

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Analýza zinek rezistentní prostatické nádorové buněčné linie**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Martina Axmanová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Michal Masařík, Ph.D.</b>
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Brně, 25.4.2014

Poděkování:

Můj velký dík patří vedoucímu RNDr. Michalu Masaříkovi Ph.D. za odborné vedení, motivaci, rady, připomínky, věnovaný čas i lidské doprovázení. Děkuji týmu studentů i zaměstnanců z Ústavu patologické fyziologie LF MU za vytvoření motivujícího zázemí ke zpracování praktické části této práce.

Děkuji také doc. PharmDr. Petru Babulovi Ph.D. z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně za možnost detekce fluorescenční mikroskopii. Dále děkuji MUDr. Jiřímu Lenzovi Ph.D. z Patologicko-anatomického ústavu Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně, díky jehož ochotě byly pořízeny fotografie histologických preparátů.

Další, neméně podstatný dík patří mým rodičům, kteří mě podporují nejen při studiu. A též sourozencům a kamarádům za povzbuzení, přátelství, pomoc a rady.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Axmanová
Název práce	Analýza zinek rezistentní prostatické nádorové buněčné linie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav patologické fyziologie, LF MU
Vedoucí práce	RNDr. Michal Masařík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt: Zinečnaté ionty jsou důležitou součástí řady proteinů. Jsou zapojeny do buněčných procesů jako je diferenciace, buněčný cyklus, genová exprese, přežívání buněk nebo apoptosa. U karcinomu prostaty byly zjištěny podstatné změny v metabolismu a transportu zinečnatých iontů oproti zdravé prostatické tkáni. K detekci dlouhodobého působení zinku byla vytvořena zinek rezistentní buněčná linie PC3. S využitím qRT-PCR byla stanovena expresní hladina vybraných genů souvisejících s metabolismem a transportem zinečnatých iontů. V závislosti na koncentraci zinku byla prokázána statisticky významná korelace u exprese genů *MT1A* ( $p=0,004$ ), *MT2A* ( $p=0,002$ ) a *ZnT-1* ( $p=0,007$ ). S využitím ANOVA testu bylo určeno, že vliv na expresní profil detekovaných genů má koncentrace zinečnatých iontů v kultivačním médiu ( $p=0,024$ ), nikoli však získaná rezistence buněk k zinku ( $p=0,609$ ). Byla detekována hodnota  $IC_{50}$  pro cytostatikum cisplatinu a pro  $Zn^{2+}$ . U obou látek byla hodnota  $IC_{50}$  zvýšená v porovnání s linií wild type. Imunocytochemickou detekcí proteinů byla potvrzena analýza genové exprese. Migrační schopnost nádorových buněk *in vitro* byla detekována scratch testem. Zinek rezistentní buňky migrovaly pomaleji, než buňky linie wt. Volné thiolové skupiny, které jsou zodpovědné za vazbu kovů, byly detekovány fluorescenční mikroskopií v jádře a v cytoplasmě. Zinečnaté ionty byly lokalizovány difúzně.

Klíčová slova	prostata, karcinom prostaty, PC3, zinek, zinek rezistentní buněčná linie, zinkové transportéry
Počet stran	78
Počet příloh	8
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Martina Axmanová
Title	Analysis of zinc resistant prostate tumor cell lines
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Pathological Physiology Faculty of Medicine, Masaryk University
Supervisor	RNDr. Michal Masařík, Ph.D.
The year of presentation	2014

Abstract: Zinc ions are important components of many proteins. They are involved in cellular processes such as differentiation, cell cycle, gene expression, cell survival or apoptosis. It was found out that the zinc ion metabolism and zinc transportation in prostate cancer cells differ from healthy prostatic tissues. To detect the long-term effect of zinc, a zinc-resistant cell line PC3 was developed. The expression profiles of selected genes related to zinc ion metabolism and transportation were determined by using qRT-PCR. We disclosed statistically significant correlation between zinc concentration and expression of genes *MT1A* ( $p=0,004$ ), *MT2A* ( $p=0,002$ ) and *ZnT-1* ( $p=0,007$ ). Using ANOVA test was determined, that concentration of zinc ions in the medium has an effect on the expression profile of detected genes ( $p=0,024$ ), but not the acquired 6ukleus6ce of cells to zinc ( $p=0,609$ ). A half of the maximal inhibition concentration was detected for cytostatic cisplatin and for  $Zn^{2+}$ . For both substances, the  $IC_{50}$  value was higher than the  $IC_{50}$  of wild type cell line. The expression analysis was confirmed by immunocytochemical detection of proteins. Scratch test was used for detection of the ability of tumor cells to migrate in vitro. Zinc-resistant cells migrated slower than the wt cells. Free thiols, which are responsible for metals binding, were detected by fluorescent microscopy in the nucleus and in the cytoplasm. Zinc ions were localized diffusely.

Keywords	prostate, prostate cancer, PC3, zinc, zinc-resistant cell line, zinc transporters
Number of pages	78
Number of appendices	8
Language	Czech

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBECNÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b> .....	<b>12</b>
2.1 Anatomie, fyziologie a histologie prostatické žlázy .....	12
2.2 Patologie prostaty .....	13
2.2.1 Záněty prostaty (prostatitis) .....	13
2.2.2 Benigní hyperplasie prostaty .....	13
2.2.3 Karcinom prostaty .....	14
2.2.3.1 Epidemiologie, patogeneze a etiologie .....	14
2.2.3.2 Klinický obraz .....	15
2.2.3.3 Screening, diagnostika, klasifikace .....	15
2.2.3.4 Léčba .....	16
<b>3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>18</b>
3.1 Zinek a prostata .....	18
3.1.1 Prostata fyziologicky .....	18
3.1.1.1 Produkce citrátu .....	18
3.1.1.2 Terminální oxidace .....	19
3.1.1.3 Vliv zinku na apoptosu .....	19
3.1.2 Metabolické změny v akumulaci zinku související s CaP .....	19
3.2 Zinek .....	22
3.2.1 Formy zinku v buňce .....	23
3.2.2 Zinek a nádorová transformace .....	23
3.3 Zinkové transportéry .....	24
3.3.1 Zip .....	25
3.3.1.1 Struktura .....	26
3.3.1.2 Přehled transportérů Zip .....	26
3.3.2 ZNT .....	27
3.3.2.1 Struktura .....	27
3.3.2.2 Přehled transportérů ZNT .....	28
3.4 Zinek vazebné struktury .....	32
3.4.1 Nízkomolekulární organické kyseliny .....	32
3.4.2 Metalothionein .....	32
3.4.2.1 Struktura .....	32
3.4.2.2 Funkce .....	33
3.4.2.3 Exprese .....	33
3.4.3 Metal regulační transkripční faktor .....	34
3.4.4 Matrixové metaloproteiny .....	34
3.4.5 Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteiny .....	35
<b>4 CÍLE</b> .....	<b>36</b>
<b>5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>37</b>
5.1 Materiál a metodika .....	37
5.1.1 Práce s buněčnými kulturami .....	37



5.1.2 Vytváření zinek rezistentních buněčných linií.....	38
5.1.3 Izolace mRNA.....	39
5.1.4 Reverzní transkripce.....	40
5.1.5 Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR).....	41
5.1.6 Imunocytochemie.....	42
5.1.7 MTT .....	45
5.1.8 Počítání buněk.....	46
5.1.9 Detekce zinku a volných thiolů.....	47
5.1.10 Scratch assay .....	48
<b>6 VÝSLEDKY .....</b>	<b>50</b>
6.1 Zinek rezistentní linie.....	50
6.2 Analýza exprese vybraných genů.....	50
6.3 Analýza viability buněk (MTT) .....	55
6.4 Imunocytochemická analýza.....	56
6.5 Fluorescenční značení .....	59
6.5.1 Detekce volných thiolů .....	59
6.5.2 Detekce zinku.....	59
6.6 Scratch assay .....	60
<b>7 DISKUSE .....</b>	<b>63</b>
7.1 Expresní profil.....	63
7.2 Buněčná viabilita.....	65
7.3 Imunocytochemická detekce.....	66
7.4 Detekce volných thiolů a zinku.....	67
7.5 Migrace buněk <i>in vitro</i> .....	67
7.6. Srovnání analýzy zinek rezistentní buněčné linie PC3 s linií wt PC3 .....	67
<b>8 ZÁVĚR.....</b>	<b>69</b>
<b>9 LITERATURA .....</b>	<b>70</b>
<b>10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>75</b>
<b>11 PŘÍLOHY .....</b>	<b>78</b>
11.1 Seznam příloh .....	78

# 1 ÚVOD

Adenokarcinom prostaty je jedním z nejvíce studovaných onkologických onemocnění z důvodu vysokého výskytu u mužů. Je řazen mezi nejčastější příčiny úmrtí na nádorové onemocnění (Mareš, 2003; Morgan a McCance, 2010).

Poodhalení transportních a metabolických systémů zinečnatých iontů je důležité pro pochopení patogeneze a progresu karcinomu prostaty. Právě zinečnaté ionty hrají zřejmě v tomto onemocnění významnou roli, neboť jejich koncentrace je zásadně odlišná ve zdravé prostatické tkáni ve srovnání s karcinomem (Desouki *et al.*, 2007; Costello a Franklin, 2011).

Zinek je důležitý stopový prvek. Zinečnaté ionty hrají klíčovou úlohu v buněčných procesech, jako je oxidační stres, programovaná buněčná smrt, proliferace a buněčná diferenciaci. Podílí se také na regulaci syntézy DNA a je zapojen do regulace buněčného cyklu. Intracelulární koncentrace zinku je přísně regulována. Narušení homeostasy zinku může mít vážné patologické následky (Kambe *et al.*, 2004; Murakami a Hirano, 2008; Costello *et al.*, 2011a).

Důležitou funkci pro udržení homeostasy zinečnatých iontů mají zinkové transportéry (rodina transmembránových přenašečů Zip a ZnT), metalothionein a metal regulační transkripční faktor. Fyziologická koncentrace zinku v prostatické tkáni má vliv mj. na produkci citrátu, energetický metabolismus či na apoptosu (Franklin *et al.*, 2005b; Costello a Franklin, 2011).

Předchozí studie byly víceméně zaměřeny na vliv zinečnatých iontů při krátkodobém působení na nádorové prostatické buněčné kultury. K analýze dlouhodobého vlivu vysoké koncentrace zinečnatých iontů v nádorově transformovaných buňkách byla vytvořena zinek rezistentní buněčná linie. Tato linie byla odvozena a vyselektována z wild type (wt) PC3 prostatické buněčné linie (agresivní karcinom).

Tato práce je zaměřena na podrobnější analýzu zinek rezistentní PC3 linie ve srovnání s buněčnou linií wt PC3 pomocí standardních metod biochemie a molekulární biologie. Zaměřila jsem se na expresní analýzu vybraných genů souvisejících s metabolismem a transportem zinečnatých iontů, na imunocytochemickou detekci vybraných proteinů v buněčných kulturách. Rezistence byla ověřena MTT

testem, byla detekována hodnota  $IC_{50}$  pro cytostatikum cisplatinu a pro zinek. Schopnost migrace buněk byla detekována *in vitro* scratch testem. Fluorescenční detekcí byly stanoveny volné thiolové skupiny zodpovědné za vazbu kovů a zinečnaté ionty.

Přínosem této práce je poodhalení metabolických změn v akumulaci zinku související s karcinomem prostaty v kontextu dlouhodobého působení zinečnatých iontů na prostatickou nádorovou buněčnou linii.

## 2 OBECNÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY

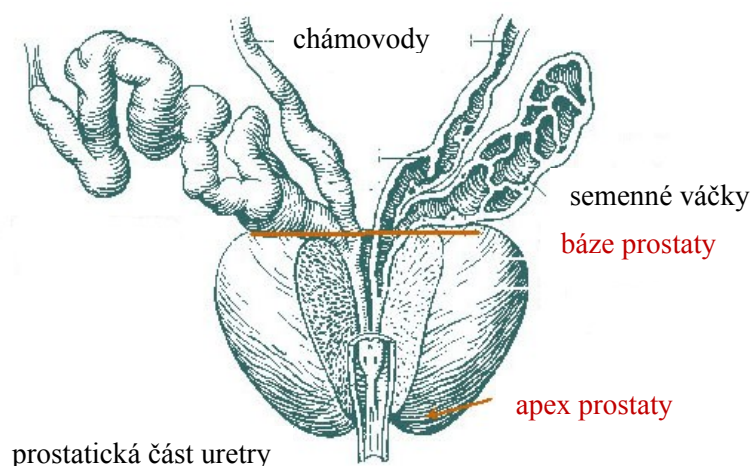
### 2.1 Anatomie, fyziologie a histologie prostatické žlázy

Prostata, párové semenné vajíčky a *gl. bulbourethralis* patří mezi přídatné pohlavní žlázy muže. Prostata je svalově žláznatý orgán, definitivní velikosti dosahuje v pubertě. Je uložena pod močovým měchýřem. Středem žlázy prochází prostatická část močové trubice (Čihák, 2002; Horký a Čech, 2003).

Anatomicky na prostatě rozlišujeme bázi, hrot a dvě plochy (viz obrázek 1). V urologické praxi se používá McNealovo schéma zonální anatomie prostaty (viz příloha 1), které rozděluje prostatickou žlázu na několik zón. Toto rozdělení je důležité v souvislosti s výskytem patologií prostaty (výskyt benigní hyperplazie prostaty a karcinomu prostaty) a v souvislosti s odlišnými molekulárními mechanismy v buňkách různých zón (viz dále, kap. 3.1.1).

Žláznový epitel prostaty vytváří sekret, který tvoří 15–30 % tekutiny ejakulátu. Prostatický sekret je bezbarvý, tekutý, o pH 6,4. Obsahuje kyselinu citronovou, zinek, prostaglandiny, polyamidy, protilátky, kyselou fosfatasu a proteasy (Petrovický, 2002).

Povrch prostatické žlázy je kryt vazivovým pouzdem. Vazivová přepážka procházející středem rozděluje žlázu na dva laloky. Prostata je tvořena prostatickými žlázkami a vazivově-svalovým stromatem (Petrovický, 2002; Horký a Čech, 2003).



Obrázek 1: Anatomie přídatných pohlavních žláz muže. Dle <http://training.seer.cancer.gov/prostate/anatomy/>, 11.3.2014).

Stěna žlázek je tvořena jednovrstevným kubickým až dvouřadým cylindrickým epitelem (viz příloha 2). Tyto buňky jsou hormonálně citlivé na testosteron (Martínek a Vacek, 2009). Vazivově svalové stroma se skládá ze svazků kolagenních vláken a snopečků hladkých svalových buněk (Horký a Čech, 2003).

Vývoj, diferenciaci a růst prostaty je hormonálně regulován androgeny. Testosteron je konvertován ve stromatu prostaty enzymem 5- $\alpha$ -reduktasou na dihydrotestosteron. Ten má vliv na žlázové buňky i stroma a udržuje prostatu funkční (Čihák, 2002; Horký a Čech, 2003).

## 2.2 Patologie prostaty

V této kapitole jsou uvedeny informace o onemocněních prostatické žlázy. Jedná se o záněty prostaty, benigní hyperplasii prostaty (BHP) a karcinom prostaty (CaP).

### 2.2.1 Záněty prostaty (prostatitis)

Obtíže spojené s prostatitidou se vyskytují přibližně u 10 % mužů. Záněty prostaty mohou být původu bakteriálního (akutní nebo chronické) nebo mohou mít jiné, nebakteriální příčiny. Informace o zánětlivých onemocněních prostaty shrnuje tabulka 1.

### 2.2.2 Benigní hyperplasie prostaty

Benigní hyperplasie prostaty (BHP) patří k nejčastějším onemocněním prostaty. Významnou měrou ke vzniku BHP přispívají hormony (androgeny a estrogy). Jejich role však zůstává neobjasněna. Hyperplasie je charakterizována zvětšením orgánu, které je způsobeno zmnožením jednotlivých buněk (viz příloha 2).

Tabulka 1: Záněty prostatické žlázy. Zpracováno dle (Mačák a Mačáková, 2004; Morgan a McCance, 2010).

typ zánětu	klinické příznaky	původce onemocnění	léčba
akutní bakteriální zánět	akutní nástup problémů, bolest v oblasti hráze, malé pánve, spodiny močového měchýře, bederní části zad, vysoká teplota (až 40°C)	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	dlouhodobá terapie ATB (fluorochinolony)
chronický bakteriální zánět	dlouhotrvající výše uvedené symptomy	G <sup>-</sup> bakterie	ATB chinolony
nebakteriální zánět	shodné symptomy	negativní mikrobiologický nálezn	analgetika, zavodnění

Incidence BHP se zvyšuje s věkem (Mačák a Mačáková, 2004; Morgan a McCance, 2010). BHP bývá nejčastěji lokalizována v centrální zóně prostaty (viz. McNealovo schéma zonální anatomie prostaty, příloha 1). Z tohoto důvodu dochází často k útlaku močovodu a následným problémům s mikcí. Komplikacemi při progresi může být hematurie, infekce močového měchýře nebo ledvin, hydronefrosis, ledvinová nedostatečnost aj.

Diagnostika benigní hyperplasie je založena na vyšetření konečníkem (DRE, digital rectal examination). Screeningové vyšetření je doporučováno 1x ročně u mužů starších 40 let. Další používanou vyšetřovací metodou je sonografické vyšetření TRUS (transrectal ultrasonography). K odlišení BHP a karcinomu prostaty se detekuje PSA denzita (denzita prostatického specifického antigenu).

K léčbě BHP se využívají látky, které uvolňují hladkou svalovinu prostaty ( $\alpha$ 1-adrenergní blokátory). Také se používají selektivní blokátory androgenů (finasterid), které způsobují zmenšení prostatické žlázy (<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0118762&tab=texts>, 12.3.2014). Invazivní metodou je transuretrální resekce. Standardním přístupem k léčbě BHP je však snížení hladiny androgenů, která vede k involuci prostaty (Mačák a Mačáková, 2004; Morgan a McCance, 2010).

## **2.2.3 Karcinom prostaty**

### **2.2.3.1 Epidemiologie, patogeneze a etiologie**

Karcinom prostaty (CaP) je jedno z nejčastějších zhoubných nádorových onemocnění u mužů v ČR. V celosvětovém měřítku je incidence velmi variabilní. Se zvyšujícím se věkem incidence stoupá. Více než 75 % z celku je diagnostikováno u mužů starších 65 let. CaP je po rakovině plic druhá nejčastější příčina smrti na nádorová onemocnění u mužů starších padesáti let. V České republice bylo v roce 2010 hlášeno 6771 nových případů výskytu nádorů prostaty (incidence 131 na 100 tis. mužů) a 1467 úmrtí na tento typ rakoviny (mortalita 28 na 100 tis. mužů), (viz příloha 3) (Mareš, 2003; Morgan a McCance, 2010).

Více jak 95 % novotvarů prostaty jsou adenokarcinomy s různým stupněm diferenciací. Prostatická intraepiteliální neoplasie (PIN) je považována za prekancerosu. Méně často se může vyskytovat karcinom z přechodných buněk (duktální) a malobuněčný karcinom. Adenokarcinomy vycházejí většinou z acinů žláz a často

vznikají víceložiskově. CaP bývá až s 80% pravděpodobností lokalizován v periferní zóně prostatické žlázy (Mareš, 2003; Dušek, 2010). Buňky periferní zóny zdravé prostatické žlázy mají schopnost akumulovat zinek a produkovat citrát. Převážná lokalizace CaP v této zóně je zajímavá zvláště v souvislosti se ztrátou těchto schopností (viz kap 3.4.2) (Costello *et al.*, 2004).

Příčiny vzniku CaP jsou multifaktoriální. Podílí se na nich: androgenní vliv (testosteron, dihydrotestosteron), aktivace onkogenů, změna stimulace nebo inhibice růstu, působení jiných environmentálních karcinogenů (Mareš, 2003; Morgan a McCance, 2010). Důležitou roli v této souvislosti hraje změna v homeostasi zinku (Franklin *et al.*, 2005b). Sekundární nádory (metastasy) vznikají šířením lymfatickou a hematogenní cestou. Šíření lymfou postihuje zpravidla pánevní a periaortální uzliny. Hematogenní metastasy jsou lokalizovány v kostech (pánev, žebra, páteř), v plicích, játrech a v nadledvinách (Mareš, 2003; Mačák a Mačáková, 2004; Morgan a McCance, 2010).

### **2.2.3.2 Klinický obraz**

CaP, lokalizovaný často v periferní zóně, nezpůsobuje v raných stádiích karcinomu zúžení močové trubice (na rozdíl od BHP). Časná stádia rakoviny jsou většinou bez symptomů. V pokročilých stádiích se vyskytují následující symptomy: problémy při močení (dysurie, nykturie, akutní retence, pomalý proud moči, neúplné vyprázdnění močového měchýře, aj.), hematurie nebo renální insuficience při hydronefroze.

Při progresi onemocnění se vyskytuje: bolest kostí vycházející z přítomnosti metastas, otoky dolních končetin (DK), úbytek hybnosti DK, zvětšení jater a lymfatických uzlin, patologické zlomeniny kostí, zmatenost (metastasy do mozku). Dalšími příznaky může být hubnutí, nechutenství a celková slabost (Mareš, 2003; Mačák a Mačáková, 2004; Morgan a McCance, 2010).

### **2.2.3.3 Screening, diagnostika, klasifikace**

Vyšetření, která jsou prováděna u pacientů s CaP je možno rozdělit na screeningová (ta, která mohou odhalit karcinom prostaty), diagnostická (vyšetření potvrzující diagnózu) a vyšetření sloužící ke klasifikaci onemocnění (určení stádia onemocnění).

- screening: stanovení hladiny PSA, vyšetření *per rektum*
- diagnostika: biopsie prostaty, transrektální sonografie

- klasifikace: histopatologické vyšetření (Gleason score), počítačová tomografie (CT), scintigrafie, TNM klasifikace (Mareš, 2003).

Stanovení sérové hladiny prostatického specifického antigenu (PSA) slouží společně s vyšetřením DRE (digital rectal examination) ke screeningu CaP. V ČR je toto vyšetření doporučováno u asymptomatických mužů starších padesáti let (Čoupek *et al.*, 2002; Dušek, 2010).

Ke stanovení definitivní diagnózy je nezbytné histologické vyšetření prostatické tkáně (punkční biopsie, intrakapsulární prostatektomie, transuretrální resekce, radikální prostatektomie) (Dvořák *et al.*, 2008).

Systém hodnocení TNM (viz příloha 4) je používán ke klasifikaci CaP. Toto hodnocení využívá celou řadu kritérií: anatomickou lokalizaci, histopatologický typ nádoru, stupeň diferenciaci, klinický a patologicko-anatomický rozsah onemocnění, symptomy, věk a pohlaví pacienta aj. (Sobin a Wittekind, 1997).

Mezi další využívané metody řadíme transrektální ultrasonografií, rentgen plic, ultrasonografií ledvin, scintigrafií kostí, CT, nukleární magnetickou rezonanci (NMR) břicha a malé pánve, transrektální monografií a cystoskopií (Lukeš, 2005).

Důležitým hodnotícím znakem je histopatologický stupeň diferenciaci nádoru (viz příloha 5). Ten je důležitý nejen ke klasifikaci, ale i k prognóze. Dobře diferencované karcinomy progredují pozvolna a méně, málo diferencované karcinomy rychleji a mají větší schopnost zakládat sekundární nádory. Jejich prognóza bývá horší (Lukeš, 2005).

#### **2.2.3.4 Léčba**

Léčba CaP se odvíjí od jeho stádia, od histologické klasifikace, předpokládaného efektu léčby, věku a celkového zdravotního stavu pacienta.

Primárním cílem léčby je odstranění nádorového ložiska, v pokročilých stádiích jde o redukci velikosti nádoru, předcházení nebo odlehčení bolesti a také prodloužení života. V terminálních stádiích CaP se využívá léčba paliativní (Morgan a McCance, 2010).



- Léčba chirurgická

Invazivně se provádí částečná nebo úplná prostatektomie (odstranění prostatické žlázy včetně pouzdra a semenných váčků) (Mareš, 2003; Morgan a McCance, 2010).

Alternativní možností je kryoterapie, při níž je nádor vystaven velmi nízkým teplotám a dojde tak k apoptose buněk (Dušek, 2010).

- Léčba radiologická

Karcinom prostaty je radiosenzitivní nádor. Toho může být využito při léčbě zářením. Tou je buď teleradioterapie (radioterapie zevními svazky), nebo brachyterapie (intersticiální aplikaci radioizotopu do tkáně). V pokročilých stádiích onemocnění bývá indikována paliativní radioterapie. Další možností je ozáření v hypoxii (Čoupek *et al.*, 2002; Dušek, 2010).

Tyto metody mohou doprovázet komplikace, mezi které patří urologické a gastrointestinální problémy, celková toxicita, otoky dolních končetin a erektilní dysfunkce (Čoupek *et al.*, 2002).

- Léčba hormonální

Principem hormonální léčby je potlačení až eliminace cirkulujících androgenů. Možnosti hormonální léčby jsou: orchitektomie (ablace zdroje androgenů), nepřímá gonadální suprese nebo podávání antiandrogenů (antagonisté androgenů na úrovni prostaty). Hormonální léčba je základní systémovou léčbou u generalizovaného karcinomu.

- Chemoterapie má místo při léčbě pokročilých stádií onemocnění (Čoupek *et al.*, 2002; Dušek, 2010).

## 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 3.1 Zinek a prostata

Následující kapitola pojednává o vztahu zinku a prostatické tkáně. Shrnuje poznatky o molekulárních a biochemických pochodech za fyziologických a patologických stavů (CaP).

#### 3.1.1 Prostata fyziologicky

Prostatická tkáň disponuje schopností akumulovat zinečnaté ionty a to až v desetinásobně vyšších koncentracích než jiné měkké tkáně (Costello *et al.*, 2004; Desouki *et al.*, 2007; Costello a Franklin, 2011). Tuto schopnost mají zejména epiteliální buňky periferní zóny prostatické žlázy (viz příloha 1). Buňky centrální zóny prostatické žlázy tuto schopnost akumulace zinečnatých iontů nemají.

Jak je zřejmé z tabulky číslo dvě, buňky periferní zóny akumulují zinek až v 10x vyšším množství než ostatní tkáně. Schopnost tvořit a produkovat citrát je v těchto buňkách vyšší 30–50x. Tyto buňky byly proto označeny jako "zinek akumulující, citrát produkující" buňky (Franklin *et al.*, 2005b).

##### 3.1.1.1 Produkce citrátu

Důležitou fyziologickou funkcí prostatické žlázy je schopnost vytvářet a produkovat velké množství citrátu, který je významnou součástí prostatického sekretu. Zinek, který je akumulován ve zvýšeném množství v prostatických buňkách, má inhibiční efekt na mitochondriální enzym m-akonitasu. To je zásadní reakce, neboť tak téměř nedochází k oxidaci citrátu v Krebsově cyklu. (Citrát je důležitým meziproduktem Krebsova cyklu (KC)), důležitý pro syntézu ATP a zdrojem pro acetylkoenzym A, který je nezbytný pro lipogenezi a syntézu cholesterolu). Nedokonalá oxidace v KC vede ke vzniku 14 ATP

Tabulka 2: Koncentrace zinečnatých iontů a citrátu v různých typech tkání a tekutin. Dle (Desouki *et al.*, 2007; Costello *et al.*, 2011b; Costello a Franklin, 2011).

Typ tkáně	koncentrace Zn <sup>2+</sup> (nmol/gram mokrý váhy)	koncentrace citrátu (nmol/gram mokrý váhy)
periferní zóna zdravé prostatické tkáně	3000–4500	13000
periferní zóna maligní prostatické tkáně	400–800	200–2000
ostatní měkké tkáně	200–400	250–450
prostatická tekutina zdravé tkáně	8 000–10000	40 000–150000
prostatická tekutina CaP	800–2000	500–3000
krevní plasma	15	100–200

na molekulu glukosy (namísto 38 molekul ATP). Tento proces je energeticky neefektivní, dochází tak ke ztrátě až 65 % ATP (Franklin *et al.*, 2005b; Costello a Franklin, 2011). Zajímavý je v této souvislosti fakt, že vysoká koncentrace zinku působí v jiných buňkách toxicky a také, že inhibice m-akonitasy je letální pro řadu savčích buněk (Franklin *et al.*, 2005b).

### **3.1.1.2 Terminální oxidace**

Prostatická tkáň je charakterizována nízkou úrovní respirace. Ve zdravé prostatické tkáni je inhibován komplex III dýchacího řetězce a částečně i komplex I a II, nedochází k inhibici komplexu IV (Franklin a Costello, 2007). Celková úroveň aktivity komplexů I–IV dýchacího řetězce je v prostatických buňkách výrazně snížena, a to až o 50–80 % ve srovnání s jaterními mitochondriemi (MTC) (Franklin a Costello, 2007). Zinek byl uveden jako inhibitor terminální oxidace v MTC savčích buněk (Franklin *et al.*, 2005b).

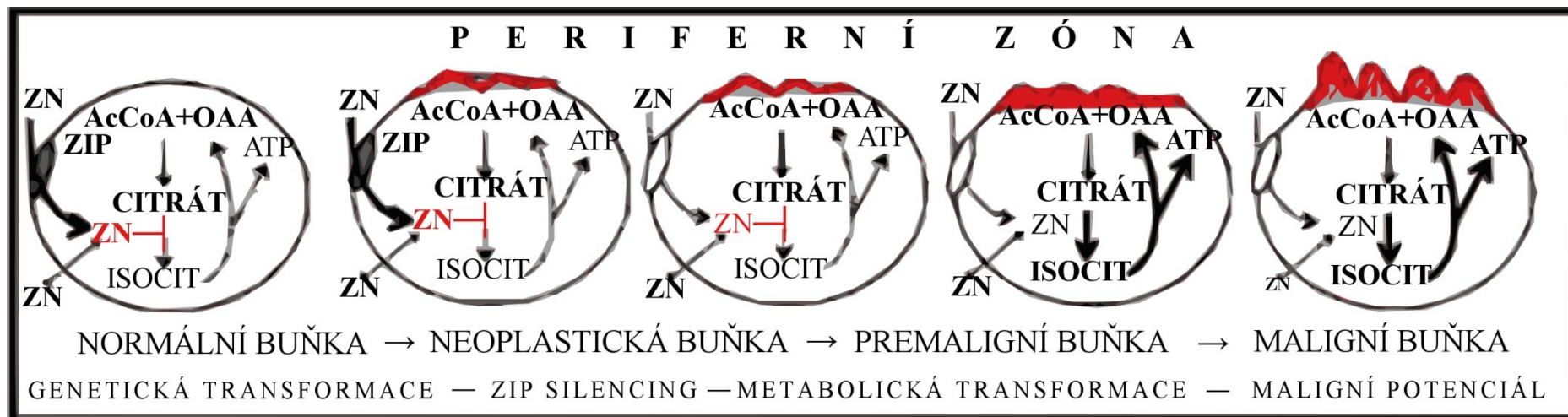
### **3.1.1.3 Vliv zinku na apoptosu**

Akumulace zinku má inhibiční vliv také na proliferaci prostatických buněk. To je vyvoláno přímou indukci apoptosy. Zinek způsobuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií, což má za následek aktivaci kaskády kaspas. Předpokládá se, že zinek přímo interaguje s mitochondriemi a usnadňuje tvorbu Bax pórů. Je pravděpodobné, že zinek zvyšuje expresi Bax a usnadňuje translokaci Bax na mitochondriální membránu (Franklin *et al.*, 2005b).

## **3.1.2 Metabolické změny v akumulaci zinku související s CaP**

U karcinomu prostaty dochází ke ztrátě schopnosti buněk akumulovat zinek. Hladina zinku je v maligní periferní zóně prostatické tkáně snížena o 70–85 % ve srovnání s periferní zónou normální prostatické tkáně (viz tab. 2). To koresponduje s hladinou citrátu, která je také snížena.

Klinické i experimentální studie dokazují zásadní změnu v maligních prostatických buňkách ve srovnání se zdravou prostatickou tkání. K proměně normálních ("zinek akumulujících, citrát produkujících") buněk na buňky nádorové (oxidující citrát a neschopné akumulovat zinek) jsou nezbytné dvě transformace, genetická a metabolická. Procesy předcházející vzniku CaP jsou znázorněny na obrázku 2, současně se změnami v metabolismu a transportu zinku, (Franklin *et al.*, 2005b;



Obrázek 2: Role Zip1, zinku a metabolismu citrátu na patogenezi karcinomu prostaty. Normální buňka žláзовého epitelu prostaty exprimuje *Zip1*, který umožňuje akumulaci zinku. Zinek inhibuje oxidaci citrátu a terminální oxidaci. Dochází tak ke hromadění citrátu a snížení produkce ATP. Genetická transformace vede k přeměně buňky zdravé na buňku s maligním potenciálem. Expresie ZIP1 je umlčena pravděpodobně epigenetickými faktory, což má za následek eliminaci importu zinku a ztrátu schopnosti akumulovat zinek v premaligní buňce. Hladina buněčného zinku je snížena, dochází k utlumení inhibice zinkem na oxidaci citrátu a na terminální oxidaci. Funkční Krebsův cyklus vede ke zvýšené tvorbě ATP. Maligní buňka je metabolicky a bioenergeticky schopna projevat svůj maligní potenciál. Také je odstraněn inhibiční efekt zinku na růst, což umožní růst a vývoj maligní buňky (Franklin *et al.*, 2005a)

(Franklin *et al.*, 2005b; Desouki *et al.*, 2007). Absence metabolické transformace u neoplastických buněk nevede k maligní progresi, ani metabolická transformace samotná nevede k rozvoji malignity v nepřítomnosti transformace genetické (Franklin a Costello, 2007; Desouki *et al.*, 2007).

Metabolická transformace zahrnuje ztrátu schopnosti akumulovat zinek, což má za následek zrušení inhibičního vlivu  $Zn^{2+}$  na m-akonitasu a následně tak dochází k oxidaci citrátu. Dále dochází ke zmírnění inhibičního efektu zinku na terminální oxidaci a ke zmírnění efektu zinku na apoptosu. Maligní buňky tak mají více energie z tvorby ATP k metabolickým a bioenergetickým změnám pro rozvoj malignity. Inhibice apoptosy vede k umožnění proliferace maligních buněk (Franklin *et al.*, 2005b).

S metabolismem zinku úzce souvisí zinkové transportéry. Expres transportérů Zip byla popsána u zdravé prostatické tkáně a u benigní hyperplasie prostaty (BHP). Zip transportéry byly identifikovány jako důležité transportéry pro akumulaci zinku v prostatických buňkách. Ke snížení hladiny zinku a ke snížení exprese *Zip1* dochází u prekancerů a v počátečních fázích rozvoje malignity. Snížené hladiny dále přetrvávají v progresi malignity (Costello *et al.*, 2011b). Důležitost transportéru Zip u maligní transformace potvrdila studie, která dokládá, že exprese *Zip1* je snížena u Afroameričanů ve srovnání s Kavkazskou populací (Rishi *et al.*, 2003). To koreluje se zvýšenou incidencí karcinomu prostaty u černochů. *Zip1* byl v nedávných studiích označen jako tumor supresorový gen pro karcinom prostaty (Franklin *et al.*, 2005a).

Tumor supresorový efekt zinku byl zaznamenán v mnoha studiích (Franklin *et al.*, 2005a; Johnson *et al.*, 2010; Costello *et al.*, 2011b; Gumulec *et al.*, 2011a). U maligních buněk je vyvinut mechanismus downregulace Zip, který brání akumulaci zinku a jeho protinádorovému efektu na nádorovou buňku. Zinek inhibuje schopnost invazivity u maligních buněk prostaty. Ishii s kolegy ukázal, že invazivita buněk LNCaP do matrigelu je silně potlačena v přítomnosti  $Zn^{2+}$  (Ishii *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2004). Další studie poukazují na supresivní efekt zinku na angiogenezi a metastatický potenciál nádorových buněk prostřednictvím specifických drah, které regulují progresi karcinomu prostaty (Uzzo *et al.*, 2006). Jiné studie však tvrdí, že dlouhodobé působení zinku u karcinomu prostaty spíše škodí (Leitzmann *et al.*, 2003).

Snížená schopnost prostatických buněk akumulovat zinek může být způsobena také zvýšeným exportem zinku. Jediným zástupcem rodiny ZnT umístěným na plasmatické membráně buněk je ZnT-1 (ostatní jsou lokalizovány na membránách organel). Změna exprese ZnT-1 nebyla u maligních buněk prostaty detekována (Franklin *et al.*, 2005b; Gumulec *et al.*, 2011b).

Výše uvedená fakta naznačují, že změny ve schopnosti buněk akumulovat zinek předchází malignitě (Costello a Franklin, 2012).

Z důvodu rozporuplných názorů na danou problematiku je třeba dalšího bádání a hlubšího pochopení mechanismů při krátkodobém i dlouhodobém působení zinku na nádory prostaty. Na poodhalení této problematiky jsem se zaměřila v praktické části své práce, kde jsem se zabírala analýzou zinek rezistentních nádorových buněčných linií.

### **3.2 Zinek**

Zinek je esenciální stopový prvek potřebný pro růst a vývoj všech živých organismů. Je podstatnou součástí struktury řady proteinů, mezi které patří také transkripční faktory a enzymy intracelulárních signálních drah. Zinek je nezbytný pro aktivitu více než 300 enzymů. Podílí se tak na řadě enzymatických a metabolických funkcí v lidském těle. Více než 2000 transkripčních faktorů vyžaduje ke své funkci, k udržení struktury proteinu a k vazbě na DNA právě zinečnaté ionty (Kambe *et al.*, 2004; Murakami a Hirano, 2008; Costello *et al.*, 2011a).

V buňce je zinek uskladněn v endoplasmatickém retikulu (ER), Golgiho aparátu (GA) nebo zinkosomech (jednomembránové vezikuly odštěpené z ER nebo GA). Zinečnaté ionty významně zasahují do celé řady buněčných procesů.  $Zn^{2+}$  je signální molekula několika signálních a regulačních kaskád.  $Zn^{2+}$  může kupříkladu inhibovat funkci protein tyrozin fosfatas (PTP) a tím dále aktivovat řadu kináz, zodpovědných za buněčnou diferenciaci či za regulaci buněčného cyklu. Těmito kinázami jsou zvláště mitogen-aktivované proteinové kinasy (MAPK), které se účastní regulace mitózy, buněčné diferenciaci, genové exprese, přežívání buněk nebo apoptosy (Gumulec *et al.*, 2011b). Metabolismus zinku je regulován zejména prostřednictvím zinkem řízené transkripce, translace a intracelulární přepravy zinkových transportérů (Kambe *et al.*, 2004). Zinek funguje podobně jako neurotransmitery (Murakami a Hirano, 2008). Murakami s kolegy (Murakami a Hirano, 2008) předpokládá, že se zinek chová také jako druhý posel.

Zinek je nezbytný v jádře pro normální funkci histonů, ostatních proteinů, metaloenzymů (RNA a DNA polymerázy) a transkripčních faktorů. Důležitými proteinovými doménami obsahující zinek jsou „zink-finger“, které regulují aktivitu jednotlivých genů (Vallee a Falchuk, 1993; Costello *et al.*, 2011a).

### 3.2.1 Formy zinku v buňce

- Zinek pevně vázaný na proteiny (metaloenzymy, metaloproteiny, nukleoproteiny) je označován jako imobilní. Představuje nereaktivní pool zinku (více viz kapitola 3.3)
- Mobilní reaktivní zinek je vázaný volně na ligandy (na AMK, citrát) a představuje reaktivní pool zinku. Vyskytuje se ve formě Zn-ligand (více viz kap. Zinek vazebné struktury 3.3).
- Volný zinek jako  $Zn^{2+}$ . Představuje reaktivní pool zinku.

Obecně je tedy intracelulární zinek vázán buď na nemobilní makromolekuly (90 %), nebo na mobilní nízkomolekulární ligandy (10 %) (Costello *et al.*, 2011a).

Celková koncentrace zinku v savčích buňkách je přibližně 0,2–1 mM. Cytosolická koncentrace zinku v buňkách prostaty je přibližně 0,6–3 mM. Koncentrace zinku v plasmě je přibližně 15  $\mu$ M. Z toho je asi 85–90 % vázáno na proteiny. V intersticiální tekutině (ISF), což je přímý zdroj zinku pro buňky, je koncentrace  $Zn^{2+}$  přibližně 2  $\mu$ M. Pro přehlednost tyto údaje shrnuje tabulka 3 (Costello *et al.*, 2011a).

### 3.2.2 Zinek a nádorová transformace

Zinek je důkladně studován v souvislosti s celou řadou nádorových onemocnění. Jeho hladina je snížena u pacientů s karcinomem jater, žlučníku, trávicího systému a prostaty. Nádorové buňky potřebují zinek k přežití a k růstu. Avšak zvýšená hladina zinku působí cytotoxicky. Zinek indukuje apoptosu u T i B lymfocytů (Ibs a Rink, 2003)

Tabulka 3: Koncentrace zinku v tělních tekutinách. Dle (Costello *et al.*, 2011a).

	koncentrace $Zn^{2+}$
plasma	15 $\mu$ M
intersticiální tekutina (ISF)	2 $\mu$ M
cytosol savčích buněk	přibližně 0,2–1 mM
cytosol prostatických buněk	přibližně 0,6–3 mM

a pravděpodobně i u nádorových buněk (Murakami a Hirano, 2008). Hladina zinku je ovlivněna okolním mikroprostředím nádorové tkáně. Řada cytokinů a růstových faktorů (IL-6, HGF, EGF, TNF- $\alpha$ ) ovlivňují přímo či nepřímo expresní profil různých zinkových transportérů. Žírné buňky jsou důležitým typem buněk v nádorovém mikroprostředí. Obsahují granula se zinkem, který mohou uvolňovat do okolního prostředí. Intracelulární koncentraci volného zinku ovlivňují oxidačně-redukční reakce v mikroprostředí nádoru (Murakami a Hirano, 2008).

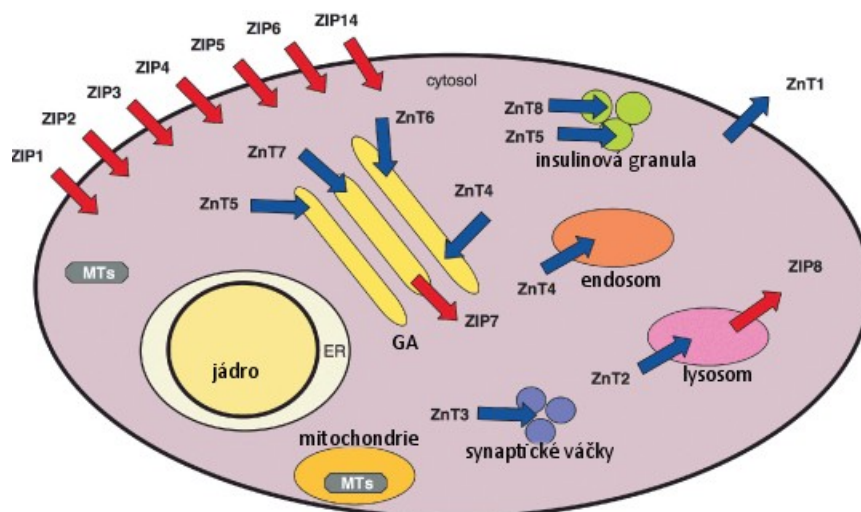
### 3.3 Zinkové transportéry

Volný zinek (ve formě  $Zn^{2+}$ ) není propustný jednoduchou difúzí přes plasmatickou membránu (Costello *et al.*, 2011a). Pro příjem zinku z intersticiální tekutiny (ISF) jsou tedy nezbytné transportní mechanismy. Intracelulární koncentrace zinku je přísně kontrolována díky zinkovým transportérům, molekulám vázajících zinek a zinkovým sensorům. Import zinečnatých iontů řídí rodina transportérů Zip (*SLC39*), export je řízen ZnT přenašeči (*SLC30*). Významný intracelulární protein vázající zinek je metalothionein (MT). Expresi některých proteinů, které se podílejí na metabolismu zinku, přímo ovlivňuje metal regulační transkripční faktor (MTF), protein detekující hladinu zinečnatých iontů (Murakami a Hirano, 2008).

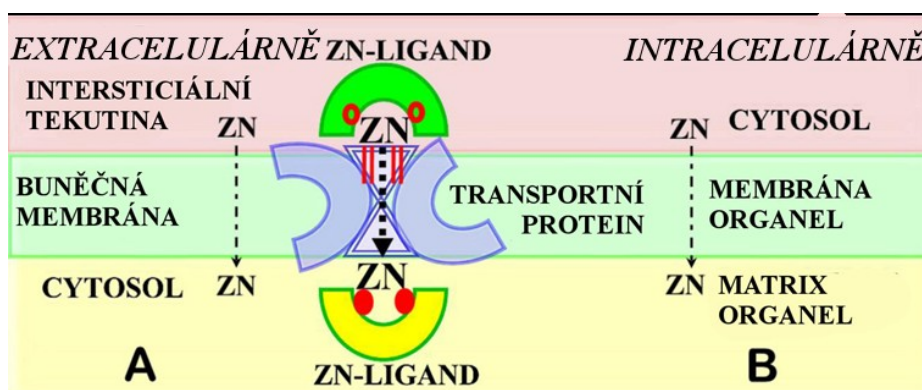
Transportéry Zip jsou až na několik výjimek lokalizovány na plasmatické membráně. Zvyšují intracelulární koncentraci zinku. Jejich funkcí je import zinku z ISF do buňky a také transport zinku z buněčných organel do cytoplasmy (Eide, 2004). Transportéry ZnT jsou zodpovědné za import zinku do buněčných organel a také export zinku z buňky do ISF. Snižují tak intracelulární koncentraci zinku. Obrázek 3 znázorňuje lokalizaci jednotlivých zinkových transportérů. Funkce, kinetika a mechanismus transportu ve specifických buňkách (kupříkladu nádorových) zůstávají prozatím, i přes důležitost těchto transportérů, převážně neznámé (Costello *et al.*, 2011a).

Obecný mechanismus transportu zinku z krevní plasmy přes ISF do buňky a dále do buněčných organel znázorňuje obrázek (viz obr. 4).





Obrázek 3: Buněčná lokalizace zinkových transportérů: subcelulární lokalizace a potenciální funkce členů rodiny transportérů Zip a ZnT. Směry transportu zinku jsou uvedeny šipkami. ER= endoplasmatické retikulum, GA=Golgiho aparát, MTs= metalothionein. Upraveno dle (Murakami a Hirano, 2008).



Obrázek 4: Znázornění přímého transportu zinku vázaného na ligandy. (A) Transportéry pro import zinku lokalizované na plasmatické membráně (např. rodina transportérů Zip) a (B) intracelulární transportéry na organelách (např. rodina transportérů ZnT). Jedná se o výměnu zinku bezprostředně mezi Zn-ligandem a Zn-transportérem. Nedochozí k tvorbě volného  $Zn^{2+}$  (Costello *et al.*, 2011).

### 3.3.1 Zip

U člověka bylo charakterizováno 14 členů rodiny Zip. Poprvé byly tyto proteiny detekovány u *Saccharomyces cerevisiae* (Zrt proteiny) a u *Arabidopsis thaliana* (Irt proteiny). Jsou kódovány geny *SLC39* (solute-linked carrier). Transportují nejen zinek, ale také železo a hořčík (Eide, 2004; Kambe *et al.*, 2004).

### 3.3.1.1 Struktura

Zip transportéry vykazují napříč druhy vysoký stupeň homologie. Obecně obsahují 8 transmembránových domén (TM) s velkou hydrofilní intracelulární smyčkou mezi TM3 a TM4 bohatou na histidin. Tyto smyčky u proteinů Zip jsou vysoce konzervované a je možné, že se účastní formace vazebného místa pro zinek (Costello *et al.*, 2011a). Tuto domněnku potvrzuje mutační analýza, která dokládá, že výměna histidinu v pozici 158 a 160 za alanin snižuje schopnost buňky akumulovat zinek (viz příloha 6) (Milon *et al.*, 2006). Ukazuje tedy, že tyto histidiny jsou nezbytné pro normální funkci tohoto transportéru. Vazebná doména pro zinek byla popsána na základě trojrozměrné struktury známých proteinů vázajících zinek.

### 3.3.1.2 Přehled transportérů Zip

Proteiny rodiny Zip jsou rozděleny do čtyř podrodin: I, II, LIV-1 a *gufA*. Regulace exprese Zip u savců není prozatím dobře pochopena. Většina z nich je regulována samotným zinkem (Kambe *et al.*, 2004).

V následujícím textu jsou popsány transportéry rodiny Zip, kterými jsem se zabývala ve své práci a ty, u kterých byla detekována souvislost s metabolismem zinečnatých iontů v prostatické tkáni. Všechny transportéry rodiny Zip jsou shrnuty v tabulce na konci kapitoly 3.3.2 (viz tab. 4).

**hZip1** je důležitý transportér pro import zinku v savčích buňkách. Pro svou aktivitu (stejně jako hZIP2) nevyžaduje ATP (Eide, 2004). Aktivitu tohoto transportéru mohou inhibovat některé přechodné kovy (Ni, Cu, Fe, Cd). Subcelulární lokalizace je různá v závislosti na typu buněk. Gen tohoto proteinu (*hZIP1*) je exprimován ve všech buňkách. To naznačuje, že hZip1 protein má zásadní funkci v mnoha typech buněk (Kambe *et al.*, 2004). Tento transportér hraje významnou roli v akumulaci  $Zn^{2+}$  v prostatických buňkách (Gaither a Eide, 2001; Kambe *et al.*, 2004). V prostatické tkáni je transportér Zip1 lokalizován na bazolaterální straně membrán buněk normálního žlázoového epitelu. Což odpovídá funkci těchto transportérů pro import zinku z intersticiální tekutiny (potažmo séra) (Desouki *et al.*, 2007).

**hZip2** byl první charakterizovaný člen rodiny Zip u savců a to na základě podobnosti s tímto proteinem u kvasinek a rostlin. Studie (Gaither a Eide, 2000) dokládají expresi

*hZip2* v tkáni prostaty a dělohy. Další studie potvrzují expresi také v mononukleárních leukocytech a v monocytech (Cao *et al.*, 2001).

*hZip3* je exprimován zejména v kostní dřeni a ve slezině, méně pak v tenkém střevě a v jaterní tkáni. Jeho exprese byla také detekována v prostatické tkáni. Přenašeče *Zip2* a *Zip3* jsou převážně lokalizovány na apikální straně buněk. Předpokládá se proto, že jejich funkcí není akumulovat zinek z cirkulace, ale reabsorbovat zinek z prostatické tekutiny (Desouki *et al.*, 2007).

*hZip6* (označován také jako *LIVI*) byl identifikován jako gen regulovaný estrogenem. Jeho zvýšená exprese je asociována s šířením karcinomu prsu do lymfatických uzlin (Taylor *et al.*, 2007). *LIVI* mRNA byla detekována u karcinomu prostaty a u BHP (Manning *et al.*, 1994; Manning *et al.*, 1995) a také v placentě a v buňkách HeLa (Taylor *et al.*, 2003).

### 3.3.2 ZNT

ZnT proteinová rodina (označována také jako CDF) je kódována geny *SLC30*. Tyto transportéry jsou zodpovědné za import zinku do buněčných organel. Tato rodina byla rozdělena do tří podrodin (I–III). U člověka je popsáno 9 typů těchto transportérů, které jsou označovány jako ZnT-1–ZnT-9 (Liuzzi a Cousins, 2004).

Tyto proteiny jsou transkripčně a posttranslačně regulovány zinkem. Exprese ZnT-1 a ZnT-2 je indukována vysokou koncentrací zinku (Langmade *et al.*, 2000). To odpovídá možné roli ZnT při detoxikaci zinku.

V následujícím textu popisují ty transportéry ZnT, které mají souvislost s metabolismem zinku v prostatické tkáni a ty, kterými jsem se zabývala ve své práci. Souhrnné informace o transportérech rodiny ZnT jsou uvedeny v tabulce na konci kapitoly (viz tab. 4).

#### 3.3.2.1 Struktura

Proteinová struktura ZnT transportérů obsahuje obvykle 6 transmembránových domén s velkou smyčkou mezi doménou 4 a 5. ZnT tvoří homo a heterodimery, které jsou pravděpodobně nutné pro jejich funkci transportérů zinku. Rentgenová krystalografie struktury homologu ZnT u *E. coli* ukazuje, že transmembránové domény homodimeru formují prázdný prostor v membráně. Tento prostor obsahuje intracelulární

a extracelulární dutinu, která váže zinek a je pravděpodobné, že se podílí na transportu zinečnatých iontů přes membránu (Costello *et al.*, 2011a).

### 3.3.2.2 Přehled transportérů ZNT

**ZnT-1** je exprimován ve všech tkáních, více pak v tenkém střevě, ledvinách a placentě. Expres je výrazně zvýšena v buněčných kulturách po ošetření zinkem (Kambe *et al.*, 2004; Devergnas *et al.*, 2004). Tento transportér byl také identifikován u prostatických buněk (Franklin *et al.*, 2005b). Transkripce je řízena MTF. Promotor *ZnT-1* obsahuje dvě sekvence pro MRE (metal response element). MTF se váže na obě vazebná místa a tím aktivuje transkripci (Kambe *et al.*, 2004).

Funkcí zinkového transportéru **ZnT-2** je zadržovat zinek v endosomech (Kambe *et al.*, 2004). Expres *ZnT-2* byla detekována v tenkém střevě, ledvinách, varlatech, placentě, v prsní žláze a v prostatě. Zvýšená exprese tohoto proteinu byla také detekována v periferní zóně prostatické žlázy v místech, kde dochází k exkreci zinku do seminální tekutiny (Iguchi *et al.*, 2002).

**ZnT-5** byl identifikován na základě homologie se *ZnT-1*. *ZnT-5* mRNA byla detekována ve všech tkáních, zejména však v pankreatu (v insulin produkujících  $\beta$  buňkách), v prostatě, ve vaječnicích a ve varlatech (Kambe *et al.*, 2004). Na rozdíl od *ZnT-1* není exprese *ZnT-5* (ani *ZnT-7*) ovlivněna přidavkem zinku do extracelulárního prostředí (Devergnas *et al.*, 2004).

Obecný mechanismus transportu zinku z krevní plasmy přes ISF do buňky a dále do buněčných organel znázorňuje obrázek 4.

Tabulka 4: Souhrnné informace o zinkových transportérech třídy ZnT a Zip u člověka. Upraveno dle (Hogstrand *et al.*, 2009).

označení proteinu	označení genu (dle HUGO)	zařazení do podrodiny	exprese	asociace s patologickým stavem	buněčná lokalizace	molekulární funkce
ZnT-1	<i>SLC30A1</i>	-	rozsáhlá	Alzheimerova choroba, karcinom plic	plasmatická membrána	export zinku z cytoplasmy
ZnT-2	<i>SLC30A2</i>	-	tenké střevo, ledviny, pankreas, varlata, semenné vajíčky, prsní žláza, prostata	karcinom prostaty (snížená zinková tolerance)	lysozomy, vezikuly	transport zinku do lysozomů a plasmatických vezikulů
ZnT-3	<i>SLC30A3</i>	-	mozek, varlata	Alzheimerova choroba, odpovědnost za ZEN u CA1	synaptické vezikuly	transport zinku do synaptických vezikulů
ZnT-4	<i>SLC30A4</i>	-	prsní žláza, mozek, tenké střevo, placenta, krevní buňky, žírné buňky, buňky epitelu	Alzheimerova choroba karcinom plic	endosomy, GA	transport zinku do vezikulů v buňkách mléčných žláz a žírných buňkách
ZnT-5	<i>SLC30A5</i>	-	$\beta$ buňky pankreatu, střevo, srdce, mozek, játra, ledviny, krevní buňky, epiteliální buňky	srdeční selhání a kostní abnormality u myši	GA, insulinová granula, varianta b na plasmatické membráně v komplexu s ZnT-6	transport zinku do GA a vezikulů
ZnT-6	<i>SLC30A6</i>	-	tenké střevo, mozek, játra, krevní buňky, tuková tkáň	Alzheimerova nemoc	GA, plasmatická membrána (v komplexu s ZnT-5)	transport zinku do GA a vezikulů
ZnT-7	<i>SLC30A7</i>	-	tenké střevo, játra, sítnice, slezina, krevní buňky	-	GA	transport zinku do GA
ZnT-8	<i>SLC30A8</i>	-	$\beta$ buňky pankreatu	<i>Diabetes mellitus</i>	insulinová granula, cytoplazma, jádro	transport zinku

Tabulka 4: Souhrnné informace o zinkových transportérech třídy ZnT a Zip u člověka (*pokračování*). Upraveno dle (Hogstrand *et al.*, 2009).

označení proteinu	označení genu (dle HUGO)	zařazení do podrodiny	exprese	asociace s patologickým stavem	buněčná lokalizace	molekulární funkce
ZnT-9	<i>SLC30A9</i>	-	rozsáhle	-	plasmatická membrána	neznámá
ZIP1	<i>SLC39A1</i>	II	rozsáhle	karcinom prostaty	plasmatická membrána	import zinku
ZIP2	<i>SLC39A2</i>	II	prostata, děloha, epitel cervixu, optický nerv, monocyty	karcinom prostaty	plasmatická membrána	import zinku
ZIP3	<i>SLC39A3</i>	II	rozsáhle	karcinom prostaty	plasmatická membrána	import zinku
ZIP4	<i>SLC39A4</i>	LIV-1A	tenké a tlusté střevo, slepé střevo, ledviny	<i>Acrodermatitis enteropathica</i>	apikální strana plasmatické membrány	import zinku
ZIP5	<i>SLC39A5</i>	LIV-1A	ledviny, játra, slezina, střevo, žaludek, pankreas	-	bazolaterální strana u polarizovaných buněk	import zinku
ZIP6	<i>SLC39A6</i>	LIV-1	rozsáhle	karcinom prsu	plasmatická membrána	import zinku
ZIP7	<i>SLC39A7</i>	KE4/LIV-1	rozsáhle	tamoxifen rezistentní karcinom prsu	ER, GA	import zinku
ZIP8	<i>SLC39A8</i>	LIV-1	rozsáhle	testikulární citlivost na kadmium	vezikuly, plasmatická membrána, mitochondrie	import Zn, Cd, Mg
ZIP9	<i>SLC39A9</i>	I	rozsáhle	-	neznámá	neznámá
ZIP10	<i>SLC39A10</i>	LIV-1	rozsáhle	karcinom prsu	plasmatická membrána	import zinku
ZIP11	<i>SLC39A11</i>	GufA	rozsáhle	-	neznámá	neznámá

Tabulka 4: Souhrnné informace o zinkových transportérech třídy ZnT a Zip u člověka (*pokračování*). Upraveno dle (Hogstrand *et al.*, 2009).

označení	označení	zařazení do	exprese	asociace s patologickým stavem	buněčná lokalizace	molekulární funkce
----------	----------	-------------	---------	--------------------------------	--------------------	--------------------

proteinu	genu (dle HUGO)	podrodiny				
ZIP12	<i>SLC39A12</i>	LIV-1	mozek, plíce, varlata, sítnice	astma, na SNP vázaná schizofrenie	plasmatická membrána	import zinku
ZIP13	<i>SLC39A13</i>	KE4/LIV-1	rozsáhle	Ehlersův-Danlosův syndrom (EDS)	GA	import zinku
ZIP14	<i>SLC39A14</i>	LIV-1	rozsáhle	astma, zánět zprostředkovaný IL-6	plasmatická membrána	příjem zinku a železa nevázaného na transferin

GA- Golgiho aparát, ER- endoplasmatické retikulum, SNP-jednonukleotidový polymorfismus, ZEN- zinc-enriched neurons, na zinek bohaté neurony, CA1 - cornu ammonis 1 (malá oblast vlastního hypocampu).

### **3.4 Zinek vazebné struktury**

Mezi důležité cytosolické ligandy, které mají schopnost vázat a následně odevzdávat zinek, patří nízkomolekulární organické kyseliny a metalothionein. Důležitým transkripčním faktorem, který reguluje metabolismus a homeostasu zinku je metal regulační transkripční faktor (MTF). Dále jsou do této kapitoly zařazeny matrixové metaloproteiny, neboť mají schopnost vázat zinek a jsou studovány v souvislosti s nádorovým onemocněním. Také jsou popsány jejich tkáňové inhibitory (TIMP).

#### **3.4.1 Nízkomolekulární organické kyseliny**

Do této skupiny patří zejména citrát, aspartát, histidin a cystein. Dále pak jiné organické ligandy dle typu buněk. Epiteliální buňky zdravé prostatické tkáně produkují velmi vysoké koncentrace aspartátu a citrátu. Z tohoto důvodu je pravděpodobné, že zvláště Zn-citrát a Zn-aspartát jsou důležitými ligandy pro vazbu zinku, jeho distribuci a dostupnost. Nízkomolekulární organické ligandy však nejsou homeostatickou složkou regulace zinku, neboť jejich koncentrace není regulována v závislosti na intracelulární koncentraci  $Zn^{2+}$  (Costello *et al.*, 2011a).

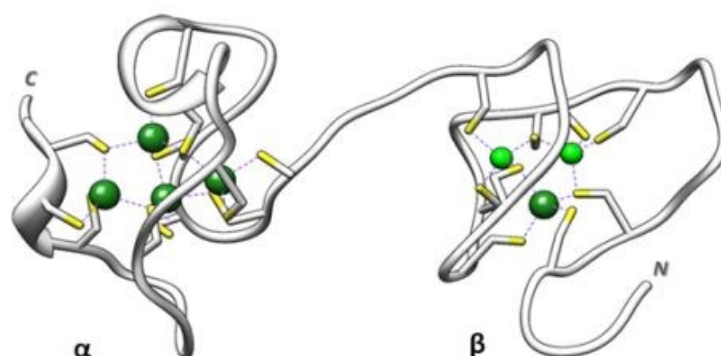
#### **3.4.2 Metalothionein**

Metalothioneiny (MT) jsou malé (6–7 kDa) proteiny bez enzymatické aktivity. Ve své struktuře obsahují 20 cysteinů a díky -SH skupinám váží do své struktury až sedm dvojmocných iontů kovů (viz obr. 5). Vazba s ionty kovů stabilizuje trojrozměrnou strukturu metalothionien. MT hrají klíčovou roli v transportu těžkých kovů (také zinku), při jejich detoxikaci a v ochraně buněk před oxidačním stresem (Sztalmachova, 2013).

##### **3.4.2.1 Struktura**

MT je složen ze dvou domén, které tvoří termodynamicky stabilní a kineticky labilní komplexy s ionty kovů. Cysteinové zbytky jsou umístěny na povrchu proteinu a tak umožňují rychlý a přímý transport kovů na malé molekuly a jiné proteiny. Je pravděpodobné, že dochází k přímým výměnám zinku mezi nízkomolekulárními organickými ligandy a metalothioneinem.





Obrázek 5: Proteinová struktura metalothioneinu. Skládá se z  $\alpha$  a  $\beta$  domény. Díky cysteinovým -SH skupinám (žlutě) může vázat MT 4–7 iontů zinku (zeleně). Dle ([http://www.protein.pl/?name=molecular\\_mechanisms\\_of\\_zinc\\_homeostasis](http://www.protein.pl/?name=molecular_mechanisms_of_zinc_homeostasis), 12.3.2014).

### 3.4.2.2 Funkce

Důležitou funkcí metalothioneinu je detoxikace kovů a udržování jejich hladiny v buňkách. Další důležitou funkcí MT je ochrana před buněčným stresem. Metalothionein interaguje s reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) a má také silné antioxidační vlastnosti. Funkce tohoto proteinu zasahuje také do regulace apoptosy, zvýšené hladiny MT působí antiapoptoticky (Sztalmachova, 2013).

MT reguluje hladinu, buněčnou lokalizaci a aktivitu transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Ten zprostředkovává ochranu buněk před apoptosou díky aktivaci antiapoptotických genů a protoonkogenů *Bcl-2*, *c-myc* a *TRAF-1* (Gumulec *et al.*, 2011b). MT se podílí na transportu zinku do mitochondrií a do jádra (Sztalmachova, 2013).

### 3.4.2.3 Exprese

MT je důležitým vazebným proteinem pro zinek. Pokud intracelulární koncentrace  $Zn^{2+}$  dosáhne prahové hodnoty, je aktivován metal regulační transkripční faktor (MTF-1). Ten indukuje mj. expresi MT, jež na sebe zinek váže. Molekuly MT jsou mobilní ligandy, doručují zinek organelám k jejich aktivním místům. Bylo detekováno, že Zn-MT proniká vnější mitochondriální membránou a vstupuje do mezimembránového prostoru (Ye *et al.*, 2001). Pak je dále transportován do matrix mitochondrií cestou přímé výměny prostřednictvím transportních proteinů (Costello *et al.*, 2011a).

Řada nedávných studií poukazuje na souvislosti mezi MT a patologickými stavy organismu, zejména malignitami. Zvýšené sérové hladiny MT byly detekovány u karcinomů prsu, plic, trávicího a urogenitálního traktu. U CaP jsou hladiny MT

v sérech pacientů zvýšeny 3x ve srovnání se zdravou populací. Mechanismus a příčina zvýšené sérové hladiny nejsou zcela ujasněny. I přes to je možné, že zvýšená hladina MT je zodpovědná za ochranu nádorových buněk před apoptosou, za zvýšenou proliferaci a za schopnost nádoru metastazovat (Gumulec *et al.*, 2011b).

### **3.4.3 Metal regulační transkripční faktor**

Metal regulační transkripční faktor (MTF-1; MRE binding transcription factor) je klíčovým regulátorem hladiny zinku i jiných kovů v buňce (Gumulec *et al.*, 2011b). MTF hraje důležitou roli v buněčné odpovědi na expozici těžkými kovy. Je také zapojen do buněčných pochodů reagujících na oxidační stres a hypoxii. Má vliv na expresi MT a některých zinkových transportérů.

MTF protein obsahuje 6 zinkových prstů, díky nimž se váže na MRE (metal response element). Tento DNA motiv obsahuje sekvenci nukleotidů TGCRNC (R=A nebo G, N=jakýkoli nukleotid), která je přítomna v několika kopiích v promotoru všech genů pro MT a v promotorech jiných genů regulovaných MTF (zinkové transportéry ZnT-1, ZnT-2, Zip10). Za fyziologických podmínek je MTF-1 v buňce inaktivován vazbou s MTI. Ten inhibuje vazbu MTF-1 na MRE. MTF je aktivován vazbou iontu kovu, fosforylací nebo oxidačním stresem. MTF-1 je uvolněn, je transportován do jádra a může aktivovat transkripci metalothioneinu nebo jiných MTF řízených genů. K řízení exprese cílového genu interaguje MTF-1 s jinými transkripčními faktory a koaktivátory (Wang *et al.*, 2004; Gumulec *et al.*, 2011b; Gunther *et al.*, 2012; Sztalmachova, 2013).

MTF-1 hraje důležitou roli při homeostase a detoxikaci těžkých kovů. Napomáhá ochraně organismu proti hypoxii a oxidačnímu stresu.

### **3.4.4 Matrixové metaloproteinasy**

Matrixové metaloproteinasy (MMP) jsou důležitou skupinou zinek vázajících proteinů s celou řadou důležitých fyziologických funkcí. Byly charakterizovány jako možné markery různých patologických stavů, včetně malignit (Zitka *et al.*, 2010). Na důležitost těchto proteinů poukazuje schopnost MMP štěpit extracelulární matrix i povrchové proteiny buněk a tak podporovat metastasování a angiogenezi (van Zijl *et al.*, 2011).

O MMP a souvislostech s nádorovým bujením jsem pojednávala ve své bakalářské práci (Axmanová, 2012).

Souhrnné informace o struktuře MMP, jejich funkcích jsou uvedeny v přílohách (viz příloha 7) (Zitka *et al.*, 2010).

### 3.4.5 Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteinás

Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteinás (TIMP) jsou hlavními endogenními regulátory MMP ve tkáni. Do této proteinové rodiny náleží čtyři homology označované jako TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4. Tyto proteiny se vážou reverzibilně k MMP v poměru 1:1. Liší se od sebe tkáňovou specifitou exprese a schopností inhibovat různé MMP (viz tab. 5).

Expres TIMP-1 a TIMP-2 je regulována cytokiny (např. tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF-  $\alpha$ ). TNF-  $\alpha$  může modifikovat expresi TIMP-1 indukcí NF- $\kappa$ B. TIMP-1 a TIMP-2 vykazují mitogenní aktivitu u různých typů buněk. TIMP-3 byl detekován v myokardu myších embryí. Je tedy možné zapojení tohoto proteinu do embryonální remodelace extracelulární matrix a do vývoje srdce (Apte *et al.*, 1994). TIMP-3 účinněji moduluje aktivitu MMP než ostatní TIMP (AnandApte *et al.*, 1996). Vysoká exprese TIMP-4 byla detekována v srdeční tkáni. Tento protein byl stanoven rovněž v ledvinách a ve střevě (Tummalapalli *et al.*, 2001).

Zvýšená produkce TIMP inhibuje růst různých typů nádorových buněk. Snížená koncentrace TIMP v průběhu remodelace poškozené tkáně zvyšuje kolagenasovou aktivitu a umožňuje nádorovým buňkám narušit extracelulární okolí a migrovat tak do okolních tkání (Ponton *et al.*, 1991; Zitka *et al.*, 2010). Klasifikace a charakteristika TIMP je uvedena v následující tabulce (viz tab. 5).

Tabulka 5: Klasifikace tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteinás. Dle (Zitka *et al.*, 2010).

	inhibované MMP	expres	lokalizace	tkáňová specifita
TIMP-1	všechny až na MMP-14	indukovaná	difúzní	kosti, vaječníky
TIMP-2	všechny	konstitutivní	difúzní	placenta
TIMP-3	MMP-1, -2, -3, -9, -13	indukovaná	asociována s ECM	ledviny, mozek
TIMP-4	MMP-1, -2, -3, -7, -9	nedetekováno	difúzní	srdce

## 4 CÍLE

- Vytvoření zinek rezistentní buněčné linie odvozené a vyselektované z wild type (wt) linie agresivní formy nádoru prostaty (PC3 linie).
- Analýza exprese vybraných genů korespondujících s metabolismem a transportem zinečnatých iontů (zinkové transportéry ZnT a Zip, metalothionein, matrixové metaloproteinasy, tkáňové inhibitory matrixových metaloproteinasy).
- Test schopnosti migrace zinek rezistentní a wild type linie s využitím scratch assay (Geback *et al.*, 2009).
- Optimalizace a kalibrace metody imunocytochemie. Aplikace této metody na tkáňové kultury. Imunocytochemická analýza vybraných proteinů souvisejících s metabolismem a transportem zinečnatých iontů (Zip, ZnT, MT, MTF).
- Porovnání citlivosti wt a zinek rezistentních linií k vybranému cytostatiku (cisPt) pomocí MTT testu.
- Fluorescenční detekce intracelulárního zinku a volných thiolů.

## **5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **5.1 Materiál a metodika**

#### **5.1.1 Práce s buněčnými kulturami**

Pro kultivaci a následnou analýzu byla využita buněčná linie wt PC3. Tato buněčná linie je odvozená ze 4. stupně adenokarcinomu prostaty z metastas z kostí a je androgen nezávislá (HPA Culture Collections, Salisbury, UK).

#### **Materiál a použité přístroje**

Kultivační média Ham's F-12 (PAA Laboratorie GmbH, Rakousko), EDTA (kys. ethylendiamintetraoctová) (PAA, Rakousko), PBS (SIGMA Aldrich, Německo), Trypsin (PAA, Rakousko), ATB (PAA, Švýcarsko), FBS (PAA, Rakousko), ZnSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Německo), kultivační plastové nádobky, plastové zkumavky, pipety, nástavec, mikrozukavky, mikroskop NICON ECLIPSE TS100 (Nicon, Japonsko), centrifuga 5810 R (Eppendorf, Německo), CO<sub>2</sub> termobox (Sanyo, Schoeller), přístroj na počítání buněk Casy Model TT System (Roche, Švýcarsko), laminární box Clean Air (Sanyo, Schoeller).

#### **Metodika**

Při postupech pracujeme ve sterilním prostředí, používáme jednorázový plastový či sterilní materiál. Buňky dodávané od výrobce se uchovávají zmrazené.

#### **Postup**

- Buňky byly rozmrazeny a přepipetovány spolu se 3 ml kultivačního média do centrifugační zkumavky
- Po centrifugaci 7 min. při 2700 g byl supernatant odsát a sediment rozsuspenzován v 1 ml příslušného média.
- Tato suspenze byla napipetována do kultivačních lahviček s 6 ml náležitého média. Buňky byly kultivovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
- Na lahvičce bylo uvedeno datum počátku kultivace, o kolikátou pasáž se jedná a naše iniciály, abychom předešli záměně.

- Buněčné linie byly během kultivace pozorovány pod mikroskopem při zvětšení 100x.
- Přibližně jednou za tři dny je třeba vyměnit médium. Staré médium bylo odsáto, buňky promyty 2 ml PBS a přidáno 6 ml čerstvého média.

Při 80% konfluenci buněk byly tkáňové kultury pasážovány nebo jinak zpracovávány.

### **Pasážování**

- Bylo odsáto staré médium, buňky byly promyty 2 ml EDTA a dále promyty 2 ml ředěného trypsinu (1:9) po dobu 30 s.
- Trypsin byl odsán, kultivační lahvička nechána 3 min. v termostatu.
- Buňky byly spláchnuty 2 ml příslušného média, suspenze byla přepipetována do centrifugačních zkumavek a proběhla centrifugace 7 min. při 2700 g.
- Po centrifugaci byl odsát supernatant, buňky byly rozsuspendovány ve 2 ml média.
- Do nových, předem označených kultivačních lahviček bylo napipetováno 6 ml příslušného média a 100  $\mu$ l připravené suspenze buněk. Nádobky s buňkami byly kultivovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

## **5.1.2 Vytváření zinek rezistentních buněčných linií**

### **Materiál**

2 M ZnSO<sub>4</sub>, voda pro tkáňové kultury, kultivační média, pipety, špičky, kultivační plast.

### **Metodika**

Vytvoření zinek rezistentní linie bylo dosaženo postupným zvyšováním množství zinečnatých iontů (ZnSO<sub>4</sub>) v kultivačním médiu tak, aby výsledná koncentrace zinečnatých iontů v kultivačním médiu pro linii PC3 byla postupně 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M a vyšší. Ochota buněk stávat se rezistentní vůči zinku je dána typem buněčné linie, aktuálním nárůstem koncentrace Zn<sup>2+</sup>, dobou kultivace. Principem je pozitivní selekce buněk rezistentních k zinku. Doba potřebná ke vzniku linie PC3 rezistentní na zinek byla minimálně tři měsíce. Následující experimenty byly prováděny s buněčnými liniemi rezistentními na zinek v koncentraci 50, 100 a 150  $\mu$ M, což je přibližně 1, 2 a 3 násobek hodnoty IC<sub>50</sub> pro wt PC3 buněčnou linii k zinku (na základě analýzy MTT).

## **Postup**

- Při pasážování buněk byla do kultivačního média přidána odpovídající koncentrace zinečnatých iontů.
- Buňky byly kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).
- Při každé výměně média bylo nutno opět dodat potřebné množství Zn<sup>2+</sup>.
- Buňky byly pozorovány pod mikroskopem a průběžně byla hodnocena jejich viabilita a mitotický potenciál, proliferace.

### **5.1.3 Izolace mRNA**

K izolaci RNA byl použit kit dodávaný firmou Roche (High Pure RNA Isolation Kit, Německo). Jednotlivé roztoky potřebné k izolaci mRNA jsou součástí tohoto kitu (lyzační pufr, DNasa, inkubační pufr, promývací pufr I a II, eluční pufr), PBS.

### **Materiál a použité přístroje**

Jednorázový plastový či sterilní materiál, pipety, škrabky na buňky, centrifugační zkumavky, mikrozukavky, filtrační mikrozukavky, NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA).

## **Postup**

- Buňky byly sklizeny mechanicky pomocí škrabky na buňky do stávajícího média. Médium s buňkami bylo přeneseno do centrifugační zkumavky.
- Po centrifugaci při 2700 g po 7 min. bylo médium odsáto, pelet buněk byl rozsuspendován v 2 ml PBS.
- Po centrifugaci při stejných parametrech (2700 g po 7 min.) byl PBS odsát.
- Pelet buněk byl rozsuspendován v 200 µl PBS.
- Dále bylo pokračováno dle instrukcí výrobce izolačního kitu (High Pure RNA Isolation Kit, Německo).
- Získaná buněčná mRNA byla dále zpracována nebo zamrazena na - 70 °C k další analýze.

## Měření čistoty a koncentrace vyizolované mRNA

- Izolovaná mRNA byla měřena na Nanodropu k detekci koncentrace nukleových kyselín a čistoty vzorku.

Čistá RNA je charakteristická parametry:

$A_{260}/280 > 2$  (poměr charakterizuje kontaminaci bílkovinami)

$A_{260}/230 > 1,8$  (kontaminace chalotropními solemi a fenolem)

### 5.1.4 Reverzní transkripce

K přepisu izolované mRNA do cDNA byl použit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo).

#### Materiál a použité přístroje

Pipety, mikrozkuhavky, mrazící destička, mikrocentrifuga (Eppendorf, Germany), sterilní box, termocykler (Labcykler, Schoeller).

#### Postup

- Vzorek mRNA naředíme PCR čistou vodou do objemu 11  $\mu\text{l}$  (na množství RNA 500 ng), připipetujeme 2  $\mu\text{l}$  random hexamerů, vzorky vložíme do termocykleru a nastavíme program na 10 min. při 65 °C.
- Připipetujeme 7  $\mu\text{l}$  mastermixu (viz tab. 6), vložíme do termocykleru. Přepis probíhá při těchto parametrech: 10 min., 25 °C; 60 min., 50 °C; 5 min., 85 °C.

Takto získaná cDNA je ihned použita k analýze qRT-PCR, nebo uchována k pozdějšímu zpracování při – 20 °C.

Tabulka 6 : Složení mastermixu pro reverzní transkripci.

0,5 $\mu\text{l}$ inhibitoru (Protector RNase inhibitor, 40 U/ $\mu\text{l}$ )
0,5 $\mu\text{l}$ transkriptasy (Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/ $\mu\text{l}$ )
4 $\mu\text{l}$ pufru (Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x konc.)
2 $\mu\text{l}$ dTP (Deoxynucleotide Mix, 10 mM každý)



### 5.1.5 Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR)

Analýza byla provedena s využitím chemismu TaqMan sond. Veškeré roztoky jsou dodávány firmou Applied Biosystems, USA (použité sondy viz tab. 7).

#### Materiál a použité přístroje

Pipety, mikrozkuřavky, mrazicí destička, mikrocentrifuga, sterilní box, analyzátor Real-Time PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems; Applied Biosystems, USA).

Analýza byla provedena s využitím chemismu TaqMan sond, které se vážou na cílové struktury a po štěpení DNA-polymerasou fluoreskují. Fluorescence je zaznamenána přístrojem.

#### Postup

- 5x naředěného vzorku cDNA bylo pipetováno 5  $\mu$ l do každé jamky mikrotitrační destičky. Seznam detekovaných genů a jejich assay ID je uveden v tabulce sedm.
- Do každé jamky bylo pipetováno 15  $\mu$ l reakční směsi na PCR (viz tab. 8).
- Jako referenční gen byl použit  $\beta$ -aktin.
- Reakce probíhala v přístroji ABI PRISM 7000 dle programu: 94 °C, 10 min.; 94 °C, 10 s; 60 °C, 1 min. Bylo provedeno 40 cyklů PCR.
- Získaná data z přístroje byla vyhodnocena s použitím metody „delta delta Ct“ podle metodiky navržené Applied Biosystems. Expres  $\beta$ -aktinu se používá pro normalizování hodnot exprese cílového genu.

Tabulka 7: Použité sondy.

detekovaný gen	assay ID
<i>MT1A</i>	Hs00831826_ml
<i>MT2A</i>	Hs02379661_ml
<i>Zip1</i>	Hs00205358_ml
<i>ZnT-1</i>	Hs00253602_ml
<i>MMP2</i>	Hs01518727_ml
<i>MMP9</i>	Hs00234579_ml
<i>TIMP1</i>	Hs00171558_ml
<i>TIMP2</i>	Hs00234278_ml
$\beta$ -aktin	Hs99999903_ml

Tabulka 8: Reakční směs na PCR (uvedené hodnoty jsou na jeden vzorek).

1 $\mu$ l roztoku sonda + primer (pro každý gen zvlášť)
10 $\mu$ l Master Mix (dodáno výrobcem)
4 $\mu$ l vody

## 5.1.6 Imunocytochemie

### Chemikálie

Primární protilátky: MT, rabbit polyclonal Ab (sc-11377); ZIP-1, goat polyclonal Ab (sc-103945); MTF-1 goat polyclonal Ab (sc-26844); Zn-t-1, goat polyclonal Ab (sc-27501). Všechny protilátky jsou od Santa Cruz Biotechnology.

Sekundární protilátky: peroxidase goat anti-rabbit IgG antibody (Vector laboratories), bovine anti-goat IgG-HRP (sc- 2352 Santa Cruz Biotechnology).

Kultivační média Ham's F-12 (PAA Laboratorie GmbH, Rakousko), peroxid vodíku (Lach-Ner), PBS (Invitrogen, USA), Normal Horse Serum (Vector Laboratories), DAB (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, DAKO), Hematoxylin Mayerův (čerstvě připravený, na 100 ml destilované vody: 0,1 g hematoxylin, 0,02 g jodičnan sodný, 5 g síran hlinito-draselný, 0,1 g kys. citronová, 5 g chlorhydrát), kanadský balzám (Intraco Micro), xylén (Chemopol, Praha), metanol (Penta, Chrudim) etanol (Penta, Chrudim), aceton (ML chemica, Troubsko), voda destilovaná, voda vodovodní, Tween (Sigma-Aldrich).

### Ostatní materiál a použité přístroje

Buněčná suspenze, box s laminárním prouděním vzduchu (Merci, ČR), centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo), magnetické míchadlo (Laboratorní přístroje, Praha), termostat (Robbins Scientific Corporation, USA), mikroskop (Nikon, Optiphot 2, Japan), podložní skla, Petriho misky, barvicí kyvety, vlhká komůrka, hydrofobní fix, pipety, nástavec na pipety, špičky, kádinka, mikrozkuřavky, filtrační papír, laboratorní sklo, buničina.

## **Metodika**

Imunocytochemická analýza se využívá k detekci proteinů v buněčných preparátech. Metoda využívá vazby primární protilátky na studovaný protein (antigenní determinantu). Na primární protilátku se následně váže protilátka sekundární, která je značená křenovou peroxidasou (HRP). HRP přeměňuje substrát DAB (3, 3'-diaminobenzidin) na hnědě zbarvený produkt. Jádra dobarvená hematoxylinem jsou modrá.

K zavedení a optimalizaci metody pro místní podmínky jsem využila následujících zdrojů:

- Postupy používané pro rutinní imunohistochemickou diagnostiku v laboratořích na Ústavu patologie FN Brno.
- Postupy používané na Ústavu histologie a embryologie LF UPOL pro výzkumné účely.
- Průvodce pro značení antigenů od firmy Vector Laboratories ([www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com), 12.3.2014).
- Informace k systému pro imunoperoxidasové značení ([www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com), 12.3.2014).
- Metodiku popsanou v publikaci Knoeppa a kolegů (Knoepp *et al.*, 2013).

## **Postup**

- Buněčná suspenze byla při pasážování rozseta na sterilní podložní sklo v Petriho misce.
- Buňky adherovaly na podložní sklo přibližně 4 h v termostatu, pak byla Petriho miska doplněna příslušným kultivačním médiem.
- Po nárůstu buněk do 80% konfluence byly buňky po oplachu PBS fixovány 10 min. ledovou směsí metanol/acetón v poměru 1:1. (Po tomto kroku lze buňky uchovat pro pozdější analýzu při - 20 °C.)
- Podložní skla byla opláchnuta 3x v PBS po dobu 5 min. Posledních 5 min. byl do PBS přidáno 10 µl detergentu TWEEN-20.

- 3% peroxidem vodíku (ředěným v destilované vodě) byla 20 min. blokována endogenní peroxidasa.
- Preparáty byly opláchnuty 3x po 5 min. v PBS.
- Okolí preparátu bylo označeno hydrofobním fixem.
- Nespecifické vazebné pozadí bylo blokováno normálním koňským sérem (NHS) po dobu 10 min (www.vectorlabs.com, 12.3.2014).
- Následně byla aplikována příslušná primární protilátka naředěná v poměru 1:50 v PBS. Inkubace probíhala přes noc (16 h) při 4 °C ve vlhké komůrce.
- Po inkubaci byly preparáty 3x pláchnuty v PBS po 5 min.
- Byla aplikována příslušná sekundární protilátka značená HRP, ředěná 1:250 v PBS. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě po dobu 45 min.
- Preparáty byly propláchnuty 3x po 5 min. v PBS.
- Na preparáty byl aplikován čerstvě připravený substrát DAB (na 1 ml substrátového pufru 20 µl DAB chromogenu) po dobu 5 min.
- Preparáty byly opláchnuty po dobu 5 min. destilovanou vodou.
- Jádra buněk byla kontrastně dobarvena Mayerovým hematoxylinem po dobu 3 min.
- 10 min. byly preparáty ponechány v kyvetě s vodovodní vodou (modrání jader).
- Preparáty byly odvodněny vzestupnou řadou alkoholu (1x5 min. 70% alkohol, 1x5 min. 80% alkohol, 1x5 min. 96% alkohol), převedeny do xyleny (1x5 min. směs aceton-xylen 2:1) a projasněny (1x5 min. xylen).
- Vzorky byly montovány kanadským balzámem a uzavírány pod krycí sklíčko.
- Preparáty byly hodnoceny pod světelným mikroskopem. Hodnocení je semikvantitativní ve srovnání s kontrolními vzorky. Je detekována lokalizace proteinů.

Míra falešné pozitivita je minimalizována následujícími metodickými kroky:

- Zpracováním negativních kontrol (odhalení nespecifických vazeb sekundárních protilátek).

- Blokadí vazebného pozadí normálním koňským sérem. Sérum vyváže volné Fc receptory imunoglobulinů přítomných na membránách buněk, které by mohly nespecifičky reagovat s primární nebo sekundární protilátkou.

- Z důvodu použití sekundárních protilátek značených křenovou peroxidasou (HRP) je třeba blokovat endogenní aktivitu tohoto enzymu. Peroxidem vodíku dojde k vysycení enzymové aktivity.

### **5.1.7 MTT**

#### **Chemikálie**

EDTA, trypsin (PAA, Rakousko), kultivační média, promývací médium, testovaná látka (cytostatikum CisPlatina 0,5 mg. ml<sup>-1</sup>, Medac, Německo); ZnSO<sub>4</sub>, (BioReagent, Francie, vhodný pro buněčné kultury); MTT reagentie (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromide), DMSO (dimetylsulfoxid), glycinový pufr.

#### **Materiál a použité přístroje**

Centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo), škrabka na buňky, mikrotitrační destička, pipety, špičky, vertikální spektrofotometr (Versa Max tunable microplate reader, Molecular Devices, USA), alobal.

#### **Metodika**

Buňky byly inkubovány v 96 jamkových destičkách s testovanými látkami (cytostatika) po dobu 24 h v termostatu při 37 °C. Metoda je založena na redukci žlutého MTT reagentu mitochondriálními enzymy živých buněk na nerozpustný formazan. Ten je následně rozpuštěn přidáním silného detergentu. Zbarvení je hodnoceno spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. Na základě výsledných hodnot absorbance je přepočítána hodnota IC<sub>50</sub> pro testovanou látku k dané buněčné linii. Hodnota IC<sub>50</sub> je polovina maximální inhibiční koncentrace, tj. taková koncentrace stanovené látky, která usmrtí 50 % buněk.

#### **Postup**

- Z kultivační nádoby bylo odsáto použité médium a buňky byly propláchnuty EDTA.

- Buňky byly propláchnuty trypsinem po dobu 30 s, trypsin byl odsát a kultivační nádobka byla vložena na 5 min. do termostatu.
- Buňky byly spláchnuty příslušným médiem a buněčná suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky.
- Po centrifugaci při 2700 g po 7 min. při 4 °C byl odsát supernatant a buňky byly rozsuspendovány v médiu.
- Množství buněk bylo počítáno (viz počítání buněk, kapitola 5.1.8)
- Buňky byly naředěny kultivačním médiem na množství přibližně 10 000 buněk na 200  $\mu$ l.
- Do jamek v prvním a posledním sloupci bylo pipetováno čisté médium, do jamek v ostatních sloupcích bylo pipetováno po 200  $\mu$ l buněčné suspenze.
- Buňky byly kultivovány v termoboxu do nárůstu do optimální konfluence (asi 70 %).
- Médium bylo odsáto a byla přidána testovaná látka o vzrůstající koncentraci do jamek ve sloupcích 2–11. Do jamek prvního a posledního sloupce bylo přidáno jen kultivační médium.
- Testovaná látka působila na buňky 24 h v termostatu.
- Médium v jamkách 1–11 sloupce bylo odsáto. Bylo přidáno 200  $\mu$ l kultivačního média a 50  $\mu$ l MTT (5 mg·ml<sup>-1</sup>). Destička byla zabalena do alobalu a byla na 4 h uložena do termostatu.
- Obsah jamek 1–11 sloupce byl odsát a bylo přidáno 200  $\mu$ l DMSO a 25  $\mu$ l glycinového pufru.
- Po promíchání byla měřena absorbance při 570 nm na vertikálním spektrofotometru.
- Výsledná hodnota absorbance byla přepočítána na hodnotu IC<sub>50</sub> pro testovanou látku.

### **5.1.8 Počítání buněk**

#### **Chemikálie**

Casy tone, pipety, 10 ml zkumavky k počítání buněk.

## **Materiál a použité přístroje**

Přístroj na počítání buněk CASY® Cell Counter (Roche, Švýcarsko), plastové zkumavky, pipety, špičky.

## **Postup**

- Do 10 ml CASY TONE bylo napipetováno 100  $\mu$ l buněčné suspenze. Vzorek byl promíchán.
- Analyzátor byl 3x pročištěn, byly nastaveny parametry pro požadovanou buněčnou linii.
- Byla měřena buněčná viabilita a počet buněk. Pokud je koncentrace buněčné suspenze příliš vysoká, přístroj není schopen detekovat počet buněk. Je třeba suspenzi buněk naředit a měření opakovat.

## **5.1.9 Detekce zinku a volných thiolů**

### **Materiál**

Podložní skla, Petriho misky, Fluorescenční mikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), PBS, 5-(bromomethyl)fluorescein (5-BMF, Sigma-Aldrich), DMSO, digitální fotoaparát (Olympus Camedia 750, Olympus, Tokyo, Japan), sonda N(6-metoxy-8-quinolyl)-p-toluen sulfonamid (TSQ, Invitrogen), pracovní TSQ roztok, PBS (pH 7,6).

### **Postup**

Zinek a volné thiolové skupiny byly barveny s použitím speciálních detekčních technik a obraz byl snímán pomocí fluorescenčního mikroskopu. Buňky byly k analýze zpracovány v naší laboratoři, následná detekce probíhala v laboratořích na VFU Brno.

- Buněčná suspenze byla při pasážování rozseta na sterilní podložní sklo v Petriho misce.
- Buňky adherovaly na podložní sklo přibližně 4 h v termostatu, pak byla Petriho miska doplněna příslušným kultivačním médiem.
- Buňky byly kultivovány v termostatu při 37 °C a při 5 % CO<sub>2</sub> do požadované konfluence.

- Mikroskopická skla byla nejprve opláchnuta médiem bez  $Zn^{2+}$  a následně PBS.
- Volné -SH skupiny byly detekovány pomocí 5-(bromomethyl)fluoresceinu (5-BMF), ten byl bezprostředně před použitím připraven čerstvý ze zásobního roztoku (naředěn PBS na koncentraci 20  $\mu M$ ). Preparáty byly inkubovány 1 h při 37 °C ve tmě.
- Preparáty byly 3 x propláchnuty PBS, pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu a fotografovány.
- Pro detekci volného zinku v buňkách byla použita sonda TSQ (N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluene sulfonamide). Detekční roztok TSQ byl připraven bezprostředně před použitím naředěním zásobního roztoku (PBS na cílovou koncentraci 10  $\mu M$ ). Preparáty byly inkubovány 30 min. při 37 °C ve tmě.
- Preparáty byly 3 x promyty v PBS, pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu a fotografovány.

### **5.1.10 Scratch assay**

#### **Materiál**

Veškeré materiály potřebné ke kultivaci buněčných kultur (viz kap. 5.1.1), mikroskop NIKON ECLIPSE TS100 (Nicon, Japonsko), fotoaparát Nikon (digital camera D80, Thailand), žlutá špička (200  $\mu l$ ).

#### **Metodika**

Scratch assay je jednoduchá a dobře proveditelná metoda pro měření migrace buněk *in vitro*. Buňky jsou kultivovány v malých Petriho miskách. Po nárůstu buněk do 100% konfluence je provedena rýha (scratch) žlutou špičkou. Detekujeme zacelení rýhy v pravidelných časových intervalech. Fotografie jsou programově hodnoceny.

Byla analyzována schopnost migrace nádorových zinek rezistentních buněk (PC3, dlouhodobě kultivovaná v koncentraci zinku 50  $\mu M$ ) ve srovnání s migrační schopností buněk linie wt PC3.

#### **Postup**

- Buňky byly při pasážování rozsety do malých Petriho misek, byly kultivovány za standardních podmínek (37°C, 5 %  $CO_2$ ).



- Po nárůstu buněk do monovrstvy (100% konfluence) byla provedena rýha žlutou (200 $\mu$ l) špičkou. Pro zajištění stejného místa fotografování byla vytvořena referenční rýha.
- Bylo vyměněno médium a přidán zinek dle koncentrace.
- Buňky jsme fotografovali v předem stanovených časových intervalech v mikroskopu s fázovým kontrastem. Čas, kdy byla provedena rýha a zdokumentována první fotografie označíme jako čas nula. Další snímky byly provedeny v intervalech 2, 4, 6, 8 a 24 h.
- Fotografie byly hodnoceny s využitím programu TScratch (CSElab) (Geback *et al.*, 2009).
- Fotografie byly hodnoceny na základě procentuálního pokryvu buňkami. Naměřené hodnoty odpovídají procentuálnímu zastoupení volné plochy na snímku.
- Vypočítali jsme podíl těchto hodnot za 24 hod ve srovnání s časem nula.
- S využitím T-testu byla vyhodnocena statistická významnost. Hladina významnosti, na které byla statistická analýza provedena je  $p=0,05$ .

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Zinek rezistentní linie

Dle popsané metodiky (viz 5.1.2) byla vytvořena nádorová prostatická linie odvozená z linie wt PC3, trvale životaschopná ve vysokých koncentracích zinku (dále v textu označovaná jako zinek rezistentní).

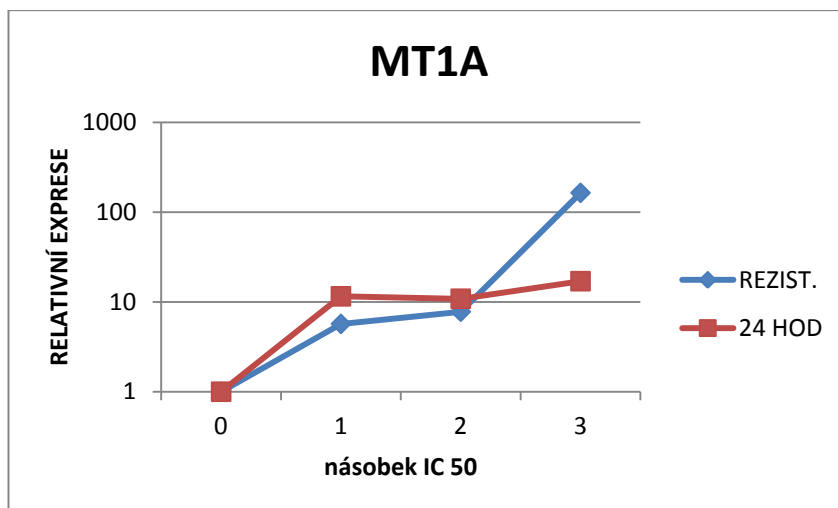
V předchozích experimentech byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  pro zinek u nádorové prostatické buněčné linie PC3 na 55,5  $\mu\text{M}$  (Sztalmachova *et al.*, 2012; Masarik *et al.*, 2012a). Pozitivní selekcí buněk rezistentních k zinku byly vytvořeny zinek rezistentní buněčné linie rostoucí v koncentracích zinku několikrát převyšující jejich původní wt  $IC_{50}$ . Pro dlouhodobou kultivaci byly využity následující koncentrace zinku: 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$ , což odpovídá 1-, 2-, 3- násobku hodnoty  $IC_{50}$ . Rezistentní buňky byly schopné dělení a růstu v koncentracích zinku vyšších než trojnásobek standardní hodnoty  $IC_{50}$ . Doba potřebná k vytvoření buněčných linií rezistentních na zinek (trojnásobek  $IC_{50}$ ) byla minimálně tři měsíce.

### 6.2 Analýza exprese vybraných genů

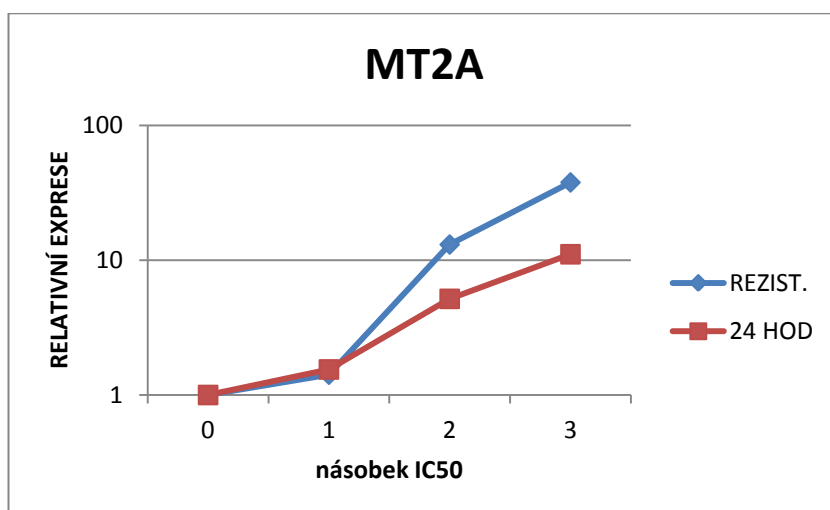
K analýze expresního profilu vybraných genů korespondujících s metabolismem a transportem zinečnatých iontů byly využity zinek rezistentní buněčné linie PC3 (dlouhodobě kultivované v médiu s koncentrací zinku odpovídající 1-, 2-, 3- násobek hodnoty  $IC_{50}$  pro zinek) a buněčná linie PC3 (wt) vystavená krátkodobému působení zinku (24 h) v koncentracích 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$ .

Expese všech studovaných genů byla porovnána s nulovou koncentrací  $\text{Zn}^{2+}$  v kultivačním médiu u buněčné linie wt PC3. Jako referenční gen byl použit  $\beta$ -aktin (*ACTB*). K analýze byly vybrány následující geny: *Zip1*, *ZnT-1* (zinkové transportéry); *MT1A*, *MT2A* (kov vázající proteiny, metalothioneiny); *MMP-2* a *MMP-9* (zinek vázající proteiny); *TIMP-1* a *TIMP-2* (tkáňové inhibitory MMP).

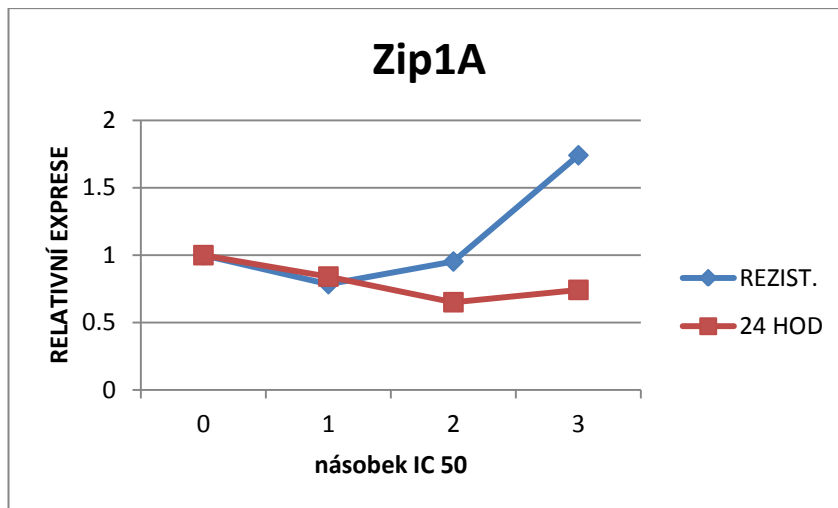
Grafy níže zobrazují míru exprese pro jednotlivé geny a vizualizují rozdíly mezi krátkodobým (24 h) a dlouhodobým (zinek rezistentní buněčná linie) působením zinečnatých iontů. Koncentrace  $\text{Zn}^{2+}$  odpovídá násobkům hodnoty  $IC_{50}$  pro linii wt PC3 (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ) (viz grafy 1–7).



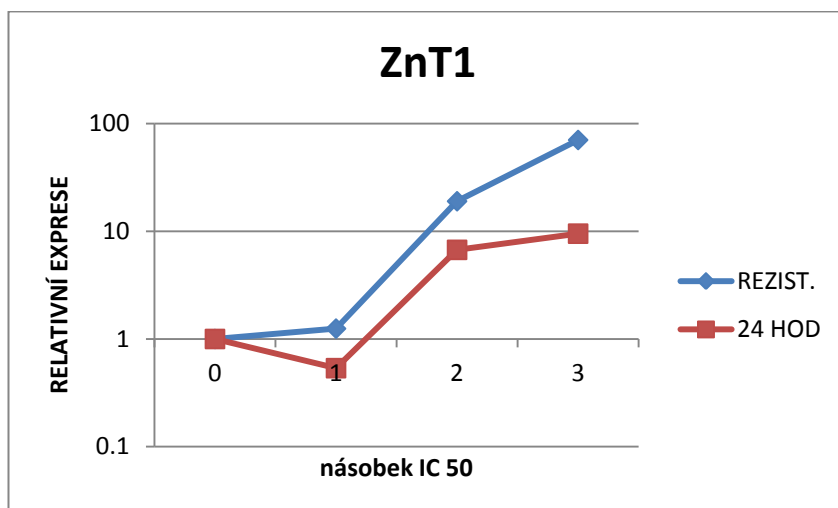
Graf 1: Expresse genu *MT1A*. Graf zobrazuje vliv zinečnatých iontů na expresi genu *MT1A*. Srovnání krátkodobého působení  $Zn^{2+}$  (24 h) a zinek rezistentní buněčné linie (rezist.).



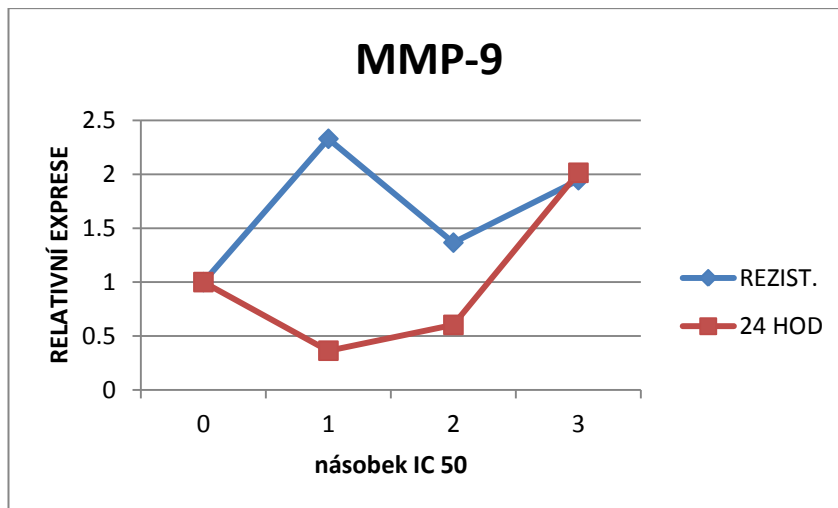
Graf 2: Expresse genu *MT2A*. Graf zobrazuje vliv zinečnatých iontů na expresi genu *MT2A*. Srovnání krátkodobého působení  $Zn^{2+}$  (24 h) a zinek rezistentní buněčné linie (rezist.).



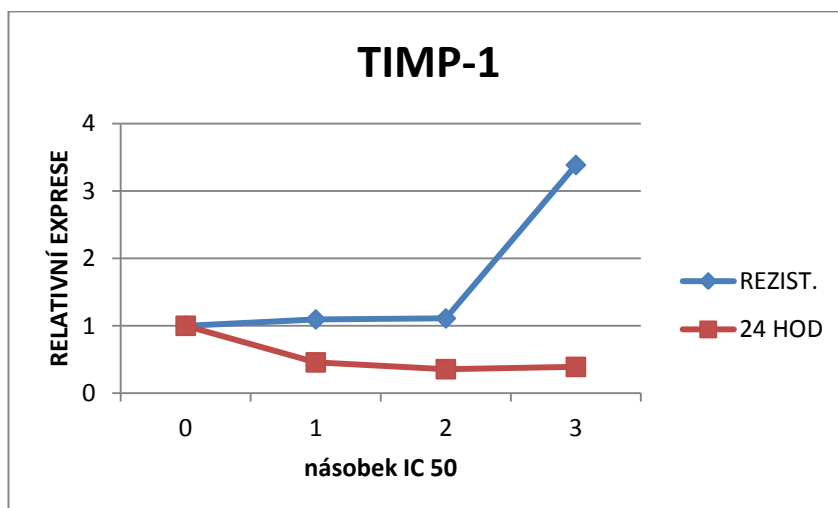
Graf 3: Expresse genu *Zip1A*. Graf zobrazuje vliv zinečnatých iontů na expresi genu *Zip1A*. Srovnání krátkodobého působení  $Zn^{2+}$  (24 h) a zinek rezistentní buněčné linie (rezist.).



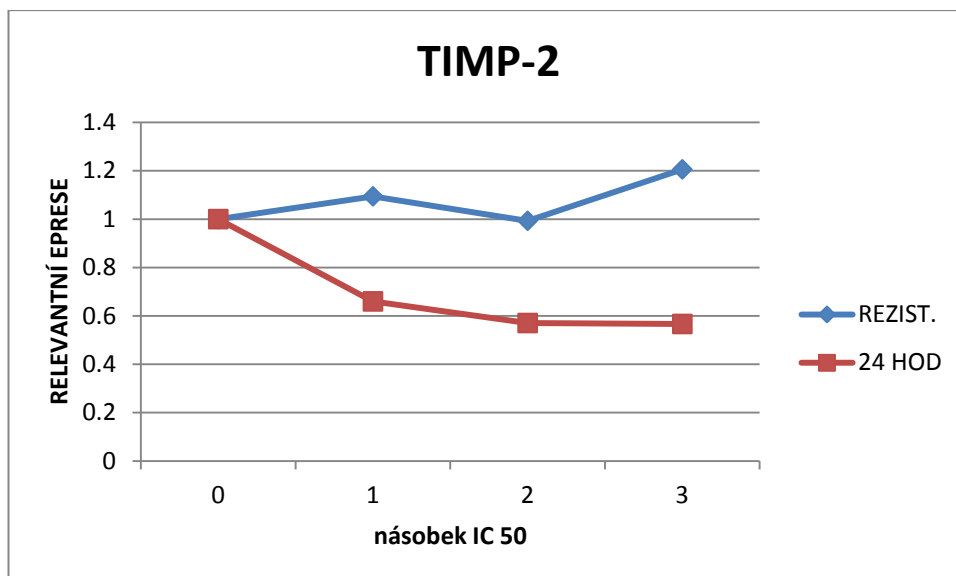
Graf 4: Expresse genu *ZnT-1*. Graf zobrazuje vliv zinečnatých iontů na expresi genu *ZnT-1*. Srovnání krátkodobého působení  $Zn^{2+}$  (24 h) a zinek rezistentní buněčné linie (rezist.).



Graf 5: Expresse genu *MMP-9*. Graf zobrazuje vliv zinečnatých iontů na expresi genu *MMP-9*. Srovnání krátkodobého působení  $Zn^{2+}$  (24 h) a zinek rezistentní buněčné linie (rezist.).



Graf 6: Expresse genu *TIMP-1*. Graf zobrazuje vliv zinečnatých iontů na expresi genu *TIMP-1*. Srovnání krátkodobého působení  $Zn^{2+}$  (24 h) a zinek rezistentní buněčné linie (rezist.).



Graf 7: Expresie genu *TIMP-2*. Graf zobrazuje vliv zinečnatých iontů na expresi genu *TIMP-2*. Srovnání krátkodobého působení  $Zn^{2+}$  (24 h) a zinek rezistentní buněčné linie (rezist.).

Expresie genů *MT1A*, *MT2A* a *ZnT-1* výrazně koreluje s přidáním zinku u obou typů linií. Míra exprese těchto genů byla zvýšena u zinek rezistentní buněčné linie, zejména u koncentrací zinku odpovídající trojnásobku hodnoty  $IC_{50}$ . Expresie genu *MT1A* (viz graf 1) byla zvýšena až desetinásobně u zinek rezistentní linie (ve srovnání s linií wt), expresie genu *MT2A* (viz graf 2) byla zvýšena až trojnásobně a expresie genu *ZnT-1* (viz graf 4) byla zvýšena sedminásobně u zinek rezistentní linie ve srovnání s linií wt.

Hladina významnosti, na které byla provedena statistická analýza, odpovídá  $p=0,05$ . S využitím Pearsonovy analýzy byla prokázána signifikantní pozitivní korelace mezi koncentrací zinečnatých iontů v médiu a expresí genů *MT1A* ( $r=0,9126$ ,  $p=0,004$ ), *MT2A* ( $r=0,9337$ ,  $p=0,002$ ) a *ZnT-1* ( $r=0,8918$ ,  $p=0,007$ ). U ostatních genů nebyla potvrzena signifikantní korelace ( $p>0,05$ ). U genu *MMP-2* nebyl ve většině vzorků detekován při qRT-PCR žádný signál, proto výsledky nebyly dále zpracovávány.

Dále byla detekována koexpresie vybraných genů. Tyto údaje shrnuje následující tabulka (viz tab. 9). Lze pozorovat, že statisticky významnou koexpresi vykazují následující dvojice genů: *MT1A* a *MT2A*, *ZnT-1* a *MT2A*, *ZnT-1* a *MT1A*, *TIMP-1* a *Zip1*, *TIMP-2* a *Zip1*.

Tabulka 9: Hodnocení koexprese detekovaných genů. Červeně zvýrazněné jsou hodnoty statisticky významné, r=korelační koeficient, p= hladina významnosti.

	MT2A	MT1A	ZIP1	ZnT-1	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
MT2A	r=1,0000	r=0,8455	r=0,4114	r=0,9725	r=0,4073	r=0,3175	r=-0,0063
MT1A	p= --- r=0,8455	p=0,008 r=1,0000	p=0,311 r=0,3912	p=0,000 r=0,7515	p=0,317 r=0,2346	p=0,444 r=0,2741	p=0,988 r=-0,0660
ZIP1	p=0,008 r=0,4114	p= --- r=0,3912	p=0,338 r=1,0000	p=0,032 r=0,4587	p=0,576 r=0,3077	p=0,511 r=0,9070	p=0,877 r=0,7284
ZnT-1	p=0,311 r=0,9725	p=0,338 r=0,7515	p= --- r=0,4587	p=0,253 r=1,0000	p=0,458 r=0,4886	p=0,002 r=0,4185	p=0,040 r=0,1224
MMP-9	p=0,000 r=0,4073	p=0,032 r=0,2346	p=0,253 r=0,3077	p= --- r=0,4886	p=0,219 r=1,0000	p=0,302 r=0,5222	p=0,773 r=0,4846
TIMP-1	p=0,317 r=0,3175	p=0,576 r=0,2741	p=0,458 r=0,9070	p=0,219 r=0,4185	p= --- r=0,5222	p=0,184 r=1,0000	p=0,224 r=0,9239
TIMP-2	p=0,444 r=-0,0063	p=0,511 r=-0,0660	p=0,002 r=0,7284	p=0,302 r=0,1224	p=0,184 r=0,4846	p= --- r=0,9239	p=0,001 r=1,0000
	p=0,988	p=0,877	p=0,040	p=0,773	p=0,224	p=0,001	p= ---

Dále bylo detekováno, zda má koncentrace  $Zn^{2+}$  či získaná rezistence vliv na expresní profil. S využitím ANOVA testu (faktorová analýza rozptylu) bylo určeno, že vliv na expresní profil detekovaných genů má koncentrace zinečnatých iontů v kultivačním médiu ( $p=0,024$ ), nikoli však získaná rezistence buněk k zinku ( $p=0,609$ ).

Pomocí Fischerova post-hoc testu byl prokázán signifikantní vliv rozdílných koncentrací zinečnatých iontů na expresi genů *ZnT-1*, *MT1A* a *MT2A* u obou typů (wt i rezistentních) sledovaných linií.

### 6.3 Analýza viability buněk (MTT)

K detekci životnosti buněk byl využit MTT test. Předchozími studiemi byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  pro wt PC3 buněčnou linii k zinku (Sztalmachova *et al.*, 2012). Byla detekována viabilita zinek rezistentní buněčné linie (koncentrace zinku 1x hodnota  $IC_{50}$ ) po 24 h působení  $Zn^{2+}$  ve vzrůstajících koncentracích (škála 0–2000  $\mu M Zn^{2+}$ ). Hodnota  $IC_{50}$  (viz 5.1.7) pro zinek rezistentní linii byla 1,4 násobně vyšší, ve srovnání s wt PC3 buněčnou linií (viz tab. 10).

Dále byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  k cytostatiku cisplatině (škála 0–250  $\mu M cisPt$ ) a to pro buněčnou linii zinek rezistentní ve srovnání s linií wt PC3. U rezistentních

buněk byla hodnota  $IC_{50}$  pro cisPt zvýšena 1,6 krát. Výsledky analýzy MTT shrnuje tabulka 10.

Dlouhodobá kultivace se zinkem tedy zvyšuje rezistenci buněk nejen k zinku, ale také k cisplatině.

## 6.4 Imunocytochemická analýza

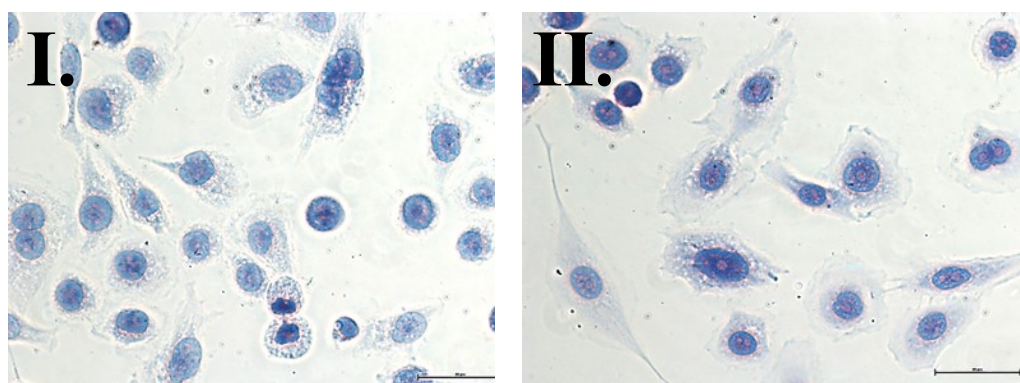
K potvrzení expresní analýzy byla využita metoda imunocytochemie na buněčných kulturách. K detekci byly vybrány následující proteiny, které bezprostředně ovlivňují metabolismus zinku: Zip1, ZnT-1 (zinkové transportéry), MT (metalothionein), MTF-1 (kov regulační transkripční faktor).

Souběžně byly zpracovány negativní kontroly (viz 5.1.6) k odhalení nespecifických vazeb sekundární protilátky (obr. 6). Kontroly byly zpracovány ke každé ze sekundárních protilátek. Tyto preparáty vykazovaly negativní reakci (nepřítomnost hnědého zbarvení). Můžeme tedy vyloučit případnou falešnou pozitivitu způsobenou nespecifickými vazbami sekundárních protilátek. K vyloučení jiných možností falešně pozitivních výsledků je součástí metodického postupu blokace endogenní peroxidasy a blokace vazebného pozadí normálním koňským sérem (NHS), (viz kap. 5.1.6).

Tabulka 10: Analýza hodnot  $IC_{50}$  pro zinek a cisplatinu: srovnání zinek rezistentní buněčné linie a wt linie PC3.

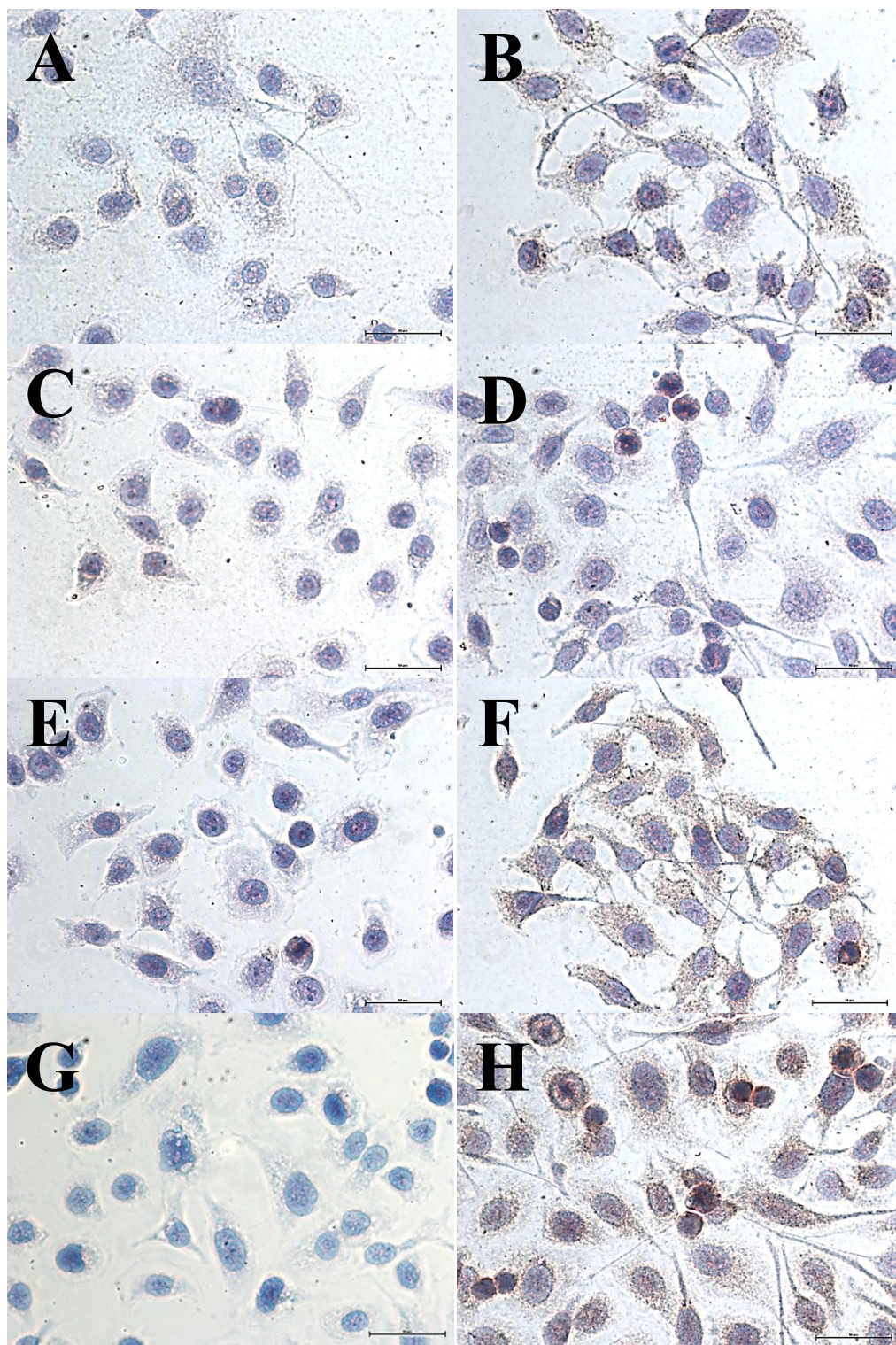
	Zn <sup>2+</sup> $\mu$ M	cisplatina $\mu$ M
wild type PC3	55, 5	74,9
zinek rezistentní PC3	83 $\pm$ 4,7	116,7 $\pm$ 70





Obrázek 6: Imunocytochemická detekce vzorků negativních kontrol. (I.) buněčná linie wt PC3 (II.) zinek rezistentní linie PC3. Kontroly nevykazují jakoukoli pozitivitu. Velikost úsečky 50 $\mu$ m.

Detekce vybraných proteinů (viz výše) byla provedena na zinek rezistentní linii PC3 (kultivované v koncentraci zinku odpovídající 1 x IC<sub>50</sub>, tj. 50 $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>). Výsledky této detekce byly srovnávány s preparáty linie wt PC3 (bez přidaného zinku). Fotografie v levém sloupci zachycují detekci vybraných proteinů v linii wt PC3, fotografie vpravo pak linii zinek rezistentní (viz obr. 7). První dvojice fotografií dokumentuje protein Zip1. Ten je lokalizován nejen na membráně ale i intracelulárně (viz kap. 7). Lze pozorovat mírné zvýšení míry positivity zbarvení u preparátu se zinek rezistentními buňkami ve srovnání s buňkami linie wt. Další dvojice preparátů detekuje protein ZnT-1. Míra positivity je v preparátu zinek rezistentní linie mírně vyšší než u linie wt PC3. Fotografie E a F zobrazují metal regulační faktor (MTF). Intenzita zbarvení je v preparátu s buňkami zinek rezistentní linie výrazně zvýšená ve srovnání s linií wt. Poslední dvojice fotografií (G a H) dokumentují protein metalothionein. Lze pozorovat výrazné zvýšení míry positivity reakce v preparátech zinek rezistentních buněk ve srovnání s wt buňkami. To je v souladu analýzou exprese genu pro MT a také s faktem, že zvýšená koncentrace zinku výrazně indukuje expresi MT.



Obrázek 7: Imunocytochemická detekce vybraných proteinů. Přítomnost hnědého zbarvení značí pozitivitu, jádra jsou dobarveny hematoxylinem modře. Srovnání linie wt PC3 (levý sloupec) a linie zinek rezistentní PC3 (sloupec vpravo). (A) Detekce Zip, linie wt (B) detekce Zip, linie zinek rezistentní (C) detekce ZnT-1, linie wt (D) detekce ZnT-1, linie zinek rezistentní (E) detekce MTF, linie wt (F) detekce MTF, linie zinek rezistentní (G) detekce MT, linie wt (H) detekce MT, linie zinek rezistentní. Velikost úsečky 50 $\mu$ m.

## **6.5 Fluorescenční značení**

Pro potvrzení, že zinek rezistentní buněčné linie jsou ovlivněny vysokou koncentrací zinku, bylo provedeno fluorescenční značení.

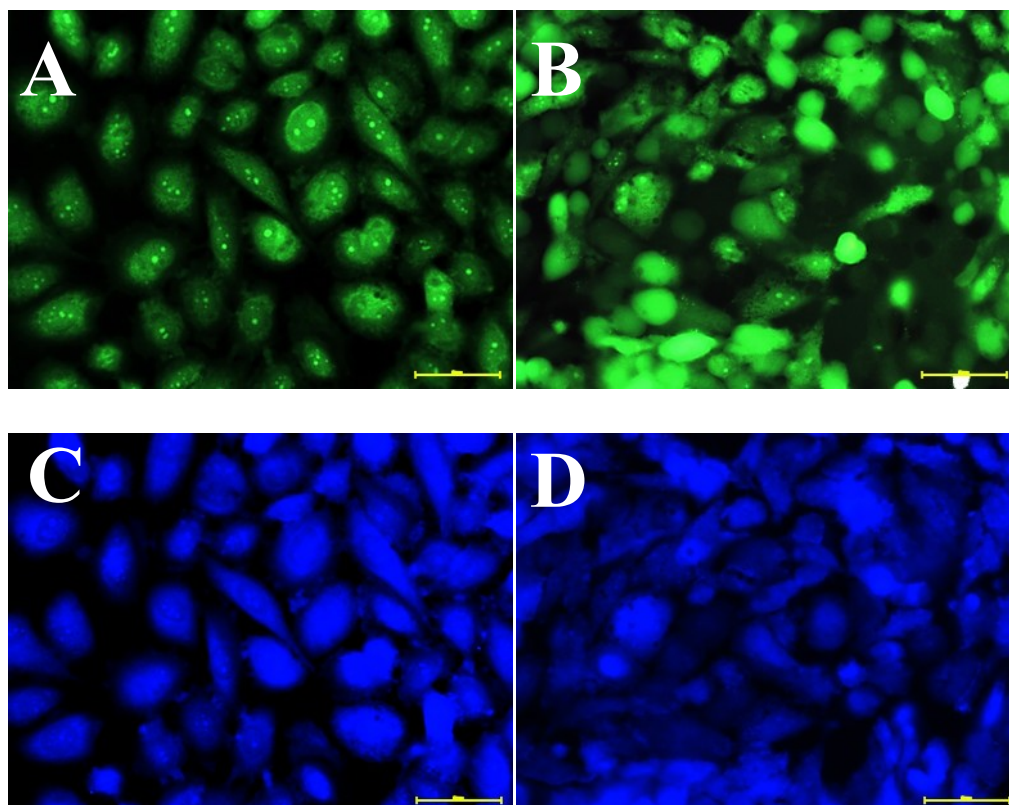
Detekce volných thiolových skupin a volného zinku ( $Zn^{2+}$ ) byla provedena na zinek rezistentní linii PC3 (kultivované v koncentraci zinku odpovídající  $1 \times IC_{50}$ , tj.  $50\mu M Zn^{2+}$ ). Výsledky této detekce byly srovnávány s preparáty linie wt PC3 (bez přidaného zinku).

### **6.5.1 Detekce volných thiolů**

Za intracelulární vazbu iontů kovů jsou zodpovědné sloučeniny bohaté na volné -SH skupiny. Thioly byly detekovány fluorescenčně vazbou sondy 5-BMF (viz kap. 5.1.9). Semikvantitativně byla hodnocena míra pozitivivity fluorescence a buněčná lokalizace. Bylo detekováno výrazné zvýšení fluorescence u buněčné linie zinek rezistentní ve srovnání s linií wt (viz obrázek 8, snímek A a B). Pozitivita je pozorovatelná zejména v jádru a také kolem jádra a v cytoplasmě.

### **6.5.2 Detekce zinku**

Intracelulární volný zinek ( $Zn^{2+}$ ) je detekován specifickou sondou (TSQ, viz 5.1.9). U buněk PC3 je rozdíl mezi wt a zinek rezistentní linií méně viditelný (viz obrázek 8), i když je z ostatních experimentů zřejmé, že tato buněčná linie byla schopna akumulovat zinek. Pozitivita je detekována na obou snímcích (C i D). Zinek je lokalizován difúzně, jak v jádře, tak i v cytoplasmě.



Obrázek 8: Detekce volných thiolů (A+B) a intracelulárního zinku (C+D). Přítomnost fluorescence značí pozitivitu. Srovnání linie wt PC3 (snímky vlevo) a linie zinek rezistentní (vpravo) PC3. (A) detekce volných thiolových skupin, wt (B) detekce volných thiolových skupin, linie zinek rezistentní (C) detekce volného zinku ( $Zn^{2+}$ ), linie wt (D) detekce volného zinku ( $Zn^{2+}$ ), linie zinek rezistentní. Zobrazená úsečka odpovídá 50 $\mu$ m.

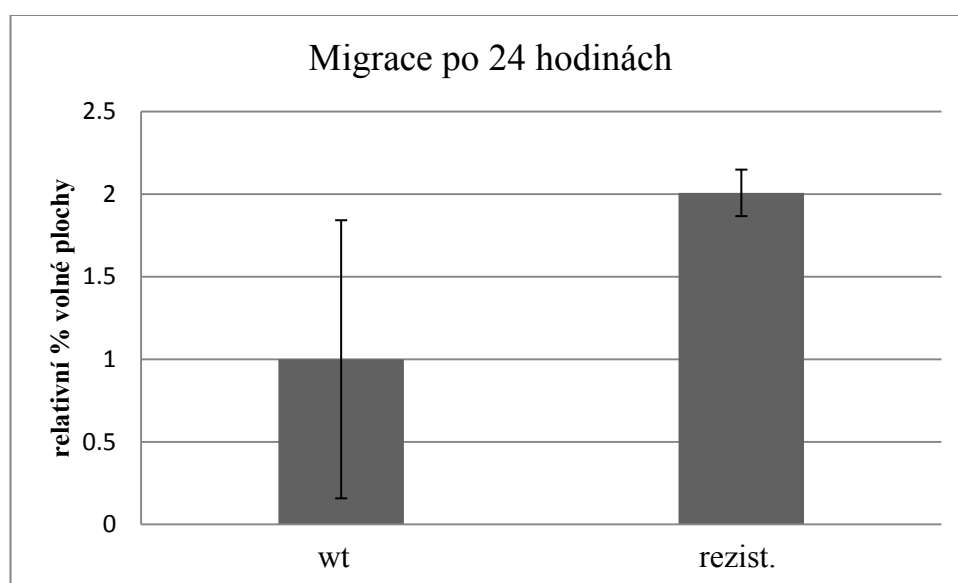
## 6.6 Scratch assay

Schopnost migrace nádorových buněk byla detekována *in vitro* s využitím metody scratch assay. K hodnocení byl použit program TScratch (CSElab) (Geback *et al.*, 2009). Naměřené hodnoty odpovídají procentuálnímu zastoupení volné plochy na snímku. Dle výpočtu (viz kap. 5.1.10) získáme hodnoty po 24 hodinách (v porovnání s časem nula) (viz tab. 11). T-testem byla vyhodnocena statistická významnost. Hladina významnosti, na niž byla statistická analýza provedena, odpovídá  $p=0,05$ .

Tabulka 11: Hodnocení migrační schopnosti nádorových buněk za 24 hodin. Srovnání buněčné linie wt PC3 s linií zinek rezistentní. Hodnocena jsou data získaná z fotografií na začátku experimentu (čas nula) a po 24 hodinách.

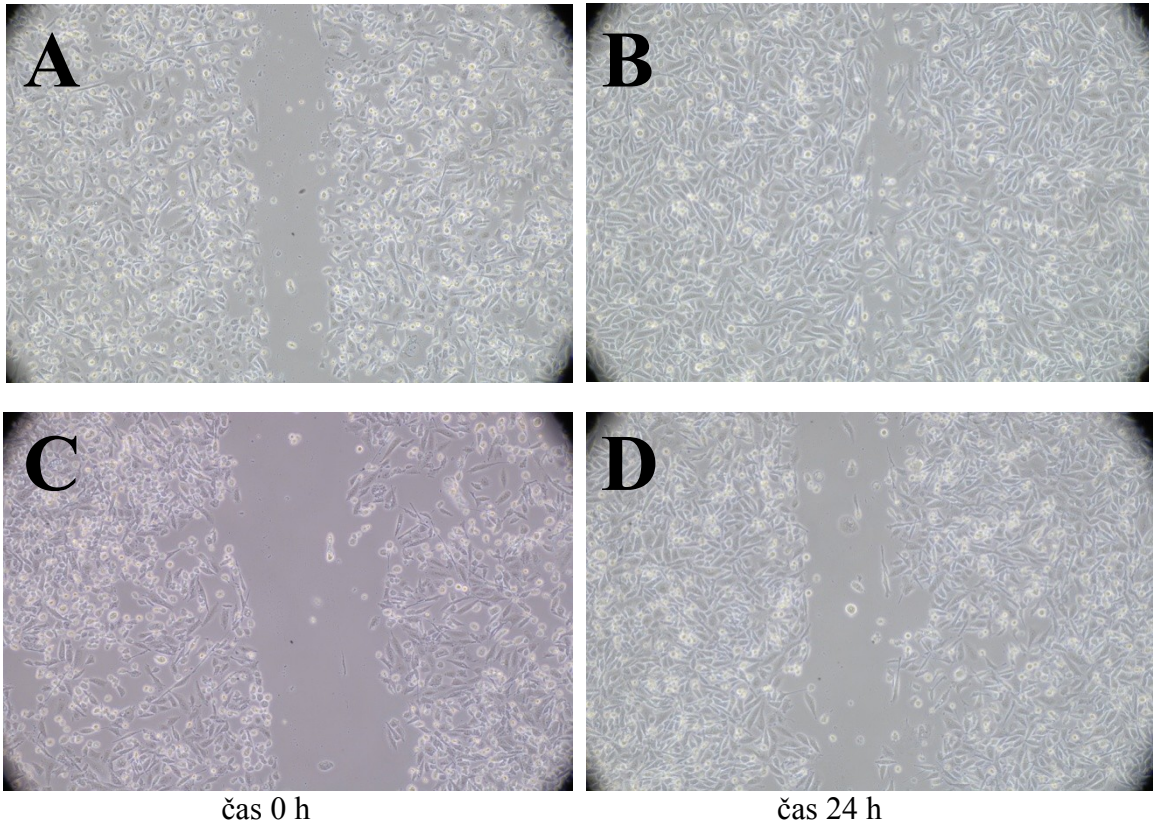
	poměr 24:0	směrodatná odchylka
wild type PC3	0,397789087	0,335
zinek rezistentní PC3	0,798674383	0,056

Výsledná data byla graficky zpracována, pro přehlednost byla přepočítána na kontrolní buněčnou linii (wt PC3). Analýza má za cíl detekovat rozdílnost v migrační schopnosti buněk zinek rezistentní linie. Graf zobrazuje schopnost migrace nádorových buněk za 24 h (viz graf 8). K porovnání byla detekována migrace buněk linie wt PC3 a linie zinek rezistentní PC3. Statisticky se jedná o hraničně významný jev. Z výsledků je zřejmé, že zinek rezistentní buňky migrovaly pomaleji než buňky linie wt.



Graf 8: Migrační schopnosti nádorových buněk. Srovnání zinek rezistentní buněčné linie (rezist.) a wt linie PC3. Hladina významnosti odpovídá  $p=0,0542$ .

Fotografie pro ukázkou dokumentují migrační schopnost nádorových buněk linie wt PC3 a zinek rezistentní buněčné linie při začátku experimentu a po 24 hodinách (viz obrázek 9). Migrace buněk byla dokumentována v časových intervalech 0, 2, 4, 6, 8 a 24 hodin. Demonstrativně jsou zobrazeny vybrané fotografie, které zastupující komplexní hodnocení (tři souběžně zpracované analýzy). Fotografie vlevo zobrazují stav na začátku experimentu (čas nula) těsně po vytvoření rýhy. Fotografie umístěné vpravo ukazují stav po 24 hodinách inkubace. V závislosti na migračních schopnostech mají buňky tendenci vytvořenou rýhu zacelit. Horní dvě fotografie zachycují buněčnou linii wt PC3, spodní dvě pak linii zinek rezistentní.



Obrázek 9: Migrační schopnost nádorových buněk linie PC3 po vytvoření rýhy. Fotografie vlevo (A+C) dokumentují stav na začátku experimentu (čas nula), vpravo (B+D) jsou fotografie ze stejné oblasti po 24 hodinách. (A+B) srovnání migrační schopnosti buněk nádorové linie wt PC3 a (C+D) zinek rezistentní buněčné linie PC3. Zvětšení 100x.

## 7 DISKUSE

Vliv zinečnatých iontů na buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty byly do nynějška studovány při krátkodobém působení (Liang *et al.*, 1999; Hasumi *et al.*, 2003; Banudevi *et al.*, 2010). K detekci dlouhodobého působení zinku na prostatickou buněčnou linii byla vytvořena (pozitivní selekcí buněk rezistentních k zinku) zinek rezistentní buněčné linie. Rezistentní buňky jsou viabilní a mají schopnost se dělit v koncentracích zinku, které přesahují trojnásobek standardní hodnoty IC<sub>50</sub>.

V této práci jsem se zaměřila na analýzu zinek rezistentní buněčná linie odvozené a vyselektované z wt PC3 prostatické buněčné linie (androgen necitlivá buněčná linie metastatického karcinomu prostaty).

### 7.1 Expresní profil

Byl stanoven expresní profil genů souvisejících s metabolismem a transportem zinečnatých iontů. Důležitými transportéry pro import zinku jsou transmembránové přenašeče rodiny Zip (Eide, 2004; Kambe *et al.*, 2004). Transportéry rodiny Zip jsou důležité pro akumulaci zinku v prostatických buňkách (Gaither a Eide, 2001; Kambe *et al.*, 2004). U maligních buněk karcinomu prostaty je expresní hladina tohoto transportéru snížena, což je pravděpodobně příčinou neschopnosti nádorových prostatických buněk akumulovat zinek (Desouki *et al.*, 2007). Z tohoto důvodu jsou transportéry Zip i ostatní transportéry související s maligní transformací široce studovány a diskutovány. Zjistili jsme, že úroveň exprese transportéru *Zip1* nekorelovala se vzrůstající koncentrací zinečnatých iontů. Statisticky významný rozdíl v expresi *Zip1* nebyl pozorován ani při srovnání dlouhodobého a krátkodobého působení zinečnatých iontů na prostatickou buněčnou linii. Je pravděpodobné, že regulace exprese Zip je nezávislá na zinku. U myšího modelu TRAMP (transgenní adenokarcinom prostaty) byly detekovány významné podobnosti s lidským karcinomem prostaty. Jednalo se o srovnání exprese *Zip1*, hladiny zinku a koncentrace citrátu. Studie Costella a kolegů poukazuje na nepřítomnost transportéru *Zip1* u modelu TRAMP. Podobně tak byla snížena koncentrace citrátu a zinečnatých iontů (Costello *et al.*, 2011b). My jsme však expresi *Zip1* u PC3 buněk odvozených od karcinomu prostaty detekovali. Řada studií navrhuje označit zinek jako tumorový supresor a *Zip1*, *Zip2* i *Zip3* jako tumor supresorové geny karcinomu prostaty (Franklin *et al.*, 2005a; Franklin

a Costello, 2007; Desouki *et al.*, 2007). Význam transportérů rodiny Zip je studován ve spojení s celou řadou patologií, včetně malignit.

Intracelulární koncentraci zinečnatých iontů snižují transportéry rodiny ZnT, které jsou zodpovědné jednak za import zinku do buněčných organel a také za export  $Zn^{2+}$  z buňky. Jediný transportér lokalizovaný na plasmatické membráně je transmembránový přenašeč ZnT-1. Proteiny rodiny ZnT jsou transkripčně a posttranslačně regulovány zinkem. Exprese *ZnT-1* i *ZnT-2* je indukována vysokou koncentrací zinku (Langmade *et al.*, 2000). To potvrzují i naše výsledky, které dokládají expresní hladinu *ZnT-1* po krátkodobém i dlouhodobém působení zinečnatých iontů několikanásobně vyšší, než bez ovlivnění zinkem. To odpovídá možné roli ZnT při detoxikaci zinku (Langmade *et al.*, 2000). Jiná studie ukazuje, že zvýšená exprese *ZnT-1* a *ZnT-2* uděluje buňkám BHK (baby hamster kidney) rezistenci k zinku (Liuzzi a Cousins, 2004). Tyto výsledky korespondují s naší studií, neboť, jak je uvedeno, u zinek rezistentních buněk jsme pozorovali významně zvýšenou expresi ZnT-1 se zvyšující se koncentrací zinečnatých iontů v kultivačním médiu.

Hladina metalothioneinu je v buňce ovlivněna metal regulačním transkripčním faktorem (MTF-1). Ten reaguje přímo na koncentraci zinečnatých iontů v buňce a indukuje expresi MT. Předchozí studie dokazují několikanásobně zvýšenou expresi *MT* po kultivaci buněk se zinkem (Masarik *et al.*, 2011; Masarik *et al.*, 2012b; Hlavna *et al.*, 2012). To je v souladu s našimi výsledky, které vykazují vzrůstající expresi *MT* se zvyšující se koncentrací zinečnatých iontů v médiu. Tento trend můžeme pozorovat u obou typů detekovaných metalothioneinů (*MT1A*, *MT2A*). Oba vykazují statisticky významnou korelaci se zvyšující se koncentrací  $Zn^{2+}$  v kultivačním médiu. Také byla detekována jejich koexprese s ZnT-1. To může poukazovat na propojenou roli těchto proteinů při detoxikaci zinku a také na to, že exprese ZnT-1 je řízena, shodně jako exprese metalothioneinů, transkripčním faktorem MTF. Výsledky expresní analýzy jsou v souladu s imunocytochemickou detekcí MT a také s fluorescenční detekcí volných thiolových skupin.

Matrixové metaloproteinasy jsou studované jako možné markery různých patologických stavů včetně nádorových onemocnění (Zitka *et al.*, 2010). Původně byly MMP považovány za zodpovědné jen při nádorové invazi a metastasování. Jiné studie však poukazují na zapojení MMP v několika krocích vývoje rakoviny (Egeblad a Werb,



2002; Uzzo *et al.*, 2006). Důležité je, že matrixové metaloproteinasy mají při nádorové progresi funkci jak podporující, tak supresivní (Egeblad a Werb, 2002; Trudel *et al.*, 2008). Význam matrixových metaloproteinás byl potvrzen také souvislostí s regulací apoptosy, s angiogenezí, s tvorbou metastas a v souvislosti s imunitním dohledem (Egeblad a Werb, 2002; Zitka *et al.*, 2010; van Zijl *et al.*, 2011). Expresní analýzu *MMP-2* nebylo možno komplexně zhodnotit, neboť ani po 40 cyklech PCR nebyl povětšinou detekován produkt reakce. Domníváme se však, že se nejednalo o selhání sondy nebo o falešně negativní výsledek reakce, ale že expresní hladina *MMP-2* je velmi nízká (viz dále). Výsledky exprese *MMP-9* nevykazují žádnou statisticky významnou korelaci s koncentrací zinečnatých iontů. U karcinomů nejsou výlučným producentem MMP jen nádorové buňky. Kupříkladu právě *MMP-2* a *MMP-9* jsou tvořeny převážně stromálními buňkami v nádorovém ložisku. Nádorové buňky mohou *in vivo* stimulovat buňky nádorového stromatu parakrinně (prostřednictvím interleukinů, interferonů a růstových faktorů) k syntéze MMP. Toho ale nemůže být v monokultuře nádorových buněk dosaženo. Z nevýrazné exprese vybraných MMP můžeme tedy usuzovat, že samotné nádorové buňky matrixové metaloproteinasy (konkrétně *MMP-2* a *MMP-9*) produkují minimálně, což potvrdily i studie Egeblada a Zitky (Egeblad a Werb, 2002; Zitka *et al.*, 2010).

Zvýšená tvorba TIMP inhibuje růst různých typů nádorových buněk. Naopak snížená koncentrace TIMP v průběhu remodelace poškozené tkáně zvyšuje kolagenasovou aktivitu a umožňuje nádorovým buňkám narušit extracelulární okolí a migrovat tak do okolních tkání (Ponton *et al.*, 1991; Zitka *et al.*, 2010). TIMP-1 inhibuje (až na *MMP-14*) všechny typy matrixových metaloproteinás, TIMP-2 inhibuje všechny typy MMP. Expresní analýza neodhalila žádnou korelaci mezi koncentrací zinku a expresí TIMP. Oba typy studovaných TIMP však vykazují pozitivní koexpresi s zinkovým transportérem Zip1.

## 7.2 Buněčná viabilita

Testem MTT byla detekována buněčná viabilita po 24 h působení  $Zn^{2+}$  a protinádorového léčiva cisplatinu. Hodnota  $IC_{50}$  pro zinek byla 1,4 násobně vyšší, ve srovnání s wt PC3 buněčnou linií. Pro cisplatinu byla hodnota  $IC_{50}$  zvýšena 1,6 krát ve srovnání s wt PC3. Tyto výsledky potvrzují, že zinek rezistentní linie byla podstatně méně citlivá na léčbu cisplatinou. To je v souladu se studií, která udává, že zvýšené množství zinku zvyšuje odolnost vůči vlivu jiných toxinů (Truong-Tran *et al.*,

2000). Tyto výsledky jsou naopak v rozporu s hypotézami, které se domnívají, že navrácení zvýšeného množství zinečnatých iontů do nádorových buněk bude mít pozitivní vliv na léčbu (Costello *et al.*, 2004). Výsledky také nejsou v souladu s hypotézou, že obnovení vysokých hladin zinku v buňkách karcinomu povede k obnovení metabolismu typického pro zdravou prostatu, čehož by mohlo být využito k zástavě progresu, nebo k přerušení průběhu karcinomu (Gumulec *et al.*, 2011b).

### 7.3 Imunocytochemická detekce

Vybrané proteiny byly v buněčných kulturách detekovány imunocytochemicky. Hodnoceny byly preparáty buněčných linií zinek rezistentních ve srovnání s linií wt PC3. Tato metoda hodnotí lokalizaci a semikvantitativně míru pozitivního zbarvení daného proteinu.

Zip 1 byl lokalizován nejen na buněčné membráně, ale i intracelulárně. Což je v souladu se studií Milona *et al.*, kteří detekovali nativní hZip1 protein u PC3 buněk i na intracelulárních vezikulech (Milon *et al.*, 2001). V prostatické tkáni je transportér Zip1 lokalizován na bazolaterální straně membrán buněk normálního žlázoového epitelu, což odpovídá funkci těchto transportérů pro import zinku z intersticiální tekutiny (potažmo séra) (Desouki *et al.*, 2007).

Imunocytochemická detekce transportéru ZnT vykazuje mírně vyšší pozitivitu zbarvení u zinek rezistentní buněčné linie. To potvrzuje expresní analýzu, která detekovala zvýšení tohoto transportéru u buněčné linie dlouhodobě ovlivněné zinkem.

Metal regulační transkripční faktor byl ve zvýšené míře detekován u preparátů zinek rezistentních buněk, což odpovídá jeho funkci v homeostase zinečnatých iontů (Gumulec *et al.*, 2011b; Gunther *et al.*, 2012). Byl detekován jak v jádře, tak cytoplasmě. To je v souladu s faktem, že je MTF lokalizován v cytoplasmě a až po aktivaci zinkem (či jinak, kupříkladu oxidačním stresem) je transportován do jádra (Gunther *et al.*, 2012).

Imunocytochemická detekce metalothioneinu jasně potvrzuje expresní analýzu. Bylo detekováno výrazné zvýšení míry positivity reakce v preparátech zinek rezistentních buněk ve srovnání s wt buňkami. To je v souladu s tvrzením, že zvýšená koncentrace zinku výrazně indukuje expresi MT (Vasak a Hasler, 2000).

## 7.4 Detekce volných thiolů a zinku

Fluorescenční detekcí bylo potvrzeno, že zinek rezistentní buněčné linie jsou ovlivněny vysokou koncentrací zinku. Buněčné linie byly schopny akumulovat zinečnaté ionty, což je v souladu se studií Costella a kolegů (Costello *et al.*, 2004)

Volné -SH skupiny proteinů jsou zodpovědné za intracelulární vazbu iontů kovů. Na snímcích lze pozorovat výrazné zvýšení volných - SH skupin u buněčné linie rezistentní na zinek. To s největší pravděpodobností odpovídá vazebným místům ve struktuře metalothioneinu.

## 7.5 Migrace buněk *in vitro*

Migrační schopnost nádorových buněk *in vitro* byla detekována scratch testem. Zinek rezistentní buňky migrovaly pomaleji, než buňky linie wt. Ishii s kolegy rovněž ukázali, že invazivita prostatických nádorových buněk (LNCaP) do matrigelu je silně potlačena v přítomnosti  $Zn^{2+}$  (Ishii *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2004). Výsledek lze považovat za statisticky hraničně významný.

PC3 buněčná linie je odvozená od agresivního karcinomu prostaty (z metastas z kostí), lze tedy předpokládat, že jejich migrační potenciál je větší ve srovnání s buněčnými liniemi odvozenými od primárního karcinomu.

Je však potřeba dalších studií, které ověří migrační potenciál nádorových prostatických buněk odvozených od primárního tumoru ve srovnání s nenádorovou prostatickou buněčnou linií.

## 7.6. Srovnání analýzy zinek rezistentní buněčné linie PC3 s linií wt PC3

Cílem práce bylo detekovat odlišnosti u wt linie PC3 krátkodobě ošetřené zinečnatými ionty (24 h) ve srovnání s linií zinek rezistentní (dlouhodobě kultivované s  $Zn^{2+}$ ). Analýza exprese vybraných genů ukazuje, že získaná rezistence buněk k zinku nemá statisticky signifikantní vliv na expresní profil studovaných genů ( $p=0,609$ ). S využitím ANOVA testu bylo však určeno, že vliv na expresní profil detekovaných genů má koncentrace zinečnatých iontů v kultivačním médiu ( $p=0,024$ ). Za krátkodobé přizpůsobení se buněk vysokým koncentracím zinečnatých iontů je pravděpodobně odpovědný zinkový transportér ZnT-1 a metalothioneiny. Ačkoli se nám nepodařilo potvrdit statisticky významný vliv sledovaných genů na vznik dlouhodobé rezistence, z výsledků testů cytotoxicity vyplývá, že buňky zinek rezistentní jsou na léčbu zinkem

i cisplatinou citlivé méně. Získaná rezistence je tedy spojena s odolnějším fenotypem. Nicméně test migrace nádorových buněk *in vitro* detekoval pomalejší pohyblivost buněk rezistentních na zinek, z čehož můžeme usuzovat, že PC3 buňky vystavené dlouhodobému působení zinečnaných iontů mají nižší schopnost migrace do okolních tkání.

## 8 ZÁVĚR

V teoretické části této práce jsem se zaměřila na sumarizaci poznatků o patofyziologii předstojné žlázy. Dále pojednávám o změnách, které souvisejí s karcinomem prostaty v kontextu zinečnatých iontů, jejich metabolismu a transportu.

Prakticky jsem se zaměřila na vytvoření zinek rezistentní nádorové buněčné linie PC3 (k detekci dlouhodobého působení zinečnatých iontů na nádorovou buněčnou linii). Zinek rezistentní buněčné linie byly trvale žitochopné v koncentracích zinku až trojnásobně vyšší než  $IC_{50}$  pro původní wt linii ( $50\mu\text{M Zn}^{2+}$ ). Dále jsem se zabývala analýzami zinek rezistentních buněčných linií PC3 ve srovnání s linií wt PC3.

Porovnála jsem expresní profil genů *ZnT-1* (transportér zodpovědný za export zinečnatých iontů), *Zip1* (zodovědný za import  $\text{Zn}^{2+}$ ), *MT* (metalothionein), *MMP-2* a *MMP-9* (matrixové metaloproteinasy) a jejich tkáňových inhibitorů *TIMP-1* a *TIMP-2* po krátkodobém (24 h) působení  $\text{Zn}^{2+}$  (koncentrace 1, 2, a 3 násobek hodnoty  $IC_{50}$ ) ve srovnání se zinek rezistentními buněčnými liniemi. Cílem bylo detekovat změny související se vznikem zinkové rezistence. Výsledky expresní analýzy vykazují pozitivní statistickou korelaci metalothioneinů (MT1A a MT2A) a zinkového transportéru ZnT-1 s koncentrací zinečnatých iontů. Pokud však posuzujeme efekt samotné rezistence, nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v expresi studovaných genů.

Další výsledky ukazují, že získaná zinková rezistence je spojena s odolnějším fenotypem, který se vyznačuje sníženou citlivostí na cytostatikum cisplatinu a na  $\text{Zn}^{2+}$ . Migrační schopnost buněk rezistentních na zinek byla však detekována jako nižší. Byla optimalizována metoda imunocytochemie a u vybraných proteinů byla detekována jejich přítomnost a lokalizace. Fluorescenční mikroskopií bylo potvrzeno, že zinek rezistentní buňky jsou schopny zinek akumulovat.

Tyto výsledky poukazují na řadu zajímavých odlišností v kontextu krátkodobého i dlouhodobého působení zinečnatých iontů na karcinom prostaty, kterých může být využito při dalším bádání, nebo při experimentech na zvířecích modelech. I přes některé studie, které dokumentují pozitivní vliv zinečnatých iontů při prevenci nebo léčbě karcinomu prostaty, zůstává možnost využití dlouhodobé suplementace zinkem při nádorovém onemocnění prostaty prozatím problematická. Je tedy zapotřebí dalšího bádání, které objasní molekulární mechanismy při léčbě zinkem.

## 9 LITERATURA

- Anandapte B., Bao L., Smith R., Iwata K., Olsen B. R., Zetter B., Apte S. S. (1996): A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, **74**, 853-862.
- Apte S. S., Hayashi K., Seldin M. F., Mattei M. G., Hayashi M., Olsen B. R. (1994): Gene encoding a novel murine tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), TIMP-3, is expressed in developing mouse epithelia, cartilage, and muscle, and is located on mouse chromosome-10. *Developmental Dynamics*, **200**, 177-197.
- Axmanová M. (2012): *Stanovení vybraných matrix metaloproteináz v prostatických nádorových liniích a v sérech pacientů s karcinomem prostaty*, Bakalářská práce, LF MU, Brno.
- Banudevi S., Senthilkumar K., Sharmila G., Arunkumar R., Viayababu M. R., Arunakaran J. (2010): Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells. *Clinica Chimica Acta*, **411**, 172-178.
- Cao J., Bobo J. A., Liuzzi J. P., Cousins R. J. (2001): Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **70**, 559-566.
- Costello L. C., Feng P., Milon B., Tan M., Franklin R. B. (2004): Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, **7**, 111-117.
- Costello L. C., Fenselau C. C., Franklin R. B. (2011a): Evidence for operation of the direct zinc ligand exchange mechanism for trafficking, transport, and reactivity of zinc in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 589-599.
- Costello L. C., Franklin R. B. (2011): Zinc is decreased in prostate cancer: an established relationship of prostate cancer! *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **16**, 3-8.
- Costello L. C., Franklin R. B. (2012): Cytotoxic/tumor suppressor role of zinc for the treatment of cancer: an enigma and an opportunity. *Expert Review of Anticancer Therapy*, **12**, 121-128.
- Costello L. C., Franklin R. B., Zou J., Feng P., Bok R., Swanson M. G., Kurhanewicz J. (2011b): Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. *Cancer Biology & Therapy*, **12**, 1078-1084.
- Čihák R. (2002): *Anatomie 2*. Grada, Praha, 673 stran.
- Čoupek P., Čápek I., Kocák I. (2002): Karcinom prostaty. In: *Speciální onkologie* (Z. Adam, J. Vorlíček eds.), Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno, 150-166.
- Desouki M. M., Geradts J., Milon B., Franklin R. B., Costello L. C. (2007): hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. *Molecular Cancer*, **6**, 37-44.
- Devergnas S., Chimienti F., Naud N., Pennequin A., Coquerel Y., Chantegrel J., Favier A., Seve M. (2004): Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT-1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels: a real-time RT-PCR study. *Biochemical Pharmacology*, **68**, 699-709.
- Dušek P. (2010): *Farmakologická léčba karcinomu prostaty*. Maxford, Praha, 156 stran.
- Dvořák K., Dvořáková Z., Feit J., Lukáš Z., Šmardová J. (2008): *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. LF MU, Brno, 119 stran.
- Egeblad M., Werb Z. (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-74.
- Eide D. J. (2004): The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, **447**, 796-800.
- Franklin R. B., Costello L. C. (2007): Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **463**, 211-217.
- Franklin R. B., Feng P., Milon B., Desouki M. M., Singh K. K., Kajdacsy-Balla A., Bagasra O., Costello L. C. (2005a): hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer. *Molecular Cancer*, **4**, 432-445.

- Franklin R. B., Milon B., Feng P., Costello L. C. (2005b): Zinc and zinc transporters in normal prostate function and the pathogenesis of prostate cancer. *Frontiers in Bioscience*, **10**, 2230-2239.
- Gaither L. A., Eide D. J. (2001): The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 22258-22264.
- Gaither L. A., Eide D. J. (2000): Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 5560-5564.
- Geback T., Schulz M. M. P., Koumoutsakos P., Detmar M. (2009): TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques*, **46**, 265-278.
- Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R. (2011a): Insight to Physiology and Pathology of Zinc(II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Current Medicinal Chemistry*, **18**, 5041-5051.
- Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Babula P., Hrabec R., Rovny A., Masarikova M., Kizek R. (2011b): Molecular mechanisms of zinc in prostate cancer. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*, **24**, 249-55.
- Gunther V., Lindert U., Schaffner W. (2012): The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1823**, 1416-1425.
- Hasumi M., Suzuki K., Matsui H., Koike H., Ito K., Yamanaka H. (2003): Regulation of metallothionein and zinc transporter expression in human prostate cancer cells and tissues. *Cancer Letters*, **200**, 187-195.
- Hlavna M., Raudenska M., Hudcova K., Gumulec J., Sztalmachova M., Tanhauserova V., Babula P., Adam V., Eckschlager T., Kizek R., Masarik M. (2012): MicroRNAs and zinc metabolism-related gene expression in prostate cancer cell lines treated with zinc(II) ions. *Int J Oncol*, **41**, 2237-44.
- Hogstrand C., Kille P., Nicholson R. I., Taylor K. M. (2009): Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends in Molecular Medicine*, **15**, 101-111.
- Horký D., Čech S. (2003): *Mikroskopická anatomie*. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno, 139 stran.
- Ibs K. H., Rink L. (2003): Zinc-altered immune function. *Journal of Nutrition*, **133**, 1452-1456.
- Iguchi K., Usui S., Inoue T., Sugimura Y., Tatematsu M., Hirano K. (2002): High-level expression of zinc transporter-2 in the rat lateral and dorsal prostate. *Journal of Andrology*, **23**, 819-824.
- Ishii K., Otsuka T., Iguchi K., Usui S., Yamamoto H., Sugimura Y., Yoshikawa K., Hayward S. W., Hirano K. (2004): Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn<sup>2+</sup> axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer Letters*, **207**, 79-87.
- Ishii K., Usui S., Sugimura Y., Yoshida S., Hioki T., Tatematsu M., Yamamoto H., Hirano K. (2001): Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *International Journal of Cancer*, **92**, 49-54.
- Johnson L. A., Kanak M. A., Kajdacsy-Balla A., Pestaner J. P., Bagasra O. (2010): Differential zinc accumulation and expression of human zinc transporter 1 (hZIP1) in prostate glands. *Methods*, **52**, 316-321.
- Kambe T., Yamaguchi-Iwai Y., Sasaki R., Nagao M. (2004): Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 49-68.
- Knoepp Stewart M., Hookim Kim, Placido Jeremiah, Fields Kristina L., Roh Michael H. (2013): The application of immunocytochemistry to cytologic direct smears of metastatic merkel cell carcinoma. *Diagnostic Cytopathology*, **41**, 729-733.
- Langmade S. J., Ravindra R., Daniels P. J., Andrews G. K. (2000): The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 34803-34809.
- Leitzmann M. F., Stampfer M. J., Wu K. N., Colditz G. A., Willett W. C., Giovannucci E. L. (2003): Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**, 1004-1007.

- Liang J. Y., Liu Y. Y., Zou J., Franklin R. B., Costello L. C., Feng P. (1999): Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. *Prostate*, **40**, 200-207.
- Liuzzi J. P., Cousins R. J. (2004): Mammalian zinc transporters. *Annual Review of Nutrition*, **24**, 151-172.
- Mačák J., Mačáková J. (2004): *Patologie*. Grada, Praha, 347 stran.
- Manning D. L., McClelland R. A., Knowlden J. M., Bryant S., Gee J. M. W., Green C. D., Robertson J. F., Blamey R. W., Sutherland R. L., Ormandy C. J., Nicholson R. I. (1995): Differential expression of estrogen-regulated genes in breast-cancer. *Acta Oncologica*, **34**, 641-646.
- Manning D. L., Robertson J. F. R., Ellis I. O., Elston C. W., McClelland R. A., Gee J. M. W., Jones R. J., Green C. D., Cannon P., Blamey R. W., Nicholson R. I. (1994): Estrogen-regulated genes in breast-cancer - association of pliv1 with lymph-node involvement. *European Journal of Cancer*, **30A**, 675-678.
- Mareš P. (2003): Karcinom prostaty. In: *Klinická onkologie*. (L. Petruželka, B. Konopásek eds.), Karolinum, Praha, 164-169.
- Martínek J., Vacek Z. (2009): *Histologický atlas*. Grada, Praha, 134 stran.
- 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**, 45-45.
- Masarik M., Gumulec J., Hlavna M., Sztalmachova M., Babula P., Raudenska M., Pavkova-Goldbergova M., Cernei N., Sochor J., Zitka O., Ruttkay-Nedecky B., Krizkova S., Adam V., Kizek R. (2012a): Monitoring of the prostate tumour cells redox state and real-time proliferation by novel biophysical techniques and fluorescent staining. *Integrative Biology*, **4**, 672-684.
- Masarik M., Gumulec J., Hlavna M., Sztalmachova M., Sochor J., Zitka O., Krizkova S., Cernei N., Ruttkay-Nedecky B., Babula P., Adam V., Kizek R. (2012b): Analysis of metallothionein and glutathione in prostate cells as markers of oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine*, **30**, 46-46.
- Milon B., Dhemy D., Pountney D., Bourgeois M., Beaumont C. (2001): Differential subcellular localization of hZip1 in adherent and non-adherent cells. *Febs Letters*, **507**, 241-246.
- Milon B., Wu Q., Zou J., Costello L. C., Franklin R. B. (2006): Histidine residues in the region between transmembrane domains III and IV of hZip1 are required for zinc transport across the plasma membrane in PC-3 cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1758**, 1696-1701.
- Morgan K., McCance K.L. (2010): Disorders of the Prostate Gland. In: *Pathophysiology The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*. (K.L. McCance, S.E. Huether eds.), Elsevier Mosby, Missouri, 813-823.
- Murakami M., Hirano T. (2008): Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Science*, **99**, 1515-1522.
- Petrovický P. (2002): *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi*. Osveta, Martin, 560 stran.
- Ponton A., Coulombe B., Skup D. (1991): Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor-cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Research*, **51**, 2138-2143.
- Rishi I., Baidouri H., Abbasi J. A., Bullard-Dillard R., Kajdacsy-Balla A., Pestaner J. P., Skacel M., Tubbs R., Bagasra O. (2003): Prostate cancer in African American men is associated with downregulation of zinc transporters. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, **11**, 253-260.
- Sobin L. H., Wittekind Ch. (1997): *TNM classification of malignant tumours*. 5rd ed., John Wiley & Sons, New York, 227 stran.
- Sztalmachova M. (2013): *Význam metalothioneinu v maligním potenciálu nádorových buněk*, Diplomová práce, Mendlova univerzita, Brno.
- Sztalmachova M., Hlavna M., Gumulec J., Holubova M., Babula P., Balvan J., Sochor J., Tanhauserova V., Raudenska M., Krizkova S., Adam V., Eckschlager 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. *Oncol Rep*, **28**, 806-14.



- Taylor K. M., Morgan H. E., Johnson A., Hadley L. J., Nicholson R. I. (2003): Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochemical Journal*, **375**, 51-59.
- Taylor K. M., Morgan H. E., Smart K., Zahari N. M., Pumford S., Ellis I. O., Robertson J. F. R., Nicholson R. I. (2007): The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Molecular Medicine*, **13**, 396-406.
- Trudel D., Fradet Y., Meyer F., Harel F., Tetu B. (2008): Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. *Human Pathology*, **39**, 731-739.
- Truong-Tran A. Q., Ho L. H., Chai F., Zalewski P. D. (2000): Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *Journal of Nutrition*, **130**, 1459S-1466S.
- Tummalapalli C. M., Heath B. J., Tyagi S. C. (2001): Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, **80**, 512-521.
- Uzzo R. G., Crispen P. L., Golovine K., Makhov P., Horwitz E. M., Kolenko V. M. (2006): Diverse effects of zinc on NF-kappa B and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. *Carcinogenesis*, **27**, 1980-1990.
- Vallee B. L., Falchuk K. H. (1993): The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, **73**, 79-118.
- Van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W. (2011): Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*, **728**, 23-34.
- Vasak M., Hasler D. W. (2000): Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4**, 177-183.
- Wang Y., Wimmer U., Lichtlen P., Inderbitzin D., Stieger B., Meier P. J., Hunziker L., Stallmach T., Forrer R., Rulicke T., Georgiev O., Schaffner W. (2004): Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. *Faseb Journal*, **18**, 1071-1079.
- Ye B., Maret W., Vallee B. L. (2001): Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 2317-2322.
- Zitka O., Kukacka J., Krizkova S., Huska D., Adam V., Masarik M., Prusa R., Kizek R. (2010): Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, **17**, 3751-3768.

Internetové zdroje:

Incidence a mortalita, karcinom prostaty: <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#> (24.3.2014).

Lukeš M. (2005): *Karcinom prostaty*, Urologická klinika, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, <http://www.urologieprostudenty.cz/uploads/pdf/karcinom-prostaty.pdf> (13.1.2014).

McNealovo schéma zonální anatomie prostaty: <http://www.prolekare.cz/ceska-urologie-clanek/je-nutna-biopsie-tranzicionalni-zony-pri-rebiopsii-prostaty-47070> (10.3.2014).

Novel prostate cancer tumour markers in a cell line model, [http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/articles/30\\_sztalmachova\\_437.pdf](http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/articles/30_sztalmachova_437.pdf) (24.3. 2014).

Proteinová struktura metallothioneinu: [http://www.protein.pl/?name=molecular\\_mechanisms\\_of\\_zinc\\_homeostasis](http://www.protein.pl/?name=molecular_mechanisms_of_zinc_homeostasis) (12.3.2014).

Souhrn údajů o přípravku, Finasterid Orion 5 mg potahované tablety: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0118762&tab=texts> (12.3. 2014).

Vector Laboratories (2005): *A Guide to Multiple Antigen Labeling*: [www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com)  
(12.3.2014).

Vector Laboratories (2014): *R.T.U. VECTASTAIN, Universal Elite, ABC Kit*:  
[www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com) (12.3.2014).

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFS: fibromuskulární stroma

ATB: antibiotika

BHP: benigní hyperplazie prostaty, nezhoubné zvětšení prostaty

CA1: *cornu ammonis I*, malá oblast vlastního *hyppocampu*

CaP: karcinom prostaty

CDF: cation diffusion facilitator

CisPt: cisplatina

CT: computed tomography, počítačová tomografie

CZ: centrální zóna

DAB: 3, 3'-diaminobenzidin

DK: dolní končetina

DMSO: dimethylsulfoxid

DRE: digital rectal examination, palpační vyšetření konečníkem

ECM: extracelulární matrix

EDTA: ethylendiamintetraoctová kyselina

EGF: epidermal growt factor, epidermální růstový faktor

EJD: *ductus ejaculatorii*

ER: endoplasmatické retikulum

GA: Golgiho aparát

GS: Gleasonovo skóre

HGF: hepatocyte growt factor, jaterní růstový faktor

HRP: horseradish peroxidase, křenová peroxidasa

ICC: imunocytochemie

IL: interleukin

ISF: interstitial fluid, intersticiální tekutina

KC: Krebsův cyklus

K<sub>m</sub>: Michaelisova konstanta

MAPK: mitogen-aktivované proteinové kinasy

MHC: major histokompatibilitý komplex, hlavní histokompatibilní komplex

MMP: matrixové metaloproteinasy

MRE: metal response element

MT: metalothionein

MTC: mitochondrie

MTF: metal-responsive element-binding transcription factor, metal regulační transkripční faktor

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid

NHS: normal horse serum, normální koňské sérum

NMR: nukleární magnetická rezonance

NVB: neurovaskulární svazek

PIN: prostatická intraepiteliální neoplasie

PSA: prostatický specifický antigen

PSB: phosphate buffered saline, fosfátový pufr

PTP: protein tyrozin fosfatasy

PZ: periferní zóna

SLC: solute-linked carrier

SNP: single nucleotide polymorfism, jednonukleotidový polymorfismus

SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv

TIMP: tkáňové inhibitory matrixových metaloproteinás

TM: transmembránový

TNF: tumor nekrosis factor, faktor nekrotizující tumory

TNM klasifikace: (tumor nodus metastasis), staging nádorového onemocnění

TRAMP: transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate

TRUS: transrektální ultrasonografie

TSQ: N (6-metoxy-8-quinolyl)-p-toluen sulfonamid

TZ: tranzicionální zóna

U: uretra

wt: wild type, divoký typ

ZEN: zinc-enriched neurons, neurony bohaté na zinek

## **11 PŘÍLOHY**

### **11.1 Seznam příloh**

Příloha 1: McNealovo schéma zonální anatomie prostaty

Příloha 2: Benigní hyperplazie prostaty

Příloha 3: Incidence a mortalita, karcinom prostaty, ČR

Příloha 4: TNM klasifikace nádorových onemocnění

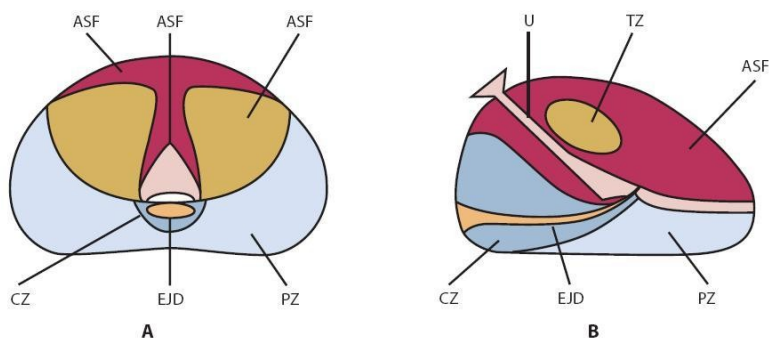
Příloha 5: Histopatologický stupeň diferenciací karcinomů, Gleason score

Příloha 6: Struktura transmembránového přenašeče Zip

Příloha 7: Klasifikace matrixových metaloproteinů

Příloha 8: Aktivní účast na odborných akcích, publikace

## Příloha 1: McNealovo schéma zonální anatomie prostaty

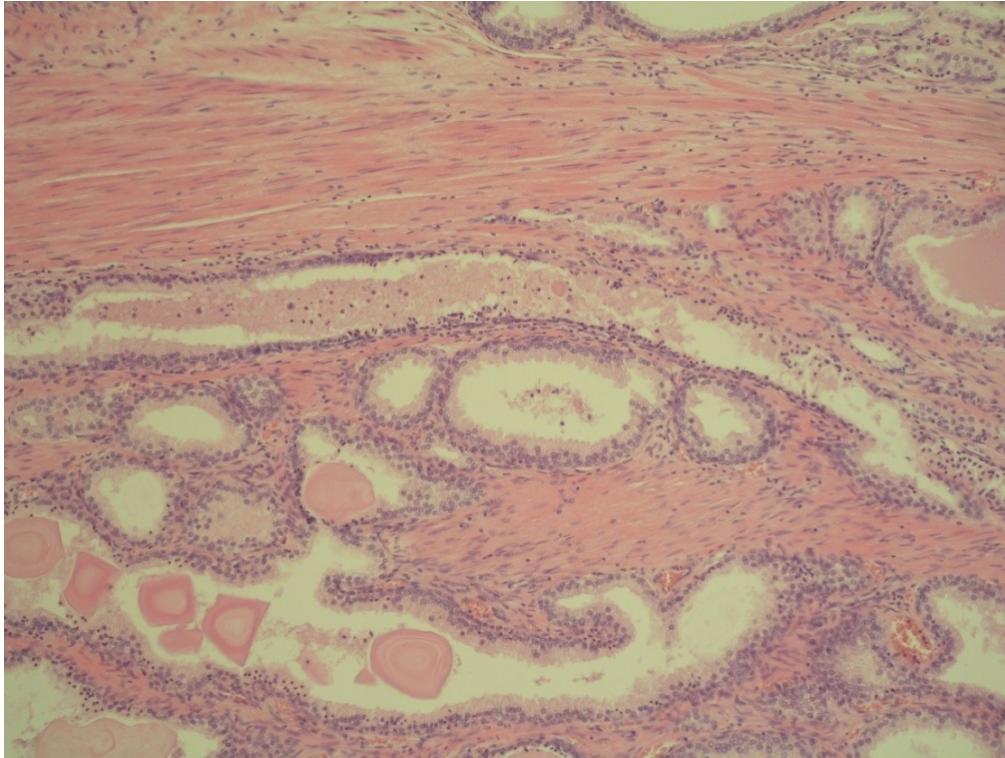


McNealovo schéma zonální anatomie prostaty. (A) sagitální řez (B) transverzální řez. AFS- fibromuskulární stroma, CZ- centrální zóna, EJD- ductus ejaculatorii, NVB- neurovaskulární svazek, PZ- periferní zóna, TZ- tranzicionální zóna, U- uretra. Dle (<http://www.prolekare.cz/ceska-urologie-clanek/je-nutna-biopsie-tranzicionalni-zony-pri-rebiopsii-prostaty-47070>, 10.3.2014).

Velkou oblast prostatické žlázy zaujímá periferní zóna (asi 70 %), centrální zóna zaujímá asi 25 % a zóna přechodná asi 5 % (Costello a Franklin, 2011). Rozdělení prostatické žlázy podle McNealova schématu je důležité v souvislosti patologiemi prostaty. BHP je často lokalizována v oblasti centrální zóny. Z tohoto důvodu dochází často ke stenose uterty a z toho plynoucí problémy s mikcí. Karcinom prostaty bývá převážně lokalizován v periferní zóně. Proto se v počátečních fázích nevyskytují klinické problémy spojené s močením (Mareš, 2003; Dušek, 2010). Periferní zóna je velmi zajímavá v souvislosti s molekulárním metabolismem, neboť buňky v této oblasti disponují schopností akumulovat zinek a produkovat vysoké koncentrace citrátu (Costello *et al.*, 2004).

## Příloha 2: Benigní hyperplasie prostaty

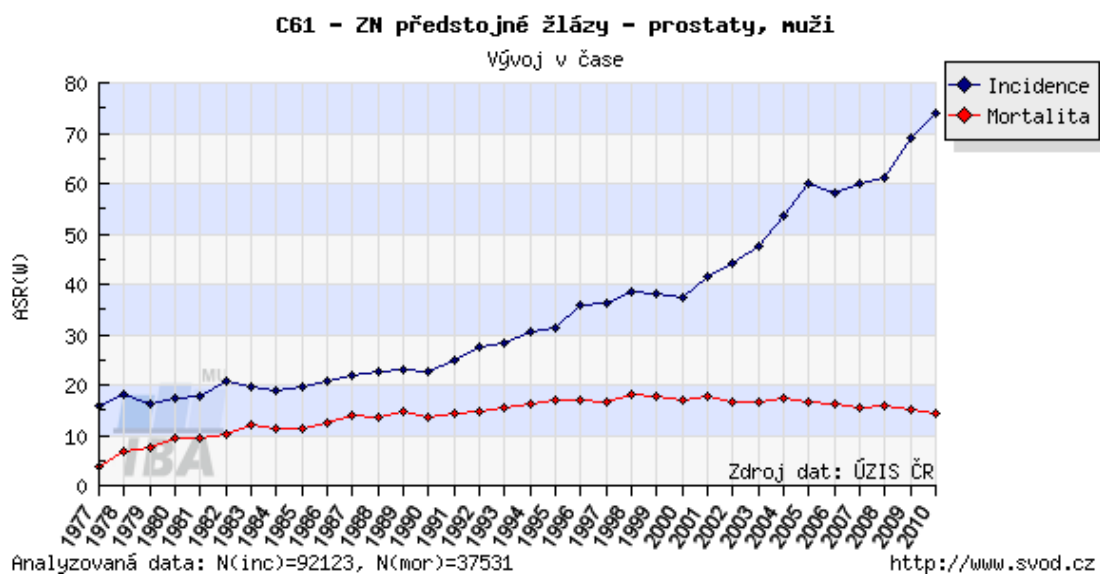
Fotografie uvedené v této části práce vznikly díky ochotě MUDr. Jiřího Lenze z patologicko-anatomického ústavu Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Všechny histologické preparáty byly standardně zpracovány a barveny přehlednou metodou hematoxylin-eozin. Zvětšení 40x.



Fotografie zachycuje benigní hyperplasii prostaty. Žlázy jsou vystlány dvouřadým epitelem s vnitřními cylindrickými a zevními oploštělými buňkami. Uvnitř žlázek jsou přítomna hojná depozita kondenzovaného sekretu (tzv. *Corpora amylacea*). Snímek také zachycuje hyperplastickou fibromuskulární stromální komponentu.



### Příloha 3: Incidence a mortalita, karcinom prostaty, ČR



Incidence a mortalita v České republice na karcinom prostaty, rok 2010. Dle ([www. svod.cz](http://www.svod.cz), 24.3.2014).

#### **Příloha 4: TNM klasifikace nádorových onemocnění**

Pro klasifikaci nádorů se používá několik kritérií: anatomická lokalizace karcinomu, klinický a patologicko-anatomický rozsah, symptomy, histologický typ nádoru, stupeň diferenciaci, pohlaví a věk pacienta, atd. (Sobin a Wittekind, 1997; Lukeš, 2005).

Pro zařazení karcinomu dle systému TNM je důležitý anatomický rozsah nemoci. Systém hodnocení je založen na hodnocení tří složek anatomického rozsahu:

- T (tumor): rozsah primárního nádoru (T1-T4).
- N (nodus): nepřítomnost či přítomnost a rozsah metastas v regionálních lymfatických uzlinách (N0-N3).
- M (metastasis): přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastas (M0-M1) (Sobin a Wittekind, 1997).

TNM klasifikaci karcinomu prostaty shrnuje tabulka v této příloze.

TNM klasifikace karcinomu prostaty. Dle (Lukeš, 2005).

T Primární tumor		
TX	Primární tumor nelze hodnotit	
T0	Žádný důkaz primárního tumoru	
T1	Klinicky němý, nehmatný nebo pomocí vyšetření nezobrazitelný tumor	
	T1a	Histologický nález tumoru v < 5 % resekované tkáně
	T1b	Histologický nález tumoru v > 5 % resekované tkáně
	T1c	Tumor zjištěný jehlovou biopsií (při zvýšeném PSA)
T2	Tumor ohraničený na prostatu	
	T2a	Tumor postihující polovinu jednoho laloku nebo méně
	T2b	Tumor postihující více než polovinu jednoho laloku, ale ne oba laloky
	T2c	Tumor postihující oba laloky
T3	Tumor přesahující pouzdro prostaty	
	T3a	Extrakapsulární šíření (jednostranné nebo oboustranné)
	T3b	Tumor prorůstá do jednoho nebo obou semenných váčků
T4	Tumor je fixovaný nebo prorůstá do okolních struktur (kromě semenných váčků): do hrdla močového měchýře, zevního svěrače, zdvihačů dna pánevního, rekta, pánevní stěny.	
N Regionální lymfatické uzliny		
NX	Regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit	
N0	Metastasy v regionálních lymfatických uzlinách nejsou přítomny	
N1	Přítomnost metastas v regionálních lymfatických uzlinách	
M Vzdálené metastasy		
MX	Přítomnost vzdálených metastas nelze hodnotit	
M0	Vzdálené metastasy nejsou přítomny	
M1	Přítomnost vzdálených metastáz	
	M1a	Metastasy mimo regionální mízní uzlinu/y
	M1b	Kostní metastasy
	M1c	Metastasy v jiných orgánech

## **Příloha 5: Histopatologický stupeň diferenciacce karcinomů, Gleason score**

K histopatologickému hodnocení primárního nádoru se využívá stupnice diferenciacce označované jako grading (viz tab. 1).

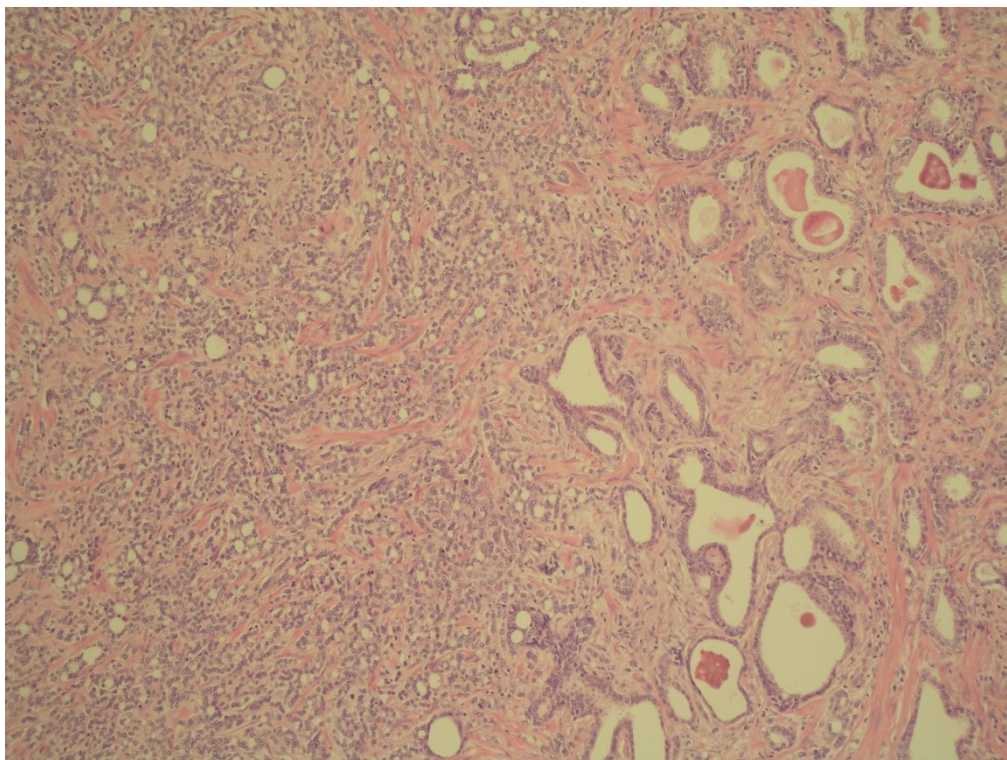
Tabulka 1: Obecné hodnocení stupně diferenciacce karcinomů.

GX	stupeň diferenciacce nelze hodnotit
G1	dobře diferencovaný
G2	středně diferencovaný
G3	nízce diferencovaný
G4	nediferencovaný

Pro grading karcinomu prostaty byl vypracován speciální hodnotící systém označovaný jako Gleasonovo skóre (GS, Gleasonův gradingový systém) (viz tab.2). Ten hodnotí architektonické uspořádání nádorových ložisek. Vyjadřuje dvě nejčastěji zastoupené gradingové jednotky v rozsahu 2 (1+1) až 10 (5+5). Se zvýšeným GS klesá diferenciacce žlázek (Sobin a Wittekind, 1997; Lukeš, 2005; Dušek, 2010). Fotografie na konci této přílohy dokumentuje mikroskopický nález CaP.

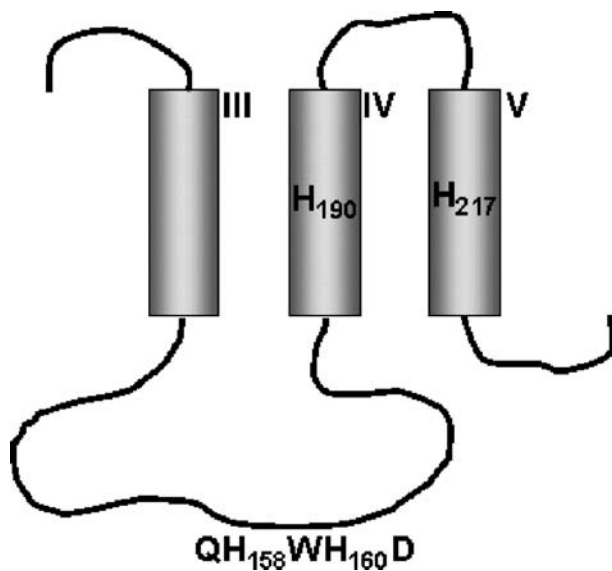
Tabulka 2: Grading karcinomu prostaty (GS). Dle (Mareš, 2003).

GS 2-4	dobře diferencovaný
GS 5-6	středně diferencovaný
GS 7	středně špatně diferencovaný
GS 8-10	špatně diferencovaný



Fotografie zachycuje nádorovou tkáň adenokarcinomu prostaty. Dle GS odpovídá pravá část fotografie GS 6: nádorová tkáň je středně diferencovaná, žlázy jsou variabilní co do velikosti i tvaru. Levá část fotografie zachycuje špatně diferencovaný karcinom (GS 10): pozorujeme kompletní ztrátu glandulární diferenciace, dominují solidní trámce, ložiska či izolované disociované nádorové buňky. Zvětšení 40x.

## Příloha 6: Struktura transmembránového přenašeče Zip



Zobrazení transmembránových domén III, IV a V transportéru Zip1. U rodiny Zip transportérů jsou histidiny (H) ve smyčce vysoce konzervované. Mutace histidinu za alanin na pozici 158 a 160 výrazně snižuje schopnost transportovat zinku. Histidiny ve smyčce a v transmembránových doménách III a IV (pozice 190 a 217) se potencionálně podílejí na formování koordinační vazby pro zinek, která je zapojena do transportního procesu (Milon *et al.*, 2006; Costello *et al.*, 2011), obrázek dle (Milon *et al.*, 2006).

**Příloha 7: Klasifikace matrixových metaloproteinás.** Upraveno dle (Zitka *et al.*, 2010).

MMP	Metaloproteinasa	kDa	EC klasifikace	lokus	substráty
MMP-1	Kolagenasa	43	EC 3.4.24.7	11q22-q23	některé typy kolagenu (I, II, III, VIII, X), gelatin, agrekan, L-selektin, IL-1 $\beta$ proteoglykan, enaktin, ovostatin, MMP-2, MMP-9
MMP-2	Gelatinasa A	72	EC 3.4.24.24	16q13	některé typy kolagenu (I, IV, V, VII, X, XI, XIV), gelatin, elastin, agrecan, fibronektin, osteonektin, laminin, MMP-1, MMP-9, MMP-13
	Gelatinasa typu IV	66			
	Kolagenasa	66			
MMP-3	Stromelysin-1	46	EC 3.4.24.17	11q23	kolagen typu III, IV, V a IX, gelatin, agrekan, perlekan, dekorin, laminin, entaktin, elastin, kasein, plazminogen, osteonektin, ovostatin, MMP-2, MMP-7, -8, -9,-13, TIMP- 2
	Proteoglykanasa				
MMP-7	Martrilysin	20	EC 3.4.24.23	11q21-q22	kolagen typu IV a X, gelatin, agrekan, dekorin, fibronektin, laminin, entaktin, elastin, kasein, tranferin, plasminogen, MMP-1, -2, -9, TIMP-1
MMP-8	Neutrofilová kolagenasa	58	EC 3.4.24.34	11q21-q22	kolagen typu I, II, III, V, VII, VIII a X, gelatin, akrekan, fibronektin
MMP- 9	Gelatinasa B	92	EC 3.4.24.35	20q11.2-q13.1	kolagen typu IV, V, VII, X a XIV, gelatin, antaktin, agrekan, elastin, fibronektin, osteonektin, plasminogen, IL-1b
MMP- 10	Stromelysin-2	46	EC 3.4. 2. 22	11q22.3- q23	kolagen typu III, IV, V, gelatin, kasein, agrekan, elastin, MMP-1, -8
MMP- 11	Stromelysin- 3	44	n.k.	22q11.2	Neznámý

Klasifikace matrixových metaloproteinás (*pokračování*). Upraveno dle (Zitka *et al.*, 2010).

MMP	Metaloproteinasa	kDa	EC klasifikace	lokus	substráty
MMP-12	Makrofágová metaloelastasa	45	EC 3.4.24.65	11q22.2-q22.3	kolagen IV, gelatin, kasein, elastin, fibronektin, vintronektin, laminin, entaktin, fibrinogen, fibrin, plasminogen
MMP-13	Kolagenasa-3	55	n.k.	11q22.3	kolagen I-IV, IX, X a XIV, gelatin, plasminogen, agrekan, perlekan, fibronektin, osteonektin, MMP-9
MMP- 14	MT1-MMP	54	n.k.	14q11-q12	kolagen I-III, gelatin, kasein, fibronektin, laminin, vintronektin, entaktin, proteoglykany, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	61	n.k.	16q12.2-q21	fibronektin, entaktin, laminin, perlekan, MMP-2
MMP-16	MT3- MMP	55	n.k.	8q21	kolagen typu III, gelatin, kasein, fibronektin, MMP-2
MMP- 17	MT4-MMP	54	n.k.	12q24	neznámý
MMP- 18	Kolagenasa-4		n.k.	neznámý	kolagen typu I-III, VIII a X, gelatin, agrekan
MMP- 19	RASI- 1		n.k.	12q14	gelatin, agrekan, fibronektin
MMP- 20	Enamelysin		n.k.	neznámý	amelogreinein, agrekan
MMP-21*			n.k.	1p36.3	neznámý
MMP-22*			n.k.	1p36.3	neznámý
MMP- 23*			n.k.	neznámý	neznámý



Klasifikace matrixových metaloproteinás (*pokračování*). Upraveno dle (Zitka *et al.*, 2010).

MMP	Metaloproteinasa	kDa	EC klasifikace	lokus	substráty
MMP- 24	MT5-MMP		n.k.	20q11.2	neznámý
MMP- 25	MT6-MMP		n.k.	16p/3.3	pro-gelatinasa A, fibrin, fibronectin, kolagen IV, gelatin
MMP- 26	Matrylysin-2		n.k.	neznámý	gelatin I $\alpha$ , fibrinogen, fibronectin, vintronektin
MMP- 28	Epilysin		n.k.	17q11.2	kasein

\*Geny pro tyto MMP byly nalezeny na chromosomech, jejich funkce a struktura prozatím nebyla identifikována, n.k. - nebylo klasifikováno.

## **Příloha 8: Účast na odborných akcích, publikace**

Axmanová Martina, Holubová Monika, Gumulec Jaromír, Sztalmachová Markéta, Polanská Hana, Hudcová Kristýna, Balvan Jan, Raudenská Martina, Kizek René, Masařík Michal (11/2013): *Zinek rezistentní PC-3 linie: expresní a imunocytochemická analýza vybraných genů korespondujících s metabolismem a transportem  $Zn^{2+}$  iontů*. IX. Dny diagnostické, experimentální a prediktivní onkologie, Olomouc.

Holubová Monika, Axmanová Martina, Sztalmachová Markéta, Gumulec Jaromír, Masařík Michal (11/2013): *Charakteristika zinek-rezistentních linií ve vztahu k apoptóze*. IX. Dny diagnostické, experimentální a prediktivní onkologie, Olomouc.

Holubová Monika, Axmanová Martina, Gumulec Jaromír, Balvan Jan, Sztalmachová Markéta, Raudenská Martina, Kizek René, Adam Vojtěch, Masařík Michal (2013): *Analýza genů regulujících apoptózu u zinek rezistentních buněčných linií*. XXXVII. Brněnské onkologické dny a XXVII. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky.

Holubová Monika, Axmanová Martina, Gumulec Jaromír, Balvan Jan, Sztalmachová Markéta, Raudenská Martina, Kizek René, Adam Vojtěch, Masařík Michal (2013): *Analýza exprese genů regulujících apoptózu u nádorových linií prostaty po působení kapsaicinu*. XXXVII. Brněnské onkologické dny a XXVII. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky.

Axmanová Martina, Masařík Michal (2012): *Stanovení vybraných matrix metaloproteináz v nádorových liniích a v sérech pacientů s karcinomem prostaty*. Sborník studentského workshopu- Toxikománie, Brno.

Holubova Monika, Axmanova Martina, Gumulec Jaromir, Raudenska Martina, Sztalmachova Marketa, Babula Petr, Adam Vojtech, Kizek Rene and Masarik Michal: *KRAS-PI3K-NF-kB is involved in the development of zinc resistance and reduced curability in prostate cancer: movement along the axis of evil*. Metallomics (in press).