

## EFFECT OF ZINC(II) IONS ON THE EXPRESSION OF PRO- AND ANTI-APOPTOTIC FACTORS IN HIGH-GRADE PROSTATE CARCINOMA CELLS

EFEKT ZINEČNATÝCH IONTŮ NA EXPRESI PRO- A ANTI-APOPTOTICKÝCH FAKTORŮ V PROSTATICÝCH NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

Balvan J.<sup>1</sup>, Holubová M.<sup>1</sup>, Gumulec J.<sup>1, 3</sup>, Sztalmachová M.<sup>1, 2</sup>, Raudenská M.<sup>1</sup>, Adam V.<sup>2, 3</sup>, Kizek R.<sup>2, 3</sup>, Masařík M.<sup>1, 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>Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

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

Email: 141792@mail.muni.cz

---

### ABSTRACT

Several typical characteristics of prostate tissue have been identified including the ability to accumulate zinc(II). However, this feature of prostate cells is lost during carcinogenesis and, thus, prostate cells are unable to accumulate zinc(II) ions in high levels. Therefore, we can expect that zinc(II) ions can significantly contribute to the progression of tumour disease and to the ability of prostate cell lines to metastasize. In this study, we aimed our attention on determining the expression of Bcl-2, c-Fos, c-Jun, Ki-67, NF-κB and p53 genes in two prostate cell lines, as the 22Rv1 cell line, a model of aggressive partially androgen-sensitive prostate cancer and the PNT1A cell line, a

normal prostate cell line model. Moreover, we were interested in the mechanisms through which exposure of these cell lines to zinc(II) ions could influence expression of the above-mentioned genes. We found that zinc(II) ions caused elevated expression of

Ki-67, a marker of proliferation, extremely low expression of p53, high expression of Bcl-2 and no changes in the expression of p53. Our experimental data show different effect of zinc(II) ions on expression of the above-mentioned regulatory genes, which may give us more information on their impact on cancer development and progression with possible using for cancer therapy.

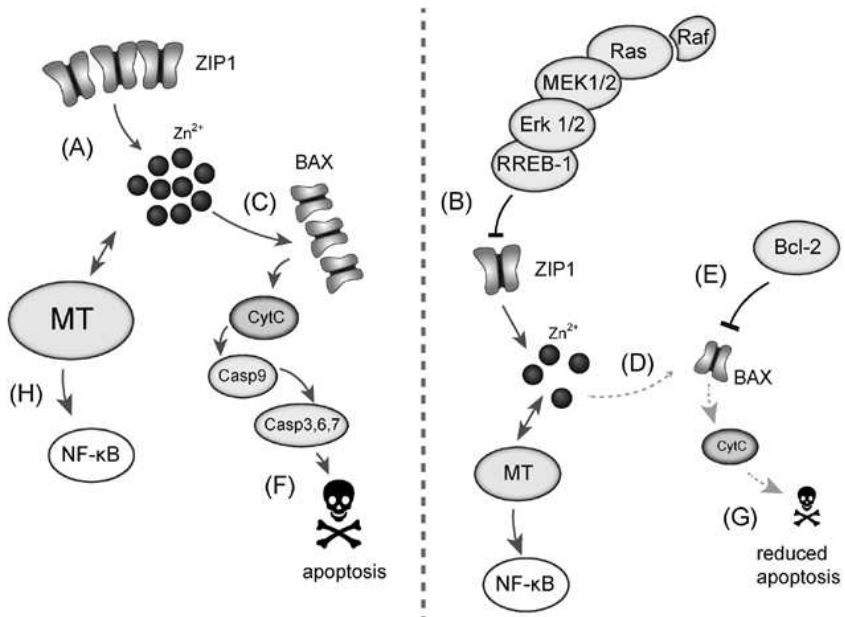
**Key words:** apoptosis, prostate cancer, prognostic marker, Bcl-2, p53, polymerase chain reaction, thiol group, fluorescence microscopy

**Acknowledgments:** Financial support from CYTORES P301/10/0356, CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 and LPR 2011 is greatly acknowledged.

## ÚVOD

Rakovina prostaty je druhým nejčastěji diagnostikovaným rakovinným onemocněním a šestou nejčastější příčinou smrti v mužské populaci. Díky mortalitě a incidenci s ní spojenou, jsou časná diagnóza, identifikace vysoce agresivních klinicky skrytých forem a porozumění patogenезi onemocnění, i s jeho metabolickými odlišnostmi, nezbytnými faktory pro vývoj specificky zaměřené terapie. Zaměříme-li se na tyto faktory, je nutné porozumět biochemii normálních i nádorových prostatických buněk. Na základě tohoto výzkumu byly stanoveny různé typické charakteristiky prostatické tkáně, mezi něž patří i schopnost prostaty akumulovat zinečnaté ionty, viz obr. 1.

*Obr. 1 Rozdíly v mechanismech zprostředkovaných zinečnatými ionty ve zdravé a v nádorové tkáni.*



(A) Ve zdravé prostatické tkáni jsou přítomny vysoké hladiny  $Zn^{2+}$  v porovnání s (B) nádorovou tkáni, kde jsou zinkové transportéry ZIP1 inhibovány nadměrně stimulovanou kaskádou Ras-Raf-Mek-Erk. (C) Zinečnaté ionty zvyšují tvorbu pórů BAX v mitochondriální membráně a (F) indukují cytochromem c (CytC)/kaspázou (Casp)-zprostředkovanou apoptózu. Naopak v rakovinné

prostatické tkáni je tvorba BAX inhibována pomocí (E) Bcl-2 a (D) nízkými intracelulárními hladinami  $Zn^{2+}$ , což se projeví nižším proapoptotickým efektem (G). Odlišné hladiny  $Zn^{2+}$  ve zdravých a v nádorových buňkách interagují s metalothioneinem (MT), který rozdílně zvyšuje expresi NF- $\kappa$ B.

Intracelulární koncentrace  $Zn^{2+}$  v prostatické tkáni převyšuje koncentraci detekovanou v ostatních typech buněk zhruba desetkrát. Tato vlastnost prostatických buněk se však ztrácí během karcinogeneze, a proto jsou nádorové buňky neschopné akumulace vysokých hladin  $Zn^{2+}$ . Lze proto očekávat, že zinečnaté ionty výrazně přispívají k progresi nádorového onemocnění a ke schopnosti prostatických buněčných linií metastázovat.

Početné studie na buněčných liniích i na pacientech s nádorovým onemocněním prostaty prokázaly existenci různých proteinů spojených s vznikem nádorů prostaty včetně Bcl-2. Jedná se o intracelulární protein patřící do velké skupiny proteinů rodiny Bcl-2, působí jako inhibitor apoptózy. Předchází jak apoptóze závislé na kaspázách, tak i oxidativní nekróze. Za normálních podmínek je Bcl-2 zakotven ve vnější mitochondriální membráně. Část jeho molekuly vyčnívá do cytozolu, což mu dává možnost interagovat s ostatními proteiny. Tyto interakce jsou důležité pro udržování správné funkce a integrity mitochondriální membrány. Vazbou na pro-apoptotické členy rodiny Bcl-2 předchází aktivaci mitochondriální apoptotické dráhy založené na narušení propustnosti mitochondriální membrány. Zvýšená exprese onkoproteinu Bcl-2 v lidských nádorových buňkách přispívá k rezistenci vůči chemoterapii a radioterapii-indukované apoptóze a je spojena s nepříznivou prognózou. Většina lidských nádorů prostaty exprimuje Bcl-2 ve zvýšené míře, což způsobuje rezistenci nádorů k chemoterapii a radioterapii. Expresce Bcl-2 je spojena s progresí nádorů, nepříznivou prognózou u pacientů s rakovinou prostaty a vývojem androgen-nezávislého karcinomu prostaty. Bcl-2 pravděpodobně interaguje i s jinými proteiny zapojenými v nádorových procesech, příkladem mohou být c-Fos, c-Jun, Ki-67, NF- $\kappa$ B a p53.

Tato studie je zaměřena na analýzu vlivu zinečnatých iontů na expresi genů Bcl-2, c-Fos, c-Jun, Ki-67, NF- $\kappa$ B a p53 v nádorové linii odvozené z primárního nádoru prostaty.

## MATERIÁL A METODIKA

Buněčné linie. V této studii byly použity dvě lidské prostatické buněčné linie: a) PNT1A lidská buněčná linie vzniklá immortalizací normálních dospělých prostatických epiteliálních buněk transfekcí plazmidem obsahujícím SV40 genom s poškozeným počátkem replikace. Primární kultura byla získána z normální prostatické tkáně 35 let starého muže *post mortem*. b) 22Rv1 linie lidských buněk odvozených z primárního nádoru prostaty.

**MENDELNET 2012**

Kultivace buněk. Buňky PNT1A byly kultivovány v médiu RPMI-1640 doplněném 10% fetálním bovinním sérem (FBS). Buňky 22Rv1 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 bez fenolové červeně s 10% FBS. Média byla doplněna penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (0,1 mg/ml). Buňky byly udržovány v prostředí inkubátoru o teplotě 37 °C, s vlhkostí 60% s 5% CO<sub>2</sub>.

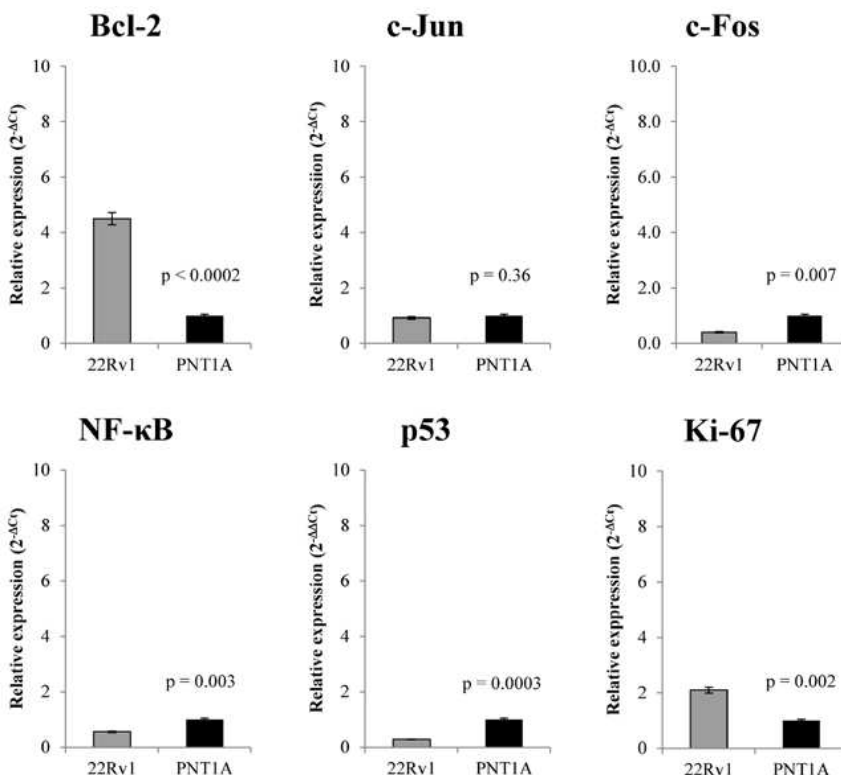
Působení Zn<sup>2+</sup> na buněčné kultury. Okamžitě po dosažení 50-60% konfluency buněčného růstu byly buňky přemístěny do čerstvého média pro synchronizaci jejich růstu. Za těchto podmínek byly buňky kultivovány 24 h a následně vystaveny působení ZnSO<sub>4</sub> (0-100 μM pro obě buněčné linie) rozpuštěném v čerstvém médiu po dobu 48 hodin.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (*RT-PCR*). RT-PCR byla prováděna v triplikátech za použití genové expresní analýzy TaqMan s pomocí real-time PCR systému 7500 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA). Amplifikovaná cDNA byla analyzována Ct srovnávací metodou za použití β-aktinu jako endogenní kontroly. Real-time PCR byla prováděna za následujících podmínek: celkový objem 20 μl, iniciační denaturace 95 °C/10 min, poté 40 cyklů 95 °C/15 s, 60 °C/1 min.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Porovnání exprese genu Bcl-2 a dalších regulačních genů po působení iontů  $Zn^{2+}$ . Zaměřili jsme se na pozorování rozdílů v úrovních exprese a změnách v transkripci genů Bcl-2, c-Fos, c-Jun, NF- $\kappa$ B, Ki-67 a p53 v prostatických buněčných liniích ovlivněných působením zinečnatých iontů. Základní míra transkripce a efekt  $Zn^{2+}$  na míru transkripce vybraných genů byly monitorovány pomocí RT-PCR. Obrázek 2 ukazuje, že buňky linie 22Rv1 vykazují rozdílné trendy exprese sledovaných genů v porovnání s buněčnou linií PNT1A.

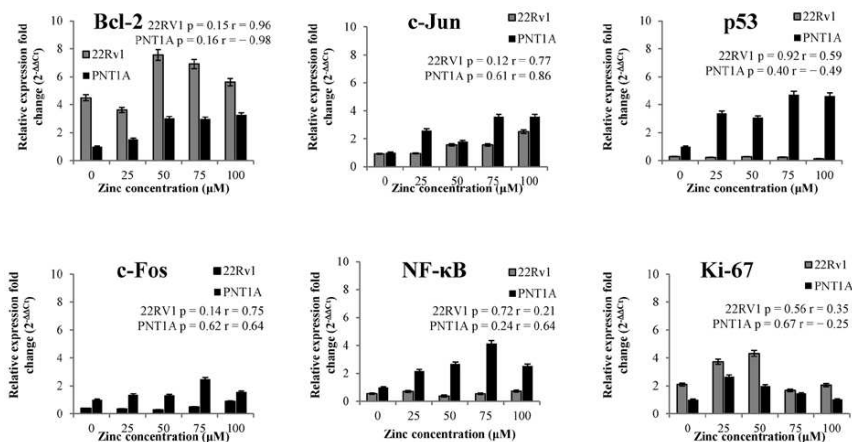
Obr. 2 Porovnání základní úrovně exprese genů c-Fos, c-Jun, NF- $\kappa$ B, Ki-67 a p53 na úrovni RNA. Měření úrovně transkripce bylo prováděno pomocí RT-PCR.



Buňky 22Rv1 vykazují 4,5x vyšší úroveň exprese anti-apoptotického genu Bcl-2. V expresi genu c-Jun jsme nenašli mezi oběma liniemi výrazné rozdíly. Gen c-Fos, který společně s c-Jun formuje důležitou část transkripčního faktoru AP-1, je v buňkách 22RV1 exprimován 2,5x méně než v linii PNT1A. Ki-67, jaderný protein spojený s buněčnou proliferací, je v buňkách linie 22Rv1 přítomen ve 2x vyšší koncentraci než v buňkách linie PNT1A. Navíc NF- $\kappa$ B je v buňkách 22Rv1,

v porovnání s buňkami PNT1A, přítomen v poloviční koncentraci a protein p53, klíčový regulátor apoptózy, vykazuje 3,5 násobné snížení hladiny v linii 22RV1 v porovnání s linií PNT1A. Po základní charakterizaci exprese vybraných markerů ve zkoumaných buněčných liniích jsme se zaměřili na efekt způsobený působením iontů  $Zn^{2+}$  na změny v expresi sledovaných regulačních genů (Obr. 3).

Obr. 3 Efekt působení iontů  $Zn^{2+}$  na změny v expresi genů *c-Fos*, *c-Jun*, *NF-κB*, *Ki-67* a *p53* na úrovni RNA. Buňky 22RV1 vykazují nejen rozdílnou úroveň exprese těchto genů v porovnání s buňkami PNT1A, ale i rozdílný efekt zinečnatých iontů na úroveň transkripce v obou buněčných liniích.



Zjistili jsme, že zinečnaté ionty pozitivně ovlivňují expresi Bcl-2 v obou zkoumaných buněčných liniích, více však v linii PNT1A (3,2x zvýšení exprese v případě působení 100  $\mu M$  koncentrace  $Zn^{2+}$ ). U buněčné linie 22RV1 jsme po působení  $Zn^{2+}$  nezaznamenali výrazné změny exprese p53, což kontrastuje s linií PNT1A, kde došlo k 3 až 4,7 násobnému nárůstu exprese tohoto genu. Gen Ki-67 vykazuje po působení  $Zn^{2+}$  podobný trend u obou buněčných linií. Není překvapující, že buňky linie 22RV1, charakterizované vysokou proliferační rychlostí, exprimují Ki-67, účastníci se proliferačních procesů, ve vyšších hladinách. Buněčná linie PNT1A zase v porovnání s linií 22RV1 exprimovala ve vyšší míře gen c-Jun, i když zinečnaté ionty zvyšovaly expresi tohoto genu v obou liniích. V expresi genů c-Jun a c-Fos po působení  $Zn^{2+}$  nebyly zaznamenány žádné souvislosti, avšak v expresním profilu c-Fos jsme po působení  $Zn^{2+}$  pozorovali statisticky významnou pozitivní korelaci s NF-κB. Oba geny byly v linii PNT1A exprimovány ve vysokých koncentracích jak v základním expresním profilu, tak i po působení zinečnatých iontů.

## ZÁVĚR

Zinek hraje roli v energetickém metabolismu, proliferaci a apoptóze buněk prostatické tkáně, můžeme tedy předpokládat, jeho důležitou roli v patogenezi rakoviny prostaty. Naše výsledky odhalily, že základní úroveň exprese anti-apoptického genu Bcl-2 je 4,5x vyšší v buňkách linie 22Rv1 než v buňkách linie PNT1A. Tento výsledek je v souladu s dříve publikovanými studiemi, ve kterých byla v nádorech prostaty zaznamenána zvýšená úroveň exprese Bcl-2. Navíc bylo toto zvýšení exprese spojováno s vývojem na androgenech nezávislého karcinomu prostaty a také s rezistencí vůči chemoterapii a radioterapii. Je zajímavé, že po působení zinečnatých iontů jsme pozorovali zvýšení exprese Bcl-2 jak v buněčné linii 22Rv1, tak i v linii PNT1A, i když v případě linie 22Rv1 bylo zvýšení exprese 7,5x vyšší než u linie PNT1A. Přestože přesný mechanismus progresu karcinomu prostaty zůstává nejasný, potvrdily naše poznatky domněnku, že vysoké koncentrace  $Zn^{2+}$  mohou přispívat k terapii rezistentních nádorů prostaty se zvýšenou expresí Bcl-2.

## LITERATURA

- Adam V., Fabrik I., Eckschlager T., Stiborova M., Trnkova L., Kizek R. (2010): Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. *TRAC-Trends Anal. Chem.*, 29(5): 409-418.
- Babula P., Kohoutkova V., Opatrilova R., Dankova I., Masarik M., Kizek R. (2010): Pharmaceutical importance of zinc and metallothionein in cell signalling. *Chim. Oggi-Chem. Today*, 28(6): 18-21.
- Bohuslav J., Chen L. F., Kwon H., Mu Y. J., Greene W. C. (2004): p53 induces NF-kappa B activation by an I kappa B kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J. Biol. Chem.*, 279(25): 26115-26125.
- Bragado P., Armesilla A., Silva A., Porras A. (2007): Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis*, 12(9): 1733-1742.
- 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.
- Costello L. C., Franklin R. B. (2011): Zinc is decreased in prostate cancer: an established relationship of prostate cancer! *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16(1): 3-8.
- Costello L. C., Liu Y. Y., Franklin R. B., Kennedy M. C. (1997): Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 272(46): 28875-28881.
- Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R. (2009): Metallothioneins and cancer. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 10(4): 360-375.
- 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. *Curr. Med. Chem.*, 18(33): 5041-5051.

Krizkova S., Fabrik I., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Kizek R. (2009): Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratisl. Med. J.-Bratisl. Lek. Listy*, 110(2): 93-97.

Krizkova S., Masarik M., Eckschlager T., Adam V., Kizek R. (2010): Effects of redox conditions and zinc(II) ions on metallothionein aggregation revealed by chip capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1217(51): 7966-7971.

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.

Masarik M., Gumulec J., Sztalmachova M., Hlavna M., Babula P., Krizkova S., Ryvolova M., Jurajda M., Sochor J., Adam V., Kizek R. (2011): Isolation of metallothionein from cells derived from aggressive form of high-grade prostate carcinoma using paramagnetic antibody-modified microbeads off-line coupled with electrochemical and electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 32(24): 3576–3588.

Scott S. L., Higdon R., Beckett L., Shi X. B., White R. W. D., Earle J. D., Gumerlock P. H. (2002): BCL2 antisense reduces prostate cancer cell survival following irradiation. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 17(6): 647-656.

Zaichick V. Y., Sviridova T. V., Zaichick S. V. (1997): Zinc in human prostate gland: Normal, hyperplastic and cancerous. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 217(2): 157-161.