

Raport științific
privind implementarea proiectului PCE Idei nr. 342/2011 în perioada
decembrie 2013 – decembrie 2014

Raportul prezent este structurat astfel încât să urmărească Planul de realizare propus pentru etapa a patra a proiectului (Act Adițional 1/2014). În plus față de obiectivul asumat și îndeplinit, am realizat studii suplimentare, în continuarea unor cercetări efectuate în etapa a treia a acestuia, completându-le. Aproape toate rezultatele raportate în această etapă au fost comunicate la conferințe naționale și internaționale și publicate în reviste cotate ISI, articolele publicate fiind premiate de UEFISCDI în competiția 2014. Conținutul raportului este următorul:

1. Evaluarea capacității quercetinei de a induce eliberarea de calciu în limfoblaști Jurkat	
Introducere.....	p. 2
Materiale și metode.....	p. 3
1.1. Caracterizarea reglării <i>in situ</i> a receptorului RyR3 de către Ca^{2+} și quercetină; determinarea parametrilor de legare a situsurilor specifice în conformație deschisă/închisă a canalului.....	p. 4
1.1.1. Discriminarea între conformațiile închis/deschis ale canalului prin măsurători de fluorescență cu dublă excitare.....	p. 4
1.1.2. Reglarea RyR3 de către Ca^{2+} în conformație deschisă/închisă.....	p. 6
1.1.3. Reglarea RyR3 de către quercetină în conformație deschisă/închisă.....	p.10
1.2. Estimarea concentrației citosolice de quercetină și a fluxului de eliberare de calciu în celule intacte expuse la quercetină.....	p. 13
1.2.1. Nivelul intracelular de quercetină liberă.....	p. 13
1.2.2. Densitatea de RyR3 și fluxul de eliberare de Ca^{2+}	p. 15
1.3. Estimarea variațiilor cinetice ale concentrației intracelulare de Ca^{2+} după expunerea la quercetină sau menadionă în prezența chelatorului de calciu BAPTA/AM.....	p. 17
1.4. Discuții.....	p. 20
2. Efectele antiproliferative și sinergia quercetinei și menadionei în celulele de leucemie umană Jurkat T. Efectele în urma tratamentelor de lungă durată (24 h)	p. 21
2.1 Efectele antiproliferative ale MD și QC.....	p. 21
2.2. Efectul MD QC asupra $\Delta\psi_m$	p. 23
2.3. Discuție.....	p. 25
Referințe bibliografice.....	p. 25
Diseminarea rezultatelor.....	p. 28

1. Evaluarea capacității quercetinei de a induce eliberarea de calciu în limfoblaști Jurkat

INTRODUCERE

Într-o etapă anterioară a derulării proiectului, ale cărei rezultate au fost materializate printr-o publicație într-o revistă de prestigiu [1] am identificat faptul că flavonoidul quercetină (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona; QC) poate fi utilizat ca o probă fluorescentă eficientă pentru a distinge cu mare sensibilitate între conformațiile deschisă și închisă ale canalului RyR3 în celulele de leucemie umană Jurkat T. Astfel, am putut să cuantificăm activitatea RyR3 atât în celule intacte cât și permeabilizate și să caracterizăm dependența probabilității de deschidere de concentrația citosolică a Ca^{2+} ori a QC. Datele pe care le-am prezentat în acel studiu au indicat faptul că *in situ*, activitatea canalului RyR3 în condiții fiziologice este parțial suprimată (canal suprimat) în timp ce atunci când este expus la concentrații mari de Ca^{2+} citosolic (~1 mM) și chelare ulterioară a Ca^{2+} (canal rectificat) canalul este aproape total activat.

Măsurătorile noastre au relevat existența pe receptorul RyR3 a unui al doilea loc citosolic de legare a Ca^{2+} , de afinitate scăzută, care apare a fi operațional în starea de canal rectificat dar nu și în cea de canal suprimat Cu toate acestea, forma de clopot a dependenței de Ca^{2+} a probabilității de deschidere (P_{deschis}) a canalului rectificat [1] pare a fi remarcabil de asemănătoare cu cea observată în experiențele cu bistraturi lipidice [2-5], ceea ce subliniază ideea că datele pentru P_{deschis} în stare staționară nu sunt suficiente prin ele însele pentru a deduce numărul total de situsuri reglatoare.

S-a arătat, în experimente efectuate în bistraturi lipidice, că quercetina modulează activitatea de canalului RyR de tip 1 (izoforma specifică mușchiului scheletal [6]) și promovează eliberarea Ca^{2+} din SR (reticulul sarcoplasmic) purificat [7]. Noi am arătat anterior că quercetina (QC) induce un puternic semnal de eliberare a Ca^{2+} în celule Jurkat intacte [1, 8] și acest efect pare a fi mediat de către receptorii RyR3 [1]. QC poate, de asemenea, să inhibe reversibil ATPaza de Ca^{2+} a SR și preluarea ionilor de Ca^{2+} de către reticulul sarcoplasmic [9-11]. Această moleculă este slab fluorescentă în soluții apoase [12,13] dar prezintă o fluorescență specifică după internalizarea celulară [12, 8], ceea ce apare a fi în conexiune cu legarea de proteine mitocondriale [14], receptori rianodinici ai ER [1, 8] sau ținte nucleare [15]. Studii anterioare de modelare [16] bazate pe datele privind P_{deschis} în stare staționară obținute cu izoforma RyR1 incorporată în bistraturi lipidice artificiale [6] au sugerat faptul că RyR1 are două situsuri distincte pentru QC care sunt cuplate alosteric cu situsurile activatoare, respectiv inhibitoare, pentru Ca^{2+} . Totuși, în timp ce efectul stimulator al quercetinei asupra deschiderii canalului RyR de către Ca^{2+} a putut fi bine caracterizat, datele disponibile [6] nu au fost suficiente pentru a explica efectele asupra situsului inhibitor al Ca^{2+} [16]. Investigațiile noastre curente indică faptul că RyR3 posedă trei clase distincte de legare a QC [17]. Unul dintre cele trei situsuri stimulează activarea RyR3 în timp ce celelalte promovează închiderea canalului. Mai mult, arătăm că în cazul receptorului RyR3 locurile de legare pentru Ca^{2+} și QC sunt, de asemenea, cuplate alosteric și putem confirma unii dintre parametrii de legare a QC derivați pentru RyR1 [16].

În acest studiu investigăm mai în detaliu modurile distincte de activitate a canalului RyR3 prin evaluarea reglării acestuia de către quercetină și Ca^{2+} în stările de canal suprimat sau rectificat, atât în conformație deschisă cât și închisă. Ne-am propus, de asemenea, să studiem modul în care concentrația intracelulară de Ca^{2+} este afectată de prezența chelatorului de calciu BAPTA/AM după expunerea la quercetină sau menadionă. În plus față de obiectivele asumate în Planul de realizare pentru 2014, prezentăm în ultima parte a raportului date noi privind efectele antiproliferative și sinergia quercetinei și menadionei în celulele de

leucemie umană Jurkat T, extinzând investigațiile efectuate în anul 2013 (raportul de fază) la tratamente de lungă durată [18].

Rezultatele prezentate în acest raport au fost parțial publicate în reviste cotate ISI sau comunicate la conferințe naționale și internaționale (a se vedea capitolul Diseminare), urmând ca și celelalte să facă obiectul unei publicații ulterioare (manuscris în pregătire).

MATERIALE ȘI METODE. Celulele Jurkat T de leucemie umană (clona E6.1 din ECACC) au fost cultivate în mediu RPMI 1640 (Invitrogen 72400-021) conținând Glutamax-I și 25 mM HEPES, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 unități/ml penicilină și 100 μg/ml streptomicină, la 37°C, într-un incubator umidificat cu o atmosferă de 5% CO₂. Densitatea, viabilitatea și morfologia celulelor au fost examinate cu un microscop în contrast de fază. Viabilitatea a fost evaluată cu ajutorul testului de exclusiune albastru tripan utilizând un hemocitometru Bürker-Türk. Atunci când nu s-a specificat altfel, reactivii au fost cumpărați de la Sigma. Quercetina dihidrat (100 mM) și digitonina au fost dizolvate în dimetil sulfoxid (DMSO) și s-au păstrat la -20°C maximum 2 luni. EGTA dizolvată în NaOH a fost stocată la 0.75 M, pH 7.2/HCl, și ținută la 18°C pentru cel mult o lună. În unele experimente QC a fost proaspăt diluată în DMSO la 2, 10 ori 30 mM înaintea măsurătorilor. Soluția de tip extracelular (ECS) a conținut 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 10 mM glucoză, pH 7.2/NaOH. Soluția salină utilizată în măsurătorile de lungă durată cu celule permeabilizate (PCS) a 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 folosind softul WEBMAXCLITE v1.15. Atunci când a fost necesar, soluțiile de CaCl₂ au fost proaspăt preparate la concentrații de 50 mM, 1 M sau 6 M fie în PCS fie în ECS, după necesități. Pentru a evalua fluorescența QC și a NADH în celulele intacte sau permeabilizate, celulele cu creștere exponențială au fost spălate de trei ori în ECS sau PCS după caz, resuspendate în 2 ml ECS sau PCS, numărate și concentrația celulelor ajustată la cea dorită prin adăugarea eventuală de ECS sau PCS. Celulele au fost apoi transferate în spectrofluorimetru într-o cuvă de cuarț menținută la 37°C, sub agitare continuă. Viabilitatea celulară evaluată imediat înaintea măsurătorilor de fluorescență a fost în toate eșantioanele celulare >90%. Fluorescența a fost înregistrată într-un spectrofluorimetru Horiba Jobin Yvon echipat cu două monocromatoare, prin excitare secvențială la 380 și 440 nm. Pulsurile de excitare s-au repetat la fiecare 20-28 s. Timpul de integrare a fost de 10 ms. Parametrii de emisie/excitare au fost de 540 nm/380 nm și 540 nm/440 nm pentru fluorescența QC, și 450 nm/380 nm și 495 nm/440 nm pentru a estima interferența cu fluorescența NADH și FLV. Quercetina s-a adăugat întotdeauna după o perioadă inițială de preechilibrare (~45 min de înregistrare) atunci când semnalul de fluorescență a devenit stabil. Pentru permeabilizarea celulelor s-au adăugat 35 μM digitonină pentru un timp de cel puțin 15 min. În studiile cu celule intacte, celulele au fost preparate în ECS și stimulate cu 50 μM QC. La sfârșitul măsurătorilor, s-a adăugat în cuvă digitonină pentru 15-20 min., și apoi s-au adăugat 10 mM EGTA pentru calibrarea semnalului de fluorescență. S-a determinat Q_{\max} ca raportul F380/F440 obținut după un timp de înregistrare adițional de 20-30 min. O parte a acestor experimente s-a realizat în aceeași manieră cu excepția faptului că celulele au fost preîncărcate cu 4 μM fura-2/AM timp de 10-15 min. la întuneric și la 24-25°C, apoi spălate, resuspendate în ECS, și incubate la 37°C timp de încă 45 min. În studiile cu celule permeabilizate, celulele au fost preparate în PCS. După ~30 min. de înregistrări celulele au fost mai întâi permeabilizate timp de 15 min. și apoi stimulate cu 5 μM QC. În experimentele efectuate cu niveluri crescătoare de QC, până la 10 μM, rectificarea s-a realizat la sfârșitul experimentului prin adăugarea de CaCl₂ timp de 15 min. până la obținerea a ~0.75-2 mM Ca²⁺ citosolic, urmată de adăugarea de EGTA timp de 20-30 min. pentru a obține 100 nM Ca²⁺. Fluorescența de fond a fost determinată pentru 2 ml din respectiva soluție salină cu sau fără adăugarea agenților corespunzători și a fost apoi scăzută din toate datele înregistrate. Corecția pentru interferența NADH/FLV a fost efectuată pentru semnalele F380 și F480 de fluorescență a QC conform cu ecuația:

$$F(t) = F_{\text{rec}}(t) - F_{\text{rest}} \times F_i(t)/F_i^{\text{rest}}$$

unde cu F se notează valoarea corectată a F380 ori a F480 la momentul t , F_{rec} este valoarea înregistrată a F380 ori F480, F_i este valoarea corespunzătoare a fluorescenței intrinseci a NADH ori FLV în urma excitației cu 380 nm ori 440 nm, respectiv, și F_i^{rest} este valoarea mediată pentru 5 min. a F_i înaintea stimulării cu QC.

Fitarea datelor din Fig. 2 (a se vedea mai jos) s-a efectuat prin minimizarea sumei pătratelor normalizate derivate din fiecare dintre cele trei seturi de date ($F440_{\text{deschis}}$, $F440_{\text{închis}}$ și P_{deschis}), conform ecuației: $\sum_{i=1}^3 \left\{ \sum_{j=1}^{n_i} \left[(y_{\text{fit},j} - y_{\text{exp},j}) / y_{\text{fit},j} \right]^2 \right\} / n_i = \min .$, unde n_1 , n_2 și n_3 reprezintă numărul de

puncte ale datelor din fiecare set, iar y_{fit} și y_{exp} reprezintă valorile teoretice și, respectiv, experimentale ale variabilelor. Fitul din Fig. 3C a fost obținut utilizând programul Origin, versiunea 7.5. Dacă nu se menționează altfel, datele sunt prezentate ca $\text{media} \pm \text{e.m.s.}$ (e.m.s. - eroarea medie standard) *Microscopia confocală*. Celulele au fost co-incubate timp de 30 min. în mediu complet la 37°C cu markerii fluorescenți specifici pentru ER- și mitocondrii, ER-Tracker Red (2 μM) și, respectiv, JC-1 (1 μg/ml). ER-Tracker Red se leagă la canalele de K^+ ATP-senzitive care predomină în ER, în timp ce JC-1 se acumulează în mitocondriile active ca agregate fluorescente care emit în oranj-roșu. Celulele au fost apoi spălate de două ori în soluție salină (SS) caldă și resuspendate în SS conținând 10 μM quercetină, la o densitate de $\sim 10^6$ celule/ml. După o incubare suplimentară de 20-30 min., celulele au fost plasate imediat pe o lamă de microscop și sigilate prin lipirea cover slip-ului pe lamă. Imaginile au fost obținute cu un sistem de microscopie confocală cu scanare laser Carl Zeiss LSM710 având posibilități de detecție spectrală, folosind un obiectiv cu imersie Zeiss 63× 1.40NA. Pentru achiziția și analiza imaginilor s-a folosit un software Carl Zeiss Zen 2010 versiunea 6.0, și o parte a procesării imaginilor s-a realizat prin folosirea softului LSM Image Browser (Zeiss). Lumina excitatoare a fost furnizată de către liniile laser de lungimi de undă 405, 445, 488, și 543 nm. Emisia fluorescentă a fost detectată la 520-580 nm pentru quercetină (cu excitare la 405 nm ori 445 nm), 578-614 nm pentru JC-1 (cu excitare la 488 nm) și 605-663 nm pentru ER-Tracker Red (cu excitare la 543 nm). Pentru fiecare dintre fluoroforii analizați au fost obținute trasee distincte pentru a minimiza suprapunerea spectrală a emisiilor fluorescente. Viteza de scanare a fost setată la 1.58 microsecunde/pixel, iar apertura confocală a corespuns unei dimensiuni de retroproiecție de 1 Airy .

1.1. Caracterizarea reglării *in situ* a receptorului RyR3 de către Ca^{2+} și quercetină; determinarea parametrilor de legare ai situsurilor specifice în conformație deschisă/închisă a canalului

REZULTATE

1.1.1. Discriminarea între conformațiile închis/deschis ale canalului prin măsurători de fluorescență cu dublă excitare

Într-o lucrare anterioară [1, raport 2013] am arătat că raportul $Q = F380/F440$ al valorilor fluorescenței celulare specifice quercetinei emise la 540 nm în urma excitării la lungimile de undă 380/440 nm reflectă probabilitatea de deschidere a canalului de eliberare de calciu RyR3/ Ca^{2+} din reticulul endoplasmatic (ER), atât în celulele Jurkat intacte cât și în cele permeabilizate. Rezultatele prezentate în respectiva lucrare indică faptul că F380 și F440 cuantifică legarea quercetinei la canalele de eliberare a calciului deschise, și la canalele de calciu care se găsesc fie în conformație deschisă fie închisă. Astfel, F440 reprezintă contribuția aditivă a fluorescenței canalelor închise care au legat QC, care prezintă o bandă de excitare specifică la 440 nm, și a celei de fluorescență reziduală emisă de către canalele deschise care au legat QC, care se caracterizează printr-un maxim de excitare centrat pe 380 nm [1, 8].

În Fig. 1 sunt ilustrate câteva imagini reprezentative ale distribuției celulare a acestor două specii fluorescente ale quercetinei, observate în microscopie confocală. Ambele semnale fluorescente ale QC sunt co-localizate cu reticulul endoplasmatic (Fig. 1F-G), și apar ca un strat subțire larg împrăștiat cuprinzând (înconjurând) mitocondriile (Fig. 1A-C), în timp ce

mitocondriile pot fi distinse ca entități individuale având diametrul de câteva sute de nanometri (Fig. 1B).

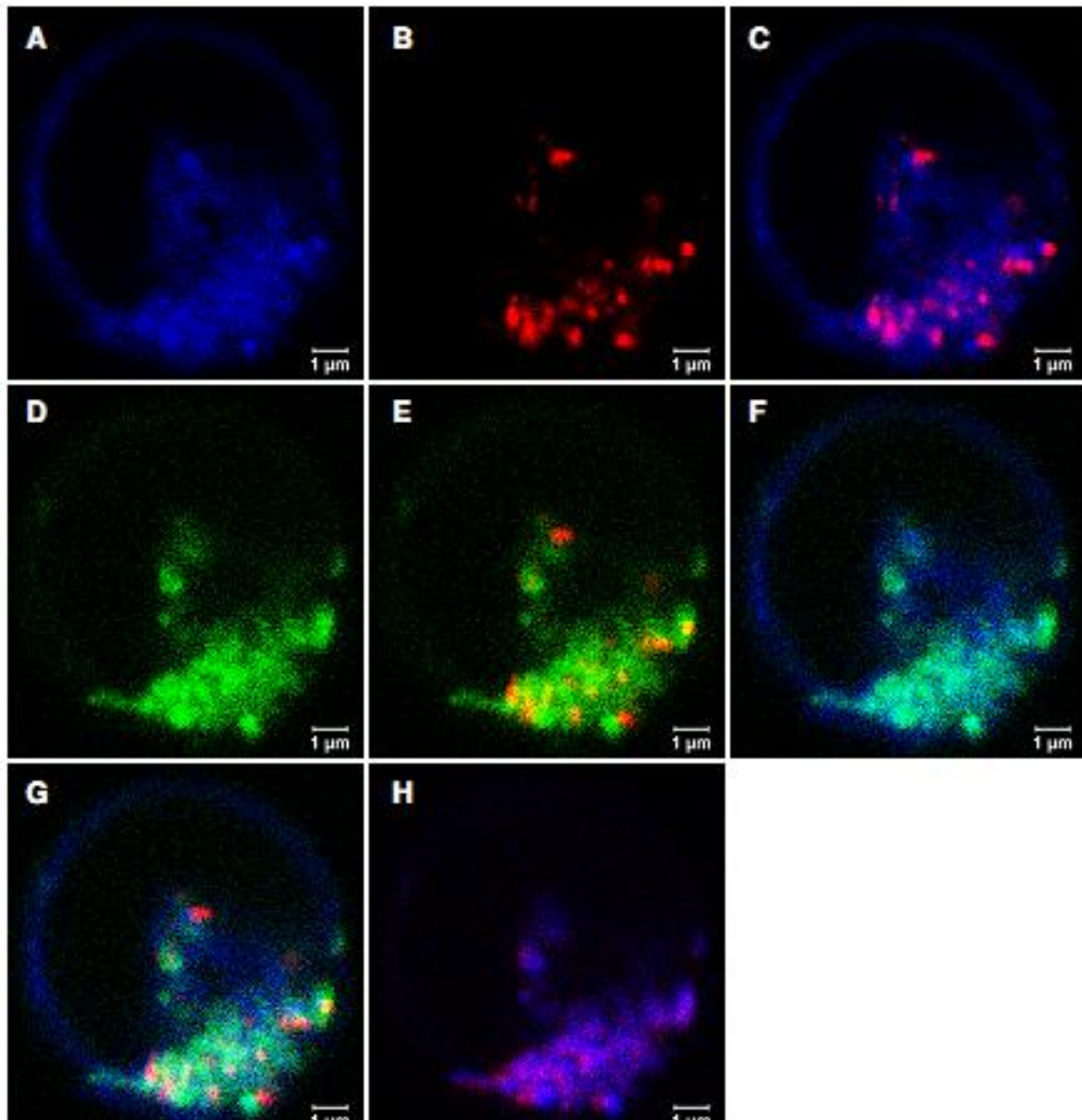


Fig. 1. Co-localizarea quercetinei fluorescente cu ER. Experimentele de microscopie confocală s-au efectuat așa cum s-a descris în “Materiale și Metode”. În **A-G**, fluorescența ER-Tracker Red, quercetinei (excitată la 405 nm) și JC-1 sunt reprezentate cu albastru, verde și roșu, respectiv. În **A**, **B** și **D** sunt reprezentate scanările individuale pentru fiecare specie fluorescentă. Panelurile **C**, **E** și **F** prezintă imaginile suprapuse pentru doi fluorofori selectați. Panelul **G** se obține prin suprapunerea semnalelor fluorescente ale tuturor celor trei fluorofori (ER-Tracker Red, JC-1, și QC excitată la 405 nm). Panelul **H** prezintă quercetina fluorescentă excitată la 405 nm (albastru) și 445 nm (roșu), respectiv.

Ambele specii fluorescente ale quercetinei au prezentat distribuții similare în ER, cu câteva regiuni dense în proximitatea strânsă ($<0.5 \mu\text{m}$) a mitocondriilor (Fig. 1D-E). În plus, o fracțiune ceva mai mare a canalelor RyR3 deschise a părut a fi localizată în pătura

exterioară a ER înconjurând mitocondriile (Fig. 1H), sugerând faptul că în condițiile noastre curente canalele RyR3 mai apropiate de membrană au avut o mai mare tendință de fi deschise. O mică fracțiune a fluorescenței quercetinei a părut a-și avea originea în nucleu (Fig. 1D-E), și ar putea proveni de la quercetina legată de receptorii rianodinici prezenți în sistemul membranelor nucleare. Într-o lucrare anterioară [1] am arătat că normalizarea raportului de fluorescență a QC, Q față de valoarea sa maximă, Q_{\max} , poate furniza o măsură cantitativă pentru evaluarea probabilității de deschidere a RyR3 *in situ* ($P_{\text{deschis}} = Q/Q_{\max}$). În mod ideal, Q_{\max} reprezintă raportul dintre valoarea maximă a fluorescenței canalului deschis care poate fi atinsă în urma excitării la 380 nm, și fluorescența emisă de către canalul complet activat în urma excitării cu 440 nm. Datele noastre au indicat că Q_{\max} este complet determinat de către doi parametri, și anume, lărgimea benzii de excitare la 380 nm, și diferența dintre lungimile de undă ale celor două benzi de excitare. Parametrul anterior pare a depinde de concentrația de celule din probă, dar într-o probă dată nu se schimbă odată cu condițiile de tratament [1].

Pentru a distinge între fluorescența emisă de canal în conformație deschisă sau închisă, trebuie mai întâi să subliniem faptul că atunci când toate canalele RyR3 dintr-o probă de celule sunt complet activate, raportul F380/F440 este egal cu Q_{\max} . Bazat pe invariabilitatea lărgimii benzii de excitare de 380 nm cu condițiile de tratament (Table 1 în [1]), o implicație importantă cu aplicabilitate generală pentru orice eșantion dat de celule este aceea privind faptul că raportul:

$$F440_{\text{deschis}} = F380/Q_{\max} \quad (1)$$

reprezintă contribuția la F440 a canalelor care se găsesc în configurație deschisă și contribuția corespunzătoare a canalelor în configurație închisă va fi atunci

$$F440_{\text{închis}} = F440 - F440_{\text{deschis}} \quad (2)$$

Analiza datelor indică faptul că $F440_{\text{deschis}}$ și $F440_{\text{închis}}$ sunt proporționale mai curând cu numărul de canale deschise și închise care leagă QC decât cu numărul total de molecule de QC legate la canalele deschise sau închise, respectiv. În consecință, fracțiunea de canale care se găsesc în conformație deschisă sau închisă poate fi ușor determinată prin împărțirea $F440_{\text{deschis}}$ ori $F440_{\text{închis}}$ la valoarea maximă a F440, $F440_{\max}$. Așa cum se va discuta mai jos, această limită superioară poate fi obținută la niveluri saturante de quercetină (>300 μM) care par a fi invariabile la concentrații de Ca^{2+} citosolic, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, activatoare sau inhibitoare.

1.1.2. Reglarea RyR3 de către Ca^{2+} în conformație deschisă/închisă

Utilizând abordarea fluorescentă sensibilă la conformație descrisă mai sus, am investigat mai detaliat mecanismul neașteptat de rectificare a canalului evidențiat de către măsurătorile noastre anterioare [1, raport 2013]. Am analizat proprietățile moleculare ale acestui aspect unic al reglării RyR3 evaluând dependența de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a fluorescenței emise de către canalul care a legat QC (Fig. 2A-B) în configurație închisă sau deschisă a acestuia, atât în stare suprimată cât și rectificată. În acest scop, am utilizat quercetina (5 μM) ca probă fluorescentă pentru RyR, și am evaluat $F440_{\text{deschis}}$ și $F440_{\text{închis}}$ în suspensii de celule permeabilizate la diferite niveluri descrescătoare de Ca^{2+} controlate prin adăugarea de CaCl_2 ori EGTA în trepte, în secvențe de durată de ~7-10 min. (a se vedea și Fig. 4 în [1]). Pentru a descrie starea quasi-staționară pentru fiecare nivel de agonist, s-au calculat valorile fluorescenței medii pentru ultimele 4-5 min. ale fiecărui pas de înregistrare. Pentru a obține starea de canal rectificat, celulele au fost mai întâi permeabilizate timp de 15 min. în PCS și apoi li s-au aplicat 5 μM QC, după care nivelul de Ca^{2+} a fost mai întâi adus în domeniul de 0.75 - 2 mM, și apoi s-a adăugat EGTA succesiv. Activarea maximă a canalului poate fi obținută pentru un domeniu final de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ situat aproximativ între 100 nM și 100 μM ([1], Fig. 2D în această referință). Starea de canal suprimat a fost obținută fie atunci când $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a

fost crescută (prin adăugare de CaCl_2) ori descrescută (prin adăugare de EGTA) de la un nivel inițial cuprins între 1 și 140 μM ([1], Fig. 2D în această referință).

Canalul suprimat în configurație deschisă (Fig. 2A) pare a fi reglat (controlat) de către o clasă de locuri de legare activatoare ale Ca^{2+} de mare afinitate ($A1$) și de către o clasă de locuri de legare a Ca^{2+} inhibitoare de mică afinitate (I) (discutate mai jos). Un tablou surprinzător diferit poate fi observat în cazul canalului rectificat deschis, care prezintă o a doua clasă ($A2$) de locuri de legare a Ca^{2+} activatoare de afinitate scăzută, în timp ce nu se pot distinge locuri de legare aparente inhibitoare (Fig. 2A). În conformație închisă, toate cele trei clase de locuri de legare a Ca^{2+} par a fi operaționale atât în canalele suprimate cât și în cele rectificate (Fig. 2B).

Pentru a substanția aceste concluzii, am analizat mai întâi datele pentru $F440_{\text{deschis}}$ obținute cu canalul inhibat (Fig. 2A), care au fost fitate cu ecuația:

$$y = F_{\text{Om}} \times x^{\text{HA1}} / (x^{\text{HA1}} + K_{\text{dA1}}^{\text{HA1}}) \times K_{\text{dI}}^{\text{HI}} / (x^{\text{HI}} + K_{\text{dI}}^{\text{HI}}) \quad (3)$$

în care y reprezintă $F440_{\text{deschis}}$ și x concentrația de Ca^{2+} liber citosolic. Cei mai buni parametri ai fitului au fost: $F_{\text{Om}} = 30385$, $K_{\text{dA1}} = 10.8$ pM, $\text{HA1} = 0.49$, $K_{\text{dI}} = 807$ mM, $\text{HI} = 0.26$. În Ec. 3, K_{dA1} și HA1 reprezintă constanta de disociere și coeficientul Hill pentru locul activator de legare a Ca^{2+} de mare afinitate, $A1$, și K_{dI} și HI reprezintă constanta de disociere și coeficientul Hill pentru locul de legare a Ca^{2+} inhibitor, I , în conformația deschisă a receptorului.

Câteva linii de evidență discutate mai jos sugerează că $F380$ și $F440$ sunt mai curând proporționale cu numărul de canale RyR3 care au legat quercetina decât cu numărul de molecule de QC legate la aceste canale. În plus, $P_{\text{deschis}} = Q/Q_{\text{max}} = F440_{\text{deschis}}/F440$. Atunci, intensitatea fluorescenței emise de către canalele care au legat QC în conformație deschisă și închisă poate fi exprimată ca:

$$F440_{\text{deschis}} = a N_{\text{QO}} = a N_{\text{Q}} P_{\text{deschis}} = a N_{\text{Q}} \tau_{\text{O}} / (\tau_{\text{O}} + \tau_{\text{C}}) \quad (4)$$

$$F440_{\text{inchis}} = a N_{\text{QC}} = a N_{\text{Q}} (1 - P_{\text{deschis}}) = a N_{\text{Q}} \tau_{\text{C}} / (\tau_{\text{O}} + \tau_{\text{C}}) \quad (5)$$

unde a = constant, N_{Q} reprezintă numărul de molecule de RyR3 care leagă QC pentru o anumită concentrație de QC, N_{QO} și N_{QC} reprezintă numărul de canale care leagă QC deschise și închise, respectiv, iar τ_{O} și τ_{C} reprezintă timpul de viață mediu pentru starea deschisă, respectiv închisă a canalului care a legat QC. Ec. 4 și 5 conțin aceeași constantă a deoarece aceasta este determinată de fluxul incident de fotoni și de caracteristicile spectrofluorimetrului, dar poate depinde și de absorbivitatea și de produsul cuantic al fluoroforului (QC) și de cea a RyR3. Deci, acest rezultat indică faptul că probabilitatea ca complexul RyR3-QC să emită fluorescență după excitarea la 440 nm să fie aceeași atât în conformația deschisă cât și în cea închisă. După însumarea Ec. 4 și 5 obținem

$$F440 = a N_{\text{Q}} \quad (6)$$

Astfel, normalizând $F440$ la valoarea maximă obținută la niveluri saturante de quercetină, care este:

$$F440_{\text{max}} = a N \quad (7)$$

unde N reprezintă numărul total de molecule de RyR3 funcționale dintr-o celulă, obținem fracțiunea de molecule de RyR3 care au legat QC pentru un nivel dat de Ca^{2+} citosolic. Datele pentru $F440_{\text{deschis}}$ obținute pentru canalul rectificat în configurație deschisă (Fig. 2A) au putut fi bine fitate cu ecuația:

$$y = F_{\text{O1}} \times x^{\text{HA1}} / (x^{\text{HA1}} + K_{\text{dA1}}^{\text{HA1}}) + (F_{\text{Om}} - F_{\text{O1}}) \times x^{\text{HA2}} / (x^{\text{HA2}} + K_{\text{dA2}}^{\text{HA2}}) \quad (8)$$

unde y reprezintă $F440_{\text{deschis}}$ și x concentrația de Ca^{2+} citosolic liber. F_{Om} a fost stabilit la 30385, valoarea maximă a $F440_{\text{deschis}}$ derivată anterior (Ec. 3). Cei mai buni parametri ai fitului au fost: $F_{\text{O1}} = 17014$, $K_{\text{dA1}} = 319$ pM, $\text{HA1} = 0.86$, $K_{\text{dA2}} = 1.09$ mM, $\text{HA2} = 2.57$. Ec. 8 descrie contribuția a două populații de canale deschise care au legat QC, și anume canalele în starea deschisă $O1$ și canalele în starea deschisă $O2$. Aceste două stări au ocupate situsurile pentru Ca^{2+} fie $A1$ fie $A2$, respectiv, ceea ce implică faptul că $A1$ și $A2$ acționează ca situsuri complementare, adică, Ca^{2+} nu poate să se lege de $A2$ dacă $A1$ nu este liber, și vice versa. În

plus, legarea Ca^{2+} la A1 ori A2 deschide canalul, și invers, disocierea Ca^{2+} de oricare dintre cele două situsuri închide canalul. Fie ca b_{A1} și b_{A2} să noteze capacitatea de legare a Ca^{2+} de către A1 și A2, respectiv, care poate fi descrisă ca:

$$b_{A1} = x^{HA1}/(x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) \quad (9)$$

$$b_{A2} = x^{HA2}/(x^{HA2} + K_{dA2}^{HA2}) \quad (10)$$

unde K_{dA1} , K_{dA2} , $HA1$ și $HA2$ indică constantele de disociere și coeficienții Hill pentru cele două locuri de legare A1 și A2, respectiv. Fluorescența emisă de către toate canalele deschise care leagă QC este atunci

$$F440_{deschis} = a [N_{QOm} b_{A1} P_{O1} + N_{QOm} b_{A2} (1 - P_{O1})] \quad (11)$$

unde N_{QOm} reprezintă numărul maxim de canale deschise care pot lega QC la un nivel citosolic de $5 \mu M$ QC, și P_{O1} este probabilitatea ca un canal deschis care a legat QC să fie în starea deschisă O1, astfel

$$P_{O1} = \tau_{O1}/(\tau_{O1} + \tau_{O2}) \quad (12)$$

unde τ_{O1} și τ_{O2} reprezintă timpul de viață mediu al canalului în starea deschisă O1 timpul de viață mediu în starea deschisă O2, respectiv. Cu alte cuvinte, τ_{O1} și τ_{O2} reprezintă timpul mediu în care un canal deschis care a legat QC are situsul, A1 respectiv A2 ocupat de către Ca^{2+} . Substituind Ec. 9, 10 și 12 în Ec. 11 obținem Ec. 8, în care

$$F_{Om} = a N_{QOm} \quad (13)$$

$$F_{O1} = F_{Om} \times P_{O1} \quad (14)$$

La niveluri saturante de Ca^{2+} , unde $b_{A1} = b_{A2} = 1$, abundența relativă a celor două populații în stare deschisă, respectiv O2 și O1, este egală cu $P_{O1}/(1 - P_{O1}) = \tau_{O1}/\tau_{O2}$. Utilizând $P_{O1} = F_{O1}/F_{Om} = 0.560$, obținem $\tau_{O1}/\tau_{O2} = 1.27$. Deoarece τ_{O1} și τ_{O2} sunt inversul constantei de viteză rate constant a disocierii Ca^{2+} de A1 și A2, respectiv, înseamnă că Ca^{2+} se disociază de A1 de 1.27 ori mai lent decât se disociază de A2. Trebuie menționat că datele obținute cu canalul inhibat nu au putut să fie fitate rezonabil de către Ec. 8. Astfel, rezultatele noastre sugerează faptul că canalul rectificat în conformație deschisă posedă două situsuri activatoare de legare a Ca^{2+} ambele accesibile Ca^{2+} citosolic sites, în timp ce situsul inhibitor pentru Ca^{2+} pare a fi cumva ecranat. În canalul suprimat care se află în conformație deschisă, par a fi expuse și funcționale numai situsul activator de legare a Ca^{2+} de mare afinitate și cel inhibitor de legare a Ca^{2+} .

Datele obținute pentru $F440_{închis}$ în cazul canalului suprimat în stare închisă (Fig. 2B) au prezentat o dependență de Ca^{2+} în formă de clopot inversat cu un platou neneglijabil într-un domeniu întins de $[Ca^{2+}]_{cit}$, ceea ce reprezintă un rezultat clar al legării Ca^{2+} la cele două situsuri activatoare și la cel inhibitor respectiv. În domeniul nivelului scăzut de Ca^{2+} ($< 0.01 \mu M$), A2 și I nu sunt ocupate și legarea Ca^{2+} la A1 descrește numărul de canale închise care au legat QC. În regiunea de platou ($\sim 0.01-100 \mu M Ca^{2+}$), A1 este saturat în timp ce A2 și I sunt neocupate. În final, la $>10 \mu M Ca^{2+}$, A1 este saturat și Ca^{2+} se poate lega atât la A2 cât și la I. Efectul dominant al situsului inhibitor de a închide canalul duce la o emisie de fluorescență crescută observată în domeniul de concentrație înaltă a Ca^{2+} . În consecință, datele au fost fitate cu ecuația:

$$y = F_{Cm} \{ 1 - [P_{C1} \times x^{HA1}/(x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) + (1 - P_{C1}) \times x^{HA2}/(x^{HA2} + K_{dA2}^{HA2})] \times K_{dI}^{HI}/(x^{HI} + K_{dI}^{HI}) \} \quad (15)$$

cu $F_{Cm} = 356096$, $P_{C1} = 0.907$, $K_{dA1} = 6.82 \text{ pM}$, $HA1 = 0.93$, $K_{dA2} = 13.2 \text{ mM}$, $HA2 = 0.68$, $K_{dI} = 4.095 \text{ M}$, $HI = 0.34$. Semnificația parametrilor referitori la situsurile de Ca^{2+} activatoare A1 și A2 este similară celei a parametrilor corespunzători care apar în Ec. 8. Astfel, P_{C1} și $(1 - P_{C1})$ reprezintă probabilitatea ca un canal închis care a legat QC având ambele situsuri A1 și A2 neocupate, să lege Ca^{2+} la A1 și la A2, respectiv. Astfel, raportul corespunzător al ratelor de asociere va fi $P_{C1}/(1 - P_{C1}) = 9.75$, ceea ce înseamnă că Ca^{2+} se asociază cu A1 de 10 ori mai rapid decât se asociază cu A2.

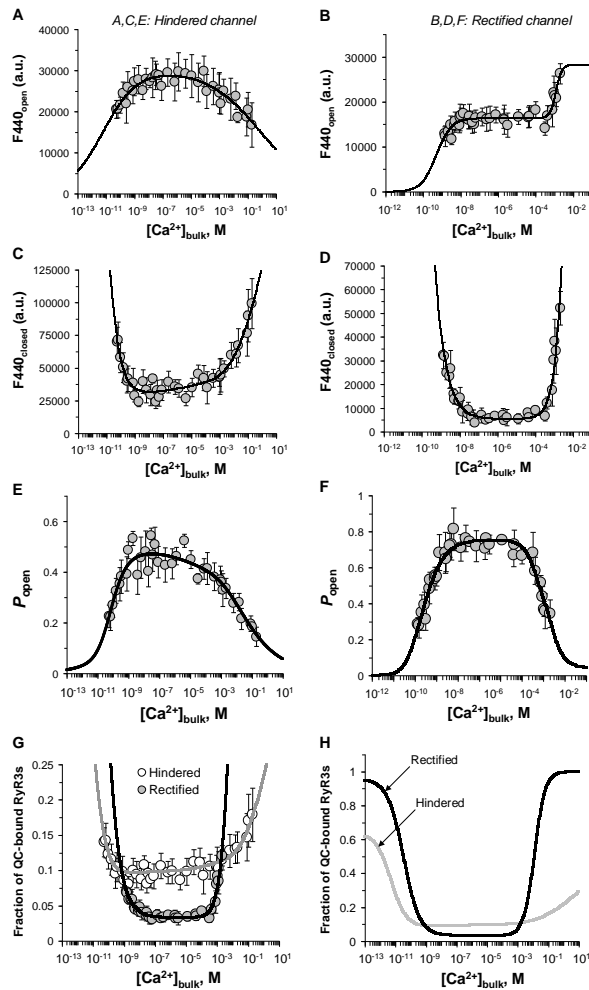


Fig. 2. Reglarea RyR3 de către Ca^{2+} citosolic *in situ*. Fluorescența quercetinei a fost monitorizată în celule Jurkat permeabilizate așa cum a fost descris în text (a se vedea și Fig. 4 în ref. [1]) (pentru canalul rectificat: $n = 24$ experimente, 150 puncte înregistrate; canalul suprimat: $n = 31$ experimente, 195 puncte înregistrate) **A**, Dependența de Ca^{2+} a fluorescenței emise de canalele care au legat QC în conformație deschisă ($F440_{\text{deschis}}$). Datele au fost fitate cu Ec. 3 (canalul suprimat) sau cu Ec. 8 (canalul rectificat). **B-C**, Dependența de Ca^{2+} a fluorescenței emise de canalele care au legat QC în conformație închisă ($F440_{\text{închis}}$). Datele din **B** au fost fitate cu Ec. 15 (canalul suprimat) sau cu Ec. 16 (canalul rectificat). În **C** sunt ilustrate curbele de fit cu linii continue. În **A-B**, s-au utilizat datele din eşantioane cu densități similare de celule. Corespunzător, media \pm e.m.s. pentru Q_{max} a fost 7.85 ± 1.36 în toate cele $n = 24$ determinări cu canalul rectificat, și 7.34 ± 1.03 în cele $n = 22$ experimente cu canalul suprimat realizate cu concentrații crescătoare de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ înaintea calibrării. Atunci când nu s-a putut obține rectificarea ($n = 9$), Q_{max} s-a calculat utilizând curba de calibrare descrisă în Fig. 1D în ref. [1]. **D**, Probabilitatea de deschidere (P_{open}), și **E-F**, fracțiunea de canale care au legat QC depind bifazic de Ca^{2+} . În **D**, P_{open} s-a calculat ca fiind raportul $F440_{\text{deschis}}/(F440_{\text{deschis}} + F440_{\text{închis}})$ obținut în experimentele descrise în **A-B**, plus alte experimente cu densități celulare ale eşantioanelor semnificativ diferite: canalul rectificat: $n = 45$ experimente, 205 puncte înregistrate; canalul suprimat: $n = 42$ experimente, 238 puncte înregistrate). Datele prezentate în **D** sunt echivalente cu cele obținute în Fig. 4C,D din [1], dar sunt fitate cu funcțiile corespunzătoare pe baza Ec. 3 și 15 (canalul suprimat) ori Ec. 8 și 16 (canalul rectificat). În **E**, fluorescența totală $F440$ a fost divizată cu valoarea maximă $F440_{\text{max}}$ indicată în Fig. 3A. Curbele de fit în **E-F** au fost obținute prin însumarea curbelor corespunzătoare pentru conformațiile deschisă și închisă arătate în **A** și **B-C**, respectiv, urmată de normalizarea la $F440_{\text{max}}$. Toate semnalele de fluorescență au fost corectate pentru interferența cu fluorescența NADH/FLV.

În plus, similar cu Ec.13, $F_{Cm} = a N_{CQ}$, unde N_{CQ} reprezintă numărul maxim de canale închise care pot lega QC la un nivel citosolic de 5 μM QC. Trebuie, de asemenea, să se observe că Ec. 15 sprijină ideea că situsul de Ca^{2+} inhibitor, care este responsabil de partea dreaptă ascendentă a curbei, funcționează independent de cele două situsuri activatoare.

Datele pentru $F440_{\text{închis}}$ obținute cu canalul rectificat în stare închisă au fost calitativ similare celor obținute cu canalul suprimat (Fig. 2B). Totuși, platoul a fost semnificativ mai scăzut decât înainte, indicând faptul că situsul A2 are numai un efect minor asupra $F440_{\text{închis}}$. În plus, fitul bazat pe Ec. 15 nu poate furniza valori realiste ale $HA2$, indicând faptul că situsul A2 are o afinitate redusă care ar putea fi cel puțin comparabilă cu afinitatea situsului I.

Prin urmare, datele au fost fitate cu ecuația:

$$y = F_{Cm} [1 - P_{C1} \times x^{HA1}/(x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) \times K_{dI}^{HI}/(x^{HI} + K_{dI}^{HI})] \quad (16)$$

cu $F_{Cm} = 356843$, $P_{C1} = 0.9807$, $K_{dA1} = 108.0$ pM, $HA1 = 0.93$, $K_{dI} = 4.84$ mM, $HI = 1.54$. În mod semnificativ, F_{Cm} obținut aici a fost virtual echivalent cu valoarea corespunzătoare obținută cu canalul suprimat. Mai mult, deoarece P_{C1} este foarte apropiat de 1, putem presupune că valorile estimate ale K_{dI} și HI ar trebui să reflecte destul de bine caracteristicile reale ale situsului inhibitor al Ca^{2+} . Astfel, raportul ratelor de legare corespunzând situsurilor A1 și A2 este $P_{C1}/(1 - P_{C1}) = 50.8$, ceea ce înseamnă că Ca^{2+} se leagă la A1 de 51 de ori mai rapid decât la A2. Dependența globală de Ca^{2+} a $F440_{\text{închis}}$ prezisă de Ec. 15 și 16 atât pentru canalul inhibat cât și pentru cel rectificat în prezența a 5 μM quercetină este ilustrată în Fig. 2C. Interesant, valoarea maximă a F_{Cm} apare a fi virtual aceeași atât în starea de canal suprimat cât și în cel rectificat.

Rezultatele obținute aici sunt consistente cu cele privind faptul că canalul RyR3 încorporat în bistraturi lipidice prezintă doi timpi de viață distincți pentru canalul deschis și doi sau trei pentru cel închis [5]. Mai mult, rapoartele celor doi sau trei timpi de viață în cazurile închis sau deschis obținute aici sunt în bună concordanță cu rapoartele publicate în referințele citate mai sus. Datele noastre indică faptul că canalul suprimat *in situ* are o distribuție unică pentru timpii de viață în starea deschisă și o distribuție dublă pentru cei în starea închisă, în timp ce distribuțiile în cazul canalului rectificat *in situ* prezintă fiecare câte două componente. Aceste rezultate, împreună cu faptul că forma caracteristică canalului RyR3 a dependenței P_{deschis} de Ca^{2+} raportată în cazul experimentelor cu bistraturi lipidice [2-5] a fost observată în experimentele noastre cu canalul rectificat și nu cu cel suprimat ([1], Fig. 2D aici), sprijină ideea că canalul RyR3 prezintă o conformație diferită în mediul de membrană artificială, corespunzând modului rectificat observat în experimentele noastre.

În plus, acest tip de măsurători de fluorescență selectivă în funcție de conformație întărește ideea reglării RyR prin cuplaj alosteric al situsurilor de legare ale Ca^{2+} și QC așa cum s-a propus pentru izoforma RyR1 [16], demonstrată clar prin dependența marcată de Ca^{2+} a fracțiunii de canale care au legat QC (Fig. 2E-F). Mai mult, așa cum s-a discutat mai înainte [1], dependența de Ca^{2+} a P_{deschis} derivată din datele de fluorescență ale $F440_{\text{deschis}}$ și ale $F440_{\text{închis}}$ descrise mai sus (Fig. 2D) indică aparent existența unui situs activator major de mare afinitate pentru Ca^{2+} și un situs inhibitor de afinitate scăzută pentru Ca^{2+} , atât în starea de canal suprimat cât și în cea de canal rectificat. Este deci evident că evaluarea diferențială a quercetinei legate la RyR3 în conformație deschisă sau închisă poate furniza informații exhaustive privind reglarea activității canalului de către diferiți liganzi.

1.1.3. Reglarea RyR3 de către quercetină în conformație deschisă/închisă

Dependența $F440_{\text{deschis}}$ și $F440_{\text{închis}}$ de nivelul de flavonoid (Fig. 3A-B) relevă trăsături interesante ale reglării de către quercetină a canalului RyR3 *in situ*. Pentru a înțelege mai bine modul în care au fost deduse ecuațiile care ne-au permis calcularea constantelor de disociere

și a coeficienților Hill, am reluat aici unele dintre reprezentările grafice găsite în experimentele prezentate în faza anterioară a raportului.

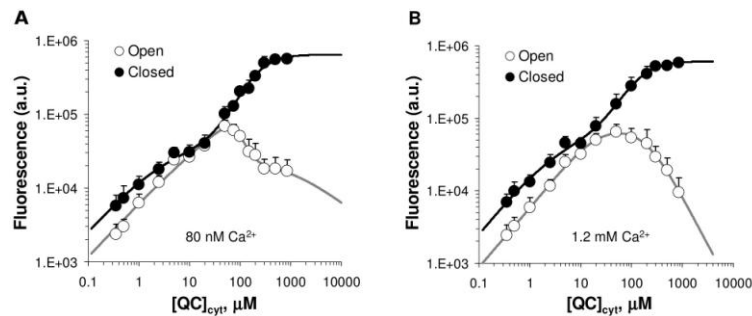


Fig. 3. Reglarea de către quercetină a RyR3 *in situ*. Dependența de QC a fluorescenței emise de către canalele care au legat QC în conformație deschisă ori închisă (cercuri deschise și închise, respectiv) în prezența a 80 nM Ca^{2+} citosolic (**A**) ori a 1.2 mM Ca^{2+} citosolic (**B**). Datele au fost obținute ca media \pm e.m.s. din 8-16 (**A**) ori 4-12 (**B**) determinări similar celor descrise în Fig. 5A în ref. [1]. Pe scurt, s-au înregistrat semnalele fluorescente F380 și F440 în celule permeabilizate la niveluri crescătoare de QC citosolic ajustate prin adăugarea secvențială de quercetină. Toate eșantioanele au avut densități de celule similare. Media \pm e.m.s. a Q_{\max} a fost (**A**) 7.41 ± 1.27 în $n = 8$ experimente, sau (**B**) 7.26 ± 1.47 în $n = 7$ experimente în care Q_{\max} a putut fi evaluat după rectificare la un nivel de 100 nM Ca^{2+} și 10 μM QC. În restul experimentelor Q_{\max} s-a calculat utilizând curba standard de calibrare (Fig. 1D în ref. [1]). Datele pentru conformațiile închisă și deschisă au fost fitate cu ec. 8 și, respectiv, 13 (curbele).

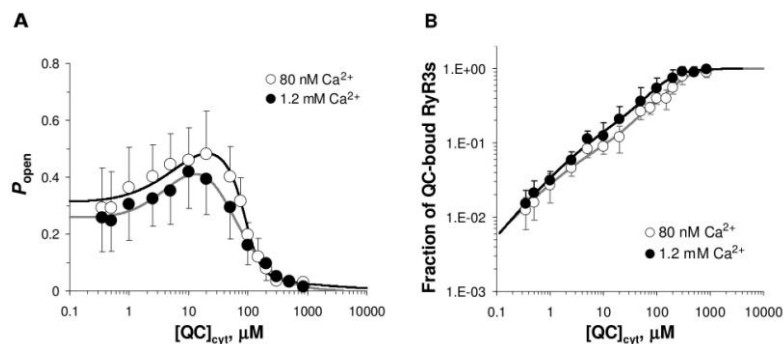


Fig. 4. Reglarea de către quercetină a RyR3 *in situ*. Dependența probabilității de deschidere a RyR3 de QC citosolic (**A**) și fracțiunea de canale care leagă QC (**B**) sunt derivate din datele arătate în **Fig. 3**. În **A**, P_{deschis} s-a calculat ca raportul $F440_{\text{deschis}}/F440$. Rezultatele sunt echivalente cu cele obținute în Fig. 5C,D în [1], dar fitul curent se bazează pe ec. 8 și ec. 12 ($P_{O1} = \tau_{O1}/(\tau_{O1} + \tau_{O2})$ - unde P_{O1} este probabilitatea ca un canal deschis care a legat QC să fie în starea deschisă $O1$, τ_{O1} și τ_{O2} reprezintă timpul de viață mediu al canalului în starea deschisă $O1$ timpul de viață mediu în starea deschisă $O2$, respectiv) din ref. [17]. În **B**, fluorescența totală F440 a fost divizată cu $F440_{\max}$ corespunzător indicat în text. Curbele continue arătate pentru 80 nM ori 1.2 mM Ca^{2+} s-au calculat prin însumarea celor două curbe de fit arătate în **A** ori **B**, respectiv, și apoi prin divizarea rezultatului la $F440_{\max}$ corespunzător. Toate semnalele fluorescente au fost corectate pentru interferența NADH/FLV.

Am studiat aici cazul canalului suprimat deoarece acesta prezintă mai mult interes din punct de vedere fiziologic, față de situația canalului rectificat care pare a fi mai apropiată de cea manifestată în bistraturi lipidice artificiale [1]. Rezultatele curente indică faptul că în conformație închisă a receptorului suprimat sunt funcționale două clase distincte de situsuri inhibitoare de legare a QC ($IQ1$ și $IQ2$), și că niciun situs activator nu este disponibil pentru legarea QC, pe când în conformație deschisă pare să opereze un situs activator (AQ). Trebuie

subliniat aici că, în acest punct, nu putem distinge neechivoc între modurile în care acționează quercetina pentru a promova fie închiderea fie deschiderea canalului (adică direct ori prin modulare alosterică). Totuși, ne referim la situsuri de QC activatoare sau inhibitoare în corespondență cu efectul lor stimulator sau inhibitor asupra activității canalului la o concentrație fixată de Ca^{2+} . Pentru a substanția concluziile menționate mai sus, am găsit mai întâi că datele de fluorescență pentru conformația închisă au fost bine fitate de ecuația:

$$y = F440_{\max} \times [P_{C1'} x^{H1}/(x^{H1} + K_{d1}^{H1}) + (1 - P_{C1'}) x^{H2}/(x^{H2} + K_{d2}^{H2})] \quad (17)$$

unde y reprezintă $F440_{\text{închis}}$ și x concentrația de QC citosolic liber. Parametrii derivați din cel mai bun fit sunt $F440_{\max} = 647652.3$, $P_{C1'} = 0.0615$, $K_{d1} = 3.08 \mu\text{M}$, $H1 = 0.78$, $K_{d2} = 202.0 \mu\text{M}$ și $H2 = 1.67$ în prezența a $80 \text{ nM } Ca^{2+}$ citosolic (Fig. 4A), și $F440_{\max} = 612816.6$, $P_{C1'} = 0.0934$, $K_{d1} = 3.43 \mu\text{M}$, $H1 = 0.87$, $K_{d2} = 127.4 \mu\text{M}$ and $H2 = 1.58$ în prezența a $1.2 \text{ mM } Ca^{2+}$ citosolic (Fig. 3B). Ec. 17 descrie contribuția a două populații de canale închise care leagă QC (și anume, canale în starea închisă $C1'$, și canale în starea închisă $C2'$). Aceste două stări au fie situsul inhibitor $IQ1$ ori cel inhibitor $IQ2$ ocupat, respectiv, ceea ce înseamnă că $IQ1$ și $IQ2$ acționează ca situsuri complementare, adică, QC nu se poate lega la $IQ2$ dacă $IQ1$ nu este liber, și viceversa. Fie ca b_{IQ1} și b_{IQ2} să noteze nivelul de legare a QC al $IQ1$ ori $IQ2$, respectiv, ceea ce se poate descrie astfel:

$$b_{IQ1} = x^{H1}/(x^{H1} + K_{d1}^{H1}) \quad (18)$$

$$b_{IQ2} = x^{H2}/(x^{H2} + K_{d2}^{H2}) \quad (19)$$

unde K_{d1} , K_{d2} , $H1$ și $H2$ indică constantele de disociere și coeficienții Hill ai celor două locuri de legare, respectiv. Fluorescența emisă de toate canalele închise va fi atunci

$$F440_{\text{închis}} = a [N b_{IQ1} P_{C1'} + N b_{IQ2} (1 - P_{C1'})] \quad (20)$$

unde N reprezintă numărul total de molecule RyR3 funcționale dintr-o celulă, $P_{C1'}$ este probabilitatea ca un canal închis să fie în starea închisă $C1'$, astfel

$$P_{C1'} = \tau_{C1'}/(\tau_{C1'} + \tau_{C2'}) \quad (21)$$

unde $\tau_{C1'}$ și $\tau_{C2'}$ reprezintă timpul de viață mediu pe care un canal închis îl petrece în starea închisă $C1'$ și în starea închisă $C2'$, respectiv. Substituind Ec. 18, 19 și 21 în Ec. 20 și utilizând Ec. 7, obținem Ec. 17. La niveluri saturante de QC, când $b_{IQ1} = b_{IQ2} = 1$, abundența relativă a celor două populații de canale închise care se găsesc în stările $C2'$ și $C1'$, respectiv, este egal cu $(1 - P_{C1'})/P_{C1'} = \tau_{C2'}/\tau_{C1'}$. Utilizând valoarea $P_{C1'}$ obținută din fit, obținem $\tau_{C2'}/\tau_{C1'} = 9.7$ în prezența a $1.2 \text{ mM } Ca^{2+}$ citosolic și $\tau_{C2'}/\tau_{C1'} = 15.3$ în prezența a $80 \text{ nM } Ca^{2+}$ citosolic, sugerând faptul că Ca^{2+} afectează rata legării QC la cel puțin un situs inhibitor pentru QC. Trebuie subliniat faptul că valorile $F440_{\max}$ obținute cu 80 nM ori $1.2 \text{ mM } Ca^{2+}$ au fost foarte asemănătoare. În consecință, considerăm că $F440_{\max}$ se va atinge atunci când toți receptorii RyR3 vor fi legat quercetina, idee care este de asemenea întărită de faptul că în această ipoteză obținem rezultate consistente privind nivelul citosolic de quercetină liberă și un bun acord între limita difuzională a nivelului citosolic de QC liber ($43.3 \mu\text{M}$) și nivelul aplicat în soluția extracelulară ($50 \mu\text{M}$). Datele pentru conformația deschisă (Fig. 3A-B) au fost fitate cu ecuația:

$$y = F440_{\max} x^H/(x^H + K_d^H) [P_{C1'} K_{d1}^{H1}/(x^{H1} + K_{d1}^{H1}) + (1 - P_{C1'}) K_{d2}^{H2}/(x^{H2} + K_{d2}^{H2})] \quad (22)$$

unde y reprezintă $F440_{\text{deschis}}$ și x concentrația de QC citosolic liber. În experimentele realizate cu $80 \text{ nM } Ca^{2+}$, $F440_{\max}$ a fost stabilit la 647652.3 așa cum s-a derivat din cazul conformației închise discutat mai sus, și parametrii corespunzători obținuți din cel mai bun fit a $K_d = 411.2 \mu\text{M}$, $H = 0.75$, $P_{C1'} = 0.500$, $K_{d1} = 10.11 \mu\text{M}$, $H1 = 0.55$, $K_{d2} = 88.2 \mu\text{M}$ și $H2 = 3.60$. Cu $1.2 \text{ mM } Ca^{2+}$, $F440_{\max}$ a fost setat la 612816.6 , și parametrii celui mai bun fit au fost $K_d = 17.0 \mu\text{M}$, $H = 1.14$, $P_{C1'} = 0.861$, $K_{d1} = 61.8 \text{ nM}$, $H1 = 0.69$, $K_{d2} = 199.8 \mu\text{M}$ și $H2 = 1.45$. În Ec. 22, termenul din paranteze descrie efectul de stingere al celor două situsuri inhibitoare $IQ1$ și $IQ2$ așa cum s-a discutat mai sus, în timp ce primul termen, $x^H/(x^H + K_d^H)$, ilustrează activarea canalului promovată de legarea QC la un situs activator pentru QC (AQ), care operează

independent de cele două situsuri inhibitoare ale QC. Aici K_d și H notează constanta de disociere și coeficientul Hill pentru situsul AQ . Invers, canalul se închide la disocierea QC de AQ . Descrierea furnizată de Ec. 22 este consistentă cu existența a două stări deschise ale canalului, $O1'$ și $O2'$, care au situsul AQ legat și fie $IQ1$ ori $IQ2$ nelegat, respectiv.

Parametrii caracteristici ai celor două locuri de legare ale QC inhibitoare în conformațiile deschisă și închisă derivați mai sus indică o schimbare semnificativă a afinității și a numărului de molecule care leagă QC. Astfel, aceste date indică faptul că în prezența a 80 nM Ca^{2+} citosolic, K_{d1} crește de trei ori în timp ce H_1 descrește de la 0.78 la 0.55 în urma deschiderii canalului. În aceleași condiții, K_{d2} descrește de 2.3 ori în timp ce H_2 crește de la 1.7 la 3.6, implicând faptul că în conformație deschisă QC se leagă la $IQ1$ cu o afinitate globală mai scăzută și cu cooperativitate negativă, și se leagă la $IQ2$ cu afinitate crescută și cooperativitate mai mare în comparație cu conformația închisă. Astfel, apare că 4 molecule de quercetină se leagă cooperativ de receptorul tetrameric la situsul $IQ2$ în conformație deschisă. Trebuie să se observe că în prezența a 1.2 mM Ca^{2+} citosolic parametrii de legare ai situsului $IQ2$ ($K_{d2} \sim 160 \mu M$, $H_2 \approx 1.5$) în conformația deschisă a canalului sunt similari celor obținuți pentru conformația închisă, în timp ce afinitatea pentru $IQ1$ crește de 5 ori în conformația închisă dar numărul de molecule de QC necesar pentru legarea de $IQ1$ pentru a promova închiderea canalului rămâne ≈ 1 în ambele configurații. Utilizând parametrii celui mai bun fit putem calcula abundența relativă a celor două populații de canale deschise care se află în stările $O1'$ și $O2'$ la niveluri saturante de QC, $P_{C1'}/(1 - P_{C1'})$, care este 6.2 în prezența a 1.2 mM Ca^{2+} citosolic și 1 în prezența a 80 nM Ca^{2+} citosolic. Ca și mai înainte, diferența dintre aceste două cifre indică un efect operativ al Ca^{2+} asupra disocierii QC de cele două situsuri inhibitoare ale QC. Astfel, legarea Ca^{2+} la situsul său inhibitor I pare a crește probabilitatea stării $O1'$ relativ la $O2'$, prin creșterea raportului ratelor de asociere ale QC corespunzând situsurilor $IQ1$ și $IQ2$, respectiv. Este demn de menționat faptul că parametrii de legare ai $IQ2$ atât în conformație deschisă cât și închisă sunt similari celor prezisați pentru locul de legare al QC care este cuplat alosteric cu locul de legare inhibitor al Ca^{2+} al receptorului RyR1 ($K_d = 86-210 \mu M$, $H = 4$) [1]. Mai mult, afinitatea situsului AQ stabilită aici este, de asemenea, similară cu cea estimată pentru RyR1 ($K_d = 300 \mu M$) într-unul dintre cele patru moduri de activitate ale sale [1]. Ca o consecință a reglării duale manifestate de către quercetină, $P_{deschis}$ a prezentat o dependență bifazică de quercetina citosolică la ambele concentrații testate de Ca^{2+} citosolic (Fig. 4A). La niveluri crescătoare de QC, fracțiunea de canale RyR3 care au legat QC a crescut progresiv în două etape principale care au fost aparent dominate de către legarea quercetinei la cele două situsuri inhibitoare în conformația închisă a canalului (Fig. 4B). Frațiunile de canale care au legat QC la cele două concentrații de Ca^{2+} citosolic au apărut a fi semnificativ diferite în domeniul de 2 - 200 μM QC (Fig. 4B), cu o fracțiune mai redusă de canale care au legat QC la 80 nM Ca^{2+} .

1.2. Estimarea concentrației citosolice de quercetină și a fluxului de eliberare de calciu în celule intacte expuse la quercetină

REZULTATE

1.2.1. Nivelul intracelular de quercetină liberă

Revăzând datele de fluorescență a QC obținute în cazul celulelor Jurkat intacte expuse la 50 μM QC (vezi Fig. 1 în [1]), remarcăm că acum putem evalua cinetica recrutării RyR3 de către quercetină și putem furniza prima estimare a nivelului citosolic de quercetină liberă în urma expunerii celulei la QC. Pentru a estima fracțiunea de canale care recrutează QC și

fluxul de eliberare a Ca^{2+} în urma expunerii celulelor intacte la $50 \mu\text{M}$ QC, fracțiunea de canale care au legat QC (f_b) a fost calculată ca fiind în fiecare moment:

$$f_b = F440/F440_{\max} \quad (23)$$

unde $F440_{\max} = 647652.3$ așa cum s-a discutat mai sus. F380 și F440 au fost măsurate în 19 experimente separate așa cum s-a descris în [1] (Fig. 1 în această referință). Traseele corespunzătoare ale P_{deschis} și f_b sunt prezentate în Fig. 5A și Fig. 5B, respectiv. Putem utiliza relația dintre f_b și $[\text{QC}]_{\text{cit}}$ stabilită mai sus (Fig. 4B) pentru a extrage $[\text{QC}]_{\text{cit}}$ la fiecare pas de timp. Conform acestor calcule, preluarea QC are loc în două faze distincte pe scări de timp diferite. Faza rapidă inițială (constanta de timp 1.04 min.) reflectă cel mai probabil un proces de transport prin membrana plasmatică întrucât nivelul corespunzător de saturație ($43.3 \mu\text{M}$) este apropiat de concentrația de QC aplicată în mediul extern ($50 \mu\text{M}$). Constanta de timp (34.5 min.) care caracterizează a doua fază indică un proces lent de acumulare a QC în citosol care poate fi în parte datorat eliberării flavonoidului din mitocondrii. Consistent cu aceasta, Fiorani et al. [14] au determinat faptul că preluarea quercetinei în celulele Jurkat este completă în mai puțin de 1 min. și că mari cantități de QC sunt reținute în formă legată în interiorul celulelor, în particular în interiorul mitocondriilor. Totuși, quercetina intramitocondrială a apărut a fi disponibilă pentru o redistribuire consecutivă în citosol, pe o scară lentă de timp similară așa cum am descris aici. Deci, în condițiile noastre, după o fază inițială de preluare, QC pare a fi eliberată gradat din organelle intracelulare, ridicând lent nivelul citosolic la $80.1 \mu\text{M}$ QC liberă (Fig. 6A).

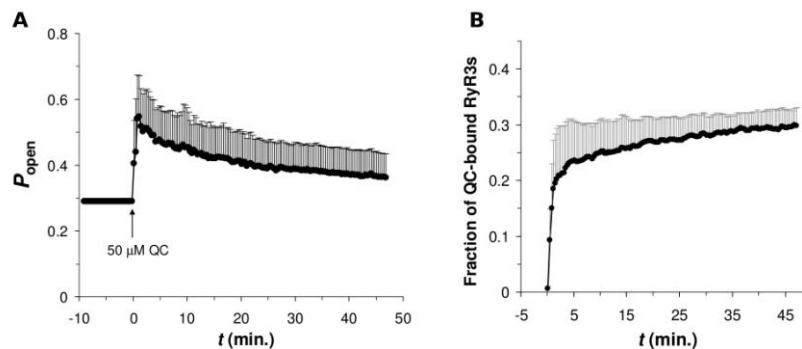


Fig. 5. A, Evoluția în timp a probabilității de deschidere, și **B**, a fracțiunii de canale legate de QC după adăugarea a $50 \mu\text{M}$ QC la suspensiile de celule Jurkat. **C**, Profilul cinetic al nivelului citosolic de QC liberă în celule intacte stimulate cu $50 \mu\text{M}$ QC la $t = 0$. În **A** și **B**, datele reprezintă media a 19 experimente realizate așa cum s-a descris în ref. [1] și în raportul de fază 2013 (Fig. 1 în referință). În **B**, F440 obținută din aceste măsurători s-a normalizat la $F440_{\max}$ derivat din datele din Fig. 3A.

O implicație particulară a acestor rezultate este faptul că faza de scădere a semnalului de Ca^{2+} evocat de quercetină în celulele intacte Jurkat (Fig. 1A în ref. [1]) este în mod esențial dirijată de către creșterea lentă a nivelului citosolic de quercetină liberă care inhibă progresiv mai mulți receptori RyR3. Trebuie menționat faptul că o evoluție în timp a preluării QC foarte asemănătoare (Fig. 6A, inset) a fost determinată recent într-o linie celulară diferită (HepG2) pe baza monitorizării creșterii fluorescenței quercetinei intracelulare excitate la 488 nm [15]. Bazat pe rezultatele conform cărora preluarea QC a fost inhibată de inhibitorul nonspecific al ATPazelor/fosfatazelor ortovanadat de sodiu ca și de scăderea temperaturii la 4°C , cinetica observată a fost atribuită influxului de quercetină mediat de un mecanism de transport activ [15].

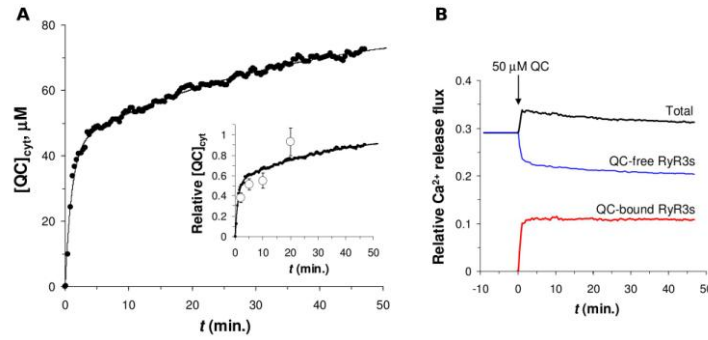


Fig. 6. Recrutarea canalelor RyR3 de către quercetină și preluarea flavonoidului în celule Jurkat intacte. În **A**, $[QC]_{cit}$ s-a estimat pe baza corespondenței numerice între datele arătate în Fig.3B și curba de fit prezentată în Fig. 4A cu 80 nM Ca^{2+} . Datele au fost fitate cu funcția $y = y_m - A \exp(-t/\tau_1) - (y_m - A) \exp(-t/\tau_2)$, cu $y_m = 81.9 \text{ } \mu\text{M}$, $A = 43.3 \text{ } \mu\text{M}$, $\tau_1 = 1.04 \text{ min.}$ și $\tau_2 = 34.5 \text{ min.}$ *Inset:* Datele în **A** au fost normalizate la y_m și comparate cu rezultatele obținute într-o linie celulară diferită, printr-o metodă diferită [15]. Datele de fluorescență arătate în Fig. 1C în [15] au fost normalizate la o valoare maximă (43.2), derivată dintr-un fit al datelor respective la curba noastră normalizată. **B**, Fluxul de eliberare a Ca^{2+} relativ în celule intacte stimulate cu $50 \text{ } \mu\text{M QC}$ (săgeata). Sunt prezentate fluxurile relative în cazul RyR3 care nu au legat QC (albastru) și care au legat QC (roșu). Fluxul total de eliberare (curba neagră) este obținut ca suma fluxurilor în canalele RyR3 care nu au legat și care au legat QC.

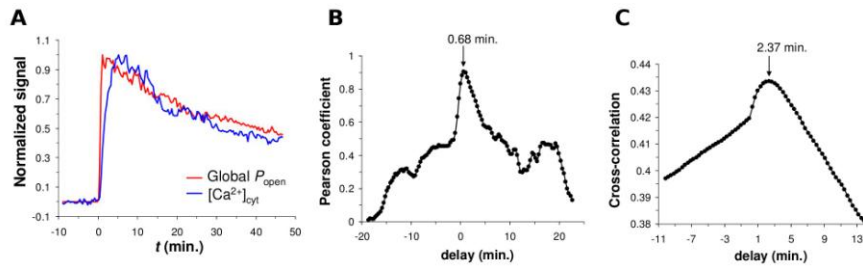


Fig. 7. A, Semnalele normalizate pentru $[\text{Ca}^{2+}]_{cit}$ și $P_{deschis}$ global ale RyR3 declanșate în celulele Jurkat expuse la $50 \text{ } \mu\text{M QC}$. Pentru a facilita comparația, datele $[\text{Ca}^{2+}]_{cit}$ luate din Fig. 1A în ref. [1] au fost corectate pentru linia de bază (122.0 nM) și apoi normalizate la creșterea maximă ($879.8 \text{ nM} - 122.0 \text{ nM}$). În mod similar, creșterea relativă a $P_{deschis}$ global a fost calculată a fi $(y - 0.2905)/(y_{max} - 0.2905)$, unde seriile de timp y au fost luate din panelul **D** (“total”) și $y_{max} = 0.3379$ este valoarea de vârf a lui y . **B**, Corelația Pearson și **G**, cross-corelația între $P_{deschis}$ global și $[\text{Ca}^{2+}]_{cit}$, ca funcție de întârzierea dintre cele două semnale. S-au folosit datele din **E** înregistrate după stimularea cu QC ($t > 0$). Întârzierea pentru care este atins maximul pentru fiecare funcție este indicată prin săgeți.

Astfel, în plus față de o difuzie pasivă lipofilă a polifenolului [19], pare a se produce de asemenea o preluare dependentă de energie [14, 20]. Cu toate acestea, în condițiile noastre, faza rapidă de preluare a QC se poate atribui cel mai probabil difuziei pasive prin membrana plasmatică, care ar necesita un domeniu fiziologic de temperatură pentru a se manifesta, în timp ce faza lentă de acumulare a QC este probabil susținută printr-un mecanism de transport activ în combinație cu o redistribuire lentă din mitocondrii.

1.2.2. Densitatea de RyR3 și fluxul de eliberare de Ca^{2+}

Pentru a estima fluxul de eliberare de Ca^{2+} mediat de RyR3 evocat de $50 \text{ } \mu\text{M QC}$ în celule intacte Jurkat, considerăm un curent de eliberare constant prin canalele individuale RyR3, ipoteză sprijinită de datele obținute în experimentele cu miocite ventriculare de

șobolan [21] ori cu fibre musculare scheletale de mamifer [22]. Curentul total de eliberare va fi atunci (i):

$$i = N i_0 [f_b P_{\text{deschis}}^b + (1 - f_b) P_{\text{deschis}}^f] \quad (24)$$

unde N este numărul total de RyR3 funcționale în interiorul unei celule de dimensiuni medii, i_0 este curentul unui receptor unitar RyR3, f_b și $(1 - f_b)$ reprezintă fracțiunea de canale care leagă, respectiv care nu leagă QC, și P_{deschis}^b și P_{deschis}^f sunt probabilitățile de deschidere ale canalelor care leagă, respectiv nu leagă, QC. Datele cinetice pentru P_{deschis}^b și f_b sunt luate din Fig. 5A și 5B, respectiv.

Investigațiile noastre anterioare [1] indică faptul că semnalul de eliberare de Ca^{2+} evocat de $50 \mu\text{M}$ QC în celule Jurkat intacte nu a dus nici la inactivare, nici nu a înlăturat inhibiția bazală a RyR3 în celule funcționale intacte, deoarece canalele RyR3 au putut fi complet activate via rectificare la sfârșitul măsurătorilor. Această observație, împreună cu uniformitatea observabilă a P_{deschis} într-un domeniu fiziologic întins de Ca^{2+} citosolic (Fig. 4D în [1]), sprijină puternic presupunerea că în timpul expunerii la QC, când $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ variază între ~ 0.1 și $\sim 1 \mu\text{M}$ (Fig. 1A în [1]), P_{deschis}^f nu variază semnificativ. Astfel, putem considera că $P_{\text{deschis}}^f = P_{\text{deschis}}^{\text{rest}} = 0.2905$ (valoare “inițială” indicată în Fig. 1F în [1]). Prin urmare,

$$i = i_{\text{max}} [f_b P_{\text{deschis}}^b + (1 - f_b) P_{\text{deschis}}^{\text{rest}}] \quad (25)$$

unde $i_{\text{max}} = N i_0$ este curentul maxim de eliberare stabilit când toți RyR3 sunt activați maximal (adică toate canalele au $P_{\text{deschis}} = 1$). După normalizare la i_{max} , obținem fluxul de eliberare relativ total (i/i_{max}), fluxul de eliberare relativ prin canalele care leagă QC ($f_b P_{\text{deschis}}^b$) și fluxul de eliberare relativ prin canalele care nu leagă QC ($(1 - f_b) P_{\text{deschis}}^{\text{rest}}$) ilustrate în Fig. 6B. P_{deschis} globală a canalelor RyR3 în timpul expunerii la QC reprezintă media valorilor lui P_{deschis} ponderată pe două populații distincte de canale care au legat QC și care nu au legat QC și este egală cu $f_b P_{\text{deschis}}^b + (1 - f_b) P_{\text{deschis}}^{\text{rest}}$. Creșterea relativă a P_{deschis} global este reprezentată în Fig. 7A. Se poate face o estimare aproximativă a valorii lui N presupunând un volum mediu al celulelor Jurkat $V_{\text{cel}} = 4\pi r^3/3 = 796 \text{ fl}$, unde $r = 5.75 \mu\text{m}$ este raza medie a celulelor Jurkat [23,24]. Densitatea RyR a fost estimată conform calculelor din [25], utilizând valorile numărului maxim de locuri de legare ale rianodinei (B_{max}) evaluate în membranele Jurkat [26]. Comparat cu alte tipuri de celule [27-33], celulele Jurkat umane par a prezenta o capacitate relativ redusă de legare a rianodinei [26]. Numărul maxim de locuri de legare specifice pentru rianodină determinat în membranele Jurkat, $B_{\text{max}} = 66 \text{ fmol per mg proteină}$ [26], se traduce într-o densitate celulară a RyR3, $D = B_{\text{max}}/c \times N_A \times \rho$, unde N_A este numărul lui Avogadro, $\rho = 1.05 \times 10^{-12} \text{ g/fl}$ este densitatea celulară presupusă a fi egală cu densitatea celulelor de CEM T-limfoblastoide umane [34] și cu a celor ale miocardului [35], și c este un factor de conversie care leagă B_{max} evaluat în preparate de membrană cu B_{max} evaluat în țesutul umed. Conținutul proteic al omogenatelor de inimă de șobolan a fost determinat a fi $106 \text{ mg proteină per 1 g de țesut umed}$ [32], de unde rezultă $c = 9.4$. Valori similare $c = 12.1$ și 5.8 pot fi determinate din măsurători ale B_{max} în miocardul de șoarece [28] și, respectiv, în inima de șobolan adult [31], comparând capacitatea de legare a rianodinei a omogenatelor crude cu cea a microzomilor SR. Prin urmare, în calculele curente s-a presupus un factor mediu de conversie de $c = 9$. Vom obține atunci $D = 4.64 \text{ receptori/fl}$ și $N = DV_{\text{cel}} = 3693$.

Din datele arătate în Fig. 5B, fracțiunea de canale recrutate de QC la momentul în care este atins vârful ratei globale de eliberare ($t_m = 60.83 \text{ s}$) este $f_{\text{bm}} = 0.185$, ceea ce înseamnă că la acest moment sunt recrutate de către quercetină $N_{\text{bm}} = f_{\text{bm}}N = 683$ canale. Probabilitatea de deschidere a acestor canale este $P_{\text{deschis}}^{\text{bm}} = 0.530$ (Fig. 5A). Creșterea maximă a concentrației citosolice de Ca^{2+} în timpul stimulării cu quercetină este $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = 758 \text{ nM}$ (Fig. 1A în [1]). Simulările numerice ale eliberării de Ca^{2+} în prezența unor medii tampon endogene și exogene mobile și fixe prezic faptul că această creștere ar necesita un curent de eliberare $i_Q = \Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}/r$, unde $r = 0.909 \text{ nM/pA}$ este o estimare aproximativă a creșterii de Ca^{2+} citosolic

per 1 pA de curent de eliberare [36] (de ex. Fig. 11C în această referință). Prin urmare, curentul unitar al canalelor care au legat QC este $i_0 = i_Q/N_{\text{bm}}/P_{\text{deschis}}^{\text{bm}} = 0.230$ pA.

Se consideră, în general, că rianodina se leagă de receptorul RyR în conformație deschisă, prin urmare estimarea densităților RyR din datele de legare a rianodinei trebuie privită cu prudență. Zhou et al. [25] au estimat o diferență de zece ori mai mare între densitățile RyR derivate din studii biochimice ale legării rianodinei și cele derivate din morfometria de imagini EM în cazul mușchiului scheletic de mamifer și amfibii. Deci, considerând $D' = 10D$ ca o limită superioară pentru densitatea RyR3 în celulele Jurkat, obținem un domeniu aproximativ $i_0 = 0.023 - 0.230$ pA pentru curentul de Ca^{2+} printr-un singur RyR3 *in situ*, și domeniul corespunzător pentru numărul total de receptori RyR3 într-o celulă, $N = 3693 - 36931$. Cea mai mare rată de curent de eliberare care poate fi produsă atunci când toți receptorii RyR3 dintr-o celulă sunt deschiși este $i_{\text{max}} = Ni_0 = i_Q/f_{\text{b0}}/P_{\text{deschis}}^{\text{b0}} = 849$ pA, indiferent de valoarea lui N . Curentul global de eliberare al RyR3 în celule în repaus poate fi evaluat aproximativ a fi $i_{\text{rest}} = P_{\text{deschis}}^{\text{rest}} i_{\text{max}} = 247$ pA, adică 29.05% din capacitatea de eliberare maximă stabilită atunci când toate canalele RyR3 sunt deschise. În urma stimulării cu 50 μM QC, fluxul de eliberare maxim observat la t_m este $i_m = P_{\text{deschis}}^m i_{\text{max}} = 287$ pA, unde $P_{\text{deschis}}^m = 0.338$ este valoarea P_{deschis} global la acel moment (Fig. 6B, curba notată “Total”), în timp ce curentul staționar final este $i_s = P_{\text{deschis}}^s i_{\text{max}} = 265$ pA, unde $P_{\text{deschis}}^s = 0.312$ este valoarea asimptotică a P_{deschis} global derivată din fitul exponențial al datelor pentru faza de scădere arătate în Fig. 6B (curba notată “Total”). Trebuie să se observe că i_{max} , i_m și i_s nu depind de N .

Rezultatele noastre curente indică faptul că celulele Jurkat posedă o mare capacitate intrinsecă de mobilizare a Ca^{2+} din depozitele intracelulare pe calea activării RyR3, deci chiar o creștere mică a fluxului de eliberare poate genera o supraîncărcare semnificativă cu Ca^{2+} citosolic. Ca o consecință, corelația dintre P_{deschis} global și $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a fost foarte puternică (Fig. 7A,B, raport 2013). Analiza de corelație Pearson și cross-corelație indică o întârziere de 0.68-2.36 min. între fluxul global de eliberare și semnalul de Ca^{2+} citosolic. În comparație cu valoarea corespunzătoare de 2.37-3.38 min. extrasă din corelația dintre $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ probabilitatea de deschidere a canalelor RyR3 care au recrutat QC, această cifră ar trebui să fie mai apropiată de timpul caracteristic al clearance-ului Ca^{2+} citosolic în celule Jurkat intacte.

În final, trebuie să subliniem faptul că o mare parte a datelor obținute în studiile noastre (studiul curent și [1, 17]) au fost explicate mai bine atunci când am considerat că $F440_{\text{deschis}}$ și $F440_{\text{închis}}$ sunt proporționale cu numărul de canale care au legat QC, deschise și închise, mai degrabă decât cu numărul total de molecule de QC legate de canalele deschise și respectiv închise. De exemplu, această abordare a furnizat o descriere mai consistentă și mai realistă a datelor privind dependența de QC a $F440_{\text{deschis}}$ și $F440_{\text{închis}}$, cât și a datelor privind fluorescența maximă atinsă în diferitele stări ori asupra nivelului estimat de quercetină citosolică în celulele intacte expuse la 50 μM QC. Însurate, toate rezultatele noastre prezentate aici și în articolul publicat anterior [1] sugerează faptul că proteina RyR3 poate acționa ca un donor de energie în complexul RyR3:QC, transferându-și energia de excitare moleculei de flavonoid pe calea mecanismului Förster de transfer rezonant de energie. Utilitatea practică a acestei proprietăți particulare a quercetinei care permite evaluarea directă a activității receptorului rianodinic este evidentă.

1.3. Estimarea variațiilor cinetice ale concentrației intracelulare de Ca^{2+} după expunerea la quercetina sau menadiona în prezența chelatorului de calciu BAPTA/AM

În studiile noastre anterioare am arătat că QC induce un semnal bifazic puternic de eliberare a Ca^{2+} în celulele Jurkat T, semnal mediat de activarea receptorilor rianodinici (RyRs) din reticulul endoplasmic (ER). În această etapă am investigat în ce măsură acest

semnal de calciu este afectat de reducerea concentrației calciului în mediul intracelular (prin incubarea cu chelatorul de calciu BAPTA/AM). Pe scurt, celulele Jurkat au fost spălate de două ori în soluția salină standard (SS) conținând 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 10 mM glucoză (pH 7.4/NaOH), incubate apoi timp de 10 min. cu indicatorul de calciu fura-2/AM (4 μM) la întuneric și la 23°C, au fost spălate de două ori în SS și incubate cu 50 μM BAPTA/AM timp de 20 min. la întuneric și la 23°C, centrifugate și resuspendate în SS. Eșantionul celular (1.5 ml) a fost apoi măsurat cu spectrofluorimetrul Horiba Jobin-Yvon la 37°C sub agitare continuă, așa cum am descris anterior [1, 17, raport 2013].

În absența BAPTA/AM, 50 μM QC adăugate suspensiilor de celule to Jurkat au evocat o creștere consistentă a concentrației Ca²⁺ citosolic ([Ca²⁺]_{cit}), cu un vârf la 878 nM în 4.5 min. după adăgarea extracelulară de quercetină (Fig. 8A). Această creștere a fost substanțial redusă în prezența BAPTA/AM (Fig. 8A). În condiții similare, nivelul de repaus al Ca²⁺ citosolic a fost de 122 nM și 48 nM în absența respectiv în prezența BAPTA/AM. Adăugarea quercetinei (50 μM) la celulele conținând BAPTA/AM a ridicat [Ca²⁺]_{cit} la un nivel relativ staționar de numai 167 nM.

Probabilitatea de deschidere a RyR ($P_{deschis}$) a prezentat o variație cinetică bimodală după adăugarea de quercetină, atât în absența cât și în prezența chelatorului de calciu (Fig. 8B). Totuși, în celulele încărcate cu BAPTA/AM s-a produs o activare completă, rapidă dar tranzitorie, a receptorilor rianodinici după adăgarea QC. Această fază inițială, care a durat câteva minute, a fost urmată de o scădere progresivă, lentă, care a fost virtual identică cu faza corespunzătoare observată în absența BAPTA/AM. Cu toate acestea, creșterea inițială în a $P_{deschis}$ a fost consistent mai scăzută în absența BAPTA/AM, când $P_{deschis}$ maxim a fost de 0.55, comparativ cu vârful corespunzător de 1.00 obținut la celulele încărcate cu BAPTA/AM. Aceste rezultate sunt consistente cu proprietatea caracteristică a canalelor de eliberare de Ca²⁺ de a fi inhibitate la niveluri înalte de Ca²⁺ care se dezvoltă în microdomeniul care înconjoară gura canalului în timpul fluxului de eliberare, astfel încât primul efect al chelatorului de calciu va fi acela de a reduce gradientul de Ca²⁺ la locul de eliberare și de prelungi astfel durata (timpul în care rămâne deschis) de deschidere a canalului. Totuși, porțiunea finală a traseului $P_{deschis}$ arătat în Fig. 8B este de fapt modulată de efectul inhibitor al quercetinei, care atinge niveluri înalte, inhibitorii, la acești timp de expunere [1, 17]. În consecință, este de așteptat ca scăderea finală a $P_{deschis}$ să fie similară în absența și în prezența BAPTA/AM. În mod clar, rezultatele noastre curente verifică această afirmație.

Ținând cont de faptul că rezultatele noastre anterioare au indicat că o componentă majoră a eliberării de calciu indusă de QC (reprezentând cca. o jumătate din fluxul total) este mediată de către receptorii rianodinici datele de față sprijină ideea conform căreia doar o parte minoră a creșterii [Ca²⁺]_{cit} induse de QC ar putea fi asociată cu un influx de calciu prin membrana plasmatică. Un prim candidat pentru acest mecanism ar fi intrarea calciului operată de depozite, calea principală a Ca²⁺ care este activată prin depleția depozitelor de calciu din ER. Se poate conchide că restul fluxului de Ca²⁺ care participă la semnalul de calciu evocat de quercetină este cel mai probabil transportat prin receptorii de inozitol trifosfat (IP₃Rs) din ER. Expunerea celulelor Jurkat la menadionă (MD) a indus numai un răspuns marginal de calciu. Astfel, în urma adăugării a 100 μM MD, [Ca²⁺]_{cit} a crescut de la un nivel de repaus de 140 nM la o valoare staționară de 187 nM în 15 min. de la expunere (Fig. 12). Rezultatele obținute cu diferite niveluri ale expunerii (50 μM și 250 μM MD) au confirmat capacitatea redusă a menadionei de a induce eliberare de calciu în această linie celulară. În consecință, efectul chelatorului de calciu BAPTA/AM nu a prezentat vreo relevanță ulterioară și de aceea nu a mai fost evaluat. Totuși, combinația quercetină/menadionă a păstrat o abilitate puternică de eliberare a Ca²⁺, care a fost redusă parțial comparativ cu cea a quercetinei aplicată singură (Fig. 10).

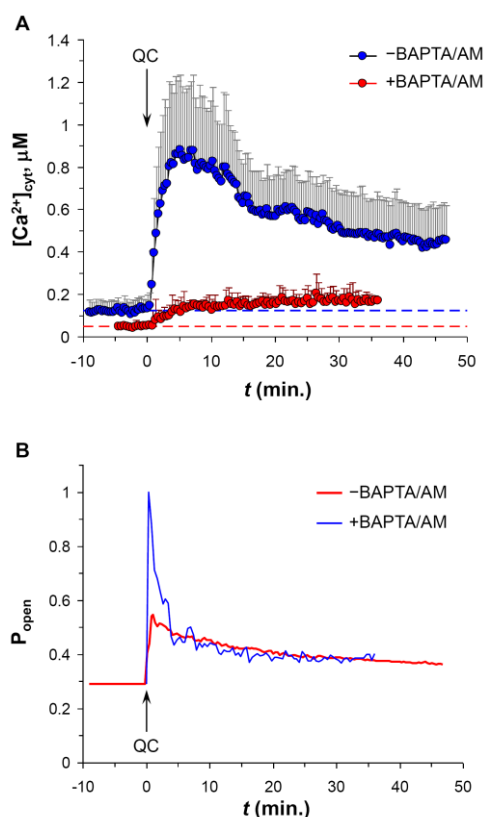


Fig. 8. Variațiile cinetice ale concentrației Ca^{2+} citosolic (A) și a probabilității de deschidere a receptorilor rianodinici, $P_{deschis}$ (B) induse de 50 μM quercetină în celulele Jurkat marcate cu fura-2, încărcate (+BAPTA/AM sau nu (-BAPTA/AM) cu chelatorul de calciu, BAPTA/AM.

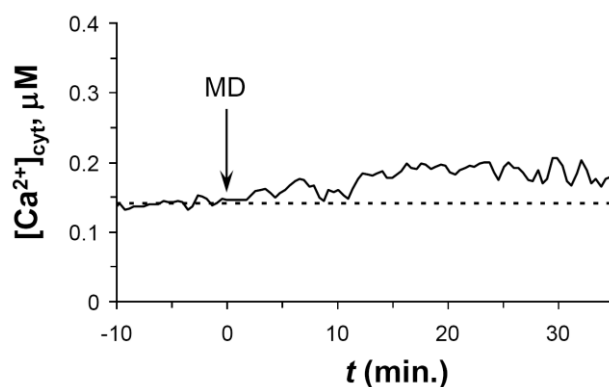


Fig. 9. Menadiona (100 μM) induce o creștere minoră a concentrației Ca^{2+} citosolic în celulele Jurkat marcate cu fura-2.

Astfel, în absența BAPTA/AM, QC (50 μM) și MD (100 μM) adăugate simultan suspensiei celulare au ridicat concentrația calciului citosolic de la 182 nM la 479 nM într-un minut de la adăugare, și nu s-a mai produs o descreștere ulterioară a $[Ca^{2+}]_{cit}$. În celulele încărcate cu BAPTA/AM stimulate cu aceeași combinație QC/MD, $[Ca^{2+}]_{cit}$ a crescut de la 69 nM la un nivel staționar de numai 147 nM, prezentând similarități clare cu traseul corespunzător de $[Ca^{2+}]_{cit}$ obținut cu celule expuse numai la QC (Fig. 8A).

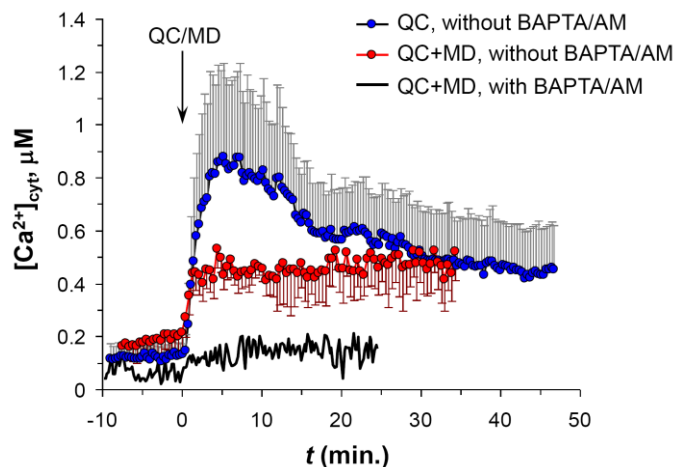


Fig. 10. Variațiile cinetice ale concentrației Ca^{2+} citosolic induse de $50 \mu\text{M}$ quercetină aplicată singură (QC) ori în combinație cu $100 \mu\text{M}$ menadionă (QC+MD) în celule Jurkat marcate cu fura-2, în prezența sau în absența chelatorului de calciu BAPTA/AM.

Aceste din urmă rezultate constituie obiectul unui manuscris în pregătire.

1.4. DISCUȚII

Este larg recunoscut faptul că receptorul rianodinic de tip 3, RyR3, are o exprimare relativ redusă în mamifere, iar rolul său funcțional a rămas neclar [18, 37, 38, 39-41]. În celulele T, răspunsul imun produs prin stimularea complexului receptor al celulelor T/CD3 (TCR/CD3) pare a implica o creștere de lungă durată a Ca^{2+} citosolic, în care RyR3 joacă un rol critic [26]. Implicațiile fiziologice ale acestui fapt sunt importante deoarece celulele T necesită un semnal de Ca^{2+} susținut pentru expansiunea clonală, deci pentru generarea unui răspuns imun funcțional [26]. Rezultate obținute în laboratorul nostru [1,8] sugerează faptul că RyR3 poate acționa ca un actor important în programul apoptotic declanșat de quercetină în celulele Jurkat T [42, 43], în care supraîncărcarea susținută cu Ca^{2+} citosolic produsă prin activarea RyR3 poate acționa sinergic cu hiperoxidarea NADH declanșând deschiderea porului mitocondrial [44]. În favoarea acestei idei, noi am găsit că tratamente cu quercetină aplicată timp de 1 oră a dus la scăderea conținutului celular de NADH [1, 8, 43], a indus o apoptoză semnificativă și a descrescut supraviețuirea clonogenă în celulele Jurkat, într-o manieră dependentă de doză [42, 43].

Din măsurătorile fluorimetrice am putut estima că fluxul total de eliberare de Ca^{2+} prin RyR3 este de aproximativ 247 pA în celule intacte Jurkat în repaus, în timp ce capacitatea maximă de eliberare atunci când toate canalele RyR3 (~3693-36931) sunt deschise a fost evaluată tentativ ca fiind 849 pA . După o fază rapidă de activare, $50 \mu\text{M}$ QC aplicată în mediul extracelular a părut să evoce un curent destul de constant prin canalele care au recrutat QC ($\approx 93 \text{ pA}$). Totuși, curentul global de eliberare mediat de RyR3 a crescut într-un minut cu 40 pA și apoi a descrescut cu o constantă de timp de 18.9 min. la o valoare ușor ridicată de 265 pA care pare a fi suficientă pentru a susține nivelul crescut de Ca^{2+} citosolic observat în experimentele noastre anterioare [1].

Estimările noastre prezente indică faptul că curentul unitar al RyR3 rezidă probabil în domeniul $0.023\text{-}0.230 \text{ pA}$, care apare a fi mai scăzut decât estimările anterioare pentru curentul RyR2 în miocitele cardiace de șobolan (1.2 pA) [21], și mai scăzut decât curentul single-channel ($1\text{-}4 \text{ pA}$) evaluat pentru toate izoformele RyR în bistraturi lipidice la niveluri de Ca^{2+} luminal nefiziologic de ridicate [3, 45, 46]. Totuși, estimările noastre sunt apropiate

de valoarea caracteristică determinată pentru fibrele musculare scheletale de mamifer (0.5 pA) [47], pentru RyR2 de mamifer sau pentru canalul RyR din mușchiul scheletal de amfibie încorporat în bistraturi plane în condiții apropiate de cele fiziologice (0.26-0.66 pA) [45, 46]. Deoarece celulele Jurkat au $\sim 400 \mu\text{M Ca}^{2+}$ în interiorul reticulului lor endoplasmatic [48], o extrapolare lineară din aceste măsurători electrofiziologice sugerează un curent RyR de referință de $\sim 0.21 \text{ pA in situ}$. Consistent cu aceasta, s-a conchis că curentul de Ca^{2+} prin RyR în celule intacte trebuie să fie considerabil $< 0.6 \text{ pA}$ [45]. Estimările noastre sunt în bun acord cu valorile curentului unitar (singular)- ($\sim 0.15 \text{ pA}$) transportat de receptorul înrudit IP_3R de tip 3 înserat în membrana nucleară externă, în condiții fiziologice [49].

În concluzie, prin măsurarea fluorescenței specifice la excitare duală în cazul celulelor încărcate cu quercetină noi am identificat un mecanism nou de reglare a RyR3 de către Ca^{2+} citosolic și quercetină în configurațiile deschisă și închisă ale canalului, și am putut estima fluxul de eliberare de Ca^{2+} mediat de RyR3 indus quercetină în celule Jurkat intacte. Rezultatele noastre sprijină ideea că receptorul canal RyR3 poate să aibă configurații diferite în mediul de membrană nativă în raport cu cel de membrană artificială, corespunzând stărilor de canal inhibat respectiv rectificat observate în experimentele noastre [1]. În plus față de locul de legare activator de mare afinitate al Ca^{2+} general recunoscut, datele indică faptul că receptorul RyR3 posedă un al doilea loc de legare activator al Ca^{2+} , care pare a fi operațional în canalul rectificat dar nu și în cel inhibat. Diferența semnificativă în afinitatea și numărul de molecule de Ca^{2+} și de quercetină care se leagă în conformațiile deschisă și închisă este consistentă cu modificarea conformațională bine documentată care are loc după deschiderea canalului [50].

Astfel, datele noastre furnizează informații semnificative privind nivelul citosolic de quercetină liberă în celulele Jurkat intacte expuse la QC. În acest mod, am putut determina, pentru prima dată, faptul că concentrația citosolică de quercetină liberă în celulele Jurkat intacte prezintă o fază inițială rapidă (constanta de timp 1.04 min.) probabil reflectând transportul difuzional prin membrana plasmatică, urmată de o acumulare lentă a quercetinei în citosol (constanta de timp 34.5 min.) producând un gradient de până la 1.6 ori între citosol și mediul extracelular. Împreună cu evidența prezentată în articolul nostru precedent [1], aducem un sprijin suplimentar [17] pentru utilizarea fluorescenței celulare specifice quercetinei ca un instrument valoros în evaluarea proprietăților funcționale și moleculare ale canalului de calciu RyR3 *in situ*, ca și pentru identificarea proteinelor țintă și distribuției celulare a flavonoidului quercetină și în cele din urmă pentru o mai bună caracterizare a funcțiilor sale moleculare.

2. Efectele antiproliferative și sinergia quercetinei și menadionei în celulele de leucemie umană Jurkat T. Efectele în urma tratamentelor de lungă durată (24 h)

Continuând cercetările efectuate într-o fază anterioară a proiectului, am analizat mai amănunțit efectele quercetinei și menadionei asupra celulelor de leucemie Jurkat T, utilizând tehnica de citometrie în flux și extinzând studiul la tratamente de lungă durată. Rezultatele studiului au fost publicate în revista cotate ISI Leukemia Research.

2.1 Efectele antiproliferative ale MD și QC

Menadiona (MD) aplicată timp de 24 h a prezentat efecte antiproliferative puternice în celulele Jurkat, așa cum am determinat prin citometrie în flux (Fig. 11A). Doza caracteristică de menadionă (EC_{50}), asociată cu inducerea morții celulare în 24 h după îndepărtarea agentului a fost $EC_{50} = 14.7 \mu\text{M}$ iar coeficientul Hill a fost $h = 5.2$. Trebuie să subliniem

faptul că aceste cifre sunt în acord cu raportări anterioare privind tratamente cu MD timp de 24 h asupra celulelor Hep G2 de hepatoblastom uman [51].

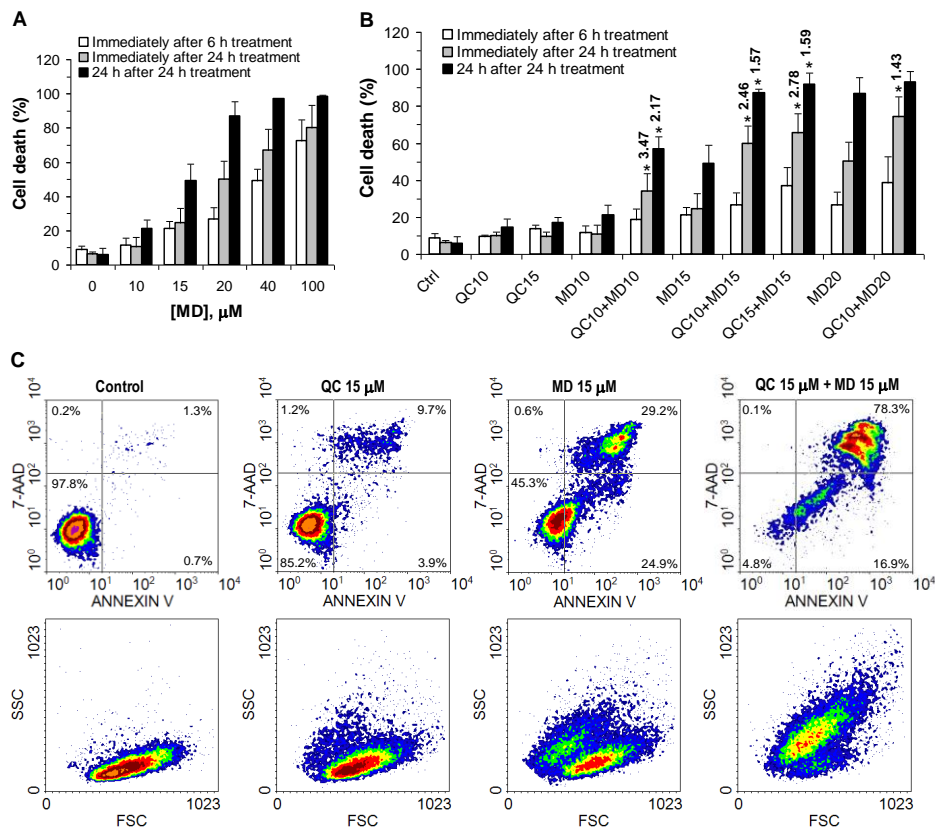


Fig. 11. Efectele antiproliferative ale tratamentelor de 24-h cu MD, QC și combinații ale celor două. (A) Dependența de doză a ratei morții celulare în celulele Jurkat tratate cu MD la dozele indicate a fost evaluată prin analiză de citometrie în flux a mărcării cu Annexin V la intervalele de timp specificate în legendă. (B) Moartea celulară indusă de MD (10, 15 și 20 μM), QC (10 și 15 μM), aplicate singure sau în combinație, a fost evaluată la intervalele de timp specificate în legendă. Diferențele semnificative dintre combinațiile MD-QC și tratamentele MD corespunzătoare sunt indicate prin steluță (*), împreună cu raportul asociat combinație-efect aditiv care a fost calculat așa cum s-a explicat în text. (C) Ploturi reprezentative de densitate obținute cu eșantioane de celule tratate timp de 24 h cu DMSO (control) cu Annexin V/7-AAD (panelurile superioare) și FSC/SSC (panelurile inferioare), 15 μM QC, 15 μM MD ori combinația 15 μM QC + 15 μM MD. Determinările de citometrie în flux au fost efectuate la 24 h după îndepărtarea agentului. Sunt indicate în fiecare cadran fracțiunile celulare ale dublului plot Annexin V/7-AAD.

Analiza viabilității celulare după tratamente combinate 10-15 μM MD și 10-15 μM QC timp de 24 h a confirmat interacțiunea sinergică puternică între cei doi agenți (Fig. 11B). În particular, combinația MD:QC la concentrațiile 15 μM : 15 μM s-a dovedit a fi extrem de eficientă în distrugerea celulelor Jurkat, prin inducerea unei fracțiuni de $91.8 \pm 6.0\%$ celule moarte la 24 h după tratament (Fig. 11B), și o supraviețuire clonogenică de $1.4 \pm 0.3\%$ ($n = 3$). Mai mult, efectul combinației a fost de 1.59 ori mai puternic decât efectul aditiv al celor doi agenți aplicați singuri (MD 15 μM: rata morții celulare $49.2 \pm 9.6\%$ și QC 15 μM: $16.9 \pm 3.0\%$; astfel, scăzând rata morții celulare ne-specifice de $6.0 \pm 3.7\%$ obținută în celulele control, se obțin rate de moarte celulară medii induse de MD și QC de 43.2% și 10.9% , respectiv, în timp ce combinația MD:QC a produs 85.8% celule moarte). În plus, raportul dintr combinație și efectul aditiv al celor doi agenți a fost încă și mai ridicat (2.78) dacă se ia

în considerare rata morții celulare evaluată îndată după tratament, indicând faptul că adăugarea quercetinei accelerează procesul de moarte celulară. În lucrări anterioare am găsit, prin utilizarea unei tehnici diferite, detecția fragmentelor de ADN cu ajutorul iodurii de propidiu, că atât MD cât și QC induc moartea celulară în mod primar prin apoptoză în celulele Jurkat [42,43]. Investigațiile curente, utilizând chitul Annexin V/7-AAD au confirmat faptul că moartea celulară indusă de către MD și QC evoluează pe calea apoptotică. De exemplu, combinația MD:QC la concentrații 15 μ M : 15 μ M a produs 65.8 \pm 10.3% celule moarte la adăugarea de agent 24 h (Fig. 11B), din care 30.9 \pm 3.7% celule au fost găsite în stadiile timpurii de apoptoză și 34.9 \pm 4.5% celule au fost în apoptoză/necroză târzie. În același interval de timp, menadiona aplicată singură (15 μ M) a produs 19.7 \pm 6.8% celule apoptotice timpurii și 4.9 \pm 1.4% celule apoptotice/necrotice târzii. Evoluția ulterioară în următoarele 24 h (ex., Fig. 11C) a fost astfel consistentă cu o migrare progresivă a populațiilor celulare prin cadranul intermediar Q2 (dreapta jos) al celulelor apoptotice timpurii, indicând faptul că în condițiile noastre moartea celulară a fost în principal apoptotică. Datele de FSC/SSC (împrăștierea frontală, o estimare a dimensiunii celulelor, și împrăștierea laterală, o estimare a granularității celulare) au furnizat informații adiționale care sprijină această idee (ex., Fig. 11C). Trebuie să menționăm că acest comportament a fost observat în toate tratamentele curente. Datorită valorii mari a coeficientului Hill asociat, menadiona la concentrații mai mari decât EC₅₀ (adică, ≥ 20 μ M) a fost foarte eficace în inducerea morții celulare în 24 h de la îndepărtarea agentului (Fig. 11A). De aceea, efectul principal al adăugării quercetinei tratamentului a fost acela de a accelera acest proces. De exemplu, combinația MD:QC la concentrații 20 μ M : 10 μ M timp de 24 h a produs o fracțiune de celule moarte de 93.1 \pm 5.7% după 24 h de la tratament, care nu a fost semnificativ diferită de fracțiunea de 87.0 \pm 8.4% celule moarte indusă de MD singură (20 μ M), în timp ce imediat după tratament ratele corespunzătoare ale morții celulare (50.1 \pm 10.4% și 74.2 \pm 10.8%, respectiv) au diferit semnificativ și raportul combinație-effect aditiv a fost 1.43 (Fig. 11B).

2.2. Efectul MD QC asupra $\Delta\psi_m$

Efectul disruptiv primar asupra $\Delta\psi_m$ al MD și QC observat în tratamentele acute (a se vedea raportul anterior de fază) s-a găsit a persista și în timpul unei expuneri mai lungi (6 h) la cei doi agenți aplicați singuri sau în combinație. În celulele tratate cu MD, fluorescența JC-1 red a fost deprimată dependent de doză, și marcarea dublă cu Annexin V/JC-1 a indicat că acest efect a precedat externalizarea fosfatidilserinei (Fig. 12A), care se produce în stadiile timpurii ale apoptozei. Distribuția celulară a celor două forme ale fluoroforului, și anume cea monomerică și forma agregată a JC-1, a prezentat un răspuns complex la doze crescătoare de menadionă (Fig. 12B). Totuși, trăsătura dominantă observabilă în reprezentarea JC-1 Green/JC-1 Red a constat în relocarea unei fracțiuni semnificative a evenimentelor din cadranul Q4 (stânga sus) la Q1 (stânga jos), care a fost asociată cu o populație mare de mitocondrii depolarizate, așa cum indică raportul JC1-Red/JC-1 Green (Fig. 12C). Reducerea dependentă de doză a populației Q4 indusă de MD în reprezentările JC-1 Green/JC-1 Red (un indicator cantitativ al populației mitocondriilor polarizate) a furnizat un IC₅₀ de 19.2 μ M și un coeficient Hill de 1.56. Raportul fluorescenței JC-1 Red/Green a prezentat o scădere progresivă cu nivelul de MD până la 20 μ M, în timp ce la concentrații mai mari (40-100 μ M) a prezentat o creștere secundară deși mult mai mică, care a părut a fi datorată unei reduceri a capacității de încărcare a citosolului cu JC-1 monomeric. În acord cu determinările cu Annexin V prezentate în Fig. 12A, o explicație posibilă pentru acest rezultat ar putea fi legată de pierderea polarității membranei plasmatică în timpul stadiilor apoptotice timpurii, ceea ce ar putea afecta colorarea citosolului cu fluoroforul cationic JC-1.

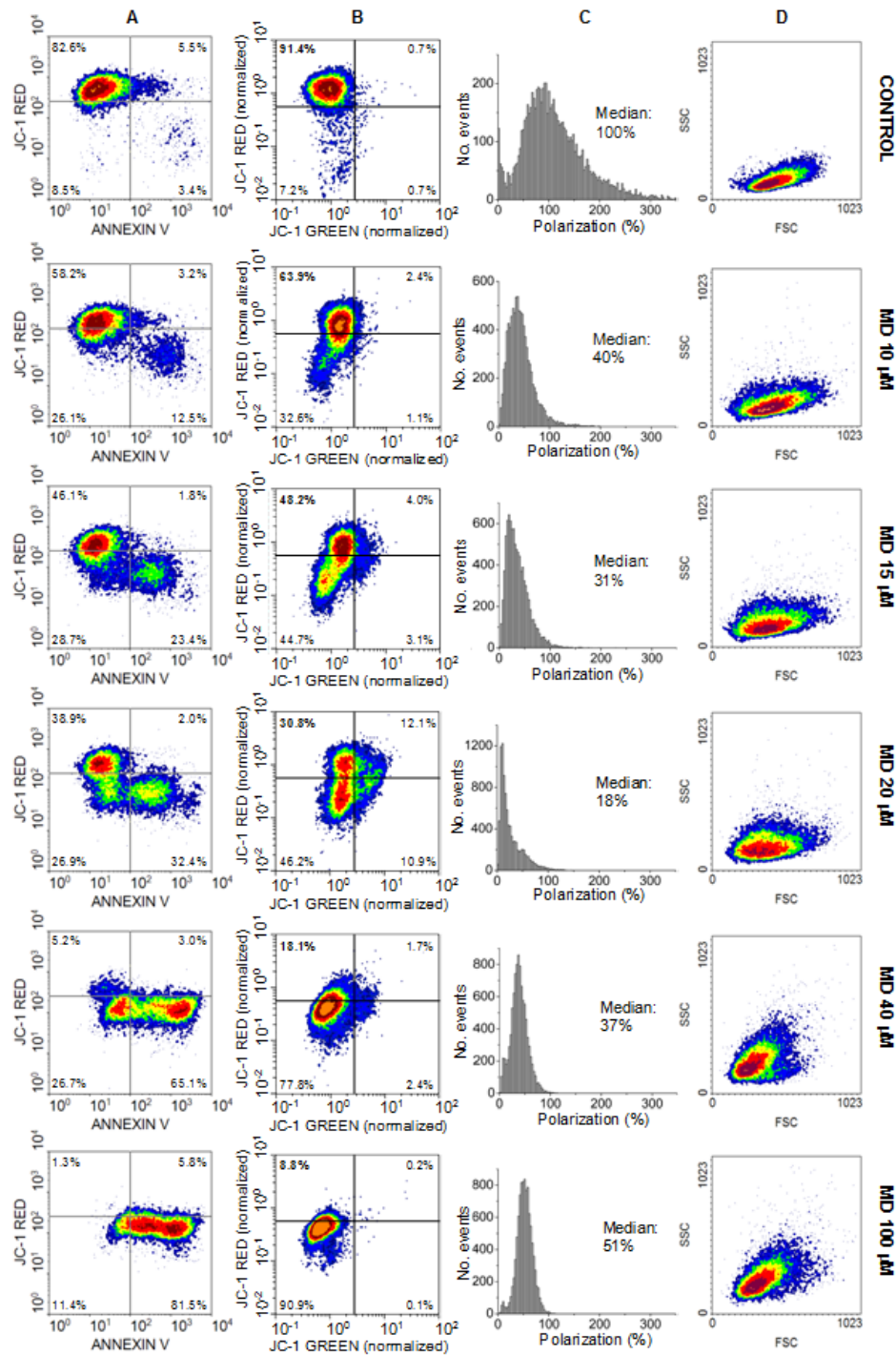


Fig. 12. Depolarizarea mitocondrială dependentă de doză în celulele Jurkat tratate cu menadionă timp de 6 h. După tratamentul cu DMSO (Control), 10, 15, 20, 40 ori 100 μM MD, celulele au fost dublu marcate cu Annexin V-FITC și JC-1 și analizate prin citometrie în flux. (A) Ploturile de densitate Annexin V-FITC/JC-1 Red arată ca o trașătură majoră migrația evenimentelor din cadranul Q4 la Q1 și apoi la Q3, indicând faptul că lipsa agregării JC-1 în interiorul mitocondriei precede externalizarea PS. Sunt specificate fracțiunile celulare corespunzând fiecărui cadran. (B) Ploturile de densitate JC-1 Green/JC-1 Red indică reducerea progresivă a populației de mitocondrii polarizate (cadran Q4, cu fracțiunea corespunzătoare a evenimentului marcată cu bold) la concentrații crescătoare de MD. Intensitățile JC-1 Green și JC-1 Red au fost normalizate la FSC. (C) Histogramele rapoartelor JC-1 Red /JC-1 Green relative la control (“Polarization”) confirmă efectul puternic al menadionei de depolarizare a mitocondriilor. (D) Datele FSC/SSC sunt consistente cu o creștere gradată a populației celulare cu morfologie apoptotică, în bună corelație cu datele de Annexin V arătate în A.

Datele de împrăștiere frontală și laterală (Fig. 12D) sprijină în plus ideea discutată mai sus, indicând o tranziție gradată, dependentă de doză, către o morfologie apoptotică (cu FSC redus, indicativ al contracției celulei, și un SSC mărit, indicativ al unei granularități crescute) în timpul expunerii pe termen lung la menadionă. După 6 h de expunere, quercetina la niveluri fiziologice de 10 μ M și 15 μ M s-a dovedit a fi un agent puternic depolarizant al mitocondriilor, producând o polarizare mitocondrială medie de $13 \pm 2\%$ și $10 \pm 3\%$, respectiv, așa cum s-a evaluat prin determinări de citometrie în flux asupra celulelor marcate cu JC-1. Frațiunea celulară Q4 în ploturile cu JC-1 Green/JC-1 Red a fost $63.0 \pm 9.9\%$, $6.5 \pm 3.3\%$, și $37.5 \pm 11.2\%$ după tratamente de 6-h cu 15 μ M MD, 15 μ M QC, și combinația lor, respectiv, sugerând că menadiona poate inhiba deschiderea porului mPTP de către quercetină, slăbind astfel efectul depolarizant al flavonoidului. Datele arată, de asemenea, că pierderea $\Delta\psi_m$ nu este un declanșator apoptotic *per se*, întrucât QC (15 μ M) aplicată singură timp de 24 h induce o fracțiune relativ mică de celule apoptotice ($16.9 \pm 3.0\%$) la 24 h după tratament (Fig. 11B). Frațiunea de celule cu mitocondrii polarizate evaluată prin raportul JC-1 Red/Green a fost considerabil de mică (mai puțin de 10%) atât la 1 h cât și la 6 h după adăugarea agentului.

2.3. DISCUȚIE

În urma investigării efectelor antiproliferative ale tratamentelor mai îndelungate (24 h) cu MD, QC și combinațiile lor în celule Jurkat, am găsit o puternică interacțiune sinergică între MD și QC care duce la o distrugere eficientă a celulelor. Astfel, combinația MD:QC la concentrații 15 μ M : 15 μ M s-a dovedit a fi foarte eficace inducând o fracțiune apoptotică ridicată și o supraviețuire clonogenică de 1.2% [50, raport 2013]. Mai mult, adăugarea de quercetină la tratamentul cu MD a accelerat semnificativ procesul morții celulare. Rezultatele indică, de asemenea, că un regim MD:QC la concentrații echimolare de 10 μ M cu o durată a tratamentului de 24 h, schemă care pare fezabilă clinic (și sigură), poate inhiba proliferarea celulară a celulelor Jurkat cu o rată eficientă (supraviețuirea clonogenică obținută în acest caz a fost $10.1 \pm 3.9\%$). Astfel, datele noastre curente sugerează că o combinație MD:QC administrată la doze și rate relevante clinic ar putea îmbunătăți rezultatele terapiei antileucemice convenționale, și garantează astfel utilitatea unor studii adiționale pentru stabilirea efectelor terapeutice ale acestei combinații în diferite linii celulare leucemice, ca și în modele animale de leucemie.

Referințe bibliografice:

1. Baran, E. Katona, C. Ganea, Quercetin as a fluorescent probe for the ryanodine receptor activity in Jurkat cells, *Pflugers Archiv, European Journal of Physiology*, 2013, DOI 10.1007/s00424-013-1235-y, Volume: 465 Issue: 8 Pages: 1101-1119
2. S.R.W. Chen, X. Li, K. Ebisawa, L. Zhang, Functional characterization of the recombinant type 3 Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) expressed in HEK293 cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24234-24246.
3. L.H. Jeyakumar, J.A. Copello, A.M. O'Malley, G.-M. Wu, R. Grassucci, T. Wagenknecht, S. Fleischer, Purification and characterization of ryanodine receptor 3 from mammalian tissue, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16011-16020.
4. T. Murayama, Y. Ogawa, Characterization of type 3 ryanodine receptor (RyR3) of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscles, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24030-24037.
5. T. Murayama, T. Oba, E. Katayama, H. Oyamada, K. Oguchi, M. Kobayashi, K. Otsuka, Y. Ogawa, Further characterization of the type 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17297-17308.
6. E.H. Lee, G. Meissner, D.H. Kim, Effects of quercetin on single Ca^{2+} release channel behavior of skeletal muscle, *Biophys. J.* 82 (2002) 1266-1277.

7. P. Palade, R.D. Mitchell, S. Fleischer, Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. General description and effects of calcium, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 8098-8107.
8. **I. Baran, C. Ganea, I. Ursu, V. Baran, O. Calinescu, A. Iftime, R. Ungureanu, I.T. Tofolean, Fluorescence properties of quercetin in human leukemia Jurkat T-cells, *Rom. J. Phys.* 56 (2011) 388-398.**
9. V. Shoshan, K.P. Campbell, D.H. MacLennan, W. Frodis, B.A. Britt, Quercetin inhibits Ca^{2+} uptake but not Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum in skinned muscle fibers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (1980) 4435-4438.
10. V. Shoshan, D.H. MacLennan, Quercetin interaction with the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 887-892.
11. C.M. Fewtrell, G.D. Gomperts, Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells, *Nature* 265 (1977) 635-636.
12. A.P. Nifli, P.A. Theodoropoulos, S. Munier, C. Castagnino, E. Roussakis, H.E. Katerinopoulos, J. Vercauteren, E. Castanas, Quercetin exhibits a specific fluorescence in cellular milieu: a valuable tool for the study of its intracellular distribution, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2873-2878.
13. O.J. Rolinski, A. Martin, D.J. Birch, Human serum albumin and quercetin interactions monitored by time-resolved fluorescence: evidence for enhanced discrete rotamer conformations, *J. Biomed. Opt.* 12 (2007) 034013.
14. M. Fiorani, A. Guidarelli, M. Blasa, C. Azzolini, M. Candiracci, E. Piatti, O. Cantoni, Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid, *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 397-404.
15. G. Notas, A.P. Nifli, M. Kampa, V. Pelekanou, V.-I. Alexaki, P. Theodoropoulos, J. Vercauteren, E. Castanas. Quercetin accumulates in nuclear structures and triggers specific gene expression in epithelial cells, *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 656-666.
16. **I. Baran, C. Ganea, V. Baran, A two-gate model for the ryanodine receptor with allosteric modulation by caffeine and quercetin, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 793-806.**
17. **Irina Baran, Constanta Ganea, RyR3 in situ regulation by Ca^{2+} and quercetin and the RyR3-mediated Ca^{2+} release flux in intact Jurkat cells, ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 540 (2013) 145–159.**
18. **Irina Baran, Diana Ionescu, Alexandru Filippi, Maria Magdalena Mocanu, Adrian Iftime, Ramona Babes, Ioana Teodora Tofolean, Ruxandra Irimia, Alexandru Goicea, Valentin Popescu, Alexandru Dimancea, Andrei Neagu, Constanta Ganea, Novel insights into the antiproliferative effects and synergism of quercetin and menadione in human leukemia Jurkat T cells, *Leukemia Research*, 2014, Volume: 38 Issue: 7 Pages: 836-849 Published: JUL 2014**
19. H.A. Scheidt, A. Pampel, L. Nissler, R. Gebhardt, D. Huster, Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1663 (2004) 97-107.
20. A. Lancon, D. Delma, H. Osman, J.P. Thenot, B. Jannin, N. Latruffe. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 1132-1137.
21. S.Q. Wang, M.D. Stern, E. Ríos, H. Cheng, The quantal nature of Ca^{2+} sparks and in situ operation of the ryanodine receptor array in cardiac cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 3979-3984.
22. L. Csernoch, J. Zhou, M.D. Stern, G. Brum, E. Ríos, The elementary events of Ca^{2+} release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle, *J. Physiol.* 557 (2004) 43-58.
23. Rosenbluth MJ, Lam WA, Fletcher DA (2006) Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys J* 90: 2994-3003.
24. Nag A, Monine MI, Faeder JR, Goldstein B (2009) Aggregation of membrane proteins by cytosolic cross-linkers: theory and simulation of the LAT-Grb2-SOS1 system. *Biophys J* 96: 2604-2623.
25. Zhou J, Launikonis BS, Ríos E, Brum G (2004) Regulation of Ca^{2+} sparks by Ca^{2+} and Mg^{2+} in mammalian and amphibian muscle. An RyR isoform-specific role in excitation-contraction coupling? *J Gen Physiol* 124: 409-428.

26. Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV, Mayr GW (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398: 70-73.
27. Ogawa Y, Murayama T, Kurebayashi N (2002) Ryanodine receptor isoforms of non-mammalian skeletal muscle. *Front Biosci* 7: d1184-1194.
28. Hayashi T, Martone ME, Yu Z, Thor A, Doi M, Holst MJ, Ellisman MH, Hoshijima M (2009) Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *J Cell Sci* 122: 1005-1013.
29. Ørtenblad N, Lunde PK, Levin K, Andersen JL, Pedersen PK (2000) Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release following intermittent sprint training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R152-R160.
30. Anderson K, Cohn AH, Meissner G (1994) High-affinity [³H]PN200-110 and [³H]ryanodine binding to rabbit and frog skeletal muscle. *Am J Physiol* 266: C462-C466.
31. Pérez CG, Copello JA, Li Y, Karko KL, Gómez L, Ramos-Franco J, Fill M, Escobar AL, Mejía-Alvarez R (2005) Ryanodine receptor function in newborn rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2527-H2540.
32. Delgado J, Saborido A, Morán M, Megías A (1999) Chronic and acute exercise do not alter Ca²⁺ regulatory systems and ectonucleotidase activities in rat heart. *J Appl Physiol* 87: 152-160.
33. Ueyama T, Ohkusa T, Yano M, Matsuzaki M (1998) Growth hormone preserves cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors) and enhances cardiac function in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* 40: 64-73.
34. Skog S, Tribukait B, Wallström B, Eriksson S (1987) Hydroxyurea-induced cell death as related to cell cycle in mouse and human T-lymphoma cells. *Cancer Res* 47: 6490-6493.
35. Vinnakota KC, Bassingthwaight JB (2004) Myocardial density and composition: a basis for calculating intracellular metabolite concentrations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1742-1749.
- 36. Baran I, Ganea C, Ungureanu R, Tofolean IT (2012) Signal mass and Ca²⁺ kinetics in local calcium events: a modeling study. *J Mol Model* 18: 721-736.**
37. C.W. Taylor, D.L. Prole, T. Rahman, Ca²⁺ channels on the move, *Biochemistry* 48 (2009) 12062-12080.
38. M. Fill, J.A. Copello, Ryanodine receptor calcium release channels, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 893-922.
39. G. Meissner, Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel, *Cell Calcium* 35 (2004) 621-628.
40. S.L. Hamilton, Ryanodine receptors, *Cell Calcium* 38 (2005) 253-260.
41. D.R. Laver, Luminal Ca²⁺ activation of cardiac ryanodine receptors by luminal and cytoplasmic domains, *Eur. Biophys. J.* 39 (2009) 19-26.
- 42. Baran I, Ganea C, Scordino A, Musumeci F, Barresi V, Tudisco S, Privitera S, Grasso R, Condorelli DF, Ursu I, Baran V, Katona E, Mocanu MM, Gulino M, Ungureanu R, Surcel M, Ursaciuc C (2010) Effects of menadione, hydrogen peroxide and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell Biochem Biophys* 58: 169-179.**
- 43. Baran I, Ganea C, Privitera S, Scordino A, Barresi V, Musumeci F, Mocanu MM, Condorelli DF, Ursu I, Grasso R, Gulino M, Garaiman A, Musso N, Cirrone GAP, Cuttone G, Detailed analysis of apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells after proton-irradiation and treatments with oxidant agents and flavonoids, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012) 498914:14**
44. Pérez-Pinzón MA, Mumford PL, Carranza V, Sick TJ (1998) Calcium influx from the extracellular space promotes NADH hyperoxidation and electrical dysfunction after anoxia in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 215-221.
45. R. Mejía-Alvarez, C. Kettlun, E. Ríos, M. Stern, M. Fill, Unitary Ca²⁺ current through cardiac ryanodine receptor channels under quasi-physiological ionic conditions, *J. Gen. Physiol.* 113 (1999) 177-186.
46. Kettlun C, González A, Ríos E, Fill M (2003) Unitary Ca²⁺ current through mammalian cardiac and amphibian skeletal muscle ryanodine receptor channels under near-physiological ionic conditions. *J Gen Physiol* 122: 407-417.

47. Csernoch L, Zhou J, Stern MD, Brum G, Ríos E (2004) The elementary events of Ca²⁺ release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle. *J Physiol* 557: 43-58.
48. R.M. Luik, B. Wang, M. Prakriya, M.M. Wu, R.S. Lewis, Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation, *Nature* 454 (2008) 538-542.
49. H. Vais, J.K. Foskett, D.O.D. Mak, Unitary Ca²⁺ current through recombinant type 3 InsP₃ receptor channels under physiological ionic conditions, *J. Gen. Physiol.* 136 (2010) 687-700.
50. A.F. Dulhunty, P. Pouliquin, What we don't know about the structure of ryanodine receptor calcium release channels, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30 (2003) 713-723.
51. Matzno S, Yamaguchi Y, Akiyoshi T, Nakabayashi T, Matsuyama K. An attempt to evaluate the effect of vitamin K₃ using as an enhancer of anticancer agents. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1270-1273.

Diseminare

Articole ISI

1. Irina Baran, Diana Ionescu, Alexandru Filippi, Maria Magdalena Mocanu, Adrian Iftime, Ramona Babes, Ioana Teodora Tofolean, Ruxandra Irimia, Alexandru Goicea, Valentin Popescu, Alexandru Dimancea, Andrei Neagu, Constanta Ganea, Novel insights into the antiproliferative effects and synergism of quercetin and menadione in human leukemia Jurkat T cells, *Leukemia Research*, 2014, Volume: 38 Issue: 7 Pages: 836-849 Published: JUL 2014 (**IF 2.692**) (**is.0.950**)
2. Agata Scordino, Irina Baran, Marisa Gulino, Constanta Ganea, Rosaria Grasso, J. Hugo Niggli, Francesco Musumeci, Ultra-weak Delayed Luminescence in cancer research: A review of the results by the ARETUSA equipment, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 139, pp. 76-84 (2014) (**IF 2.803**) (**is. 0.843**)
3. M.M. Mocanu, C. Ganea, L. Georgescu, T. Varadi, D. Shrestha, I. Baran, E. Katona, P. Nagy, J. Szöllösi, *Epigallocatechin-gallate determines ErbB proteins downregulation, cell death mediated by 67kDa laminin receptor and altered lipid order in mammary and epidermoid carcinoma cells*, *J. NAT. PROD.*, Volume: 77 Issue: 2 Pages: 250-257 FEB 2014 (**if. 3.947, is. 2.158**)
4. Irina Baran, Constanta Ganea, *RyR3 in situ regulation by Ca²⁺ and quercetin and the RyR3-mediated Ca²⁺ release flux in intact Jurkat cells*, *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 540 (2013) 145–159, ISSN 0003-986 (**IF. 3.043**) (**is. 1.285**)
5. Irina Baran, Diana Ionescu, Simona Privitera, Agata Scordino, Maria Magdalena Mocanu, Francesco Musumeci, Rosaria Grasso, Marisa Gulino, Magdalena Mocanu, Adrian Iftime, Ioana Teodora Tofolean, Alexandru Garaiman, Alexandru Goicea, Ruxandra Irimia, Alexandru Dimancea, Constanta Ganea, *Mitochondrial respiratory Complex I probed by delayed luminescence spectroscopy*, *JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, J. Biomed. Opt.* 18 (12), 127006 (December 23, 2013); doi: 10.1117/1.JBO.18.12.127006 (**IF 2.752**) (**is. 1.910**)

Conferințe

6. R.G. Sandu, I. Baran, D. Ionescu, A. Filippi, R. Babes, A. Goicea, A. Garaiman, R. Irimia, A. Dimancea, M. Gaman, C. Ganea, A. Murgoci. Doxorubicin induces G₂/M arrest, Ca²⁺ release, oxidative stress and apoptosis in human leukemia Jurkat cells at clinical doses and dose rates, poster (acceptat), *FEBS EMBO 2014 Congress*, 30 August - 4 Septembrie 2014, Paris, Franta. Rezumatul publicat în *FEBS Journal*, vol. 281, supl. 1, p. 456 (2014); ISSN: 1742-464X; revistă cotată ISI

7. M.M. Mocanu, T. Picot, E. Radu, I. Baran, E. Katona, P. Nagy, J. Szöllösi, L. Campos, C. Ganea. Modulation of motility and signaling pathways by epigallocatechin-3-O-gallate in tumor cell lines overexpressing ErbB proteins, poster (acceptat), *FEBS EMBO 2014 Congress*, 30 Aug. - 4 Sept. 2014, Paris, Franta. Rezumatul publicat în *FEBS Journal*, vol. 281, supl. 1, p. 486 (2014); ISSN: 1742-464X; revistă cotate ISI
8. Alexandru Garaiman, Diana Ionescu, Alexandru Filippi, Ramona Babes, Alexandru Goicea, Valentin Popescu, Ruxandra Irimia, Alexandru Dimancea, Mihnea Gaman, Adrian Murgoci, Constanta Ganea, Irina Baran. Synergic antiproliferative effect of Epigallocatechine-3-gallate and menadione in human leukemia Jurkat T cells. Poster, *7th EFIS/EJI South East European Immunology School*, Timișoara, 26-29 sept. 2014
9. Mihnea-Alexandru Gaman, Alexandru Filippi, Diana Ionescu, Constanta Ganea, Irina Baran, Modulation of the antitumoral effect of doxorubicin by quercetin-menadione combinations in human leukemia Jurkat cells, Craiova International Medical Students Conference (6-9th November, 2014)

Premii

Premierea rezultatelor cercetării de către UEFISCDI 2014: articolele 1, 3-5.
Lucrarea nr. 9 a obținut **Premiul II** la Craiova International Medical Students Conference.

Director de proiect
Prof. Dr. Constanța Ganea