

Proiect PN-II-ID-PCE-2011-3-0800, nr. 342/2011

Titlul propunerii de proiect: „Studiul mecanismelor moleculare și celulare ale acțiunii EGCG și quercetinei ca potențiali agenți chimioterapeutici pentru celulele leucemice umane Jurkat T”

Titlul propunerii de proiect (formulată în lb. engleză): „Study on the molecular and cellular mechanisms of action of EGCG and quercetin as potential chemotherapeutic agents in human leukemia Jurkat T-cells”

Contextul științific și motivarea activității de cercetare.

În ultimele decenii a crescut treptat interesul comunității medicale în privința beneficiilor aduse de flavonoizii naturali. Acești compuși sunt ubiquitari în fructe, legume, ceai (ceaiul verde sau negru); s-a constatat că au proprietăți cardioprotectoare, anticancerigene, antiinflamatorii, antialergice și antimicrobiene.

Epigallocatechina-3-galată (EGCG) și quercetin (QC; 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) sunt doi compuși din această clasă care sunt relativ bine investigați și despre care există date certe că inhibă proliferarea celulară și induc apoptoza celulelor tumorale din diverse tipuri de cancere [1-9]. Atât EGCG cât și QC pot exercita un efect dual, pro- și anti-oxidant, în funcție de dozarea și temporizarea administrării, iar numeroase studii indică faptul că celulele maligne sunt mai susceptibile decât celulele normale la efectele citotoxice ale acestor flavonoizi [2,7-9]. În momentul de față, mai există doar câțiva agenți terapeutici care să manifeste potențial o astfel de selectivitate pentru eliminarea celulelor tumorale, exercitând însă în același timp și efecte citoprotectoare asupra celulelor normale [2]. Drept urmare, această combinație de proprietăți ar putea fi teoretic folosită pentru prevenirea apariției leucemiei sau pentru a crește eficacitatea tratamentelor chimioterapeutice pentru leucemie. Însă la acest moment studiile sunt deocamdată limitate la stadii pre-clinice (pe modele de linii celulare și de animale de laborator), deoarece există o îngrijorare deosebită privind efectele citotoxice acumulate asupra celulelor normale, efecte care apar la doze mari de flavonoizi.

Stabilirea dozării optime și sigure (fără efecte secundare semnificative) pentru EGCG sau QC rămâne o sarcină critică care trebuie îndeplinită. Alt motiv serios de îngrijorare este faptul că eșecul eliminării prin apoptoză a celulelor care au fost expuse agenților genotoxici este asociată cu riscul apariției cancerelor secundare și apariției rezistenței la agenții chimioterapici anti-cancer. Aceste probleme sunt motivele pentru care este necesară cercetarea unor abordări farmacologice diferite, ținute pe sensibilizarea celulelor canceroase la factori apoptotici, reducând astfel riscul inflamației și a potențialelor complicații ale chimio- și radio- terapiei. Beneficii importante mai pot apărea și datorită dezvoltării unor terapii care utilizează compuși cu specificitate mai mare pentru celulele maligne, dar care protejează țesuturile sănătoase. În acest proiect vom folosi celule Jurkat T ca sistem model pentru leucemie umană acută de tip limfoblastoid și vom investiga efectele EGCG și QC ca posibili potențiatori ai apoptozei induse de MD. La momentul de față, proprietățile antiproliferative ale EGCG și QC și dependențele acestora de doza administrată sunt în mare măsură necunoscute în ceea ce privește linia celulară de limfoblaști Jurkat T. S-a descoperit că QC se poate acumula în cantități mari în mitocondrii [10] și inhibă Complexele I și III ale lanțului respirator mitocondrial (MRC) [11]. Doze mari de QC cresc producerea de peroxid de hidrogen (H_2O_2) și de radical superoxid ($O_2^{\cdot -}$) [9,12-13], iar dozele mici ($\sim 10 \mu M$) de QC exercită efecte protectoare împotriva H_2O_2 dar nu și a MD în celulele Jurkat [14]. În celulele Jurkat concentrațiile mici de EGCG ($\sim 10 \mu M$) au un efect protector, antioxidant, în timp ce concentrațiile mari ($\sim 100 \mu M$) au un efect pro-oxidant, cito- și geno-toxic, inducând leziuni la nivelul ADN-ului, chiar în absența unor agenți oxidanți exogeni [1]. În celulele Jurkat, EGCG (conc. $50 \mu M$) produce H_2O_2 intracelular, ceea ce poate la rândul lui induce apoptoza [5]. În alte tipuri de celule, s-a descoperit că EGCG se asociază cu mitocondriile și cu alte organite citoplasmice (încă nespecificate) [15]. Un agent chimioterapeutic important utilizat clinic în tratamentul leucemiei este menadiona (vitamina K3) [16, 17]. Menadiona (MD) se reduce la nivelul Complexului I al lanțului respirator mitocondrial (MRC) [18, 19], ceea ce constituie cca. $\sim 50\%$ din metabolizarea acesteia [19]; aceasta poate ușor disrupe circuitul electronilor din Complexul I [19], ducând la producția de superoxid. În complexul I MRC, cei doi electroni livrați de nicotinamid-adenin-dinucleotida redusă (NADH) către FMN sunt transferați individual între opt complexe fier-sulf și în cele din urmă ajung la ubiquinonă. Rotenonul (ROT) este utilizat deja în studii preclinice ca agent molecular eficient pentru diferențierea efectelor diversilor compuși chimici asupra Complexului I al lanțului respirator. [20,21]. Rotenonul se leagă de un site specific al Complexului MRC și inhibă transferul electronilor de pe centrele Fe-S către ubiquinonă. Ca o consecință directă, electronii sunt deviați de la nivelul Complexului I către oxigenul molecular din mediul înconjurător, producând astfel superoxid. EGCG, QC, MD și ROT pot activa programul apoptozei în diverse tipuri de celule printr-o cale mitocondrială dependentă de Ca^{2+} , prin creșterea concentrației de Ca^{2+} citosolic și colapsul consecutiv al potențialului de membrană mitocondrială [7,11,13,16,20-25]. Oricum, datele privitoare la efectele precise acestor compuși asupra ciclului celular și apoptozei/necrozei în celulele Jurkat T sunt extrem de limitate la acest moment. Noi am arătat că QC este un puternic inductor al apoptozei și este de asemenea capabil să mărească apoptoza MD-indusă în celulele Jurkat [14]; Aceste efecte au fost investigate însă numai asupra unui set redus de doze-concentrații. După cunoștințele noastre nu este raportat în literatura de specialitate nici un raport sau studiu despre efectele acestor compuși asupra supraviețuirii clonogenice, care este un indicator critic pentru evaluarea eficienței efectelor antiproliferative ale agenților folosiți în chimioterapie, cât și ca indicator al probabilității de reparație a cancerului după terminarea chimioterapiei. Noi intenționăm să efectuăm un studiu sistematic al acestor efecte în regimuri combinate de dozaje și intervale de timp. Dorim de asemenea să investigăm relația dintre concentrația de calciu și apoptoza indusă de flavonoizi și/sau menadionă în celulele Jurkat. După cunoștințele noastre, nu există nici un studiu sistematic anterior al efectelor EGCG și QC asupra semnalelor intracelulare de calciu în celulele Jurkat. Ionii de calciu joacă un rol central în multiple căi de semnalizare celulară, pentru îndeplinirea unui număr variat de funcții, între care fertilizarea, proliferarea celulară, apoptoza, contracția musculară, secreția, memoria, etc. [25, 26]. Ca^{2+} este

eliberat din reticulul endoplasmic în urma activării unor receptor specifici: inozitol 1,4,5-trisfosfat (IP3) sau receptorii rianodinici (RyR). S-a constatat că unicul tip de receptor rianodinic exprimat în celulele Jurkat T este tipul 3 RyR (RyR3), care este responsabil pentru menținerea semnalului de Ca^{2+} necesară pentru expansiunea clonală [27]. Noi am arătat recent că QC în concentrație de 50 μ M produce un semnal evocat, puternic și susținut de Ca^{2+} în celulele Jurkat [28]. În măsurători experimentale ulterioare în care am utilizat diverși antagoniști pentru acest receptor, noi am obținut rezultate care indică că RyR3 pare responsabil de eliberarea de Ca^{2+} indusă de quercetină în celule Jurkat, și că legarea QC de acest receptor poate fi evaluată prin metode spectrofluorimetrice. Până în momentul de față sunt doar două studii de electrofiziologie care arată că EGCG și QC pot acționa ca modulator direct al activității canalului RyR/ Ca^{2+} [29,30]. Grupul nostru are experiență în domeniul reglării IP3R și RyR. Noi am dezvoltat anterior un model cantitativ care descrie reglarea alosterică a RyR (tip 2) de către cafeină și quercetină [31,32]. Având în vedere că spectroscopia de luminescență întârziată (DL) poate fi un instrument util în diagnosticul bolilor mitocondriale sau neoplazice [33-37], un al treilea scop al acestui proiect este investigarea în premieră a corelației dintre DL și metabolismul mitocondrial. DL este o emisie luminoasă de intensitate foarte scăzută, de durată mare, care urmează expunerii la lumină pulsată sau la radiație UV. Avem o strânsă colaborare [14,38,39] cu un grup de cercetători de la LNSINFN (Catania, Italia) care a dezvoltat o tehnică experimentală cu o sensibilitate deosebit de ridicată pentru a studia caracteristicile DL. Recent [14] noi am evaluat efectele DL produse de MD, H_2O_2 și QC în diverse doze asupra celulelor Jurkat și am găsit o puternică corelare negativă între apoptoză și DL, pe o scală de timp specifică DL (100 μ s - 1 ms). Mai mult, datele noastre sugerează că transferul de electroni de la nivelul Complexului I MRC este una dintre sursele principale ale DL.

Obiective

(1) Intenționăm să **cuantificăm efectele diferențiale dependente de doză ale EGCG și QC asupra celulelor leucemice umane (Jurkat)**, cu atenție deosebită asupra apoptozei, supraviețuirii clonale, ciclului celular și metabolismului mitocondrial. Dorim definirea exactă a parametrilor de dozaj și de temporizare a tratamentului, parametri necesari pentru creșterea semnificativă a influenței celor doi flavonoizi asupra apoptozei induse de menadionă asupra liniilor celulare, în același timp cu găsirea dozajului minim eficace ale substanțelor implicate. Vom măsura supraviețuirea clonală, evoluția ciclului celular și raportul apoptoză / necroză, potențialul membranar mitocondrial, nivelele mitocondriale de superoxid, NADH și FMN în celulele Jurkat tratate cu EGCG, QC, MD or ROT. (2) Dorim să **caracterizăm capacitatea EGCG și QC, singure sau în combinație cu MD, de a induce apoptoza via eliberarea de Ca^{2+} din reticulul endoplasmic intracelular**, și de a găsi caracteristicile modulării ale receptorilor rianodinici de către acești flavonoizi. Vom evalua cinetica variației concentrației intracelulare de Ca^{2+} în funcție de EGCG, QC și / sau MD, în prezența, respectiv absența inhibitorilor receptorului RyR (ruthenium-red și dantrolen). Vom investiga în ce măsură intensitatea semnalului de calciu este afectată de reducerea concentrației de calciu în mediul extracelular sau cel intracelular (prin fixarea concentrației extracelulare de Ca^{2+} și incubarea cu ionomicină (ionofor de calciu) sau cu BAPTA/AM (chelator de calciu). În tratamentele cu QC, concentrația de quercetină internalizată de celule și asociată mitocondriilor sau altor organite va fi determinată prin măsurători de cinetică a fluorescenței acesteia la lungimi de undă specifice pentru excitație, respectiv emisie [28]. (3) Vom **investiga corelația dintre luminescența întârziată și metabolismul mitocondrial prin parametri descriși mai sus**. DL a celulelor Jurkat va fi măsurată după tratamentul combinat al acestora cu EGCG, QC, MD și ROT. Randamentul cuantic (quantum yield) al DL va fi calculat în trei domenii temporare (11 - 100 μ s, 100 μ s - 1 ms și 1 - 10 ms) care sunt specifice diferitelor etape de transfer ale electronilor. Corelația dintre randamentul cuantic și ceilalți parametri mitocondriali va fi stabilită pentru fiecare componentă a DL.

Referințe bibliografice:

1. Johnson MK, Loo G. 2000. Mutation Research 459: 211-218
2. Han DW et al. 2011. Acta Pharmacologica Sinica, doi : 10.1038/aps.2011.17
3. Stresmann C et al. 2006. Cancer Res 66(5): 2794-2800
4. Wu H et al. 2009. Archives of Biochemistry and Biophysics 483: 99-105
5. Nakagawa H. et al. 2004. Carcinogenesis 25: 1567-1574
6. Matzno S et al. 2008. Biol Pharm Bull. 31: 1270-1273
7. Chen D et al. 2005. Biochem Pharmacol. 69: 1421-1432
8. Jeong JH et al. 2009. J Cell Biochem. 106: 73-82
9. Yen GC et al. 2003. Biosci Biotechnol Biochem. 67: 1215-1222
10. Fiorani M et al. 2010. J Nutr Biochem. 21: 397-404
11. Dorta DJ et al. 2005. Chem Biol Interact. 152: 67-78
12. Ferraresi R et al. 2005. Free Radic Res. 39: 1249-1258
13. De Marchi U et al. 2009. Biochim Biophys Acta. 1787: 1425-1432
14. Baran I, Ganea C et al. 2010. Cell Biochem Biophys. 58: 169-179
15. Piyaviriyakul S et al. 2011. Biol Pharm Bull. 34: 396-400
16. Laux I, Nel A. 2001. Clin Immunol. 101: 335-344
17. Matzno S et al. 2008. Biol Pharm Bull. 31: 1270-1273
18. Briere JJ et al. 2004. Biochem Biophys Res Commun. 316: 1138-1142
19. Floreani M, Carpenedo F. 1992. Gen Pharmacol. 23: 757-762
20. Rasola A, Geuna M. 2001. Cytometry 45: 151-157
21. Yin W et al. Biochem Pharmacol. 2009. 78: 191-202
22. Chien SY et al. 2009. Hum Exp Toxicol. 28: 493-503
23. Godar DE. 1999. J Invest Dermatol. 112: 3-12
24. Wang JH et al. 2011. Int J Mol Sci. 12: 742-754
25. Berridge MJ et al. 1998. Nature 395: 645-648
26. Case RM et al. 2007. Cell Calcium 42: 345-350
27. Guse AH et al. 1999. Nature 398: 70-73
28. Baran I, Ganea C et al. 2011. Rom J Phys. 56(3-4), sub tipar.