

Raport științific

privind implementarea proiectului PCE Idei nr. 342/2011 în perioada octombrie – decembrie 2011

Studii preliminare privind corelația dintre fluorescența quercetinei și capacitatea acesteia de a induce eliberarea de Ca^{2+} de celulele Jurkat T

INTRODUCERE

O serie de cercetări efectuate în ultimele decenii au pus în evidență efectele benefice pentru sănătate ale flavonoizilor naturali. Flavonoizii naturali se găsesc frecvent în fructe, legume și ceai și s-a constatat că posedă proprietăți cardioprotectoare, anticancer, antiinflamatoare și antialergice [1, review și referințele incluse]. Dintre acești flavonoizi, ne-am propus să studiem epigallocatechina-3-galată (EGCG) și quercetina (QC; 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone) și anume modul în care acestea interacționează cu celulele leucemiei umane, limfoblastii Jurkat T. S-a arătat că acești doi flavonoizi pot inhiba proliferarea celulară și induce apoptoza în diferite tipuri de cancer [1-7]. Atât EGCG cât și QC pot exercita un efect dual, pro- și anti-oxidant, depinzând de doza și durata tratamentului și numeroase studii indică faptul că celulele maligne sunt mult mai susceptibile decât celulele normale la citotoxicitatea acestor doi flavonoizi [3,5-7]. Această proprietate recomandă utilizarea celor doi flavonoizi fie în prevenirea diferitelor tipuri de cancer, în particular a leucemiei, fie pentru a crește eficiența chimioterapiei în tratamentul acestora. Întrucât datele disponibile până în prezent privind efectele acestor compuși asupra ciclului celular și apoptozei/necrozei în celulele Jurkat T sunt extrem de limitate și neomogene, ne-am propus să efectuăm o serie de studii care să clarifice mecanismele care stau la baza interacțiunilor acestor flavonoizi cu celulele leucemice, singuri sau în combinație cu agenți chimioterapeutici. Asemenea cercetări au fost începute în cadrul unui proiect anterior (Idei nr. 1138/2009) și rezultatele obținute ne-au determinat să continuăm acest domeniu de studiu și, chiar mai mult, au sugerat abordarea unei noi direcții de cercetare, respectiv încercarea de a elucida rolul canalelor de eliberare a calciului din ER/SR în inducerea apoptozei celulare. Dintre rezultatele obținute în proiectul anterior (soldate cu publicarea a 7 articole ISI și a 9 articole BDI) ar fi de menționat cele care pun în evidență rolul QC și EGCG în inducerea apoptozei în celulele Jurkat T, efectele combinate cu agentul chimioterapeutic menadionă (MD) sau efectul inhibitorului respirației mitochondriale rotenon [4,8,9]. Un rezultat extrem de interesant care, așa cum am menționat anterior, va constitui o nouă linie de cercetare, se referă la declanșarea unui semnal de calciu în urma aplicării a 50 μM QC în celulele Jurkat [10].

În această primă fază a proiectului, ne-am propus să examinăm modul în care quercetina, care este slab fluorescentă în soluții apoase, își modifică fluorescența în urma pătrunderii în celulele Jurkat T și să examinăm mai îndeaproape corelația dintre aplicarea quercetinei și semnalul de calciu generat. S-a arătat că QC se leagă de proteine celulare încă neidentificate și astfel se acumulează în mari cantități în citosolul și mitocondriile celulelor Jurkat T [10,11].

MATERIALE ȘI METODE

Culturi celulare. Limfoblastii de celule leucemice umane Jurkat T au fost cultivați în mediu MegaCell RPMI 1640 suplimentat cu ser fetal bovin 5%, 2 mM L-glutamină, 100 unitați/ml penicilină și 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycină, la 37°C într-un incubator umidificat cu atmosferă de CO_2 5%. Dihidratul de quercetină (Sigma) și fura-2/AM (Invitrogen) s-au dizolvat în dimetil sulfoxid (DMSO) și s-au păstrat la -20°C. Unde nu s-a specificat altfel, reactivii au fost cumpărați de la Sigma. Densitatea, viabilitatea și morfologia celulelor au fost urmărite prin cu un microscop cu contrast de fază. Viabilitatea a fost monitorizată cu testul de excludere cu albastru tripan. Celulele au fost numărate cu un hemocitometru.

Soluțiile saline. Soluția de tip extracelular (ECS) a constatat din 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, 10 mM glucoză, pH 7.2/NaOH. Soluția salină folosită pentru măsurători de lungă durată cu

celule permeabilizate (PCS) care au conținut 140 mM KCl, 4 mM NaCl, 0.14 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, pH 7.2/NaOH. Nivelul de Ca²⁺ liber în soluții a fost calculat cu programul WEBMAXCLITE v1.15.

Stabilirea concentrației [Ca²⁺]_i în celule intacte s-a realizat pe baza metodei lui Grynkiewicz et al. [12], așa cum a fost descris anterior [10], cu modificări minore. Celulele Jurkat au fost spălate de două ori în ECS și apoi au fost incubate cu 4 μM fura-2/AM for 10-15 min. la întuneric și la temperatura camerei (24-25°C) cu agitare ocazională, spălate de două ori în ECS, resuspendate în 2 ml ECS, numărate și ajustate la concentrația de celule dorită prin adăugarea de ECS. Celulele au fost incubate la 37°C pentru încă 45 min. în scopul de-esterificării complete a indicatorului de calciu. Celulele au fost apoi transferate într-o cuvă de cuarț de 2 ml care a fost menținută la 37°C sub agitare continuă. Viabilitatea celulară, controlată imediat înaintea înregistrărilor fluorescenței, a fost > 90% în toate probele de celule. Fluorescența s-a înregistrat cu ajutorul unui spectrofluorimetru Horiba Jobin Yvon, în urma excitației secvențiale la 340, 380 și 440 nm. Pulsurile de excitație au fost repetate la fiecare 20.28 s. Timpul de integrare a fost de 10 ms. Parametrii de emisie/excitație au fost 495 nm/340 nm și 495 nm/380 nm pentru fura-2, 560 nm/380 nm și 560 nm/440 nm pentru QC și 420 nm/380 nm pentru NADH. Quercetina s-a adăugat după ce semnalul de fluorescență a devenit stabil în urma unei perioade inițiale de pre-echilibrare (45 min. de înregistrări). Concentrația de Ca²⁺ intracelular, [Ca²⁺]_i, s-a calculat din ecuația [12]:

$$[Ca^{2+}]_{cyt} = \beta K_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

unde $R = F_{340}/F_{380}$ reprezintă raportul dintre emisia la 340 nm cu excitație la 380 nm, respectiv, R_{min} este raportul F_{340}/F_{380} obținut pentru o soluție nominal lipsită de Ca²⁺, R_{max} este F_{340}/F_{380} atunci când indicatorul de Ca²⁺ este saturat cu Ca²⁺, β este raportul dintre F_{380} în soluția fără Ca²⁺-free și F_{380} la saturație, și $K_d = 0.225 \mu M$ este constanta de disociere de indicator a Ca²⁺. F_{340} și F_{380} au fost corectate pentru autofluorescență. Calibrarea pentru R_{max} a fost realizată la sfârșitul fiecărei înregistrări prin adăugarea timp de 15-20 min. a 35 μM digitonină dintr-o soluție stoc de 100 mM în DMSO. Gradul de permeabilizare a celulelor a fost de 100% conform evaluării prin testul de excludere cu albastru tripan în determinări separate. Apoi, s-a adăugat 10 mM EGTA pentru calibrarea semnalului de fluorescență a QC în 15 nM Ca²⁺. După 20 min., s-au mai adăugat 10 mM EGTA pentru a ajunge la o concentrație de Ca²⁺ liber de 7 nM și după încă 20 min. s-a evaluat R_{min} . Celulele control au fost tratate în același mod cu excepția faptului că în locul indicatorului de calciu s-a adăugat o aceeași cantitate DMSO.

Spectroscopia de fluorescență. Suspensiile celulare au fost preparate la o densitate de ~10⁶ celule/ml în ECS după 3 spălări cu ECS. 2 ml de suspensie au fost transferați într-o cuvă de cuarț sub agitare continuă. Fluorescența s-a înregistrat la 37°C cu spectrofluorimetrul Horiba Jobin Yvon așa cum s-a descris mai sus pentru celulele încărcate cu fura-2. Primul spectru a fost înregistrat după o perioadă de pre-echilibrare de 45 min. Spectrele de excitație/emisie au fost colectate înainte și după adăugarea a 50 μM quercetină la momentele de timp indicate. După 1 oră de expunere la QC, s-au adăugat în cuvă 35 μM digitonină. Spectrele de fluorescență au fost înregistrate după 15 min., apoi, după adăugarea a 10 mM EGTA, s-a înregistrat o nouă serie de spectre după încă 15 min. În acest pas final, concentrația calculată de Ca²⁺ liber a fost de 15 nM. Celulele control au fost expuse la DMSO în loc de quercetină. Pentru **măsurătorile de autofluorescență**, probele control de celule au fost tratate la fel cu excepția faptului că în loc de fura-2 sau quercetină a fost adăugată o cantitate egală de DMSO. **Fluorescența de fond** a fost determinată în 2 ml de soluție salină adecvată și a fost scăzută din toate datele. **Corecția pentru semnalele de autofluorescență ale fura-2**, F_{340} și F_{380} s-a realizat prin scăderea fluorescenței celulelor control măsurată în condiții identice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe baza rezultatelor preliminare obținute anterior [10], am reluat experimentele privind apariția unui semnal de calciu în urma pătrunderii quercetinei în celulele Jurkat T intacte. Într-adevăr, măsurătorile de fluorescență a celulelor încărcate cu fura-2/AM, indică o eliberare susținută de calciu din rezervoarele intracelulare, generând astfel un semnal bifazic distinct de Ca²⁺ indus de 50 μM QC (Fig. 1a). Pentru a stabili cu certitudine dacă acesta este într-adevăr un semnal de calciu și nu un artefact, am folosit un inhibitor al canalelor de calciu, ruthenium red (RR). După cum se observă din Fig. 1b, în aceleași condiții experimentale, semnalul de calciu este inhibat. Mai mult, RR este un inhibitor specific al receptorului rianodinic (RyR) și nu al receptorului de inositol trifosfat (IP3).

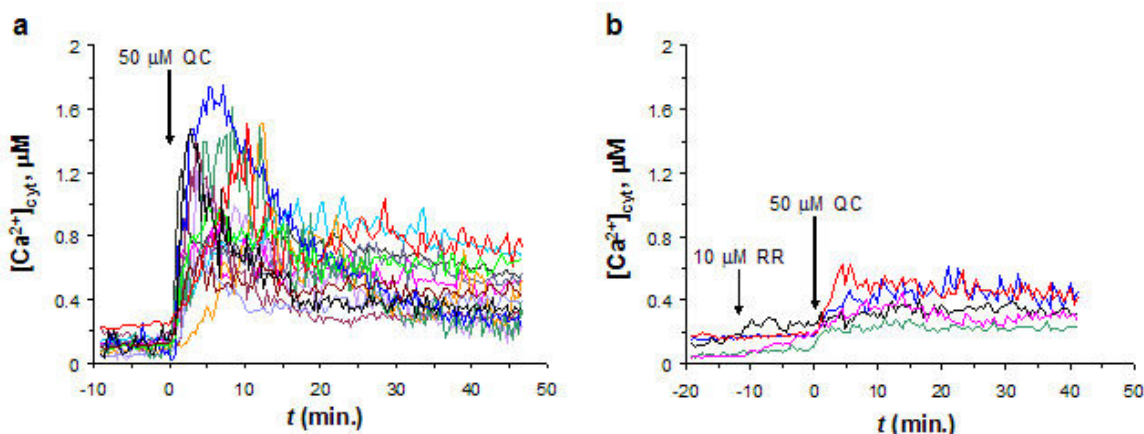


Fig. 1. Semnale de fluorescență induse de 50 μM QC în celulele Jurkat. Trasee Individuale de semnale de Ca^{2+} induse de 50 μM QC în celulele Jurkat încărcate cu fura-2 obținute în 14 experimente separate (a) și în prezența a 10 μM RR în 5 experimente independente (b). Semnalele au fost calibrate la sfârșitul fiecărui experiment Emisia a fost colectată la 420 nm, cu excitație la 360 nm. Semnalele au fost corectate pentru fluorescența de fond.

Spectrele de fluorescență măsurate într-o lucrare anterioară [10], au evidențiat o scădere a nivelului de NADH în celulele Jurkat T intacte expuse la 50 μM QC. Am făcut un pas mai departe în această cercetare și am măsurat nivelul de NADH, în condițiile modificării concentrației de calciu intracelular, respectiv am comparat evoluția acestui nivel în celule intacte, celule permeabilizate cu digitonină și apoi la adăugarea EGTA. Am constatat că, în toate aceste situații, în mod invariabil nivelul de NADH scade (Fig. 2).

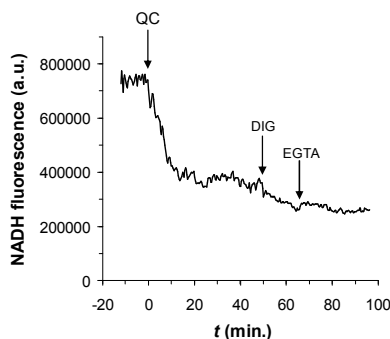


Fig. 2. Evoluția în timp a fluorescenței NADH după adăugarea în suspensia de celule Jurkat a 50 μM QC, apoi a 35 μM digitonină (DIG) și, în final, a 10 mM EGTA.

Am examinat în continuare, dezvoltând linia de cercetare anterioară [10] modul în care se modifică fluorescența quercetinei în funcție de concentrația de calciu din celule.

În cercetările noastre anterioare [10] am observat că lungimile de undă la care spectrele de excitație ale quercetinei intracelulare prezintă maxime se află în jur de 380 nm, respectiv 440 nm. Spectrul de emisie prezintă un maxim în jurul valorii de 540 nm. Ne-am propus să examinăm mai în detaliu evoluția acestor spectre în funcție de concentrația de calciu în celulă.

Pentru a caracteriza mai bine proprietățile fluorescente ale quercetinei intracelulare, am monitorizat modificările spectrelor de fluorescență ale acesteia în urma expunerii celulelor Jurkat intacte la 50 μM QC și după permeabilizarea celulei cu digitonină. Fig. 3 ilustrează un exemplu de spectre de fluorescență de emisie ale QC, în celule intacte și în celule Jurkat permeabilizate, obținute în urma excitării cu 380 nm și respectiv 440 nm. Toate spectrele prezintă un maxim prominent la $\sim 535\text{-}540$ nm specific formelor tautomerice ale quercetinei [13].

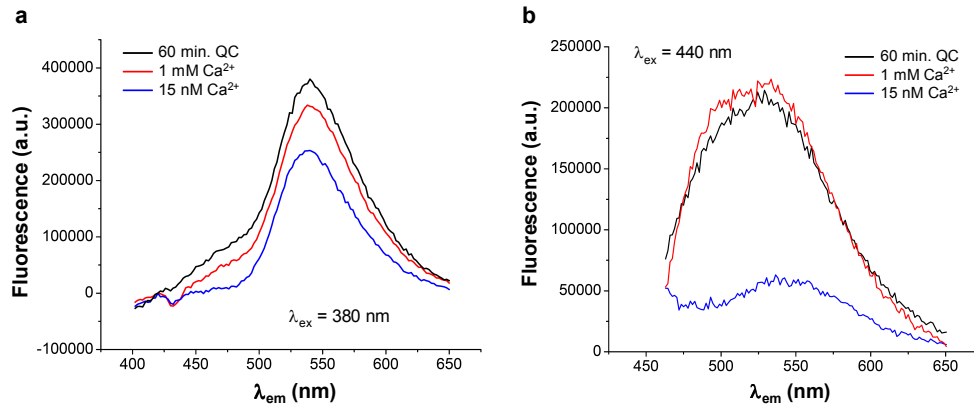


Fig. 3. Spectrele de fluorescență de emisie ale QC în celule Jurkat intacte și permeabilizate. Excitarea s-a făcut la 380 nm (a) și 440 nm (b). Spectrele au fost înregistrate la 60 min. după expunerea celulelor intacte la 50 μM QC (traseul negru), după permeabilizarea în 1 mM Ca^{2+} (traseul roșu) ori în 15 nM Ca^{2+} (traseul albastru). Aceste rezultate au fost obținute prin mediere pentru of 4 experimente reprezentative independente.

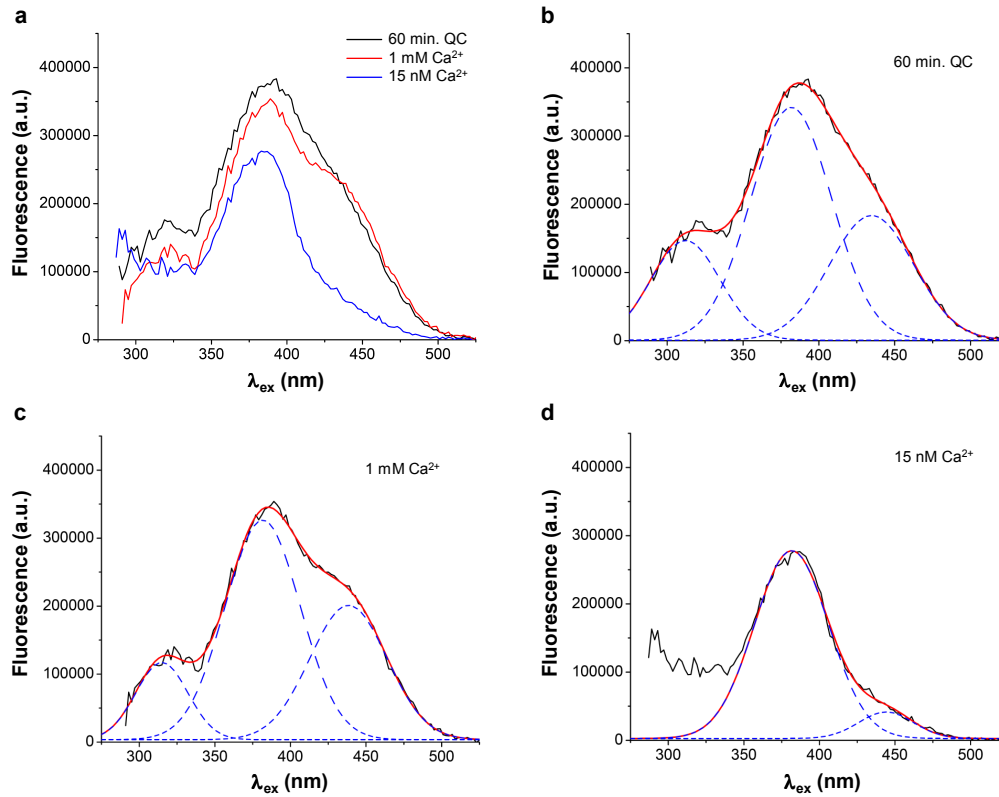


Fig. 4. Spectrele de fluorescență de excitare ale QC în celule intacte și permeabilizate. Emisia a fost înregistrată la 540 nm. **a**, Spectrele au fost înregistrate la 60 min. după expunerea celulelor intacte 50 μM QC (traseul negru), după permeabilizarea în 1 mM Ca^{2+} (traseul roșu) ori în 15 nM Ca^{2+} (traseul albastru). **b-d**, Deconvoluția Gaussiană a spectrelor de excitare prezentate în **a**. Curba de fitare (roșu) a fost obținută conform cu ecuația 4 cu parametrii din Tabelul 1. Curbele prezentate cu linii întrerupte sunt componentele Gaussiene descrise de ecuația 1. În **d**, nu a fost posibilă determinarea primei componente spectrale. Aceste rezultate sunt obținute în 4 experimente reprezentative independente.

În Fig. 4 este redat un set reprezentativ de spectre de excitare ale quercetinei în celule intacte și permeabilizate, precum și analiza prin intermediul unei descompuneri Gaussiene. În domeniul care ne interesează se află cele două benzi centrate pe ~ 380 nm și ~ 440 nm, respectiv (Fig. 4, Tabel 1). Datele de fluorescență au fost fitate cu ecuația:

$$y = y_0 + A_1/w_1/(\pi/2)^{1/2} \exp\{-2[(\lambda_{\text{ex}} - \lambda_1)/w_1]^2\} + A_2/w_2/(\pi/2)^{1/2} \exp\{-2[(\lambda_{\text{ex}} - \lambda_2)/w_2]^2\} + A_3/w_3/(\pi/2)^{1/2} \exp\{-2[(\lambda_{\text{ex}} - \lambda_3)/w_3]^2\} \quad (1)$$

unde y reprezintă fluorescența emisă la 540 nm, y_0 reprezintă o componentă de fluorescență reziduală, A_1, A_2, A_3 și $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ sunt amplitudinile și respectiv lungimile de undă ale celor trei maxime de excitare. Parametrii rezultați din cel mai bun fit sunt prezentați în Tabelul 1.

Studiile noastre anterioare [10] au arătat, în acord cu alte studii din literatură [11], că quercetina se acumulează în interiorul celulelor Jurkat și se leagă de proteine intracelulare, prezentând o fluorescență specifică cu emisia la ~540 nm.

Tabelul 1. Parametrii de fluorescență de excitare ai quercetinei intracelulare

| Condiții | y_0 | A_1 | w_1 (nm) | λ_1 (nm) | A_2 | w_2 (nm) | λ_2 (nm) | A_3 | w_3 (nm) | λ_3 (nm) |
|---------------------------|-------|---------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|
| 60 min. QC | 765 | 8359997 | 45.7 | 312.1 | 22845346 | 53.4 | 381.8 | 12725602 | 55.6 | 434.8 |
| 1 mM Ca ²⁺ | 3570 | 4902427 | 34.5 | 314.9 | 20175523 | 49.9 | 381.6 | 12646700 | 51.1 | 438.4 |
| 15 nM Ca ²⁺ | 2751 | n.d. | n.d. | n.d. | 16938566 | 49.1 | 381.6 | 1753912 | 36.1 | 444.1 |

n.d., nedeterminat

În experimentele efectuate în această etapă a proiectului am evidențiat modul specific în care se modifică spectrele de fluorescență de excitare și emisie ale quercetinei intracelulare în funcție de concentrația de calciu intracelular. În plus, am putut demonstra că la aplicarea quercetinei în celule Jurkat intacte se obține un semnal de calciu, iar inhibiția cu ruthenium red indică activarea unui receptor de tip rianodinic. De aici deducem că ar fi posibil ca proteina intracelulară de care se leagă quercetina să fie chiar receptorul rianodinic din reticulul endoplasmic. Ne propunem ca în cercetările ce urmează să studiem mai îndeaproape în ce măsură ipoteza noastră se confirmă.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Kuresh A. Youdim et al., Biol. Chem., Vol. 383, pp. 503 – 519, March /April 2002.
2. Johnson MK, Loo G. 2000. *Mutation Res.* 459: 211-218
3. Han DW et al. 2011. *Acta Pharmacologica Sinica*, doi: 10.1038/aps.2011.17
4. Baran I, Ganea C, Scordino A, Musumeci F, Barresi V et al. 2010. *Cell Biochem Biophys* 58: 169-179
5. Chen D et al. 2005. *Biochem Pharmacol* 69: 1421-1432
6. Jeong JH et al. 2009. *J Cell Biochem* 106: 73-82
7. Yen GC et al. 2003. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1215
8. Baran, I., C. Ganea, et al., *Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud*, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561
9. Baran, I., C. Ganea, et al., *Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud*, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561
10. Baran, I, C. Ganea I. Ursu, V. Baran, O Calinescu, A. Iftime, R. Ungureanu, I.T. Tofolean, *Rom. J. of Physics* Volume 56, no. 3-4, 388-398, 2011
11. M. Fiorani, A. Guidarelli, M. Blasa, C. Azzolini, M. Candiracci, E. Piatti, O. Cantoni, *J. Nutr. Biochem.* **21**, 397 – 404 (2010)
12. Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985).
13. Sengupta, B., Sengupta, P. K. Binding of quercetin with human serum albumin: a critical spectroscopic study. *Biopolymers* **72**, 427-434 (2003)

Director proiect,

Prof. Dr. Constanța Ganea