

Çinko, insan prostat karsinomu [Zn] içeriğini düzenler ve sitratın gen ekspresyonunu bloke eder

Ke-Hung Tsui - Phei Lang Chang (Resmi Müzik Video)

- 1 Üroloji Bölümü, Chang Gung Memorial Hastanesi, Kwei-Shan, Tayvan, Çin Cumhuriyeti
- 2 Chang Gung Biyoinformatik Merkezi, Chang Gung Memorial Hastanesi, Kwei-Shan, Tayvan, Çin Cumhuriyeti
- 3 Anatomi Bölümü, Chang Gung Üniversitesi, Kwei-Shan, Tayvan, Çin Cumhuriyeti

Mitokondriyal akonitaz (mACON), insan prostat epitel hücresinde sitrat oksidasyonu için anahtar enzim olarak bir [4Fe-4S] kümesi içerir. Prostat hücresinde mACON ekspresyonu düşük düzeyde bulunur.

mate Hücresel mACON ekspresyonu, sitrat oksidasyonu için anahtar enzim olarak bir [4Fe-4S] kümesi içerir. Prostat hücresinde mACON ekspresyonu düşük düzeyde bulunur.

an (Manassas, VA) sodyum sitrat (FAC) (St. Louis, MO)

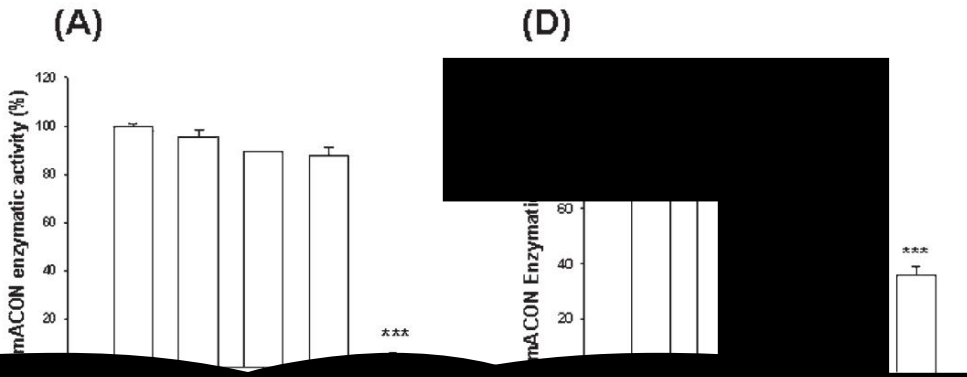
kahverengi bir doku, 100 mg/ml suda çözündürüldü. 100 mg/ml karmak için 10.000 mg u... g u... mada Zn-HA olarak... tır. FBS, ... Tüm kültür ortamları ve... (St. Louis, MO) satın alındı. 100 mg/ml... 1640 içinde kültürlendi ve ortam, haftada

ve laktat dehidrojenaz enzimatik aktivite... asyonlarda ZnCl₂ veya Zn-HA ile hücre... , mitokondriyal akonitaz ve laktat dehidrojenazı... if edildiği gibi test edildi. 18 Hücreler, 500 ul 0.25... 50 mM HEPES ve %0.007 digitonin ile yeniden... süpernatanı santrifüjlendi ve laktat dehidrojenaz... deneyi için hazırlandı. Peletlenmiş mitokondri... PES [pH 7.5], 1 mM DTT, %10 gliserol ve 2 mM... /L löpeptin, 0.7 mg/L pepstatin ve 0.2 mM PMSF... edildi. Mitokondriyal parçacığın zarı, %1... nde parçalandı ve mitokondri ekstresi, NADH... itaz aktivitesi aşısından test edildi. Mitokondriyal... nı n protein konsantrasyonları, BCA protein... rd, IL) kullanılarak ölçüldü. Hücresel mACON ve... tesisi, protein konsantrasyonu ile ayarlandı.

konitaz ve b-aktinin immüno blot testi... FBS içeren RPMI 1640 ortamında DTPA'lı /... da Zn-HA kullanılarak muameleden sonra, ... 2.5 mM Tris [pH 6.8], %2 SDS, %10 gliserol, %5... ptoetanol, 7 M üre, 5 ug/ml leupeptin ve 1 mM... Eşit miktarlarda protein, %5 SDS-poliakrilamid... ti (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) kullanılarak... ylandı. 100 mg/ml üre, 5 ug/ml leupeptin ve 1 mM... di. Leke, seyreltilmiş mACON

ung... : CMRP D1006, ... an, ÇHC); Hibe numarası : ... gi, 259 Wen-Hua 1st Road, ... 011-886-3-2118112.

Televizyonundan sonra kabul... 2005'te Wiley InterScience'da... ınımı yayımlandı.



ŞEKİL 1 - PC-3 hücrelerinde mACON enzimatif aktivitesinin ve hücre çoğalması için çinko klorür ve Zn-HA ile modülasyonu. Hücreler, 16 saat boyunca %5 FBS ile RPMI 1640 içinde 3 ml farklı ZnCl₂ (a-c) veya Zn-HA (d-f) konsantrasyonları ile işlendi. Hücreler toplandı ve mitokondri partikülleri digitonin sindirimi kullanılarak hazırlandı. mACON enzimatif aktivitesi (a,d), mitokondriyal membranı ayırmak için %1 Triton X-100 varlığında NADP-bağımlı tahlil ile belirlendi (n=5). Sitoplazma fraksiyonundaki LDH aktivitesi (b,e), tüketilen piruvat miktarı için 30°C'de tahlil edildi. Deneysel veriler, kontrolle işlenmiş numuneye göre ZnCl₂ işlemleriyle indüklenen enzimatif aktivitenin ortalama yüzdesi 6 SE (n = 6) olarak sunulur (**p < 0.05; ***p < 0.01). Hücreler (5.000 hücre/oyuk; n = 5), 100 µl içinde 1 ZnCl₂ (C) veya Zn-HA (F) (belirtildiği gibi) ile inkübe edildi.

48 saat boyunca %5 FBS içeren RPMI 1640 ortamı ve MTS deneyi ile hücre sayısı belirlendi. Her bir tedavi noktası, taklit olarak işlenmiş analog a göre ZnCl₂ işlemleri tarafından indüklenen 490 nm'de absorpsiyon yarılmaları ortalama yüzdesini temsil eder (**p < 0.05; ***p < 0.01).

RB Franklin tarafından hediye edilmiş tir ve 1:1000 seyreltilmiş b-aktin antiserum (C11, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Ribonükleaz koruma testi

İnsan mACON cDNA'sı, NcoI sindirimi kullanılarak doğrusallaştırıldı. RNA problemleri (mACON ve b-aktin), daha önce açıkladığımız gibi ribonükleaz koruma tahlil kiti (PRA II; Ambion, Austin, TX) ile T3 RNA polimeraz ile sentezlendi. 15 RNA probe (1.3 10⁵ cpm), 30 µg toplam RNA 95°C'de 5 dakika süreyle ve ardından gece boyunca 48°C'de inkübe edildi. Korunmuş tek sarmallı RNA, 5 U RNaz A ve 20 U RNaz T1 ile çözüldü. Ribonükleaz korumasının sonucu, %5 denatüre edici poliakrilamid jeller üzerinde analiz için ayrıldı.

Hücre proliferasyonu

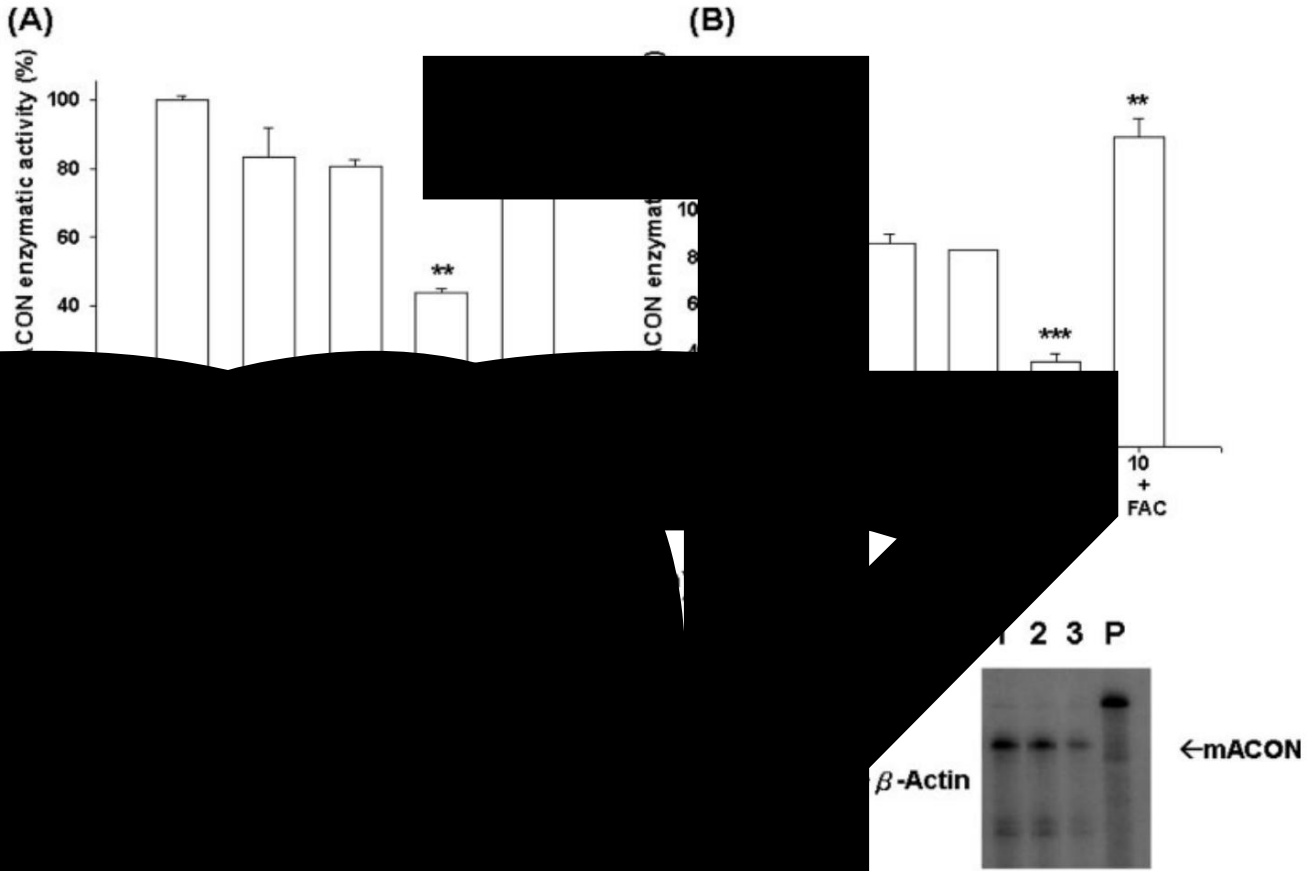
Deneyleri ZnCl₂ veya Zn-HA'ya yanıt olarak hücre proliferasyonu, MTS deney kiti (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA) ile ölçüldü. Hücreler (5.000 hücre/oyuk) 100 µl RPMI 1640 içinde büyütüldü.

48 saat boyunca %5 FBS ve farklı dozlarda ZnCl₂ veya Zn-HA içeren ortam. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı, ardından taze hazırlanmış, kombine MTS/fenazin metosüfat (hacimce 1:1) solüsyonu ile 3 saat süreyle 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosferinde inkübe edildi. Formazan ürününün absorpsiyonunu ELISA mikropilaka okuyucusu (Dyngex Technologies, Chantilly, VA) ile 490 nm'de ölçülmüş tür.

Sitrat ve hücre içi ATP tahlili PC-3 hücreleri

2.3 10⁵ /kuyu), %80 birleşim elde edilene kadar 6 oyuklu plaka içinde inkübe edildi. 48 saat boyunca %5 FBS ile RPMI 1640 ortamında Zn-HA işlemlerinden sonra, ortam sitrat konsantrasyonları ve hücre içi ATP seviyeleri şu şekilde ölçüldü:

tarif edilmiş tir. 15 Süpernatandaki sitrat konsantrasyonları, eşleştilmiş reaksiyonlardan NADH oksidasyonu izlenerek tahmin edilmiş tir. Ortamdaki sitrat konsantrasyonları ve hücre içi ATP seviyeleri, BCA protein tahlil kiti (Pierce) kullanılarak tüm hücre ekstraktını protein konsantrasyonlarına ayarlandı.



ör veya ferrik amonyum sitrat ile modülasyonu.
 10 içinde DTPA (a) veya FAC (b) ile iş lendi.
 idi. Deneysel veriler, kontrol numunesine göre
 < 0.01). Hücreler, 24 saat boyunca DTPA'lı veya
 immünoblot deneyi (c) için proteini ç karmak ve
 Zn-HA; P, ücretsiz araş tırma).

iki kez ve hemen 16 saat daha %5 FBS ile RPMI
 ldığı gibi farklı konsantrasyonlarda Zn-HA ile
 Lusiferaz Hücre Kültürü Parçalama Reaktifi
 e parçalandı . Üretici (Promega Bioscience)
 rı ldi ğ ı üzere, luci ferase tahlili için yirmi
 e b-galaktosidaz (b GAL) enzim tahlili için 100 ul
 . Lusiferaz aktivitesi, LumiCount lüminometre
 riden, CT) kullanı larak görelili ş ı k birimleri
 e b-GAL aktivitesi ile ayarlandı .

aydı rma testi

e kaydı rma testi, d... landı ğ ı
 /arsayı lan met... (50
 TCTCTCTCTC... mmalı
 DN... 50 uşuydu
 po... , üretici (PIERCE)
 tar... plazmik ekstraksiyon
 rea... MRE (MRE probu; 5 nM),
 20... [pH 7.9], 50 mM KCL ,
 e tilsüfonil florür ve
 (C). Bağ lanma kayması ,
 a çift sarmallı MRE ile zorlandı .

g P32ATP'ye sahip 50 -ucun etiketlenmediği i mutasyonel form (MREm; 50 -GTTTCATCCTGGGAGGATCTG CCTTTG-30). Protein-DNA kompleksi oluş umu, otoradyografi ile %4 poliakrilamid jeller üzerinde analiz

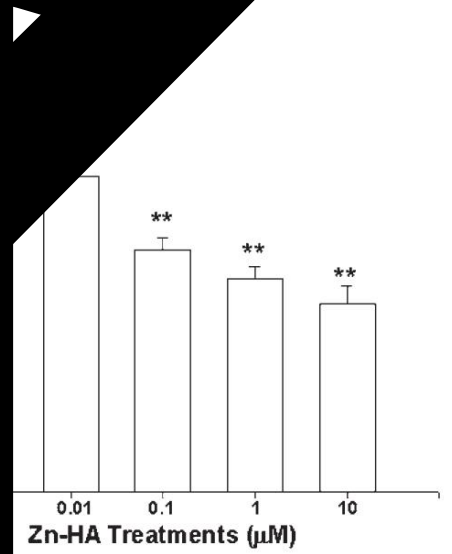
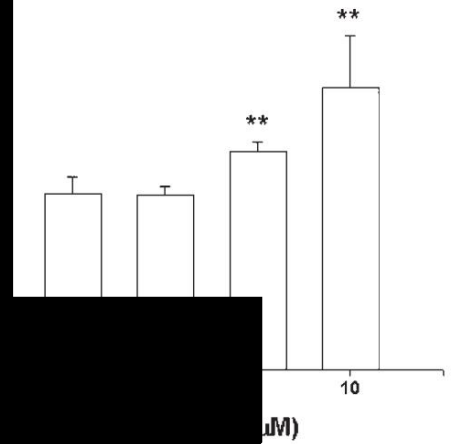
(A)

İ statistiksel analiz

Sonuçlar, her deneyin en az 3 bağı msız tekrarı n olarak ifade edilir. İ statistiksel anlamlı lık, Windows için Sigmasoft yazılım (sürüm 2.03; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanı larak ikili t-testi analizi ile belirlendi.

Sonuçlar

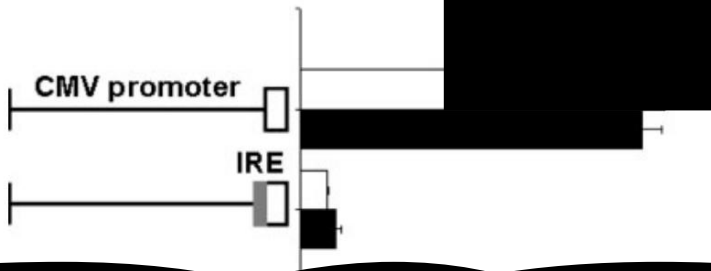
İ nsan prostat kansinomu hücresi PC-3 kullanı larak yapı lan in vitro



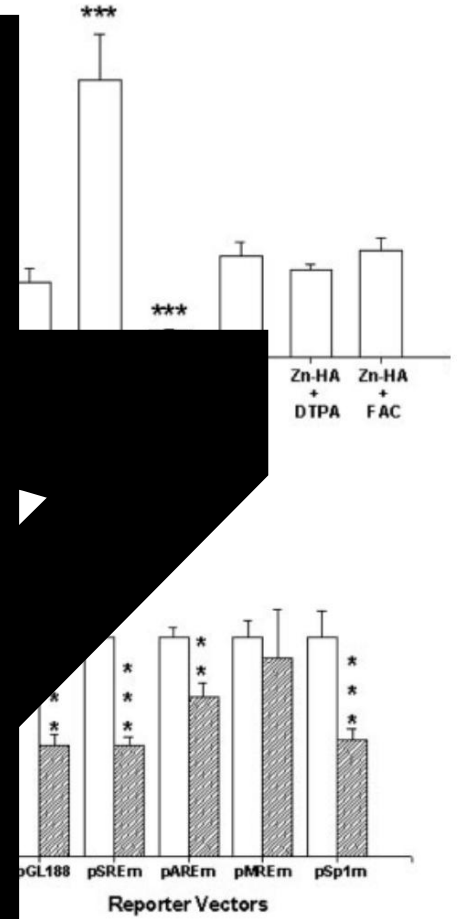
relerinde hücre içi ATP seviyelerinin ve sitrat A tarafı ndan düzenlenmesi. Hücreler (2 3 106 oyunca %5 FBS ile RPMI 1640 içinde 3 ml farklı rarı (belirtildiği gibi) ile iş lendi (n=6). Ortam landı ve hücreler hücre içi ATP düzeylerinin (b) yal ve Yöntemlerde açıkladı ğ ı gibi riler, kontrol örneğ ine göre Zn-HA iş leminden santrasyonu ve ATP düzeylerinin ortalama ak sunulmuş tur (**p < 0.05).

oku ile karşı laşt ırıldı ğ ında prostat kanserinde ndriyal çinkonun benzersiz ş ekilde yüksek birikimi, rat ve aspartat gibi çinko ilaçları için bileş imli ligandları n e bağı lı gibi görünme ve hücreleri.21-24 u t, yüksek çinko seviyeleri genellikle bu aybı nı n, m... ş imi ve ktör oldu... 13 Ayrı ca, takviye... oluş umunu izi... kanseri insidansı ve laboratuvar ca, in vivo ve in vitro ersine, yüksek dozda na prostata hücre apoptozuna at dı ş ı hücreler.25-29

(A)



(C)



İ geni ekspresyonunun Zn-HA regülasyonu, mACON...
 ular sınırsız olarak Zn-HA tedavilerini...
 fragmanı ile ilişkili olduğunu gösterir (beyaz ve...
 fekte edilmiş PC-3 hücreleri, 16 saat boyunca ferrik...
 hücreleri, haberci vektörün farklı mutant formlarıyla...
 tilen ortalama yüzde (6SE) lusiferaz aktivitesi olarak

lağar.30 Mevcut çalışmamızda, daha yüksek...
 avisinin PC-3 hücreleri üzerinde yalnızca orta...
 e sahip olduğunu bulduk. Hümk asidin çinko...
 fikasyondaki kesin işlevleri bilinmemekle birlikte,
 mik asidi in vitro tahlil sistemlerinde taşıyıcı...
 hmiş ve arsenik, kadmiyum, krom veya kurşunun...
 presyonu üzerindeki düzenleme rolünü göstermiştir.17

konun prostattaki ana...
 mACON inhibitör...
 21-23 Sonuçta...
 3 hücre,
 erinden de... ve hücre iç...
 flatan... presyonundan...
 ar, m... tülen benzer in vivo...
 ur.3,6,31,32 Çinkonun...
 basitçe insanda mACON...
 antagonisti olarak işlev...
 inmemektedir.
 otör ile raportör tahlilini ve...
 göstermiştir.

Referanslar

1. Tapiero H, Tew KD. İnsan fizyolojisi ve patolojisinde eser elementler: çinko ve metalotiyoninler. *Biomed Pharmacother* 2003;57: 389-411.
2. Costello LC, Franklin RB. Prostat sitrat metabolizması nın düzenlenmesinde çinkonun yeni rolü ve bunun prostat kanserindeki etkisi. *Prostat* 1998;35:285-96.
3. Liang JY, Liu YY, Zou J, Franklin RB, Costello LC, Feng P. Çinkonun insan prostat kanserinde hücre büyümesi üzerinde inhibe edici etkisi. *Prostat* 1999;40:200-7.
4. Feng P, Liang JY, Guan ZX, Zou J, Franklin RB, Costello LC. Çinko, prostat hücrelerinde mitokondri apoptozunu indükledi. *Mol Urol* 2000;4:31-6.
5. Platz EA, Helzlsouer KJ, Hoffman SC, Morris JS, Baskett CK, Comstock GW. Ön tanı ayak tı rnağ ı kadmiyum ve çinko ve sonraki prostat kanseri riski. *Prostat* 2003;52:288-96.
6. Feng P, Li TL, Guan ZX, Franklin RB, Costello LC. Çinko plak farelerde çinkonun prostat tumörijenitesi üzerindeki etkisi. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010: 316-20.
7. Costello LC, Feng P, Milon B, Tan M, Franklin RB. Prostat kanserinin patogenezi ve tedavisinde çinkonun rolü çözülmesi gereken kritik sorunlar. *Prostat Kanseri Prostatik Hastalıkları* 2004;7:111-7.
8. Prasad AS, Kucuk O. Kanserden korunmada çinko. *Kanser Metastazı Rev* 2002;21:291-5.
9. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Wu K, Colditz GA, Willett WC, Giovannucci EL. Çinko takviyesi kullanımı ve prostat kanseri riski. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1004-7.
10. Costello LC, Liu Y, Franklin RB, Kennedy MC. Mitokondriyal akonitazların çinko inhibisyonu ve prostat epitel hücrelerinin sitrat metabolizması ndaki önemi. *J Biol Chem* 1997;272:28875-81.
11. Iguchi K, Hamatake M, Ishida R. Prostat kanserinde hücrelerinde çinko ile nekroz indüksiyonu ve bu indüksiyonla bağlantılı olarak proteinlerin tanı mlaması arttı . *Eur J Biochem* 1998;253:766-70.
12. Costello LC, Franklin RB, Liu Y, Kennedy MC. Çinko, prostat mitokondrisinin akonitaz reaksiyonunun dengesinde sitrata doğru bir kaymaya neden olur. *J Inorg Biochem* 2000;78:161-5.
13. Costello LC, Franklin RB. Prostat nın ara metabolizması : prostat malignitesinin patogenezi ve ilerlemesini anlamak için bir anahtar. *Onkoloji* 2000;59:269-82.
14. Emptage MH, Kent TA, Kennedy MC, Beinert H, Münch E, Mossbauer ve aktive edilmiş akonitazların n EPR çalı şmaları : cit oranı nı n bağı lanması üzerine [4Fe-4S] kümesinin bir alt bölgesinde lokalize değ erlik durumunun geliş imi. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4674-8.
15. Juan HH. Mitokondriyal akonitazın n insan prostat kanserinde hücrelerinin biyoenerjisi üzerindeki modülasyonu. *Mol Genet Metab* 2004;81:244-52.
16. Juang HH. İnsan prostat kanserinde hücrelerinde mitokondriyal akonitaz ekspresyonunda demirin modülasyonu. *Mol Cell Biochem* 2004;265:185-94.
17. Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mümtaz MM, Chapin RE. Arsenik, kadmiyum, krom ve kurş unun rekombinant HepG2 hücrelerinde 13 farklı promotörden oluş an bir pil tarafı ndan düzenlenen gen ekspresyonu üzerindeki etkileri. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;169:79-90.
18. Juan HH. İnsan prostat kanserinde hücrelerinde siklik adenozin 30,50-monosofat sinyal iletim yolu yoluyla mitokondriyal akonitaz gen ekspresyonunu uyarı r. *Prostat* 2004;61:92-102.
19. Tsui KH, Chang PL, Lin HT, Juang HH. İnsan prostat kanseri hücrelerinde prostat spesifik antijen promotörünün p53 tarafı ndan aş ağı regülasyonu. *J Urol* 2004;172:2035-9.
20. Zaichick VY, Sviridova TV, Zaichick SV. İnsan prostat sı sı ndaki çinko konsantrasyonu: normal, kronik prostatit, adenom ve kanser. *Uluslararası Urol Nephrol* 1996;28:687-94.
21. Guan Z, Kukoyi B, Feng P, Kennedy MC, Franklin RB, Costello LC. Prostat hücrelerinde mitokondriyal çinko alımı m taş ı ma iş leminin kinetik olarak tanı mlaması . *J Inorg Biochem* 2003;97:199-206.
22. Franklin RB, Ma J, Zou J, Guan Z, Kukoyi BI, Feng P, Costello LC. İnsan ZIP1'ı, prostat hücrelerinde çinko birikimi için önemli bir çinko alımı m taş ı yı cı sı dır. *J Inorg Biochem* 2003;96:435-42.
23. Costello LC, Guan Z, Franklin RB, Feng P. Metallothionein, çinko alımı nı n prostat ve karaciğer mitokondrisine taş ı nması için refakatçi olarak iş lev görebilir. *J Inorg Biochem* 2004;98:664-6.
24. Henshall SM, Afar DE, Rasiah KK, Horvath LG, Gish K, Caras J, Ramakrishnan V, Wong M, Jeffrey U, Kench JG, Quinn DI, Turner JJ, et al. Çinko taş ı yı cı ZnT4'ün ekspresyonu, erken prostat hastalığı ndan invaziv prostat kanserine ilerlemede azalır. *Oncogene* 2003;6005-12.
25. Untergasser G, Rumpold H, Plasm E, Witkowski M, Pfister G, Berger P. Çinko iyonları nı n yüksek seviyeleri, in vitro ekili insan prostat epitel hücrelerinde mitokondriyal potansiyel kaybı na ve antiapoptotik Bcl-2 proteininin bozulması na neden olur. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279: 607-14.
26. Uzzo RG, Leavis P, Hatch W, Gabali VL, Dulin N, Zvartau N, Kolenko VM. Çinko, nükleer faktör- κ B aktivasyonunu inhibe eder ve prostat kanseri hücrelerini sitotoksik ajanlara karşı duyarlı hale getirir. *Clin Cancer Res* 2002;8: 3579-83.
27. Chimenti F, Jourdan E, Favier A, Seve M. Çinko direnci, HeLa hücrelerinde oksidatif strese duyarlı lığı bozar: metal lotiyonin ekspresyonu yoluyla koruma. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1179-90.
28. Chimenti F, Seve M, Richard S, Mathieu J, Favier A. Programlanmış hücre ölümünde hücre çinkonun rolü çinko tükenmesi, kaspazların n aktivasyonu ve Sp alilesi transkripsiyon faktörlerinin bölünmesi arasındaki zamansal iliş ki. *Biochem Pharmacol* 2001;62:51-62.
29. Feng P, Li TL, Guan ZX, Franklin RB, Costello LC. Çinkonun prostat hücrelerinde mitokondriyal apoptoz üzerindeki doğ rudan etkisi. *Prostat* 2002; 52:311-8.
30. Calace N, Petronio BM. Organik maddenin metal toksitesindeki rolü ve biyo-elveriş ililik. *Ann Chim* 2004;94:487-93.
31. Dineley KE, Votyakova TV, Reynolds JJ. Hücresel enerji üretiminin çinko inhibisyonu: mitokondri ve nörodegenerasyon için ç arı mlar. *J Neurochem* 2003;85:563-70.
32. Hasumi M, Suzuki K, Matsui H, Koike H, Ito K, Yamanaka H. İnsan prostat kanseri hücreleri ve dokusunda metalotiyonin ve çinko taş ı yı cı ifadesinin düzenlenmesi. *Kanser Lett* 2003;200:187-95.
33. Iguchi K, Otsuka T, Usui S, Ishii K, Onishi T, Sugimura Y, Hirano K. LNCaP hücrelerinin androjen bağı mlaması z alt hattı nda çinko ve metalotiyonin seviyeleri ve çinko taş ı yı cı nı n ifadesi. *J Androl* 2004;25:154-61.
34. Chen X, Agarwal A, Giedroc DP. İnsan MRE bağı layıcı transkripsiyon faktörü-1'in çinko parmakları arasındaki yapı sal ve iş levsel heterojenlik. *Biyokimya* 1998;37:1153-61.
35. Koizumi S, Suzuki K, Ogra Y, Yamada H, Otsuka F. İnsan metalotiyonin-IIA geninin metale duyarlı elemanları nı n transkripsiyonel aktivitesi ve düzenleyici protein bağı lanması . *Eur J Biochem* 1999;259: 635-42.
36. Larchelle O, Stewart G, Moffatt P, Tremblay V, Seguin C. Fare metal düzenleyici element bağı layıcı proteinlerin, metal element proteini-1 ve metal düzenleyici transkripsiyon faktörü-1'in karakterizasyonu. *Biochem J* 2001;353:591-601.
37. Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfili I. Metallothioneinlerin antioksidan rolü karşı laş tırmlı bir genel bakış . *Cell Mol Biol* 2000;46: 407-17.
38. Yan Y, Sheppard PC, Kasper S, Lin L, Hoare S, Kapoor A, Dodd JG, Duckworth ML, Matusik RJ. Probasin promotörünün büyük parçası , transgenik farelerin prostatına yüksek seviyelerde transgen ekspresyonu hedefler. *Prostat* 1997;32:129-39.
39. Feng TH, Tsui KH, Juang HH. İnsan prostat kanserinde hücrelerinde mitokondriyal akonitaz ekspresyonunun kolesterol modülasyonu. *Chin J Physiol* 2005;48:93-100.
40. Yoo HY, Chang MS, Rhoads HM. Sı çan Cu/Zn süperoksit dismutaz geninin metale duyarlı bir element yoluyla ağı r metal aracı lık aktivasyonu. *Mol Genet* 1999;262:310-3.