

METALLOTHIONEIN – ZINC – PROSTATE CANCER: PATHOGENESIS AND DIAGNOSTIC USE

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, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is one of the most frequent cancer and one of the most frequent cancer-related cause of death among men. Therefore, early diagnosis, differentiation between risky and relative benign forms and understanding of pathogenesis of disease for further therapeutic approaches is highly desirable. Healthy prostate is unique in zinc accumulation. Zinc is (mostly) buffered by cysteine-rich low molecular protein metallothionein (MT). In contrast, PCa has altered zinc metabolism and elevated MT. In PCa patients, MT is elevated even in serum and can therefore be used as potential tumor marker due to high specificity to PCa. This could be very desirable because of inaccuracies of current prostatic specific antigen (PSA) screening. The aims of this study is (1) to analyze MT-zinc relation on cell lines: to determine zinc and MT levels in cell lines PC-3 (cancer) and PNT1A (control), (2) to find relations between MT and PSA, (3) to describe potential effects of MT and/or zinc on prostate cancer pathogenesis, (4) to determine serum MT level, (5) to find relations between MT level and patient's disease grading. We used (1) optimized fully automated immunochemical methods for detection of serum PSA in serum, (2) protein separation with paramagnetic microparticles modified with antibody against PSA and MT, (3) PAGE gel silver and coomassie staining and colorimetric detection. We found (1) statistically significant ($p=0.001$) MT elevation in PCa lines and in PCa serum, (2) significant PSA elevation in cell lines, (3) strong correlation between intracel. zinc and MT, (4) no correlation between disease grading/patient's history, PSA level and MT level. We found MT/zinc play a role in PCa pathogenesis, further understanding may have therapeutic implications. By our findings, MT is a good candidate for new marker for PCa screening, developing of automated diagnostic methods is highly desirable.

Key words: metallothionein, zinc prostate cancer, magnetic particles, PC-3, PNT1A, tumor marker

Acknowledgments: Financial support from the following grants GACR 301/09/P436, IGA MZ 10200-3 is highly acknowledged.

ÚVOD

V řadě rozvinutých zemí jsou nádory prostaty nejčastějším nádorovým onemocněním mužů a druhou nejčastější s nádorem spojenou příčinou smrti (WitaSternberg, 2009). Výskyt těchto nádorů je významně spjat s vyšším věkem pacientů, objevují se převážně u mužů nad 50 let. Až v 90% se jedná o acinární adenokarcinomy, proliferující nádory s infiltrativním růstem a různým stupněm diferenciací (BéginBismar, 2009). Zbýlých 5 % tvoří adenokarcinomy duktální, acinózní, malobuněčné, dlaždicobuněčné přechodné karcinomy aj. (BéginBismar, 2009; WitaSternberg, 2009). Adenokarcinomy prostaty jsou obvykle bezpříznakovými nádory, často diagnostikovány až při sekci zemřelých na jinou příčinu. Malá část adenokarcinomů je agresivnější – metastazuje do lymfatického systému a do kostí.

Vzhledem k vysoké incidenci a mortalitě je žádoucí diagnostikovat toto onemocnění co nejdříve, rozpoznat vysoce agresivní formy od klinicky němých a pochopit patogenezi onemocnění s typickými metabolickými odlišnostmi (jsou-li nějaké) se záměrem vyvinout specificky cílenou terapii.

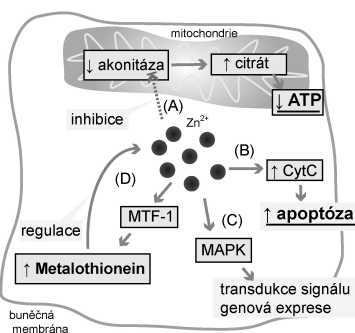
Současné diagnostické metody karcinomu prostaty je možné rozdělit na metody vedoucí k podezření na karcinom (vyšetření per rectum a stanovení hladiny prostatického specifického antigenu, PSA) a na metody diagnózu potvrzující (transrektální sonografie s biopsií prostaty) (AdamaVorlíček, 2002). Zvyšující se množství karcinomů je detekováno v současné době právě díky stanovování nádorového markeru prostatického specifického antigenu (PSA). Detekce pomocí PSA je velmi senzitivní, dosahuje až 91%. Významné zvýšení specifity – až na hladinu 80% – přináší stanovování poměru mezi volným a celkovým PSA v séru – „free/total PSA ratio“. I přes tyto vysoké hodnoty senzitivity i specifity není PSA ideálním markerem tohoto onemocnění; řada pacientů je indikována na zbytečnou vyšetření a zatížena tak zbytečným fyziologickému a psychickému stresu (HumbertaChevette, 2009). Mimoto hladina PSA nevyovídá o stupni agresivity karcinomu. (Študent a kol., 2006)

Podobně jako u jiných nádorových onemocnění, také pro adenokarcinom prostaty je typická genová nestabilita projevující se zvýšením a/nebo snížením exprese řady genů, jejichž proteinové produkty se mohou podílet na patogenezi onemocnění jako protoonkogeny, resp. tumor supresorové geny. Identifikace takovýchto genů u konkrétního pacienta může (a) předvídat reakce na konkrétní druh léčby (HumbertaChevette, 2009), (b) zacílit terapii právě na tyto dysregulované látky a – (c) řada genů, jejichž exprese je zvýšena a jsou specifické pro karcinom prostaty, mohou být použity jako nádorový marker tohoto onemocnění, (d) či jako imunohistochemická metoda bioptických vzorků. Řadu těchto kritérií splňuje skupina nízkomolekulárních proteinů metalothioneinů (MT). MT jsou významné ve vztahu ke karcinomu prostaty, resp. ke zdravé prostatické tkáni zejména pro atypický

metabolismus zinku v této tkáni; metalothionein váží volné zinečnaté ionty a fungují jako labilní pool těchto iontů.

Sekretorické buňky fyziologické prostatické tkáně jsou schopny akumulovat zinek v až desetinásobně větší koncentraci oproti jiným buňkám lidského těla. (FranklinaCostello, 2009) Zvýšené hladiny zinku v těchto buňkách mají vliv na řadu kaskád (Gumulec, Masarik a kol., 2010); je ovlivněno energetické hospodaření buněk a metabolismus organických kyselin (cestou inhibice oxidace a zabráněním utilizace citrátu v krebsově cyklu), jsou ovlivněny apoptické mechanismy (proapoptické působení), je ovlivněna exprese řady genů. (Formigare a kol., 2007; Thirumoorthy a kol., 2007) Karcinom však schopnost akumulace zinku ztrácí, popsané vlivy zinku proto mizí. (CostelloFranklin, 2006; OteizaMackenzie, 2005) Některé mechanismy – například snížení proapoptického působení – se zřejmě mohou významným mechanismem podílet na patogenezi onemocnění. (Masarik a kol., 2010; Plum a kol., 2010)

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- κ B. (Formigare a kol., 2007) NF- κ B zajišťuje ochranu buněk před apoptózou aktivací antiapoptických genů a protoonkogenů Bcl-2, c-myc a TRAF-1 (viz Obrázek 1). Tuto antiapoptickou kaskádu využívají některé nádory (Krizkova a kol., 2009). V posledních letech byla popsána souvislost se zvýšením hladin těchto proteinů u řady nádorů. (FanaCherian, 2002; Jin a kol., 2002; Penkowa a kol., 2009; Wei a kol., 2008)



Obr. 1 Funkce zinku a metalothioneinu.

MATERIÁL A METODIKA

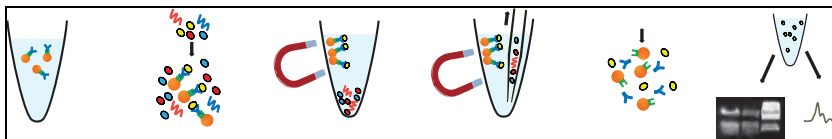
V této studii byly použity tři buněčné linie: (a) kontrolní, PNT1A, lidská buněčná linie získaná imortalizací normálních prostatických epiteliálních buněk 35letého muže post mortem, (b) PC-3 buněčná linie získaná z grade 4 androgen-nezávislého adenokarcinomu 62letého muže z kostních metastáz. Tyto buněčné linie byly zakoupeny u HPA Culture Collections (Salisbury, UK).

V dalších fázích experimentů byla testována lidská séra, 20 kontrolních a 70 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 1/2 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). Je známo, že nádorově změnéné 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 $\mu\text{M/L}$. 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 a PSA; Real-time PCR byla vyhotovena komparativní metodou; Hodnoty Ct byly standardizovány vůči beta-aktinu.

Během experimentů byla zjištěna úskalí detekce metalothioneinu; protein tvoří polymery a má řadu nespecifických interakcí s řadou substancí ve vzorku. Z toho důvodu bylo žádoucí odseparovat ostatní složky séra/lyzátu. Byla proto použita imunoseparace pomocí protilátkou změnénéých magnetických částic (viz Obrázek 3). Tato metoda umožní separovat vybrané proteiny dle zvolené protilátky (která je svým Fc fragmentem navázaná na protein G částic).



Obr. 2 Separace pomocí protilátkou změnénéých magnetických částic

Následně byly vzorky elektroforeticky separovány na 10% SDS-PAGE gelech a výsledky barveny coomassie modří, stříbrem, nebo převedeny na nitrocelulóзовou membránu a imunodetekovány. Pro rychlou orientaci byly používány dot-bloty. MT byl souběžně detekován elektrochemicky. Elektrochemická detekce MT se provádí na přístroji AUTOLAB Analyser v klasickém tříelektrodovém uspořádání pomocí tzv. Brdičkovy reakce. Právě Rudolf Brdička před více než 70 lety objevil katalytické vylučování vodíku ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinů. Tato metoda byla později vylepšena a využita pro analýzu proteinů krevních sér pacientů s rakovinou.

MENDELNET 2010

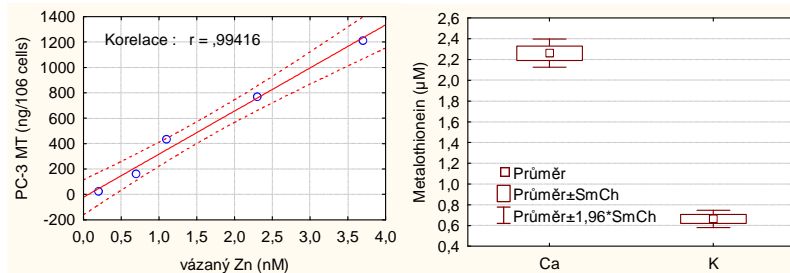
Dlouho nebylo jasné, které proteiny se této reakce účastní, ale později bylo zjištěno, že jsou to právě látky obsahující –SH skupiny, mezi které patří i MT. Měření probíhá tak, že na pracovní elektrodu, kterou je visící rtuťová elektroda dochází k akumulaci vzorku a stanovení probíhá v základním elektrolytu, obsahujícím kobaltitou sůl v amonném pufru s pH 9.6.

Výsledky byly vyhodnocovány v software Statistica 9. Byly prováněny t-testy a korelační matrice. Byla stanovena hladina významnosti $p=0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Z experimentu inkubace buněčných linií v médiu s obsahem zinku je zřejmá silná závislost hladiny PSA, volného PSA a metalothioneinu na množství zinku v médiu (viz Obrázek 3); U „karcinomové“ linie PC-3 dosahuje korelační koeficient pro závislost přidaný zinek - metalothionein až hodnoty 0,9 a je statisticky významný na hladině $p=0,05$. U zmíněné linie je popsána také statisticky významná závislost hladiny metalothioneinu na hladině PSA. V „karcinomové“ linii PC-3 je popsáno statisticky významné zvýšení hladin PSA i metalothioneinu oproti kontrolní linii PNT1A. Z analýzy mRNA byla zjištěna elevace třídy metalothioneinu MT2A u linie PC-3 oproti MT1A. Třída MT1A byla naopak elevována u kontrolní linie PNT1A.

V sérech bylo zjištěno statisticky významné zvýšení hladiny metalothioneinu (viz Obr). Pro metalothionein je – oproti PSA – typické mnohem menší rozptyl hodnot. Oproti výsledkům v buněčných liniích je ale pozorována mnohem menší závislost mezi hodnotami PSA a metalothioneinu.



Obr. 3 závislost hladiny metalothioneinu na hladiny zinku v médiu

Obr. 4 hladina metalothioneinu v séru karcinom/kontrola

ZÁVĚR

Hladina intracelulárního MT a intracelulárního zinku se signifikantně liší u linie odvozené od karcinomu a u linie kontrolní. Intracelulární MT i intracelulární zinek je u obou linií indukovatelný zvýšením množství zinku v médiu, v „karcinomové“ linii je dosahováno nižších hladin intracelulárního zinku. Vzhledem k alteraci antiapoptických/proapoptických mechanismů zinku

a metalothioneinu a jejich popsané změně hladin je možné očekávat působení na patogenezi onemocnění. (Gumulec, Cernei a kol., 2010) Je žádoucí dále zkoumat procesy způsobující snížení intracelulární hladiny zinku – zejména zinkové transportní mechanismy (a odlišit tak příčinu a následek) a dále procesy, jimiž zinek a metalothionein působí u karcinomu patogenezi.

MT v séru pacientů s histologicky ověřeným adenokarcinomem prostaty je signifikantně zvýšena, MT je proto nadějným kandidátem na post nového markeru adenokarcinomu prostaty. Je ovšem nutné optimalizovat a případně automatizovat jejich detekční algoritmus pro snadnější využití v rutinní praxi a stanovit možné případy falešné pozitivivity, resp. negativity.

Poděkování: výzkum této problematiky je podporován granty GACR 301/09/P436, IGA MZ 10200-3 a 9/2010/FaF.

LITERATURA

Adam Z., Vorlíček J.: Speciální onkologie. Brno: Masarykova univerzita, 2002.

Bégin L.R., Bismar T.A.: Prostate Cancer: Pathological Perspective, in Male Reproductive Cancers Epidemiology, Pathology and Genetics. Edited by Foulkes WD, Cooney KA. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer Verlag, 2009.

Costello L., Franklin R. (2006): The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Molecular Cancer* 5(1):17.

Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R. (2009): Metallothioneins and cancer. *Current Protein and 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.

Franklin R., Costello L. (2009): The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *Journal of cellular biochemistry* 106(5):750-757.

Gumulec J., Cernei N.V., Zitka O., Masarik M., Babula P., et al.: Zinc, Metallothionein and Prostate Tumour Cells - Is There Any Relation?, in 10th International Nutrition & Diagnostics Conference. Edited by. Prague, CZ, 2010, pp. 46.

Gumulec J., Masarik M., Hrabec R., Rovny A., Binkova H., et al. (2010): Zinek a jeho vztah k nádorům prostaty. *Praktický lékař* 90(8):455-459.

Humbert L., Chevrette M.: Somatic Molecular Genetics of Prostate Cancer, in Male Reproductive Cancers Epidemiology, Pathology and Genetics. Edited by Foulkes WD, Cooney KA. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer Verlag, 2009.

- Jin R.X., Chow V.T.K., Tan P.H., Dheen S.T., Duan W., et al. (2002): Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis* 23(1):81-86.
- Krizkova S., Fabrik I., Adam V., Hrabeta P., Eckschlagler T., et al. (2009): Metallothionein - a promising tool for cancer diagnostics. *Bratislavské Lekárske Listy* 110(2):93-97.
- Masarik M., Gumulec J., Kuchtickova S., Kudlackova V., Jurajda M., et al. (2010): Determination of novel tumor markers in prostate carcinoma. *FEBS Journal* 277(s.1):188-188.
- Oteiza P., Mackenzie G. (2005): Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26(4-5):245-255.
- Penkowa M., Srensen B.L., Nielsen S.L., Hansen P.B. (2009): Metallothionein as a useful marker in Hodgkin lymphoma subclassification. *Leukemia & Lymphoma* 50(2):200-210.
- Plum L.M., Rink L., Haase H. (2010): The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7(4):1342-1365.
- Študent V., Grepl M., Král M., Hartmann I. (2006): Má vyšetření PSA stále význam při vyhledávání karcinomu prostaty? *Urologie pro Praxi* 5(5):214-218.
- Thirumoorthy N., Kumar K.T.M., Sundar A.S., Panayappan L., Chatterjee M. (2007): Metallothionein: An overview. *World Journal of Gastroenterology* 13(7):993-996.
- Wei H., Desouki M.M., Lin S., Xiao D., Franklin R.B., et al. (2008): Differential expression of metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in response to zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues. *Molecular Cancer* 7(-).
- Wit R.d., Sternberg C.N.: *Cancers of the Genitourinary Tract*, in *Textbook of medical oncology*. Edited by Cavalli F, Hansen HH, Kaye SB. London, Informa Healthcare, 2009.