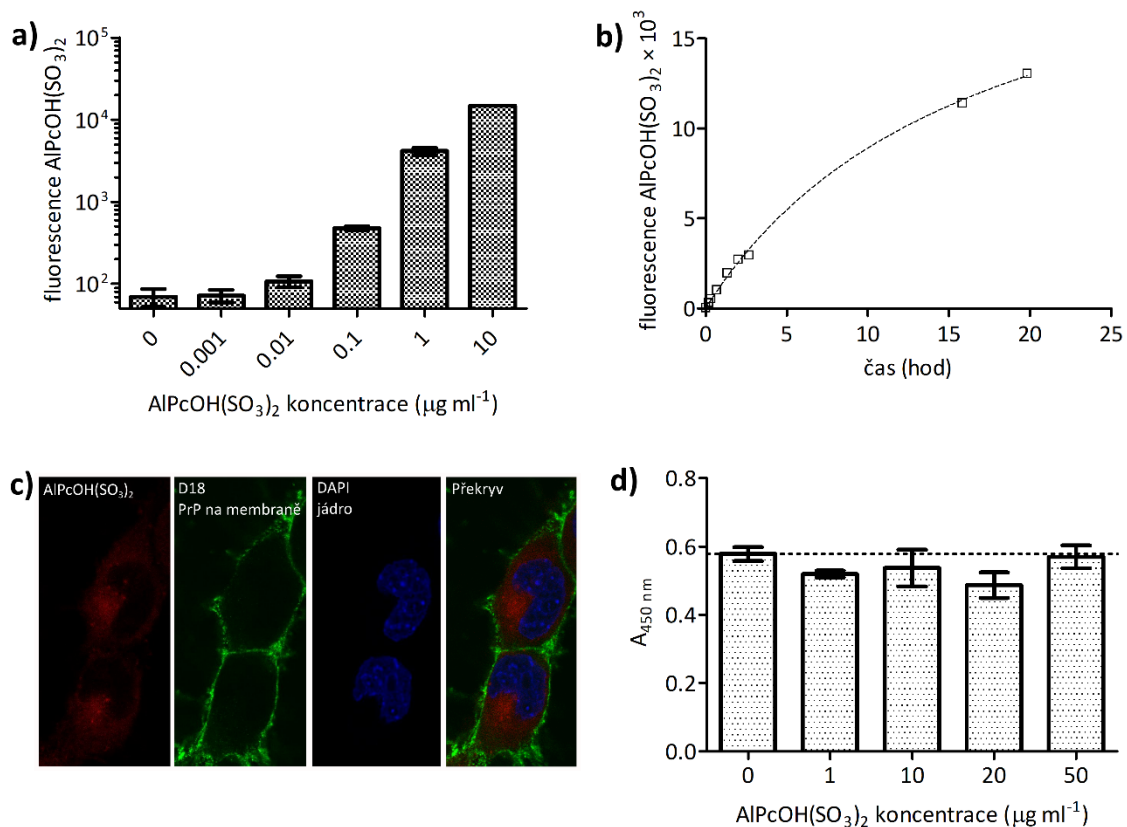


**Obrázek 21.** Myší bioesej. (a) Srovnání délky života myší inokulovaných PDI RML homogenátem ( $n = 10$ ) a myší inokulovaných směsí RML homogenátu s  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  drženou ve tmě ( $n = 10$ ). (b) Prionová infektivita PDI RML homogenátu je zobrazena na regresní křivce vycházející ze závislosti délky života myší na dávce inokula. Signifikance rozdílů byla statisticky evaluována nepárovým  $t$ -testem ( $***p < 0,001$ ).

## 4.12 Buněčné eseje

### 4.12.1 Charakterizace AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v CAD5 linii

Na průtokovém cytometru byla detekována intenzita fluorescence buněk v oblasti 710/20 nm odpovídající množství AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> inkorporovaného buňkami. Fluorescenci buněk nebylo možné na cytometru detekovat u buněk, které byly inkubovány s koncentracemi AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ≤ 0.001 μg.ml<sup>-1</sup>. Intenzita fluorescence těchto buněk byla srovnatelná s buňkami, které byly kultivovány v médiu bez Pc. S rostoucí koncentrací AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.01 – 10 μg.ml<sup>-1</sup>) v kultivačním mediu, vzrůstala intenzita fluorescence buněk (Obr. 22a). Intenzita fluorescence buněk se zvyšovala i s prodloužením doby kultivace v přítomnosti 1 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Saturace buněk nebylo dosaženo ani po 20 hod kultivace, kdy byl experiment ukončen (Obr. 22b). Buňky pro konfokální mikroskopii nebyly permeabilizovány, a proto mohla být jejich vnější strana membrány vizualizována pomocí protilátky D18 proti prionovému proteinu. Jádro buněk bylo barveno DAPI, které může volně procházet přes membrány buněk. Fluorescence AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> byla lokalizována primárně v cytoplazmě buňky a nebyla pozorována v membráně buněk a jádře (Obr. 22c). Životaschopnost buněk byla detekovaná CCK8 kitem jako aktivita buněčných dehydrogenáz, která je přímo úměrná počtu živých buněk. Kultivace CAD5 buněk v přítomnosti 1 – 50 μg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> po dobu 20 hod nevedla ke změně aktivity buněčných dehydrogenáz a tedy počtu živých buněk v porovnání s kontrolními CAD5 kultivovanými v čistém médiu (Obr. 22d).

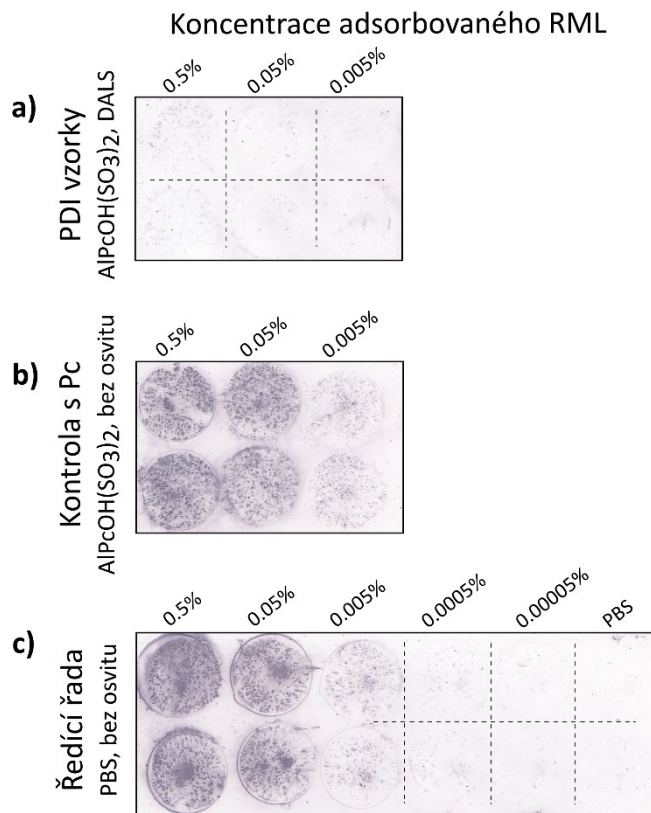


**Obrázek 22.** Charakterizace interakcí ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> s CAD5 buněčnou linií. (a) Závislost absorpce ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> buňkami na jeho koncentraci v kultivačním mediu (n=2). (b) Časová závislost absorpce ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> buňkami. (c) Reprezentativní obrázek distribuce ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v CAD5 buňkách (vyfotil Mgr. Adam Schröfel, PhD.). (d) Závislost životaschopnosti CAD5 buněk na koncentraci ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v mediu (n=3).

#### 4.12.2 Redukce infekivity PDI prionů sorbovaných na povrch

Účinnost PDI na povrchově vázaný RML homogenát byla monitorována pomocí CAD5 buněčné linie. CAD5 buňky jsou citlivé k prionovému onemocnění a množství nakažených buněk odráží prionovou infektivitu vzorku. Nákaza buněk je detekovaná protilátkami jako signálu PrPres na nitrocelulóзовé membráně po přetištění buněk. Buňky rostoucí na 0,5% RML homogenátu, který byl fotodynamicky inaktivován 10 μg.ml<sup>-1</sup> ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, vykazovaly na buněčném blotu výrazné snížení PrPres signálu (Obr. 23a) ve srovnání se signálem PrPres neovlivněného RML homogenátu (Obr. 23c). Porovnáním s ředící řadou neovlivněného RML homogenátu odpovídá redukce PrPres signálu snížení prionové infekivity o 3 řády. Buňky rostoucí na 0,5% - 0,005% RML homogenátu, který byl inkubován s 10 μg.ml<sup>-1</sup> ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ve tmě, měly PrPres signál

(Obr. 23b) srovnatelný se signálem PrPres neovlivněného RML homogenátu. Z toho plyne, že neexcitovaný  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  neměl vliv na redukci prionové infekivity.



**Obrázek 23.** Buněčná esej detekující snížení prionové infekivity RML homogenátu sorbovaného na plastová povrch. PrPres signál detekovaný v buňkách rostoucích na (a) PDI sorbovaném RML homogenátu, (b) sorbovaném RML, který byl inkubován ve tmě s  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ , (c) sorbovaných ředění RML homogenátu. PrPres byl detekován směsí protilátek AH6 a 6D11 na membráně po přetištění buněk v 3. pasáži po infekci.

## 5 Diskuse

Běžně používané sterilizační postupy vedou jen k částečné dekontaminaci prionů a některé metody strukturu prionů dokonce fixují, například dezinfekce alkoholy (Taylor 1999). Spolu s vysokou vazebnou afinitou prionů k povrchům roste riziko jejich nozokomiálního přenosu od asymptomatických pacientů nebo jedinců v subklinickém stadiu nemoci, u kterých se ložiska PrP<sup>TSE</sup> nachází v širokém spektru tkání a orgánů (Wadsworth, et al. 2001; WHO 2010). Takové případy přenosu jsou dokumentovány prostřednictvím chirurgických nástrojů (Bonda, et al. 2016). Účinná dekontaminace prionů roztokem 1 M NaOH navržená světovou zdravotnickou organizací (WHO 2000) může vést k poškození nákladných lékařských nástrojů (Brown, et al. 2005). To vede k neustále potřebě hledat nové přístupy pro dekontaminaci prionů.

V této disertační práci jsme se zaměřili na metodu fotodynamické inaktivace prionů v přítomnosti senzitizeru. K jeho aktivaci bylo použito světlo o vlnové délce v červené oblasti elektromagnetického spektra, která umožňuje hlubší penetraci do tkání (Jawad, et al. 2011; Plaetzer, et al. 2009). Světelný zdroj DALs byl navržen pro rozsáhlé komparativní experimenty až 60 vzorků najednou, každý v objemu 50 – 300  $\mu$ l. Zdroj byl například využit pro porovnávání účinnosti fotodynamické eliminace signálu PrPres u různých prionových kmenů. TLS sloužil k inaktivaci většího objemu vzorků v řádech mililitrů a byl použit pro inaktivaci inokula, kterým bylo infikováno až 10 myší. Protože je PDI závislá přístupu světla, byly jako reakční nádoby pro experimenty použity mikrozkušavky a mikrotitrační destičky z průsvitného materiálu. I přesto byla pohlcena nebo odražena 1/3 světla dopadajícího kolmo na dno mikrotitrační destičky a 2/3 světla dopadajícího na kónickou stěnu mikrozkušavky. Zbývající podíl prošlého světla byl dostatečný pro excitaci Pc.

Při fotochemických a fotofyzikálních reakcích fotosenzitizerů mezi sebou soutěží dva typy mechanismů. U I. typu mechanismu dochází k přenosu elektronu na  $O_2(^3\Sigma_g)$  za vzniku radikálů  $O_2^{\bullet-}$  (Foote 1991), který není v biologickém systému příliš reaktivní a může dismutovat na  $H_2O_2$  (Plaetzer, et al. 2009). U II. typu dochází k přenosu energie na  $O_2(^3\Sigma_g)$  a produkci  $O_2(^1\Delta_g)$  (Foote 1991). Společným rysem těchto ROS jsou jejich oxidační vlastnostmi, které mohou mít degradační účinky na řadu biomolekul jako jsou lipidy, proteiny a nukleových kyselin (Di Meo, et al. 2016; Evans, et al. 2004; Hughson, et al. 2016; Paspaltsis, et al. 2006; Pizzimenti, et al. 2010). Produkce ROS fotoaktivací Pc ve vodném roztoku byly zcela inhibovány  $NaN_3$ , který je specifickým fyzikálním zhasičem  $O_2(^1\Delta_g)$  (Hall a Chignell 1987). To poukazuje na produkci  $O_2(^1\Delta_g)$ . ROS vznikající při přenosu

elektronů (mechanismem I. typu) detekovány nebyly a to ani v případě, kdy byly excitovány  $10\times$  vyšší koncentrace  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  než při standardním PDI experimentu. Lze tedy předpokládat, že tyto formy ROS nejsou fotoaktivací Pc generovány anebo je jejich množství zanedbatelné ve srovnání s produkcí  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ . Produkce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  ftalocyaniny a jeho oxidační účinky byly potvrzeny oxidační degradací kyseliny močové, která pracuje na principu specifického chemického zhasěče  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  a ve fosfátovém pufru je inertní vůči účinkům  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Becker 1993). Produkce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  jakožto hlavní ROS produkovaný Pc je dokládán také v literatuře (Černý, et al. 2010; Kuznetsova, et al. 2012).

Produkce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  fotoaktivací Pc v infekční mozgovém homogenátu byla potvrzena inhibicí fotodynamické eliminace působením  $\text{NaN}_3$ . Pro úplnou inhibici fotodynamické eliminace signálu PrPres v mozgovém homogenátu je zapotřebí až desetinásobná koncentrace  $\text{NaN}_3$  v porovnání s inhibicí produkce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  ve vodném roztoku při stejné koncentraci Pc. To může být vysvětleno vazebnou afinitou Pc k  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  (Caughey, et al. 1998) a krátkou dobou života lokálně působícího  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  (Lang, et al. 2005). V takovém případě se primárním cílem  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  mohou stát postranní řetězce aminokyselin proteinů, se kterými Pc interaguje, oproti rozpustnému  $\text{NaN}_3$ . Produkci ROS mechanismem I. typu ( $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve vodném roztoku jsme vyloučili, protože jejich signál nebyl nedetekován ani při fotoaktivaci  $10\times$  vyšší koncentrace Pc než ve standardním experimentu. Zjistili jsme, že  $\text{H}_2\text{O}_2$  redukuje signál PrPres až při 1 M (= 3,4%) koncentraci (Panigaj, et al. 2011), ale koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$  potenciálně produkovaného fotoaktivací Pc ve vodném roztoku nepřekročil detekční limit 5,1  $\mu\text{M}$ . Vliv  $\text{H}_2\text{O}_2$  na fotodynamickou eliminaci signálu PrPres tedy není pravděpodobný. To znamená, že  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  je hlavní činitel zodpovědný za eliminaci PrPres signálu.

Množství  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  produkovaného ftalocyaniny ve vodném roztoku bylo závislé na délce osvětlení a tato závislost měla lineární průběh. Produkce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  fotoaktivací Pc ve výkonnějším TLS zdroji pokračovala v lineárním průběhu i v 6. minutě osvětlení. To naznačuje, že roztok byl dostatečně saturován molekulárním kyslíkem. Koncentrace molekulárního kyslíku  $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$  v roztoku je pro fotodynamické reakce klíčová a závisí na ní rychlost tvorby  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  (Lang, et al. 2005). Zdroj DALS je ve srovnání s TLS méně účinný v produkci  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  fotoaktivací Pc. I při nejdelších použitých expozičních časech (90 min) nepřesáhlo množství produkovaného  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  v DALS hodnoty dosažené v TLS (5 min). Rozdílná účinnost zdrojů ve fotoaktivaci Pc je způsobena rozdílnou výkoností diod a do jisté

míry může být ovlivněna rozdílnou transmitancí světla skrze stěny mikrozkuřavky a mikrotitrační destičky.

Množství  $O_2(^1\Delta_g)$  produkovaného ve vodném roztoku bylo přímo úměrné koncentraci fotoaktivovaného derivátu Pc. Mezi testovanými Pc generoval největší množství  $O_2(^1\Delta_g)$  SiPc(OH)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub> následovaný AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> s mírně nižší produkcí. Fotoaktivace ZnPc(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub> vedla k 2,4× nižším výtěžkům  $O_2(^1\Delta_g)$  v porovnání s AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanou fotochemickou aktivitou derivátů Pc v pořadí  $M^{III}Pc(SO_3)_n > M^{II}Pc(SO_3)_n > H_2Pc(SO_3)_n$  (Kuznetsova, et al. 2012). S klesající fotochemickou aktivitou roste tendence Pc k tvorbě agregátů, které ovlivňují fotochemické vlastnosti Pc. Na produkci  $O_2(^1\Delta_g)$  se totiž podílí pouze monomerní Pc (Kuznetsova, et al. 2012). Tendence molekul k agregaci je zprostředkována  $\pi$ - $\pi$  interakcemi aromatických kruhů Pc (Caughey, et al. 2007; Palewska, et al. 2012). Míra agregace je redukována přítomností axiálních ligandů na centrálním kovu Pc (Chen, et al. 2015). V našem případě vykazoval nejmenší tendence k agregaci SiPc(OH)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub> se dvěma m-OH ligandy následovaný AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> s jedním -OH ligandem. Přibližně polovina frakce monomerů obou derivátů se nacházela v agregátech. ZnPc(SO<sub>3</sub>)<sub>1-3</sub>, který na centrálním atomu zinku nenesl žádné ligandy, byl v PBS agregován ze 75%.

PDI RML mozkového homogenátu pomocí Pc vedla k eliminaci signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres pod detekční limit western blotu, pokud byly k detekci použity protilátky mířené proti střední a C-terminální části molekuly PrP. V cílových epitopech těchto protilátek se nachází aminokyseliny Tyr, Trp, His nebo Met, které jsou selektivním cílem elektrofilní ataku  $O_2(^1\Delta_g)$ .  $O_2(^1\Delta_g)$  atakuje konkrétně dvojné vazby nebo ne vazebné elektronové páry atomů v postranních řetězcích aminokyselinách (Davies 2003; Lang, et al. 2005). Cílové epitopy protilátek byly během fotodynamické eliminace pravděpodobně modifikovány působením  $O_2(^1\Delta_g)$ , což znemožnilo vazbu protilátek. Cílové epitopy protilátek mířených proti N-terminální části molekuly PrP (DC2 a AG4) obsahují také modifikovatelné kyseliny. Při použití těchto protilátek nedošlo k redukci signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> pod detekční limit. Tyto protilátky detekovaly po PDI RML homogenátu diglykosylovanou formu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> i za podmínek, kdy ostatní protilátky své cílové epitopy již nerozeznaly. Tento reziduální signál diglykosylované formy tvořil 10 % počátečního signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> (v 1% RML homogenátu). Zdá se, že oligosacharidy na Arg<sup>180</sup> a Arg<sup>196</sup> by mohly hrát protektivní roli při oxidaci N-terminálního konce PrP. Samotné oligosacharidy jsou málo senzitivní k oxidaci  $O_2(^1\Delta_g)$  (Min a Boff 2002). Signál PrPres nelze protilátkami AG4 a DC2 detekovat, protože

molekula PrPres neobsahuje epitopy těchto protilátek. Není tedy možné určit, zda reziduální signál diglykosylované formy PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> pochází z PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>TSE</sup> nebo obou izoform. Na základě těchto dat se domníváme, že mechanismus fotodynamické eliminace signálu PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> a PrPres na western blotu je výsledkem oxidační modifikace postranních řetězců aminokyselin účinky O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). Tyto modifikace znemožňují nebo omezují specifickou vazbu protilátek. Oxidační účinky O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) na proteiny již byly popsány (Davies 2004).

Fotodynamická eliminace signálu PrPres v RML homogenátu měla průběh klesající exponenciální křivky navzdory lineární fotoprodukcí O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) ve vodném roztoku. Tento exponenciální průběh reakce je nejspíše způsoben omezenou dostupností PrP<sup>TSE</sup>, která také limituje rychlost reakce. Podobný průběh reakce jsme zaznamenali u oxidační degradace kyseliny močové účinky O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). V literatuře je takovýto průběh reakce dokumentován pro oxidaci dimethylantracenu (Černý, et al. 2010; Rapozzi, et al. 2014) či difenylisobenzofuranu (Černý, et al. 2010), které se používají pro nespecifickou detekci O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). Fotodynamickou eliminací se úspěšně podařilo snížit signál PrPres pod detekční limit western blotu na obou zdrojích. To odpovídá redukcí signálu PrPres o více než 1,8 řádu při použití nanomolárních koncentrací ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Přítomnost Pc ve směsi s mozkovým homogenátem nevedla k redukcí signálu PrPres, pokud byla směs ponechána ve tmě. Tento signál PrPres byl srovnatelný se signálem kontroly bez Pc. Fotodynamická eliminace na světelných zdrojích byla doprovázena zvýšením teploty exponovaných vzorků. Zatímco teplota vzorků po 90 min v DALS nepřesahovala 26°C a blížila se laboratorní teplotě (24°C), teplota vzorků v TLS po 5 min vzrostla na 38°C. Ačkoliv by mohla zvýšená teplota ovlivňovat účinnost PDI, k pozorovatelnému úbytku PrPres signálu nedocházelo. Toto zjištění podporuje také publikovaná rezistence prionů účinkům tepla (Marín-Moreno, et al. 2019; Taylor 2004).

Koncentrace proteinů byla detekována pomocí BCA eseje, která sleduje aktivitu peptidové vazby při redukci Cu<sup>2+</sup> na Cu<sup>+</sup> (Fisher\_Scientific). Úbytek množství celkového proteinu byl po PDI relativně malý a u výkonnějšího zdrojů (TLS) nepřesáhl 20 %. Tento pokles naznačuje jen částečné ovlivnění peptidových vazeb působením O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) (Davies 2003). Elektroforetický profil proteinů barvených roztokem AgNO<sub>3</sub> v gelu zůstal po fotodynamické eliminaci zachován. S rostoucí intenzitou fotodynamické eliminace (koncentrací ALPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) docházelo pouze k mírnému poklesu intenzity zabarvení proteinů. Ag<sup>+</sup> ionty se váží primárně ke karboxylovým a sulfhydrylovým skupinám postranních řetězců aminokyselin (Switzer, et al. 1979). Je pravděpodobné, že

pokles intenzity zbarvení byl částečně způsoben modifikací postranních řetězců aminokyselin účinky  $O_2(^1\Delta_g)$ , jehož cílem jsou také  $-SH$  skupiny (Davies 2016). K fragmentaci proteinů vlivem oxidačních účinků  $O_2(^1\Delta_g)$  zřejmě dochází jen v nízké míře nebo vůbec (Gimenez, et al. 2016). Nicméně v důsledku oxidačních změn postranních řetězců aminokyselin mohou při reakcích  $O_2(^1\Delta_g)$  s proteiny vznikat agregáty (Davies 2004; Pattison, et al. 2012). Molekula myšího PrP nese ve své aminokyselinové sekvenci devět histidinů (UniProtKB-P04925). Meziprodukty oxidace histidinu se mohou vzájemně propojovat nebo atakovat další aminokyseliny (Balasubramanian, et al. 1990). Oxidací dvou postranních řetězců Cys, může vznikat disulfidický můstek (Rougee, et al. 1988). Molekula PrP obsahuje pouze dva Cys, které tvoří disulfidický můstek přirozeně. Vznik agregátů proteinů i PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> (v mozkovém homogenátu) působením PDI byl analyzován na sacharózovém gradientu. Zastoupení proteinů i reziduální diglykosylované formy PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> po PDI v jednotlivých frakcích bylo srovnatelné s profilem frakcí neovlivněné kontroly i kontroly bez Pc. To naznačuje, že k tvorbě agregátů při fotodynamické eliminaci nedocházelo (Gimenez, et al. 2016). PDI byla provedena při nejintenzivnějších podmínkách použitých v našich experimentech (finální koncentraci  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  AIPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a celkově 18 min v TLS), abychom posoudili maximální dopad PDI na tvorbu agregátu. Jako pozitivní kontrola agregace byla použita směs  $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  AIPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a RML homogenátu držená ve tmě (Priola, et al. 2003). Při takto vysoké koncentraci AIPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> se převážná část proteinů i PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> nacházela ve frakcích s vysokou koncentrací sacharózy. To dokazuje, že v této kontrole se proteiny i PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup> nacházely v agregátech (s AIPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Možnost paralelní studie několika vzorků v DALS (90 min) nám umožnila porovnat senzitivitu PrP<sup>TSE</sup> prionových kmenů vůči fotodynamické eliminaci. Odolnost PrP<sup>TSE</sup> prionových kmenů k fotodynamické eliminaci napříč použitými deriváty Pc klesala v pořadí ME7 = 22L > mBSE = mvCJD > 139A = RML = mFu. Rozdílná odolnost prionových kmenů byla v literatuře dokumentována vůči působení denaturačních činidel (Safar, et al. 1998) nebo tepla (Marín-Moreno, et al. 2019). Jensen et al. (2011) demonstroval, že rychlostní konstanta reakce  $O_2(^1\Delta_g)$  závisí na struktuře proteinu. Rozdíly v odolnosti PrP<sup>TSE</sup> prionových kmenů můžeme vysvětlit jejich odlišnou strukturou (Safar, et al. 1998) a z ní plynoucí rozdílnou stabilitou k účinkům  $O_2(^1\Delta_g)$ . Na principu oxidace proteinů je založena metoda proteinového footprintingu využívaná pro analýzu struktury proteinu. Tato metoda používá k oxidaci postranních řetězců aminokyselin hydroxylové radikály (Kiselar, et al. 2003). PrP<sup>TSE</sup> kmenů mBSE a mvCJD vykazovalo vůči účinkům  $O_2(^1\Delta_g)$  stejnou senzitivitu, která

může být vysvětlena příbuzností těchto kmenů. Konzumace hovězího masa kontaminovaného BSE vedla u lidí k rozvoji vCJD (Hill, et al. 1997). Stejný fenomén pozorujeme u PrP<sup>TSE</sup> kmenů 139A a RML, který můžeme vysvětlit jejich původem. Předpokládá se, že oba kmeny mají společný původ, ale byly připraveny nezávisle ve dvou různých laboratořích (Oelschlegel, et al. 2012).

Vliv derivátů Pc na fotodynamickou eliminaci prionových kmenů klesal v pořadí  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2 > \text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3} \gg \text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$ . Jejich vliv na fotodynamickou eliminaci neodpovídal účinnosti při produkci  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , při níž je neúčinnější  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  a nejméně účinný  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  (Kuznetsova, et al. 2012). Tato nesrovnalost by mohla souviset s agregačními tendencemi derivátů Pc diskutovanými výše. S rostoucími tendencemi derivátu Pc k agregaci roste i jejich antiprionový účinek. Ten spočívá v interakci derivátu Pc s molekulou PrP (Caughey, et al. 1998). Předpokládáme, že vzájemná blízkost nebo interakce Pc a PrP je nezbytná pro efektivně cílenou PDI prionů v suspenzi mozkového homogenátu. Cílem lokálně působícího  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  s krátkou dobou života (Lang, et al. 2005; Moan 1990), jsou s větší pravděpodobností blízké a interagující molekuly PrP než ostatní biomolekuly mozkového homogenátu. To by mohlo naznačovat, že nízká tendence k agregaci  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$  vede k nízké afinitě k molekulám PrP<sup>TSE</sup>. PDI by nebyla cílená na PrP<sup>TSE</sup> a rovnocenně by eliminovala všechny proteiny se stejnou pravděpodobností. Tím můžeme vysvětlit, proč je nejméně účinná fotodynamická eliminace indukovaná  $\text{SiPc}(\text{OH})_2(\text{SO}_3)_{1-3}$ , který ve vodném roztoku produkuje nejvyšší množství  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ .  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  a  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  byly při fotodynamické eliminaci srovnatelně účinné vůči většině prionových kmenů. Výjimkou byly kmeny mBSE a mvCJD, při nichž se projevila vyšší účinnost  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$ .  $\text{AlPc}(\text{SO}_3)_4$  má vůči  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_4$  nižší tendence k agregaci, nižším antiprionový účinek (Caughey, et al. 2007; Caughey, et al. 1998) a nižší afinitu k rPrP (Dee, et al. 2012). Srovnatelnou účinnost těchto Pc při fotodynamické eliminaci bychom mohli vysvětlit tím, že  $\text{ZnPc}(\text{SO}_3)_{1-3}$  má vyšší afinitu k prionům, a proto dochází k lepšímu cílení účinků  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ . Naproti tomu  $\text{AlPcOH}(\text{SO}_3)_2$  s nižší afinitou k prionům produkuje vyšší množství  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ .

PDI RML vede k vymizení signálu PrPres na western blotu a snížení prionové infekivity, ale aktivita při konverzi rPrP zůstala nezměněná a nevykazovala ani pozdější nástup konverze ve srovnání s aktivitou PrP<sup>TSE</sup> neovlivněného RML homogenátu. Analogický jev byl demonstrován pro fenolový čisticí prostředek Environ LpH<sup>TM</sup> (Steris plc, USA) účinný v redukci prionové infekivity (Ernst a Race 1993; Fichet, et al. 2004;

Hughson, et al. 2016), ale nikoli ve snížení aktivity PrP<sup>TSE</sup> při konverzi rPrP. Tyto výsledky naznačují, že eliminace prionové infekčnosti nemusí být spojena s redukcí konvertující aktivity PrP<sup>TSE</sup> (Hughson, et al. 2016).

Míra redukce infekčnosti PrP<sup>TSE</sup> v RML po PDI byla sledována velmi senzitivní myší bioesejí s intracerebrální inokulací. Přímá inokulace prionů do CNS je nejrychlejší a nejsenzitivnější metoda prokázání přítomnosti PrP<sup>TSE</sup> (Kimberlin a Walker 1986; Klingeborn, et al. 2011). Délka přežití myší po inokulaci odráží prionovou infekčnost inokula (Prusiner, et al. 1982). Z křivky závislosti délky přežití na ředění inokula jsme zjistili, že v 1% RML mozковém homogenátu po PDI byla infekční dávka PrP<sup>TSE</sup> snížena o 4 řády. Tento výsledek demonstruje jednoznačnou schopnost PDI pomocí AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> inaktivovat priony. Podobné míry inaktivace bylo dosaženo použitím dekontaminačních metod založených na produkci •OH (Paspaltsis, et al. 2006; Solassol, et al. 2006). Za námi nastavených podmínek (25 µg.ml<sup>-1</sup> AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 18 min TLS) zůstala část prionů neinaktivovaná a u myší nakonec vyvolala prionové onemocnění. Tento problém by mohl být vyřešen prodloužením délky osvitů nebo použitím vyšší koncentrace AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Koncentrace Pc, které by překročily případnou toxickou dávku Pc, lze redukovat fotodegradací molekuly Pc intenzivním světlem (Kostelanska, et al. 2019; Plaetzer, et al. 2009). Inokulace směsi infekčního inokula s AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> držené ve tmě nevedlo, navzdory dříve publikovaným výzkumům (Priola, et al. 2003; Priola, et al. 2000), k prodloužení života myší. Tato nesrovnalost se vysvětluje použitím 400× nižší koncentrace AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v našich experimentech. Vysoké koncentrace AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 mg.ml<sup>-1</sup>) tvoří agregáty s PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>TSE</sup>, které dokumentujeme jejich rozložením ve frakcích v sacharózovém gradientu. Publikovaný pozdější nástup onemocnění u myší, které obdržely inokulum s vysokou dávkou Pc(SO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, je pravděpodobně způsoben pomalou biodegradací agregátů prionů s Pc (Priola, et al. 2003) a nikoliv jejich inaktivací.

Priony sorbované na povrchy lékařských nástrojů jsou rizikem pro přenos prionového onemocnění (Bonda, et al. 2016; Thomas, et al. 2013). Účinnost metody PDI na povrchově vázané RML PrP<sup>TSE</sup> v přítomnosti AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> byla sledována pomocí CAD5 buněk, které jsou citlivé k prionovému onemocnění (Mahal, et al. 2007). Cytotoxicita AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> se neprojevila ani při nejvyšší testované koncentraci (50 µg.ml<sup>-1</sup>) (Amin, et al. 2012). Předpokládáme, že zůstatek AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> po PDI neměl vliv na životaschopnost buněk. Míra redukce prionové infekčnosti byla odvozena ze závislosti množství

detekovaného signálu PrPres v buňkách na ředění RML homogenátu sorbovaného k plastu. U 0,5% RML homogenátu byla infektivita PrP<sup>TSE</sup> snížena o 3 řády.

Dle literatury vede působení  $O_2(^1\Delta_g)$  ke změnám sekundární a terciální strukturu proteinů v důsledku oxidace postranních řetězců aminokyselin (Davies 2003; Michaeli a Feitelson 1997). Účinnost oxidace se odvíjí od konformace proteinů (Jensen, et al. 2011). Právě uspořádání sekundární a terciální struktury určuje stabilitu a odolnost prionů a determinuje také prionové kmeny a jejich vlastnosti (Morales 2017; Safar, et al. 1998; Wemheuer, et al. 2017).  $O_2(^1\Delta_g)$  by tak mohl být nadějným nástrojem pro boj s priony. Produkce  $O_2(^1\Delta_g)$  při fotodynamické inaktivaci pomocí ftalocyaninů vede k eliminaci signálu prionů na western blotu a k redukci prionové infekivity jak v suspenzi, tak vázané na povrch.

## 6 Závěr

Tato disertační práce byla zaměřena na studium inaktivace prionů pomocí singletního kyslíku generovaného fotoaktivací derivátů ftalocyaninu. Předpokládáme, že dosažené výsledky lze využít k zavedení ekonomicky dostupné metody pro redukci rizika přenosu prionové infekce skrze nástroje používané v nemocničních zařízeních. Dekontaminace prionů fotodynamickou inaktivací by mohla být využita také ve veterinární praxi.

Shrnutí výsledků:

1. Důsledně jsme charakterizovali světelné podmínky, za kterých experimenty vyžadující aktivaci světlem probíhaly.
2. Identifikovali jsme singletní kyslík jako jedinou reaktivní formu kyslíku zodpovědnou za eliminaci signálu PrP<sup>TSE</sup> v mozковém homogenátu.
3. Optimalizovali jsme podmínky pro fotodynamickou eliminaci signálu PrP<sup>TSE</sup> a popsali průběh této reakce.
4. Demonstrovali jsme rozdílnou rezistenci prionových kmenů k PDI, která může být využita k rozlišení prionových kmenů.
5. Poukázali jsme na skutečnost, že fotodynamická eliminace signálu PrPres není závislá množství O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) produkovaného deriváty Pc, ale důležitou roli zřejmě hrají i strukturní parametry Pc.
6. Ukázali jsme, že fotodynamická inaktivace nevede k viditelnému štěpení proteinů ani k tvorbě jejich agregátů.
7. Na senzitivním myším modelu jsme demonstrovali redukci infekivity PrP<sup>TSE</sup> v suspenzi o 4 řády.
8. Infektivitu PrP<sup>TSE</sup> sorbovaného na povrch jsme fotodynamickou inaktivací snížili o 3 řády.

## 7 Seznam použité literatury

- Abdel-Haq, H., M. Lu, F. Cardone, Q. G. Liu, M. Puopolo & M. Pocchiari (2009) Efficacy of phthalocyanine tetrasulfonate against mouse-adapted human prion strains. *Arch Virol*, 154, 1005-7.
- Amin, R. M., C. Hauser, I. Kinzler, A. Rueck & C. Scalfi-Happ (2012) Evaluation of photodynamic treatment using aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride as a photosensitizer: new approach. *Photochem Photobiol Sci*, 11, 1156-63.
- Babelhadj, B., M. A. Di Bari, L. Pirisinu, B. Chiappini, S. B. S. Gaouar, G. Riccardi, S. Marcon, U. Agrimi, R. Nonno & G. Vaccari (2018) Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis*, 24, 1029-1036.
- Balasubramanian, D., X. Du & J. S. Zigler, Jr. (1990) The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins. *Photochem Photobiol*, 52, 761-8.
- Baptista, M. S., J. Cadet, P. Di Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas, M. Vignoni & T. M. Yoshimura (2017) Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol*, 93, 912-919.
- Baron, E. D., C. L. Malbasa, D. Santo-Domingo, P. Fu, J. D. Miller, K. K. Hanneman, A. H. Hsia, N. L. Oleinick, V. C. Colussi & K. D. Cooper (2010) Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: results of a phase 1 clinical trial. *Lasers Surg Med*, 42, 728-735.
- Becker, B. F. (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*, 14, 615-31.
- Belay, E. D., J. Blase, L. M. Schulster, R. A. Maddox & L. B. Schonberger (2013) Management of neurosurgical instruments and patients exposed to Creutzfeldt-Jakob disease. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 34, 1272-80.
- Belay, E. D., R. A. Maddox, E. S. Williams, M. W. Miller, P. Gambetti & L. B. Schonberger (2004) Chronic Wasting Disease and Potential Transmission to Humans. *Emerg Infect Dis*, 10.
- Ben-Hur, E., A. Carmichael, P. Riesz & I. Rosenthal (1985) Photochemical generation of superoxide radical and the cytotoxicity of phthalocyanines. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 48, 837-46.
- Bendheim, P. E., H. R. Brown, R. D. Rudelli, L. J. Scala, N. L. Goller, G. Y. Wen, R. J. Kascsak, N. R. Cashman & D. C. Bolton (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*, 42, 149-56.
- Berberidou, C., K. Xanthopoulos, I. Paspaltsis, A. Loubopoulos, E. Polyzoidou, T. Sklaviadis & I. Poulis (2013) Homogenous photocatalytic decontamination of prion infected stainless steel and titanium surfaces. *Prion*, 7, 488-95.
- Bessen, R. A. & R. F. Marsh (1992) Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, 66, 2096-101.
- Bonda, D. J., S. Manjila, P. Mehndiratta, F. Khan, B. R. Miller, K. Onwuzulike, G. Puoti, M. L. Cohen, L. B. Schonberger & I. Cali (2016) Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg Focus*, 41, E10-E10.
- Boyle, R. W. & D. Dolphin (1996) Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol*, 64, 469-85.
- Brewis, M., B. M. Hassan, H. Li, S. Makhseed, N. B. McKeown & N. Thompson (2000) The synthetic quest for 'splendid isolation' within phthalocyanine materials. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 4, 460-464.

- Brooke, F. J., A. Boyd, G. M. Klug, C. L. Masters & S. J. Collins (2004) Lyodura use and the risk of iatrogenic Creutzfeldt–Jakob disease in Australia. *Med J Aust*.
- Brown, K. & J. A. Mastrianni (2010) The prion diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23, 277-98.
- Brown, S. A., K. Merritt, T. O. Woods & D. N. Busick (2005) Effects on instruments of the World Health Organization--recommended protocols for decontamination after possible exposure to transmissible spongiform encephalopathy-contaminated tissue. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 72, 186-90.
- Caspi, S., M. Halimi, A. Yanai, S. B. Sasson, A. Taraboulos & R. Gabizon (1998) The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem*, 273, 3484-9.
- Caughey, B. & G. S. Baron (2006) Prions and their partners in crime. *Nature*, 443, 803-10.
- Caughey, B., W. S. Caughey, D. A. Kocisko, K. S. Lee, J. R. Silveira & J. D. Morrey (2006) Prions and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) chemotherapeutics: A common mechanism for anti-TSE compounds? *Acc Chem Res*, 39, 646-53.
- Caughey, W. S., S. A. Priola, D. A. Kocisko, L. D. Raymond, A. Ward & B. Caughey (2007) Cyclic tetrapyrrole sulfonation, metals, and oligomerization in antiprion activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3887-3894.
- Caughey, W. S., L. D. Raymond, M. Horiuchi & B. Caughey (1998) Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12117-12122.
- Collin, F. (2019) Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 20, 2407.
- Collinge, J., M. Gorham, F. Hudson, A. Kennedy, G. Keogh, S. Pal, M. Rossor, P. Rudge, D. Siddique, M. Spyer, D. Thomas, S. Walker, T. Webb, S. Wroe & J. Darbyshire (2009) Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial. *Lancet Neurol*, 8, 334-44.
- Černý, J., M. Karásková, J. Rakušan & S. Nešpůrek (2010) Reactive oxygen species produced by irradiation of some phthalocyanine derivatives. *J Photoch Photobio A*, 210, 82-88.
- Davies, M. J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 761-70.
- Davies, M. J. (2004) Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem Photobiol Sci*, 3, 17-25.
- Davies, M. J. (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*, 1703, 93-109.
- Davies, M. J. (2016) Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*, 473, 805-825.
- Dee, D. R., A. N. Gupta, M. Anikovskiy, I. Sosova, E. Grandi, L. Rivera, A. Vincent, A. M. Brigley, N. O. Petersen & M. T. Woodside (2012) Phthalocyanine tetrasulfonates bind to multiple sites on natively-folded prion protein. *Biochim Biophys Acta*, 1824, 826-32.
- Di Meo, S., T. T. Reed, P. Venditti & V. M. Victor (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 1245049.
- Duyckaerts, C., V. Sazdovitch, K. Ando, D. Seilhean, N. Privat, Z. Yilmaz, L. Peckeu, E. Amar, E. Comoy, A. Maceski, S. Lehmann, J. P. Brion, J. P. Brandel & S. Haik (2018) Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease and immunoassay of French cadaver-sourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of Abeta pathology. *Acta Neuropathol*, 135, 201-212.

- Eisele, Y. S., T. Bolmont, M. Heikenwalder, F. Langer, L. H. Jacobson, Z.-X. Yan, K. Roth, A. Aguzzi, M. Staufenbiel, L. C. Walker & M. Jucker (2009) Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic A $\beta$  inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12926-12931.
- Ernst, D. R. & R. E. Race (1993) Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods*, 41, 193-201.
- Evans, M. D., M. Dizdaroglu & M. S. Cooke (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 567, 1-61.
- Fichet, G., K. Antloga, E. Comoy, J. P. Deslys & G. McDonnell (2007a) Prion inactivation using a new gaseous hydrogen peroxide sterilisation process. *J Hosp Infect*, 67, 278-286.
- Fichet, G., E. Comoy, C. Dehen, L. Challier, K. Antloga, J. P. Deslys & G. McDonnell (2007b) Investigations of a prion infectivity assay to evaluate methods of decontamination. *J Microbiol Methods*, 70, 511-8.
- Fichet, G., E. Comoy, C. Duval, K. Antloga, C. Dehen, A. Charbonnier, G. McDonnell, P. Brown, C. I. Lasmezas & J. P. Deslys (2004) Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet*, 364, 521-6.
- Fisher\_Scientific BCA assay. [https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?gclid=CjwKCAjw7-P1BRA2EiwAXoPWAIJ5zB03jVwg-ZtxaqsO8kYvQynb5-14NkhEgDb2Cmat8gg2ybRc9RoC-HUQAvD\\_BwE&ef\\_id=CjwKCAjw7-P1BRA2EiwAXoPWAIJ5zB03jVwg-ZtxaqsO8kYvQynb5-14NkhEgDb2Cmat8gg2ybRc9RoC-HUQAvD\\_BwE:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!236691351004!b!!g!!%2Bbca%20%2Bassay?cid=bid\\_pca\\_ppf\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_nt\\_pur\\_con](https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?gclid=CjwKCAjw7-P1BRA2EiwAXoPWAIJ5zB03jVwg-ZtxaqsO8kYvQynb5-14NkhEgDb2Cmat8gg2ybRc9RoC-HUQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAjw7-P1BRA2EiwAXoPWAIJ5zB03jVwg-ZtxaqsO8kYvQynb5-14NkhEgDb2Cmat8gg2ybRc9RoC-HUQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!236691351004!b!!g!!%2Bbca%20%2Bassay?cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con). [Prístup 14.6.2020]
- Fischer, F., G. Grashew, H. J. Sinn, W. Maier-Borst, W. J. Lorenz & P. M. Schlag (1998) A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. *Clin Chim Acta*, 274, 89-104.
- Flechsigg, E., I. Hegyi, M. Enari, P. Schwarz, J. Collinge & C. Weissmann (2001) Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med*, 7, 679-684.
- Foote, C. S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*, 162, 963-70.
- Foote, C. S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*, 54, 659-659.
- Fremuntova, Z., T. Mosko, J. Soukup, J. Kucerova, M. Kostelanska, Z. B. Hanusova, M. Filipova, L. Cervenakova & K. Holada (2020) Changes in cellular prion protein expression, processing and localisation during differentiation of the neuronal cell line CAD 5. *Biol Cell*, 112, 1-21.
- Giles, K., D. B. Berry, C. Condello, R. C. Hawley, A. Gallardo-Godoy, C. Bryant, A. Oehler, M. Elepano, S. Bhardwaj, S. Patel, B. M. Silber, S. Guan, S. J. DeArmond, A. R. Renslo & S. B. Prusiner (2015) Different 2-Aminothiazole Therapeutics Produce Distinct Patterns of Scrapie Prion Neuropathology in Mouse Brains. *J Pharmacol Exp Ther*, 355, 2-12.
- Gimenez, R. E., V. Vargova, V. Rey, M. B. Turbay, I. Abatedaga, F. E. Moran Vieyra, V. I. Paz Zanini, J. H. Mecchia Ortiz, N. E. Katz, V. Ostatna & C. D. Borsarelli (2016) Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization. *Free Radic Biol Med*, 94, 99-109.

- Gregory, P. (2000) Industrial applications of phthalocyanines. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 04, 432-437.
- Haigh, C. L. & D. R. Brown (2006) Prion protein reduces both oxidative and non-oxidative copper toxicity. *J Neurochem*, 98, 677-89.
- Haley, N. J., C. K. Mathiason, S. Carver, M. Zabel, G. C. Telling & E. A. Hoover (2011) Detection of chronic wasting disease prions in salivary, urinary, and intestinal tissues of deer: potential mechanisms of prion shedding and transmission. *J Virol*, 85, 6309-6318.
- Hall, R. D. & C. F. Chignell (1987) Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: a Stern-Volmer quenching experiment with sodium azide. *Photochem Photobiol*, 45, 459-64.
- Hamir, A. N., R. A. Kunkle, R. C. Cutlip, J. M. Miller, K. I. O'Rourke, E. S. Williams, M. W. Miller, M. J. Stack, M. J. Chaplin & J. A. Richt (2005) Experimental transmission of chronic wasting disease agent from mule deer to cattle by the intracerebral route. *J Vet Diagn Invest*, 17, 276-81.
- Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey & P. Lantos (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389, 448-50, 526.
- Holada, K., J. Simak & J. G. Vostal (2000) Transmission of BSE by blood transfusion. *Lancet*, 356, 1772.
- Hughson, A. G., B. Race, A. Kraus, L. R. Sangaré, L. Robins, B. R. Groveman, E. Saijo, K. Phillips, L. Contreras, V. Dhaliwal, M. Manca, G. Zanusso, D. Terry, J. F. Williams & B. Caughey (2016) Inactivation of Prions and Amyloid Seeds with Hypochlorous Acid. *PLoS Pathog*, 12, e1005914-e1005914.
- Charveriat, M., M. Reboul, Q. Wang, C. Picoli, N. Lenuzza, A. Montagnac, N. Nhiri, E. Jacquet, F. Gueritte, J. Y. Lallemand, J. P. Deslys & F. Mouthon (2009) New inhibitors of prion replication that target the amyloid precursor. *J Gen Virol*, 90, 1294-1301.
- Chen, X., D. Ma, K. Cai, S. Pan, Y. Wang, T. Zhang, Z. Huang, H. Yang & Y. Peng (2015) Effect of axial ligands on the photophysical properties of new silicon(IV) phthalocyanines. *J Coord Chem*, 68, 732-740.
- Chevallet, M., S. Luche & T. Rabilloud (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*, 1, 1852-1858.
- Imran, M. & S. Mahmood (2011) An overview of human prion diseases. *Virol J*, 8, 559-559.
- Janouskova, O., J. Rakusan, M. Karaskova & K. Holada (2012) Photodynamic inactivation of prions by disulfonated hydroxyaluminium phthalocyanine. *J Gen Virol*, 93, 2512-7.
- Jaunmuktane, Z., S. Mead, M. Ellis, J. D. Wadsworth, A. J. Nicoll, J. Kenny, F. Launchbury, J. Linehan, A. Richard-Loendt, A. S. Walker, P. Rudge, J. Collinge & S. Brandner (2015) Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*, 525, 247-50.
- Jawad, M. M., S. T. Abdul Qade, A. A. Zaidan, B. B. Zaidan, A. W. Naji & I. T. Abdul Qade (2011) An Overview of Laser Principle, Laser-Tissue Interaction Mechanisms and Laser Safety Precautions for Medical Laser Users. *Int J Pharmacol*, 7, 149-160.
- Jensen, R. L., J. Arnbjerg, H. Birkedal & P. R. Ogilby (2011) Singlet oxygen's response to protein dynamics. *J Am Chem Soc*, 133, 7166-73.
- Jori, G., C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti & G. Roncucci (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*, 38, 468-81.

- Josefsen, L. B. & R. W. Boyle (2008) Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs*, 2008, 276109-276109.
- Karpuj, M. V., K. Giles, S. Gelibter-Niv, M. R. Scott, V. R. Lingappa, F. C. Szoka, D. Peretz, W. Denetclaw & S. B. Prusiner (2007) Phosphorothioate oligonucleotides reduce PrP levels and prion infectivity in cultured cells. *Mol Med*, 13, 190-198.
- Kimberlin, R. H. & C. A. Walker (1986) Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol*, 67 ( Pt 2), 255-63.
- Kinsella, T. J., E. D. Baron, V. C. Colussi, K. D. Cooper, C. L. Hoppel, S. T. Ingalls, M. E. Kenney, X. Li, N. L. Oleinick, S. R. Stevens & S. C. Remick (2011) Preliminary clinical and pharmacologic investigation of photodynamic therapy with the silicon phthalocyanine photosensitizer pc 4 for primary or metastatic cutaneous cancers. *Front Oncol*, 1, 14-14.
- Kiselar, J. G., P. A. Janmey, S. C. Almo & M. R. Chance (2003) Structural analysis of gelsolin using synchrotron protein footprinting. *Mol Cell Proteomics*, 2, 1120-32.
- Klingeborn, M., B. Race, K. D. Meade-White, R. Rosenke, J. F. Striebel & B. Chesebro (2011) Crucial role for prion protein membrane anchoring in the neuroinvasion and neural spread of prion infection. *J Virol*, 85, 1484-1494.
- Kobayashi, N. (2002) Design, Synthesis, Structure, and Spectroscopic and Electrochemical Properties of Phthalocyanines. *BCSJ*, 75, 1-19.
- Kocisko, D. A., G. S. Baron, R. Rubenstein, J. Chen, S. Kuizon & B. Caughey (2003) New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J Virol*, 77, 10288-94.
- Kocisko, D. A., A. L. Engel, K. Harbuck, K. M. Arnold, E. A. Olsen, L. D. Raymond, D. Vilette & B. Caughey (2005) Comparison of protease-resistant prion protein inhibitors in cell cultures infected with two strains of mouse and sheep scrapie. *Neurosci Lett*, 388, 106-11.
- Kostelanska, M., J. Freisleben, Z. Backovska Hanusova, T. Mosko, R. Vik, D. Moravcova, A. Hamacek, J. Mosinger & K. Holada (2019) Optimization of the photodynamic inactivation of prions by a phthalocyanine photosensitizer: The crucial involvement of singlet oxygen. *J Biophotonics*, 12, e201800340.
- Krichevsky, D. M., A. V. Zasedatelev, A. Y. Tolbin, S. Y. Luchkin, A. B. Karpo, V. I. Krasovskii & L. G. Tomilova (2017) Highly transparent low-symmetry zinc phthalocyanine-based monolayers for NO<sub>2</sub> gas detection. *Thin Solid Films*, 642, 295-302.
- Kupfer, L., W. Hinrichs & M. H. Groschup (2009) Prion protein misfolding. *Curr Mol Med*, 9, 826-35.
- Kuznetsova, N. A., N. S. Gretsova, V. M. Derkacheva, O. L. Kaliya & E. A. Lukyanets (2012) Sulfonated phthalocyanines: aggregation and singlet oxygen quantum yield in aqueous solutions. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 07, 147-154.
- Lang, K., J. Mosinger & D. M. Wagnerova (2005) Pokroky ve fotochemii singletního kyslíku. *Chem Listy*, 99, 211-221.
- Lemmer, K., M. Mielke, C. Kratzel, M. Joncic, M. Oezel, G. Pauli & M. Beekes (2008) Decontamination of surgical instruments from prions. II. In vivo findings with a model system for testing the removal of scrapie infectivity from steel surfaces. *J Gen Virol*, 89, 348-358.
- Lemmer, K., M. Mielke, G. Pauli & M. Beekes (2004) Decontamination of surgical instruments from prion proteins: in vitro studies on the detachment, destabilization and degradation of PrP<sup>Sc</sup> bound to steel surfaces. *J Gen Virol*, 85, 3805-16.

- Lipscomb, I. P., H. Pinchin, R. Collin & C. W. Keevil (2007) Effect of drying time, ambient temperature and pre-soaks on prion-infected tissue contamination levels on surgical stainless steel: concerns over prolonged transportation of instruments from theatre to central sterile service departments. *J Hosp Infect*, 65, 72-7.
- Liu, F., W. Lu, X. Yin & J. Liu (2016) Mechanistic and Kinetic Study of Singlet O<sub>2</sub> Oxidation of Methionine by On-Line Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 27, 59-72.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie & R. G. Will (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, 363, 417-21.
- Mahal, S. P., C. A. Baker, C. A. Demczyk, E. W. Smith, C. Julius & C. Weissmann (2007) Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20908-13.
- Marín-Moreno, A., P. Aguilar-Calvo, M. Moudjou, J. C. Espinosa, V. Béringue & J. M. Torres (2019) Thermostability as a highly dependent prion strain feature. *Sci Rep*, 9, 11396.
- McDonnell, G. & P. Burke (2003) The challenge of prion decontamination. *Clin Infect Dis*, 36, 1152-4.
- McDonnell, G., C. Dehen, A. Perrin, V. Thomas, A. Igel-Egalon, P. A. Burke, J. P. Deslys & E. Comoy (2013) Cleaning, disinfection and sterilization of surface prion contamination. *J Hosp Infect*, 85, 268-73.
- Meyer-Luehmann, M., J. Coomaraswamy, T. Bolmont, S. Kaeser, C. Schaefer, E. Kilger, A. Neuenschwander, D. Abramowski, P. Frey, A. L. Jaton, J. M. Vigouret, P. Paganetti, D. M. Walsh, P. M. Mathews, J. Ghiso, M. Staufenbiel, L. C. Walker & M. Jucker (2006) Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, 313, 1781-4.
- Michaeli, A. & J. Feitelson (1997) Reactivity of singlet oxygen toward proteins: the effect of structure in basic pancreatic trypsin inhibitor and in ribonuclease A. *Photochem Photobiol*, 65, 309-15.
- Miller, M. W. & E. S. Williams (2003) Horizontal prion transmission in mule deer. *Nature*, 425, 35-36.
- Min, D. B. & J. M. Boff (2002) Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Compr Rev Food Sci*, 1, 58-72.
- Moan, J. (1990) On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photoch Photobio B*, 6, 343-344.
- Mok, T., Z. Jaunmuktane, S. Joiner, T. Campbell, C. Morgan, B. Wakerley, F. Golestani, P. Rudge, S. Mead, H. R. Jäger, J. D. F. Wadsworth, S. Brandner & J. Collinge (2017) Variant Creutzfeldt–Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *N Engl J Med*, 376, 292-294.
- Morales, R. (2017) Prion strains in mammals: Different conformations leading to disease. *PLoS Pathog*, 13, e1006323.
- Morales, R., K. Abid & C. Soto (2007) The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 681-91.
- Mosinger, J. & B. Mosinger (1995) Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia*, 51, 106-109.
- NCJDRSU (2017) Creutzfeldt-Jakob disease surveillance in the UK: 26th Annual Report. <https://www.cjd.ed.ac.uk/sites/default/files/report26.pdf>. [Přístup 14.6.2020]
- Nonell, S. & S. E. Braslavsky (2000) Time-resolved singlet oxygen detection. *Methods Enzymol*, 319, 37-49.

- Norum, O. J., P. K. Selbo, A. Weyergang, K. E. Giercksky & K. Berg (2009) Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine. *J Photochem Photobiol B*, 96, 83-92.
- Nunziante, M., C. Kehler, E. Maas, M. U. Kassack, M. Groschup & H. M. Schatzl (2005) Charged bipolar suramin derivatives induce aggregation of the prion protein at the cell surface and inhibit PrPSc replication. *J Cell Sci*, 118, 4959-73.
- Oelschlegel, A. M., M. Fallahi, S. Ortiz-Umpierre & C. Weissmann (2012) The extended cell panel assay characterizes the relationship of prion strains RML, 79A, and 139A and reveals conversion of 139A to 79A-like prions in cell culture. *J Virol*, 86, 5297-303.
- Ochsner, M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*, 39, 1-18.
- Palewska, K., J. Sworakowski & J. Lipiński (2012) Molecular aggregation in soluble phthalocyanines – Chemical interactions vs.  $\pi$ -stacking. *Optical Materials*, 34, 1717-1724.
- Panigaj, M., A. Brouckova, H. Glierova, E. Dvorakova, J. Simak, J. G. Vostal & K. Holada (2011) Underestimation of the expression of cellular prion protein on human red blood cells. *Transfusion*, 51, 1012-21.
- Parchi, P., R. Strammiello, S. Notari, A. Giese, J. P. M. Langeveld, A. Ladogana, I. Zerr, F. Roncaroli, P. Cras, B. Ghetti, M. Pocchiari, H. Kretzschmar & S. Capellari (2009) Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPSc types: an updated classification. *Acta Neuropathol*, 118, 659-671.
- Park, S., J. Y. Jang, J. S. Koo, J. B. Park, Y. J. Lim, S. J. Hong, S.-W. Kim & H. J. Chun (2013) A review of current disinfectants for gastrointestinal endoscopic reprocessing. *Clin Endosc*, 46, 337-341.
- Paspaltsis, I., C. Berberidou, I. Poullos & T. Sklaviadis (2009) Photocatalytic degradation of prions using the photo-Fenton reagent. *J Hosp Infect*, 71, 149-56.
- Paspaltsis, I., K. Kotta, R. Lagoudaki, N. Grigoriadis, I. Poullos & T. Sklaviadis (2006) Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions. *J Gen Virol*, 87, 3125-30.
- Pattison, D. I., A. S. Rahmanto & M. J. Davies (2012) Photo-oxidation of proteins. *Photochem Photobiol Sci*, 11, 38-53.
- Peden, A. H., D. L. Ritchie, M. W. Head & J. W. Ironside (2006) Detection and localization of PrPSc in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol*, 168, 927-35.
- Petritsch, K., R. H. Friend, A. Lux, G. Rozenberg, S. C. Moratti & A. B. Holmes (1999) Liquid crystalline phthalocyanines in organic solar cells. *Synthetic Metals*, 102, 1776-1777.
- Pimenta, F. M., R. L. Jensen, L. Holmegaard, T. V. Esipova, M. Westberg, T. Breitenbach & P. R. Ogilby (2012) Singlet-Oxygen-Mediated Cell Death Using Spatially-Localized Two-Photon Excitation of an Extracellular Sensitizer. *J Phys Chem B*, 116, 10234-10246.
- Pizzimenti, S., C. Toaldo, P. Pettazzoni, M. U. Dianzani & G. Barrera (2010) The "two-faced" effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. *Cancers*, 2, 338-363.
- Plaetzer, K., B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr & T. Kiesslich (2009) Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*, 24, 259-68.

- Pocchiari, M., S. Schmittinger & C. Masullo (1987) Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J Gen Virol*, 68 ( Pt 1), 219-23.
- Porter, S. R. (2002) Prions and dentistry. *J R Soc Med*, 95, 178-181.
- Prinsze, C., T. M. Dubbelman & J. Van Steveninck (1990) Protein damage, induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta*, 1038, 152-7.
- Priola, S. A., A. Raines & W. Caughey (2003) Prophylactic and therapeutic effects of phthalocyanine tetrasulfonate in scrapie-infected mice. *J Infect Dis*, 188, 699-705.
- Priola, S. A., A. Raines & W. S. Caughey (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, 287, 1503-6.
- Prusiner, S. B. (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13363-83.
- Prusiner, S. B., S. P. Cochran, D. F. Groth, D. E. Downey, K. A. Bowman & H. M. Martinez (1982) Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol*, 11, 353-8.
- Rabello, B. R., A. P. Gerola, D. S. Pellosi, A. L. Tessaro, J. L. Aparício, W. Caetano & N. Hioka (2012) Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. *J Photochem Photobiol A*, 238, 53-62.
- Rapozzi, V., S. Zorzet, M. Zacchigna, E. Della Pietra, S. Cogoi & L. E. Xodo (2014) Anticancer activity of cationic porphyrins in melanoma tumour-bearing mice and mechanistic in vitro studies. *Mol Cancer*, 13, 75.
- Raymond, G. J., A. Bossers, L. D. Raymond, K. I. O'Rourke, L. E. McHolland, P. K. Bryant, 3rd, M. W. Miller, E. S. Williams, M. Smits & B. Caughey (2000) Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J*, 19, 4425-4430.
- Rogez-Kreuz, C., R. Yousfi, C. Soufflet, I. Quadrio, Z. X. Yan, V. Huyot, C. Aubenque, P. Destrez, K. Roth, C. Roberts, M. Favero & P. Clayette (2009) Inactivation of animal and human prions by hydrogen peroxide gas plasma sterilization. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30, 769-77.
- Rohan, Z., R. Rusina, M. Maresova & R. Matej (2015) Human prion diseases in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 64, 115-20.
- Rougee, M., R. V. Bensasson, E. J. Land & R. Pariente (1988) Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochem Photobiol*, 47, 485-489.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen & S. B. Prusiner (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*, 4, 1157-65.
- Sakudo, A., Y. Ano, T. Onodera, K. Nitta, H. Shintani, K. Ikuta & Y. Tanaka (2011) Fundamentals of prions and their inactivation (review). *Int J Mol Med*, 27, 483-9.
- Secker, T. J., H. E. Pinchin, R. C. Herve & C. W. Keevil (2015) Efficacy of humidity retention bags for the reduced adsorption and improved cleaning of tissue proteins including prion-associated amyloid to surgical stainless steel surfaces. *Biofouling*, 31, 535-41.
- Shen, H. R., J. D. Spikes, P. Kopecková & J. Kopecek (1996) Photodynamic crosslinking of proteins. II. Photocrosslinking of a model protein-ribonuclease A. *J Photochem Photobiol B*, 35, 213-9.
- Schieber, M. & N. S. Chandel (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24, R453-R462.

- Silva, E., C. De Landea, A. M. Edwards & E. Lissi (2000) Lysozyme photo-oxidation by singlet oxygen: properties of the partially inactivated enzyme. *J Photochem Photobiol B*, 55, 196-200.
- Solassol, J., M. Pastore, C. Crozet, V. Perrier & S. Lehmann (2006) A novel copper-hydrogen peroxide formulation for prion decontamination. *J Infect Dis*, 194, 865-9.
- Steinbeck, M. J., A. U. Khan & M. J. Karnovsky (1993) Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem*, 268, 15649-54.
- Stewart, L. A., L. H. M. Rydzewska, G. F. Keogh & R. S. G. Knight (2008) Systematic review of therapeutic interventions in human prion disease. *Neurology*, 70, 1272-1281.
- Surewicz, W. K. & M. I. Apostol. 2011. Prion Protein and Its Conformational Conversion: A Structural Perspective. In *Prion Proteins*, ed. J. Tatzelt, 135-167. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Sushma, B., S. Gugwad, R. Pavaskar & S. A. Malik (2016) Prions in dentistry: A need to be concerned and known. *J Oral Maxillofac Pathol*, 20, 111-114.
- Switzer, R. C., 3rd, C. R. Merrill & S. Shifrin (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 98, 231-7.
- Tateishi, J., T. Kitamoto, H. Hashiguchi & H. Shii (1988) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease: immunohistological and experimental studies. *Ann Neurol*, 24, 35-40.
- Taylor, D. M. (1999) Inactivation of prions by physical and chemical means. *J Hosp Infect*, 43 Suppl, S69-76.
- Taylor, D. M. (2004) Resistance of transmissible spongiform encephalopathy agents to decontamination. *Contrib Microbiol*, 11, 136-45.
- Thackray, A. M., L. Hopkins, M. A. Klein & R. Bujdoso (2007) Mouse-adapted ovine scrapie prion strains are characterized by different conformers of PrP<sup>Sc</sup>. *J Virol*, 81, 12119-12127.
- Thomas, J. G., C. E. Chenoweth & S. E. Sullivan (2013) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease via surgical instruments. *J Clin Neurosci*, 20, 1207-12.
- To, T. L., K. F. Medzihradzky, A. L. Burlingame, W. F. DeGrado, H. Jo & X. Shu (2016) Photoactivatable protein labeling by singlet oxygen mediated reactions. *Bioorg Med Chem Lett*, 26, 3359-3363.
- Todd, N. V., J. Morrow, K. Doh-ura, S. Dealler, S. O'Hare, P. Farling, M. Duddy & N. G. Rainov (2005) Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect*, 50, 394-6.
- UniProtKB-P04925 UniProtKB-P04925 (PRIO\_MOUSE).  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P04925>. [Přístup 14.6.2020]
- Verweu, H. & J. v. Steveninck (1982) MODEL STUDIES ON PHOTODYNAMIC CROSS-LINKING. *Photochem Photobiol*, 35, 265-267.
- Wadsworth, J. D., S. Joiner, A. F. Hill, T. A. Campbell, M. Desbruslais, P. J. Luthert & J. Collinge (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet*, 358, 171-80.
- Wall, B. A., M. E. Arnold, D. Radia, W. Gilbert, A. Ortiz-Pelaez, K. D. Stärk, E. Van Klink & J. Guitian (2017) Evidence for more cost-effective surveillance options for bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie in Great Britain. *Euro Surveill*, 22, 30594.
- Watts, J. C., M. E. C. Bourkas & H. Arshad (2018) The function of the cellular prion protein in health and disease. *Acta Neuropathol*, 135, 159-178.

- Weissmann, C., M. Enari, P. C. Klöhn, D. Rossi & E. Flechsig (2002) Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 Suppl 4, 16378-16383.
- Wemheuer, W. M., A. Wrede & W. J. Schulz-Schaeffer (2017) Types and Strains: Their Essential Role in Understanding Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*, 9.
- WHO, W.-C. C. A. (2000) Infection Control Guidelines for TSE. <https://www.who.int/csr/resources/publications/bse/whocdscsraph2003.pdf>. [Přístup 14.6.2020]
- WHO, W. E. Q. (2010) Tables on Tissue Infectivity Distribution in TSE. [www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf). [Přístup 14.6.2020]
- Wilkinson, F., W. P. Helman & A. B. Ross (1995) Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J Phys Chem Ref Data*, 24, 663-677.
- Yan, Z. X., L. Stitz, P. Heeg, E. Pfaff & K. Roth (2004) Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires: a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25, 280-3.
- Zhang, Y. & J. F. Lovell (2017) Recent applications of phthalocyanines and naphthalocyanines for imaging and therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 9, e1420.
- Zlotnik, I. & J. C. Rennie (1963) Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *J Comp Pathol*, 73, 150-IN13.
- Zobeley, E., E. Flechsig, A. Cozzio, M. Enari & C. Weissmann (1999) Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med*, 5, 240-3.

## 8 Příloha

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Kostelanska M., Freisleben J., Backovska Hanusova Z., Mosko T., Vik R., Moravcova D., Hamacek A., Mosinger J., Holada K.

**Optimization of the photodynamic inactivation of prions by a phthalocyanine photosensitizer: The crucial involvement of singlet oxygen.**

*Journal of Biophotonics*. 2019; e201800340. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800430>

IF = 3.763

Fremuntova Z., Mosko T., Soukup J., Kucerova J., Kostelanska M., Backovska Hanusova Z., Filipova M., Cervenakova L., Holada K.

**Changes in cellular prion protein expression, processing and localization in differentiating neuronal cell line CAD 5.**

*Biology of the Cell*. 2020 Jan;112(1):1-21. <https://doi.org/10.1111/boc.201900045>

IF = 3.863

Rukopis:

Kostelanska M., Holada K.

**Prion strains express different sensitivity to photodynamic inactivation by phthalocyanine derivatives.**

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Rukopis v recenzním řízení:

Soukup J., Kostelanska M., Kereiče S., Hujacova A., Pavelcova M., Petrak J., Kubala Havrdova E., Holada K.

**Flow cytometry analysis of isolated blood extracellular vesicles in patients with relapsing multiple sclerosis.**

Zasláno do redakce *Immunology Letters*.

IF = 2.552