

PROSTATICKÝ SPECIFICKÝ ANTIGEN, METALOTHIONEIN A CAVEOLIN-1 JAKO MARKERY VZNIKU A ROZVOJE KARCINOMU PROSTATY

MARKÉTA SZTALMACHOVÁ^{a,b,*}, JAROMÍR GUMULEC^a, NATALIA CERNEJ^{b,c}, MARIAN HLAVNA^a, ONDŘEJ ZÍTKA^{b,c}, PETR BABULA^d, VOJTĚCH ADAM^{b,c}, RENÉ KIZEK^{b,c} a MICHAL MASARIK^{a,c}

^a Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno, Kamenice 5, 625 00 Brno, ^b Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^c Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Technická 3058/10, 616 00 Brno, ^d Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno
masarik@med.muni.cz

Došlo 22.3.12, přijato 14.8.12.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: karcinom prostaty, metalothionein, prostatický specifický antigen, caveolin-1

Úvod

Karcinom prostaty je druhým nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním u mužů^{1–3} a jeho incidence roste se vzrůstajícím věkem pacientů, kdy se toto onemocnění objevuje téměř u každého muže staršího osmdesáti let. K detekci onemocnění se v praxi používá stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) v séru pacientů. Díky zavedení tohoto markeru do praxe stoupá počet zachytu tohoto onemocnění, mortalita však, díky včasné diagnostice, výrazně klesá^{4–8}. Přes vysoký výskyt tohoto onemocnění karcinom prostaty neohrožuje až v 90 % pacienta na životě⁹, protože je známo, že pouze malý podíl nádorů se chová agresivně^{10–12}. Dnes používané stanovení PSA v séru nedokáže odhalit, zda pacient trpí agresivní formou onemocnění, nebo u něj probíhá klinicky němá forma nemoci^{13,14}. Ze statistických studií vyplývá, že téměř

80 % pacientů je léčeno, jako by u nich probíhala agresivní forma nemoci, což snižuje kvalitu jejich života¹. Z tohoto důvodu jsou hledány další markery karcinomu prostaty jako proteiny metalothionein a caveolin-1, pomocí kterých by bylo možné diagnostikovat agresivní formu tohoto onemocnění. Metalothionein (MT) je protein s vysokým obsahem cysteinových aminokyselin a má důležitou roli při přenosu a detoxikaci těžkých kovů^{15–17}. Podílí se také na ochraně buněk před oxidativním stresem a má antiapoptické působení^{18–20}. Jeho zvýšená hladina byla také pozorována při vzniku některých nádorových onemocnění^{18,21,22}. Caveolin-1 je protein lokalizovaný v invaginacích buněčné membrány, zvaných *calveolae*²³. Je zodpovědný za přenos cholesterolu a podílí se na endocytóze. Jeho zvýšená hladina byla pozorována u agresivních forem karcinomu prostaty^{24–27}.

Cílem naší práce bylo popsat rozdíly mezi „zdravou“ prostatickou tkání, nízké maligním primárním nádorem a agresivní formou onemocnění se schopností metastázovat. Pro naše experimenty byly vybrány geny metalothionein, caveolin-1 a PSA. U těchto genů byla stanovena exprese na RNA úrovni a také na úrovni proteinu u modelových buněčných linií.

Experimentální část

Chemikálie

V našich experimentech byly použity následující chemikálie: médium RPMI 1640, médium HAM'S F12, fetální bovinní sérum, penicilin/streptomycin, trypsin, EDTA (PAA, Rakousko), PBS (Invitrogen, Carlsbad), RIPA pufr (Sigma-Aldrich, USA), High pure total RNA isolation kit (Roche, Švýcarsko), Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, Švýcarsko), monoklonální myši protilátka proti MT, polyklonální králičí protilátka proti PSA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), ELISA kit pro stanovení caveolinu-1 (USCN, Čína).

Buněčné linie

K experimentům byly použity tři buněčné linie. Jeden model zdravé prostatické tkáně a dvě nádorové tkáně prostaty. Jako kontrolní linie byla zvolena linie PNT1A, která byla odvozena z prostatické tkáně zdravého 35letého muže. Buněčná linie 22Rv1 je zástupcem primárního nádoru prostaty. Byla získána z xenograftu CWR22 opakovaně pasážovaného na kastrovaných myších. Tato linie je charakteristická vysokým obsahem PSA na proteinové úrovni a její růst je stimulovatelný androgeny. Linie PC-3, která byla odvozena z metastáz bederních obratlů 62 letého mu-

*Prezentováno Markétou Sztalmachovou na 15. ročníku celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie, O cenu firmy Merck.

že, je zástupcem agresivní formy onemocnění. Tato linie nereaguje na androgeny. Všechny linie byly zakoupeny u HPA Culture Collections (Salisbury, UK).

Příprava buněčných lysátů

PSA, MT a caveolin-1 byly stanovány v buněčných lysátech, které byly získány tepelnou denaturací nebo pomocí RIPA pufru a mechanickou homogenizací. RIPA lysát byl získán po mechanické homogenizaci buněk se 75 μ l RIPA pufru a následném doplnění pufrem na celkový objem 200 μ l. Poté byla mikrozkuhavka centrifugována při 14 000 g a 4 °C po dobu 30 min. Supernatant byl použit pro stanovení prostatického specifického antigenu a caveolinu-1. Při přípravě tepelného lysátu byly buňky homogenizovány se 75 μ l PBS a doplněny na objem 200 μ l. Následně byla mikrozkuhavka na 15 min vložena do termomixéru (99 °C) (cit.^{28,29}). Po denaturaci byla mikrozkuhavka centrifugována 30 min při 4 °C a 14 000 g. Supernatant byl použit pro stanovení metalothioneinu.

Stanovení exprese genů

K izolaci RNA z buněčných linií byl použit High pure total RNA isolation kit (Roche, Švýcarsko). Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, Švýcarsko) dle pokynů výrobce. Real time PCR analýza byla následně provedena pomocí specifických TaqMan sond pro výše zmíněné geny (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, USA). Veškeré analýzy byly prováděny v triplikátech.

Stanovení metalothioneinu

Pro stanovení metalothioneinu ve vzorku byl před vlastní detekcí zařazen krok separace proteinu z tepelného lysátu pomocí paramagnetických částic. Paramagnetické částice konjugované s proteinem G (DB-G, 10 μ l), umístěné v mikrozkuhavce, byly dvakrát promyty 100 μ l PBS. Na povrch mikročástic byla následně navázána polyklonální králičí protilátka proti MT 1A/2A (1 μ g) a tento komplex byl inkubován 60 min při pokojové teplotě a 800 ot min⁻¹ na třepačce, aby nedošlo k sedimentaci. Mikrozkuhavka byla poté umístěna na magnet, supernatant byl odsát a částice s navázanou protilátkou byly promyty 100 μ l PBS. Po odsátí PBS bylo přidáno 10 μ l testovaného vzorku a mikrozkuhavka byla ponechána při pokojové teplotě 60 min. Mikrozkuhavka byla poté opět umístěna na magnet a nanočástice s navázaným proteinem byly třikrát promyty 100 μ l PBS. K paramagnetickým částicím s navázaným proteinem byl přidán acetátový pufr (pH 4,3) a tento komplex byl inkubován při 70 °C 15 min na termomixéru při 800 ot min⁻¹.

Poté byl supernatant přenesen do čisté mikrozkuhavky pro následné měření diferenční pulzní voltametrií Brdiczkovou reakcí³⁰. K analýze byl použit přístroj 747 VA Stand ve spojení se 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko) ve tříelektrodevém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), plocha kapky je 0,4 mm². Jako referenční elektroda byla použita Ag/AgCl/3 M KCl a pomocnou elektrodou byla platinová elektroda. Stanovení probíhalo v základním elektrolytu, který byl měněn po každých 5 měřeních (1 mmol l⁻¹ [Co(NH₃)₆]Cl₃ a 1 mol l⁻¹ a amonný pufr; NH₃ (aq) + NH₄Cl, pH 9). Počáteční potenciál měření byl -0,7 V a konečný potenciál -1,75 V. Modulační čas 30 ms, časový interval 0,8 s. Potenciálový krok 3 mV, modulační amplituda 25 mV a teplota základního elektrolytu 4 °C, která byla dosažena termostatem (Julabo F25, Labortechnik GmbH, Německo).

Stanovení prostatického specifického antigenu (PSA)

Pro stanovení PSA byla použita enzymoimunologická metoda s využitím automatického analyzátoru AIA 600 II (Tosoh Bioscience, Japonsko). Do testovacího kelímku ST AIA-PACK PSAII (Tosoh Bioscience, Japonsko), obsahující lyofilizované reagensie (12 magnetických mikrokuliček s myší protilátkou anti-PSA, 100 μ l konjugované myší protilátky anti-PSA s hovězí alkalickou fosfatázou, 0,1% azid sodný) bylo pipetováno 70 μ l lysátu. Následně byl vzorek inkubován při 37 °C po dobu 10 min. Nenavázané protilátky byly odstraněny promytím roztokem NaCl. Následně byl přidán fluorogenní substrát (4-methylumbelliferyl fosfát) a pomocí fluorescenční intenzity změněna aktivita enzymu.

Stanovení caveolinu-1

K detekci caveolinu-1 bylo použito ELISA kitu (USCN Life Science Inc.). Standard caveolinu-1 (60 ng ml⁻¹) dodaný výrobcem byl ředěn v daných intervalech a postup byl kalibrován. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μ l vzorku a destička byla inkubována 2 h při 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 100 μ l polyklonální protilátky proti caveolinu-1, která byla konjugována s avidinem (reagensie A), a destička byla 60 min inkubována při 37 °C. Poté byl roztok odsát a jamky byly třikrát promyty 350 μ l promývacím roztokem pro ELISA analýzy (fosfátový pufr, pH 7,4). Následně byl přidán konjugát peroxidasa + biotin (reagensie B) a destička byla inkubována 30 min při 37 °C. Jamky byly poté pětkrát promyty 350 μ l promývacího roztoku, následně bylo přidáno 90 μ l substrátu a destička byla inkubována 15–25 min při 37 °C ve tmě. Nakonec bylo přidáno 50 μ l stop reagensie (1,5 M kyselina sírová) a výsledek vyjádřený změnou barvy substrátu byl detegován fotometricky při 495 nm.

Vyhodnocení výsledků

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v softwaru Statistica 9 (StatSoft, USA). K porovnání hladiny mezi kontrolní a nádorovou skupinou byl použit Studentův

t-test. Hladina významnosti $P = 0,05$ byla zvolena jako signifikantní.

Výsledky a diskuse

Stanovení exprese genů

U linií PNT1A, 22Rv1 a PC-3 byla stanovena hladina potenciálních markerů karcinomu prostaty, PSA, Cav-1 a MT, na úrovni ribonukleové kyseliny (mRNA, obr. 1A, 2A a 3A) a proteinu (obr. 1B, 2B a 3B). Hladina mRNA byla vyjádřena jako relativní násobek oproti expresi ve zdravé tkáni. Modelem zdravé tkáně je buněčná linie PNT1A. Hladina exprese genu PSA byla více než dvojnásobně zvýšena u obou nádorových linií 22Rv1 a PC-3 ($P < 0,05$, obr. 1A). Nádorové linie tak mohou být použity jako vhodný model nádorové tkáně. Hladina caveolinu-1 byla u primárního tumoru (22Rv1) signifikantně nižší ($P < 0,001$) proti kontrole, u linie PC-3, odvozené z metastázy, byla hladina naopak trojnásobně zvýšena ($P < 0,001$, obr. 2A). Stejný trend, signifikantní na hladině $P < 0,04$, byl pozorován také u metalothioneinu třídy 2A (MT2A). U metalothioneinu třídy 1A (MT1A) byla hladina mRNA tohoto genu snížena (obr. 3A).

Stanovení proteinů

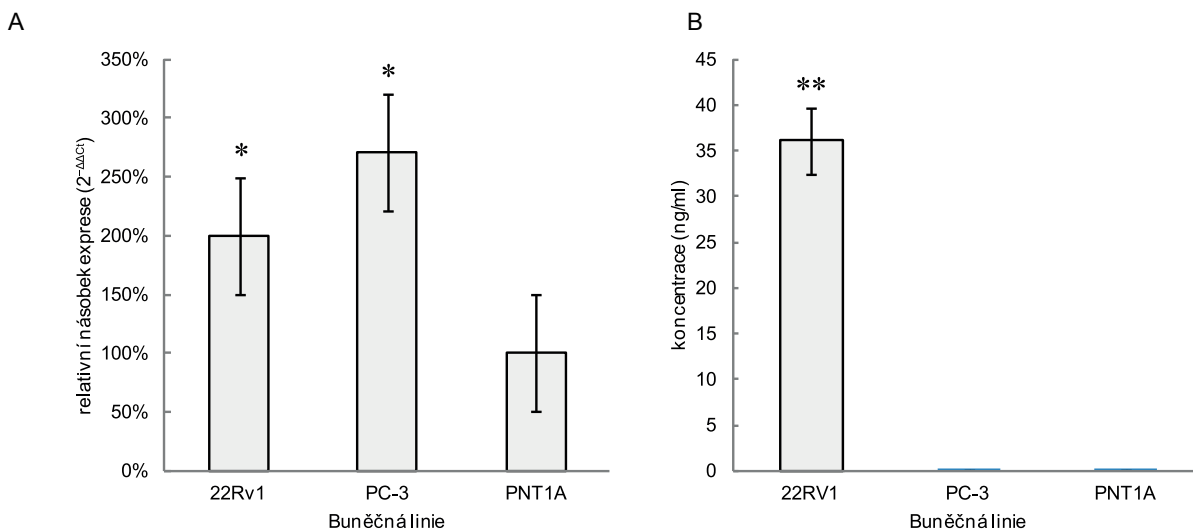
Nejprve byl v lyzátech buněčných linií stanoven PSA pomocí enzymoimunologické metody s limitem detekce 1 nM. Na proteinové úrovni byl PSA signifikantně zvýšen pouze u nádorové linie 22Rv1 ($36,2 \pm 0,1$ ng ml⁻¹ proti $0,053 \pm 0,008$ ng ml⁻¹ u PNT1A), což potvrzuje význam

tohoto proteinu jako markeru onemocnění. U linie PC-3 bylo zjištěno nesignifikantní zvýšení hladiny PSA na hodnotu $0,069 \pm 0,005$ ng ml⁻¹ (obr. 1B).

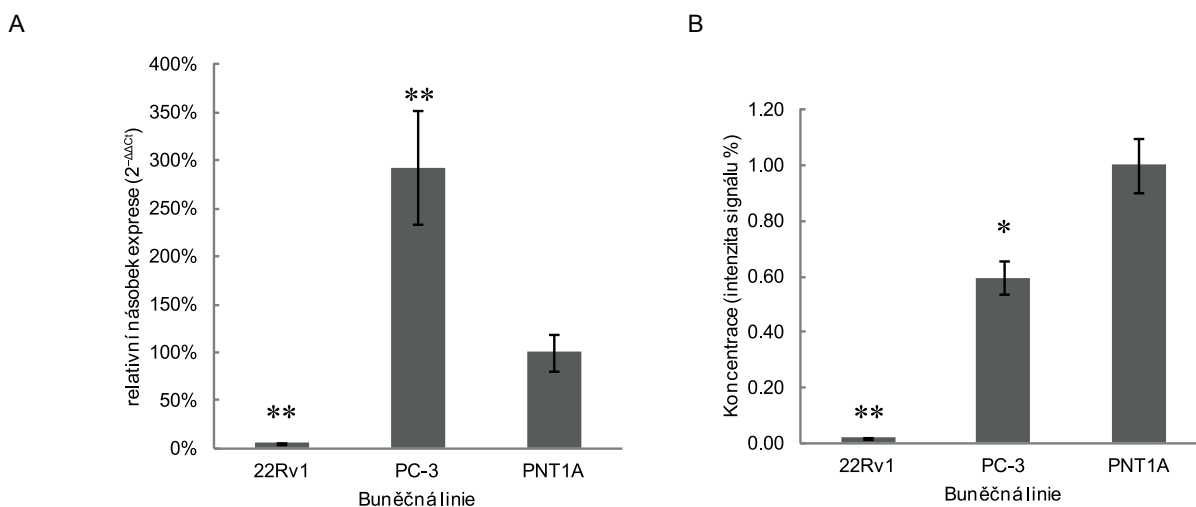
Pro stanovení caveolinu-1 byl stanoven limit detekce 0,2 ng ml⁻¹. Hladina caveolinu-1 na proteinové úrovni byla u obou nádorových linií snížena, přičemž u linie odvozené z primárního tumoru (22Rv1) bylo toto snížení významnější (50násobně, $P < 0,001$), než u linie PC-3 (hraničně signifikantní snížení na $P = 0,05$). Trend tohoto zjištění (výrazné snížení u 22Rv1 a hraničně signifikantní změna u PC-3, obr. 2B) je ve shodě s trendem pozorovaným na úrovni mRNA. Výsledky hladiny caveolinu-1 u pacientů potvrdily signifikantní rozdíly v jeho hladině při srovnání s kontrolami. Navíc byly pozorovány signifikantně pozitivní asociace s histologickým stupněm onemocnění²⁷.

Stanovení MT pomocí tzv. Brdičkovy reakce bylo provedeno následně po separaci paramagnetickými částicemi konjugovanými G proteinem³¹. V dřívějších studiích jsme prokázali, že metalothionein je díky své neobvyklé struktuře s vysokým obsahem cysteinu a nízké molekulové hmotnosti 6–10 kDa obtížně detegovatelný v matrici komplexního vzorku^{21,28}. Předřazení separačního mezikroku tak významně zlepšuje přesnost následné detekce.

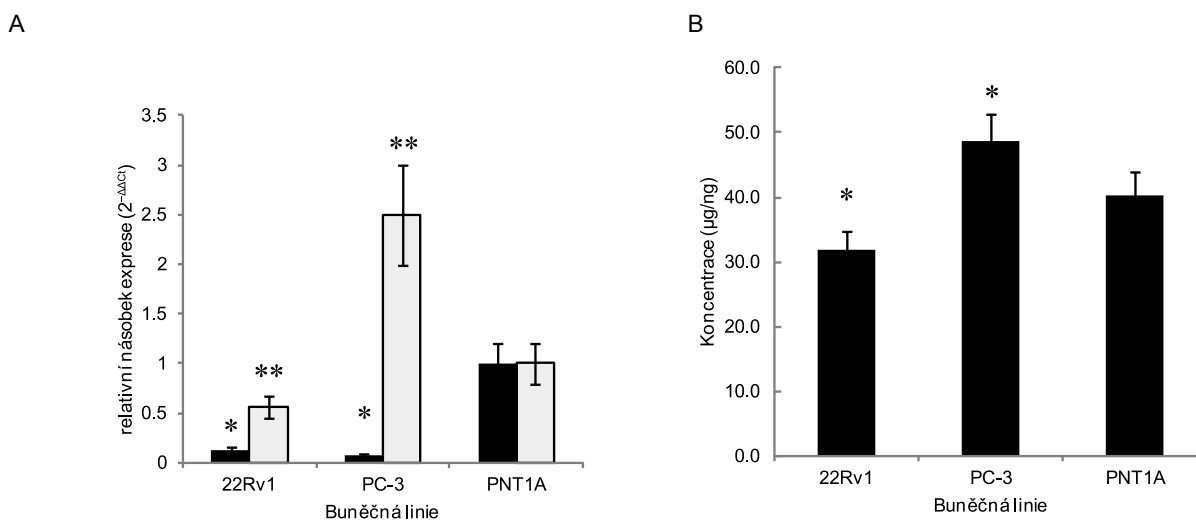
Protilátka k metalothioneinu se váže s vysokou afinitou ke G proteinu a MT může být následně selektivně izolován. Citlivost imunoseparace paramagnetickými částicemi je silně závislá na reakčních podmínkách, a proto bylo uskutečněno několik experimentů s cílem tyto podmínky optimalizovat. Byly testovány králičí a myší polyklonální protilátky. Koncentrace metalothioneinu ze standardizovaného vzorku detegovaná pomocí polyklonální protilátky byla vyšší (výťažnost 95 %), než koncentrace získaná jinými protilátkami (výťažnost 85 %), a proto byla dále



Obr. 1. Analýza prostatického specifického antigenu (PSA) u prostatických buněčných linií. (A) Relativní hladina PSA na mRNA úrovni v nádorových buněčných liniích 22Rv1 a PC-3 vztaheno k nenádorové buněčné linii PNT1A a (B) koncentrace PSA na proteinové úrovni v buněčných lyzátech. * významné na $P < 0,05$, ** významné na $P < 0,001$



Obr. 2. Analýza caveolinu-1 (Cav-1) u prostatických buněčných linií. (A) Relativní hladina Cav-1 na mRNA úrovni v nádorových buněčných liniích 22Rv1 a PC-3 vztaheno k nenádorové buněčné linii PNT1A a (B) koncentrace Cav-1 na proteinové úrovni v buněčných lyzátech. * významné na $P < 0,05$, ** významné na $P < 0,001$



Obr. 3. Analýza metalothioneinu (MT) u prostatických buněčných linií. (A) Relativní hladina MT na mRNA úrovni v nádorových buněčných liniích 22Rv1 a PC-3 vztaheno k nenádorové buněčné linii PNT1A, ■ MT1A, □ MT2A a (B) koncentrace MT na proteinové úrovni v buněčných lyzátech. * významné na $P < 0,05$, ** významné na $P < 0,001$

v experimentech používána polyklonální protilátka. Dále byl testován vliv teploty potřebné k uvolnění komplexu částice–protein. V rozsahu teplot 4–99 °C byla pozorována signifikantně vyšší koncentrace získaného proteinu při teplotě 70 °C. Při optimalizaci pH acetátového pufru bylo

jako nejvhodnější zvoleno pH 4,3. Před detekcí MT ve vzorku byla sestavena ze standardního 1 mM vzorku metalothioneinu kalibrační křivka z koncentrací 0 μM ; 1,56 μM ; 3,125 μM ; 6,25 μM ; 12,5 μM ; 25 μM ; 50 μM . Jako limit detekce byla určena koncentrace 100 pM (R.S.D. = 2,8 %).

Detailní analytický postup byl popsán v naší předchozí práci³⁰.

Hladina metalothioneinu na proteinové úrovni byla zvýšena u linie PC-3 (48,53 $\mu\text{g g}^{-1}$ celkového proteinu oproti 40,28 $\mu\text{g g}^{-1}$ u kontroly, $P < 0,05$), u linie 22Rv1 bylo popsáno statisticky významné ($P = 0,04$) snížení na hladinu 31,96 $\mu\text{g g}^{-1}$ (obr. 3B). Tato zjištění jsou ve shodě s hladinou mRNA a korelují také s předchozími výsledky²¹. Již dříve jsme publikovali zjištění, že izoforma metalothioneinu 2A je pro prostatickou tkáň výrazně dominantní, proteinová hladina MT opisuje stejný trend právě jako tato izoforma^{21,32}.

Závěr

Současná diagnostická omezení zhoubných nádorů prostaty poukazují na nutnost vývoje nových postupů k časnému odhalení agresivních forem tohoto onemocnění. Tato práce popisuje komplexní přístup k detekci potenciálních nádorových markerů s využitím rozdílných metod a s jejich optimalizací. Nadějnými geny jsou metalothionein a caveolin-1. Metalothionein díky jeho unikátní struktuře byl detegován za užití separace pomocí paramagnetických částic a následné elektrochemické detekce. Metalothionein i caveolin-1 vykazují stejné trendy na úrovni mRNA a proteinu – snížení hladiny u primárního nádoru a výrazné zvýšení u metastatické linie PC-3. Oba geny jsou tedy významně zvýšeny až u agresivní formy onemocnění. Praktickou použitelnost je nutné ověřit studii na reálných biotických vzorcích.

Poděkování patří Grantové agentuře České republiky za finanční podporu projektu NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068 a CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

LITERATURA

- Študent V., Grepl M., Král M., Hartmann I.: *Urologie pro praxi* 5, 214 (2006).
- Murad A. S., Down L., Smith G. D., Donovan J. L., Lane J. A., Hamdy F. C., Neal D. E., Martin R. M.: *Int. J. Cancer* 128, 1442 (2011).
- Gumulec J., Masařík M., Křížková S., Babula P., Hrabec R., Rovný A., Masaříková M., Kizek R.: *Klin. Onkol.* 24, 249 (2011).
- Schroeder F. H., Hugosson J., Roobol M. J., Tammela T. L. J., Ciatto S., Nelen V., Kwiatkowski M., Lujan M., Lilja H., Zappa M., Denis L. J., Recker F., Berenguer A., Maattanen L., Bangma C. H., Aus G., Villers A., Rebillard X., van der Kwast T., Blijenberg B. G., Moss S. M., de Koning H. J., Auvinen A., Investigators E.: *N. Engl. J. Med.* 360, 1320 (2009).
- Rigau M., Ortega I., Mir M. C., Ballesteros C., Garcia M., Llaurodo M., Colas E., Pedrola N., Montes M., Sequeiros T., Ertekin T., Majem B., Planas J., Ruiz A., Abal M., Sanchez A., Morote J., Reventos J., Doll A.: *Prostate* 71, 1736 (2011).
- Huang S. P., Bao B. Y., Wu M. T., Choueiri T. K., Goggins W. B., Huang C. Y., Pu Y. S., Yu C. C., Huang C. H.: *Prostate* 71, 1189 (2011).
- Minamimoto R., Uemura H., Sano F., Terao H., Nagashima Y., Yamanaka S., Shizukuishi K., Tateishi U., Kubota Y., Inoue T.: *Ann. Nucl. Med.* 25, 21 (2011).
- Djavan B., Kazzazi A., Dulabon L., Margreiter M., Farr A., Handl M. J., Lepor H.: *Eur. Urol. Suppl.* 10, E26 (2011).
- Gumulec J., Masařík M., Křížková S., Babula P., Hrabec R., Rovný A., Masaříková M., Adam V., Eckschlager T., Kizek R.: *Prakt. Lek.* 91, 471 (2011).
- Jamaspishvili T., Kral M., Khomeriki I., Student V., Kolar Z., Bouchal J.: *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 13, 12 (2010).
- Keizman D., Huang P., Antonarakis E. S., Sinibaldi V., Carducci M. A., Denmeade S., Kim J. J., Walczak J., Eisenberger M. A.: *Prostate* 71, 1608 (2011).
- Dwek M. V., Jenks A., Leatham A. J. C.: *Clin. Chim. Acta* 411, 1935 (2010).
- Canto E. I., Slawin K. M.: *Annu. Rev. Med.* 53, 355 (2002).
- Payne H., Cornford P.: *Urol. Oncol. Sem. Original Invest.* 29, 593 (2011).
- Ryvolova M., Krizkova S., Adam V., Beklova M., Trnkova L., Hubalek J., Kizek R.: *Curr. Anal. Chem.* 7, 243 (2011).
- Ryvolova M., Hynek D., Skutkova H., Adam V., Provaznik I., Kizek R.: *Electrophoresis* 33, 270 (2012).
- Adam V., Fabrik I., Eckschlager T., Stiborova M., Trnkova L., Kizek R.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 29, 409 (2010).
- Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R.: *Curr. Protein Pept. Sci.* 10, 360 (2009).
- Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M.: *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 627 (2002).
- Krizkova S., Ryvolova M., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Majzlik P., Hubalek J., Provaznik I., Kizek R.: *Electrophoresis* 32, 1952 (2011).
- Krizkova S., Fabrik I., Adam V., Hrabeta P., Eckschlager T., Kizek R.: *Bratisl. Med. J.* 110, 93 (2009).
- Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R.: *Curr. Med. Chem.* 18, 5041 (2011).
- Burgermeister E., Liscovitch M., Rocken C., Schmid R. M., Ebert M. P. A.: *Cancer Lett.* 268, 187 (2008).
- Ando T., Ishiguro H., Kimura M., Mitsui A., Mori Y., Sugito N., Tomoda K., Mori R., Harada K., Katada T., Ogawa R., Fujii Y., Kuwabara Y.: *Oncol. Rep.* 18, 601 (2007).
- Goetz J. G., Lajoie P., Wiseman S. M., Nabi I. R.: *Cancer Metastasis Rev.* 27, 715 (2008).
- Karam J. A., Lotan Y., Roehrborn C. G., Ashfaq R., Karakiewicz P. I., Shariat S. F.: *Prostate* 67, 614 (2007).
- Gumulec J., Sochor J., Hlavna M., Sztalmachova M., Krizkova S., Babula P., Hrabec R., Rovný A., Adam

- V., Eckschlager T., Kizek R., Masarik M.: *Oncol. Rep.* 27, 831 (2012).
28. Petrlova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5112 (2006).
29. Adam V., Petrlova J., Wang J., Eckschlager T., Trnkova L., Kizek R.: *PLoS ONE* 5, e11441 (2010).
30. Adam V., Blastik O., Krizkova S., Lubal P., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Chem. Listy* 102, 51 (2008).
31. Masarik M., Gumulec J., Sztalmachova M., Hlavna M., Babula P., Krizkova S., Ryvolova M., Jurajda M., Sochor J., Adam V., Kizek R.: *Electrophoresis* 32, 3576 (2011).
32. Krizkova S., Adam V., Eckschlager T., Kizek R.: *Electrophoresis* 30, 3726 (2009).

M. Sztalmachová^{a,b}, J. Gumulec^a, N. Cernei^{b,c}, M. Hlavna^a, O. Zítka^{b,c}, P. Babula^d, V. Adam^{b,c}, R. Kizek^{b,c}, and M. Masařík^{a,c} (^a *Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*, ^b *Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno*, ^c *Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Brno*, ^d *Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno*): **Prostate Specific Antigen, Metallothionein and Caveolin-1 as Markers of Formation and Development of Prostate Carcinom**

The current diagnostic limitations of prostate cancer have shown that the development of new approaches to early detection of aggressive forms of the cancer is very important. A comprehensive approach to detection of potential tumour markers using different methods and their optimization is described. We focused on caveolin-1 and metallothionein and the obtained results were compared with prostate specific antigen as a golden standard of prostate cancer markers. All the mentioned markers were detected on both the mRNA and protein levels in three types of prostate cell lines. Metallothionein and caveolin-1 rank among the promising markers in prostate cancer diagnosis, especially for distinguishing aggressive silent forms of the disease.