

OBSAH

SOUHRN.....	4
SUMMARY	5
1. ÚVOD	6
2. CÍLE PRÁCE.....	9
3. MATERIÁL A METODY.....	10
4. VÝSLEDKY.....	15
Metabolická aktivita a celkový obsah proteinů	15
Syntéza DNA	15
Proliferace a morfologie buněk.....	15
Analýza buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení anti-cyklin A2 /7-AAD	16
Změny v expresi proteinů spojených s buněčným cyklem.....	16
Stanovení sub G1 frakce buněčného cyklu	16
Aktivita kaspáz 3 a 7	17
Produkce superoxidu v mitochondriích	18
Vliv prooxidantu (BSO) a antioxidantu (MnTMPyP) na proliferaci buněk ovlivněných seleničitanem sodným	18
Poškození DNA a exprese proteinu p53	18
Vliv pifithrinu- α na antiproliferační a proapoptotické účinky seleničitanu sodného	18
Detekce autofagie	19
5. DISKUSE	20
6. ZÁVĚRY	24
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	25
8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA	27

SOUHRN

Kolorektální karcinom (CRC) představuje jedno z nejčastějších nádorových onemocnění, spojené navíc se značnou mortalitou. Velká pozornost se věnuje možnostem prevence vzniku CRC nejrůznějšími faktory vnějšího prostředí. Z výsledků řady epidemiologických a klinických studií vyplývá, že zvýšení hladin selenu v organismu koreluje se snížením rizika vzniku a rozvoje nádorových onemocnění včetně CRC. Rovněž v případech pokusných zvířat a v modelech *in vitro* prokázaly sloučeniny selenu schopnost inhibovat proliferaci nádorových buněk a indukovat buněčnou smrt. Cílem této práce bylo prozkoumat antiproliferační účinky seleničitanu sodného v modelu kolorektálního karcinomu *in vitro*, konkrétně u dvou modelových linií lidského kolorektálního karcinomu HCT 116 lišících se přítomností funkčního genu pro p53 protein.

Z výsledků práce vyplývá, že seleničitan sodný v koncentracích 2,5 μM – 10 μM inhiboval proliferaci a indukoval buněčnou smrt buněk HCT 116 v závislosti na koncentraci a době působení. Seleničitan sodný dále blokoval buněčný cyklus buněk HCT 116 v S/G2-M fázích, indukoval produkci superoxidu v mitochondriích, poškození DNA, expresi proteinu p53 a buněčnou smrt za účasti kaspáz. Buněčná smrt způsobená seleničitanem je u těchto buněk doprovázena autofagií. Buňky linie HCT 116-p53KO, neobsahující funkční gen p53, jsou v rámci sledovaného koncentračního rozmezí a časového intervalu méně citlivé k působení seleničitanu sodného než buňky linie HCT 116. Buňky linie HCT 116-p53KO jsou schopné odpovědět na působení seleničitanu sodného aktivací kaspáz, ne však v takové intenzitě jako buňky divokého typu. Získané výsledky svědčí o tom, že přítomnost funkčního proteinu p53 ovlivňuje reakci buněk HCT 116 na toxické působení seleničitanu sodného, zároveň se však v tomto modelu uplatňují i mechanismy na p53 nezávislé.

SUMMARY

Effects of sodium selenite in human colon cancer cells with different p53 status

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the leading causes of cancer - associated mortality. Great effort is spent on the investigation of prevention possibilities by various types of environmental factors. Several epidemiological studies and clinical studies have shown an inverse association between selenium intake and the risk of different types cancer including CRC. Also in animal models and cell lines *in vitro* selenium compounds have shown ability to inhibit proliferation and induce cell death. The aim of this study was to assess the antiproliferative effects of sodium selenite in colorectal cancer cells *in vitro*, particularly in two model colorectal cancer cell lines HCT 116 differing in their p53 status.

We have shown that sodium selenite in concentration range of 2.5 μM –10 μM inhibited proliferation and induced cell death in HCT 116 cells in a time- and concentration-dependent manner. Sodium selenite blocked the progression through the cell cycle in the S/G2-M phases, induced superoxide production in mitochondria, DNA damage and expression of p53 protein and activated cell death with involvement of caspases. Sodium selenite also increased the expression of autophagy markers. The HCT 116-p53KO cells, lacking functional p53 gene, were significantly less sensitive to sodium selenite treatment than the wild type HCT 116 cells. The HCT 116 cells were able to activate the effector caspases following sodium selenite treatment, but to significantly smaller extent compared to the wild type cell line. These results suggest that p53 status affects the reaction of model cell lines to sodium selenite treatment, however, they also indicate the presence of p53-independent mechanisms of selenite – induced cytotoxicity.

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Podle studie publikované v r. 2008 je kolorektální karcinom (CRC) celosvětově třetím nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a druhým nejčastějším u žen. Počet nově diagnostikovaných případů byl v tomto roce odhadován na 1 233 000, s předpokládaným počtem úmrtí 608 000 osob. V české republice je ročně diagnostikováno kolem 8000 nových případů kolorektálního karcinomu a přibližně 4500 postižených na toto onemocnění umírá. Více než 50 % nových případů je bohužel diagnostikováno v pokročilých klinických stádiích onemocnění, což významně zhoršuje prognózu pacienta [1].

Kolorektální karcinom vzniká jako důsledek akumulace genetických a epigenetických změn, které přemění normální střevní epitel v invazivní adenokarcinom. Klíčovou signální drahou v patogenezi CRC je Wnt – signální dráha, která je zodpovědná za udržování kompartmentu nediferencovaných kmenových buněk střevního epitelu. Jednou z prvních událostí v tumorigenezi CRC tak bývají mutace inaktivující protein APC, případně stabilizující β -katenin, které mají za následek zadržení nediferencovaných proliferujících buněk ve stěně krypty. Deregulace dráhy epidermálního růstového faktoru (EGF) nastává rovněž v časných fázích vývoje kolorektálního karcinomu. Aktivace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) vede prostřednictvím proteinu KRAS a jeho cíle BRAF k aktivaci MAPK signální dráhy, která stimuluje proliferaci a podporuje přežití buněk. Mutace signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) jsou přítomny až ve 40 % případů CRC a podporují zřejmě přechod onemocnění od stadia adenomu ke karcinomu. S maligní transformací adenomů jsou rovněž spojeny poruchy dráhy transformačního růstového faktoru β (TGF β). Inaktivující mutace postihují receptorové geny (TGFBR2 a TGFBR1) i geny pro transkripční faktory rodiny SMAD, zejména SMAD2 a SMAD4 [5, 11]. Aktivace IKK/NF- κ B signální dráhy se uplatňuje zejména v patogenezi CRC spojené s chronickým zánětlivým onemocněním [2, 3]

Protein p53 je klíčový tumor supresorový protein aktivovaný různými typy buněčného stresu. Specificky se váže na DNA a indukuje expresi řady genů hrajících roli v regulaci buněčného cyklu, opravě DNA a apoptóze. Mutace v genu pro p53 jsou přítomny ve více než polovině případů nádorových onemocnění, ve většině zbylých případů nacházíme další poruchy v rámci dráhy p53, které interferují s jeho funkcí. Ztráta funkce p53 umožňuje nádorové buňce uniknout apoptotické smrti a posilovat maligní

fenotyp, což vede často k rozvoji rezistence nádorových buněk vůči běžné radioterapii a chemoterapii [4]. V případě CRC jsou mutace v tumor supresorovém genu p53 nacházeny zejména v pozdních fázích progresu onemocnění (vyskytují se u 4-6 % adenomů, 50 % adenomů s invazivními ložisky a 50 – 75 % kolorektálních karcinomů) a korelují s agresivnějším fenotypem nádorových buněk [5].

Základní metodou léčby kolorektálního karcinomu je chirurgické odstranění nádorové tkáně, kombinované s chemoterapií. V léčbě se užívá 5-fluorouracilu, capecitabinu, oxaliplatinu a irinotecanu, derivátů kyseliny listové a rovněž biologických léčiv jako bevacizumab, cetuximab a panitumimab. Pro včasný záchyt onemocnění se provádí test na přítomnost okultního krvácení do stolice (TOKS) a případně kolonoskopické vyšetření [6]. Velká pozornost se věnuje prevenci CRC ovlivněním faktorů vnějšího prostředí, zejména vyváženou skladbou potravy, udržováním optimální tělesné hmotnosti a pravidelnou pohybovou aktivitou. Pokud se hovoří o chemoprevenci CRC, znamená to na jedné straně vyloučení škodlivých látek z diety, na druhé straně začlenění látek působících proti vzniku a rozvoji nádorového bujení, ať už přírodních, nebo syntetických. Tyto látky a faktory jsou studovány na různých úrovních, od in vitro modelů přes studie na pokusných zvířatech až po epidemiologické a klinické studie různého typu a rozsahu. Spektrum testovaných faktorů je velmi široké, od komplexních typu „konzumace ovoce a zeleniny“, až po farmaka snažící se zasáhnout specifický mechanismus v patogenezi CRC [7]. Mezi intenzivně studované chemopreventivní látky patří i sloučeniny selenu.

Selen je stopový prvek potřebný pro správnou funkci lidského organismu. Fyziologická role selenu je dána jeho přítomností v selenoproteinech, v nichž se vyskytuje ve formě selenocysteinu. Selenoproteiny se účastní klíčových buněčných procesů včetně biosyntézy deoxyribonukleotidů, odstraňování peroxidů, redukce oxidovaných proteinů a membrán, regulace redoxní signalizace a metabolismu hormonů štítné žlázy [8]. V šedesátých letech minulého století se objevily první zprávy o tom, že nízký obsah selenu v dietě zřejmě koreluje s vyšším výskytem nádorových onemocnění [9]. Za významný mezník je považována studie nazvaná Nutritional Prevention of Cancer Trial, která proběhla na přelomu 80. a 90. let minulého století v USA a prokázala vliv selenu na významné snížení výskytu nádorů prostaty, plic a tlustého střeva [10]. Od té doby

proběhla řada dalších studií, z nichž mnohé potvrdily příznivý vliv selenu v chemoprevenci nádorových onemocnění, jiné však nikoli [11, 12].

Slibné výsledky však přineslo studium protinádorových účinků různých sloučenin selenu u laboratorních zvířat a v modelech *in vitro*. Protinádorové účinky selenu jsou závislé na typu a koncentraci použité sloučeniny a také na typu biologického modelu. Chemopreventivní potenciál fyziologických dávek selenu spočívá v jeho antioxidačním působení prostřednictvím selenoproteinů. Předpokládá se, že určité kombinace polymorfismů v genech pro selenoproteiny mohou reflektovat funkční interakce mezi těmito proteiny a ovlivňovat tak dostupnost selenu pro různé tkáně, schopnost udržovat redoxní rovnováhu a kontrolovat redoxní signalizaci [13]. Sloučeniny selenu mají rovněž vliv na biotransformaci karcinogenních látek [14]. Při použití tzv. „supranutričních“ dávek (tj. netoxických dávek větších než jsou zapotřebí k zajištění maximální aktivity selenoproteinů) se uplatňuje spíše prooxidační působení selenu. Selen zasahuje do buněčné signalizace modifikací regulačních cysteinů různých enzymů a transkripčních faktorů, např. PKC, NF- κ B, AP-1, JNK, kaspázy 3 a ASK1 [15-17]. Ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy sloučeninami selenu byla popsána u řady typů nádorových buněk. Mechanismy indukce apoptózy selenem jsou komplexní a zahrnují produkci ROS a aktivovaci kináz JNK1, ERK1/2, p38 MAPK a Akt a dráhy p53 [18]. Selen rovněž inhiboval neoangiogenezi v nádorech vzniklých z xenotransplantátů nádorových buněk prostaty [19]. Z hlediska chemopreventivního působení selenu je dále velmi významné zjištění, že nádorové buňky mohou být citlivější k působení sloučenin selenu než jejich normální protějšky [19, 20]. Podrobnější výzkum účinků sloučenin selenu v různých buněčných modelech *in vitro* může tedy přinést nové poznatky o mechanismu jejich působení a přispět tak k jejich budoucímu využití v klinických aplikacích.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

V rámci této práce jsme si stanovili následující cíle:

1. Zjistit citlivost buněk linií lidského kolorektálního karcinomu HCT 116 a HCT 116-p53KO na působení seleničitanu sodného. Najít koncentrační rozmezí, ve kterém seleničitan sodný ovlivňuje buněčnou proliferaci a indukuje buněčnou smrt u těchto linií.
2. Podrobněji popsat mechanismus antiproliferativního účinku seleničitanu sodného s ohledem na buněčný cyklus.
3. Podrobněji popsat mechanismus buněčné smrti indukované seleničitanem sodným.
4. Zjistit, zda nepřítomnost funkčního proteinu p53 ovlivňuje citlivost buněk HCT 116 na působení seleničitanu sodného.

3. MATERIÁL A METODIKA

Buňky a jejich kultivace

Buňky lidského kolorektálního karcinomu linie HCT 116 byly zakoupeny prostřednictvím American Type Culture Collection (ATCC No CCL-247, Manassas, VA, USA), buňky linie HCT 116-p53 KO byly laskavě poskytnuty prof. B. Vogelsteinem z Johns Hopkins University v Baltimore. Linie byly kultivovány jako monolayer v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu, při 37°C v atmosféře 5 % CO₂. Buňky byly pasážovány po dosažení 80 % konfluence 2x týdně pomocí 0,05 % trypsinu/0,53 mM EDTA. Kultury byly pravidelně testovány na přítomnost mykoplazmat.

Ovlivnění buněk seleničitanem sodným

Buňky v logaritmické fázi růstu byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % roztoku trypsinu/0,53 mM EDTA, resuspendovány v kultivačním médiu, nasazeny do kultivačních lahví nebo 96-jamkových mikrotitračních destiček v hustotě 30 x 10³ buněk v 1 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Po 24-hodinové inkubaci bylo médium vyměněno za čerstvé médium v případě kontrolních vzorků nebo za médium obsahující seleničitan sodný a buňky byly dále kultivovány do uplynutí stanoveného časového intervalu.

Test metabolické aktivity (WST-1) a stanovení celkového množství proteinů v buňkách (Coomassie Brilliant Blue)

Kontrolní a ovlivněné buňky v mikrotitračních destičkách byly 2x opláchnuty PBS a do jamek bylo přidáno 100 µl WST-1 v médiu (0,3 mg/ml). Absorbance byla měřena při 450 nm proti 650 nm (Spektrofotometr SpektraFluor Plus, Tecan, Salzburg, Austria). Poté byly destičky umístěny do inkubátoru a měření bylo opakováno po 2 h. Po měření byly kultury 2x opláchnuty PBS a fixovány roztokem ve složení 50 % etanol, 49 % H₂O a 1 % ledová kyselina octová. Buňky byly barveny roztokem Coomassie Brilliant Blue v koncentraci 0,4 mg/ml po dobu 1 h. Poté byly opláchnuty roztokem ve složení 85 % destilovaná voda, 10 % absolutní etanol, 5 % ledová kyselina octová. Navázané barvivo bylo rozpuštěno přidáním 100 µl

desorpčního roztoku na jamku (98 mg octanu draselného, 700 ml etanolu a 300 ml H₂O) za mírného třepání po dobu 1 h. Absorbance byla měřena při 620 nm proti 450 nm.

Test DNA syntézy

Buňky byly nasazeny do černých 96-jamkových mikrotitračních destiček s transparentním dnem v hustotě 6×10^3 buněk na jamku ve 200 μ l média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium v jamkách vyměněno za 200 μ l čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 200 μ l média obsahujícího seleničitan sodný a buňky byly kultivovány v inkubátoru po dobu dalších 24 resp. 48 h. Na poslední čtyři hodiny inkubace bylo k buňkám přidáno 20 μ l roztoku BrDU o koncentraci 100 μ M. Dále jsme postupovali podle pokynů výrobce kitu (Cell Proliferation Elisa BrDU Kit). Chemiluminescence byla měřena na spektrofotometru.

Časoběrná videomikroskopie

Kontrolní a ovlivněné buňky byly umístěny na stolek invertovaného mikroskopu v prostoru s teplotou 37°C. Po dobu 72 h bylo snímáno vybrané reprezentativní zorné pole.

Analýza buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení anti-cyclin A2/7-AAD

Kontrolní a ovlivněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % trypsinu/0,53 mM EDTA a centrifugovány při 1000 rpm a 4°C po dobu 10 min, opláchnuty PBS a fixovány ledovým metanolem po dobu 10 min. Alikvoty 5×10^5 buněk byly přeneseny do mikroskopavek, opláchnuty 1 ml PBS + 5 % BSA, resuspendovány ve 100 μ l PBS + 5 % BSA a inkubovány s 20 μ l anti-cyclin A2-FITC (nebo 20 μ l izotypové kontroly - myší IgG1-FITC) a 20 μ l 7-AAD po dobu 60 min při pokojové teplotě ve tmě. Poté byly vzorky opláchnuty 1 ml PBS + 5 % BSA, resuspendovány v 500 μ l PBS + 5 % BSA a analyzovány na průtokovém cytometru.

Detekce proteinů Western blottingem

Buněčné lyzáty byly zahřívány po dobu 5 min při 95° C v SDS vzorkovém pufru (TRIS-HCL pH 6,8, 2,β-merkaptetanol, 10 % glycerol, SDS, 0,1 % bromfenolová modř) a poté nanášeny na 15 % SDS/polaykrylamidový gel. Po skončení elektroforézy byly proteiny přeneseny na PVDF membránu (100 V, 250 mA, 60 min) a inkubovány při 25°C po dobu 1 h v roztoku obsahujícím 5 % odtučněné sušené mléko, 10 mmol TRIS-HCL pH 8, 150 mM NaCl a

0,1 % Tween 20 (TBST). Membrány byly inkubovány s primárními protilátkami (anti-PCNA 1:100, anti-p21 1:500, anti-cyklin D1, anti-cyklin B1, anti-Cdc2 p34, anti- β aktin, anti-LC3B, anti-LAMP1, anti-p53, anti-pH2A.X, anti-pATM 1:1000) při 4°C přes noc, opláchnuty 6x po 5 min TBST, inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou (polyklonální prasečí proti-králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou nebo polyklonální prasečí proti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou 1 : °1000, 1 h, 25°C), opláchnuty 6x TBST a signál byl vyvolán pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu.

Stanovení sub G1 frakce buněčného cyklu

Kontrolní a ovlivněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % trypsinu/0.53 mM EDTA a resuspendovány v čerstvém médiu. Původní médium bylo před trypsinováním odebráno a poté přidáno k resuspendovaným buňkám, abych nedošlo ke ztrátě plovoucích buněk. Vzorky byly zcentrifugovány při 1000 rpm a 4°C po dobu 10 min, opláchnuty PBS a fixovány 2 ml ledového 70 % etanolu za mírného vortexování. Fixované vzorky byly uloženy při 4°C přes noc. Poté byly buňky opláchnuty PBS a jejich hustota upravena na 1×10^6 buněk/ml vzorku. Buňky byly inkubovány s 0,5 ml fosfát-citrátového pufru (0.2 M Na₂ HPO₄, 0.1 M citrát, pH 7.8) po dobu 5 min, opláchnuty PBS a inkubovány s 0,5 ml Vindelovova roztoku (1.2 g/l TRIS, 0,6 g/l NaCl, 0.01 g/l RNáza a 0.05 g/l propidium jodid) po dobu 1 h při 37°C ve tmě. Poté byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

Detekce aktivních kaspáz 3 a 7 pomocí průtokové cytometrie

Kontrolní a ovlivněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % trypsinu/0.53 mM EDTA a resuspendovány v čerstvém médiu. Původní médium bylo před trypsinováním slito a poté přidáno k resuspendovaným buňkám, aby nedošlo ke ztrátě plovoucích buněk. Hustota buněčné suspenze byla upravena na 1×10^6 buněk/ml. K 300 μ l této suspenze bylo přidáno 10 μ l roztoku FLICA (fluorescenční inhibitor kaspáz) připraveného podle pokynů výrobce (Vybrant® FAM Caspase-3 and 7-Assay Kit for Flow Cytometry, Molecular Probes) a buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5 % CO₂ po dobu 1 h. Během inkubace byly vzorky 3x krátce protřepány. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány při 1000 rpm a 20°C po dobu 10 min, 2x propláchnuty 1 ml promývacího pufru (dodaného výrobcem jako součást kitu), resuspendovány ve 400 μ l promývacího pufru a analyzovány na průtokovém cytometru.

Modulace účinků seleničitanu sodného prooxidantem (BSO) a anti-oxidantem (MnTMPyP)

Do každé jamky 16-jamkové E-destičky bylo napipetováno 90 μl média a byla změřena základní hodnota impedance (pozadí) ve všech jamkách. Poté bylo do jamek přidáno 100 μl buněčné suspenze v hustotě 5×10^4 buněk na jamku. Po 24-hodinové inkubaci v RTCA stanici bylo do jamek přidáno 10 μl kultivačního média (kontrolní jamky) nebo 10 μl média obsahujícího seleničitan sodný (výsledná koncentrace 10 μM), BSO (výsledná koncentrace 100 μM), MnTMPyP (výsledná koncentrace 5 μM) a kombinace BSO + seleničitan sodný a MnTMPyP + seleničitan sodný v uvedených koncentracích. Buňky byly kultivovány v RTCA stanici po dobu dalších 48 h, hodnota buněčného indexu byla snímána každou hodinu.

Modulace účinků seleničitanu sodného pifithrinem- α

Do každé jamky 16-jamkové E-destičky bylo napipetováno 90 μl média a byla změřena základní hodnota impedance (pozadí) ve všech jamkách. Poté bylo do jamek přidáno 100 μl buněčné suspenze v hustotě 5×10^4 buněk na jamku. Po 6-hodinové inkubaci v RTCA stanici bylo do jamek přidáno 10 μl kultivačního média (kontrolní jamky) nebo 10 μl média obsahujícího seleničitan sodný (výsledná koncentrace 10 μM) nebo pifithrin- α (výsledná koncentrace 10 μM) a kombinaci seleničitanu sodného a pifithrinu- α v uvedených koncentracích. Buňky byly kultivovány v RTCA stanici po dobu 48 h, hodnota buněčného indexu (impedance) byla snímána každou hodinu.

Fluorescenční detekce superoxidu v mitochondriích

Buňky byly nasazeny do cytopsinových komůrek v hustotě 3×10^4 buněk v 1 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 1 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 1 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentraci 10 μM a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 h. Po ukončení doby ovlivnění byly buňky opláchnuty PBS s přísadkou Ca²⁺ a Mg²⁺ iontů (37°C) a inkubovány s 1 ml média DMEM (37°C) obsahujícího MitoTracker® Green (0,1 $\mu\text{l/ml}$) a MitoSOX™ Red (5 μM). Poté byly buňky opláchnuty DMEM (37°C), dobarveny barvivem Hoechst 33342 (5 μM v DMEM) po dobu 5 min, opět opláchnuty DMEM (37°C), přikryty krycím sklem a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu.

Imunofluorescenční detekce fosforylovaného histonu H2A.X

Kontrolní a ovlivněné buňky v cytospinových komůrkách byly opláchnuty PBS, fixovány čerstvým paraformaldehydem (2 % v PBS) po dobu 15 min, opláchnuty 3x PBS a blokovány mlékem (5 % v PBS-T) po dobu 30 min při pokojové teplotě. Poté byly buňky inkubovány s primární protilátkou proti fosforylovanému histonu H2A.X v ředění 1:100 v mléku (5 % v PBS-T) při teplotě 4°C po dobu 1 h. Po skončení inkubace byly buňky 4x opláchnuty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou (proti-králičí Alexa Fluor® 488, ředění 1:250 v mléku - 5 % v PBS-T) po dobu 1 h při pokojové teplotě. Vzorky byly dobarveny barvivem DAPI v koncentraci 10 µg/ml po dobu 5 min, opláchnuty 3 x PBS, zamontovány do SlowFade® média a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu).

Vliv pifithrinu-α na aktivaci kaspáz po ovlivnění seleničitanem sodným

Buňky byly nasazeny do 25 cm² ml kultivačních lahví v hustotě 3 x 10⁵ buněk v 10 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5% CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 10 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentraci 10 µM, pifithrin-α v koncentraci 10 µM, případně kombinaci seleničitanu sodného a pifithrinu-α v uvedených koncentracích a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 resp. 48 h. Vzorky byly dále zpracovány postupem uvedeným výše (detekce aktivních kaspáz 3 a 7 pomocí průtokové cytometrie).

Fluorescenční detekce monodansylcadaverinu

Kontrolní a ovlivněné buňky byly inkubovány s 50 µM monodansylcadaverinu a vzorky byly inkubovány 60 min při 37°C ve tmě. Změny ve fluorescenci byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu.

Statistické vyhodnocení

Předkládané výsledky jsou průměrem ze tří nezávislých měření. Statistická analýza dat byla provedena statistickým programem GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Byl použit Anova test s následným hodnocením podle Dunetta či Bonferroniho (mnohočetný porovnávací test). Výsledky byly porovnávány s kontrolou, přičemž rozdíly byly považovány za signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

Metabolická aktivita a celkový obsah proteinů

Účinek seleničitanu sodného na buňky linií HCT 116 a HCT 116-p53KO byl nejprve stanoven měřením metabolické aktivity testem WST-1 a dále měřením celkového obsahu proteinů metodou barvení Coomassie Brilliant Blue v průběhu 24 h. U buněk HCT 116 došlo ke snížení metabolické aktivity po působení seleničitanu sodného v koncentracích 10 μM a vyšších, ke snížení celkového obsahu proteinů od koncentrace 2,5 μM . Buňky HCT 116-p53KO byly méně citlivé k působení seleničitanu sodného, k významnému snížení metabolické aktivity a celkového obsahu proteinů u nich došlo až od koncentrace 25 μM této látky. Na základě těchto výsledků byly pro další testování zvoleny koncentrace 2,5 μM , 5 μM a 10 μM seleničitanu sodného.

Syntéza DNA

Vliv seleničitanu sodného na syntézu DNA u buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO byl stanoven metodou inkorporace BrDU s chemiluminiscenční detekcí. Seleničitan sodný snižoval množství inkorporovaného BrDU u obou buněčných linií v závislosti na koncentraci a době působení. V intervalu 24 h došlo u linie HCT 116 k významnému poklesu množství inkorporovaného BrDU ve srovnání s kontrolním vzorkem již od koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného, u linie HCT 116-p53KO od koncentrace 5 μM seleničitanu sodného. V intervalu 48 h byla syntéza DNA významně snížena u obou linií od koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného. Inkorporace BrDU byla méně inhibována seleničitanem sodným u linie HCT 116-p53KO ve srovnání s linií HCT 116, statisticky významné rozdíly mezi liniemi byly zjištěny v obou časových intervalech v koncentracích 2,5 μM a 5 μM seleničitanu sodného, v koncentraci 10 μM tyto rozdíly vymizely.

Proliferace a morfologie buněk

Buňky linií HCT 116 a HCT 116-p53KO kontrolní a ovlivněné seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM byly časosběrně snímány po dobu 72 h. Seleničitan sodný inhiboval proliferaci obou buněčných linií v závislosti na koncentraci a době působení. V ovlivněných buňkách docházelo k tvorbě četných cytoplazmatických vakuol buňky se zakulacovaly, odpojovaly od podkladu a vytvářely dynamicky se měnící výběžky

cytoplazmy, tzv. „blebs“. Výrazný rozdíl v citlivosti obou linií byl patrný již v koncentraci 5 μM seleničitanu sodného.

Analýza buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení anti-cyklin A2 /7-AAD

Vliv seleničitanu sodného na distribuci fází buněčného cyklu s ohledem na expresi cyklinu A2 u buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO byl stanoven pomocí průtokové cytometrie. Expresce cyklinu A2 byla detekována pomocí fluorescenčně značené protilátky, DNA byla barvena 7-AAD (Obr. 5-4A,B). Ve srovnání s linií HCT 116 projevovaly buňky linie HCT 116-p53KO výraznější tendenci hromadit se v S/G2 fázích buněčného cyklu, což bylo patrné zejména v koncentracích 5 μM a 10 μM seleničitanu sodného. Statisticky významný rozdíl v procentu buněk pozitivních na cyklin A2 mezi liniemi HCT 116 a HCT 116-p53KO byl zjištěn v koncentracích 5 μM a 10 μM seleničitanu sodného v intervalu 24 h a 5 μM seleničitanu sodného v intervalu 48 h.

Změny v expresi proteinů spojených s buněčným cyklem

Vliv seleničitanu sodného v koncentraci 10 μM na expresi proteinů spojených s buněčným cyklem byl stanoven pomocí Western blottingu. Po ovlivnění seleničitanem sodným došlo k přechodnému zvýšení a následnému poklesu exprese proteinu PCNA u obou sledovaných linií, u buněk HCT 116 byl přechodný vzestup exprese výraznější a delší. Expresce cyklinu B1 u linie HCT 116 stoupala během 16 h ovlivnění, poté začala klesat, zatímco u linie HCT 116-p53KO přetrvávala zvýšená exprese cyklinu B1 nejméně do 36 h po ovlivnění. U obou linií došlo k poklesu exprese cyklinu D1. Expresce kinázy Cdc2 p34 (Cdk1) u linie HCT 116 po přechodném poklesu mírně stoupla, u buněk HCT 116-p53KO stoupala během 48 h ovlivnění. U obou linií byla indukována exprese proteinu p21.

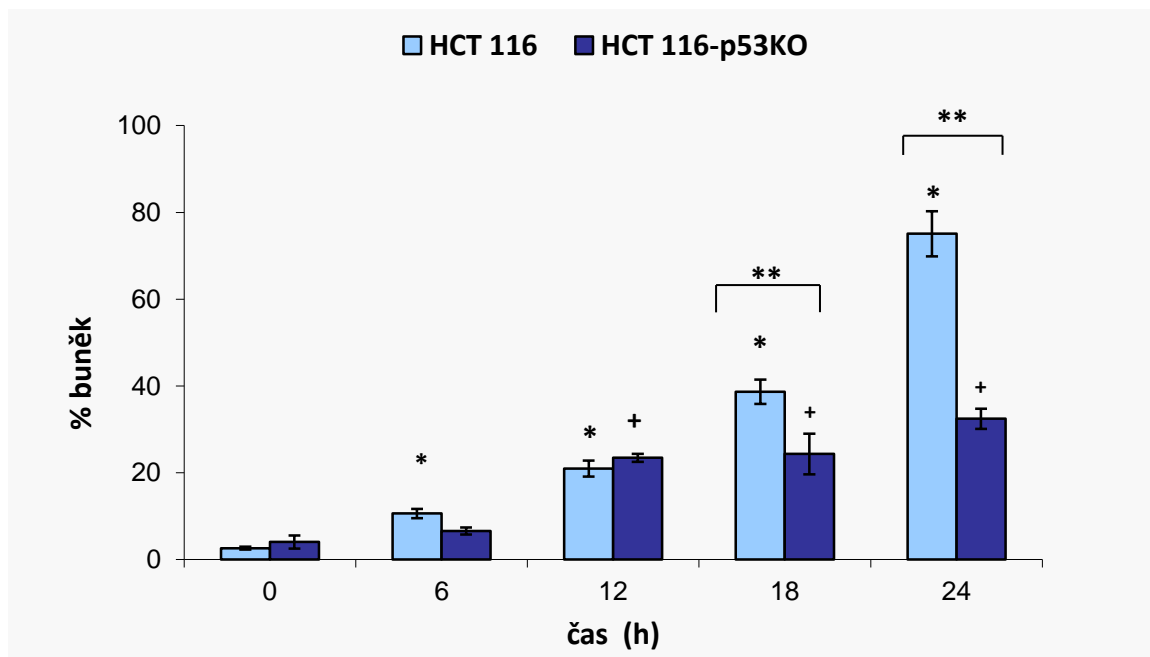
Stanovení sub G1 frakce buněčného cyklu

Velikost sub G1 frakce buněčného cyklu u buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO byla stanovena pomocí průtokové cytometrie metodou barvení DNA propidium jodidem. Seleničitan sodný v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM měnil distribuci fází buněčného cyklu a způsoboval zvýšení sub G1 frakce (Obr. 5-6A). Tento účinek byl významně silnější

u buněk linie HCT 116 a to od koncentrace 5 μM seleničitanu sodného v časovém intervalu 24 h a od koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného v intervalu 48 h.

Aktivita kaspáz 3 a 7

Vliv seleničitanu sodného v koncentraci 10 μM na aktivitu kaspáz 3 a 7 u buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO v průběhu 24 h byl stanoven pomocí průtokové cytometrie za použití fluorescenčního inhibitoru kaspáz (FLICA). Seleničitan sodný v koncentraci 10 μM zvyšoval procento buněk pozitivních na přítomnost aktivních kaspáz 3 a 7. Významný nárůst frakce pozitivních buněk ve srovnání s časem 0 h byl zaznamenán u linie HCT 116 od 6 h po ovlivnění, u linie HCT 116-p53KO od 12 h po ovlivnění. Statisticky významný rozdíl mezi liniemi byl patrný v intervalu 18 h a 24 h, kdy procento buněk s aktivními kaspázami 3 a 7 bylo vyšší u linie HCT 116 (Obr.1)



Obr. 1 Procento buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO pozitivních na přítomnost aktivovaných kaspáz 3 a 7, ovlivněných seleničitanem sodným v koncentraci 10 μM během 24 h. * významný rozdíl proti kontrole (HCT 116), + významný rozdíl proti kontrole (HCT 116-p53KO), ** významný rozdíl mezi liniemi HCT 116 a HCT 116-p53KO, $p < 0.05$.

Produkce superoxidu v mitochondriích

Produkce superoxidu v mitochondriích buněk HCT 116 byla detekována kombinovaným fluorescenčním barvením MitoTracker®Green pro detekci mitochondrií a MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator pro detekci superoxidu. Seleničitan sodný v koncentraci 10 μM v časových intervalech 3 h, 6 h, 12 h, 18 h a 24 h stimuloval produkci superoxidu v mitochondriích, což se projevilo intenzivní červenou fluorescencí mitochondrií.

Vliv prooxidantu (BSO) a antioxidantu (MnTMPyP) na proliferaci buněk ovlivněných seleničitanem sodným

Vliv seleničitanu sodného v kombinaci s BSO (L-buthionin-sulfoximin) a MnTMPyP (Mn(III)tetrakis(1-Methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride) na proliferaci buněk HCT 116 byl sledován v průběhu 48 h metodou měření impedance pomocí systému xCELLigence. Kombinace 100 μM BSO + 10 μM seleničitanu sodného způsobila nejprve nárůst a poté výrazný pokles buněčného indexu ve srovnání se samotným 10 μM seleničitanem sodným. Naopak MnTMPyP v koncentraci 5 μM téměř eliminoval cytotoxický účinek seleničitanu sodného.

Poškození DNA a exprese proteinu p53

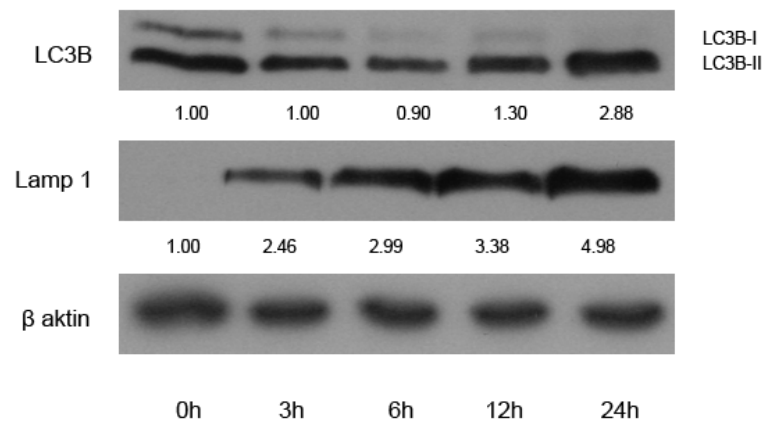
Expese proteinů indikujících poškození DNA u buněk HCT 116 po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentraci 10 μM byla detekována metodou Western blottingu a imunofluorescenčním barvením. Seleničitan sodný v uvedené koncentraci zvyšoval množství fosforylované ATM kinázy, fosforylovaného histonu H2A.X a proteinu p53. Přítomnost fosforylovaného histonu H2A.X byla detekována rovněž pomocí imunofluorescenčního barvení.

Vliv pifithrinu- α na antiproliferační a proapoptotické účinky seleničitanu sodného

Vliv pifithrinu- α na proliferaci buněk linie HCT 116 po ovlivnění 10 μM seleničitanu sodného byl sledován v průběhu 48 h metodou měření impedance pomocí systému xCELLigence a dále měřením aktivity kaspáz 3 a 7 metodou FLICA pomocí průtokové cytometrie. Pifithrin- α v koncentraci 10 μM nezabránil snížení buněčného indexu u buněk ovlivněných seleničitanem sodným rovněž neměl vliv na aktivaci kaspáz 3 a 7.

Detekce autofagie

Markery autofagie u buněk HCT 116 po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M byly sledovány metodou imunofluorescenční detekce a Western blottingu. Seleničitan sodný způsoboval vakuolizaci cytoplazmy ovlivněných buněk a zvýšení intenzity barvení monodansylcadaverinem indikujícím přítomnost autofagických vakuol. U ovlivněných buněk došlo také ke konverzi cytosolického LC3B-I proteinu na lipidovaný LC3B-II protein a k zvýšení exprese proteinu LAMP1 (Obr. 2).



Obr. 2 Exprese proteinů LC3B a LAMP1 u buněk HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M v intervalu 24 h.

5. DISKUSE

Sloučeniny selenu prokázaly v celé řadě klinických studií schopnost příznivě ovlivňovat výskyt nádorů u sledovaných jedinců a staly se jedněmi z nejintenzivněji studovaných chemopreventivních látek. Biologické účinky selenu jsou závislé na koncentraci a chemické formě sloučeniny a také, jak se stále více ukazuje, na typu buněčného modelu. Nádorové buňky jsou velmi heterogenní, maligního potenciálu dosahují různými mechanismy a obsahují aktivační či inhibiční mutace a epigenetické změny v různých signálních drahách, což může ovlivnit jejich reakci na působení selenu. Na druhou stranu sloučeniny selenu nepůsobí v buňce na jeden izolovaný děj nebo kompartment, jejich účinek je spíše komplexní a proto výsledek studie závisí na konkrétní kombinaci chemické formy selenu a studovaného buněčného modelu.

Seleničitan sodný byl jednou z prvních forem selenu používaných s úspěchem v chemoprevenci, později byla však zdůrazňována jeho vyšší toxicita a proto byl v klinických studiích opomíjen. Negativní výsledek projektu SELECT, rozsáhlé klinické studie zaměřené na chemoprevenci nádorů prostaty selenem a vitamínem E, přinesl značné rozčarování a zároveň dal podnět k diskusi o možných příčinách neúspěchu. Jedním z nejvíce diskutovaných faktorů je volba selenomethioninu, organické sloučeniny selenu podávané v této studii samostatně nebo v kombinaci s vitamínem E. V této souvislosti došlo k znovuobjevení seleničitanu jako vhodné formy selenu pro použití v klinických studiích a to tím spíše, že i pokusy *in vitro* přinesly další řadu důkazů o jeho protinádorovém působení [21].

Seleničitan sodný prokázal schopnost inhibovat proliferaci a indukovat buněčnou smrt u různých typů nádorových buněčných linií, zejména u buněk nádorů prostaty [22], děložního čípku [23], plic [24] a leukémií [25]. Relativně málo prací se však zabývalo účinky seleničitanu sodného v modelu kolorektálního karcinomu, přestože právě tento typ nádoru v klinických studiích příznivě reagoval na suplementaci selenem [10]. V této souvislosti rovněž nebyly k dispozici informace o roli proteinu p53 v reakci buněk kolorektálního karcinomu na buněčný stres způsobený seleničitanem sodným. Proto jsme v rámci této práce provedli sérii experimentů využívajících izogenní buněčné linie HCT 116 a HCT 116-p53KO lišící se pouze přítomností genu pro p53 protein, s cílem zjistit, jaká je citlivost těchto linií na seleničitan sodný a zda rozdíl v genotypu bude hrát roli v jejich odpovědi na ovlivnění touto látkou.

Zjistili jsme, že seleničitan sodný inhibuje proliferaci a indukuje buněčnou smrt u obou modelových linií, a to v závislosti na koncentraci a době působení. Koncentrační rozmezí, v němž selen projevoval inhibiční účinky na proliferaci buněk bylo poměrně úzké. Zatímco koncentrace 2,5 μM u sledovaných linií vykazovala relativně mírný toxický účinek, koncentrace 10 μM již výrazně inhibovala proliferaci a indukovala buněčnou smrt. Pokud uvažujeme klinickou relevanci těchto dávek, koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného představuje 200 $\mu\text{g/l}$ selenu, je tedy mírně vyšší než obvykle udávané koncentrace selenu v krvi zdravých jedinců, které se nejčastěji pohybují v rozmezí 76-151 $\mu\text{g/l}$ [26]. Zpráva WHO nicméně udává jako horní hranici zjištěnou u zdravých jedinců právě koncentraci 2,5 μM [27], zatímco koncentrace selenu v séru účastníků klinické studie SELECT dosahovaly při dlouhodobé suplementaci selenem hodnot až 250 $\mu\text{g/l}$ [11]. Koncentrace 5 μM odpovídá přibližně maximální bezpečné denní dávce, jak byla předběžně stanovena WHO [28]. Koncentrace 10 μM se již blíží hranici, kdy se u citlivých jedinců projevují příznaky selenózy [27].

Z našich výsledků dále vyplývá, že seleničitan sodný stimuluje v buňkách linií HCT 116 a HCT 116-p53KO produkci superoxidu, způsobuje oxidativní stres, inhibuje proliferaci zástavou buněčného cyklu v S/G2 fázích a indukuje buněčnou smrt za účasti kaspáz. Tato zjištění jsou v souladu s údaji publikovanými kolektivem čínských autorů současně s naší prací, které popisují redox-dependentní aktivaci proteinu Bax, aktivaci kinázy JNK-1 indukci apoptózy seleničitanem sodným u buněčných linií kolorektálního karcinomu SW 480, HCT 116 a HT29 [29, 30]. Naše výsledky dále ukázaly, že buňky linie HCT 116-p53KO jsou méně citlivé k působení seleničitanu sodného než původní linie divokého typu a že tedy přítomnost funkčního proteinu p53 může hrát roli v reakci buněk na ovlivnění seleničitanem sodným. V buněčném modelu promyelocytické leukémie linie NB4 bylo zjištěno, že seleničitan sodný indukuje translokaci p53 do mitochondrií a aktivuje mitochondriální cestu apoptózy [31]. Dále bylo prokázáno, že buňky lidského karcinomu prostaty linie LNCaP obsahující funkční protein p53 jsou citlivější k působení seleničitanu sodného než buňky linií p53-null PC3 a DU 145 a že aktivace p53 je nutná pro dlouhodobé udržení zvýšené produkce superoxidu v mitochondriích. U buněk karcinomu prostaty postrádajících funkční protein p53 tato zpětná vazba mezi p53 a mitochondriemi neexistuje a seleničitan zde indukuje buněčnou smrt v menším rozsahu a

na kaspázách nezávislou [32, 33]. V našem buněčném modelu jsme však po ovlivnění seleničitanem sodným detekovali aktivované kaspázy 3 a 7 i v případě linie HCT 116-p53KO. Seleničitan sodný v koncentraci 10 μM zvýšil expresi proteinu p53 v buňkách HCT 116, použití inhibitoru p53 pifithrinu- α však nemělo žádný vliv na snížení buněčné proliferace ani na aktivaci kaspáz. Buňky linií HCT 116 jsou tedy zřejmě schopné reagovat na seleničitan sodný aktivací kaspáz bez ohledu na p53 status, tato reakce je však u buněk divokého typu rychlejší a výraznější. Vzhledem k výše zmíněné nově odhalené roli proteinu Bax v apoptóze indukované seleničitanem u buněk HCT 116 [30] je možné se domnívat, že redoxní aktivace Bax se uplatňuje i v případě buněk HCT 116-p53KO a je příčinou aktivace apoptotické odpovědi těchto buněk i v nepřítomnosti funkčního p53. Touto hypotézou se chceme zabývat v naší další práci. Na druhou stranu výzkum v buněčném modelu mesotheliomu odhalil, že pifithrin- α sice nezabránil apoptóze indukované seleničitanem u ovlivněných buněk, snižoval však významně základní hladinu apoptózy u selenem neovlivněných kontrol. Autoři předpokládají, že p53 je přímo inaktivován seleničitanem a diskutují možné mechanismy této inaktivace včetně vytěsnění atomu zinku v p53 seleničitanem nebo redoxní inaktivace jeho cysteinových zbytků [24].

Významným buněčným mechanismem, který by mohl hrát roli v odpovědi buněk na seleničitan sodný, je také autofagie. Je známo, že regulace apoptózy a autofagie je vzájemně provázaná a že tyto dva mechanismy mohou v některých případech operovat společně v procesu vedoucím k buněčné smrti, v jiných naopak působí proti sobě [34]. Informace o roli autofagie v buněčné smrti indukované sloučeninami selenu jsou zatím skrovné. V buňkách gliomu indukoval seleničitan sodný v koncentraci 7 μM autofagickou buněčnou smrt charakterizovanou zkracováním, zakulacováním a bobtnáním mitochondrií, snížením hladin mitochondriálních proteinů a pohlcováním mitochondrií autofagickými vakuolami. Zároveň nebyly pozorovány žádné známky apoptózy, reakce TUNEL byla negativní a proces buněčné smrti nebyl ovlivněn inhibitory kaspáz [35]. V buňkách promyelocytické leukémie seleničitan sodný naopak inhiboval autofagii zřejmě prostřednictvím PI3K/Akt dráhy a indukoval apoptózu, navíc inhibice autofagie specifickými inhibitory dále zvýšila rozsah apoptotické smrti indukované seleničitanem [36]. V naší práci jsme jako první detekovali markery autofagie u buněk kolorektálního karcinomu po ovlivnění seleničitanem sodným. Buňky linie HCT 116 v přítomnosti 10 μM

seleničitanu sodného vytvářely četné cytoplazmatické vakuoly viditelné ve fázově kontrastním mikroskopu. Jejich jednoznačná identifikace a analýza jejich obsahu v současné době probíhá, nicméně fluorescenční mikroskopie dále potvrdila pozitivitu těchto vakuol na barvení monodansylcadaverinem. Zároveň došlo ke zvýšení hladin modifikovaného proteinu LC3B, jenž je markerem časných autofagosomů a ke zvýšení exprese lysosomálního proteinu LAMP-1. Zdá se tedy, že apoptotická smrt indukovaná seleničitanem sodným je u buněk HCT 116 doprovázena autofagií. Protože bylo prokázáno, že p53 status buněk ovlivňuje rozsah autofagie a že buňky HCT 116-p53KO mají zvýšené základní hladiny autofagických markerů [37], není vyloučeno, že rozdíly v citlivosti buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO mohou být částečně ovlivněny také interakcí mezi apoptotickými a autofagickými programy v těchto buňkách. Pokud by seleničitan skutečně zasahoval do mechanismů autofagie, znamenalo by to rozšíření jeho buněčných cílů o další oblast, z hlediska terapie nádorů potenciálně významnou.

6. ZÁVĚRY

1. Seleničitan sodný inhiboval proliferaci a indukoval buněčnou smrt buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO v závislosti na koncentraci a době působení. Toxicita seleničitanu sodného se projevovala od koncentrace 2,5 μM , výrazný toxický účinek byl spojen s koncentrací 10 μM .

2. Seleničitan sodný v koncentračním rozmezí 2,5 μM - 10 μM měnil distribuci fází buněčného cyklu a expresi proteinů spojených s buněčným cyklem. Získané výsledky svědčí o zástavě buněčného cyklu v S/G2-M fázích.

3. Seleničitan sodný v koncentraci 10 μM indukoval u buněk linie HCT 116 produkci superoxidu v mitochondriích, poškození DNA, expresi proteinu p53 a buněčnou smrt za účasti kaspáz. Buněčná smrt způsobená seleničitanem je u těchto buněk doprovázena autofagií.

4. Buňky linie HCT 116-p53KO jsou v rámci sledovaného koncentračního rozmezí a časového intervalu méně citlivé k působení seleničitanu sodného než buňky linie HCT 116. Buňky linie HCT 116-p53KO jsou schopné odpovědět na působení seleničitanu sodného aktivací kaspáz, ne však v takové intenzitě jako buňky divokého typu. Použití pifithrinu- α neovlivnilo reakci buněk HCT 116 na toxické působení seleničitanu sodného. Získané výsledky svědčí o tom, že přítomnost funkčního proteinu p53 ovlivňuje reakci buněk HCT 116 na toxické působení seleničitanu sodného, zároveň se však v tomto modelu uplatňují i mechanismy na p53 nezávislé.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Dušek, L., Abrahámová, J., Mužík, J., Májek, O., Pavlík, T., Koptíková, J., Vyzula, R., and Fínek, J. (2009). Populační odhady počtu nemocných s kolorektálním karcinomem - jeden z nástrojů včasné diagnostiky časných stadií a rekurence onemocnění. *Farmakoterapie* 5, 11-20.
2. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
3. Pritchard, C.C., and Grady, W.M. (2010). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*.
4. Wiman, K.G. (2006). Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ* 13, 921-926.
5. Leslie, A., Carey, F.A., Pratt, N.R., and Steele, R.J. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 89, 845-860.
6. Urban, O. (2008). Diagnostika kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 2(1), 9-11.
7. Marshall, J.R. (2008). Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention, and lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am* 37, 73-82, vi.
8. Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., and Khanna, K.K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 9, 775-806.
9. Shamberger, R.J., and Frost, D.V. (1969). Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc J* 100, 682.
10. Clark, L.C., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., et al. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Jama* 276, 1957-1963.
11. Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., et al. (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* 301, 39-51.
12. Thorpe, J.F., Jain, S., Marczylo, T.H., Gescher, A.J., Steward, W.P., and Mellon, J.K. (2007). A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention. *Ann R Coll Surg Engl* 89, 207-211.
13. Meplan, C., Hughes, D.J., Pardini, B., Naccarati, A., Soucek, P., Vodickova, L., Hlavata, I., Vrana, D., Vodicka, P., and Hesketh, J.E. (2010). Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 1074-1079.
14. El-Bayoumy, K., and Sinha, R. (2004). Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res* 551, 181-197.
15. Gopalakrishna, R., Chen, Z.H., and Gundimeda, U. (1997). Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch Biochem Biophys* 348, 37-48.
16. Park, H.S., Huh, S.H., Kim, Y., Shim, J., Lee, S.H., Park, I.S., Jung, Y.K., Kim, I.Y., and Choi, E.J. (2000). Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism. *J Biol Chem* 275, 8487-8491.
17. Park, H.S., Park, E., Kim, M.S., Ahn, K., Kim, I.Y., and Choi, E.J. (2000). Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism. *J Biol Chem* 275, 2527-2531.
18. Sanmartin, C., Plano, D., and Palop, J.A. (2008). Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini Rev Med Chem* 8, 1020-1031.
19. Wang, Z., Hu, H., Li, G., Lee, H.J., Jiang, C., Kim, S.H., and Lu, J. (2008). Methylseleninic acid inhibits microvascular endothelial G1 cell cycle progression and decreases tumor microvessel density. *Int J Cancer* 122, 15-24.

20. Olm, E., Fernandes, A.P., Hebert, C., Rundlof, A.K., Larsen, E.H., Danielsson, O., and Bjornstedt, M. (2009). Extracellular thiol-assisted selenium uptake dependent on the x(c)-cystine transporter explains the cancer-specific cytotoxicity of selenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 11400-11405.
21. Brozmanova, J., Manikova, D., Vlckova, V., and Chovanec, M. (2010). Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol* *84*, 919-938.
22. Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H., and Lu, J. (2002). Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* *1*, 1059-1066.
23. Rudolf, E., Rudolf, K., and Cervinka, M. (2008). Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biol Toxicol* *24*, 123-141.
24. Nilsonne, G., Olm, E., Szulkin, A., Mundt, F., Stein, A., Kocic, B., Rundlof, A.K., Fernandes, A.P., Bjornstedt, M., and Dobra, K. (2009). Phenotype-dependent apoptosis signalling in mesothelioma cells after selenite exposure. *J Exp Clin Cancer Res* *28*, 92.
25. Cao, T.M., Hua, F.Y., Xu, C.M., Han, B.S., Dong, H., Zuo, L., Wang, X., Yang, Y., Pan, H.Z., and Zhang, Z.N. (2006). Distinct effects of different concentrations of sodium selenite on apoptosis, cell cycle, and gene expression profile in acute promyelocytic leukemia-derived NB4 cells. *Ann Hematol* *85*, 434-442.
26. Muecke, R., Schomburg, L., Buentzel, J., Kisters, K., and Micke, O. (2010). Selenium or no selenium--that is the question in tumor patients: a new controversy. *Integr Cancer Ther* *9*, 136-141.
27. (2002). Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation., F.a.A.O.W.H. Organization, ed. (Bangkok: FAO / WHO), pp. 105-122.
28. (2000). Selenium. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. . I.o.M. Food and Nutrition Board, ed. (Washington, DC: National Academy Press), pp. 284-324.
29. Fang, W., Han, A., Bi, X., Xiong, B., and Yang, W. (2010). Tumor inhibition by sodium selenite is associated with activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1 and suppression of beta-catenin signaling. *Int J Cancer* *127*, 32-42.
30. Huang, F., Nie, C., Yang, Y., Yue, W., Ren, Y., Shang, Y., Wang, X., Jin, H., Xu, C., and Chen, Q. (2009). Selenite induces redox-dependent Bax activation and apoptosis in colorectal cancer cells. *Free Radic Biol Med* *46*, 1186-1196.
31. Guan, L., Huang, F., Li, Z., Han, B., Jiang, Q., Ren, Y., Yang, Y., and Xu, C. (2008). P53 transcription-independent activity mediates selenite-induced acute promyelocytic leukemia NB4 cell apoptosis. *BMB Rep* *41*, 745-750.
32. Li, G.X., Hu, H., Jiang, C., Schuster, T., and Lu, J. (2007). Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* *120*, 2034-2043.
33. Zhao, R., Xiang, N., Domann, F.E., and Zhong, W. (2006). Expression of p53 Enhances Selenite-Induced Superoxide Production and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* *66*, 2296-2304.
34. Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., and Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* *16*, 966-975.
35. Kim, E.H., Sohn, S., Kwon, H.J., Kim, S.U., Kim, M.J., Lee, S.J., and Choi, K.S. (2007). Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* *67*, 6314-6324.
36. Ren, Y., Huang, F., Liu, Y., Yang, Y., Jiang, Q., and Xu, C. (2009). Autophagy inhibition through PI3K/Akt increases apoptosis by sodium selenite in NB4 cells. *BMB Rep* *42*, 599-604.
37. Morselli, E., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Kepp, O., Criollo, A., Vicencio, J.M., Soussi, T., and Kroemer, G. (2008). Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* *7*, 3056-3061.

8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

Monografie a kapitoly v monografiích

Rudolf E., Rudolf K., Králová V., Schroterová L., Červinka M.: DNA damage signaling in human skin cells exposed to hexavalent chromium. *New research on DNA damage*, 1. vyd., New York, Nova Science Publishers, 2009, 287-304.

Původní články

Schröterová L, Králová V, Voráčová A, Hašková P, Rudolf E, Červinka M.: Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro*. 2009 Oct;23(7):1406-11. **IF 2,06**

Králová V, Brigulová K, Červinka M, Rudolf E.: Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells. *Toxicol In Vitro*. 2009 Dec;23(8):1497-503. **IF 2,06**

Hanušová V, Králová V, Schröterová L, Trilecová L, Pakostová A, Skálová L.: The effectiveness of oracin in enhancing the cytotoxicity of doxorubicin through the inhibition of doxorubicin deactivation in breast cancer MCF7 cells. *Xenobiotica*. 2010 Oct;40(10):681-90. **IF 2,799**

Králová V, Červinka M, Rudolf E.: ROS mediate selenite-induced apoptosis in colon cancer cells. *Central European Journal of Biology* 2010, Volume 5, Number 2, Pages 166-177. **IF 0,915**

Přehledové články

Rudolf E, Králová V, Červinka M.: Selenium and colon cancer-from chemoprevention to new treatment modality. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008 Aug;8(6):598-602.

Sdělení na odborných setkáních

Králová V., Brigulová K., Červinka M., Rudolf E.: Effect of sodium selenite on colorectal cell lines with different p53 status. XIX. Biologické dny, Hradec Králové, 2008.

Králová V., Rudolf E., Červinka M.: Vliv seleničitanu sodného na buňky kolorektálního karcinomu s odlišným p53 genotypem. XXV. Xenobiochemické symposium, Mikulov, 2009.

Králová V, Rudolf E, Brigulova K, Červinka M: The effects of sodium selenite in human colon carcinoma cells with differing p53 status. The EMBO Meeting 2010, Barcelona, 2010.

Králová V, Rudolf: E.: Selenite-induced cell death in human colon cancer cells. XXII. Biochemický zjazd, Martin, 2010. Cena pořadatele za nejlepší posterové sdělení.