

NOVEL PROSTATE CANCER TUMOUR MARKERS IN A CELL LINE MODEL

Sztalmachová M.¹, Gumulec J.¹, Cernei N.², Zítka O.², Masařík M.¹, Babula P.³, Adam V.¹, Kizek R.¹

¹Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Komenského náměstí 2, 662 43 Brno, Czech Republic

²Department of Chemistry and Biochemistry Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

³Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic

E-mail: j.gumulec@mail.muni.cz

ABSTRACT

To date, it is not possible to differentiate between high-risk and latent forms of prostate cancer. The aim of this study is to determine RNA and protein level of potential tumour markers in the cell lines PNT1A and 22Rv1, which represent healthy prostate tissue and high-grade prostate cancer. We determined significantly decreased level of caveolin-1 on both RNA and protein level, which is in contradiction with our previous findings regarding to its serum level in prostate cancer patients (found increased in high-grade tumours). We also determined increased level of metallothionein on RNA and protein level in tumorous tissue, which is in agreement with previous studies focused on determination of metallothionein in serum (where increased levels were observed). Moreover, we determined significantly up-regulated RNA level of zinc(II) transporters ZIP-1 and ZnT-1. Regarding ZnT-1, such changes of expression have not been described yet. These data suggest that combination of caveolin-1, metallothionein and ZIP-1 or ZnT-1 may be utilized as a tool to distinguish aggressive forms of prostate cancer from clinically latent forms. It is expected, that such diagnostic tool is to be used for the evaluation of bioptical samples, however, verification in a large follow-up set of samples is needed.

Key words: metallothionein, prostate cancer, tumour marker, bioanalysis,

Acknowledgement: Support from IGA MZ NS 10200-3 is highly acknowledged.

ÚVOD

Karcinom prostaty je nejčastěji se vyskytující nádorové onemocnění. Je alarmující skutečností, že nádorově změněné buňky se vyskytují v prostatické tkáni u téměř sta procent osmdesátníků. Prvním krokem lékaře, které vede k podezření na nádorové onemocnění, je snadno proveditelné vyšetření per rectum. Výrazný podíl nádorů není ale ozejměn tímto vyšetřením, ale až díky stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) v séru pacientů. Zavedení tohoto nádorového markeru do klinické praxe v průběhu devadesátých let přineslo výrazné zvýšení počtu pacientů s nově objevenými nádory prostaty, které byly vyšetřením per rectum nezaznamenatelné. Screening PSA přispěl ke snížení úmrtnosti o 20 %, jak uvádí studie zaměřená na evropská léčebná zařízení otištěná v prestižním periodiku New England Journal of Medicine [1].

Proti vysoké frekvenci tohoto onemocnění stojí ale fakt, že naprostá většina nádorů je bezpříznaková, bez vlivu na kvalitu života, nikterak neohrožující pacienta [2, 3]. Žádná ze současně používaných diagnostických metod (včetně PSA) není schopna odlišit tyto klinicky němé formy od agresivních forem. Až 80 % pacientů s tumorem prostaty je proto léčeno zbytečně, jako by mělo agresivní, život ohrožující formu nádoru [4, 5]. To vede jednak ke snížení kvality života pacienta, projevující se inkontinencí, či sexuální dysfunkcí, jednak k nezanedbatelným ekonomickým důsledkům pro zdravotnictví. Je proto velice žádoucí nalézt diagnostický postup, vedoucí k odlišení agresivních život ohrožujících forem od klinicky němých nádorů.

Cílem práce je popsat rozdíly mezi „zdravou“ prostatickou tkání a pokročilým nádorem prostaty na úrovni exprese RNA a proteinu u genů, u nichž literatura zmiňuje změnu jejich hladiny, nebo je změna hladin předpokládána. Pro práci byly vybrány geny metalothionein, caveolin-1, Ki-67, p53, NF- κ B, alfa-metyl CoA-racemáza, c-FOS, c-JUN, matrixová metaloproteináza 9, a zinkové transportéry ZIP1, ZnT-1. Metalothioneiny jsou skupinou proteinů o molekulární hmotnosti 6–10 kDa s vysokým obsahem cysteinu. Metalothioneiny hrají, mimo jiné, významnou roli v ochraně buněk před oxidativním stresem, jejich funkce je proto asociována s řadou nádorových onemocnění, karcinomu prostaty nevyjímaje [6]. Alfa-metyl CoA-racemáza (AMACR) je peroxizomální a mitochondriální enzym účastnící β -oxidace větvených mastných kyselin. Zvýšení hladin tohoto proteinu je popsáno u většiny adenokarcinomů prostaty, naopak, nízké hladiny tohoto genu jsou popsány u benigní hyperplazie prostaty [7-9]. Caveolin-1 (Cav-1) je membránový protein. Hraje důležitou roli v odbourávání cholesterolu, účastní se transmembránové signalizace. Práce z posledních let zmiňují caveolin-1 v souvislosti s progresí řady nádorových onemocnění. c-Fos a c-Jun jsou protoonkogeny, účastní se patogeneze karcinomu prostaty svým vztahem k receptoru pro mužské pohlavní hormony [10]. Tumor-supresorový protein p53 ovlivňuje

proliferaci a opravu DNA, apoptózu a odezvu buněk na růstové faktory.[11]. Zinkové transportéry jsou zkoumány pro svůj odlišný metabolismus zinku v buňkách zdravé a nádorové prostatické tkáně [6, 12-14]. Hladina zinečnatých iontů je u karcinomu snížena zejména v důsledku snížení hladiny zinkového transportéru ZIP-1. Jednou z příčin odchýlného metabolismu zinkových transportérů je změna exprese jejich transkripci regulujících proteinů, vyskytující se typicky u agresivních nádorů [15, 16].

MATERIÁL A METODIKA

Analýza možných nádorových markerů byla provedena na buněčných liniích, modelech (nádorově změněné) tkáně prostaty. Nejdříve byla stanovena exprese širší řady genů na úrovni mRNA a z ní byly následně vybrány geny, u nichž bylo optimalizováno stanovení na úrovni proteinů.

Jako kontrolní buněčná linie byla zvolena PN1A, lidská linie odvozená imortalizací prostatických buněk zdravého 35letého jedince post mortem. Buněčná linie 22Rv1 reprezentuje pokročilý primární nádor prostaty. Dá se očekávat, že tato linie lépe odpovídá skutečnému tumoru než dosud používané buněčné linie karcinomu prostaty (PC-3, LNCaP, DU-145). Ty jsou totiž odvozeny z metastáz, nikoli z primárního nádoru v prostatické tkáni a mají vyšší stupeň genové variability [17]. Tyto buněčné linie byly zakoupeny u HPA Culture Collections (Salisbury, UK). Proteiny z těchto linií a z testovaných vzorků krevních sér pacientů byly izolovány pomocí RIPA pufru, mechanickou homogenizací nebo tepelnou denaturací (99 °C) získaného materiálu.

K izolaci RNA z buněčných linií byl použit High pure total RNA isolation kit (Roche, CH). Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche) dle pokynů výrobce. Real-time PCR byla provedena pomocí systému TaqMan na přístroji 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA). Výsledky byly vyhodnoceny v triplicátech komparativní Ct metodou a standardizovány vůči β -aktinu.

K detekci hladiny metalothioneinu bylo použito elektrochemické detekce [18]. Elektrochemická detekce MT se provádí na přístroji AUTOLAB Analyser v klasickém tříelektrodeovém uspořádání pomocí tzv. Brdičkovy reakce. Analyzovaný vzorek je akumulován na povrch pracovní elektrody, kterou je visící rtuťová elektroda. Po akumulaci stanovení probíhá v základním elektrolytu, obsahujícím kobaltitou sůl v amonném pufru s pH 9,6 [19, 20]. K detekci caveolinu-1 bylo použito ELISA kitu (USCN Life Science Inc.) Postup ELISA byl proveden dle pokynů výrobce. Výsledek vyjádřený změnou barvy substrátu byla detekována fotometricky při 495 nm. Vzorky byly elektroforeticky separovány na 10% SDS-PAGE gelech, barvený dusičnanem stříbrným (kit BioRad, postup dle výrobce) a souběžně blotovány na nitrocelulóзовou membránu a imunodetkovány pomocí specifických protilátek. Pro rychlou orientaci byly používány dot-bloty. Proti metalothioneinu (isoformě 1 a 2) byla použita polyklonální králičí protilátka (Santa Cruz biotechnology, USA), proti AMACR polyklonální králičí protilátka (Clonestar, CZ), proti PSA monoklonální myší protilátka (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

Výsledky byly vyhodnocovány v softwaru Statistica 9. K porovnání hladiny mezi kontrolní a nádorovou skupinou bylo použito t-testů. Korelační matice byly použity k nalezení souvislostí mezi testovanými veličinami. K orientaci v souboru pacientů byla provedena clusterová analýza (K-means). Hladina významnosti $p = 0,05$ byla stanovena pro určení signifikantně odlišné hodnoty.

VÝSLEDKY A DISKUZE

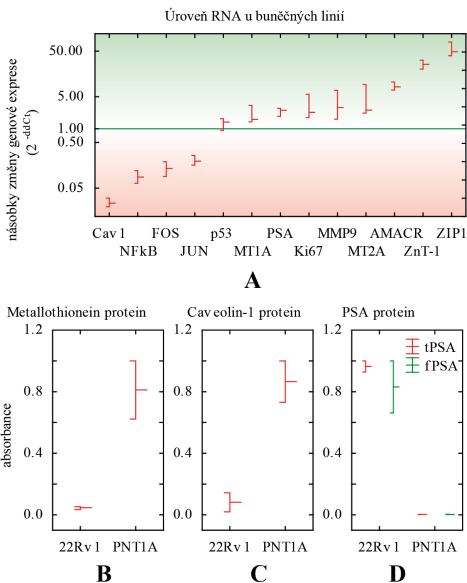
Model tkáně karcinomu reprezentuje buněčná linie 22Rv1. V této linii byla stanovena hladina potenciálních markerů tohoto onemocnění na úrovni mRNA a proteinu. Hladina mRNA je vyjádřena jako relativní násobek oproti expresi ve zdravé tkáni. Modelem zdravé tkáně je buněčná linie PNT1A.

Nejdříve byl u buněčných linií stanoven prostatický specifický antigen (jeho volná i vázaná frakce) s cílem ověřit, reprezentují-li buněčné linie nádorovou a kontrolní tkáň. Hladina tohoto genu byla u nádorové linie zvýšena jak na úrovni RNA (přibližně 2,5krát), tak na úrovni proteinu (téměř 10krát), (**obr. 1A, 1D**). Je tedy možné předpokládat vhodnost použití buněčných linií jakožto modelů skutečného nádoru.

Ze sledovaných genů se u buněčných linií neměnila hladina mRNA p53. Literatura zmiňuje určitý podíl nádorů prostaty s mutací tohoto genu, linie 22Rv1 tedy zřejmě tuto formu nereprezentuje [3]. Na úrovni mRNA bylo detekováno statisticky významné snížení exprese genů Caveolinu-1, NF- κ B, c-FOS a c-JUN. Hladina caveolinu-1 byla snížena ze sledovaných genů nejvýrazněji, jeho hladina v nádorové linii byla oproti linii zdravé snížena přibližně 50krát (**obr. 1A**). Obdobný trend byl zjištěn také na úrovni proteinu, kde jeho hladina byla snížena téměř desetkrát (**obr. 1C**). Při analýze hladiny caveolinu-1 v séru pacientů (nepublikovaná data) jsme naopak zjistili, že jeho hladina se zvyšuje u nádorů vysokého stupně. To nasvědčuje tomu, že exprese caveolinu-1 je účastna patogeneze onemocnění a objasnění jeho vlivu je žádoucí dále zkoumat.

Výrazný pokles byl popsán také u NF- κ B, proliferačně působícího faktoru. Cílem stanovení mRNA NF- κ B nebylo jeho možné využití jako nádorového markeru, ale snaha o základní pochopení proliferace nádorových buněk. U těch se předpokládá spíše jeho zvýšená hladina vzhledem k jeho vlivu na podporu genové exprese. Hladina RNA genů c-FOS a c-JUN se oproti kontrole pohybovala v rozmezí 15 % a 20 %.

Významné zvýšení hladiny bylo popsáno u metalothioneinu třídy 1A a 2A (MT1A, 190 % a MT2A, 240 %). Hladina tohoto genu je zvýšena taktéž na úrovni proteinu (přibližně 0,8krát) (**Obř. 1A, 1B**). Toto zjištění je v souladu s dříve prokázanou změnou hladiny metalothioneinu v séru pacientů [13]. Zvýšení hladin bylo dále popsáno u genů Ki-67 (200 %), MMP-9 (370 %), AMACR (840 %) a u zinkových transportérů ZIP1 a ZnT-1 (4500 % a 2500 %).



Obr. 1 Hladina sledovaných genů u buněčných linií na úrovni RNA (A) a proteinu (B-D). Popis viz text.

ZÁVĚR

Práce popisuje zvýšení hladiny metallothioneinu u buněčné linie karcinomu prostaty na úrovni RNA i proteinu. Spolu s dříve zjištěným zvýšením hladiny tohoto proteinu v séru pacientů je tak možné zdůvodnit, že původem zvýšení sérové hladiny je nádorově změněná prostatická tkáň a nikoli jiné procesy v organismu. Naopak, hladina caveolinu-1 je v nádorové prostatě snížena a v séru zvýšena pouze u pokročilého tumoru. Tato dysbalance nasvědčuje, že taktéž caveolin-1 se zřejmě podílí na patogenezi onemocnění, vliv obou genů je žádoucí dále zkoumat. Výsledky nasvědčují spíše faktu, že agresivní forma tumoru (resp. buněčná linie 22Rv1 odvozená od agresivní formy tumoru) je charakterizovatelná spíše než změnou exprese jednoho genu souborem genů, jejichž exprese se liší (ať již je zvýšena, či snížena) oproti zdravé tkáni, či oproti tumoru o nízkém stupni agresivity. Právě kombinace caveolin-1 a metallothionein (případně v kombinaci se zinkovými transportéry) se jeví jako možná kombinace hodnocení bioptických vzorků, odlišující právě agresivní formu onemocnění. Pro definitivní určení je však žádoucí provést „follow-up“ studie na reálných bioptických vzorcích.

LITERATURA

1. Schroeder, F.H., et al., *Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(13): p. 1320-1328.
2. Jamaspishvili, T., et al., *Urine markers in monitoring for prostate cancer*. Prostate Cancer and Prostatic Diseases. **13**(1): p. 12-19.
3. Wit, R.d. and C.N. Sternberg, *Cancers of the Genitourinary Tract*, in *Textbook of medical oncology*, F. Cavalli, H.H. Hansen, and S.B. Kaye, Editors. 2009, Informa Healthcare: London.
4. Študent, V., et al., *Má vyšetření PSA stále význam při vyhledávání karcinomu prostaty?* Urologie pro Praxi, 2006. **5**(5): p. 214-218.
5. Humbert, L. and M. Chevrette, *Somatic Molecular Genetics of Prostate Cancer*, in *Male Reproductive Cancers Epidemiology, Pathology and Genetics*, W.D. Foulkes and K.A. Cooney, Editors. 2009, Springer Verlag: New York, Dordrecht, Heidelberg, London.
6. Eckschlager, T., et al., *Metallothioneins and Cancer*. Current Protein & Peptide Science, 2009. **10**(4): p. 360-375.
7. Xu, J., et al., *Identification of Differentially Expressed Genes in Human Prostate Cancer Using Subtraction and Microarray*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1677-1682.
8. Evans, A., *alpha-Methylacyl CoA racemase (P504S): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies*. Journal of clinical pathology, 2003. **56**(12): p. 892.
9. Rubin, M.A., et al., *alpha-methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2002. **287**(13): p. 1662-1670.
10. Edwards, J., et al., *The role of c-Jun and c-Fos expression in androgen-independent prostate cancer*. Journal of Pathology, 2004. **204**(2): p. 153-158.
11. Chi, S.G., et al., *P53 IN PROSTATE-CANCER - FREQUENT EXPRESSED TRANSITION MUTATIONS*. Journal of the National Cancer Institute, 1994. **86**(12): p. 926-933.
12. Formigare, A., P. Irato, and A. Santon, *Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects*. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, 2007. **146**(4): p. 443-459.
13. Krizkova, S., et al., *Metallothionein - a promising tool for cancer diagnostics*. Bratislavske Lekarske Listy, 2009. **110**(2): p. 93-97.

14. Gumulec, J., et al., *Zinc, Metallothionein and Prostate Tumour Cells - Is There Any Relation?*, in *10th International Nutrition & Diagnostics Conference* 2010: Prague, CZ. p. 46.
15. Webber, M.M., D. Bello, and S. Quader, *Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications .2. Tumorigenic cell lines*. Prostate, 1997. **30**(1): p. 58-64.
16. Gioeli, D., *Signal transduction in prostate cancer progression*. Clinical Science, 2005. **108**(4): p. 293-308.
17. Sramkoski, R.M., et al., *A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 1999. **35**(7): p. 403-409.
18. Adam, V., et al., *Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(5): p. 409-418.
19. Adam, V., et al., *Application of the Brdicka reaction in determination of metallothionein in patients with tumours*. Chemické Listy, 2008. **102**(1): p. 51-58.
20. Kizek, R., et al., *Využití katalytických reakcí na rtuťové elektrodě pro elektrochemické stanovení metalothioneinů*. Chem. listy, 2004. **98**(4).