

## REVEALING THE ROLE OF ZINC(II) IN PROSTATE CANCER PATHOGENESIS

### ODHALOVÁNÍ ROLE ZINEČNATÝCH IONTŮ U KARCINOMU PROSTATY

Gumulec J.<sup>1,2</sup>, Sztalmachová M.<sup>1</sup>, Raudenská M.<sup>1</sup>, Masařík M.<sup>1</sup>, Kizek R.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: j.gumulec@gmail.com

---

#### ABSTRACT

Current diagnostic procedures do not enable us to distinguish between clinically latent forms of prostate cancer from aggressive forms, the most common cancer in males. The key to understand the different behavior of these forms is in its molecular mechanisms. Current literature highlights the role of zinc(II) ions in the development and pathogenesis of this cancer. Our objective was to identify diverse metabolic pathways of these forms of cancer and determine prognostic markers of high-grade form of prostate cancer. We determined genes alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR), caveolin-1 (Cav-1), metallothionein (MT), p53, NF-κB, c-FOS, c-JUN, Ki-67, ZIP1 and ZnT-1 on RNA and protein level in the sera of 133 men (82 tumorous and 51 healthy) and in cell lines derived from aggressive form of cancer. The level of these genes was determined and compared to prostatic specific antigen, widely used prostate cancer biomarker. We identified significantly ( $p < 0.05$ ) decreased ( $> 4$ -fold) RNA level of Cav-1 NF-κB, c-FOS a c-JUN and significantly elevated ( $> 2$ -fold) RNA level of MT, AMACR, PSA, Ki-67, MMP-9 and ZIP1 and ZnT-1 ( $> 25$ -fold) in tumorous cell line 22Rv1 in comparison to healthy cell line PNT1A. On the protein level, we identified significant ( $> 20$ -fold) decrease of MT in cell lines. In contrary, serum MT level was significantly 4-fold increased. Furthermore, we identified insignificant changes in serum Cav-1 and AMACR. However, Cav-1 level was significantly increased in high stage TNM T4 patients and positively correlated with grading ( $r = 0.29$  at  $p = 0.028$ ). Thus, we may consider the combination of Cav-1 and MT as a high risk prostate cancer biomarker.

**Key words:** zinc; prostate; cancer; apoptosis; tumor marker

**Acknowledgments:** Financial support from NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068, Ceitec CZ.1.05/1.1.00/02.0068, and doc Ceitec.02/2012 is highly acknowledged

## ÚVOD

Tumory prostaty patří nejčastějším nádorovým onemocněním a přes svůj pomalý růst patří k jedněm z nejčastějších příčin úmrtí na nádorové onemocnění (Bégin a Bismar, 2009, Gumulec, a kol., 2010). Nicméně, je známo, že ve většině případů se tyto nádory chovají neagresivně a nevedou k záhubě pacientů, pouze relativně malý podíl nádorů se chová agresivně. Současné možnosti diagnostiky neumožňují s přesností již v raných stádiích určit, zdali se bude jednat o agresivní, či latentní, tj. níže agresivní formu. Toto rozlišení již v raných fázích je nicméně klíčové, neboť zákrok pouze v této době onemocnění vede k vyléčení pacienta.

Je proto zcela zásadní pochopit molekulární mechanismy, které vedou k odlišnému chování nádorových buněk „latentního“ karcinomu a karcinomu agresivního. S tím souvisí taktéž naše snaha vyvinout metodiku schopnou odlišit tyto dvě formy onemocnění – identifikovat markery onemocnění snadno zjištělné v tělních tekutinách, resp. v biotických vzorcích.

Tato studie se zaměřuje na geny alfa-methylacyl-CoA racemáza (AMACR), Caveolin-1 (Cav-1), metalothionein (MT), p53, NF- $\kappa$ B, c-FOS, c-JUN, Ki-67, ZIP1 a ZnT-1 (Fan a Cherian, 2002, Kury, a kol., 2002, Sfanos, a kol., 2011). Metalothioneiny jsou skupinou proteinů s vysokým obsahem cysteinu o molekulární hmotnosti 6 – 10 kDa. Ty jim (díky thiolovým vazbám mezi cysteiny) propůjčují schopnost vázat řadu kovů. Metalothioneiny proto hrají klíčovou roli v transportu těžkých kovů, jejich detoxikaci a v ochraně buněk před oxidativním stresem (Eckschlagler, a kol., 2009). Funkce těchto proteinů zasahují také do regulace apoptózy – zvýšené hladiny metalothioneinu mají antiapoptické působení – metalothionein reguluje hladinu, aktivitu a buněčnou lokalizaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (Formigare, a kol., 2007). NF- $\kappa$ B zajišťuje ochranu buněk před apoptózou aktivací antiapoptických genů a protoonkogenů Bcl-2, c-myc a TRAF-1. Tuto antiapoptickou kaskádu využívají některé nádory (Krizkova, a kol., 2011). V posledních letech byla popsána souvislost se zvýšením hladin těchto proteinů u řady nádorů (Penkowa, a kol., 2005). AMACR je peroxisomální a mitochondriální enzym účastnící se beta oxidace větvených mastných kyselin a katabolismu žlučových kyselin (Kuefer, a kol., 2002). Bylo identifikováno zvýšení hladin tohoto enzymu u adenokarcinomů a prostatických intraepiteliálních neoplazií (Luo, a kol., 2002). Caveolin-1 je často asociován s nádorovými onemocněními jako potenciální marker. Jedná se o membránový protein, součást tzv. caveol. Ty se účastní endocytózy. Caveolin také hraje významnou roli v degradaci cholesterolu. Nicméně, funguje také jako signální molekula (Thompson, a kol., 2010). ZIP-1 a ZnT1 jsou zinkové transportéry, u nichž byla popsána odchylná exprese u karcinomů.

Cílem práce je popsat hladiny těchto genů na úrovni RNA a proteinu v buněčných liniích (sloužící jako model tkáně tumoru) a v séru pacientů a nalézt souvislosti mezi získanými daty.

## MATERIÁL A METODIKA

V této studii byly použity buněčné linie: (a) kontrolní, PNT1A, lidská buněčná linie získaná imortalizací normálních prostatických epiteliálních buněk 35letého muže post mortem, (b) 22Rv1, získaná z primárního tumoru karcinomu prostaty pasážovaného na myším xenograftu. Tyto buněčné linie byly zakoupeny u HPA Culture Collections (Salisbury, UK).

V dalších fázích experimentů byla testována lidská séra, 82 nádorových a 51 kontrolních s bioticky verifikovaným adenokarcinomem prostaty. Testovaná séra byla získána z Urologické kliniky nemocnice U svaté Anny v Brně.

Proteiny z těchto linií a z testovaných vzorků sér byly získávány jednak RIPA pufrem, jednak mechanickou homogenizací a tepelnou lyzací (99°C) buněk. Proti metalothioneinu 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). Caveolin byl detekován pomocí ELISA kitu (VersaMax microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Metodika detekce je podrobněji rozepsána v předchozích studiích (Gumulec, a kol., 2012, Gumulec, a kol., 2012, Sztalmachova, a kol., 2012). Je známo, že nádorově změněné buňky mají utlumený mechanismus importu zinečnatých iontů do buněk prostaty. Linie byly proto inkubovány v médiu se zvyšujícím se množstvím těchto iontů; koncentrace tohoto kovu se v médiu pohybovala v rozmezí 0–500 μM/L. V těchto koncentračních řadách (každá linie pěstována současně v pěti vzestupných koncentracích) byla stanovována hladina mRNA a proteinu MT a PSA a hladina intracelulárního zinku volného a vázaného zinku. U linií byla stanovena hladina mRNA metalothioneinů MT1A a MT2A, PSA; AMACR, Cav-1, p53, NF-κB, c-FOS, c-JUN, Ki-67, ZIP1 a ZnT-1. Real-time PCR byla vyhotovena komparativní metodou; Hodnoty Ct byly standardizovány vůči beta-aktinu.

Následně byly vzorky elektroforeticky separovány na 10% SDS-PAGE gelech (Bio-Rad, USA) na 10–12% 0.75 mm gelech. Bylo použito napětí 80V po 30 min a 120 V po 90 min. Výsledky barveny, stříbrem, nebo přeblotovány (1h, 100 V) na nitrocelulózovou membránu, zablokovaný po dobu 1 h 5% mlékem v PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, pH 8,0) a imunodetekovány. Pro rychlou orientaci byly používány dot-bloty. Byla použita myší protilátka 1:750 v PBS s 5% mlékem, po 4 °C po 12 h a sekundární anti-mouse protilátka značená horseradish peroxidázou, Sigma Aldrich Co., USA, v ředění 1:5000). MT byl souběžně detekován elektrochemicky. Byl použit elektrochemický analyzář (Metrohm AG, Švýcarsko), byl použit analyzář 757 VA Computrace (Metrohm AG, Švýcarsko) ve tříelektrodovém zapojení s visící rtuťovou kapkou (HMDE) jakožto pracovní elektrodou.

Výsledky byly vyhodnocovány v software Statistica 10. Byly prováněny t-testy a korelační matrice. Byla stanovena hladina významnosti p = 0,05. K testu normality byl použit Kolmogorovův-

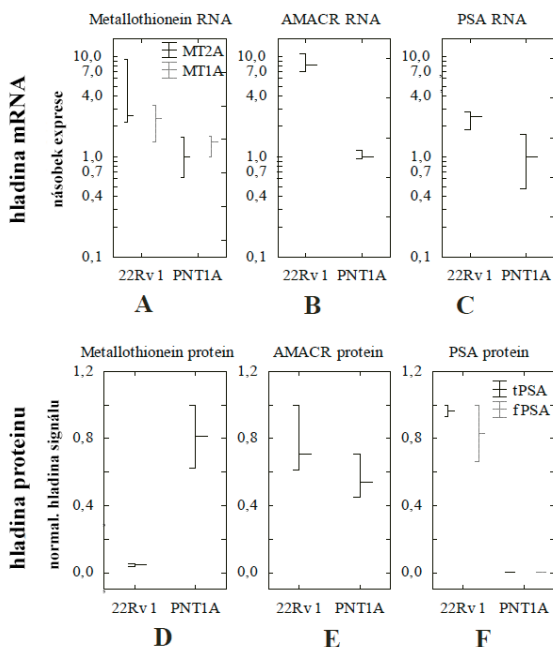
Smimovův test, k rozřazení vzorků do skupin byla použita clusterová analýza (K-means clustering a tree clustering).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

**Nádorové linie.** Model nádorové tkáně je reprezentován buněčnou linií 22Rv1, zdravá tkáň je reprezentována linií PNT1A. Identifikovali jsme signifikantní ( $p < 0,05$ ) snížení hladin RNA Cav-1, NF- $\kappa$ B, c-FOS a c-JUN a signifikantně zvýšenou hladinu ( $> 2$  násobně) MT, AMACR, PSA, Ki-67, MMP-9 a ZIP1 a ZnT-1 ( $> 25$  násobně) v nádorové buněčné linii, viz **obr. 1** (Gumulec, a kol., 2012, Gumulec, a kol., 2012).

Vedle hladiny RNA byla u linií stanovena také hladina proteinová. Byla zjištěna signifikantně zvýšená hladina AMACR a takéž kontrolní PSA. Elevace PSA je signifikantní jak v jeho volné, tak celkové frakci. AMACR byla signifikantně zvýšena (1,5 násobně,  $p = 0,132$ ). Nicméně, MT byl signifikantně snížen u nádorové linie.

*Obr. 1: Hladiny vybraných genů u buněčných linií. Hladina mRNA (A-C) zobrazena jako relativní násobek exprese vůči nenádorové linii PNT1A. D-F: hladina proteinu těchto genů. tPSA – celková PSA, fPSA – volné PSA*

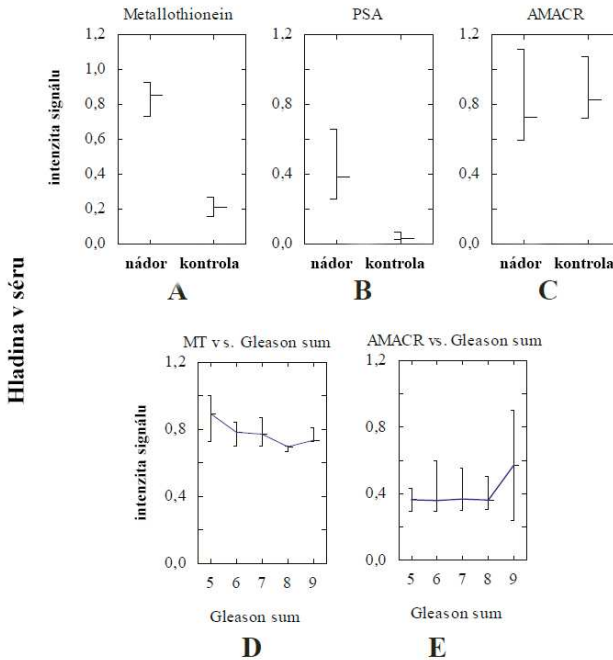


**Klinická studie u pacientů trpících nádorovým onemocněním.** V séru jsme sledovali hladinu AMACR, PSA, MT a Cav-1. V dřívějších experimentech jsme prokázali, že MT je elevován u

pacientů s vysokou mírou specifity u pacientů s karcinomem (Křížková, a kol., 2011, Masarik, a kol., 2011).

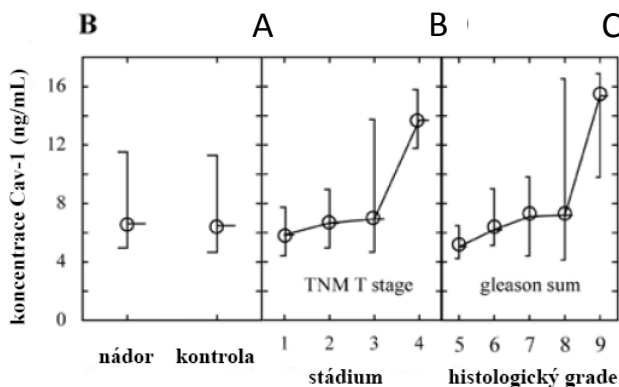
V této studii jsme identifikovali zvýšení hladiny MT a PSA, AMACR v sérové hladině zvýšena nebyla a zůstává tak markerem tkáňovým, což je konzistentní s údaji v literatuře (Luo, a kol., 2002).

*Obr. 2: sérová hladina vybraných markerů (A-C) onemocnění a její závislosti na gradingu D-E (stupni histologické diferenciace)*



Sérová hladina caveolinu-1 byla stanovena v rozmezí 1,2–14,2 ng/mL u pacientů a 1,74–14,98 ng/mL u kontrol. Průměrná koncentrace byla stanovena 5,96 ng/mL u pacientů a 5,42 ng/mL u kontrol. Mezi kontrolami a pacienty nebyla nalezena signifikantní změna hladiny. Nicméně, clusterová analýza odhalila signifikantní variaci v hodnotách u pacientů a rozdělila tak tuto skupinu na dvě podskupiny: Skupina s vysokou koncentrací cav-1 a s nízkou koncentrací cav-1. Následně byly tyto skupiny dány do souvislosti s histologickým stagingem (TNM T scale) a gradingem (Gleason sum) onemocnění. Bylo zjištěno následující: nízké hladiny caveolinu-1 byly asociovány s tumory nízkých stupňů malignity (**Obr. 3**)

Obr. 3: Hladina *cav-1* u kontrol a nádorů (A), závislost hladiny *Cav-1* na stagingu (B) a gradingu (C).



Pacienti s šířícím se tumorem (T4) měli signifikantně ( $p < 0,004$ ) zvýšenou hladinu tohoto genu oproti pacientům nižšího stádia. Co se týče gradingu, pacienti s Gleason skóre 9 měli zjevně zvýšenou hladinu oproti pacientům s nižším grade tumoru ( $r = 0,29$  při  $p = 0,028$ ).

Dále byly provedeny korelace s věkem pacientů, přidruženými nemocemi (hypertenze, ischemická choroba srdeční, dyslipidémie, diabetes mellitus), přičemž nebyla identifikována změna hladin charakteristická pro žádnou s uvedených chorob. Obdobně, hladina *cav-1* se neliší u kuřáků a nekuřáků.

Tab. 1 Hladina *Cav-1* a PSA u pacientů – seřazeno dle stádia a histologie

	<i>n</i>	PSA (ng/ml)	volné PSA (ng/ml)	Caveolin-1 (ng/ml)
<b>Stádium (TNM)</b>				
T1	1	3.12	0.54	4.19
T2	40	5.41 ± 3.44	0.77 ± 0.44	5.25 ± 2.62
T3	18	5.18 ± 3.96	0.58 ± 0.38	6.60 ± 3.69
T4	3	5.58 ± 4.01	0.57 ± 0.33	14.25 ± 2.19*
<b>Diferenciace tumoru</b>				
dobře	3	4.15 ± 1.40	0.63 ± 0.42	4.13 ± 1.27
středně	23	4.83 ± 3.50	0.66 ± 0.40	5.64 ± 3.02
špatně	28	5.95 ± 4.66	0.72 ± 0.48	6.28 ± 3.32
<b>Grade nádoru (Gleason sum skóre)</b>				
5	5	3.69 ± 1.43	0.46 ± 0.02	3.86 ± 1.11
6	20	5.03 ± 2.56	0.82 ± 0.39	5.11 ± 2.42
7	32	4.85 ± 3.22	0.58 ± 0.37	5.75 ± 2.98
8	3	10.12 ± 8.17	1.02 ± 0.82	6.96 ± 4.83
9	4	6.87 ± 5.03	0.64 ± 0.42	9.99 ± 4.04
10	1	3.9	---	---

## ZÁVĚR

V této studii jsme identifikovali významné charakteristiky v hladinách AMACR (zejména na tkáňové úrovni) a caveolinu-1, zejména v séru pacientů s pokročilými tumory. Z modelu buněčných linií a z výsledků koncentrací sér vyplývá, že kombinace uvedených markerů tak může být použita jako zpřesnění diagnostiky a zvýšení pravděpodobnosti záchytu rizikových pacientů ještě v raném stádiu onemocnění.

## LITERATURA

- Bégin L. R., Bismar T. A. Prostate Cancer: Pathological Perspective. In: Foulkes, W. D.; Cooney K. A., eds. *Male Reproductive Cancers Epidemiology, Pathology and Genetics*. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer Verlag, 2009.
- Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R. (2009): Metallothioneins and Cancer. *Current Protein & Peptide Science*, 10(4): 360-375.
- Fan L. Z., Cherian M. G. (2002): Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 87(9): 1019-1026.
- Formigare A., Irato P., Santon A. (2007): Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 146(4): 443-459.
- Gumulec J., Masarik M., Hrabec R., Rovny A., Binkova H., Babula P., Adam V., Kizek R. (2010): Zinek a jeho vztah k nádorům prostaty. *Praktický lékař*, 90(8): 455-459.
- Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Hlavna M., Babula P., Hrabec R., Rovny A., Masarikova M., Sochor J., Adam V., Eckschlager T., Kizek R. (2012): Evaluation of alpha-methylacyl-CoA racemase, metallothionein and prostate specific antigen as prostate cancer prognostic markers. *Neoplasma*, 59(2): 191-200.
- Gumulec J., Sochor J., Hlavna M., Sztalmachova M., Krizkova S., Babula P., Hrabec R., Rovny A., Adam V., Eckschlager T., Kizek R., Masarik M. (2012): Caveolin-1 as a potential high-risk prostate cancer biomarker. *Oncology Reports*, 27(3): 831-841.
- Krizkova S., Ryvolova M., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Majzlik P., Hubalek J., Provaznik I., Kizek R. (2011): Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. *Electrophoresis*, 32(15): 1952-1961.
- Kuefer R., Varambally S., Zhou M., Lucas P. C., Loeffler M., Wolter H., Mattfeldt T., Hautmann R. E., Gschwend J. E., Barrette T. R., Dunn R. L., Chinnaiyan A. M., Rubin M. A. (2002): alpha-Methyl acyl-CoA racemase: Expression levels of this novel cancer biomarker depend on tumor differentiation. *American Journal of Pathology*, 161(3): 841-848.

Kury S., Dreno B., Bezieau S., Giraudet S., Kharfi M., Kamoun R., Moisan J. P. (2002): Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nature Genetics*, 31(3): 239-240.

Luo J., Zha S., Gage W. R., Dunn T. A., Hicks J. L., Bennett C. J., Ewing C. N., Platz E. A., Ferdinandusse S., Wanders R. J., Trent J. M., Isaacs W. B., De Marzo A. M. (2002): alpha-Methylacyl-CoA racemase: A new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Research*, 62(8): 2220-2226.

Masarik M., Gumulec J., Hlavna M., Sztalmachova M., Babula P., Adam V., Krizkova S., Hrabec R., Rovny A., Kizek R. (2011): Analysis of tumor markers in prostate carcinoma at RNA and protein level. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(S45-S45).

Penkowa M., Florit S., Giral M., Quintana A., Molinero A., Carrasco J., Hidalgo J. (2005): Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neuro degeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *Journal of Neuroscience Research*, 79(4): 522-534.

Sfanos K. S., Aloia A. L., Hicks J. L., Esopi D. M., Steranka J. P., Shao W., Sanchez-Martinez S., Yegnasubramanian S., Burns K. H., Rein A., De Marzo A. M. (2011): Identification of Replication Competent Murine Gammaretroviruses in Commonly Used Prostate Cancer Cell Lines. *Plos One*, 6(6).

Sztalmachova M., Hlavna M., Gumulec J., Holoubkova M., Babula P., Balvan J., Sochor J., Tanhauserova V., Raudenska M., Krizkova S., Adam V., Eckschlagler T., Kizek R., Masarik M. (2012): Effect of zinc(II) ions on the expression of pro- and anti-apoptotic factors in high-grade prostate carcinoma cells. *Oncology Reports*, in press(

Thompson T. C., Tahir S. A., Li L., Watanabe M., Naruishi K., Yang G., Kadmon D., Logothetis C. J., Troncoso P., Ren C., Goltsov A., Park S. (2010): The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 13(1): 6-11.