

PROFILE COMPARISON OF ZINC-PROTEINS IN CANCER AND CONTROL PROSTATIC CELLS EXPOSED A ZN(II)

SROVNÁNÍ PROFILU ZINKOVÝCH PROTEINŮ NÁDOROVÝCH A KONTROLNÍCH PROSTATICKÝCH BUNĚK VYSTAVENÝCH ZN^(II)

Jílková E.¹, Křížková S.^{1,3}, Masařík M.^{1,2}, Kenšová R.¹, Adam V.^{1,3}, Kizek R.^{1,3}

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

²Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

³Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: evajil@centrum.cz

ABSTRACT

The aim of this study is compare the profile of zinc-proteins level of potential tumour markers in the cell lines PC-3, LNCaP and PNT1A. Zinc plays an important role in the healthy prostatic tissue. It is necessary for the proliferation, differentiation, regulation and apoptosis of the cells. Prostatic healthy tissue accumulate zinc in the cells of the lateral lobes in the prostate. Cancer prostatic tissue loses this ability. Cell lines PC-3 and LNCaP represent prostate cancer and line PNT1A represent healthy and control prostate tissue. We have developed automatic and fast method of the isolation of zinc-proteins from prostatic cells by magnetic particles modified by specific antibody. Zinc was measured by the electrochemical method - differential pulse voltammetry. We determined 15% decreased level of zinc in prostate cancer patients than in the control healthy prostatic cells.

Key words: prostate cancer, Zn(II), metallothionein, magnetic particles, SDS- PAGE electrophoresis, electrochemistry

Acknowledgments: Support from IGA TP6/2012 is highly acknowledged.

ÚVOD

Nádory prostaty patří mezi nejčastější nádorové onemocnění u mužů a také se řadí na druhé místo, co se týká souvislosti nádorového onemocnění a úmrtí (A.-S., 2011, Gumulec, a kol., 2011). V případě karcinomu prostaty dochází k nekontrolovatelnému růstu buněk a k nárůstu objemu nádoru, jelikož dochází k selhání buněčné apoptózy (naprogramovaná smrt buněk). Výskyt karcinomu prostaty má mnoho zvláštností. Doposud není zcela objasněn mechanismus vzniku a šíření karcinomu, pravděpodobně má to tom podíl několik vlivů. Podmínkou vzniku karcinomu prostaty je přítomnost androgenů, mužských pohlavních hormonů (Rosenberg, a kol., 2010). V další řadě je to věk muže. U mužů nad 60 let je uváděn nález ložisek karcinomu prostaty až v 80 % a u mužů nad 80 let dokonce 95 %. Dále můžeme uvést genetické dispozice či etnický původ tyto faktory také pravděpodobně přispívají ke vzniku karcinomu prostaty Maligní nádorové onemocnění prostaty, se ve více jak 95 %, týká adenokarcinomu (Humphrey, 2012). Nejčastěji se vyskytující adenokarcinomy metastazují do lymfatického systému a do kostí. V současné době se k diagnostikování karcinomu prostaty používá několik metod vyšetření. Mezi nejčastější vyšetření, která vedou k podezření na karcinom prostaty je vyšetření per rectum a stanovení hladiny specifického antigenu (PSA) v séru (Barry, 2001, Dhanasekaran, a kol., 2001, Shearer, 1991). Dále se provádí histologická vyšetření, která potvrdí diagnózu a to biopsie prostaty a transrektální ultrasonografie (TRUS). Z nových studií, které se zabývaly hledáním nových markerů, které vedou ke včasné diagnostice rakoviny prostaty, bylo opakovaně prokázáno, že rakovinné buňky prostaty mají změněnou schopnost příjmu a akumulace zinkových iontů v porovnání se zdravými prostatickými buňkami (Costello a Franklin, 2000).

Zinek patří k prvkům s výraznou biologickou aktivitou. Tento prvek je důležitou esenciální živinou - je nezbytně nutný pro funkci některých enzymů a v nízkých koncentracích je přítomen ve všech (nebo většině) buněk (Stefanidou, a kol., 2006). Z lidského genomu 10 % kóduje proteiny, které váží ve své struktuře zinek (Andreini, a kol., 2006). Ionty zinku jsou nezbytné katalytické, strukturální a ko-katalytické komponenty mnohých proteinů a jsou také součástí řady enzymů (Auld, 2001, Gumulec, a kol., 2011). Zinek se váže na zinek-dependentní enzymy, nejčastěji se váže na doménu tzv. „zinkové prsty“. Tato doména obsahuje histidin a cystein obsahující repetice His₂Cys₂, každá tato repetice váže jeden zinečnatý ion. Zinkové prsty slouží k udržování terciární a kvarterní struktury těchto bílkovin (Kambe, a kol., 2004, Maret a Li, 2009). Ve zdravé prostatické tkáni hraje zinek důležitou roli v proliferaci, diferenciaci, regulaci a apoptózy buněk (Beyersmann a Haase, 2001). Ve zdravé a nádorové prostatické tkáni je intracelulární zinek chelátován četnými proteiny (nukleoproteiny, metaloenzymy, metaloproteiny, zejména metalothioneinem) (Colvin, a kol., 2010). Zinek se v prostatě vyskytuje v buňkách laterálních laloků. U pacientů s karcinomem

prostaty bylo prokázáno, nižší hladiny zinku v buňkách laterálního laloku, oproti buňkám zdravých jedinců. Bylo zjištěno, že u pacientů s karcinomem prostaty jsou v buňkách laterálního laloku tohoto orgánu hladiny zinku signifikantně nižší oproti normálním hodnotám (Kambe, a kol., 2004). Laterální lalok je také hlavním místem počátku rakovinného bujení a je charakteristický ztrátou akumulace zinku (Costello a Franklin, 2000).

Cílem práce bylo popsat rozdíly mezi zdravou prostatickou tkání a pokročilým nádorem prostaty ke vztahu k obsahu $Zn^{(II)}$ v proteinech a sledování jejich elektroforetického profilu.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Buněčné linie PNT1A, PC-3, LNCaP byly zakoupeny od HPA, Salisbury, Velká Británie. Linie PC-3 jsou prostatické nádorové buňky odvozené z metastatického místa v kosti a LNCaP jsou prostatické nádorové buňky odvozené z metastatického místa v levé supraklavikulární uzlině. Linie PNT1A byla získána posmrtně ze zdravé prostatické tkáně. Další použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Kultivace prostatických buněk

PNT1A buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s přidavkem 10 % FBS, PC-3 a LNCaP buňky v Ham F12 médiu s 7 % FBS. Všechna média byla obohacena o antibiotika, penicilin (100 U ml^{-1}) a streptomycin ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ s 5 % CO_2 .

MTT test

Před začátkem experimentů byl u všech linií proveden MTT test. Test je založen na viabilitě buněk v daném prostředí. Dle výsledků z MTT testu bylo určeno pět koncentrací $Zn^{(II)}$, které byly poté použity při tvorbě buněčných lyzátů. U všech linií byly použity koncentrace 0, 25 a $50 \text{ } \mu\text{M}$. Dle výsledků MTT testů je zřejmé, že při těchto koncentracích buňky ještě rostly. K nakultivovaným

buňkám se tyto koncentrace $Zn^{(II)}$ přidávají. Po dvou dnech působení byly z buněčných linií izolovány proteiny mechanickou homogenizací, tepelnou denaturací a dle Wisniewski (Wisniewski, a kol., 2009).

Příprava lyzátů

Buňky byly dvakrát propláchnuty 5 ml PBS zchlazeným na $0 \text{ }^\circ\text{C}$ a obsah byl odsát. K buňkám bylo přidáno PBS a škrabkou se buňky seškrábaly. Suspenze se přepipetovala do centrifugační zkušavky byla centrifugována 2700 ot./min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 7 minut. Poté se odsál supernatant, buňky se resuspendovaly v PBS a byly spočítány v Bürkerově komůrce. Poté se buňky opět centrifugovaly a supernatant se odsál. Buňky se resuspendovaly v 1 ml PBS a tato suspenze se přepipetovala do mikrozkušavky (Eppendorf 5402, Německo) a opět se centrifugovala. Supernatant byl odsát. V našem případě se dělaly tři druhy lyzátů – tepelný lyzát, sonikovaný lyzát a lyzát dle

(Wisniewski, a kol., 2009). V případě tepelného lyzátu se k buňkám přidá 75 μ l PBS a lyzuje se tři minuty. Poté se doplní objem PBS na konečných 200 μ l a zkumavka se vloží do termomixéru (Eppendorf 5430, Německo), ve kterém je 99 °C na 15 minut. Tepelnou úpravou se denaturují termolabilní a vysokomolekulární proteiny. Po tepelné úpravě se centrifuguje při 14 000ot/min., 4 °C, 30 minut. Supernatant (lyzát) se přepipetuje do čisté mikrozkušavky. Při přípravě sonikovaného lyzátu se k buňkám přidá 200 μ l PBS a buňky se lyzují pomocí ultrazvukové jehly po dobu 2 minut.

Izolace Zn^(II) proteinů

Zn^(II) proteiny byly izolovány z lyzátu pomocí magnetizovatelných částic Dynabeads®MyOne™ tosylactivated (Invitrogen, Norsko) se specificky navázanou slepičí protilátkou vázající se na zinek. Postup modifikace magnetizovatelných částic slepičími protilátkami byl převzat z článku (Krizkova, a kol., 2012). Pro automatickou izolaci zinkových proteinů byl využit přístroj epMotion 5075 (Eppendorf, Německo).

Elektrochemické stanovení volného a vázaného Zn^(II)

Stanovení zinečnatých iontů bylo provedeno na přístroji 797 VA Stand, přístroj byl připojen k 813 kompaktnímu Autosampleru (Metrohm, Švýcarsko). Analyzátor (797 VA Computrace z Metrohm, Švýcarsko) využívá tradiční tříelektrodové zapojení. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm², referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda. Diferenční pulsní voltametrické měření byla provedena na základě těchto parametrů: probublávání argonem po dobu 90 s, počáteční potenciál -1,5 V, depozice 360 s, konečný potenciál; 0,75 V; pulzní amplituda 0,025 V, impulzní čas 0,04 s; krok potenciál 5,035 mV, doba kroku potenciál 0,3 s objem vstříkovaného vzorku 100 μ l, objem cely (2 ml) byl doplněn acetátovým pufrům 1900 μ l. Mineralizace vzorku se prováděla v mikrovlnném systému Multiwave 3000 (Anton-Paar GmbH). Do lahvičky MG5 se umístí 15 μ l vzorku s 350 μ l koncentrované kyseliny dusičné a 150 μ l H₂O₂. Takto připravený vzorek se uzavře a umístí do rotoru 64MG5 se zvoleným programem po dobu 50 minut (10 minut – 50W, 30minut – 100W, 10 minut – 0W). Po skončení mineralizace je provedeno stanovení koncentrace zinku postupu jako u vzorku nemineralizovaného.

Elektroforetická separace

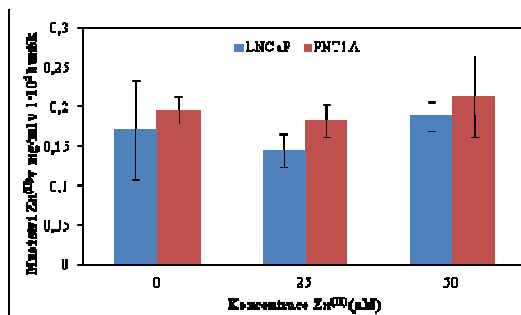
Izolované proteiny byly detekovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Elektroforéza byla provedena na aparatuře Mini Protean Tetra s gelem o rozměrech 8,3 x 7,3 cm (BioRad, USA). Koncentrace dělicího pufru byla 15 % (m/V) a koncentrace zaostřovacího gelu byla 5 % (m/V). Gely byly připraveny z 30% (m/V) zásobního roztoku akrylamidu a 1 % (m/V) bisakrylamidu. Polymerace gelů probíhala při pokojové teplotě po dobu 45 minut (dělicí gel) nebo 30 minut (zaostřovací gel). Před analýzou byly vzorky smíchány s nanášecím pufrům 2:1 a inkubovány při 93 °C po dobu 3 minut. Pro stanovení molekulové hmotnosti byl použit standard „Precision plus protein standards“ (Biorad, USA). Elektroforéza probíhala při 150 V podobu jedné hodiny při teplotě 23 °C (PowerBasicBiorad, USA) v Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-

diol) - glycinovém separačním pufru (0,025 M Trizma-base, 0,19 M glycin a 3,5 mM SDS, pH = 8,3). Poté byly gely obarveny barvivem Coomassie brilantová modř (Wong, a kol., 2000), a následně stříbrem (Krizkova, a kol., 2009) s vynecháním fixačního kroku (1,1 % (v/v) - kyselina octová, 6,4 % (v/v) methanol a 0,37 % (v/v) formaldehydu) a následujících dvou promývacích kroků (50 % (v/v) methanol).

VÝSLEDKY A DISKUZE

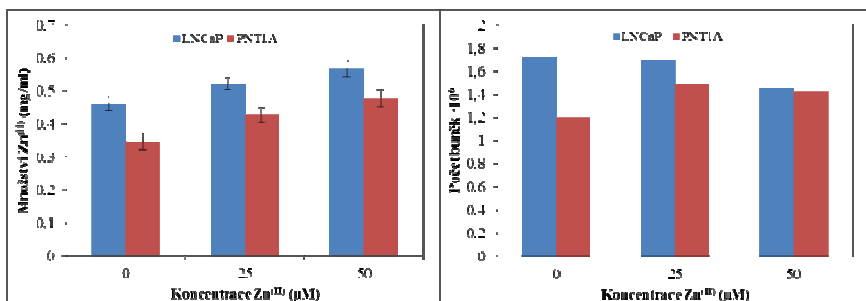
Modelem zdravé tkáně a kontrolní variantou je buněčná linie PNT1A, model tkáně karcinomu prostaty reprezentují buněčné linie PC-3 a LNCaP. U buněk všech linií byly stanoveny hladiny potenciálních markerů – obsah zinku v proteinech a metalothioneinu. Obsah $Zn^{(II)}$ byl stanoven metodou diferenční pulzní voltametrie ve dvou typech buněčných lyzátů – sonikovaném a dle (Wisniewski, a kol., 2009). Bylo zjištěno, že vhodnějším lyzátem pro stanovení množství $Zn^{(II)}$ v prostatických buňkách je použití sonikovaného lyzátu. Při použití lyzátu dle (Wisniewski, a kol., 2009) docházelo k interferenci lyzačních složek lyzačního roztoku především DTT. Obsah zinku byl dále stanoven jen u sonikovaných buněčných lyzátů. Z výsledků vyplývá, že obsah zinku v rakovinných prostatických buňkách byl v průměru o 15 % nižší než u zdravých prostatických buněk.

Obr. 1: Srovnání obsahu $Zn^{(II)}$ v lyzátech prostatických nádorových buněk (LNCaP) a zdravých prostatických buněk (PNT1A).



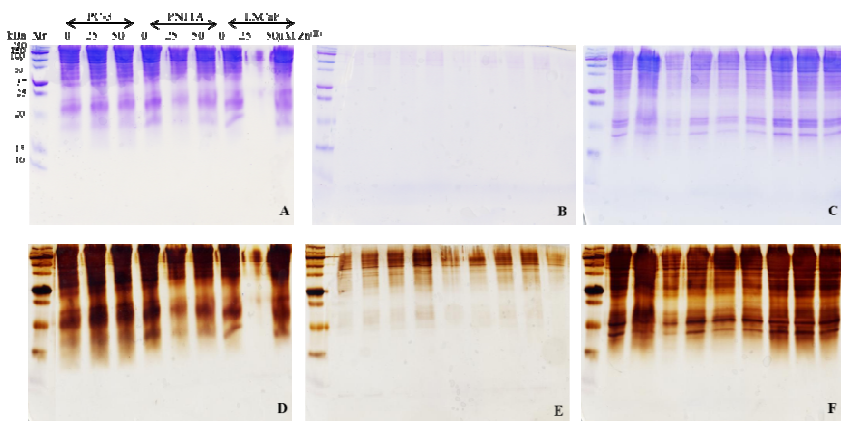
Dále bylo sledováno množství narostlých prostatických buněk při kultivaci v médiu obsahující různé koncentrace zinku. Nádorových prostatických buněk kultivovaných v médiu bez přidavku $Zn^{(II)}$ bylo o 43 % více než u zdravých buněk, při přidavku $Zn^{(II)}$ do kultivačního média byl sledován snižující se trend počtu nádorových prostatických buněk. Při vystavení nejvyšší koncentraci 50 μM $Zn^{(II)}$ byl počet rakovinných prostatických buněk vyšší jen o 2 % k zdravé variantě. V dalším kroku se sledovalo množství $Zn^{(II)}$ v kultivačním médiu po odebrání narostlých buněk. Obsah $Zn^{(II)}$ měl zvyšující se trend v závislosti na zvyšující se koncentraci $Zn^{(II)}$. Při srovnání výsledků obsahu $Zn^{(II)}$, kultivačního média zdravých a rakovinných buněk, lze říci, že zdravé prostatické buňky akumulovaly více $Zn^{(II)}$ z média než rakovinné buňky v průměru o 24 %.

Obr. 2 Srovnání růstu a akumulace $Zn^{(II)}$ prostatických nádorových buněk (LNCaP) a zdravých prostatických buněk (PNT1A). A) Množství $Zn^{(II)}$ v kultivačním médiu po odebrání buněk, B) počet prostatických buněk po kultivaci s $Zn^{(II)}$.



Buněčné lyzáty byly použity pro izolaci proteinů vázajících $Zn^{(II)}$. Tyto proteiny byly izolovány pomocí magnetizovatelných částic (MPs) se specificky navázanou protilátkou rozeznávající $Zn^{(II)}$. Z výsledků vyplývá, že se nám podařilo pomocí MPs izolovat zinek vázající proteiny a množství proteinů v lyzátu, eluátu a retentátu se výrazně nemění, což dokumentuje obr. 3.

Obr. 3 Elektroforetické stanovení Zn-proteinů v prostatických buňkách A-C) gely barveny Coomassie blue A) v lyzátu, B) v izolovaných Zn-proteinech pomocí MPs, C) v lyzátu po izolaci pomocí MPs; D-F) barveno stříbrem D) v lyzátu, E) v izolovaných Zn-proteinech pomocí MPs, F) v lyzátu po izolaci pomocí MPs.



ZÁVĚR

Byla provedena analýza obsahu $Zn^{(II)}$ u třech buněčných linií, kde linie PC-3 a LNCaP reprezentovaly karcinom tkáně a linie PNT1A zdravé prostatické tkáně byla použita jako kontrolní varianta. Byl porovnán obsah $Zn^{(II)}$ v sonikovaném lyzátu a v lyzátu dle (Wisniewski, a kol., 2009) metodou diferenční pulsní voltametrie. Dále byly vyizolovány pomocí magnetizovatelných částic proteiny vázající ve své struktuře zinek a to elektroforetickou separací – SDS-PAGE. Z našich výsledků vyplývá, že proteiny vázající zinek jsou jedním z potenciálních markerů, detekovatelných v prostatických buňkách. Byly porovnány výsledky obsahu $Zn^{(II)}$ v prostatických zdravých a nádorových buňkách. Bylo zjištěno, že s přibývajícím koncentrací $Zn^{(II)}$ přidaného do živného média rakovinných prostatických buněk klesá množství $Zn^{(II)}$ v buňkách oproti zdravým buňkám. Dále byla vyvinuta metoda pro rychlou izolaci proteinů obsahující zinek pomocí magnetizovatelných částic. Výsledky experimentální práce vykazují slibné výsledky, ale je potřeba ještě hodně experimentálních studií, aby se tento rakovinný marker mohl využívat i v běžné praxi.

LITERATURA

A.-S. G. (2011): Cancer de la prostate: les marques biologiques. *Medecine Nucleaire*, 35(373-377).

Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. (2006): Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, 5(1): 196-201.

Auld D. S. (2001): Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*, 14(3-4): 271-313.

Barry M. J. (2001): Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 344(1373-1377).

Beyersmann D., Haase H. (2001): Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*, 14(3-4): 331-341.

Colvin R. A., Holmes W. R., Fontaine C. P., Maret W. (2010): Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2(5): 306-317.

Costello L. C., Franklin R. B. (2000): The intermediary metabolism of the prostate: A key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*, 59(4): 269-282.

Dhanasekaran S. M., Barrette T. R., Ghosh D., Shah R., Varambally S., Kurachi K., Pienta K. J., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M. (2001): Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, 412(6849): 822-826.

Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R. (2011): Insight to Physiology and Pathology of Zinc(II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Current Medicinal Chemistry*, 18(33): 5041-5051.

Humphrey P. A. (2012): Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*, 60(1): 59-74.

Kambe T., Yamaguchi-Iwai Y., Sasaki R., Nagao M. (2004): Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(1): 49-68.

Krizkova S., Adam V., Eckschlager T., Kizek R. (2009): Using of chicken antibodies for metallothionein detection in human blood serum and cadmium-treated tumour cell lines after dot- and electroblotting. *Electrophoresis*, 30(21): 3726-3735.

Krizkova S., Ryvolova M., Hynek D., Eckschlager T., Hodek P., Masarik M., Adam V., Kizek R. (2012): Immunoextraction of zinc proteins from human plasma using chicken yolk antibodies immobilized onto paramagnetic particles and their electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 33(12): 1824-1832.

Maret W., Li Y. (2009): Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chemical Reviews*, 109(10): 4682-4707.

Rosenberg M. T., Froehner M., Albala D., Miner M. M. (2010): Biology and natural history of prostate cancer and the role of chemoprevention. *International Journal of Clinical Practice*, 64(13): 1746-1753.

Shearer R. J. (1991): Prostatic specific antigen. *British Journal of Urology*, 67(1): 1-5.

Stefanidou M., Maravelias C., Dona A., Spiliopoulou C. (2006): Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology*, 80(1): 1-9.

Wisniewski J. R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6(5): 359-U60.

Wong C., Sridhara S., Bardwell J. C. A., Jakob U. (2000): Heating greatly speeds coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques*, 28(3): 426-+.