

## AUTOMATED ZINC PROTEINS EXTRACTION FROM PROSTATIC CANCER CELLS USING MAGNETIC PARTICLES

### AUTOMATIZOVANÁ EXTRAKCE ZINKOVÝCH PROTEINŮ Z PROSTATICKÝCH NÁDOROVÝCH BUNĚK ZA POUŽITÍ MAGNETIZOVATELNÝCH ČÁSTIC

Dostálová S.<sup>1</sup>, Jílková E.<sup>1</sup>, Křížková S.<sup>1, 3</sup>, Masařík M.<sup>1, 2</sup>, Šmerková K.<sup>1</sup>, Hýnek D.<sup>1, 3</sup>, Ruttkay-Nedecký B.<sup>1, 3</sup>, Krejčová L.<sup>1</sup>, Adam V.<sup>1, 3</sup>, Kizek R.<sup>1, 3</sup>

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

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

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

E-mail: kizek@sci.muni.cz

#### ABSTRACT

Prostate cancer is a huge problem in modern world, mainly in the developed countries. It is important to diagnose this disease as soon as possible due to its high mortality. Prostate tissue has a unique ability to accumulate zinc ions. However cancer prostate tissue loses this ability. It is therefore possible to help the diagnosis of the prostate cancer via the isolation of zinc proteins contained in prostatic tissue. This isolation can be carried out using magnetic particles modified with anti-Zn<sup>II</sup>-antibodies.

Our objective was to create a procedure for isolation of zinc proteins from prostatic cells using magnetic particles and automated pipetting station. Cell lines PNT1A and LNCaP were used for experiments. Cell line PNT1A represents healthy prostate tissue, line LNCaP represent cancer tissue. There was decreasing level (10%) of Zn<sup>II</sup> ions observed in the cancer prostatic cell lines for the 25 and 50 μM concentrations of zinc.

**Key words:** electrochemistry, magnetic particles, prostate cancer, Zn<sup>II</sup>

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

## ÚVOD

Magnetizovatelné částice (MPs) jsou struktury o rozměrech řádově nanometrů až několika mikrometrů, které mají paramagnetické nebo superparamagnetické vlastnosti. To umožňuje částicím změnu chování v závislosti na aplikaci vnějšího magnetického pole (Hsing, a kol., 2007). Je tak možné je snadno shlukovat nebo rozptylovat v nějakém roztoku. Částice jsou většinou vyrobeny z kompozitních materiálů, složených z feromagnetické nebo ferimagnetické a diamagnetické složky. Feromagnetická nebo ferimagnetická složka je nutná pro interakci s vnějším magnetickým polem a diamagnetická složka zajišťuje specifickou interakci s analytem (Safarik a Safarikova, 2009).

Povrch částic je také možné modifikovat širokou škálou specifických látek a mohou tak sloužit jako vhodný nástroj pro specifickou izolaci různých látek (Hsing, a kol., 2007), pro cílený transport genů (Scherer, a kol., 2002) nebo léčiv, opravu tkání, detoxikaci biologických tekutin (Gupta a Gupta, 2005) nebo zobrazování pomocí nukleární magnetické rezonance (Yezhelyev, a kol., 2006). Neprovádí se jen modifikace částic pro jejich specifickou afinitu, ale také pro stabilizaci částic *in vivo* a *in vitro* (Gupta a Gupta, 2005). Pro separaci látek jsou částice velmi vhodné, a to vzhledem ke svým unikátním magnetickým vlastnostem, nízké ceně syntézy, snadnému postupu izolace, eliminaci nespecifické adsorpce biomolekul, zkrácení času izolace a možnosti miniaturizace a automatizace (Hsing, a kol., 2007, Huska, a kol., 2011).

Pomocí magnetizovatelných částic je možné izolovat nukleové kyseliny (Broutian, a kol., 2011), proteiny a peptidy (Safarik a Safarikova, 2004) nebo celé buňky (Dincman, a kol., 2012). Pro izolaci proteinů je možné provést imunomagnetickou separaci, kdy jsou protilátky proti těmto proteinům navázány na povrch částic (Tu, a kol., 2011). Tuto vazbu je možné provést několika způsoby. Jeden z nich je modifikovat povrch částic tosylací, kdy se protilátky na povrch částic vážou na základě kovalentní vazby, pokud obsahují thiolovou nebo aminoskupinu (Krizkova, a kol., 2012, Rastogi, a kol., 2009). Další možností je modifikace povrchu částic streptavidinem, kdy je ale nutná biotinylace protilátek (Tu, a kol., 2011).

## MATERIÁL A METODIKA

Pokud není uvedeno jinak, všechny chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (USA).

### *Modifikace magnetizovatelných částic*

Slepíčí protilátky byly připraveny na zakázku firmou HENA, s. r. o. (Česká republika) tak, že dvě slepice byly imunizovány Zn-KLH komplexem a IgY frakce, která je k tomuto komplexu reaktivní

byla získána z vaječného žloutku. Protilátky byly stabilizovány v 0,1% azidu sodném ve fosfátovém pufru (PBS), přičemž koncentrace proteinu byla 39,6 mg/ml v imunoglobulinové frakci.

Pro kovalentní imobilizaci protilátek byly použity superparamagnetické polystyrenové částice Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated od firmy Invitrogen (Norsko), jejichž povrch je modifikován polyurethanovou vrstvou. S použitím filtrů Amicon Ultra 0,5 s membránou 50 K od firmy Millipore (USA) byl odstraněn azid sodný a protilátky byly pomocí HCl okyseleny na pH 2,5. Po 15 minutách pak byl k protilátkám přidán fosfátový pufr (PBS). Imobilizační protokol byl podle (Krizkova, a kol., 2012), pro imobilizaci byl použit 1 mg protilátek na 25 mg částic. Imobilizace probíhala v celkovém objemu 625  $\mu$ l v 0,1 M borátovém pufru (pH 9,5) a 0,1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  24 hodin za mírné rotace (30 rpm; 90°) pomocí Multi RS-60 od firmy Biosan (Lotyšsko). Poté byl 0,5% hovězím sérovým albuminem (BSA) v PBS s 0,05% Tween-20 blokováno volný povrch částic po dobu 10 hodin. Následně byly částice třikrát promyty v 1 ml 0,1% BSA v PBS s 0,05% Tween-20 a resuspendovány v 625  $\mu$ l promývacího pufru s 0,02 % azidem sodným.

#### *Kultivace a lýza prostatických buněk*

Buněčné linie LNCaP a PNT1A byly zakoupeny od firmy HPA (Velká Británie). Linie LNCaP jsou prostatické nádorové buňky odvozené z metastázy v levé supraklavikulární uzlině a linie PNT1A je srovnávacím případem zdravé prostatické tkáně. Linie LNCaP byla kultivována v inkubátoru při 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) v HAM F12 médiu s přidavkem 7% fetálního bovinního séra (FBS), linie PNT1A v médiu RPMI-1640 s přidavkem 10% FBS za stejných podmínek jako předchozí linie. Do médií byla vždy přidána antibiotika penicilin (o koncentraci 100 U/ml) a streptomycin (o koncentraci 0,1 mg/ml). Buněčné linie byly následně obohaceny zinkem (Zn<sup>II</sup>), jehož koncentrace byly na základě výsledků MTT testu zvoleny jako 0, 25 a 50  $\mu$ M.

Buňky byly vždy dvakrát promyty 5 ml PBS (zchlazen na 0 °C). Poté byly zality PBS, setřeny kličkou, suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky a centrifugována 7 minut při 27000 ot./min a 4 °C. Po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány v PBS a spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Následovala znovu centrifugace, odsátí supernatantu a resuspendování v 1 ml PBS. Suspenze byla přepipetována do mikrozukavky a znovu centrifugována. Lýza se prováděla tepelnou denaturací, sonikací a podle Wisniewského (Wisniewski, a kol., 2009). V případě tepelné denaturace bylo k buňkám přidáno 75  $\mu$ l PBS a lyzovaly se 3 minuty při 20 °C. Poté bylo přidáno 125  $\mu$ l PBS a lýza probíhala na přístroji Thermomixer comfort od firmy Eppendorf (Německo) 15 minut při 99 °C. Následuje centrifugace 30 minut při 14 000 ot./min a 4 °C a lýzát byl odsát do čisté mikrozukavky.

#### *Imunoextrakce zinkových proteinů*

Pro izolaci Zn<sup>(II)</sup> proteinů byly použity magnetizovatelné částice Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated od firmy Invitrogen (Norsko) s navázanou slepičí protilátkou podle výše uvedeného postupu. V této práci byl vyvinut postup této imunoextrakce. Pro jeho zautomatizování byla použita automatická pipetovací stanice epMotion 5075 od firmy Eppendorf (Německo), kde byly

experimenty vykonány v destičkách Deepwell plate 96/1200  $\mu$ l Protein LoBind, jejichž povrch je upraven pro snížení navázání proteinů na něj. Magnetický stojánek byl pořízen od firmy Promega.

#### *Elektrochemické měření zinku*

Stanovení množství volných zinečnatých iontů ve vzorku bylo provedeno metodou diferenční pulzní voltametrie na analyzátoru Autosampler 813 Compact (Metrohm, Švýcarsko) propojeném s VA Stand 797 (Metrohm, Švýcarsko). Pro měření bylo použito standardní tříelektrodové zapojení, kdy pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), referenční argentchloridová a pomocná byla platinová elektroda. Parametry měření: počáteční potenciál -1,5 V; konečný potenciál 0,75 V; krok 5,035 mV; doba kroku 0,3 s; depozice 360 s; probublávání argonem 90 s; pulzní amplituda 0,025 V; impulzní čas 0,04 s; objem vstříkovaného vzorku 100  $\mu$ l, cela o celkovém objemu 2 ml byla doplněna 1900  $\mu$ l acetátového pufru.

Pro stanovení množství vázaných zinečnatých iontů bylo potřeba vzorek nejdříve zmineralizovat pomocí mikrovlnného systému Multiwave 3000 od firmy Anton-Paar GmbH (Rakousko). 15  $\mu$ l vzorku, 350  $\mu$ l koncentrované kyseliny dusičné a 150  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bylo napipetováno do lahvičky MG5. Vzorek byl uzavřen a umístěn do rotoru 64MG5 po dobu 50 minut s následujícím programem: 10 minut 50 W, 30 minut 100 W a 10 minut 0 W. Vázané zinečnaté ionty byly poté stanoveny stejnou metodou jako volné.

#### *Elektroforetická separace zinkových proteinů*

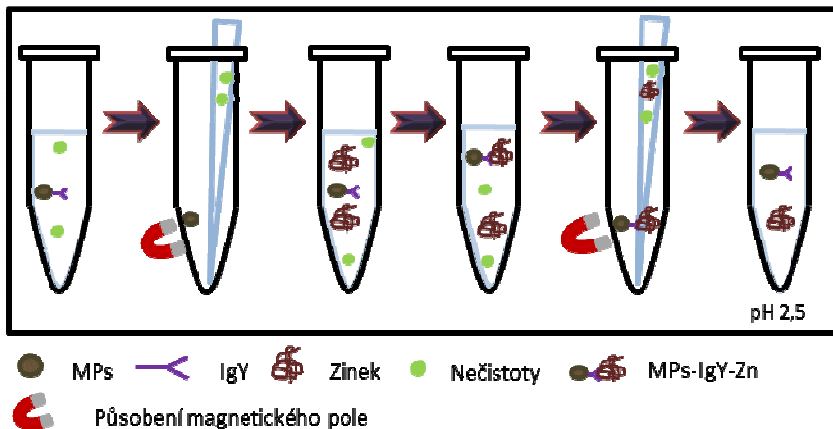
Kromě elektrochemické detekce, byly izolované proteiny detekovány také pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Ta byla provedena na přístroji Mini Protean Tetra od firmy Biorad (USA) a gel měl rozměry 8,3  $\times$  7,3 cm. Dělicí pufr byl 15%, zaostřovací gel byl 5%. Gely byly vyrobeny z 30% akrylamidu a 1% bisakrylamidu. Polymerace gelů probíhala 45 minut při 20 °C v případě dělicího gelu a 30 minut při 20 °C u zaostřovacího gelu. Vzorky byly vždy smíchány s nanášecím pufrem v poměru 2:1 a inkubovány 3 minuty při 93 °C. Pro stanovení molekulové hmotnosti byl použit standard Precision plus protein standards od firmy Biorad (USA). Samotná elektroforéza probíhala za následujících podmínek: 1 hodina, 150 V, 23 °C na přístroji PowerBasic od firmy Biorad (USA) v Tris (2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol) – glycinovém separačním pufru (0,025M Trizma base; 0,19M glycin; 3,5 mM SDS pH 8,3). Barvení probíhalo barvivem coomassie blue a stříbrem.

## **VÝSLEDKY A DISKUZE**

Cílem této práce bylo navrhnout metodu izolace zinkových proteinů z reálných vzorků prostatických buněk. Nejdříve je do každé jamky nebo mikrozkušavky napipetováno 10  $\mu$ l magnetizovatelných částic s navázanou slepičí protilátkou proti zinkovým proteinům. Poté je potřeba částice promýt pro odstranění kontaminantů, je k nim tedy přidáno 300  $\mu$ l PBS pH 7,5, částice jsou v něm resuspendovány, destička nebo mikrozkušavka je umístěna na magnetický stojánek a promývací roztok je odstraněn. Toto promytí částic se poté ještě 2 $\times$  opakuje. Následně se přidá 150  $\mu$ l buněčného lyzátu a imobilizace probíhá 30 minut při 20 °C, přičemž jsou částice se vzorkem vždy po 15 minutách promíchány pipetou. Destička nebo zkušavka se poté opět přemísť

na magnetický stojánek, přebytečný roztok je odstraněn a částice s navázanými zinkovými proteiny jsou promyty 500  $\mu$ l PBS pH 7,5. Eluce proteinů poté probíhá 35 minut do 30  $\mu$ l 0,1 M citrátu pH 2,5 a vždy po 5 minutách je vzorek promíchán. Schéma postupu je možné vidět na Obr. 1.

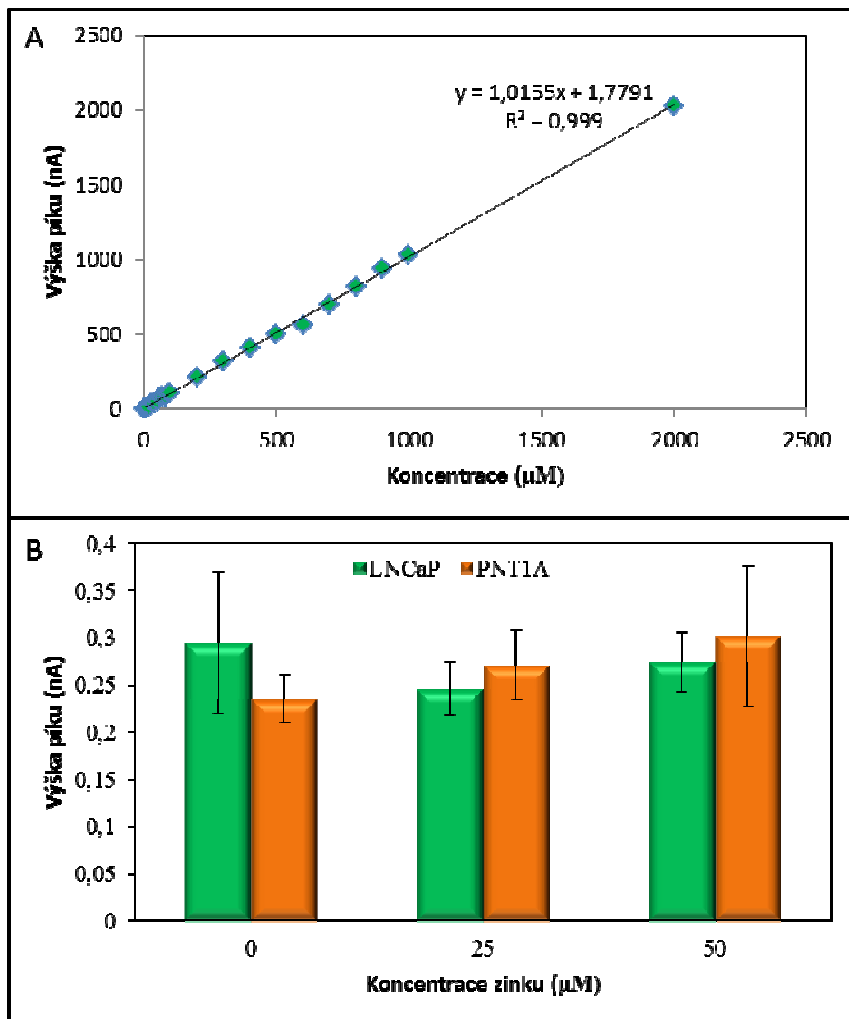
Obrázek 1 Schéma izolace zinkových proteinů pomocí magnetizovatelných částic.



Pro elektrochemická měření byla vytvořena lineární kalibrační závislost naměřené výšky píku na koncentraci  $Zn^{II}$  ve vzorku (Obr. 2A). Podle rovnice regrese zjištěné z této kalibrační křivky byly následně vypočteny koncentrace  $Zn^{II}$  v reálných vzorcích podle výšky naměřeného píku.

Z naměřených výsledků (Obr. 2B) je patrné, že je rozdíl mezi množstvím izolovaných zinkových proteinů mezi jednotlivými liniemi. Zatímco při koncentraci  $Zn^{II}$  0  $\mu$ M byl obsah zinku v nádorové linii LNCaP o 20 % vyšší, než u kontrolní linie PNT1A, u koncentrací 25 a 50  $\mu$ M byl obsah  $Zn^{II}$  v kontrolní linii o 10 % vyšší ve srovnání s nádorovou linií LNCaP.

Obrázek 2 A) Kalibrační křivka zinku; B) Obsah  $Zn^{II}$  v lyzátu u nádorové a kontrolní linie karcinomu prostaty.



## ZÁVĚR

Magnetizovatelné částice mohou sloužit jako nástroj pro izolaci velké řady specifických látek díky svým unikátním vlastnostem a možnostem modifikace jejich povrchu, automatizace a miniaturizace. Jako možnost aplikace pro širokou veřejnost se jeví využití těchto částic při studiu exprese zinkových proteinů v buněčných liniích karcinomu prostaty. Prostatická tkáň má totiž zvýšenou schopnost akumulace zinečnatých iontů, ale v případě rakovinného onemocnění tuto schopnost ztrácí.

Částice je možné modifikovat protilátkami proti zinku, izolovat tak zinkové proteiny z prostatické tkáně a porovnáním se zdravými prostatickými buňkami studovat rozdíly v expresi zinkových proteinů mezi zdravou a nádorovou tkání.

V práci byla vyvinuta rychlá metoda pro izolaci zinkových proteinů z prostatických buněk využívající magnetizovatelné částice, na které jsou navázány protilátky proti zinku. Tato metoda byla implementována na automatickou pipetovací stanici epMotion 5075 pro eliminaci chyb vzniklých lidským faktorem.

## LITERATURA

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.

Broutian T. R., He X., Gillison M. L. (2011): Automated high throughput DNA isolation for detection of human papillomavirus in oral rinse samples. *Journal of Clinical Virology*, 50(4): 270-275.

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.

Dincman T. A., Beare J. E., Ohri S. S., Whittemore S. R. (2012): Isolation of cortical mouse oligodendrocyte precursor cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 209(1): 219-226.

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.

Gupta A. K., Gupta M. (2005): Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18): 3995-4021.

Habib F. K. (1980): Evaluation of androgen metabolism studies in human-prostate cancer-correlation with zinc levels. *Preventive Medicine*, 9(5): 650-656.

Hsing I. M., Xu Y., Zhao W. T. (2007): Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis*, 19(7-8): 755-768.

Huska D., Adam V., Babula P., Trnkova L., Hubalek J., Zehnalek J., Havel L., Kizek R. (2011): Microfluidic robotic device coupled with electrochemical sensor field for handling of paramagnetic micro-particles as a tool for determination of plant mRNA. *Microchim. Acta*, 173(1-2): 189-197.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y. P., Xu J. Q., Murray T., Thun M. J. (2008): Cancer statistics, 2008. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 58(2): 71-96.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y. P., Xu J. Q., Thun M. J. (2009): Cancer Statistics, 2009. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 59(4): 225-249.

Jemal A., Siegel R., Xu J. Q., Ward E. (2010): Cancer Statistics, 2010. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 60(5): 277-300.

Jep Č. Č. Ceska republika a rakovina v cislech: Ceska onkologicka spolecnost Ceske lekarske spolecnosti Jana Evangelisty Purkyne, 2011.

Krizkova S., Jilkova E., Krejцова L., Cernei N., Hynek D., Ruttkay-Nedecky B., Sochor J., Kynicky J., Adam V., Kizek R. (2012): An assay for isolation of zinc(II)-containing bacterial proteins using microfluidic coupled with paramagnetic particles. *Electrophoresis*, in press(

Krizkova S., Ryvolova M., Hynek D., Eckschlagler 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.

Rastogi S. K., Gibbon S., Branan J. R., Branan A. L. Amperometric Detection of Staphylococcal Enterotoxin B in milk using Magnetic Bead-Based Immunoassay on Disposable Screen Printed Carbon Electrode Strip. In: LAUDON, M.; ROMANOWICZ B., eds. *Nanotech Conference & Expo 2009, Vol 1, Technical Proceedings*. Boca Raton: Crc Press-Taylor & Francis Group, 2009.

Safarik I., Safarikova M. (2004): Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2(7): 17.

Safarik I., Safarikova M. *Magnetically Responsive Nanocomposite Materials for Bioapplications*. In: KNY, E., ed. *Nanocomposite Materials*. Stafa-Zurich: Trans Tech Publications Ltd, 2009 (vol 151).

Sanna V., Sechi M. (2012): Nanoparticle therapeutics for prostate cancer treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(31-36).

Sarada N. C., Thamaraiselvi K., Vijayalakshmi M. A. (2008): Anti Zn antibodies: Cross reactivity and competitive binding with heavy metals. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 861(2): 236-239.

Scherer F., Anton M., Schillinger U., Henkel J., Bergemann C., Kruger A., Gansbacher B., Plank C. (2002): Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 9(2): 102-109.



**MENDELNET 2012**

---

Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (2012): Cancer Statistics, 2012. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 62(1): 10-29.

Tu S. I., Reed S., Gehring A., He Y. P. (2011): Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium: The Use of Magnetic Beads Conjugated with Multiple Capture Antibodies. *Food Analytical Methods*, 4(3): 357-364.

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

Yezhelyev M. V., Gao X., Xing Y., Al-Hajj A., Nie S. M., O'regan R. M. (2006): Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7(8): 657-667.