

## Posudek disertační práce

Název práce: **Molecular mechanisms of apoptosis induced by photodynamic activation in cancer cells**

Autorka: Irena Moserová

Obsahem předložené práce je analýza působení skupiny nově syntetizovaných fotosensitizerů s možným uplatněním ve fotodynamické terapii nádorových onemocnění. Fotodynamická terapie (PDT) je založena na více či méně selektivní akumulaci fotoexcitovatelné látky v nádorových buňkách a jejím následném ozáření, které obvykle vede k tvorbě reaktivních kyslíkatých molekul (ROS) a spuštění programované buněčné smrti. Zkoumaná skupina látek je odvozena od tetrafenylporfyrinové základní struktury a obsahuje modifikace v podobě jednoho až čtyř glykolových řetězců navázaných na fenylových skupinách v polohách meta nebo para. Jednotlivé fotosensitizery byly porovnány podle jejich účinnosti na adherentní buněčné linii 4T1 a suspenzní leukemické linii HL60. U vybraných nejúčinnějších produktů byla poté testována jejich schopnost omezit růst implantovaných nádorů *in vivo* v myším modelu a zejména byl podrobně studován mechanismus jejich působení na buňky buněčných linií 4T1 a HL60.

Vlastní práce je psána anglicky, poměrně přehledně a srozumitelně. Zejména česká verze autoreferátu by si ovšem zasloužila pečlivější kontrolu formální i jazykové stránky.

Teoretická část práce obsahuje základní popis podstaty PDT a používaných fotosensitizerů a přehled literatury týkající se zejména apoptotických signálních drah a jejich indukce působením PDT. Těžiště práce spočívá v experimentální části, ze které je patrné, že autorka si osvojila řadu různých vyšetřovacích metod a dospěla k souboru kvalitních výsledků, které uspořádala do logického celku. Z původní širší skupiny substituovaných porfyrinů byly pro detailní studium vybrány hydroxyethylglykolové deriváty, z nichž některé vykazují lepší účinnost než klinicky používané látky. Ukázalo se, že umístění glykolových řetězců na porfyrinové struktuře výrazně ovlivňuje vnitrobuněčnou lokalizaci fotosensitizeru a tím také jeho účinnost. Účinnější meta deriváty se hromadí mimo jiné v endoplazmatickém retikulu a k jejich cytotoxickému působení přispívá dráha spuštěná uvolněním vápenatých iontů, která mimo jiné zahrnuje indukci transkripčních faktorů ATF4 a CHOP. Para i meta deriváty také aktivují signální kaskádu vedoucí přes p38 MAPK, její inhibice ale ovlivňuje celkový cytotoxický účinek PDT jen u para derivátů. V části Diskuse jsou popsány pozorování porovnávána s dosud publikovanými výsledky jiných autorů získanými za použití jiných fotosensibilizačních látek.

Komentáře a doplňující otázky:

- 1) Jaký význam mají čísla udaná v % ve schématech 3.1 až 3.3 ?
- 2) Intracelulární rozložení meta a para EG-derivátů podle obrázku 4.2 odpovídá popisu v textu (difúzní cytoplazmatické obarvení pro meta derivát a fokální pro para derivát), ale u rodičovských látek se rozložení zdá být spíše opačné. Máte pro to nějaké vysvětlení?
- 3) Probíhající apoptóza indukovaná PDT byla prokázána mimo jiné pomocí Annexinového testu, který umožňuje detekci fosfatidylserinu (PS) na vnější straně cytoplazmatické membrány. Podle krátkého vysvětlení v textu (str.39) externalizace PS nastává vlivem změn v permeabilitě membrány. O jaké změny se jedná a čím je toto tvrzení podloženo? Nesymetrické rozložení fosfolipidů v membráně je v intaktní buňce zajišťováno činností enzymů a možným důvodem ztráty asymetrie je výpadek jejich činnosti. Byl mechanismus externalizace PS během apoptózy již vyjasněn?

4) V odstavci 4.6 a příslušejícím obr. 4.8, které jsou věnovány interakci studovaných porfyrinů se sialovou kyselinou, jsou nekonzistentně používány termíny titrační křivka/vazebná křivka, vazebná konstanta je označena jako  $pK_a$  a udávána jako bezrozměrná. Vysvětlete, prosím, co je na obrázku 4.8 B, jaká veličina je na ose x, jakým způsobem je z dat vypočtena vazebná konstanta a jaký je její význam.

5) Obr. 4.13C pravděpodobně dokládá, že pro cytotoxické účinky para derivátů je důležitá kináza p38, jelikož v buňkách MEF s vyřazeným genem pro p38 se statisticky významně snižuje toxický účinek těchto látek. Pro jednoznačnou interpretaci výsledků uvedených v tomto obrázku by ale bylo třeba ověřit, že v buňkách MEF p38<sup>-/-</sup> se porfyriny akumulují ve stejné míře jako v buňkách s intaktním p38. Byla tato kontrola provedena?

6) Obr. 4.22 ukazuje mimo jiné vliv inhibitoru kaspáz zVADfmk na štěpení fodrinu. Inhibitor byl použit ve vysoké koncentraci (100  $\mu$ M), ve které už má nespecifické účinky (kromě kaspáz inhibuje i další proteázy, včetně kalpainů). V diskusi autorka z výsledků uvedených v tomto obrázku vyvozuje, že kalpains mohou být aktivovány kaspázami (str. 69). Podle mých zkušeností na inhibici kaspázy-3 v suspenzních buněčných liniích stačí 5  $\mu$ M zVADfmk, v instrukcích od dodavatelů se doporučená koncentrace pohybuje kolem 10-20  $\mu$ M. Jaký byl účel experimentu s přidáním zVADfmk a z jakého důvodu byla zvolena koncentrace 100  $\mu$ M?

7) V práci bylo detailně a věrohodně doloženo, že cytotoxické účinky studovaných meta derivátů porfyrinů jsou zčásti zprostředkovány uvolněním  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy, aktivací kalpainů a spuštěním signální dráhy typické pro stres endoplazmatického retikula. Paralelně s tím ale nepochybně probíhají další procesy vedoucí k zániku buňky, neboť inhibice procesů spojených s děním v endoplazmatickém retikulu (vyvázání  $Ca^{2+}$  pomocí BAPTA, farmakologická inhibice nebo knock-down kalpainu, inhibice translokace  $Ca^{2+}$  do mitochondrií, knock-down proteinu PERK, inhibice eIF2) má vždy omezený, byť statisticky významný, vliv na buněčnou viabilitu. Z obr. 4.20 je rovněž patrné, že BAPTA neinhibuje vznik 120 kDa fragmentu fodrinu, který je přičítán aktivitě kaspázy 12. Test cytotoxicity byl prováděn vždy v jednom časovém bodě (24h po ozáření). Na jakém základě byl vybrán právě tento bod? Byl sledován i účinek v jiných časových intervalech po ozáření? Je možné, že inhibice procesů vyvolaných uvolněním vápenatých iontů zánik buněk jen zpomalila, ale konečná frakce buněk, které ošetření nepřežijí, zůstane stejná?

8) Podle výsledků uvedených v obr. 4.24 se zdá, že kinetika změn ATF4 na úrovni mRNA (panel B) a na úrovni proteinového produktu (panel A) spolu příliš dobře nekorelují. Čím by to bylo možno vysvětlit?

9) Bylo prokázáno, že cytotoxický účinek meta derivátů je alespoň částečně zprostředkován signální drahou PERK/eIF2 zatímco aktivace p38/MAPK se zdá být důležitá jen v případě para derivátů. Kináza p38 se ovšem aktivuje i po ošetření buněk meta deriváty. Není vyloučeno, že obě dráhy jsou po PDT s meta deriváty spouštěny paralelně, přičemž PERK/eIF2 má větší (rychlejší?) účinek, takže dráha přes p38 se v cytotoxickém účinku uplatní jen v případě, že je dráha spouštěná  $Ca^{2+}$  zablokována. Zjišťovali jste, jaký výsledek by v případě meta derivátů měla inhibice obou těchto drah současně?

Připomínky ke grafické a formální úpravě:

1) Barevné rozlišení křivek v obrázku 4.1 není dostatečné a neumožňuje jednoznačně identifikovat data patřící k mTHPP, mTPP(EG)1 a 2. Tendenci agregovat má navíc zjevně i mTPP(EG)3. Pro přesnější stanovení zastoupení agregátů by bylo vhodnější porovnávat emisní spektra fluorescence, ve kterých se agregace projevuje výrazněji než ve spektrech absorpčních. Odkaz na tento obrázek je v textu umístěn až za odkazem na následující obrázek 4.2.

2) V legendách k obrázkům obsahujícím statisticky hodnocená data (např. 4.9, 4.13, 4.16, 4.21) je systematicky nesprávně používán výraz "statistický rozdíl" (statistical difference) místo "statisticky významný rozdíl" (statistically significant difference).

3) Výsledky detekce hladiny fosforylovaného PERK (p-PERK) pomocí western-blottingu (obr. 4.24) nejsou příliš přesvědčivé, pro buňky linie HL60 není tento protein uveden vůbec a v legendě k tomuto obrázku není uveden počet opakování experimentu. Pro spolehlivou detekci fosforylačně-specifickými protilátkami je obvykle třeba přidávat do lytického pufru inhibitory fosfatáz, ty ale ve složení lytického pufru v této práci uvedeny nejsou.

4) Drobné nedostatky: V základním popisu mechanismu působení PDT se v textu (str. 7) uvádí, že fotosensitizer může přenést energii na molekulu kyslíku nebo z excitovaného tripletního stavu přejít nezářivým přechodem do stavu základního. V obrázku k tomuto textu (klasické Jablonského schema, obr. 1.2) je ovšem vedle vzniku singletního kyslíku znázorněna fosforescence (tj. přechod zářivý). U veličiny OPD (celková fotodynamická dávka) by v Tabulce 4.1 měly být uvedeny jednotky. V obr. 4.7 (zvláště v panelu B) je obtížné rozlišit jednotlivé použité symboly. V legendě k obrázku 4.24 nejsou vysvětleny zkratky C a D (control- bez porfyrinu i bez ozáření?, dark- s porfyrinem bez ozáření?). V textu (str.36) se uvádí, že po prodloužené inkubaci se rodičovská látka mTHPP objevuje i v lyzozomech, v legendě k příslušnému obrázku (4.4) ovšem údaj o době inkubace není uveden u žádného z porfyrinů. V diskusi na str. 67 se doslovně opakuje část textu ve dvou po sobě jdoucích odstavcích.

Přes uvedené připomínky se domnívám, že předložená disertační práce má velmi dobrou úroveň. Experimentální výsledky, které jsou v ní uvedeny, jsou součástí dvou publikací v kvalitních impaktovaných časopisech a práce nepochybně splňuje všechny podmínky potřebné pro udělení titulu PhD. Proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze, dne 2.8.2012

RNDr Kateřina Kuželová, PhD