

Raport științific
*privind implementarea proiectului PCE Idei nr. 342/2011 în perioada
decembrie 2014 – decembrie 2015*

Raportul prezent este structurat astfel încât să urmărească Planul de realizare propus pentru etapa a V-a a proiectului (Act Adițional 2/2015). Aproape toate rezultatele raportate în această etapă au fost comunicate la conferințe naționale și internaționale și publicate în reviste cotate ISI. Conținutul raportului este următorul:

Obiectivul fazei: Caracterizarea corelației dintre luminescența întârziată și metabolismul mitocondrial

1. Introducere.....	p. 2
2. Materiale și metode.....	p. 3
2.1. Metoda luminescenței întârziate.....	p. 3
2.2. Culturi celulare.....	p. 5
2.3. Măsurători de spectroscopie de luminescență întârziată.....	p. 6
2.4. Statistica	p. 6
3. Rezultate.....	p. 6
3.1 Determinarea caracteristicilor DL (cinetica, produs cuantic, componente spectrale) în celule tratate cu EGCG.....	p. 6
3.2. Determinarea dependenței/ independenței luminescenței întârziate de potențialul membranar mitocondrial și de nivelul de superoxid mitocondrial.....	p. 7
3.3 Caracterizarea corelației dintre luminescența întârziată și nivelul mitocondrial de NADH și FMN stabilită după o serie largă de tratamente cu quercetină, menadionă, rotenon și EGCG.....	p. 13
3.4. Elaborarea unui model minimal al starilor generatoare de DL	p. 18
3.5. Evaluarea apoptozei și a supraviețuirii celulare clonogene ca funcție de doza de EGCG.....	p. 23
4. Discuții.....	p. 27
5. Concluzie.....	p. 32
6. Referințe bibliografice.....	p. 33
7. Diseminarea rezultatelor.....	p. 35

Caracterizarea corelației dintre luminescența întârziată și metabolismul mitocondrial

1. Introducere

Continuând cercetări anterioare, ne-am propus să aducem date și interpretări noi privind corelația dintre luminescența întârziată și metabolismul mitocondrial, utilizând două flavonoide, epigallocatechina-3-galat (EGCG) și quercetina (QC;3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavonă) și inhibitorul respirației mitocondriale rotenon (ROT). EGCG și QC sunt două flavonoide bine investigate care pot inhiba proliferarea celulară și pot induce apoptoza în diferite tipuri de celule canceroase [Johnson MK, Loo G. 2000, Han DW et al. 2011, Baran I., et al. 2010, 2012, Chen D et al. 2005, Jeong JH et al. 2009, Yen GC et al. 2003]. Atât EGCG cât și QC pot exercita efecte duale, pro- și anti-oxidante, depinzând de doza și durata tratamentului, și numeroase studii au indicat faptul că celulele maligne sunt mai susceptibile decât cele normale la citotoxicitatea acestor două flavonoide [Han DW et al. 2011, Chen D et al. 2005, Jeong JH et al. 2009, Yen GC et al. 2003]. Deci, aceste proprietăți ar putea fi exploatate pentru prevenirea leucemiei sau pentru a crește eficiența chimioterapiilor antileucemice. Un agent chimioterapeutic important utilizat în tratamentul leucemiei este menadiona (vitamina K₃)(MD)[Matzno S et al. 2008], care poate produce mari cantități de superoxid la nivelul Complexului I al lanțului respirator mitocondrial (MRC)[Floreani M, Carpenedo F. 1992]. MD, H₂O₂, QC și EGCG pot activa programul apoptotic pe calea unei căi mitocondriale Ca²⁺-dependentă [Johnson MK, Loo G. 2000, Han DW et al. 2011, Baran I., et al. 2010, 2012, Chen D et al. 2005, Jeong JH et al. 2009, Yen GC et al. 2003, Matzno S et al. 2008, Floreani M, Carpenedo F 1992, Barbouti A et al. 2007].

Ne-am propus, în continuarea cercetărilor anterioare [Baran I., et al. 2010, 2012, 2013], să investigăm mai în detaliu corelația dintre apoptoză, stres oxidativ și luminescența întârziată, ca și relația acesteia cu metabolismul mitocondrial. Pentru a induce stresul oxidativ am utilizat menadiona (MD) și peroxidul de hidrogen (apa oxigenată) (H₂O₂), și cele două flavonoide, quercetina și epigallocatechina-3-gallat, aplicate singure sau în combinație cu MD ori H₂O₂. În colaborare cu partenerii de la LNS Catania, Italia, am urmărit, pe de-o parte, să contribuim la o mai bună înțelegere a mecanismelor biochimice responsabile de luminescența întârziată a celulelor vii și, pe de altă parte, să obținem noi date privind relația dintre DL și starea celulei. Măsurătorile noastre au avut ca obiect de studiu efectele agenților sus-menționați asupra limfoblaștilor Jurkat T de leucemie umană.

O arie activă a cercetării actuale este reprezentată de găsirea unor metode de depistare timpurie a afecțiunilor maligne, printre altele și a leucemiei, în scopul unor terapii eficiente a acestora. Luminescența întârziată (DL - Delayed Luminescence) este una dintre aceste metode, făcând parte din categoria tehnicilor optice, considerate a fi cele mai neinvazive și permițând o scanare rapidă și ieftină. Luminescența întârziată este luminescența ultra slabă fotoindusă prelungită, emisă de către sistemele biologice după ce sursa de iluminare a fost stinsă. Această metodă poate constitui un candidat excelent pentru dezvoltarea unei tehnici optice de biopsie, ieftină și fiabilă [Scordino, A. et al, 2014]. De aceea, studiile privind corelația dintre DL și starea funcțională a celulei vii pot aduce informații valoroase privind discriminarea între

celulele normale și cele maligne. Progrese înregistrate în ultimii ani au arătat că mitocondriile joacă un rol cheie în controlul vieții și morții pe lângă rolul lor bine stabilit de generare a energiei pentru celulă. Într-adevăr, cu puține excepții, mitocondriile reprezintă o componentă esențială a multor căi apoptotice [S. Desagher and J-C. Martinou, 2000] prin eliberarea citocromului c în citosol și activarea prin aceasta a caspazelor. În această privință rezultate recente privind luminescența întârziată fotoindusă în celulele leucemice Jurkat [Baran I., et al. 2010, 2012, 2013] au sprijinit ipoteza conform căreia DL este în principal produsă în sistemul de transfer de electroni mitocondrial la nivelul Complexului I. De aceea, ne-am propus să aprofundăm această temă și să elaborăm un model al stărilor generatoare de DL produse în timpul transferului de electroni în Complexul I.

2. Materiale și metode

2.1. Metoda luminescenței întârziate. Este necesar, în primul rând, să descriem în ce constă metoda DL și ce informații poate aduce aceasta. Luminescența întârziată (Delayed Luminescence - DL) este un semnal multifazic, cu un spectru al timpilor săi de viață extinzându-se de la cca. 10^{-7} s la mai mult de 10^2 s. Datorită faptului că semnalul este foarte slab (o intensitate de $10^3 \div 10^5$ mai redusă decât cea a fluorescenței), acesta poate fi ușor contaminat cu zgomot. În consecință, pentru a putea înregistra un semnal atât de slab este necesar un sistem sensibil și fiabil de detecție a fotonilor singulari. Detecția DL este încă și mai dificilă în cazul studiului celulelor de mamifere, deoarece spectrul de excitare se deplasează spre regiunea frecvențelor înalte, astfel că se poate întâmpla ca spectrul DL să se suprapună cu spectrul de excitare al materialelor utilizate în mod obișnuit ca suporturi ale probelor, cum ar fi cuvele de plastic sau cuarț, din echipamentele standard [C. Mieg et al., 1992]. Pentru a depăși aceste probleme s-a realizat la LNS-INFN Catania, Italia, [Tudisco S.A. et al., 2003, 2004, Scordino et al., 2014] un nou echipament care să țină cont de următoarele cerințe specifice: (i) abilitatea de a detecta fotoni singulari, (ii) un zgomot de fond foarte redus, (iii) eficiență înaltă în colectarea luminescenței provenind de la culturi celulare, (iv) un timp de întârziere scurt între sfârșitul pulsului de iluminare și începutul achiziției de date, (v) cantități mici de celule care să fie utilizate. Acest sistem, numit ARETUSA “Advanced Research Equipment for fast Ultraweak luminescence Analysis” [Tudisco S.A. et al., 2003, 2004] a fost utilizat pentru a măsura luminescența întârziată a culturilor celulare. Cu acest sistem se pot detecta fotoni singulari și, în plus, nivelul zgomotului este foarte redus. De asemenea, eficiența colectării luminii emise de culturile celulare este foarte bună, iar înregistrarea semnalului începe cu o întârziere mică față de sfârșitul pulsului de iluminare. O reprezentare schematică a dispozitivului este redată în Fig. 1. Detectorul utilizat este un tub fotomultiplicator (PMT) multialcalin (Hamamatsu R-7602-1/Q, răspuns spectral 300-850 nm), selectat pentru numărare de fotoni singulari. Ca sursă de excitare este folosită o sursă de laser pe baza de azot (Laser Photonics LN 230C), care furnizează pulsuri având lungimea de undă $\lambda=337$ nm, și o lărgime a pulsului de 5 ns, cu o energie de 100 ± 5 μ J/puls. În timpul măsurătorii este necesar un control constant al intensității laserului. În acest scop, o extremitate a fibrei optice este conectată la un dispozitiv (Power meter PE10-V2, Ophir) de măsurare a intensității. Eroarea introdusă de fluctuațiile intensității laserului este de 3-4%.

Pentru a preveni distrugerea datorată unui număr mare de fotoni difuzați de către probă în timpul pulsului laser, un shutter electronic închide detectorul PMT.

Semnalele DL detectate sunt înregistrate via computer cu ajutorul unui dispozitiv multicanal (Ortec MCS PCI), capabil sa colecteze semnale analogice sau logice ca funcție de timp, într-o fereastră temporală definită.

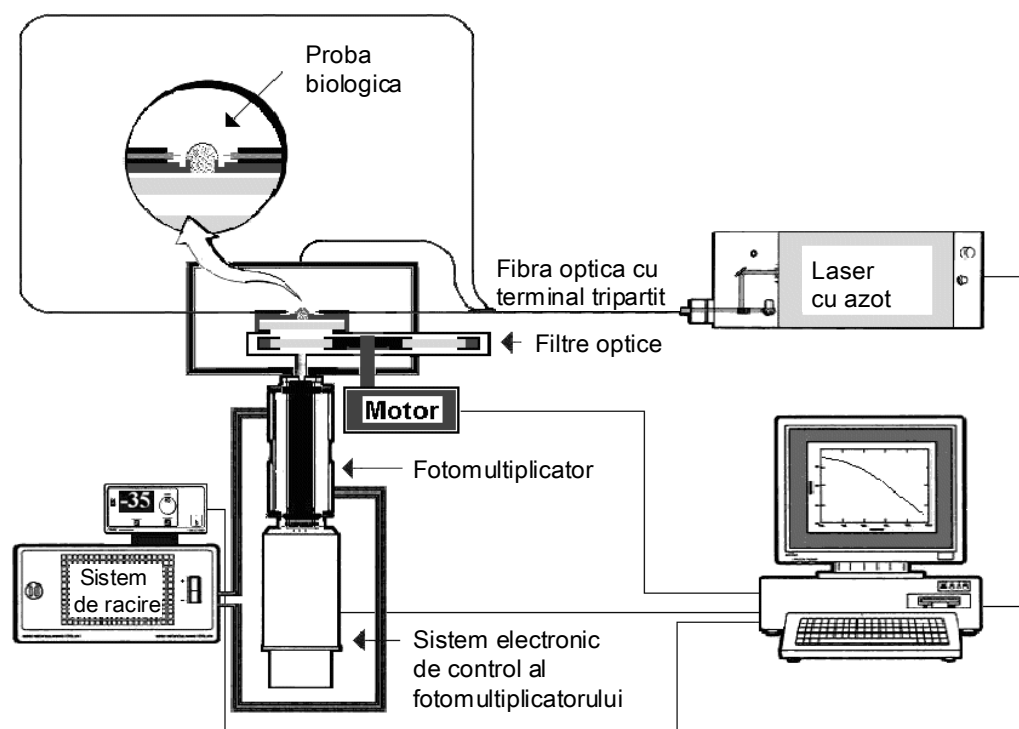


Fig.1. Dispozitivul experimental ARETUSA [Scordino A. et al., 2014]

Pentru a reduce zgomotul aleator s-a utilizat o funcție de netezire: punctele experimentale au fost astfel eșantionate încât $\Delta t_i/t_i$ să fie constant și datele rezultate să fie spațiate egal pe o scară de timp logaritmică [Scordino A. et al., 1996, 2014]. În general, intensitatea slabă a semnalului DL emis nu permite obținerea unei rezoluții spectrale înalte. De aceea, pentru analiza spectrală se utilizează un set de filtre de interferență de bandă largă (80 nm FWHM) Thermo-Oriel plasate între probă și fotomultiplicator. Pentru a obține o reducere semnificativă a curentului intrinsec de întuneric (fond), tubul fotomultiplicator este răcit la -30°C , folosind un sistem de circulație cu lichid rece în contact direct cu suprafața sa. Detectorul a fost plasat cât se poate de aproape de probă, astfel încât, din punct de vedere geometric, eficiența totală a acestui tip de aranjament este de aproximativ 8%, cu un ordin de mărime mai mare decât cea obținută cu majoritatea sistemelor folosite anterior [Scordino A. et al., 2014]. Cea mai importantă sursă de zgomot de fond (de întuneric) în aceste măsurători a fost reprezentată de către DL emisă de părți ale setup-ului însuși, ca de exemplu suportul de probe, dacă acesta este atins chiar și numai de o fracțiune de lumină de excitație. Astfel, pentru a evita utilizarea vreunui suport al probelor, măsurătorile DL pe culturi celulare s-au realizat plasând un volum de cca. $100\div 150\ \mu\text{L}$ din suspensia celulară (o picătură) direct pe fereastra de cuarț (diametru 5 mm) a ghidului de undă lichid (Edmund Optics NT53-694), transmițând mai mult de 40% din lumina incidentă în intervalul dintre 300 și 700 nm. La capătul opus, ghidul de undă a fost conectat direct

la fotocatod printr-o mică cantitate de gel optic. Aparatul a fost închis într-o cameră întunecată, făcută dintr-un material plastic caracterizat de o emisie luminescentă redusă, și căptușit pe suprafața interioară cu o vopsea specială slab luminescentă. Pentru a asigura o iluminare uniformă a probei, laserul a fost conectat la o fibra optică având terminalul tripartit, cu cele trei ramificații orientate în jurul probei la unghiuri egale, de 120° între direcțiile lor. Totuși, și în acest setup, un oarecare zgomot de fond provine de la fereastra de cuarț a ghidului de undă lichid. Într-adevăr, picătura de probă, acționând ca o lentilă semisferică, excită fereastra de cuarț proiectând pe aceasta 20% din lumina laser totală. Pentru a discrimina DL generată de probă de zgomotul de fond sunt necesare densități celulare relativ mari. Cu dublul scop de a reduce cantitatea de probă necesară și de a limita posibilele semnale de fond nedorite provenind de la excitarea unor părți ale setup-ului, a fost desemnat și realizat un nou tip de suport de probe [Scordino A. et al., 2008, 2014]. Acesta constă dintr-un cilindru gol având la partea superioară un disc de închidere cu un mic orificiu de diametru 3.5 mm. Proba constă dintr-o lamelă mică de lichid (volum $\sim 20\text{--}25\mu\text{L}$), în care sunt suspendate celulele, susținută numai prin contactul cu marginea orificiului circular, evitând astfel prezența oricărui material solid în spatele ei. Această configurație prezintă multe avantaje față de cele anterioare. Într-adevăr, pentru efectuarea măsurătorilor au fost necesare cantități mai mici de eșantioane. Mai mult, geometria setup-ului a evitat semnalele de fond nedorite provenind de la orice material solid de sub probă. În final, discul de închidere al suportului probei poate fi schimbat de la o măsurătoare la alta, evitând astfel problemele de contaminare. Un asemenea set-up experimental îmbunătățit a fost utilizat pentru studiul DL din celulele leucemice Jurkat [Baran I. et al., 2010, 2012, 2013, Scordino A., et al., 2014].

2.2. Culturi celulare. Limfoblaștii de celule leucemice umane Jurkat T au fost cultivați în suspensie în mediu RPMI 1640 suplimentat cu 5% ser bovin fetal inactivat prin căldură, 2 mM L-glutamină, 100 unități/ml penicilină și 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycină, la 37°C într-un incubator umidificat cu atmosferă de 5% CO_2 . Celule cu creștere exponențială au fost ajustate la o densitate de 0.2×10^6 celule/ml în ziua anterioară experimentului. Am folosit soluție 30% de peroxid de hidrogen și soluții stoc de bisulfid de sodiu de menadionă în tampon fosfat salin (PBS), sau quercetină dihidrat și epigallocatechină galată dizolvate în dimetil sulfoxid (DMSO). Rotenonul a fost dizolvat în dimetil sulfoxid (DMSO). DMSO a fost de 0.125% (v/v) în toate culturile. În tratamente combinate, agentul oxidant s-a adăugat direct în culturile celulare după preincubarea cu QC ori EGCG, așa cum s-a specificat, fără spălare intermediară. Dacă nu se specifică altfel, toate chimicalele au fost cumpărate de la Sigma-Aldrich. După fiecare tratament celulele au fost spălate bine cu PBS și resuspendate în PBS la temperatura camerei (20°C) (pentru probele DL, $\sim 40 \times 10^6$ celule/ml, ori pentru spectrofluorimetrie, $\sim 1 \times 10^6$ celule/ml) ori în mediu complet pentru evaluarea apoptozei ($\sim 0.2 \times 10^6$ celule/ml). Probele DL și fluorimetrice au fost analizate imediat prin spectroscopie DL și de fluorescență. Densitatea, viabilitatea și morfologia celulară au fost examinate cu o cameră CCD Logitech QuickCam Pro 4000, conectată la un microscop cu contrast de fază Olympus CK30. Pentru evaluarea densității celulare, alicote de 25 μl din probele pentru DL au fost diluate în PBS, colorate cu 0.4% soluție de albastru tripan și $\sim 1500\text{--}2000$ celule au fost numărate cu un hemocitometru Bürker la momentul măsurătorii DL. Evaluarea numărării celulare a fost realizată atât în timpul experimentelor DL cât și prin inspecție vizuală la microscop și, ulterior, prin analiza microgafiilor cu ajutorul programului ImageJ.

2.3. Măsurătorile de spectroscopia de luminescență întârziată. Am utilizat varianta îmbunătățită a sistemului ARETUSA descrisă mai sus. Semnalele detectate au fost achiziționate cu un dispozitiv multicanal (Ortec MCS PCI), cu un pas minim de timp 200 ns. Măsurătorile DL s-au făcut pentru minimum 3 picături diferite din fiecare eșantion de celule (volumul picăturii 15-25 μ l) la temperatura camerei ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). Luminescența PBS s-a scăzut din fiecare înregistrare. Fotoemisia a fost înregistrată între 11 μ s și 100 ms după excitarea cu laser. Intensitatea DL (I) a fost obținută ca fiind numărul de fotoni înregistrat într-un anumit interval de timp divizat prin acel interval de timp și prin numărul de celule vii din picătură. Randamentul cuantic a fost calculat în trei domenii temporale ale emisiei DL: 11-100 μ s (DL-I), 100 μ s - 1 ms (DL-II) și 1-10 ms (DL-III), ca raportul dintre integrala lui I și energia laserului. Intensitatea DL galben/verde a fost estimată prin scăderea contribuției aditive a intensităților DL albastru și roșu din intensitatea DL VIS. Datele de scădere în timp a curbelor de fotoemisie DL au fost fitate cu o ecuație de tip: $y = \sum A_i \exp(-t/\tau_i)$ cu un număr variabil de componente exponențiale. Pentru fiecare set de date de emisie DL, VIS, albastru, verde/galben sau roșu, constantele de timp de scădere (τ_i) și numărul minim de componente DL exponențiale ale DL s-au stabilit din cel mai bun fit simultan pentru toate curbele DL obținute cu celulele control și cu cele tratate cu rotenon în setul respectiv de date spectroscopice. Apoi randamentul DL corespunzător fiecărei componente cinetice s-a calculat pentru fiecare curbă DL individuală ca fiind produsul $A_i \tau_i$. Pentru a facilita comparația dintre diferitele componente spectrale DL, care au prezentat unele diferențe semnificative în cinetica de emisie, produsul cuantic al DL a fost calculat în unele cazuri în trei domenii ale emisiei DL, corespunzând celor trei clase principale de emisie de lumină: 11-100 μ s (S_1), 100 μ s - 1 ms (S_2) și 1-10 ms (S_3), ca integrala funcțiilor de fitare I pe domeniul de timp respectiv. Această analiză nu a putut să fie realizată într-o manieră consistentă în domeniul de timp 10-100 ms, deoarece în unele cazuri raportul semnal/zgomot a fost prea mare în această regiune.

2.4. Statistica. Dacă nu se indică altfel, datele sunt prezentate ca media \pm e.m.s. (e.m.s. – eroarea medie standard) pentru cel puțin trei măsurători diferite. **Fitarea datelor** s-a realizat cu programul Origin, versiunea 7.5.

3. Rezultate

3.1. Determinarea caracteristicilor DL (cinetica, produs cuantic, componente spectrale) în celule tratate cu EGCG

Într-o primă etapă, ne-am propus studierea caracteristicilor luminescenței întârziate în cazul tratamentelor celulelor Jurkat cu EGCG în diferite concentrații. EGCG a exercitat asupra DL un efect calitativ diferit de cel al quercetinei producând o reducere destul de uniformă a intensității fotoemisiei pe întreaga scară de timp (Fig. 2). Am găsit anterior că menadiona (MD), quercetina (QC) și H_2O_2 acționează ca inhibitori ai DL [Baran I. et al, 2010]. EGCG a acționat ca un antioxidant față de reducerea DL-II determinată de tratamentul cu H_2O_2 . Astfel, pre-tratamentul cu 10 μ M EGCG timp de 24 h a putut induce o revenire semnificativă a emisiei DL-II. De asemenea, în cazul reducerii drastice a DL în urma tratamentului cu menadionă, preincubarea cu EGCG a indus, în general, o revenire parțială a DL-III până la ~25% din valoarea de repaus.

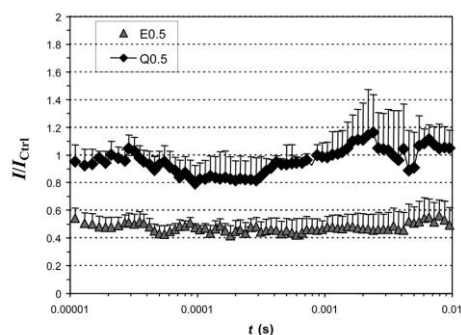


Fig. 2. Cinetica emisiei DL a celulelor Jurkat după tratamente cu flavonoide. Tratamentele sunt marcate în figură. Intensitatea emisiei de lumină a celulelor tratate (I) este normalizată la intensitatea DL a celulelor control (I_{Ctrl}).

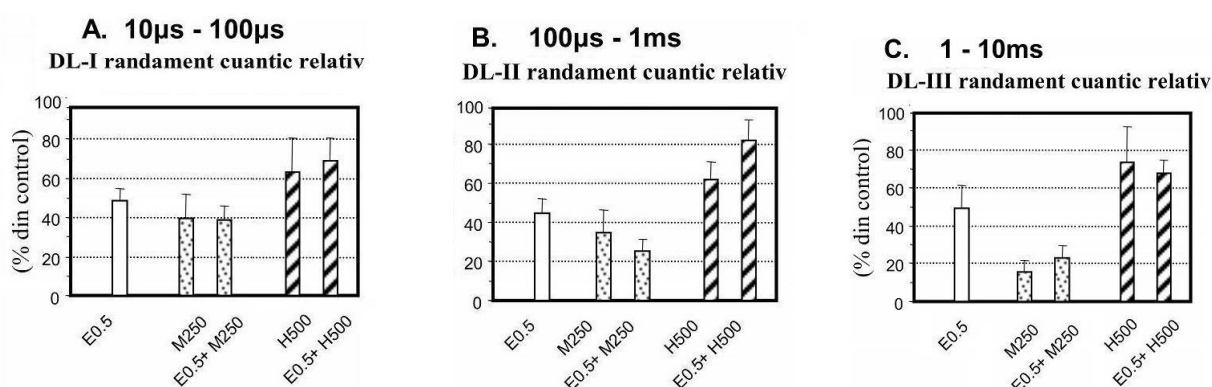


Fig. 3. Produsul cuantic al DL relativ la control (A-C) la diferite tratamente așa cum sunt indicate în figură. E, M/ME, H/ HE reprezintă tratamente cu EGCG, tratamente cu MD cu sau fără preincubare cu EGCG, tratamente cu H_2O_2 cu sau fără preincubare cu EGCG. Rezultatele obținute pentru domeniile de timp DL separate DL indicate în căsuțele interioare sunt prezentate individual pentru DL-I (A), DL-II (B) și DL-III (C).

Fig. 3 prezintă valorile relative față de control ale produsului cuantic în cele 3 zone ale emisiei DL în urma tratamentului cu EGCG și tratamentelor combinate. Din punct de vedere al componentelor spectrale, se constată că EGCG prezintă un efect uniform pentru toate lungimile de undă studiate (de aceea nu se arată).

3.2. Determinarea dependenței/ independenței luminescenței întârziată de potențialul membranelor mitocondriale și de nivelul de superoxid mitocondrial

Studiile noastre anterioare au indicat faptul că DL este corelată cu activitatea Complexului I al lanțului respirator mitocondrial (MRC) dar nu cu existența rupturilor lanțului ADN [Baran I. et al, 2009, 2010].

Am continuat investigațiile noastre anterioare privind corelația între metabolismul mitocondrial și DL, utilizând din nou inhibitorul respirației mitocondriale rotenon (ROT). După cum am arătat anterior (raport 2013) ROT, un inhibitor specific al respirației mitocondriale [Li N., 2003, Xu X., E.A. Arriaga, 2009], se leagă în Complexul I la două situsuri distincte, care nu interacționează [Suzuki H., T.E. King, 1983, Grivennikova V.G. et al., 1997]. Aceste situsuri ROT, denumite situsul 1 ROT și situsul 2 ROT, sunt cel mai probabil situate în subunitățile

49-kDa și ND1 ale Complexului I, respectiv [Albracht S.P.J. et al., 2011]. Cele două situsuri ROT, care prezintă afinități diferite pentru inhibitor [Magnitsky S. et al., 2002], par a fi implicate în transferul de electroni direct și invers, respectiv [Grivennikova V.G. et al., 1997]. Este larg acceptat că în modul direct (implicând situsul 1) ROT întrerupe fluxul de electroni la nivelul ubiquinonei legate de proteină adiacent centrului N2 (Q_{Nf}), specific prin destabilizarea ubisemiquinonei produsă după acceptarea primului electron de la centrul N2 [Ohnishi S.T. et al., 2005]. Ca o consecință directă a blocajului cu rotenon, respirația încetează și nivelul intracelular de NADH crește datorită lipsei consumului de către mitocondrie. Mai mult, electronii acumulați sunt deviați dinspre Complexul I către oxigenul molecular din jur, producând astfel superoxid ($O_2^{\bullet-}$) la rate ridicate, eliberat apoi în matrice [Xu X., E.A. Arriaga, 2009]. Superoxidul produs de către lanțul transportor de electroni mitocondrial este convertit rapid la peroxid de hidrogen (H_2O_2) prin acțiunea superoxid dismutazelor mitocondriale. Rotenonul și în general rotenozii au demonstrat o activitate anticancer care a fost atribuită inducerii apoptozei [Isenberg, J.S., J.E. Klaunig, 2000, Li N. et al., 2003]. Efectele apoptotice ale rotenonului asupra celulelor de leucemie umană Jurkat T au fost demonstrate de câteva studii în care au fost folosite doze și timpi de aplicare particulari [Isenberg, J.S., J.E. Klaunig, 2000, Yin W. et al., 2009].

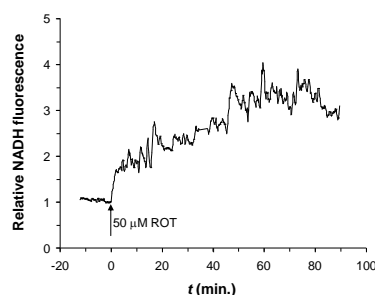


Fig. 4. Cinetica variației nivelului relativ de NADH intracelular în suspensii de celule Jurkat înainte și după expunerea la 50 μ M rotenon [Baran I. et al., 2014].

Studiile noastre anterioare [Baran I. et al., 2014] prin măsurători spectrofluorimetrice de determinare a efectelor rotenonului asupra celulelor Jurkat au pus în evidență modificări ale nivelului de superoxid mitocondrial și ale celui de NADH intracelular.

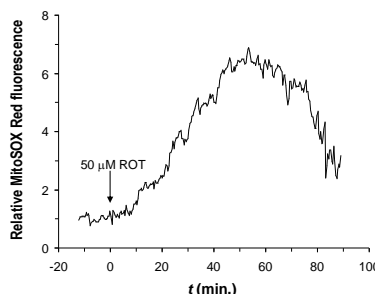


Fig. 5. Cinetica variației nivelului relativ de superoxid mitocondrial în suspensii de celule Jurkat înainte și după expunerea la 50 μ M rotenon. Valoarea fluorescenței emise de indicatorul MitoSOX Red a fost raportată la valoarea medie înregistrată pe o perioadă de 10 min. înainte de adăugarea ROT în suspensie [Baran I. et al., 2014].

S-a obținut o creștere marcantă a ambelor mărimi, cu un maxim atins după cca. 40-60 min., urmată de o perioadă de scădere pronunțată a nivelului de superoxid (Fig. 4, 5). Deoarece atât MD cât și QC inhibă respirația mitocondrială la nivelul Complexului I, am investigat mecanismele prin care acești compuși au asupra DL un efect opus celui al rotenonului. În acest scop am măsurat variațiile NADH intracelular și superoxidului mitocondrial după expunerea la diferite doze de ROT. Așa cum era de așteptat ambele niveluri au crescut consistent (până la de ~8 ori) (Fig. 6). În schimb QC a scăzut substanțial (de ~3-5 ori) atât nivelul de NADH cât și pe cel de superoxid, probabil exercitând un efect antioxidant care a împiedicat acumularea acestor specii (nu se arată).

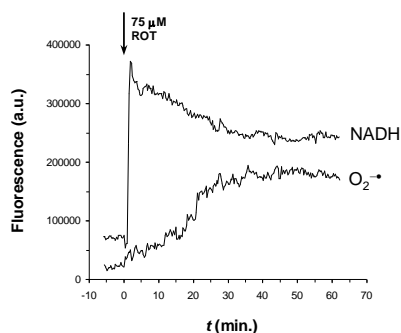


Fig. 6. Dependența de timp a nivelurilor de NADH și superoxid mitocondrial în suspensii de celule Jurkat expuse la 75 μ M ROT.

Important, măsurătorile noastre au indicat pentru prima dată o corelație foarte puternică între produsul cuantic al DL și nivelul de NADH celular și de superoxid mitocondrial (Fig. 7), care a fost caracterizată de către un coeficient de corelație Pearson de 0.95 și 0.96 (în domeniul vizibil), și de 0.84 și 0.88 (la 686 nm), respectiv. Toate aceste date sprijină puternic ideea conform căreia Complexul I al lanțului respirator mitocondrial este o sursă importantă de luminescență întârziată în celulele vii și sugerează faptul că DL este corelată cantitativ atât cu nivelul de NADH cât și cu cel de superoxid mitocondrial.

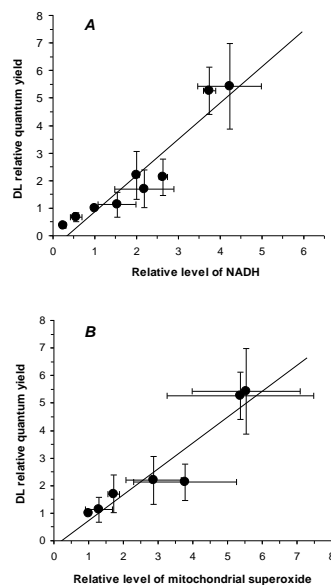


Fig. 7. Corelația dintre produsul cuantic relativ al DL în domeniul vizibil și nivelul de NADH (A) și de superoxid mitocondrial (B) relativ la control.

În plus, măsurătorile noastre indică faptul că recombinarea de sarcini în centrul N2 al Complexului I produce luminescență întârziată cu o lungime de undă caracteristică de 686 nm și o constantă de timp de scădere de 132 μ s. Am urmărit în continuare să cuantificăm efectele rotenonului asupra luminescenței întârziate în limfoblaști Jurkat. Cercetările noastre [Baran I. et al., 2013] au sugerat că procesele de oxido-reducere la nivelul centrilor Fe/S care se produc în timpul transferului de electroni în Complexul I al lanțului respirator mitocondrial au o contribuție dominantă la emisia DL pe o scală de timp de 10 μ s - 10 ms. Pentru determinarea proprietăților DL, probele celulare, atât cele netratate cât și cele tratate cu 50 μ M ROT, au fost spălate de 2 ori în PBS și resuspendate în PBS la o concentrație de 30×10^6 celule/ml și au fost iluminate cu radiație UV în regim de pulsuri, produsă de o sursă de azot și având lungimea de undă caracteristică $\lambda = 337$ nm.

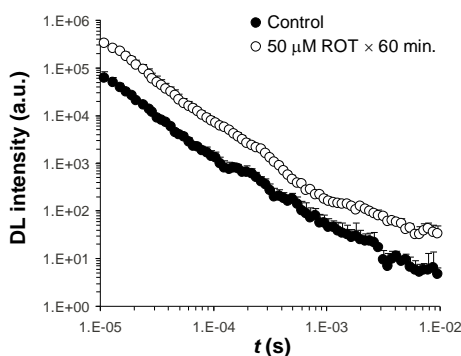


Fig. 8. Cinetica emisiei DL în suspensii celulare netratate (Control) sau tratate cu 50 μ M rotenon timp de 60 min.

Emisia de fotoni a probei în domeniul vizibil (VIS) a fost măsurată în intervalul 11 μ s – 10 ms de la iluminare, prin spectroscopie DL, utilizând tubul fotomultiplicator Hamamatsu R-7602-1/Q. Am calculat produsul cuantic în trei domenii ale emisiei DL, respectiv: 11 - 100 μ s (DL-I), 100 μ s - 1 ms (DL-II) și 1 - 10 ms (DL-III), raportând integrala temporală a intensității emisiei de fotoni la energia fascicolului laser.

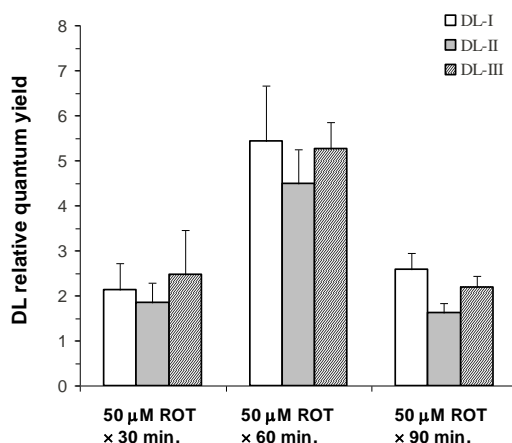


Fig. 9. Produsul cuantic relativ al emisiei DL în VIS în suspensii celulare tratate cu 50 μ M rotenon timp de 30, 60 sau 90 min. Produsul cuantic DL calculat pe cele trei domenii temporale a fost raportat la valoarea corespunzătoare obținută în suspensii celulare netratate.

La aceasta doză de ROT, am obținut un efect bifazic în funcție de timpul de tratament, observând un maxim al emisiei DL în VIS la tratamente de 60 min. și o revenire semnificativă la tratamente de 90 min. (Fig. 9). Am înregistrat o creștere substanțială a produsului cuantic pe toate cele trei domenii în probele tratate cu 50 μ M ROT timp de 60 min., comparativ cu probele netratate (Fig. 9). Aceste rezultate au fost corelate cu inducerea preferențială a apoptozei și nu a necrozei prin tratamente cu rotenon în acest sistem celular. Emisia de fotoni a probei (DL) la lungimea de undă de 686 nm a fost măsurată în intervalul 11 μ s - 10 ms de la iluminare, prin spectroscopie DL, utilizând un filtru interferențial Lot-Oriel cu lărgimea de bandă de 80 nm, pentru selecția lungimii de undă a luminii transmise. Am înregistrat o creștere substanțială a randamentului cuantic pe toate cele trei domenii în probele tratate cu 50 μ M ROT timp de 60 min., comparativ cu probele netratate (Fig. 10).

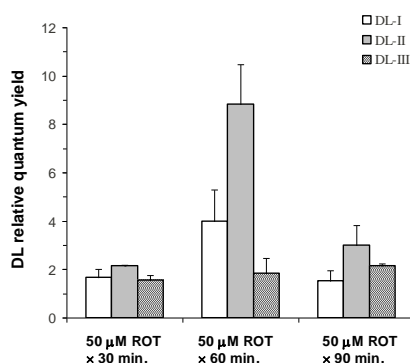


Fig. 10. Produsul cuantic relativ al emisiei DL la 686 nm în suspensii celulare Jurkat tratate cu 50 μ M rotenon timp de 30, 60 sau 90 min. Produsul cuantic DL calculat pe cele trei domenii temporale a fost raportat la valoarea corespunzătoare obținută în suspensii celulare netratate.

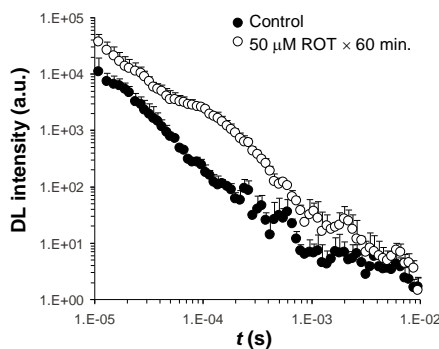


Fig. 11. Cinetica emisiei DL la 686 nm în suspensii celulare Jurkat netratate (Control) sau tratate 60 min. cu 50 μ M ROT.

La această doză de ROT, am obținut un efect bifazic în funcție de timpul de tratament, observând un maxim al emisiei DL la 686 nm la tratamente de 60 min. și o revenire semnificativă la tratamente de 90 min. (Fig. 10). Componenta DL-II a prezentat o variație marcantă comparativ cu DL-I și DL-III. Din fitarea datelor de cinetică a emisiei DL (Fig. 11) s-a obținut o constantă de timp caracteristică de 132 μ s, după cum am arătat mai sus, care poate fi interpretată ca fiind corelată cu reacțiile de oxido-reducere care au loc la nivelul centrului redox N2 al complexului I al lanțului respirator mitocondrial.

Am studiat în continuare dependența DL de doza de ROT in limfoblaști Jurkat. Suspensiile celulare au fost incubate, fiind sau nu expuse la 25 μM , 50 μM și respectiv 75 μM ROT timp de 30 min. la 37°C. Probele DL au fost apoi preparate in PBS la o concentrație de 30×10^6 celule/ml și iluminate cu radiație UV ($\lambda = 337 \text{ nm}$) în regim de pulsuri. Emisia de fotoni a probei a fost măsurată atât în întregul domeniu vizibil (VIS), cât și la lungimile de undă $460 \pm 40 \text{ nm}$ și respectiv $686 \pm 40 \text{ nm}$, în intervalul de timp 11 μs - 20 ms. Am efectuat fiecare experiment în triplicat, realizând în total un număr de 24 măsurători, incluzând probele celulare netratate. Pentru fiecare doza de ROT am calculat valorile medii ale intensității fotoemisie DL în funcție de timp și am fitat fiecare curbă de emisie cu o sumă de 4 exponențiale (în VIS) sau 6 exponențiale (pentru emisia la 460 nm sau la 686 nm).

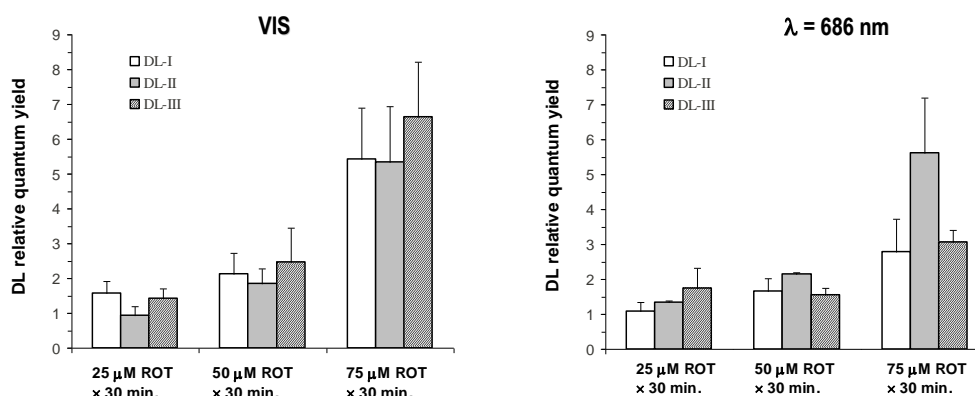


Fig. 12. Produsul cuantic relativ al emisie DL in VIS sau la 686 nm in suspensii celulare Jurkat tratate cu 25, 50 sau 75 μM rotenon timp de 30 min. Produsul cuantic DL calculat pe cele trei domenii temporale a fost raportat la valoarea corespunzătoare obținuta în suspensii celulare netratate.

Constantele de timp caracteristice obținute au fost de: 22.9 μs , 140 μs , 1.40 ms și 8.50 ms (în VIS), respectiv 13.3 μs , 129 μs , 388 μs , 1.70 ms, 3.87 ms și 8.25 ms pentru emisia de lumina roșie (la $\sim 686 \text{ nm}$) sau albastră (la $\sim 460 \text{ nm}$). Aceste valori dau indicații asupra diferitelor rate de transfer electronic la nivelul Complexului I al lanțului respirator mitocondrial. Am înregistrat o creștere a randamentului cuantic cu doza de rotenon pe toate cele trei domenii DL comparativ cu probele netratate, astfel (Fig. 12): 1) în VIS, pentru doza de 25 μM ROT, creșterea medie a fost de 1.5 ori pentru DL-I, de 1.1 ori pentru DL-II și respectiv de 1.3 ori pentru DL-III, iar la 50 μM ROT, creșterea medie a fost de 2.1 ori pentru DL-I, de 1.9 ori pentru DL-II și respectiv de 2.6 ori pentru DL-III; 2) la 686 nm, pentru doza de 25 μM ROT, creșterea medie a fost de 1.2 ori pentru DL-I, de 1.3 ori pentru DL-II și respectiv de 1.7 ori pentru DL-III, iar la 50 μM ROT, creșterea medie a fost de 1.6 ori pentru DL-I, de 2.1 ori pentru DL-II și respectiv de 1.4 ori pentru DL-III.

ROT a produs efecte puternice asupra luminescenței întârziate (Fig. 12). După tratamentul cu 75 μM ROT timp de 30 min. s-a observat o creștere ~ 6 -ori a produsului cuantic al DL în domeniul vizibil. Interesant, dependența de timp a efectului ROT asupra DL a fost bifazică, cu un maximum observat pentru tratamente de 60 min. urmată de o revenire substanțială la 90 min., indicând faptul că celulele au neutralizat blocajul produs de rotenon. Această idee este, de asemenea, puternic sprijinită de absența observată a necrozei, ceea ce sugerează că celulele au reluat respirația mitocondrială. Amplificarea DL observată la durată optimă de tratament

(60 min.) a crescut cu doza de rotenon. Efecte similare calitativ au fost observate atunci când DL s-a înregistrat la $\lambda = 686$ nm, în timp ce la $\lambda = 460$ nm nu a existat o diferență măsurabilă față de celulele control (nu se arată). DL la $\lambda = 686$ nm a prezentat o creștere marcată în domeniul DL-II, și cinetica de fotoemisie a arătat o componentă exponențială distinctă cu o constantă de timp de 132 μ s. Această valoare este în bun acord cu rata transferului de electroni la cei doi centri Fe/S extremi N1a și N2 în Complexul I al MRC [Fiorani M. et al., 2010], ceea ce sugerează că DL-II/686 nm poate fi o bună măsură a transferului de electroni la nivelul centrului N2, cel mai apropiat de situl ubiquinonei Complexul I.

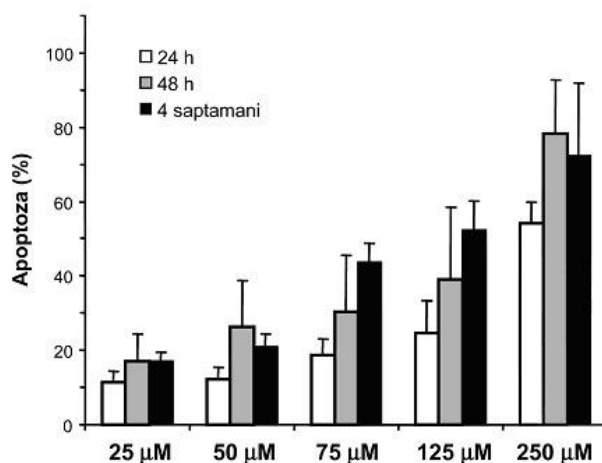


Figura 13: Rotenonul induce apoptoză în celulele Jurkat într-o manieră dependentă de doză. Apoptoza a fost evaluată la 24 h și 48 h după tratamentul cu ROT timp de 1 h la dozele indicate. În figură este reprezentată rata morții calculată din supraviețuirea clonogenică obținută la 4 săptămâni de la tratament (barele negre) este comparată cu rata apoptozei (barele albe/gri) obținută după scăderea ratei apoptotice nespecifice.

În acord cu datele anterioare (raport 2013), ROT induce apoptoză în celulele Jurkat într-o manieră dependentă de doză (Fig. 13). Rezultatele noastre evidențiază corelarea strânsă dintre metabolismul mitocondrial și luminescența întârziată. Aceste date se completează cu cele privind nivelul mitocondrial de NADH și FMN, date care vor fi prezentate mai departe.

3.3. Caracterizarea corelației dintre luminescența întârziată și nivelul mitocondrial de NADH și FMN stabilită după o serie largă de tratamente cu quercetină, menadionă, rotenon și EGCG.

Cu ajutorul DL am monitorizat efectele MD, H₂O₂, QC, și EGCG asupra apoptozei și ciclului celular în celulele Jurkat T de leucemie umană. Creșterea caracteristică a celulelor Jurkat în suspensie a recomandat acest tip de celule ca fiind mai potrivit pentru investigația de DL, întrucât minimizează considerabil timpul de preparare a eșantioanelor ca și stresul celular produs în timpul probei de luminescență întârziată, astfel încât a fost evitată orice interferență artificială cu metabolismul celular a unui pas suplimentar de tripsinizare.

Menadiona (vitamina K3) este un agent chimioterapeutic important clinic utilizat în tratamentul leucemiei și al altor tipuri de cancer. MD participă la reacțiile redox ciclice catalizate de către un număr de flavoenzime, producând astfel mari cantități de anion superoxid intracelular. Reducerea menadionei la Complexul I al lanțului respirator mitocondrial (MRC), care este responsabilă de 50% din metabolismul menadionei, poate devia fluxul de electroni de la Complexul I și astfel să interfereze cu respirația mitocondrială. Quercetina (QC) este un flavonoid natural care poate prezenta atât proprietăți antioxidante cât și prooxidante. Pentru a crește eficiența chimioterapiilor în leucemie s-a propus utilizarea unor tratamente în combinație cu quercetina. Mai mult, am profitat de avantajul oferit de abilitatea specifică a quercetinei de a se acumula în interiorul mitocondriilor celulelor Jurkat, ca și de faptul că atât quercetina cât și menadiona par a interacționa robust cu mitocondriile și de a induce apoptoza pe cale mitocondrială. Astfel, am putut proba dacă DL este corelată cu metabolismul mitocondrial.

Diferite concentrații și diferiți timpi de incubare cu menadionă, peroxid de hidrogen, quercetină și EGCG, ca și tratamente combinate au fost testate prin evaluarea prin citometrie în flux a fracțiilor celulare în fiecare din fazele ciclului celular. Apoptoza a fost evaluată ca fracția de fragmente celulare hipodiploide (fracția celulară sub-G₀/G₁). Mai precis, celulele Jurkat au fost tratate cu 0.5, 5, 50 μM quercetină timp de 24 h, 10 ori 50 μM quercetină timp de 1 h, 25 μM menadionă timp de 20 min și 4 h, 250 μM menadionă timp de 20 min, 100 ori 500 μM peroxid de hidrogen timp de 20 min, 0.5 μM EGCG timp de 24h, și tratamente combinate de preincubare cu QC ori EGCG urmată de adăugarea de 250 μM menadionă sau 100/500 μM H₂O₂ timp de 20 min. Am efectuat măsurătorile de luminescență întârziată (DL) pentru tratamentele menționate mai sus.

Intensitatea DL, *I*, a fost normalizată la numărul de celule vii din probă. Curbele DL pentru celulele Jurkat au prezentat o scădere complexă, cu mai multe componente. Pentru a evidenția mai bine efectele diferitelor tratamente asupra cineticii DL, am reprezentat, de asemenea, variația în timp a intensității fotoemisieii relativ la intensitatea DL a celulelor control, așa cum se vede în Fig.14.

În figură se observă cele trei domenii de timp distincte în care DL manifestă caracteristici diferite și anume 11 - 100 μs (notat DL-I), 100 μs - 1 ms (DL-II) și 1 - 10 ms (DL-III). La doze crescătoare, quercetina a inhibat progresiv DL [Baran I. et al., 2010, 2012, Scordino A. et al., 2014]. Regiunea cea mai sensibilă a fost DL-III, în care după tratamentul cu 50 μM QC timp de 24 h, în timp ce DL-I a fost afectată de quercetină foarte puțin. EGCG a exercitat un efect calitativ diferit asupra DL determinând o reducere destul de uniformă a intensității fotoemisieii pe întreaga scală de timp. 500 μM H₂O₂ aplicați timp de 20 min. au redus semnificativ DL în regiunile DL-I și DL-II. Pretratamentul cu 0.5 μM EGCG timp de 24 h a indus o revenire semnificativă a emisiei DL-II, în timp ce preincubarea cu 10 μM QC timp de 1 h a redus și mai mult intensitatea DL-III. Doza mai redusă de 100 μM H₂O₂ a avut un efect modest asupra DL și a inhibat fotoemisia cu ≈22% pe întreaga scală de timp. Preincubarea cu 50 μM QC timp de 24 h a restabilit emisia DL-I dar a inhibat substanțial DL-II și DL-III. Menadiona a inhibat, de asemenea, DL într-o manieră dependentă de doză. În plus, față de efectul modest al QC asupra DL-I, MD a redus substanțial fotoemisia în regiunea DL-I. Această inhibiție a fost puternică chiar și la cea mai joasă doză de menadionă de 25 μM. DL-II a fost inhibată într-o măsură similară de către doze mari de MD, în timp ce DL-III a prezentat o reducere drastică. Preincubarea cu cele două flavonoide a indus în general o revenire parțială a DL-III până la cca. 25% din valoarea de repaus, exceptând cazul pretratamentului cu 5 μM

QC timp de 24 h, când s-a înregistrat o reducere suplimentară de $9.2 \pm 3.8\%$. Mai mult, în urma evaluării produsului cuantic, calculat în cele trei domenii ale curbei intensității DL ca fiind raportul dintre integrala I (în intervalul de timp considerat) și energia laserului, s-a găsit o corelație negativă semnificativă ($r = -0.63$) între DL-II și fracția de celule apoptotice la tratamente cu diferite doze și diferiți timpi de incubare pentru cei doi inducitori de stres oxidativ, MD și H_2O_2 , și cele două flavonoide, QC și EGCG.

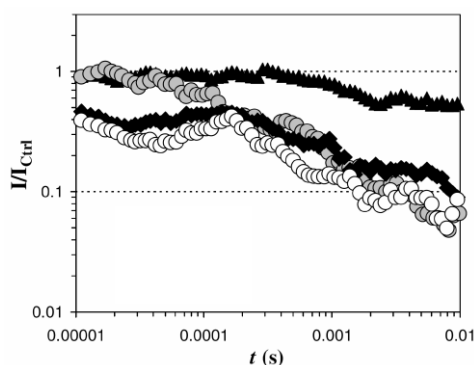


Fig. 14. Cinetica emisiei DL a celulelor Jurkat la diferite tratamente: 5 μ M (\blacktriangle) și 50 μ M (cercurile gri) QC timp de 24 h, 250 μ M menadionă timp de 20 min, singură (\blacklozenge) și după (\circ) preincubare cu 5 μ M QC timp de 24 h. Intensitatea emisiei de lumină (I) este normalizată la intensitatea DL a culturii netratate (I_{Crl}).

Mai mult, selectând numai tratamentele cu MD, QC, și combinații ale celor două, am obținut o anticorelație foarte puternică între produsele cuantice pentru ambele DL-II și DL-III și apoptoză ($r = -0.90$ și -0.84 , respectiv)(Fig. 15). Toate seturile de date au fost consistente cu ipoteza că luminescența întârziată a celulelor Jurkat își are originea într-o măsură majoră în Complexul I al lanțului respirator mitocondrial (MRC). În Complexul I, cei doi electroni eliberați prin reducerea nicotinamid adenin dinucleotidului (NADH) la flavin mononucleotid (FMN) sunt transferați între opt clusteri consecutivi de fier-sulf (Fe/S), ajungând în cele din urmă la ubiquinonă. Rezultatele noastre au sugerat că după iradierea cu UV, FMN poate produce stări excitate singlet care fie decad la starea fundamentală prin fluorescență promptă fie suferă o traversare intersistem la stări triplet de viață lungă care pot ulterior să se relaxeze la stări metastabile intermediare.

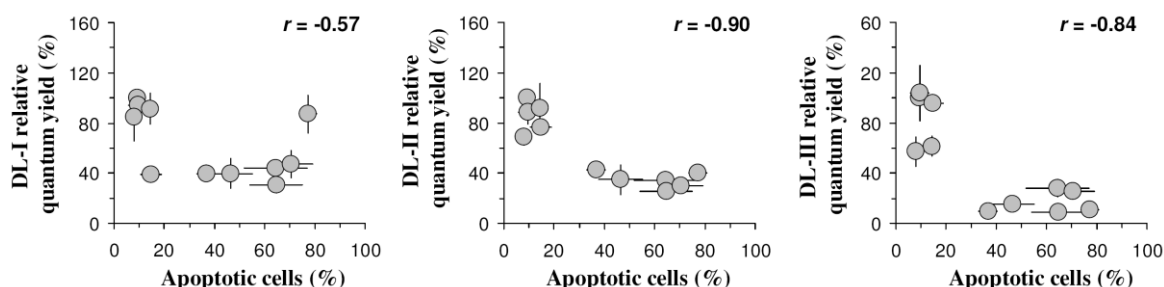


Fig. 15. Produsul cuantic relativ DL ca funcția de fracția celulară apoptotică pentru tratamente cu QC și MD cu și fără preincubare cu QC, în cele trei intervale de timp ale curbei DL: 11 - 100 μ s (DL-I), 100 μ s - 1 ms (DL-II) și 1 - 10 ms (DL-III).

Aceste specii de stări triplet-ori metastabile prezintă un timp lung de viață intrinsecă, permițând producerea unei serii de reacții fotochimice în Complexul I via recombinații în centrul redox Fe/S redox și a producerii apoi de excitări secundare, dând astfel naștere luminescenței întârziate. Este demn de notat că din literatură se știe că unii inhibitori de transport de electroni pot afecta emisia de lumină din cloroplaste [Felker P. et al, 1973] și Fotosistemul II, prima componentă din lanțul de transfer de electroni, care reprezintă analogul Complexului I MRC.

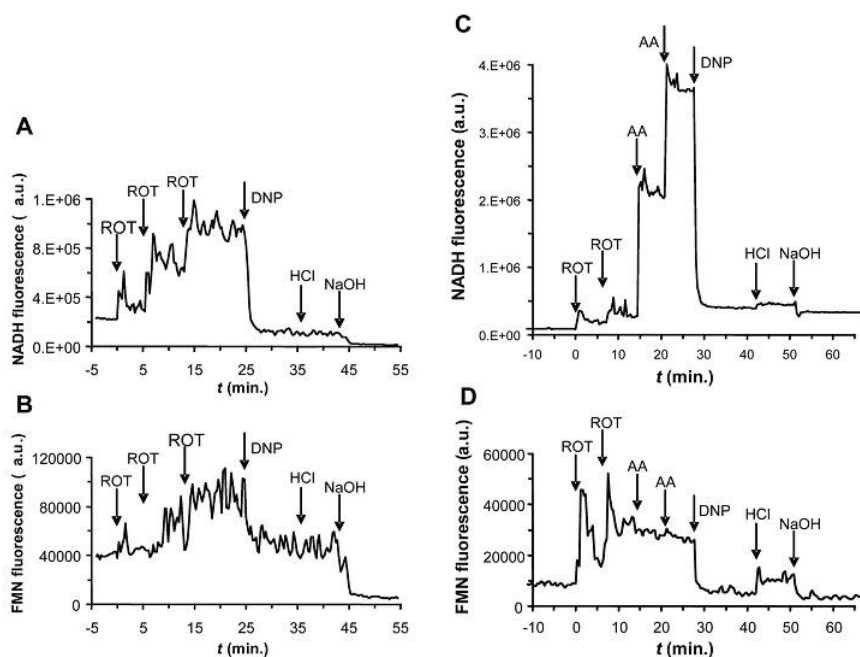


Fig. 16. Autofluorescența NADH și FMN în celulele Jurkat depind de starea metabolică a mitocondriilor. Traseele cinetice ale autofluorescenței NADH (A) și FMN (B) în suspensii agitate de celule Jurkat la expunere la ROT și 2,4-dinitrophenol (DNP) la 37°C. Substanțele au fost adăugate secvențial la punctele de timp indicate de săgeți: trei pași de 50 μM ROT fiecare, apoi 75 μM DNP, și în final 2.5 mM HCl și 5 mM NaOH. pH-ul final a fost de 6.1 și 7.9 după adăugarea HCl și NaOH respectiv. Traseele cinetice ale autofluorescenței NADH (C) și FMN (D) în celule Jurkat sub agitare la expunere, la 37°C, la ROT, AA (antimicina), și DNP. Substanțele au fost adăugate secvențial la momentele de timp (săgeți) indicate: 50 μM ROT, 25 μM ROT, 4 μM AA, 4 μM AA, 75 μM DNP, 1 mM HCl, și 2 mM NaOH. pH-ul final a fost de 6.9 și 7.6 adăugarea HCl și NaOH respectiv. Traseele în sunt reprezentative pentru trei experimente diferite.

În mod corespunzător, datele noastre anterioare [Baran I. et al., 2010, 2012, Scordino A. et al., 2014] au sugerat că DL-I ar putea fi determinată în principal prin reacții de transfer de electroni directe, în timp ce DL-II și DL-III ar putea fi determinate de către reacții de transfer de electroni inverse în Complexul I. Investigații ulterioare [Baran I., et al., 2013] au furnizat informații mai detaliate privind relația dintre diferitele domenii de timp caracteristice ale DL și pașii cinetici specifici ai reacțiilor redox care au loc între NADH, FMN, centrul Fe/S și ubiquinonă în Complexul I respirator, și au delineat căile principale de transfer de electroni care au putut fi asociate cu DL-I, DL-II și DL-III. Rezultate recente [Baran I. et al., 2013] obținute prin compararea efectelor MD și QC cu cele induse de rotenon (ROT), inhibitor specific al respirației mitocondriale [Li N. et al., 2003] și despre care se știe

că se leagă la două situsuri distincte ale Complexului I și care nu interacționează, întăresc ideea conform căreia Complexul I mitocondrial joacă un rol major în fotoemisia întârziată ultra slabă indusă de fotoni în celulele Jurkat. Rezultatele au permis, de asemenea, elucidarea efectului quercetinei asupra activității Complexului I. Investigațiile noastre anterioare (raport 2013, [Baran I. et al., 2013, 2014]) au indicat faptul că expunerea acută a celulelor Jurkat la 50 μM QC timp 1 h diminuează nivelul mitocondrial de superoxid și conținutul celular de H_2O_2 , și previne în mod eficient producerea extinsă de H_2O_2 indusă de menadionă. În pofida puternicului caracter antioxidant manifestat de către flavonoid, acest tratament cu QC a întărit semnificativ efectul antiproliferativ al menadionei. Datele obținute au indicat, de asemenea, că eliberarea de calciu este un pas critic în inducerea morții celulare de către QC, cel mai probabil pe calea unei supraîncărcări prelungite a mitocondriei cu Ca^{2+} . În studii anterioare [Baran I. et al., 2013, 2014] am găsit că un pre-tratament pe termen scurt cu 10 μM QC timp de 1 h a intensificat semnificativ apoptoza indusă de 250 μM MD. În linie cu acele studii, rezultatele noastre prezente indică faptul că pre-tratamentul cu 50 μM QC timp de 1 h intensifică substanțial moartea celulară indusă de 250 μM MD. Toutși, am arătat [Baran I. et al., 2013, 2014]) că, contrar a ceea ce ne așteptam, această intensificare nu se datorează producerii de ROS, ci este cel mai probabil rezultatul unei aboliri mai severe și mai prelungite a $\Delta\psi_m$ așa cum s-a observat în faza inițială care a urmat îndepărtării agentului. Determinarea spectrofluorimetrică a nivelurilor de NADH mitocondrial a sprijinit astfel ideea conform căreia ROT inhibă în timp ce QC ca și MD stimulează activitatea Complexului I prin inhibarea sau respectiv disocierea NAD^+ . Aceste diferențe se reflectă și în produsul cuantic al DL, atât în întreg domeniul lungimilor de undă de emisie cât și în componentele spectrale albastru ($\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) și roșu ($\lambda_{em} = 645 \text{ nm}$), așa cum se observă din Tabelul I, în care sunt comparate efectele tratamentelor care au produs aproximativ aceeași supraviețuire clonogenică. Este evidentă corelarea DL cu nivelul mitocondrial de NADH.

Tabel I. Niveluri relative de NADH și produsul cuantic DL în celulele Jurkat de leucemie umană expuse la tratamente cu ROT și QC cu aproximativ aceeași supraviețuire clonogenică.

Tratament	[NADH]_m relativ	Produs cuantic DL (VIS) 400-800 nm	Produs cuantic DL (albastru) 460 nm	Produs cuantic DL (roșu) 645 nm
Control	1	1	1	1
50 μM ROT × 30 min.	1,74	2,00	2,38	1,51
50 μM QC × 24 h	0,27	0,57	0,80	0,42

Anticorelația lineară ridicată între $\Delta\psi_m$ și $[\text{NADH}]_m$ observată în celulele Jurkat expuse scurt la rotenon (Fig. 3C în raportul din 2013) au furnizat o evidență accentuată privind faptul că hiperpolarizarea mitocondrială indusă de QC este direct legată de activitatea Complexului I. Pe această bază, am propus că în condițiile noastre se pot forma multimeri ai Complexului I, în care ROT siturile 1 interacționează cooperativ între monomeri. Conform cu această interpretare, valorile prezentate în Tabelul 3 din raportul pe 2013 au sugerat că dimerii Complexului I prezintă pentru ROT o afinitate aparentă de 3.6 μM , în timp ce trimerii și tetramerii Complexului I prezintă afinități mult mai reduse pentru ROT (215 μM și 164 μM , respectiv). Rezultatele obținute în laboratorul nostru folosind tehnica de investigare DL sprijină de asemenea ideea formării multimerilor Complexului I care să prezinte o cooperativitate puternică între monomeri la nivelul ROT situl 1.

Conform cu datele de DL, emisia de lumină albastră este cel mai probabil legată de stările excitate ale NADH, în timp ce nivelul crescut de lumină roșie după tratamentele cu ROT, luând în considerare legătura cu Complexul I, este cel mai probabil produs via fotoemisia dimol ($\lambda_{em} = 579, 634, \text{și } 703 \text{ nm}$) [Khan A. U., M. Kasha, 1970] generată de către ciocnirea a două molecule de oxigen singlet ($^1\text{O}_2$).

În legătură cu acest punct trebuie observat că filtrele de bandă largă (80nm FWHM) utilizate nu permit atribuirea univocă a spectrelor de emisie. Ca o consecință, în timp ce atunci când se compară celulele normale cu cele tumorale, componenta roșie a emisiei DL ar putea fi atribuită protoporfirinei, în acord cu măsurătorile de autofluorescență [Croce A. C. et al., 2011], atunci când se compară celulele leucemice după tratamentele cu ROT, rezultatele noastre diferă de cele care raportează o descreștere a emisiei protoporfirinei IX după inhibiția cu ROT a respirației mitocondriale [Mik E. G. et al., 2006, 2008]. Amplificarea puternică observată a componentelor roșii ale DL duce la concluzia că, cel puțin în celulele Jurkat leucemice, după excitarea la 337 nm, oxigenul singlet este generatorul dominant al emisiei DL în roșu. Toate aceste rezultate indică posibilitatea atractivă ca spectroscopia DL să poată fi utilizată ca o tehnică robustă, sensibilă și fiabilă care să permită urmărirea (probe) fluxului de electroni în Complexul I și obținerea unor informații valoroase privind organizarea structurală și funcțională a acestui complex respirator *in situ*. Sunt avute în vedere dezvoltări ulterioare în scopul utilizării în diagnosticul clinic al dezordinilor (tulburărilor) mitocondriale sau al cancerului.

3.4. Elaborarea unui model minimal al stărilor generatoare de DL

Descrierea caracteristicilor DL în termenii stărilor cu emisie de lumină cu timpi de viață în cele trei intervale de timp specificate mai sus, împreună cu evoluția în timp a reacțiilor redox care au loc în Complexul I [Verkhovskaya M. L. et al., 2008, Ransac S. et al., 2010] ne-au permis să propunem un model minimal al stărilor care generează DL (Fig. 18) produse în timpul transferului de electroni. Ca o consecință, din emisia întârziată de lumină roșie pot fi estimate scalele de timp pentru diferiții pași ai transferului de electroni care implică formarea de radicali flavină și ubisemiquinonă cu producere consecutivă de superoxid. Pentru a putea urmări modelul și raționamentele noastre, reproducem Fig. 1 din [Baran I. et al., 2013, raport 2013](Fig. 17). Fotoexcitarea în UV a FMN generează stări excitate singlet ale FMN care fie pot să revină la starea fundamentală prin fluorescență promptă [Foster K.A. et al., 2006] ori pot suferi o traversare intersistem spre stări de viață triplet de lungă durată care ulterior se pot relaxa la stări intermediare metastabile [Swartz, T.E. et al., 2001]. În mod analog cu cazul Fotosistemului II [Goltsev V. et al., 2005, Guo Y., J.

Tan, 2009], timpul de viață lung al speciilor de stări triplet- ori metastabile permite să se producă în Complexul I o serie de reacții fotochimice și să producă astfel excitări secundare, dând astfel naștere fotoemisie întârziată ultra slabe indusă de fotoni. Stările S_1 descrise aici cu emisie de lumină albastră sau verde/galbenă sunt cel mai probabil stări excitate ale NADH sau respectiv FMN_{ox} , care sunt produse după o serie de pași de transfer de electroni înainte sau înapoi ajungând până la centrul Fe/S, N4 (Fig. 18A).

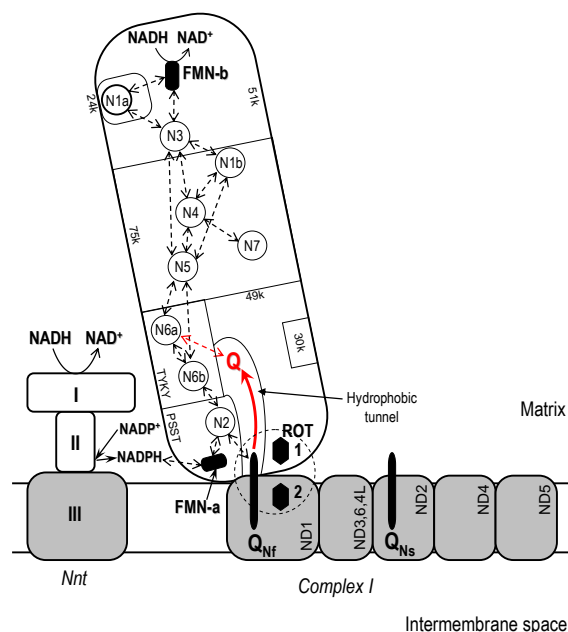


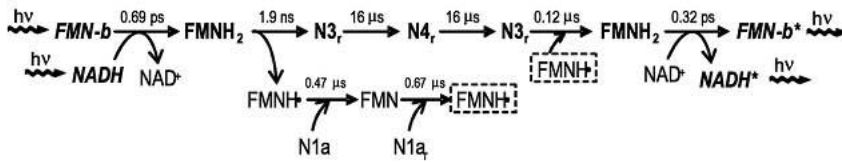
Fig. 17. Reprezentare modulară a arhitecturii Complexului I. Sunt reprezentate schematic cele șapte subunități hidrofille principale și cele șapte subunități membranare, marcate conform cu nomenclatura subunităților Complexului I uman. Pentru simplitate, subunitățile ND3, ND6 și ND4L sunt cuprinse într-un singur modul. Pozițiile relative ale diferitelor subunități și ale centrilor Fe/S sunt prezentate doar calitativ. Săgețile întrerupte indică posibilele reacții de transfer de electroni. Sunt ilustrate cele două grupări prostetice FMN și interacțiunea lor cu NADH/NADPH. Sunt specificate situsurile ROT (1 și 2) și cele două ale Q (Q_{Nf} și Q_{Ns}). Cercul întrerupt cuprinde buzunarul de legare al Q la interfața dintre domeniile hidrofил și hidrofob ale Complexului I. Q poate aluneca de-a lungul presupusului tunel hidrofob format între subunitățile de 49-kDa și PSST, și poate interacționa cu centrul N6a. Interacțiunea Nnt - Complex I poate regla reducerea FMN-a pe calea controlului raportului local $NADPH/NADP^+$ prin Nnt (aici, este ilustrat numai un monomer Nnt; sunt arătate cele trei domenii specifice ale monomerului, I, II (domeniile extramembranare) și III (domeniul membranar) [Baran I. et al., 2013, raport 2013].

O condiție necesară pentru cele două secvențe arătate în Fig. 18 Aa-b este aceea ca molecula NAD^+ oxidată primar să nu se disocieze de Complexul I în întregul interval de timp. Într-adevăr, timpul mediu în care NAD^+ rămâne atașat de Complexul I (~1 ms, [Verkhovskaya M.L. et al., 2008, Ransac S. et al., 2010] este mult mai lung decât timpul total de viață de 29.3 μs estimat pentru domeniul S_1 al traseelor de emisie de lumină albastră. În continuare, stările S_2 care emit lumină albastră (sau verde/galbenă) ar putea reprezenta stări excitate ale NADH (ori FMN_{ox}) regenerate pe calea recombinației de sarcină inverse după secvența primară sau pașii direcți de transfer înspre centrul N2 (Fig. 18 Ba). Apariția stărilor S_3 implică probabil transferul de sarcină de la centrul N1b către N5 și înapoi, ca și de la centrul N1a la N3 (Fig. 18C).

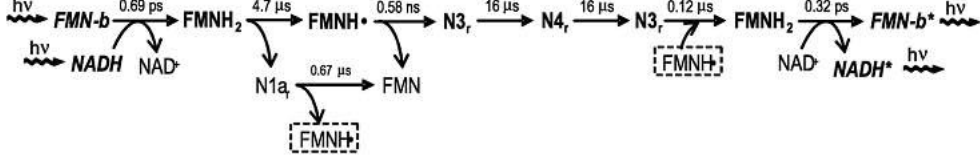
S₁

A

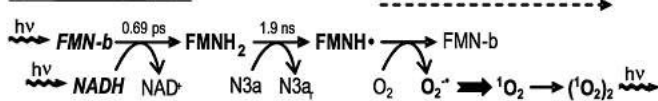
a) 32 μs (albastru, verde/galben)



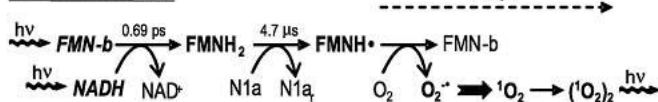
b) 37 μs (albastru, verde/galben)



c) 13.3 μs (roșu)



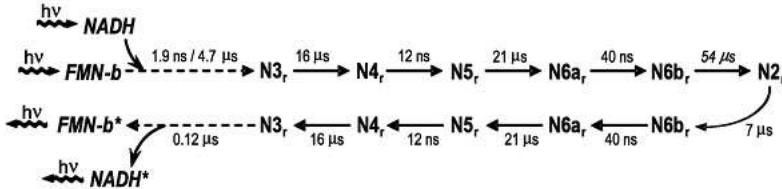
d) 18 μs (roșu)



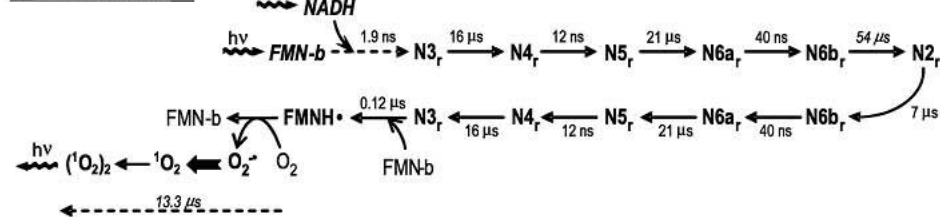
S₂

B

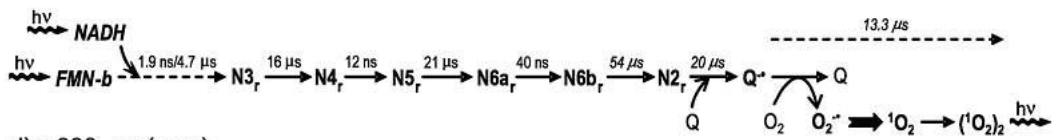
a) 135 μs/140 μs (albastru, verde/galben)



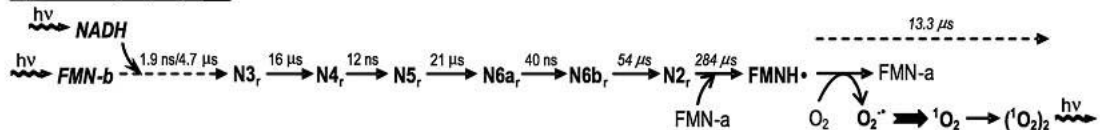
b) 148 μs (roșu)



c) 124 μs/129 μs (roșu)



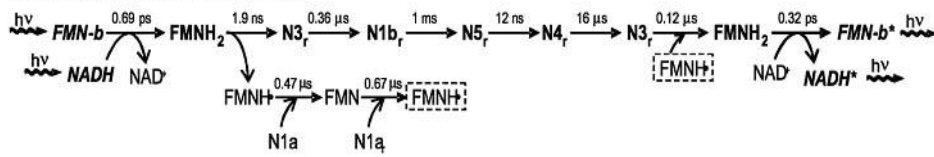
d) ≈ 390 μs (roșu)



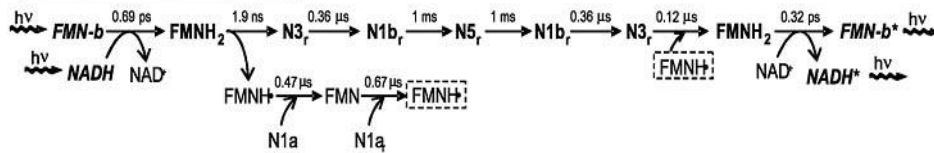
S₃

C

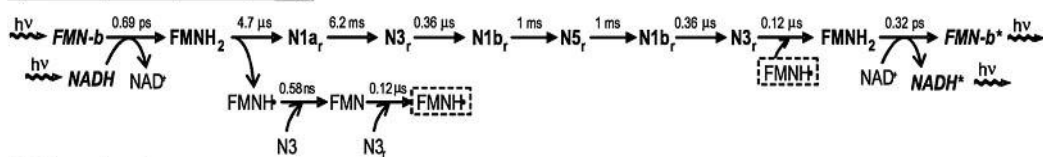
a) 1 ms (albastru, verde/galben)



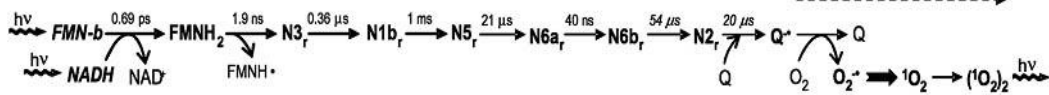
b) 2 ms (albastru, verde/galben)



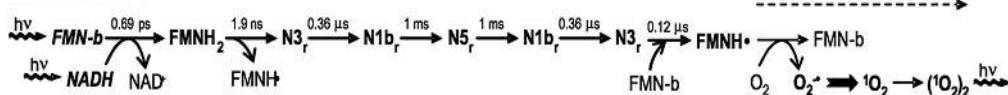
c) 8.2 ms (albastru, verde/galben)



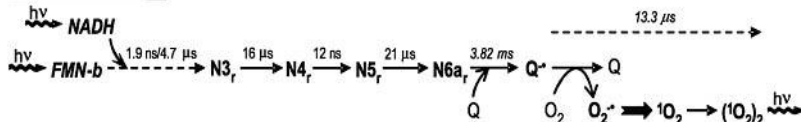
d) 1.1 ms (roșu)



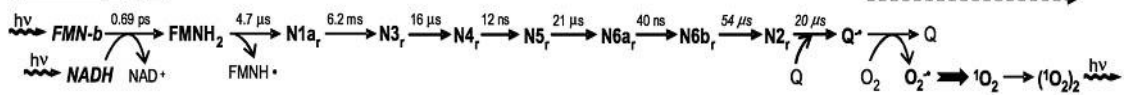
e) 2 ms (roșu)



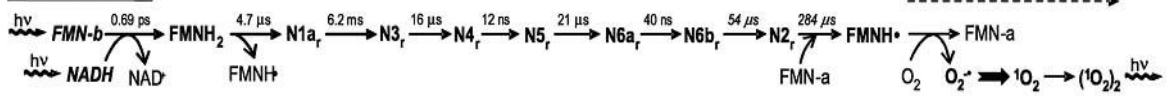
f) 3.87 ms (roșu)



g) 6.3 ms (roșu)



h) 6.6 ms (roșu)



i) 10.1 ms (roșu)

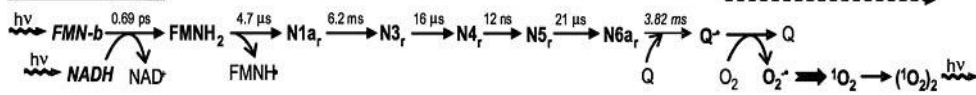


Fig. 18. Modelul minimal al stărilor generatoare de DL produse în timpul transferului de electroni în Complexul I. Clasele de stări S₂ și S₃ sunt discutate separat în panelurile A, B și C, respectiv. Săgețile indică produsul principal rezultat după transferul de electroni în pasul respectiv. Forma redusă a centrilor Fe/S este indicată prin indicele "r". Constantele de timp individuale ale pașilor transferului de electroni sunt luate din [Ransac S. et al., 2010], cu excepția valorilor estimate în studiul de față (cu *italic*). FMNH[•] regenerat care participă la reacțiile subsecvente este indicat printr-un dreptunghi cu linie întreruptă. Săgețile întrerupte la începutul seriei de reacții în B și C indică două modalități posibile de transfer de electroni arătate în Ab și Ac. Săgețile întrerupte la sfârșitul seriei de reacții indică timpul scurs între coliziunea moleculei de O₂ cu radicalul FMNH[•] ori Q[•], și fotoemisia dimol rezultată.

În virtutea similarităților cu alte componente spectrale, emisia întârziată de lumină roșie apare, de asemenea, a fi strâns legată de Complexul I. În consecință, propunem că DL roșie este cel mai probabil produsă pe calea fotoemisie dimol generate de coliziunea a două molecule de oxigen singlet ($^1\text{O}_2$). Luminescența dimol poate fi observată la lungimile de undă caracteristice de 579, 634 și 703 nm [Khan A.U., M. Kasha, 1970, Boodaghians R. et al., 1982], cu emisia principală la 634 nm. Astfel, nivelurile crescute de superoxid produse de către semiflavona de la situsul FMN-b (Fig. 18Ac-d, Fig. 18Bb, Fig. 18Ce) ori FMN (Fig. 18Bd,h), ori de către ubisemiquinona de la situsul Q (Fig. 18Bc, Fig. 18Cd,f,g,i) ar putea duce, în special în prezența superoxid dismutazei, la generarea unor niveluri semnificative de oxigen singlet [Khan A.U., 1978] și fotoemisie dimol. Trebuie să menționăm că rezultatele noastre diferă de cele ale lui Mik et al. [Mik E.G. et al., 2006, 2008] care au găsit că rotenonul și alți inhibitori ai respirației mitocondriale descresc luminescența întârziată (roșie) a protoporfirinei endogene IX (PpIX), care este sintetizată în interiorul mitocondrii. Inhibiția de către rotenon a DL roșie a PpIX a apărut a fi un proces mediat de niveluri crescute de O_2 mitocondrial [Mik E.G. et al., 2006]. Totuși, design-ul experimental utilizat de către aceștia s-a bazat pe aplicarea unui precursor al PpIX (5-aminolevulinic acid hidroclorid, ALA) pentru a augmenta concentrația PpIX. În absența ALA, DL roșie a celulelor HeLa a fost virtual nedetectabilă (Fig. 4a în [Mik E.G. et al., 2006]. În condițiile noastre (excitare la 337 nm, vs. 405 nm în [Mik E.G. et al., 2006] ori 510 nm în [Mik E.G. et al., 2008], noi am observat o creștere a DL roșie indusă de rotenon, care ar putea sugera că, cel puțin în celulele Jurkat, oxigenul singlet este probabil generatorul dominant de DL roșie observată după excitarea la 337 nm. Pe această bază, datele noastre curente de DL sugerează că timpul mediu scurs de la generarea unei semiflavone la FMN-b până la coliziunea $^1\text{O}_2$ rezultat cu un al doilea oxigen singlet situat în vecinătatea strânsă a acestuia este de 13.3 μs (Fig. 18Ac).

Pentru simplitate, presupunem, de asemenea, că celelalte două situsuri de generare a superoxidului în Complexul I, și anume FMN-a și Q, prezintă aceeași cinetică de fotoemisie dimol, cu un timp total de transfer de electroni de la semiflavonă/semiquinonă la oxigenul molecular, producția de dimol și declinul radiativ, de 13.3 μs . Mai mult, datele noastre DL sunt cel mai bine explicate dacă presupunem că centrul N2 este redus de către NADH în 90 μs , în acord cu raportări anterioare [Verkhovskaya M.L. et al., 2008], ceea ce furnizează un timp caracteristic necesar transferului de electroni de la centrul N6b la N2 de 54 μs (Fig. 18Ba). Trebuie menționat că cele două valori derivate mai sus explică foarte bine componenta cinetică dominantă pentru emisia din stările S_2 atât de lumină albastră cât și verde/galbenă (140 μs derivat din curbele de emisie DL), ca și pentru cea roșie (148 μs) produse pe calea reducerii cu NADH a N2, urmată de transferul de electroni inversat la FMN-b și NADH (Fig. 18Ba,b). Totuși, conform propunerii noastre, componenta proeminentă S_2 (129 μs) a DL roșie este produsă pe calea reducerii ubiquinonei de către primul electron al NADH primit de la centrul N2 (timp estimat, 20 μs), a generării de superoxid și apoi a dimolului oxigen singlet pe calea obișnuită (Fig. 18Bc). În prezența ROT, ubisemiquinona devine instabilă, se disociază de situsul Q_{Nf} și reduce O_2 la superoxid [Ohnishi S.T. et al., 2005]. În absența ROT, ubisemiquinona rămâne atașată de situsul Q_{Nf} (pentru care are o mare afinitate) și este mai departe redusă la ubiquinol ($\text{Q}_{\text{Nf}}\text{H}_2$) de un al doilea electron provenit de la N2. $\text{Q}_{\text{Nf}}\text{H}_2$, care nu poate reacționa cu oxigenul molecular din cauză că reacția este interzisă de spin [Albracht S.P.J. et al., 2011], participă la transferul de electroni în

domeniul membranei la translocarea de protoni. În consecință, ROT va crește emisia de lumină roșie de la radicalul semiquinonă produs la situsul Q pe calea reducerii de către NADH. Componenta mai lentă a DL roșie (390 μ s) ar putea fi produsă în manieră similară, pe calea reducerii flavinei FMN-a de către NADH prin centrul N2, și interacțiunea subsecventă cu O₂ (Fig. 18Bd). Am estimat că în prezența rotenonului, timpul mediu de transfer al electronului de la centrul N2 redus la FMN-a este 284 μ s *in situ*, ceea ce sugerează că probabilitatea ca N2 să reducă ubiquinona este de 14 mai mare decât aceea de a reduce FMN-a. Pe scala de timp de milisecunde, emisia întârziată de lumină roșie ar putea implica transfer de electroni între centrii N1b și N5, ori de la centrul N1a la N3, și producția subsecventă de superoxid la situsurile FMN-b, FMN-a ori Q (Fig. 18Cd-e,g-i). În plus, propunem că componenta distinctă DL roșie cu timp de declin de 3.87 ms este asociată cu reducerea ubiquinonei de către centrul N6a. Cu toate acestea, timpul îndelungat necesar pentru această reacție de transfer de sarcină este compatibilă cu o probabilitate redusă a unui proces în care coada lungă, flexibilă a ubiquinonei se poate aranja în interiorul presupusului tunel hidrofob format între subunitățile de 49-kDa și PSST ale Complexului I [Albracht S.P.J. et al., 2011] (Fig. 17). Deși structura cristalină a Complexului I izolat din două sisteme procariotice (*E. coli*, *T. thermophilus*) nu prezintă o evidență clară pentru acest scenariu [Berrisford J.M., L.A. Sazanov, 2009], este posibil ca aceasta să nu reflecte cu acuratețe constituția Complexului I de la mamifere [Blinova K. et al., 2008], care ar putea prezenta particularități distincte, în special în mediul său mitocondrial nativ. Corespunzător, datele noastre sugerează că ambele situații sunt posibile, totuși pătrunderea ubiquinonei în tunelul hidrofob până la clusterul N6a apare a fi un eveniment mai degrabă rar, care ar putea fi facilitat prin legarea ROT la situsul 1. Este, deci, posibil ca în experimentele noastre să fi fost detectate răspunsuri mixte care își au originea în asemenea supercomplexe asamblate din Complexele I și III oligomerice, având în vedere efectele particulare ale rotenonului și/sau antimicinei A asupra autofluorescenței flavinei. Cunoașterea distribuției specifice a Complexului I monomeric/dimeric ar putea fi semnificativă pentru înțelegerea proprietăților moleculare și funcționale ale complexelor și supercomplexelor respiratorii în condiții fiziologice și patologice.

3.5. Evaluarea apoptozei și a supraviețuirii celulare clonogene ca funcție de doza de EGCG

Am evaluat, în continuare, citotoxicitatea EGCG, aplicată singură sau în combinație cu menadiona și am investigat mecanismele care stau la baza inducerii apoptozei. Pentru măsurătorile de supraviețuire clonogenică am procedat după cum descriem în cele ce urmează.

După tratamente, așa cum s-a descris anterior, celulele au fost spălate cu PBS cald și cultivate în 96 godeuri la o densitate de 4 sau 6 celule/godeu în 100 μ l de mediu complet per godeu. După 3-4 săptămâni de la incubare, godeurile au fost inspectate prin microscopie și godeurile care au conținut cel puțin o colonie cu >50 celule au fost considerate pozitive și numărate. Eficiența de cultivare a fost calculată ca fiind raportul dintre densitatea Poisson teoretică a numărului de godeuri negative observate și densitatea inițială de cultivare, adică $\ln[96/(\text{nr. de godeuri negative})]/(\text{densitate celulară}) \times 100$. Supraviețuirea celulară a fost determinată ca raportul dintre eficiența de cultivare a celulelor tratate și, respectiv, netratate. Pentru evaluarea apoptozei/necrozei, celulele au fost spălate de două ori cu PBS și dublu

marcate cu Anexină V (BD Pharmingen) conjugată cu FITC (izotiocianat de fluoresceină) și PI (iodură de propidiu BD Pharmingen) conform cu instrucțiunile producătorului. Probele au fost analizate imediat cu un citometru în flux Beckman Coulter Gallios. Lungimea de undă de excitare a fost de 488 nm. Vârful de emisie a fost înregistrat pentru Anexină V-FITC în FL1 (525 nm, lărgime de bandă 40 nm) și pentru PI în FL3 (620 nm, lărgime de bandă 30 nm). Analiza datelor s-a realizat utilizând programul WinMDI 2.9. Celulele negative, atât pentru Anexină V-FITC, cât și pentru PI au fost considerate ca fiind apoptotice, cele pozitive pentru Anexină V-FITC și negative pentru PI au fost considerate celule apoptotice timpurii, iar cele pozitive pentru ambii markeri au fost considerate celule apoptotice târzii sau celule necrotice. Fitarea datelor experimentale s-a realizat utilizând programul Origin, versiunea 7.5. Efectele monofazice inhibitoare sau stimulative ale diferiților agenți asupra unei cantități măsurate (y) au fost fitate cu funcțiile:

$$y = y_0 + (y_{\max} - y_0) [1 - x^h / (IC_{50}^h + x^h)] \quad (1)$$

și

$$y = y_0 + (y_{\max} - y_0) x^h / (EC_{50}^h + x^h) \quad (2)$$

respectiv, unde x și h reprezintă concentrația și coeficientul Hill, respectiv, y_0 și y_{\max} sunt valorile minime și, respectiv, maxime ale y , iar IC_{50} și EC_{50} sunt jumătate din concentrațiile maxime inhibitoare și respectiv efective ale agentului corespunzător.

Efectele antiproliferative ale EGCG, MD și ale combinațiilor acestora. Tratamente acute cu EGCG aplicate timp de 1 h au indus o scădere dependentă de doză a supraviețuirii clonogenice a celulelor Jurkat (Fig. 19 A). Concentrația de EGCG necesară pentru a reduce clonogenicitatea la 50% a fost de 117 μM (Tabel 2), și coeficientul Hill asociat (3.17) au indicat un grad înalt de cooperativitate între mecanismele specifice EGCG care stau la baza morții celulare. Combinația EGCG:MD a demonstrat un caracter sinergic semnificativ. Astfel, efectul citotoxic dependent de doză al menadionei aplicate singură timp de 20 min. a fost caracterizat printr-un IC_{50} de 66.8 μM și un coeficient Hill 1.37 (Fig. 19 B, Tabelul 3), sugerând o interacțiune cooperativă între procesele specifice MD care mediază efectul supresiv al creșterii celulare observat.

Tabel 2. Parametrii specifici efectului EGCG (IC_{50} or EC_{50} , doza mediană a efectului; h , coeficientul Hill) asociați supraviețuirii clonogenice după expunerea acută a celulelor Jurkat la EGCG.

Parametru	Supraviețuire clonogenică
IC_{50}/EC_{50} (μM)	117
h	3.17

Preincubarea cu 50 μM ori 100 μM EGCG timp de 1 h a redus doza mediană a efectului menadionei la 32.7 μM și, respectiv, la 9.48 μM , fără a afecta semnificativ coeficientul Hill (Tabel 3).

Tabel 3. Parametrii specifici citotoxicității menadionei derivați din supraviețuirea clonogenică în urma expunerii acute la menadionă în absența sau prezența EGCG la concentrațiile indicate.

Parametru	[EGCG], μM		
	0	50	100
IC_{50} (μM)	66.8	32.7	9.48
h	1.37	1.33	1.59

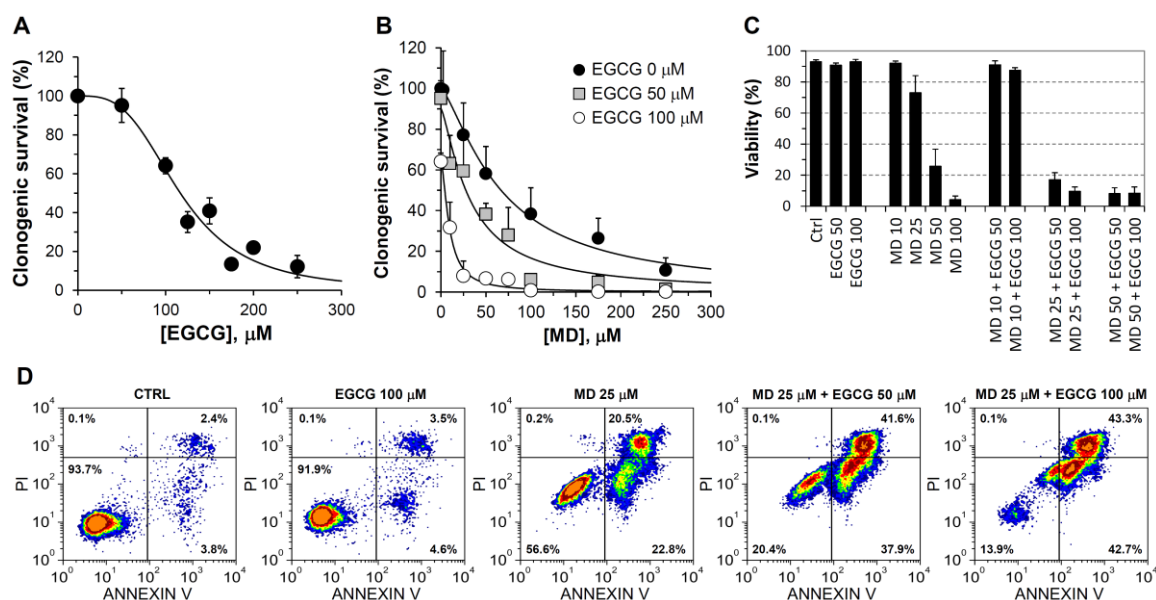


Fig. 19. Citotoxicitatea EGCG și MD după tratamente acute este asociată cu o scădere dependentă de doză a supraviețuirii clonogenice și inducerea apoptozei în celulele Jurkat. Celulele au fost expuse la EGCG timp de 1 h (A), ori la MD timp de 20 min., urmând o preincubare cu timp de 1 h cu EGCG la concentrațiile indicate (B). Curbele au fost generate prin fitare cu ecuația 1. (C) Viabilitatea celulară în urma expunerii timp de 1 h la EGCG și/ori MD la concentrațiile indicate (în μM). Determinările de citometrie în flux au fost realizate utilizând evaluarea cu Anexin V/PI la 24 h de la înlăturarea agentului. Viabilitatea este exprimată ca fracțiune din celulele Anexin V- și PI-celule negative. (D) Ploturi bivariate reprezentative arătând inducerea apoptozei în celulele Jurkat expuse la EGCG, MD ori combinații ale acestora la dozele indicate. Franciunile celulare din fiecare cadran sunt indicate ca % din evenimentele considerate.

La concentrații mai scăzute ($5 \mu\text{M}$), EGCG nu a interferat în vreun mod măsurabil cu efectul citotoxic al menadionei. Indicii de combinație ai celor două combinații EGCG:MD care determină o supraviețuire clonogenică de 10% au fost

relativ asemănători (0.69 și 0.51 pentru 50 μM și 100 μM EGCG, respectiv) și au indicat o interacțiune sinergică între cei doi agenți. Pentru o supraviețuire clonogenică de 1% indicii de combinare au fost încă și mai scăzuți (0.61 și 0.27, respectiv).

Evaluarea apoptozei cu Anexină V/PI a evidențiat faptul că MD la concentrații până la 100 μM , aplicată fie singură fie în combinație cu 50 μM ori 100 μM EGCG timp de 1 h, a descrescut semnificativ viabilitatea celulară la 24 h de la expunere, într-o manieră dependentă de doză (Fig. 19C, D). În contrast, EGCG (50 μM ori 100 μM) aplicată timp de 1 h nu a avut efecte majore asupra viabilității celulare, în timp ce combinația EGCG:MD a prezentat trăsături sinergice remarcabile privind citotoxicitatea, asociate cu o apoptoză considerabilă (Fig. 19C, D). Experimentele realizate cu tratamente cu EGCG și/sau MD la parametri fiziologic relevanți au arătat că nivelurile compatibile cu scheme de administrare clinic fezabile pot exercita efecte antiproliferative puternice asupra celulelor Jurkat. Astfel, expuneri timp de 24 h ori 48 h la 10 μM EGCG combinat cu 10 μM MD au produs rate de moarte celulară eficiente, care pot fi observate imediat după tratament (Fig. 20A-C).

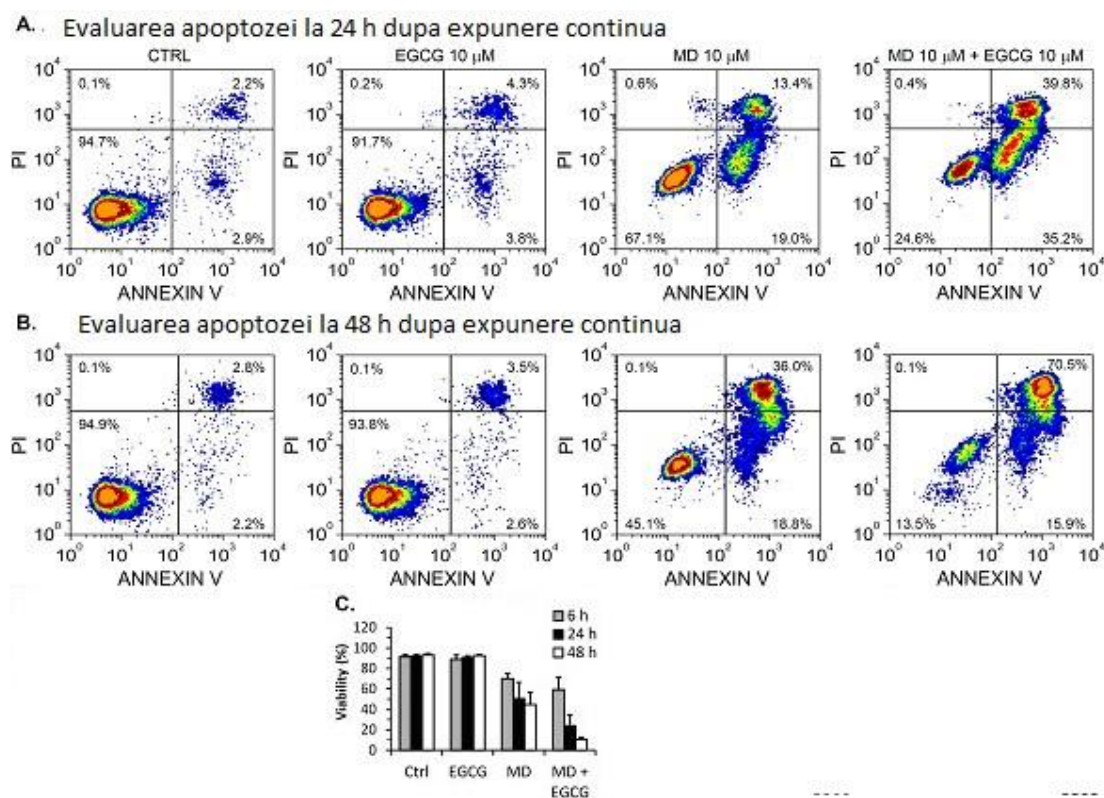


Fig. 20. Inducerea apoptozei în celulele Jurkat în expuse la 10 μM MD și/sau 10 μM EGCG. Ploturi bivariante specifice pentru Anexină V/PI obținute prin citometrie în flux la 24 h (A) ori 48 h (B) expunere continuă. Frațiile celulare în fiecare cadran sunt indicate ca % din evenimentele operate. (C) Viabilitatea celulară detremantă ca fracțiune din celulele negative la Anexină V și PI la 24 h după o expunere de 6h cu mediul schimbat la fiecare 2 h, ori imediat după expunerea continuă timp de 24 h ori 48 h, așa cum se indică.

În particular, această combinație a fost foarte eficientă în omorârea celulelor producând o fracție celulară viabilă de numai $10.8 \pm 1.8\%$ după 48 h de la expunere, în timp ce EGCG singură (10 μM) nu a avut un impact măsurabil asupra viabilității celulare, iar MD singură (10 μM) a descrescut viabilitatea la $44.6 \pm 12.4\%$, sugerând

o acțiune sinergică între cei doi agenți. Evaluarea cu V/PI utilizată pentru a obține aceste valori, a indicat, de asemenea, că MD, și mai accentuat, combinația EGCG:MD au declanșat o apoptoză extensivă la 24 h și 48 h de la expunere (Fig. 20A,B).

În concluzie, aceste cercetări furnizează noi informații privind efectele citotoxice ale EGCG asupra celulelor de leucemie umană Jurkat T cells. Mai întâi, tratamentele de scurtă durată (1 h) au indicat o scădere dependentă de doză a viabilității celulare, caracterizată printr-o interacțiune înalt cooperativă, implicând probabil trei molecule de EGCG. Abilitatea EGCG de a induce moartea celulară a fost accentuată sinergic de către menadionă. În baza evaluării supraviețuirii clonogenice, s-au obținut valori relevante ale indicilor de combinare (0.3 - 0.6). Mai mult, determinări prin citometrie în flux asupra celulelor dublu marcate cu Anexină V și PI au sugerat faptul că efectele citotoxice ale EGCG aplicată singură sau în combinație cu MD suntacompaniate de inducerea apoptozei.

4. Discuții

În baza rezultatelor noastre principale, obținute pe parcursul cercetărilor efectuate în cadrul proiectului de față folosind metoda luminescenței întârziate am găsit următoarele: 1) DL este strâns legată de nivelul de FMN oxidat, care se găsește mai ales în mitocondrii [Gaspers L.D., A.P. Thomas, 2008, Heikal A.A., 2010], 2) DL este, de asemenea, legat de nivelul de NADH, substratul Complexului I mitocondrial, 3) ROT, un inhibitor specific al Complexului I, a afectat considerabil DL, și 4) MD și QC, care interacționează robust cu Complexul I, au afectat de asemenea semnificativ DL. Astfel, toate rezultatele noastre întăresc ideea conform căreia Complexul I mitocondrial joacă un rol major în fotoemisia întârziată ultra-slabă indusă de fotoni în celulele Jurkat. Pe baza datelor noastre obținute în perioada derulării acestui proiect, putem face o serie de observații legate de corelația dintre metabolismul mitocondrial și luminescența întârziată.

Poate că cele mai relevante fiziologic rezultate ale investigațiilor noastre derivă din descoperirea că produsul DL depinde într-o manieră de tip Hill de nivelul de NADH ca și de cel al FMN_{ox}, cu coeficient Hill aparent de 4.3. În plus, analiza spectrală DL indică diferite grade de cooperativitate a ambelor NADH și FMN_{ox}, reflectate în coeficienții Hill diferiți asociați cu emisia de lumină albastră, verde/galbenă și roșie, și anume 3.9, 7.2 și 2.8, respectiv. În plus, măsurătorile fluorimetrice ale nivelurilor de NADH și FMN_{ox} au indicat că legarea rotenonului prezintă un coeficient Hill aparent de 2.0-2.4, sugerând faptul că Complexul I funcționează mai ales ca un dimer în celulele Jurkat intacte. Bazat pe aceste rezultate, propunem că DL albastră și roșie este produsă predominant de către Complexul I dimeric, în timp ce DL verde/galbenă provine mai ales de la Complexul I tetrameric. La prima vedere, aceste rezultate ar putea sugera o acțiune cooperativă a situsurilor NADH și NADPH a unui Complex I monomer, ca și cooperativitatea dintre ambele flavine oxidate (FMN-a și FMN-b [Albracht S.P.J. et al., 2011], pentru a genera stările specifice ale DL, coroborat cu interacțiunea cooperativă dintre toți monomerii cuplați cu forma oligomerică a Complexului I. O asemenea cooperativitate între situsuri situate la cele două extremități ale sectorului hidrofilic al Complexului I ar trebui să implice o interacțiune de distanță lungă (care a fost documentată în [Hano N. et al., 2003, Sazanov L. A., 2007, Berrisford J.M., L.A. Sazanov, 2009]) și ar putea reflecta că, în particular, în conformația Complexului I indusă de modulatori specifici ca rotenonul, menadiona și quercetina, afinitatea NADPH pentru situsul său ar crește în Complexul I legat de NADH. Totuși, având în vedere faptul că concentrația NADPH

în matrice este în general mult mai scăzută decât cea a NADH [Mayevsky A., G.G. Rogatsky, 2007], o interpretare mai plauzibilă ar putea fi dedusă din ideea unei interacțiuni strânse între Complexul I și Nnt (nicotinamid nucleotid transhidrogenaza), o enzimă mitocondrială care catalizează reacția $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+$. Se sugerează [Albracht S.P.J. et al., 2011] că Nnt (un homodimer) poate forma un heteromer cu Complexul I și astfel poate regla raportul $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ în vecinătatea situsului NADPH al Complexului I (Fig. 17). Prin acest mecanism, de exemplu, Nnt cooperează cu Complexul I în atenuarea generării peroxidului de hidrogen de către Complexul I [Albracht S.P.J. et al., 2011]. Se poate concepe astfel că, *in situ*, legarea NADH la situsul său în Complexul I conduce cumva la stabilizarea heteromerului Complex I - Nnt crescând astfel rata aparentă (și afinitatea) legării NADPH de situsul său distal în Complexul I. Astfel, propunem ca, pentru ca Complexul I, care a legat ROT-, MD- ori QC, să genereze DL, o moleculă de NADH trebuie să fie legată la situsul său în Complexul I, o moleculă de NADH trebuie să se asocieze cu monomerul Nnt care este ancorat pe comerul Complexului I, și Complexul I și Nnt trebuie să formeze un heteromer strâns legat. În final, în aceeași conformație particulară a Complexului I, legarea NADH și similar, a NADPH, la situsurile lor corespunzătoare măresc rata oxidării FMN-b și FMN-a, respectiv. De aceea, un coeficient Hill aparent de 2 obținut pentru NADH per monomer al Complexului I va fi strâns legat de un coeficient Hill aparent de 2 caracteristic pentru FMN oxidat. În heterotetramerul Nnt-Complex I, situsurile de legare ale NADH situate pe cei doi monomeri ai Complexului I, ca și cele două situsuri ale NADH de pe cei doi monomeri Nnt, trebuie să interacționeze cooperativ. Astfel, rezultatele noastre sunt consistente cu faptul că în celulele Jurkat principala organizare structurală a Complexului I mitocondrial este cel mai probabil un supercomplex de organizare compus dintr-un dimer al Complexului I și un dimer al Nnt. În favoarea acestei idei, s-a găsit că concentrațiile Complexului I și Nnt în particulele submitocondriale ale inimii de bovine sunt foarte asemănătoare [Albracht S.P.J. et al., 2011].

În acest punct, trebuie reamintit faptul că au fost identificate multiple locuri de legare ale NAD(H) și NADP(H) în secvența Complexului I, și, consistent cu aceasta, s-a găsit că cinci subunități izolate din Complexul I leagă NADH și/sau NADPH [Yamaguchi M. et al., 2000]. Studii de cinetică staționară a activității transhidrogenazei Complexului I au indicat, de asemenea, că un singur loc de legare pentru dinucleotid este incompatibil cu datele din literatură [Zakharova N.V. et al., 1999]. Mai mult, a fost raportată de către grupuri diferite legarea cooperativă a NADH în Complexul I, cu un coeficient Hill asociat de 2.3 [Suzuki H., T.E. King, 1983] ori 2.6 [Dooijewaard G., E.C. Slater, 1976]. În plus, în preparatele de Complex I în care coeficientul Hill pentru legarea NADH a fost 2.3, coeficientul Hill corespunzător pentru legarea rotenonului s-a găsit a fi 1.1 [Suzuki H., T.E. King, 1983]. Se remarcă că raportul nr. de molecule NADH/ nr. de molecule ROT legate la Complexul I derivat în studiul nostru (≈ 2) este în bun acord cu aceste cifre, dar, bazat pe numărul de molecule de NADH și FMN implicate (două din fiecare per moleculă de rotenon legată), sugerează că al doilea situs activ dinucleotid trebuie să interacționeze cu a doua flavină (FMN-a). Totuși, pe moment singurul loc de legare bine definit pe Complexul I rămâne cel situat în subunitatea Complexului I de 51 kDa care conține FMN-b [Yamaguchi M. et al., 2000, Sazanov L.A., 2007, Berrisford J.M., L.A. Sazanov, 2009]. De aceea, în absența unei cunoașteri a situsului funcțional al NADH care ar fi capabil să interacționeze cu FMN-a, credem că ipoteza unei cuplări heteromerice Nnt-Complex I poate explica în mod rezonabil datele noastre DL. Mai mult, abilitatea presupusă a Complexului I de a forma oligomeri în membrana internă

nativă a mitocondriilor celulelor intacte este în linie cu evidențele recente privind existența unor supercomplexe respirasome funcționale mari în diferite combinații de monomeri, dimeri sau trimeri de complexe respiratorii individuale, cu diferite stoichiometrii [Stroh A. et al., 2004, Marques I. et al., 2007]. Astfel, se poate concepe că, *in situ*, Complexul I poate forma dimeri, cum se sugerează de asemenea de către un număr de studii anterioare [Brink J. et al., 1988, R. van Belzen R., et al., 1990, Stroh A. et al., 2004, Krause F. et al., 2004, Marques I. et al., 2007], sau chiar tetrameri [Boekema E.J. et al., 1982]. Pe moment, s-a detectat Complexul I dimeric în mitocondrii fungale, și s-a propus că asemenea dimeri se pot produce în organisme care posedă enzime respiratorii alternative [Krause F. et al., 2004, Marques I. et al., 2007]. Astfel este posibil ca prin blocajul cu ROT să fie activate oxidaze alternative în celulele Jurkat, crescând deci probabilitatea agregării Complexului I. În favoarea ipotezei noastre privind formarea dimerilor Complexului I sau a oligomerilor de ordin mai înalt, am găsit, într-un set de experimente diferite, că quercetina induce în celulele Jurkat, mult timp după ce aceasta a fost înlăturată, o stare de hiperpolarizare mitocondrială persistentă, care este inhibată de rotenon într-o manieră bifazică, cu coeficienții Hill corespunzători de 1.2-1.4 și 2.8-3.6, respectiv. Mai mult, aceste măsurători au implicat detecția fluorimetrică a emisiei fluorescente a unui indicator fluorescent bine stabilit, JC-1, și nu pe cea a NADH ori FMN. Deci, aceste din urmă rezultate aduc un sprijin suplimentar ideii de interacțiune cooperativă între 2 până la 3-4 locuri de legare ale rotenonului, respectiv. În plus, un test independent non-fluorimetric realizat pe baza determinărilor de supraviețuire clonogenă (raport 2013 Fig. 2A) a indicat, de asemenea, o cooperativitate între cel puțin două locuri de legare ale ROT. Aceasta exclude ideea conform căreia rezultatele prezente ar putea reflecta niște potențiale artefacte fluorescente și nu dependența nivelurilor de NADH și FMN de doza de ROT. În concluzie, linia de celule Jurkat pare a fi un candidat promițător pentru studii ulterioare privind posibila formare de oligomeri ai Complexului I în celulele de mamifere. Astfel, pe baza rezultatelor noastre putem sugera că în celulele Jurkat se formează oligomeri ai Complexului I, cel puțin în prezența ROT, QC ori MD, și pot exista fie în formă dimerică sau tetramerică cu un raport al abundenței de 3:2. Complexul I se crede că este aproximativ 50-90% asociat cu Complexul III dimeric în supercomplexe care ar putea conține, de asemenea, 1-4 subunități ale Complexului IV [Krause F. et al. 2004]. Interacția dintre Complexul I și Complexul III în respirasomi s-a găsit a fi esențială pentru activitatea și stabilitatea Complexului I [Eichler M. et al., 2005]. Important, a fost neambiguu confirmată existența unor supercomplexe încă și mai mari conținând monomeri multipli ai Complexelor I, III și IV [Krause F. et al., 2004].

Măsurătorile fluorimetrice realizate de către noi [Baran et al., 2013, 2014, raport 2013] au demonstrat, de asemenea, contrar așteptărilor [Gaspers L.D., A.P. Thomas, 2008], o corelație lineară puternică între nivelul mitocondrial de NADH și cel al FMN oxidat în celulele Jurkat tratate cu agenți care țintesc Complexul I cum sunt ROT, MD și QC. Această trăsătură neobișnuită a mai fost anterior observată la țesutul muscular [Kuznetsov A.V. et al., 1998] și la monocitele umane [Kindzelskii A., H.R. Petty, 2004], la care s-a raportat că rotenonul crește emisia flavoproteinelor. Corelația stabilită aici ar putea sugera că în celulele Jurkat Complexul I care a legat ROT-, MD- sau QC-acelerează transferul de electroni de la FMN redus, fie spre centrul Fe/S învecinați fie înapoi, la molecula NAD^+ , dacă aceasta din urmă nu s-a disociat încă de FMN. În oricare caz, presupunând că nivelul total de flavine mitocondriale nu se modifică semnificativ în timpul tratamentului, creșterea fluorescenței observate a FMN_{ox} la niveluri crescătoare de NADH reflectă în mod

definit o creștere globală a populației stării oxidate a FMN (și a timpului de rezidență relativ) și o scădere corespunzătoare a populației stărilor complet sau semi-reduce ale FMN (și a timpului de rezidență relativ). Având în vedere că o creștere a NADH nu induce prin sine însăși o creștere a nivelului FMN_{ox}, așa cum s-a demonstrat prin experimente folosind inhibitorul Complexului III, Antimycin A, deducem că ROT, MD și QC cel mai probabil induc o modificare conformațională a Complexului I, în care densitatea populației FMN_{ox} este legată direct de nivelul NADH în matrice, deci de timpul aparent de rezidență a NADH/NAD⁺ pe locul său de legare în Complexul I [deoarece legarea NADH la enzimă are ca rezultat o modificare conformațională de distanță lungă la interfața membranei (buzunarul de legare al quinonei) [Hano N. et al., 2003, Sazanov L.A., 2007, Berrisford J.M., L.A. Sazanov, 2009]], se poate concepe că este, de asemenea, posibilă situația inversă. O explicație posibilă ar fi aceea că legarea rotenonului sau a menadionei/quercetinei la Complexul I *in situ* inhibă sau stimulează, respectiv, disocierea NAD⁺ de Complexul I ca urmare a reducerii FMN de către NADH, și că NAD⁺ asociat favorizează starea oxidată a FMN în această conformație particulară. Totuși, deoarece rotenonul nu afectează nici cinetica de reducere a clusterilor Fe/S [Albracht S.P.J. et al., 2011], pare mai probabil că radicalul FMNH[•] al semiflavinei care este produs rapid după reducerea centrului N3a de către FMNH₂, este dislocat în cavitatea de legare a FMN și produce o modificare conformațională a proteinei care ar permite accesul la oxigenul molecular (chiar în prezența NAD⁺ în fanta de legare a substratului), ducând la o producere subsecventă de superoxid. FMN_{ox} regenerat poate apoi să se lege din nou cu mare afinitate la situsul său. Mai mult, niveluri înalte de NADH par să stimuleze disocierea FMNH[•] de situsul FMN [Vinogradov A.D., 2008], fapt care aduce încă un sprijin interpretării noastre. Astfel, datele noastre sugerează că ROT mărește în timp ce menadiona și quercetina reduc probabilitatea reducerii O₂ de către FMNH[•] pe calea modulării nivelului de NADH dar și prin facilitarea conformațională a efectului NADH asupra FMNH[•]. În plus, deoarece atât quercetina cât și menadiona descresc [NADH]_m și [FMN_{ox}] și au, de asemenea, efecte foarte similare asupra DL [Baran I. et al., 2010, studiile în cadrul proiectului de față] este de așteptat ca ambii agenți să împartă un loc de legare comun și să opereze prin mecanisme similare la nivelul Complexului I în celulele Jurkat. Raportări privind faptul că quercetina poate să acționeze ca o moleculă Q-mimetică [Sandoval-Acuña C. et al., 2012] sau să scadă producerea de ROS de către Complexul I [Lagoa R. et al., 2011] substanțiază mai mult propunerea curentă privind faptul că menadiona și quercetina scad afinitatea NAD⁺ pentru forma redusă a Complexului I (K_d aparent $\approx 10 \mu\text{M}$ în condiții normale [Vinogradov A.D., 2008] prin stimularea disocierii NAD⁺ de Complexul I redus. La rândul său, locul liber în situsul NADH împiedică detașarea FMNH[•], și în acest fel inabilitatea radicalului flavin de a accesa dioxigenul duce la o producere scăzută de superoxid. Observația că rotenonul exercită efecte opuse în producerea H₂O₂ de către mitocondrie, deși situsul său este situat în aceeași cavitate hidrofobă la interfața matrice/membrană [Lagoa R. et al., 2011], este, de asemenea, în acord cu rezultatele noastre. Quercetina și menadiona inhibă probabil accesibilitatea ubiquinonei la ambii centri Fe/S, N2 și N6a, ca reducerea N2 de către FMN-a, explicând deci scăderea considerabilă a DL observată în special pe scalele de timp ale S₂ și S₃ (Baran I. et al., 2010). Interesant, în preparatele mitocondriale din creier și inimă de șobolan ale lui Lagoa și colaboratorii, quercetina a exercitat efectele sale inhibitoare asupra Complexului I fără a afecta rata respirației (consumul de oxigen), sugerând că quercetina este capabilă să primească ambii electroni de la N2 și să-i redirecționeze către Q_{Ns} fără destabilizarea radicalului intermediar, acționând prin aceasta ca un

substituit pentru ubiquinonă [Lagoa R. et al., 2011]. Totuși, deoarece menadiona produce superoxid în Complexul I prin formarea unei semiquinone [Xu X., E.A. Arriaga, 2009, Floreani M., F. Carpenedo, 1992], probabil după acceptarea unui electron de la centrul N2, deducem că mecanismul principal responsabil pentru efectele observate ale menadionei și quercetinei asupra DL sunt cauzate de inhibiția: 1) timpului de viață al semiflavinei (indirect, pe calea unui efect mediat de NADH/NAD⁺), 2) reducerea ubiquinonei la centrul N6a, și 3) reducerea N2 de către FMN-a, în timp ce rotenonul amplifică DL stimulând toate aceste procese dar și transferul înapoi de electroni de la centrul N2 la FMN-b (datorită unei număr crescute de electroni care rezidă în interiorul Complexului I). În plus, având în vedere că etapa determinantă a vitezei de reacție (rate-limiting step) care definește activitatea enzimatică a Complexului I este disocierea NAD⁺ de situsul său, care are un timp de viață tipic de ~1 ms în condiții normale [Verkhovskaya M.L. et al., 2008, Ransac S. et al., 2010], rezultatele noastre sprijină ideea că ROT inhibă, în timp ce MD și QC stimulează activitatea Complexului I prin inhibarea sau stimularea disocierii NAD⁺.

Datele noastre curente de DL indică o constantă aparentă de disociere a NADH ori FMN_{ox} de Complexul I asociat cu ROT-, MD- ori QC în celulele Jurkat care este de 2.92 ori de 2.65 ori mai mare, respectiv, decât concentrația de repaus a NADH sau FMN_{ox} total (liber + legat) (notat aici ca [NADH]₀ și [FMN_{ox}]₀, respectiv). Pe de altă parte, din datele spectrofluorimetrice am putut estima că NADH își exercită efectul local asupra FMN vecin la nivelul Complexului I monomeric cu un K_d aparent = $8.25 \times [NADH]_0$ (derivat din fitarea datelor din Fig. 3 din [Baran I. et al., 2013] cu un model al unui singur loc de legare a NADH cu un coeficient Hill estimat de 1.2). Afinitatea NADH pentru Complexul I monomeric variază în general de la 20-50 μM în forma redusă a enzimei la 100 μM în cea oxidată [produce o estimare a conținutului de NADH în compartimentul mitocondrial al celulelor Jurkat de ca. $60 \mu\text{M} / 8.25 = 7.3 \mu\text{M}$. Observăm că această cifră este consistentă cu estimările în cazul diferitelor linii de celule canceroase: ~7 μM și ~6 μM (derivate din datele prezentate în Fig. 6 și Tabelul 4 în [Villette S. et al., 2006] în două linii celulare de celule epiteliale esofagiene umane maligne, OE33 și OE21, respectiv. Mai mult, K_d aparent al legării NADH de Complexul I oligomeric în celulele Jurkat apare a fi semnificativ mai scăzut ($2.92 \times 7.3 \mu\text{M} \approx 21 \mu\text{M}$) decât în enzima monomerică (60 μM), substanțiind noțiunea de interacțiune cooperativă între monomeri. În plus, fitul susmenționat al datelor prezentate în Fig. 3 din [Baran I. et al., 2013] a furnizat de asemenea nivelul maxim relativ al FMN egal cu $11.63 \times [FMN_{ox}]_0$. Conținutul celular FMN total (liber+ legat, oxidat + redus) este considerat a fi ~5-50 μM [Eichler M. et al., 2005] (aceste cifre se bazează pe un amplu set de date din [Pérez-Ruiz T. et al., 2001]) și poate fi derivat presupunând o densitate celulară a proteinei $\rho = 1.05 \times 10^{-12}$ g/fl [Skog S. et al., 1987, Vinnakota K.C., J.B. Bassingthwaite, 2004]. Sensibilitatea Complexului I la rotenon în experimentele noastre ($K_d = 33 \mu\text{M}$) sugerează că concentrația FMN în celulele Jurkat este aproximativ 50 μM , în baza faptului că rotenonul inhibă activitatea Complexului I la concentrații care se apropie de conținutul de FMN în enzimă [Hatefi Y., J.S. Rieske, 1967]. Acest lucru validează, de asemenea, presupunerea noastră că semnalul de fluorescență a FMN pe care l-am înregistrat în suspensiile de celule Jurkat își are originea în principal în FMN asociat Complexului I. Astfel, presupunând că nivelul maxim relativ al FMN este $11.63 \times [FMN_{ox}]_0 = 50 \mu\text{M}$, obținem $[FMN_{ox}]_0 = 4.3 \mu\text{M}$ and $[FMN_{red}]_0 = 45.7 \mu\text{M}$, unde FMN_{red} reprezintă FMN (semi- + complet-) redus. În plus, afinitatea aparentă a FMN pentru Complexul I oligomeric în celulele Jurkat apare a fi într-o aproximație brută

$2.65 \times 4.3 \mu\text{M} = 11.4 \mu\text{M}$. Este larg acceptat că FMN se leagă strâns, non-covalent, de primul situs activ al FMN (FMN-b) al apoenzimei; totuși, nu am putut să găsim în literatură decât un singur raport cantitativ al constantei de disociere corespunzătoare, care a fost determinat a fi 0.4 și 10.0 nM în particulele submitocondriale de inimă de bovine la pH 9.0 și 10.0, respectiv, studiu în care s-a conchis că reducerea FMN slăbește legarea FMN la Complexul I [Gostimskaya I.S. et al., 2007]. Al doilea situs FMN (FMN-a) nu a fost încă caracterizat. Totuși, K_d estimat aici (11.4 μM) este similar cu $K_d = 4 \mu\text{M}$ raportat pentru legarea FMN la oxidoreductaza clostridială NADH [Barnes S., J.G. Spennay, 1980] sau cu $K_d = 5 \mu\text{M}$ raportat pentru legarea FMN la oxidoreductaza NADPH:FMN a *Vibrio harveyi* [Liu M. et al., 1997]. Rezultatul nostru este, de asemenea, asemănător cu cazul unor flavodoxine ori proteine de tip flavodoxine particulare care prezintă o legare a FMN neobișnuit de slabă ($K_d = 1\text{-}2 \mu\text{M}$, comparat cu valorile tipice de $\sim 1\text{-}10 \text{ nM}$ [Ji H.F. et al., 2006, Bui S.H. et al., 2012]). Cu toate acestea, este clar că valorile menționate mai sus indică o afinitate slabă a FMN pentru Complexul I care leagă ROT-, MD- ori QC în celulele Jurkat, ceea ce ar putea sugera că conformația specifică a proteinei care a legat ROT-, MD- ori QC descrește considerabil afinitatea intrinsecă a FMN pentru Complexul I. Această trăsătură ar putea reflecta fie o mutație constitutivă la locul de legare al FMN [Bui S.H. et al., 2012] fie o rețea de legături de H alterată în mediul înconjurător al FMN [Nogués I. et al., 2004] în conformația modificată a enzimei, care ar putea împiedica accesul grupului 5'-fosfat al FMN la subsitusul de legare a fosfatului din locul de legare al FMN [Murray T.A., R.P. Swenson, 2003]. Într-adevăr, s-a afirmat că o cauză majoră a legării slabe a FMN ar fi numărul redus de legături de hidrogen între apoproteină și grupul fosfat al FMN [Ji H.F. et al., 2006]. În oricare caz, datele noastre par a sprijini noțiunea că legarea ROT, MD ori QC la Complexul I nu afectează dramatic afinitatea totală a NADH pentru proteină, în timp ce reduce considerabil afinitatea aparentă a FMN.

5. Concluzie

Am prezentat, în studiile efectuate în cadrul acestui proiect, evidențe privind faptul că fotoemisia întârziată ultra slabă indusă de fotoni în celulele Jurkat intacte își are originea în principal în Complexul I mitocondrial, care apare a funcționa predominant ca dimer (cu o frecvență relativă de ca. 60%) și mai puțin frecvent ca tetramer (cu o frecvență relativă de ca. 40%) în acest tip de celule. Oligomerii Complexului I apar a prezenta o interacțiune cooperativă între monomeri la nivelul situsului 1 al ROT, situsurilor NADH/NADPH și FMN-b/FMN-a. Mai mult, în monomerii individuali, locurile de legare ale ambelor perechi NADH/NADPH și FMN-b/FMN-a, care sunt situate la cele două extremități ale domeniului extramembranar al Complexului I, prezintă o cooperativitate puternică în legarea liganzilor lor specifici. În plus, scalele de timp ale diferiților pași ai transferului de electroni implicând formarea radicalilor flavină și ubisemiquinonă cu producerea subsequentă de superoxid pot fi estimate din emisia întârziată de lumină roșie. Toate aceste rezultate ridică posibilitatea atractivă ca spectroscopia DL să fie utilizată ca o tehnică robustă, sensibilă și fiabilă pentru probarea fluxului de electroni în Complexul I și pentru a obține informații valoroase privind organizarea structurală și funcțională a acestui complex respirator *in situ*. Ar putea fi luate în considerare dezvoltări ulterioare pentru diagnosticul clinic al dezordinilor mitocondriale sau cancerului.

6. Referințe bibliografice

- Albracht, S.P.J., A.J. Meijer, J. Rydström, J. Bioenerg. Biomembr. 43 (2011) 541-564.
- Baran, I., C. Ganea, A.Scordino, F.Musumeci, V.Barresi, S.Tudisco, S.Privitera, R.Grasso, D.F.Condorelli, V.Baran, E.Katona, M-M.Mocanu, M.Gulino, R.Ungureanu, M.Surcel, C.Ursaciuc, Cell Biochemistry and Biophysics 58 (2010) 169-179
- Baran, I., C. Ganea, S. Privitera, A. Scordino, V. Barresi, F. Musumeci, M. M. Mocanu, D. F. Condorelli, I. Ursu, R. Grasso, M. Gulino, A. Garaiman, N. Musso, G. A., P. Cirrone, G. Cuttone., Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2012 (2012) Article ID 498914 (14 pp)
- Baran, I., D. Ionescu, S. Privitera, A. Scordino, M. M. Mocanu, F. Musumeci, R. Grasso, M. Gulino, A. Iftime, I. T. Tofolean, A. Garaiman, A. Goicea, R. Irimia, A. Dimancea, C. Ganea, Journal of Biomedical Optics 18 (2013) 127006
- Baran, I., D. Ionescu, A. Filippi, M. M. Mocanu, A. Iftime, R. Babes, I. T. Tofolean, R. Irimia, A. Goicea, V. Popescu, A. Dimancea, A. Neagu, C. Ganea, (2014) Leukemia Research, 38, 7 pp. 836-849
- Baran I, Ganea C. et al. 2009. *Rom J Phys* 54: 557-569]
- Barbouti, A. et al. 2007. *Free Radic Biol Med* 43: 1377-1387
- Barnes, S., J.G. Spenny, Clin. Chim. Acta 107 (1980) 149-154.
- van Belzen, R., M.C.M. van Gaalen, P.A. Cuypers, S.P.J. Albracht, Biochim. Biophys. Acta 1017 (1990) 152-159.
- Berrisford, J.M., L.A. Sazanov, J. Biol. Chem. 284 (2009) 29773-29783.
- Brink, J., E.J. Boekema, E.F.J. Van Bruggen, Electron Microsc. Rev. 1 (1988) 175-199.
- Boekema, E.J., J.F.L. Van Breenen, WKeegstra, E.F.J. Van Bruggen, S.P.J. Albracht, Biochim. Biophys. Acta 679 (1982) 7-11.
- Boodaghians, R., P.M. Borrell, P. Borrell, K.R. Grant, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2, 78 (1982) 1195- 1209.
- Bui, S.H., K.J. McLean, M.R. Cheesman, J.M. Bradley, S.E. Rigby, C.W. Levy, D. Leys, A.W. Munro, J. Biol. Chem. 287 (2012) 19699-19714.
- Chen, D. et al. 2005. *Biochem Pharmacol* 69: 1421-1432
- Croce, A.C., G. Santamaria, U. De Simone, F. Lucchini, I. Freitas, G. Bottiroli, Photochem. Photobiol. Sci. 10 (2011) 1189-1195
- Desagher, S. and J-C. Martinou, Trends Cell Biol. 10 (2000), 369-377
- Dooijewaard, G., E.C. Slater, Biochim. Biophys. Acta 440 (1976) 1-15.
- Eichler, M., R. Lavi, A. Shainberg, R. Lubart, Lasers Surg. Med. 37 (2005) 314-319.
- Felker, P., S. Izawa, N. E. Good, and A. Haug, Biochimica et Biophysica Acta, 325 (1973) 193–196
- Fiorani, M., Guidarelli, A., Blasa, M., Azzolini, C., Candiracci, M., Piatti, E., Cantoni, O., 2010.. J. Nutr. Biochem. 21, 397-404.
- Floreani, M., Carpenedo, F. 1992. *Gen Pharmacol* 23: 757-762
- Foster, K.A., F. Galeffi, F.J. Gerich, D.A. Turner, M. Müller, Progr. Neurobiol. 79 (2006) 136-171.
- Gaspers, L.D., A.P. Thomas, , Methods 46 (2008) 224-232.
- Goltsev, V., P. Chernev, I. Zaharieva, P. Lambrev, R.J. Strasser, Photosynth. Res. 84 (2005) 209-215.
- Gostimskaya, I.S., V.G. Grivennikova, G. Cecchini, A.D. Vinogradov. FEBS Lett. 581 (2007) 5803-5806.
- Grivennikova, V.G., E.O. Maklashina, E.V. Gavrikova, A.D. Vinogradov, Biochim. Biophys. Acta 1319 (1997) 223-232.
- Guo, Y., J. Tan, BioSystems 95 (2009) 98-103.
- Han DW et al. 2011. *Acta Pharmacologica Sinica*, doi: 10.1038/aps.2011.17
- Hano, N., Y. Nakashima, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, J. Bioenerg. Biomembr. 35 (2003) 257-265.
- Hatefi, Y., J.S. Rieske, in: R.W. Estabrook, M.E. Pullman (Eds.), Methods in Enzymology, Vol. 10, Academic Press, New York, 1967, pp. 235-239.
- Heikal, A.A., Biomark. Med. 4 (2010) 241-263.
- Isenberg, J.S., J.E. Klaunig, Toxicol. Sci. 53 (2000) 340-351.
- Jeong, J.H. et al. 2009. *J Cell Biochem* 106: 73-82
- Johnson MK, Loo G. 2000. *Mutation Res.* 459: 211-218

- Ji, H.F., L. Shen, J. Carey, R. Grandori, H.Y. Zhang, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 764 (2006) 155-160.
- Khan, A.U., M. Kasha, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 3293-3300
- Khan, A.U., Activated oxygen: singlet molecular oxygen and superoxide anion. *Photochem. Photobiol.* 28 (1978) 615-626.
- Kindzelskii, A., H.R. Petty, *Eur. Biophys. J.* 33 (2004) 291-299.
- Krause, F., C.Q. Scheckhuber, A. Werner, S. Rexroth, N.H. Reifschneider, N.A. Dencher, H.D. Osiewacz, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26453-26461.
- Kuznetsov, A.V., O. Mayboroda, D. Kunz, K. Winkler, W. Schubert, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1091-1099.
- Lagoa, R., I. Graziani, C. Lopez-Sanchez, V. Garcia-Martinez, C. Gutierrez-Merino, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 1562-1572.
- Li, N., K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, J.P. Robinson, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8516-8525.
- Liu, M., B. Lei, Q. Ding, J.C. Lee, S.C. Tu, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 89-95.
- Magnitsky, S., L. Touloukhouva, T. Yano, V.D. Sled, C. Hägerhäll, V.G. Grivennikova, D.S. Burbaev, A.D. Vinogradov, T. Ohnishi, *J. Bioenerg. Biomembr.* 34 (2002) 193-208.
- Marques, I., N.A. Dencher, A. Videira, F. Krause, *Eukaryot. Cell* 6 (2007) 2391-2405.
- Matzno, S. et al. 2008. *Biol Pharm Bull* 31: 1270-1273
- Mayevsky, A., G.G. Rogatsky, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (2007) C615-C640.
- Mik, E. G., J. Stap, M. Sinaasappel, J. F. Beek, J. A. Aten, T. G. van Leeuwen, C. Ince, *Nat. Methods* 3 (2006) 939- 945
- Mik, E. G., T. Johannes, C. J. Zuurbier, A. Heinen, J. H. P. M. Houben-Weerts, G. M. Balestra, J. Stap, J. F. Beek, C. Ince, *Biophys. J.* 95 (2008) 3977-3990
- C. Mieg, W. P. Mei, and F. A. Popp, in *Recent Advances in Biophoton Research and its Applications*, F. A. Popp, K. H. Li, and Q. Gu Eds (World Scientific, 1992) 197–205]
- Murray, T.A., R.P. Swenson, *Biochemistry* 42 (2003) 2307-2316]
- Nogués, I., L.A. Campos, J. Sancho, C. Gómez-Moreno, S.G. Mayhew, M. Medina, *Biochemistry* 43 (2004) 15111-15121.
- Ohnishi, S.T., T. Ohnishi, S. Muranaka, H. Fujita, H. Kimura, K. Uemura, K. Yoshida, K. Utsumi, *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (2005) 1-15.
- Pérez-Ruiz, T., C. Martínez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, *Electrophoresis* 22 (2001) 1170-1174.
- Ransac, S., C. Arnarez, J.P. Mazat, The flitting of electrons in complex I: A stochastic approach, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 641-648.
- Sandoval-Acuña, C., C. Lopez-Alarcón, M.E. Aliaga, H. Speisky, *Chem. Biol. Interact.* 199 (2012) 18- 28.
- Sazanov, L.A., *Biochemistry* 46 (2007) 2275-2288.
- Scordino, A., A. Triglia, F. Musumeci, F. Grasso, Z. Rajfur, *J. Photochem. Photobiol. B* 32 (1996) 11–17
- Scordino, A., F. Musumeci, M. Gulino, L. Lanzanò, S. Tudisco, L. Sui, R. Grasso, A. Triglia, *Journal of Physics D – Applied Physics* 41 (2008) 155507 (7pp)
- Scordino, A., I. Baran, M. Gulino, C. Ganea, R. Grasso, J. H. Niggli, F. Musumeci, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 139 , pp. 76-84 (2014)
- Shuttleworth, C.W., *Neurochem Int.* 56 (2010) 379-386.
- Skog, S., B. Tribukait, B. Wallström, S. Eriksson, *Cancer Res.* 47 (1987) 6490-6493.
- Stroh, A., O. Anderka, K. Pfeiffer, T. Yagi, M. Finel, B. Ludwig, H. Schägger, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5000-5007.
- Suzuki, H., T.E. King, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 352-358.
- Swartz, T.E., S.B. Corchnoy, J.M. Christie, J.W. Lewis, I. Szundi, W.R. Briggs, R.A. Bogomolni, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36493-36500.
- Tudisco, S., F. Musumeci , A. Scordino, G. Privitera, *Review of Scientific Instruments* 74 (2003) 4485- 4490
- Tudisco, S., A. Scordino, G. Privitera, I. Baran, F. Musumeci, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A* 518 (2004) 463-464
- Verkhovskaya, M.L., N. Belevich, L. Euro, M. Wikström, M.I. Verkhovsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 3763-3767.

- Villette, S., S. Pigaglio-Deshayes, C. Vever-Bizet, P. Validire, G. Bourg-Heckly, *Photochem. Photobiol. Sci.* 5 (2006) 483-492.
- Vinnakota, K.C., J.B. Bassingthwaighite, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286 (2004) H1742-1749.
- Vinogradov, A.D., *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008) 729-734.
- Zakharova, N.V., T.V. Zharova, A.D. Vinogradov, *FEBS Lett.* 444 (1999) 211-216.
- Xu, X., E.A. Arriaga, *Free Rad. Biol. Med.* 46 (2009) 905-913.
- Yamaguchi, M., G.I. Belogradov, A. Matsuno-Yagi, Y. Hatefi, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 329-336
- Yen, G.C. et al. 2003. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1215
- Yin, W., X. Li, S. Feng, W. Cheng, B. Tang, Y.L. Shi, Z.C. Hua. *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 191-202.

7. Diseminarea rezultatelor

Articole

1. Ioana Teodora Tofolean, Constanta Ganea, Diana Ionescu, Alexandru Filippi, Alexandru Garaiman, Alexandru Goicea, Mihnea-Alexandru Gaman, Alexandru Dimancea, Irina Baran, Cellular determinants involving mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis correlate with the synergic cytotoxicity of epigallocatechin-3-gallate and menadione in human leukemia Jurkat T cells, *Pharmacological Research*, sub tipar, 2015 **(if. 4.408)(is.1.170) (ISI)**
2. I. Baran, A. Scordino, D. Ionescu, S. Privitera, R. Grasso, M. Gulino, F. Musumeci, I.T. Tofolean, C. Ganea, Functional characterization of mitochondrial respiratory complex I by delayed luminescence spectroscopy, *LNS Activity Report 2015* Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud, sub tipar, 2015; Edit. Marchese Arti Grafiche, Siracusa, Italia; ISSN: 1827-1561 **(BDI)**
3. A. Iftime, C. Ganea, A. Popescu Rightmire, Interference of coumarin with the insertion of lyotropic anions and cadmium in artificial lipid bilayers, *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 20, No. 4, Pages: 10637-10647 Published: JUL-AUG 20152015 **(if. 0.404)(is 0.442) (ISI)**
4. 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) (ISI)**

Conferințe

1. Valentin Popescu, Bogdan Mastalier, Irina Baran. Polycaprolactone microspheres loaded with bioflavonoids and menadione mixture, novel systemic-friendly approach on cancer. Prezentare orală acceptată la workshop-ul internațional „Electroporation based Technologies and Treatments” organizat de European Society for Biomaterials, Ljubljana, Slovenia, 15-21 nov. 2015
2. Roxana Gabriela Sandu, Ioana Teodora Tofolean, Constanta Ganea, Irina Baran. Enhancement of the antiproliferative effect of doxorubicin by quercetin-menadione combinations in human leukemia Jurkat cells. Poster, 6th EMBO (European Molecular Biology Organization) Meeting, 5-8 sept. 2015, Birmingham, Marea Britanie
3. Alexandru Garaiman, Ioana Teodora Tofolean, Irina Baran. Chemotherapeutic potential of combination EGCG:MD in human leukemia Jurkat T cells. Poster, 5th Lower Saxony International Summer Academy in Immunology, 16 august – 13 september 2015, Hannover Medical School, Hannover, Germania. Abstract Book pag. 3
4. Oana Elena Baran, Ioana Teodora Tofolean, Ruxandra Irimia, Irina Baran, Constanta Ganea. Antiproliferative effect of doxorubicin/quercetin/menadione combination in

leukemia Jurkat T cells. Poster, 10th EBSA European Biophysics Congress, 18-22 July 2015, Dresda, Germania. Late Abstract Booklet p. 44

5. Vlad Cosoreanu, Ioana Teodora Tofolean, Constanta Ganea, Alexandru Goicea, Irina Baran. Growth-suppressive action of doxorubicin on human leukemia Jurkat cells. Modulation by quercetin. Poster, 10th EBSA European Biophysics Congress, 18-22 July 2015, Dresda, Germania. Late Abstract Booklet p. 45

6. Maria Teodora Ilie, Ioana Teodora Tofolean, Constanta Ganea, Alexandru Dimancea, Irina Baran. Chemotherapeutic potential of the doxorubicin/menadione combination in a human leukemia cell model. Poster, 10th EBSA European Biophysics Congress, 18-22 July 2015, Dresda, Germania. Late Abstract Booklet p. 45

7. Valentin Popescu, Bogdan Mastalier, Irina Baran. Bioflavonoids and menadione potential in novel systemic-friendly approach on cancer. Poster la workshop-ul international „YOUNG SCIENTISTS JOINING FORCES FOR EXCELLENCE IN BIOMATERIALS RESEARCH” organizat de European Society for Biomaterials, București, 28-29 mai 2015.

Lucrare distinsă cu premiul „Best Poster Award”

8. Ruxandra Irimia, Irina Baran. Green tea derived EGCG and vitamin K3: a synergic antiproliferative effect in acute lymphoblastic leukemia. MEDICALIS International Congress for Medical Students and Young Professionals, 14-17 May 2015, Cluj-Napoca

9. Paul Ciucur, Simona Costache, Irina Baran, Constantea Ganea. Possible therapeutic attitude towards acute lymphoblastic leukemia. MEDICALIS International Congress for Medical Students and Young Professionals, 14-17 May 2015, Cluj-Napoca

10. Simona Costache, Paul Ciucur, Alexandru Filippi, Irina Baran. Modularea efectului antitumoral al doxorubicinei asupra celulelor umane leucemice Jurkat cu combinații quercetină-menadionă. Comunicare orală, Congresul Național pentru Studenți și Tineri Medici, București, martie 2015. **Lucrare distinsă cu Premiul I.** Carte de Abstracte ISSN 2285-9438

11. A. Filippi, T. Picot, C.M. Aanei, L. Campos, C. Ganea, M.M. Mocanu, Epigallocatechin-3-O-gallate reduces the clonogenicity, induces the mitochondrial depolarization and increases production of reactive oxygen species in cancer cell lines with ErbB proteins overexpression, International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Bucharest, 17-18 September 2015, ISBN 978-973-720-605-3

12. M.M. Mocanu, A. Filippi, T. Picot, C. M. Aanei, L. Campos, C. Ganea, Anticancer effects of epigallocatechin-3-O-gallate in tumor cell lines with ErbB proteins overexpression, poster, National Conference of Cytometry, May 20, 2015, Bucharest, Romania