

## **Programul: Resurse umane**

**Tipul proiectului: Proiecte de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente - tip TE**

**Titlul proiectului: Efectele polifenolilor în modularea relației dintre proteinele ErbB și progresia ciclului celular în adenocarcinomul mamar și epidermoid**

**Cod proiect: PN-II-RU-TE-2011-3-0204**

**Contract nr. 111/10.10.2011**

**Raport științific de sinteză**

*privind implementarea proiectului în perioada octombrie 2011 – octombrie 2014*

### **1. Etapa I: octombrie 2011 – decembrie 2011**

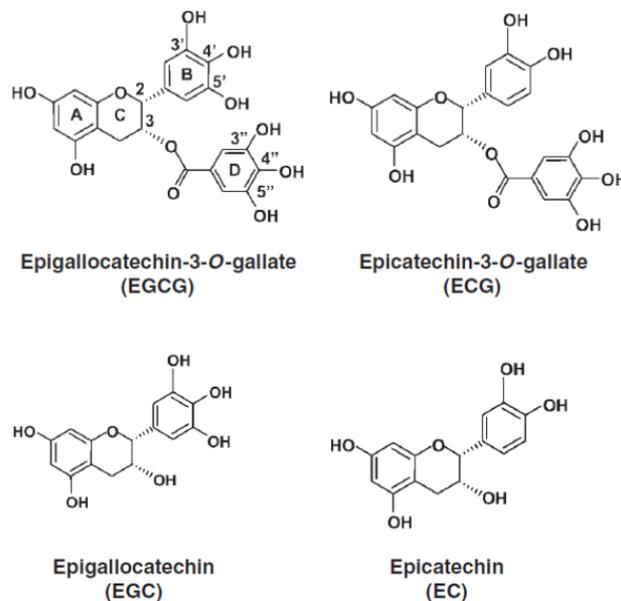
#### **Introducere**

Implicarea proteinelor ErbB în cancer este cunoscută încă de la începutul anilor 1980, când s-a observat că virusul eritroblastozei aviare codifică o proteină asemănătoare receptorului factorului de creștere epidermal cunoscută sub denumirea ErbB1 (Y. Yarden & al. [1]). Familia factorului de creștere epidermal este o familie de receptori tirozin-kinazici care cuprinde patru membri: ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) și ErbB4 (HER4) (Y. Yarden & al. [1], J.W. Park & al. [2]). Proteinele ErbB sunt implicate în multiple evenimente celulare care includ: diviziunea celulară, migrarea (asociată cu tumorigeneza), adeziunea celulară, diferențierea și apoptoza (Y. Yarden & al. [1]). După cuplarea liganzilor la receptori are loc asocierea acestora sub formă de homo- și heterodimeri, iar dintre aceștia, heterodimerii proteinei ErbB2 sunt cei care au efectul cel mai puternic în declanșarea proceselor de diviziune celulară și tumorigeneză (Y. Yarden & al. [1]). În cazul celulelor tumorale care superexprimă oncoproteina ErbB2, activarea acesteia are loc în mod independent de ligand (J.W. Park & al. [2]). De asemenea, heterodimerul ErbB2/ErB3 este considerat unul dintre cele mai mitogene și transformante combinații ale proteinelor ErbB (Y. Yarden & al. [1], J.W. Park & al. [2]). Activarea oncoproteinei ErbB2 conduce la proliferare celulară și inhibarea apoptozei prin perturbarea proteinelor implicate în progresia ciclului celular (T. Gelardi & al. [3]).

Ceaiul verde produs din frunzele de *Camellia sinensis* conține o serie de compuși polifenolici (Fig. 1), cum sunt: (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG) și (-)-epicatechin (EC) (M. Shimizu & al. [4]). Efectul anti-tumoral al EGCG este parțial atribuit proprietăților antioxidante, respectiv abilității de a îndepărta speciile reactive de oxigen (ROS) (H. Fujiki & al. [5]). EGCG are efect și la nivel de supraviețuire și proliferare celulară, inducând apoptoza și blocarea ciclului celular în celulele tumorale (H. Tachibana [6]), iar Kuzuhara și colaboratorii au propus ADN și ARN ca noi ținte pentru EGCG (T. Kuzuhara & al. [7]). Studii recente au indicat receptorii tirozin kinazici, respectiv proteine din familia ErbB, ca fiind ținte ale EGCG. S-a demonstrat că EGCG inhibă activarea proteinelor ErbB3 în celulele tumorale de cancer de colon (M. Shimizu & al. [8]). De asemenea, EGCG interferează cu semnalizarea

intracelulară a receptorului factorului de creștere epidermal (EGFR) în cazul carcinoamelor de cap și gât (M. Masuda & al. [9]).

În încercarea de a înțelege cât mai bine mecanismele de acțiune ale EGCG la nivelul celulelor tumorale care superexprimă proteinele familiei ErbB a fost evaluată abilitatea sa de acțiune *in vitro* asupra progresiei ciclului celular.



**Figura 1: Structuri ale polifenolilor din frunzele de *Camellia sinensis* (ceaiul verde).** Adaptare după Tachibana, H. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 87 (2011)

În aceste experimente preliminare s-a observat mărirea numărului de celule tumorale mamare SK-BR-3 în faza S, cu diminuarea numărului de celule în faza G0/G1. Experimentele efectuate la nivelul liniilor tumorale mamare SK-BR-3 reprezintă o continuare a experimentelor anterioare efectuate la Universitatea de Medicină din Debrecen, Ungaria unde a fost investigată expresia genică a *c-erbB2* la nivelul țesutului tumoral mamar.

## **Materiale și metode**

**Culturi celulare și tratament cu EGCG.** Celulele tumorale mamare SK-BR-3 au fost crescute până la 60 – 70% confluență în mediul DMEM cu L-glutamină (Lonza) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 unități penicilină/ml și 0.01 mg streptomycină/ml. Culturile celulare au fost menținute la 37°C în incubator cu atmosferă umedă și CO<sub>2</sub> (5%). Mediul a fost reînnoit la 2 – 3 zile, iar proporția de subcultivare a fost de 1:2. Celulele aderente subconfluente au fost tratate cu diferite concentrații de EGCG: 5, 10, 50 și 75 μM (Sigma) dizolvată în DMSO (maxim 0,1 %) pentru 36 de ore.

**Colorare ADN pentru evaluarea ciclului celular.** După tripsinizare celulele au fost spălate în tampon fosfat salin și pregătite pentru analiza ciclului celular. Pe scurt, 10<sup>6</sup> celule au fost resuspendate în 0,5 ml tampon fosfat salin rece, transferate în 4,5 ml etanol 70% rece (ice cold, -20°C) și incubate peste noapte la 4°C. După centrifugare, sedimentul a fost spălat cu 5 ml tampon fosfat salin. După o nouă centrifugare sedimentul a fost reluat în 0,5 ml iodură de propidiu/ RNAză (BD Pharmingen) și incubat 15 minute, în întuneric, la temperatura camerei.

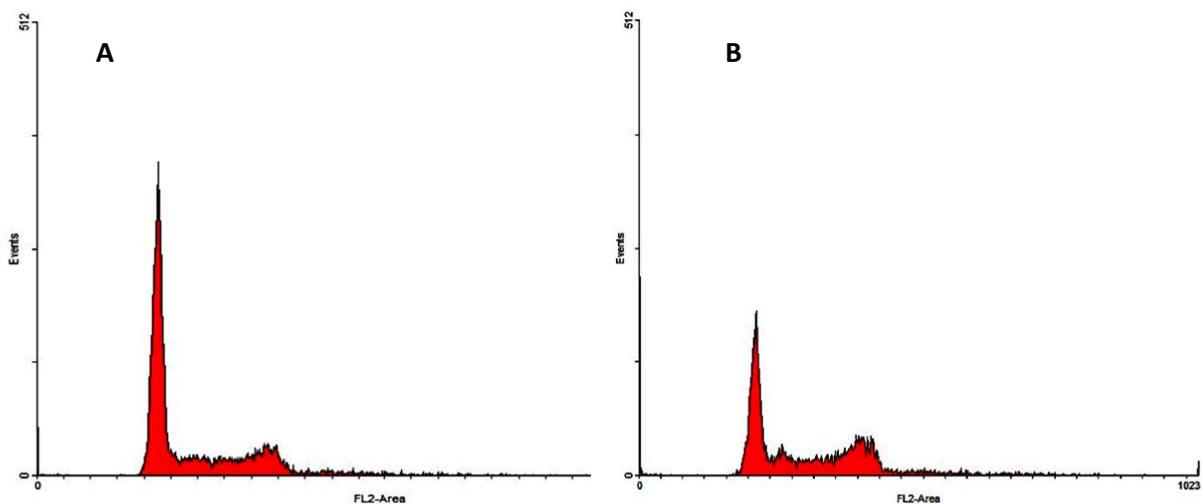
**Citometrie în flux.** Distribuția fazelor ciclului celular a fost realizată cu ajutorul unui citometru: Becton Dickinson FACSCalibur (FACS, fluorescence-activated cell sorting caliber) echipat cu programul de achiziție de date CellQuest. După legarea iodurii de propidiu la nivelul ADN, maximul de absorbție este la 535 nm, maximul de emisie este la 617 nm. Pentru înregistrarea semnalului fluorescent al iodurii de propidiu a fost utilizat un laser cu ioni de Argon cu emisie la 488 nm, iar fluorescența a fost colectată cu ajutorul unui filtru bandpass 585 nm (în canalul FL2 al citometrului). Pentru fiecare măsurătoare au fost analizate 10000 de evenimente. Analiza datelor a fost realizată cu programul ModFit 3.3, iar prezentarea imaginilor în raport cu ajutorul programului WinMDI 2.8.

## Rezultate și discuții

### Obiectiv 1: Studiarea efectelor polifenolilor asupra ciclului celular, apoptozei și viabilității celulare

#### Realizarea unor măsurători preliminare de evaluare a progresiei ciclului celular în prezența polifenolilor

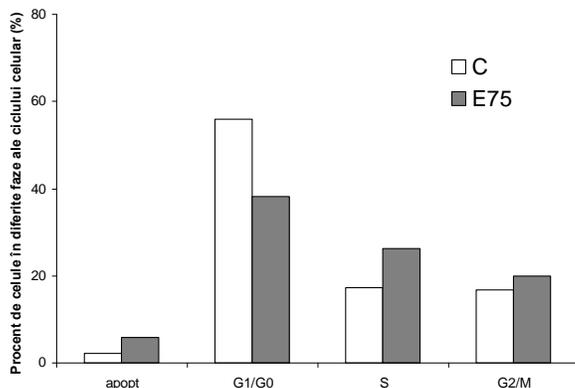
Studii anterioare au indicat EGCG ca având efect antimitotic (H. Tachibana [6], C.S. Yang & al. [10]). Pentru a investiga dacă activitatea sa este asociată cu blocarea progresiei ciclului celular au fost efectuate măsurători de citometrie în flux, în care celulele tumorale mamare SK-BR-3 care superexprimă oncoproteina ErbB2 (M.M. Mocanu & al. [11]) au fost tratate cu diferite concentrații de EGCG (5, 10, 50 și 75  $\mu$ M) pentru 36 de ore.



**Figura 2: Efectul EGCG asupra progresiei ciclului celular.** Conținutul ADN și progresia ciclului celular au fost analizate prin citometrie în flux. Pentru colorarea ADN s-a folosit iodura de propidiu. Cele două vârfuri ale histogramei indică fazele G0/G1 ale ciclului celular și G2/M, iar între cele două vârfuri se afla faza S. Abscisa reprezintă intensitatea fluorescenței, iar ordonata numărul relativ de celule (au fost investigate 10000 de evenimente). **A.** Progresia ciclului celular pentru linia SK-BR-3 fără tratament cu EGCG. **B.** Se observă reducerea fazei G0/G1 după incubarea celulelor cu 75  $\mu$ M EGCG pentru 36 ore.

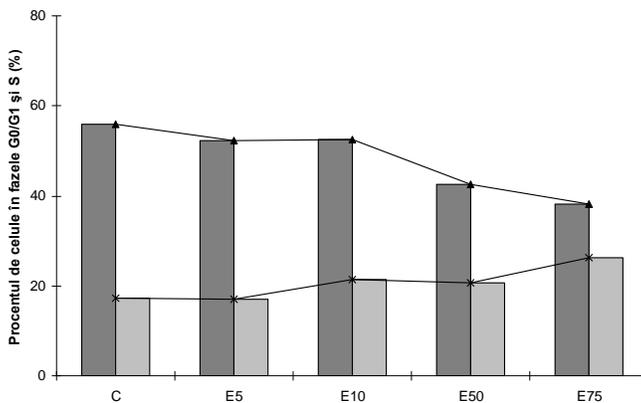
Fig. 2A prezintă fazele ciclului celular G0/G1, S și G2/M pentru celulele tumorale netratate. Tratamentul celulelor tumorale mamare SK-BR-3 cu 75  $\mu$ M EGCG pentru 36 de ore (Fig. 2B) induce blocarea ciclului celular la nivelul fazei S. Aceste rezultate sunt în concordanță cu date anterior publicate în studii in vitro efectuate la nivelul celulelor de carcinom pulmonar (D. Sadava & al. [12]). Fig. 3 prezintă cuantificarea rezultatelor de citometrie în flux realizată prin analiza a 10000 de evenimente. S-a observat o scădere a numărului de celule tumorale SK-BR-3 în faza G0/G1 de la 53% (control) la 38% (celule tratate cu 75  $\mu$ M EGCG) și o creștere a numărului de celule în faza S de la 17% la 26% (34.61%), sugerând blocarea

progresiei ciclului celular la nivelul fazei S. De asemenea, se observă o ușoară creștere a numărului de celule în faza G2/M sau în fracția sub-G0/G1 după tratamentul cu 75  $\mu$ M EGCG.



**Figura 3: Procentele de celule SK-BR-3 în diferitele faze ale ciclului celular.** Coloanele albe reprezintă rezultatele obținute din analiza progresiei ciclului celular al SK-BR-3 în absența EGCG (control, C), iar coloanele gri reprezintă celulele SK-BR-3 în prezența EGCG (E75). Linia celulară tumorală mamară SK-BR-3 a fost tratată cu 75  $\mu$ M EGCG pentru 36 ore. Cuantificarea datelor de citometrie în flux indică diminuarea fazei G1/G0 și mărirea numărului de celule în fazele S, G2/M. De asemenea, se observă o ușoară mărire a numărului de celule apoptotice în cazul celulelor tratate cu EGCG.

Efectul EGCG asupra progresiei ciclului celular a fost investigat în prezența unor doze reduse de EGCG (5 și 10  $\mu$ M) sau doze relativ crescute de EGCG (50 și 75  $\mu$ M). Fig. 4 indică o influență redusă a 5 și 10  $\mu$ M EGCG la nivelul fazei G0/G1 comparativ cu proba control. Reducerea numărului de celule în faza G0/G1 este evidentă începând cu doze relativ mărite de EGCG, respectiv 50 și 75  $\mu$ M. Datele preliminare obținute indică o mărire a numărului de celule în faza S după incubarea celulelor tumorale cu 10, 50 și 75  $\mu$ M EGCG pentru 36 de ore, concentrația de 5  $\mu$ M EGCG nemedificând numărul de celulele în faza S comparativ cu proba control.



**Figura 4: Efectul EGCG asupra fazelor G0/G1 și S.** Linia celulară tumorală mamară SK-BR-3 a fost tratată cu diferite concentrații de EGCG: 5, 10, 50 și 75  $\mu$ M EGCG pentru 36 ore. Se observă scăderea numărului de celule în faza G0/G1 a ciclului celular (coloanele gri închis), concomitent cu mărirea numărului de celule din faza S (coloanele gri deschis).

## Concluzii

În cadrul acestor experimente preliminare s-a prezentat efectul a diferite doze de EGCG asupra progresiei ciclului celular tumoral (linia tumorală de adenocarcinom mamar SK-BR-3). S-a observat că doze relativ crescute de EGCG, 50 și 75  $\mu$ M, determină reducerea numărului de celule în faza G0/G1 și mărirea

numărului de celule în faza S a ciclului celular în mod similar datelor din literatură (D. Sadava & al. [12]). De asemenea, s-a observat că efectul EGCG la nivelul progresiei ciclului celular tumoral este dependent de doza utilizată.

## 2. Etapa II: ianuarie 2012 – decembrie 2012

### Introducere

În această etapă am continuat studiul efectului polifenolilor, respectiv al galatului de epigallocatechină (EGCG) extras din ceaiul verde (*Camellia sinensis*), la nivelul liniilor tumorale mamare (SK-BR-3) și epidermale (A431) care superexprimă proteine transmembranare din familia ErbB.

### Materiale și metode

**Culturi celulare și tratament cu EGCG.** Celulele tumorale mamare SK-BR-3 și epidermale A431 au fost crescute până la 60 – 70% confluență în mediul DMEM cu L-glutamină (Sigma) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 unități penicilină/ml și 0.01 mg streptomycină/ml. Culturile celulare au fost menținute la 37 °C în incubator cu atmosferă umedă și CO<sub>2</sub> (5%). Mediul a fost reînnoit la 2 – 3 zile, iar proporția de subcultivare a fost de 1:2 pentru SK-BR-3 și 1:5 pentru A431. Celulele aderente subconfluente au fost tratate cu diferite concentrații de EGCG: 5, 10, 50 și 75 μM (Sigma) dizolvată în DMSO (maxim 0,1 %) pentru diferite perioade de timp.

**Colorare ADN pentru evaluarea ciclului celular.** După tripsinizare celulele au fost spălate în tampon fosfat salin și pregătite pentru analiza ciclului celular. 10<sup>6</sup> celule au fost resuspendate în 0,5 ml tampon fosfat salin rece, transferate în 4,5 ml etanol 70% rece (ice cold, -20°C) și incubate peste noapte la 4°C. După centrifugare, sedimentul a fost spălat cu 5 ml tampon fosfat salin. După o nouă centrifugare sedimentul a fost reluat în 0,5 ml iodură de propidiu/RNAză (BD Pharmingen) și incubat 15 minute, în întuneric, la temperatura camerei. Distribuția fazelor ciclului celular a fost analizată cu ajutorul unui citometru: Becton Dickinson FACSCalibur (FACS, fluorescence-activated cell sorting caliber) echipat cu programul de achiziție de date CellQuest. După legarea iodurii de propidiu la nivelul ADN, maximul de absorbție este la 535 nm, maximul de emisie este la 617 nm. Pentru înregistrarea semnalului fluorescent al iodurii de propidiu a fost utilizat un laser cu ioni de Argon cu emisie la 488 nm, iar fluorescența a fost colectată cu ajutorul unui filtru bandpass 585 nm (în canalul FL2 al citometrului). Pentru fiecare măsurătoare au fost analizate 10000 de evenimente. Analiza cantitativă a datelor a fost realizată cu programele ModFit 3.3, WinMDI 2.9.

**Apoptoza.** După incubarea celulelor tumorale mamare (SK-BR-3) și epidermale (A431) cu diferite concentrații de EGCG timp de 24 h și 72 h s-a realizat colorarea acestora pentru măsurători de apoptoză. Celulele au fost colectate prin tripsinizare (s-au colectat toate fracțiile celulare), iar pentru fiecare probă s-au pregătit 10<sup>6</sup> celule. După spălarea de două ori în PBS, supernatantul a fost îndepărtat iar sedimentul a fost prelulat în 100 μl AVBB (Annexin V binding buffer) conform instrucțiunilor producătorului (Beckman Coulter). Fiecare probă a fost incubată cu 1 μl Anexina V-FITC și 2,5 μl 7-AAD timp de 15 minute, în întuneric, la temperatura camerei, după care s-a completat volumul probelor cu 400 μl AVBB. Probele au fost analizate prin citometrie în flux în mai puțin de o oră cu ajutorul unui instrument FACSCalibur (Beckton Dickinson). Lungimea de undă la care au fost excitați fluoroforii a fost 488 nm (laser cu argon, 15 mW), iar datele au fost înregistrate cu ajutorul unor filtre de tip bandpass la 530 nm pentru FITC și > 670 nm pentru 7-AAD.

**Evaluarea viabilității celulare – WST-1 assay.** Viabilitatea celulară a fost evaluată prin măsurarea oxidării sărurilor de tetrazolium hidrosolubile, utilizându-se reactivul WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Celulele aderente au fost cultivate în plăci cu 96 de godeuri la o concentrație de 7 x 10<sup>3</sup> celule/ godeu cu 24 h înainte de a se efectua tratamentele. Celulele tumorale aderente au fost incubate la 37 °C, în atmosferă cu CO<sub>2</sub> cu diferite

concentrații de EGCG pentru 24 și 48 h în triplicat. Absorbanța reactivului WST-1 a fost măsurată cu ajutorul unui spectrofotometru pentru plăci cu 96 de godeuri (Sinergy HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) la lungimile de undă de 450 și 620 nm. Concentrația de polifenoli care conduce la moartea a 50% dintre celulele tumorale (IC50) a fost calculată cu ajutorul programului MatLab (Mathworks Inc., Natick, MA) [2011, Varadi *et al.*, Eur J Pharmacol]:

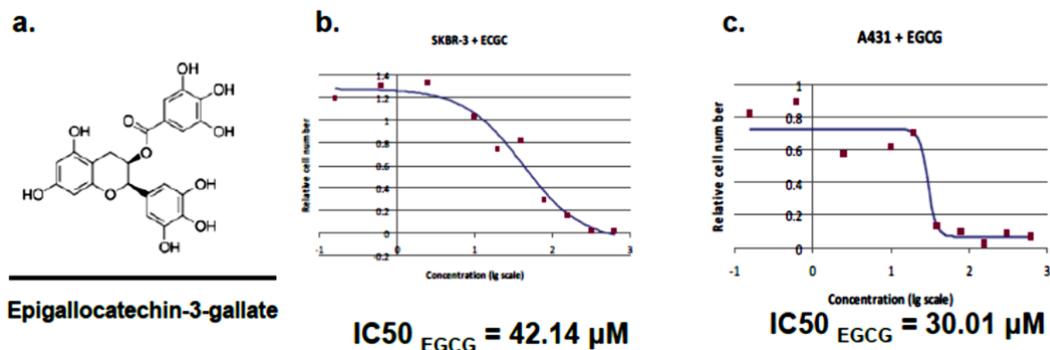
$$A_{\min} + \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + 10^{n(\log(c) - \log(IC50))}} \quad (1)$$

unde,  $A_{\min}$  și  $A_{\max}$  sunt absorbanțele pentru cele mai scăzute și cele mai mari valori ale absorbanțelor,  $n$  este coeficientul lui Hill,  $c$  este concentrația de polifenol.

## Rezultate

### Obiectiv 1: Studiarea efectelor polifenolilor asupra ciclului celular, apoptozei și viabilității celulare

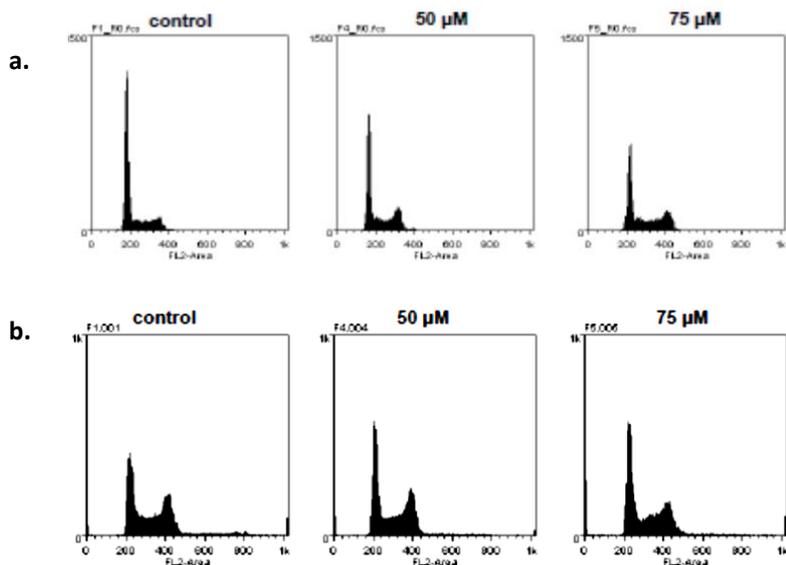
Efectul EGCG asupra viabilității liniilor celulare tumorale mamare, SK-BR-3 și epidermale, A431 a fost studiat prin incubarea celulelor în prezența mai multor concentrații de polifenol.



**Figura 1: Curbele de viabilitate în cazul incubării celulelor tumorale care superexprimă proteinele ErbB cu EGCG.** a. Structura EGCG; b. Curba de viabilitate celulară pentru SK-BR-3 în urma incubării cu diferite concentrații de EGCG; c. Curba de viabilitate celulară pentru A431 după incubarea cu EGCG.

Linia celulară mamară superexprimă oncoproteina ErbB2, iar linia celulară epidermală A431 superexprimă proteina ErbB1 (receptorul factorului de creștere epidermal). S-a evaluat viabilitatea celulară la 24 și 48 de ore. Figura 1 prezintă curbele de viabilitate pentru celulele tumorale mamare SK-BR-3 (Figura 1b) și celulele tumorale epidermale A431 (Figura 1c). De asemenea, s-a calculat și valoarea IC50 obținându-se  $42.14 \pm 1.29 \mu M$  pentru linia celulară tumorală mamară SK-BR-3 și  $30.01 \pm 0.72 \mu M$  pentru linia celulară tumorală epidermală A431 după o incubare cu EGCG de 24 h.

Figura 2a prezintă influența EGCG la nivelul fazelor ciclului celular pentru linia tumorală mamară SK-BR-3. Au fost investigate mai multe concentrații de polifenol: 5, 10, 50, 75  $\mu M$  EGCG. Concentrațiile scăzute de polifenol nu au influențat semnificativ progresia ciclului celular, iar concentrațiile de 50 și 75  $\mu M$  EGCG au determinat scăderea numărului de celule în faza G0/G1 și creșterea acestuia în fazele S și G2/M (Figura 2b).



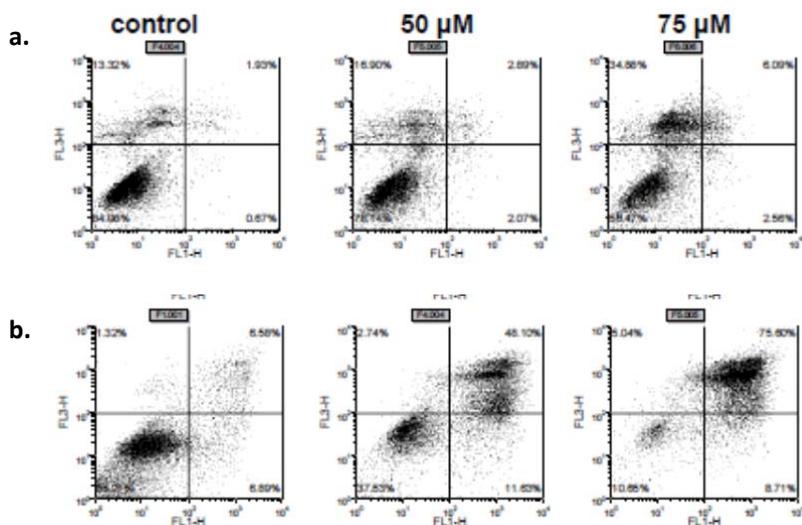
**Figura 2: Efectul EGCG asupra progresiei ciclului celular în cazul liniei celulare tumorale mamare SK-BR-3.** a. Imagini comparative ale progresiei ciclului celular în cazul probei control și probelor incubate pentru 24 h cu 50 și 75  $\mu\text{M}$  EGCG. b. Fazele ciclului celular pentru celulele tumorale epidermale A431 incubate pentru 24 h în prezența a 50 și 75  $\mu\text{M}$  EGCG.

Analiza cantitativă a etapelor ciclului celular în cazul liniei tumorale epidermale A431 pentru concentrațiile de 50 și 75  $\mu\text{M}$  EGCG a indicat modificări ale procentelor fiecărei etape a ciclului celular (Tabel 1); de asemenea, în Tabelul 1 sunt prezentate rezultatele pentru linia tumorală mamară SK-BR-3:

Linia celulară	Proba	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
SK-BR-3	Control	62.25	32.09	5.67
	50 $\mu\text{M}$ EGCG	49.81	36.76	13.44
	75 $\mu\text{M}$ EGCG	41.31	43.50	15.19
A431	Control	27.75	47.27	24.98
	50 $\mu\text{M}$ EGCG	31.26	49.58	19.16
	75 $\mu\text{M}$ EGCG	27.97	58.88	13.16

**Tabel 1: Procentele fazelor ciclului celular după incubarea cu galat de epigallocatechină.**

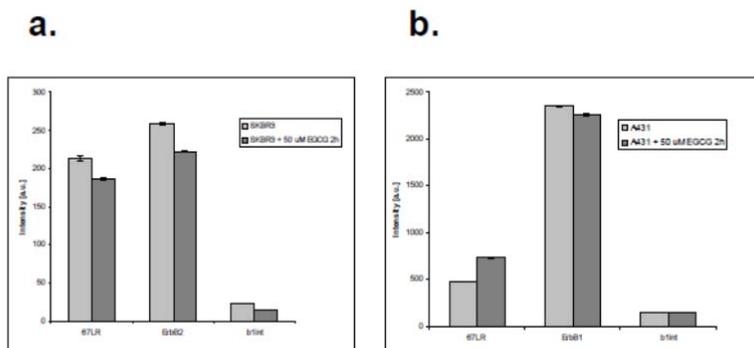
Într-o următoare etapă am fost interesați să investigăm efectul EGCG asupra procesului apoptotic. Celulele tumorale au fost tratate cu diferite concentrații de polifenol: 5, 10, 50, 75  $\mu\text{M}$  EGCG timp de 72 h. După incubare celulele tumorale au fost colorate cu Anexină V-FITC și 7-AAD pentru identificarea celulelor viabile (cadranul stânga jos), celulelor apoptotice timpurii (cadranul dreapta jos) și celulelor apoptotice târzii sau necrotice (cele două cadrane din partea de sus a graficelor prin puncte). Figura 3 prezintă influența EGCG la nivelul proceselor apoptotice. S-a constatat că EGCG la concentrații de 50 și 75  $\mu\text{M}$  induce apariția apoptozei târzii/ necrozei atât la nivelul liniei tumorale mamare SK-BR-3 (Figura 3a), cât și la nivelul liniei tumorale epidermale A431 (Figura 3b). Se observă creșterea procentului de celule apoptotice târzii/ necrotice odată cu mărirea concentrației de EGCG, ceea ce indică dependența procesului apoptotic de doza de EGCG utilizată. Măsurătorile de citometrie au fost realizate în Laboratorul de Imunologie, Institutul Național Victor Babeș.



**Figura 3: Efectul tratamentului cu EGCG la nivelul apoptozei evaluat prin colorarea celulelor cu Anexină V – FITC și 7-AAD. a.** Linia tumorală mamară SK-BR-3; **b.** Linia tumorală epidermală A431

**Obiectiv 2: Investigarea efectului polifenolilor asupra expresiei proteinelor ErbB**

Deoarece în literatura de specialitate s-a menționat influența EGCG la nivelul expresiei proteinelor membranare din familia ErbB, la nivelul  $\beta$ 1-integrinei, cât și observația conform căreia receptorul de laminină 67LR este molecula receptoare pentru a fost investigat efectul EGCG la nivelul acestor proteine membranare prin tehnica de citometrie în flux.



**Figura 4: Efectul EGCG la nivelul expresiei proteinelor membranare. a.** Nivelul expresiei proteinelor membranare: ErbB2, 67LR, beta1-integrina a fost redus după incubarea celulelor tumorale mamare SK-BR-3 cu 50  $\mu$ M EGCG pentru 2 h; **b.** Incubarea celulelor tumorale epidermale A431 cu 50  $\mu$ M EGCG pentru 2 h.

Cellulele tumorale mamare SK-BR-3 și epidermale A431 au fost incubate în prezența a 50  $\mu$ M EGCG timp de 2 h. S-a investigat efectul EGCG la nivelul expresiei proteinelor ErbB2, receptorului pentru laminină 67LR, și beta1-integrinei în cazul liniei tumorale SK-BR-3 și la nivelul proteinelor ErbB1 (Figura 4a), receptorului pentru laminină 67LR și beta1-integrinei în cazul liniei tumorale A431 (figura 4b). În cazul liniei tumorale SK-BR-3 s-a constatat o scădere moderată a nivelului expresiei proteinelor membranare investigate, iar în cazul liniei tumorale A431 s-a observat o scădere moderată a nivelului expresiei proteinei ErbB, nu s-au

observat modificări în cazul beta1-integrinei și s-a constatat o creștere a nivelului expresiei receptorului pentru laminină 67LR. Obiectivul a fost realizat în laboratoarele de Biofizică și Biologie Celulară, Facultatea de Medicină, Universitatea din Debrecen, Ungaria.

## Concluzii

În concluzie, măsurătorile efectuate susțin implicarea polifenolilor, respectiv a EGCG, în blocarea progresiei ciclului celular, în promovarea apoptozei târzii/ necrozei și în diminuarea exprimării proteinelor ErbB la nivelul liniilor tumorale mamare și epidermale investigate. De asemenea, s-a constatat că efectul EGCG este dependent de doză. Sunt necesare experimente ulterioare în care să se evalueze efectul altor polifenoli, cât și combinațiilor acestora, în scopul recomandării polifenolilor ca posibili agenți chemoterapeutici ai cancerului.

### 3. Etapa III: ianuarie 2012 – octombrie 2013

#### Introducere

Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) este un metabolit secundar din plante care poate fi găsit în ceapă, mere, struguri, ceai verde etc. (G.S. Kelly [13], F. Dajas [14]). Numeroase studii au evidențiat efectele chemopreventive și chemoterapeutice ale quercetinei bazate pe două activități esențiale ale acesteia, respectiv proprietățile sale anti-oxidante și pro-oxidante. Proprietățile anti-oxidante ale quercetinei sunt legate de abilitatea flavonoidului de a dona electroni speciilor de oxigen reactive (ROS) care vor fi mai puțin nocive pentru macromolecula de ADN (A.J. Vargas & al. [15]). Proprietățile anti-oxidante ale quercetinei au fost observate la concentrații scăzute ale acesteia, de până la 40  $\mu\text{M}$  (A.J. Vargas & al. [15]) și au fost asociate atât cu activitatea sa anti-inflamatorie, cât și cu efectele sale neuroprotectoare și cardioprotectoare (F. Dajas [14]). Proprietățile pro-oxidante ale quercetinei au fost puse în legătură cu abilitatea acesteia de a inhiba proliferarea celulelor tumorale și s-a apreciat că aceste proprietăți antitumorale se manifestă în domeniul de concentrații 40 – 250  $\mu\text{M}$  (A.J. Vargas & al. [15]). Alte raportări indică, însă, o activitate antitumorală a quercetinei chiar la concentrații mai scăzute (3 – 50  $\mu\text{M}$ ) (L. Gibellini & al. [16]).

De remarcă faptul că, rolul antiproliferativ al quercetinei a fost evident doar în cazul celulelor tumorale (G. Wang & al. [17], I. Baran & al. [18], S.U. Mertens-Talcott & al. [19]), în timp ce astfel de efecte nu au fost observate în cazul celulelor normale (J.H. Jeong & al. [20]). Conform unor raportări anterioare, quercetina a indus blocarea ciclului celular în faza G<sub>2</sub>/M (K. Bishayee & al. [21]), faza G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (M. Yoshida & al. [22]), ori faza S (H. Zhang & al. [23]). Datele divergente privind concentrațiile la care se manifestă activitatea antiproliferativă și varietatea efectelor asupra progresiei ciclului celular după incubarea cu quercetină ne-au determinat să investigăm aceste efecte în celulele tumorale epiteliale.

Inducerea apoptozei în liniile celulare tumorale de către flavonoide a fost raportată de numeroase studii. Flavonoidele pot modula atât căile apoptotice extrinseci, cât și pe cele intrinseci prin creșterea exprimării caspazelor 3/7 și prin inhibarea proteinelor anti-apoptotice cum ar fi Bcl-2 (M.H. Lee & al. [24]). Studii recente demonstrează că activitatea pro-apoptotică a EGCG este mediată de un receptor pentru laminină de 67kDa (67LR), iar blocarea acestui receptor cu anticorpi specifici a condus aproape la inhibarea completă a apoptozei în linii celulare de mielom multiplu (M. Kumazoe & al. [25]). De asemenea, s-a raportat și influențarea progresiei ciclului celular de către flavonoide: în timp ce EGCG poate determina

blocarea ciclului celular în faza  $G_0/G_1$ , genisteina ar putea conduce la blocarea progresiei ciclului celular în faza  $G_2/M$  (H.C. Huang & al. [26]).

Multiple rezultate științifice susțin ipoteza conform căreia consumul anumitor constituenți alimentari, cum ar fi galatul de epigallocatechină (EGCG) din ceaiul verde sau genisteina din soia, este asociat atât cu riscul redus de cancer (C.S. Yang & al. [27], S.J. Park & al. [28]). Efectul acestor flavonoide asupra apoptozei, progresiei ciclului celular și fosforilării receptorilor tirozin kinazici (RTK) a fost studiat în diferite linii celulare tumorale (M. Masuda & al. [9], M. Shimizu & al. [29]). Cu toate acestea, mecanismul molecular de acțiune al flavonoidelor în liniile celulare care superexprimă proteinele ErbB rămâne a fi elucidat. Proteinele ErbB, o familie de RTK, au un rol central în dezvoltarea diferitelor forme de cancer (Y. Yarden & al. [1], N.E. Hynes & al. [30]). Familia proteinelor ErbB cuprinde patru membri, de la ErbB1 la ErbB4, iar superexprimarea acestora este asociată cu fenomene de invazivitate, metastazare și inhibare a apoptozei în celulele tumorale (Y. Yarden & al. [1]). ErbB1, receptorul factorului de creștere epidermal (EGF), formează homo- și heterodimeri, declanșând activarea căilor de semnalizare intracelulară după cuplarea ligandului (N.E. Hynes & al. [31]).

Caracterizarea asocierii dintre proteine sau a modificărilor acestora induse de cuplarea fiziologică a liganzilor sau a altor molecule cu efect terapeutic, nu permite doar elucidarea declanșării semnalizării intracelulare, ci reprezintă și o modalitate terapeutică ce ar putea fi abordată în viitor. O varietate de metode este valabilă pentru investigarea interacțiilor dintre proteine, incluzând: tehnici de biologie moleculară (exemplu: imunoprecipitarea, "yeast two-hybrid" (M.P. Williamson & al. [32]), tehnici care se bazează pe diferite manifestări ale fluorescenței transferului de energie (FRET) (E.A. Jares-Erijman & al. [33]) sau variații ale fluorescenței din tehnicile spectroscopice (fluorescence correlation spectroscopy, FCS)(E. Haustein & al. [34]).

Studiul de față a avut ca scop testarea abilității quercetinei, EGCG și genisteinei de a inhiba proliferarea celulelor tumorale în cazul a două linii celulare de cancer epitelial, respectiv celulele tumorale mamare SK-BR-3 și celulele de carcinom epidermoid A-431. Am studiat, efectele antiproliferative ale quercetinei, în primul rând, prin evaluarea progresiei ciclului celular și, în al doilea rând, prin investigarea activității pro-apoptotice a acesteia. Datele noastre susțin atât abilitatea quercetinei de a interfera cu progresia ciclului celular cât și capacitatea acesteia de a produce efecte pro-apoptotice într-o manieră dependentă de timp și de doză în celulele tumorale epiteliale SK-BR-3 și A-431. De asemenea, EGCG a fost mai eficientă în inducerea apoptozei târzii/necrozei, iar genisteina a blocat progresia ciclului celular în faza  $G_2/M$ . S-a observat că efectul antiproliferativ al EGCG a fost mediat de 67LR. Măsurătorile de citometrie în flux au indicat reducerea nivelului de exprimare a proteinelor ErbB1 și ErbB2 după incubarea celulelor tumorale în prezența EGCG, dar nu în prezența genisteinei.

## **Materiale și metode**

### ***Chimicale și reactivi***

Quercetina, EGCG, genisteina și dimetilsulfoxidul (DMSO) au fost obținute de la Sigma Aldrich, sărurile hidrosolubile de tetrazolium 4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat (WST-1) de la Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, iodura de propidiu /RNaza de la BD Biosciences, Annexin V-FITC de la Beckman Coulter, Brea, CA și 7-AAD de la BD Biosciences, San Jose, CA. Mediul Dulbecco modificat (DMEM), serul bovin fetal (FBS), penicilina/streptomicina au fost de la Sigma Aldrich și L-glutamina de la Gibco – Life Technologies.

### ***Culturi celulare și anticorpi***

Liniile celulare de cancer de sân uman SK-BR-3 și de carcinom epidermoid uman A-431 au fost obținute de la American Type Culture Collection (Rockville, MD) și au fost crescute conform cu specificațiile respective. Pe scurt, celulele tumorale au fost cultivate în DMEM suplimentat cu 10% FBS, 100 unități/ml penicilină și 100 μg/ml streptomycină, la 37°C, într-un incubator umidificat cu atmosferă de 5% CO<sub>2</sub>.

Au fost utilizați următorii anticorpi anti-ErbB1: anticorpus monoclonal 528 (Mab528) produs de linia celulară de tip hibridoma HB-8509 obținută de la ATCC conjugat direct cu AlexaFluor 546 sau AlexaFluor 647; anticorpus umanizat anti-ErbB2, Herceptin (Roche, Budapest, Hungary) conjugat direct cu AlexaFluor 546 sau AlexaFluor 647.

### ***Testul de viabilitate***

Celulele SK-BR-3 și A-431 au fost cultivate în triplicat la o densitate de  $7 \cdot 10^3$  celule/ eșantion în plăci cu 96 de godeuri, cu 24 h înainte experimentelor. Tratamentul cu diferite concentrații de quercetină timp de 24 h a fost realizat în mediu fără ser (H. van der Woude & al. [35]). Concentrația finală de DMSO în mediul de cultură a fost de 0.05%. Testul de viabilitate a fost efectuat în triplicat utilizând reactivul de proliferare WST-1 bazat pe reducerea sării de tetrazolium WST-1 la formazan de către dehidrogenazele mitocondriale. Absorbanta formazanului s-a măsurat la 450 nm și a fost corectată la 620 nm cu ajutorul unui spectrofotometru pentru plăci cu 96 de godeuri (ELISA reader).

### ***Analiza ciclului celular***

După tratamentul cu flavonoid (0, 5, 10, 50, și 75 μM quercetină) timp de 24 h în mediu complet celulele au fost recoltate prin tripsinizare, fixate în etanol 70% rece (ice cold) și stocate la -20 °C. Etanolul a fost înlăturat prin centrifugare și celulele au fost spălate în PBS după care  $10^6$  celule/eșantion au fost colorate cu iodură de propidium/RNAză timp de 15 minute la întuneric, conform cu instrucțiunile producătorului. Conținutul de ADN a fost analizat cu ajutorul unui instrument FACSCalibur (Becton Dickinson). Pentru excitarea la 488 nm s-a folosit un laser cu ioni de argon răcit cu aer (15 mW) și au fost colectate datele de la 10000 evenimente/eșantion cu un filtru trece bandă de 585-nm. Experimentele au fost realizate în triplicat. Analiza datelor s-a efectuat în funcție procentele de celule aflate în fazele G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S și G<sub>2</sub>/M ale ciclului celular.

### ***Evaluarea apoptozei***

Celulele tumorale au fost incubate cu 0, 5, 10, 50, și 75 μM quercetină în mediu complet timp de 24 și 72 h. Celulele au fost colectate prin tripsinizare, spălate de două ori în PBS și  $10^6$  celule/eșantion au fost dublu colorate cu Annexin V-FITC și 7-AAD conform instrucțiunilor producătorului. Probele au fost analizate prin citometrie în flux în mai puțin de o oră cu ajutorul unui instrument FACSCalibur (Becton Dickinson San Jose, CA). Lungimea de undă la care au fost excitați fluoroforii FITC și 7-AAD a fost 488 nm (laser cu argon, 15 mW), iar datele au fost înregistrate cu ajutorul unor filtre de tip bandpass la 530 nm pentru FITC și > 670 nm pentru 7-AAD. La analiza datelor, celulele Annexin V-FITC<sup>-</sup>/7-ADD<sup>-</sup>, Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-ADD<sup>-</sup>, Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-ADD<sup>+</sup> și Annexin V-FITC<sup>-</sup>/7-ADD<sup>+</sup> au fost considerate ca fiind viabile, apoptotice timpurii, apoptotice târzii și necrotice. Experimentele s-au efectuat în triplicat.

### ***Marcarea imunofluorescentă pentru citometria în flux***

Celulele tripsinizate, menținute pentru 24 h în mediu fără ser, au fost incubate pentru alte 24 h în prezența a diferite concentrații de flavonoide (de asemenea, în mediu fără ser). Anticorpii primari anti-ErbB2 (Herceptin-Alexa Fluor 488), ErbB1 (528-Alexa Fluor 488) au fost utilizați la o concentrație de 20 μg/ml. Incubarea cu anticorpii primari marcați fluorescent a avut loc pe gheață, timp de 30 minute, fiind urmată de spălare în PBS rece și fixare cu 4% formaldehidă. Fluorescența de la 20000 de celule s-a măsurat cu ajutorul citometrului în flux FACSCalibur (Becton Dickinson).

### **Fluorescence resonance energy transfer (FRET)**

FRET a fost măsurat cu ajutorul citometrului în flux FACSArray. Anticorpii conjugați direct cu AlexaFluor 546 și AlexaFluor 647 au fost utilizați ca donor și acceptor. Intensitatea fluorescenței donorului, FRET și acceptorului au fost măsurate pentru spectrele de galben, roșu îndepărtat și roșu. Fluorescențele pentru galben și roșu îndepărtat au fost excitate cu 532 nm laser solid și detectate folosind un filtru band-pass de 585/42 nm și un filtru long-pass la 635 nm. Fluorescența pentru spectrul roșu a fost excitată folosind o diodă laser cu emisie de 635 nm, iar detectarea acesteia s-a realizat utilizând un filtru band-pass 661/16 nm. Probele control necesare, calibrarea probelor și principiile de evaluare au fost descrise într-un alt articol (P. Nagy & al. [36]). Datele măsurate în cazul a 20000 de evenimente au fost analizate cu programul ReFlex (G. Szentesi & al. [37]). Eficiența FRET este invers corelată cu puterea a șasea dintre donor și acceptor și este interpretată ca o modalitate de măsurare a asocierii dintre molecule (J. Szollosi & al. [38]).

### **Statistica**

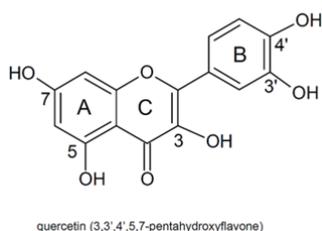
Datele sunt prezentate ca media  $\pm$  e.s.m. pentru trei măsurători independente, dacă nu se specifică altfel. Pentru analiza statistică s-a folosit testul t'Student.

### **Rezultate și discuții**

#### **Obiectiv 1: Studiarea efectelor polifenolilor asupra ciclului celular, apoptozei și viabilității celulare**

#### **Efectul bifazic al quercetinei în liniile celulare tumorale mamare și epidermoide**

Quercetina (Figura 1) a fost administrată celulelor tumorale SK-BR-3 și A-431 în diferite concentrații: 0, 2.5, 10, 20, 40, 80, 160 și 320  $\mu$ M timp de 24 h. Concentrațiile mari de quercetină au avut un efect inhibitor în ambele linii celulare tumorale (Figura 2).

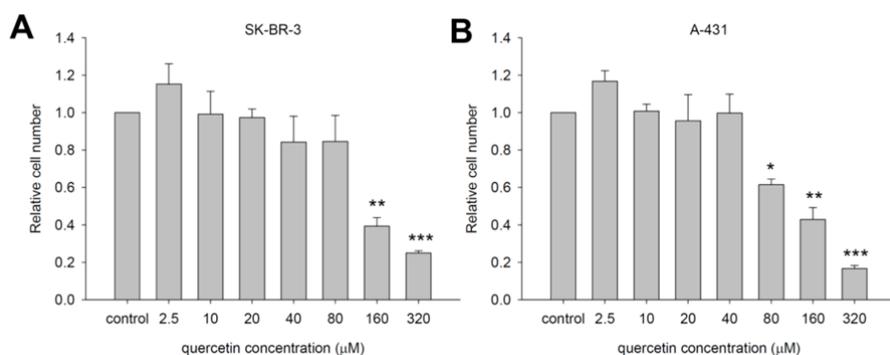


**Figura 1. Structura chimică a quercetinei (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavona).**

La incubarea timp de 24 h în prezența quercetinei, linia celulară A-431 s-a dovedit a fi mai sensibilă la efectul antiproliferativ al acesteia comparativ cu linia celulară SK-BR-3. Pe de altă parte, concentrații de quercetină mai scăzute, în particular de cca. 2.5  $\mu$ M au indus o tendință de creștere a viabilității în celulele tratate, comparativ cu probele control (Figura 2). Viabilitatea celulară a crescut cu 15% și 16% după aplicarea a 2.5  $\mu$ M în linia celulară SK-BR-3 și A-431, respectiv. Datele ar putea sugera un efect bifazic al quercetinei în liniile celulare tumorale SK-BR-3 și A-431.

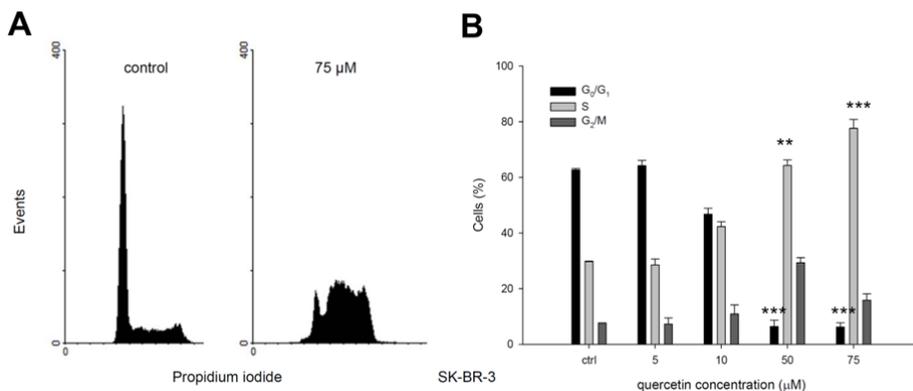
#### **Blocarea fazei S a liniei celulare mamare SK-BR-3 la concentrații ridicate de quercetină**

Pentru a identifica mecanismul responsabil de efectul inhibitor al quercetinei în linia celulară SK-BR-3 am evaluat efectul acesteia asupra conținutului de ADN, măsurat prin citometrie în flux (Figura 3). Pentru a evalua progresia ciclului celular, și anume fazele G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S și G<sub>2</sub>/M, au fost utilizate histogramele înregistrate pentru conținutul de ADN.



**Figura 2. Inhibiția viabilității celulare de către quercetină în celulele de cancer de sân SK-BR-3 (A) și de carcinom epidermoid A-431 (B).** Celulele tumorale au fost incubate cu diferite concentrații de quercetină timp de 24 h și viabilitatea celulară a fost măsurată cu testul WST-1. Datele reprezintă media ± e.m.s. pentru experimente în triplicat. Diferențele semnificative față de control: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

După incubarea cu 50 și 75 mM quercetină numărul de celule SK-BR-3 în faza S s-a mărit cu 64% ( $p < 0.01$ ) și respectiv 78% ( $p < 0.001$ ) în comparație cu 30% în probele control. După cum se observă în Figura 3, efectul a fost dependent de doză. Această creștere a fost însoțită de o scădere semnificativă a populației celulare în faza  $G_0/G_1$ , de la 63% în probele control la 6% pentru 50 și 75 μM quercetină ( $p < 0.001$ ). La concentrații de 10 μM quercetină, blocarea fazei S a fost moderată. Concentrații mici de quercetină (5 μM) nu au dus la modificări semnificative în distribuția ciclului celular al liniei celulare SK-BR-3.



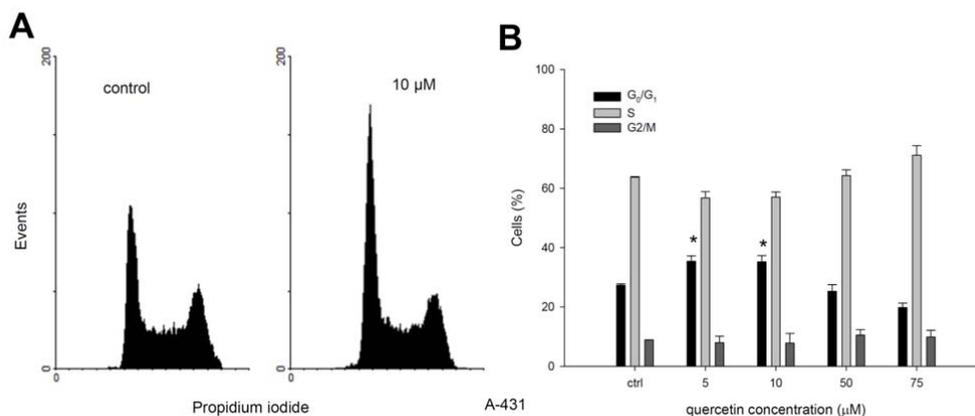
**Figura 3. Efectul quercetinei asupra ciclului celular în cazul liniei tumorale SK-BR-3.** Celulele tumorale, după tratamente cu 0, 5, 10, 50, și 75 μM quercetină, au fost colorate cu iodură de propidiu, și apoi conținutul de ADN a fost analizat prin citometrie în flux. (A) Histograme reprezentative ale distribuției ADN. (B) Media ± DS pentru fazele  $G_0/G_1$ , S, și  $G_2/M$  fără tratament, respectiv cu tratament cu quercetină ( $n = 3$ ); diferențele semnificative față de control: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **Blocarea fazei $G_0/G_1$ a liniei celulare tumorale epidermoide A-431 la concentrații scăzute de quercetină**

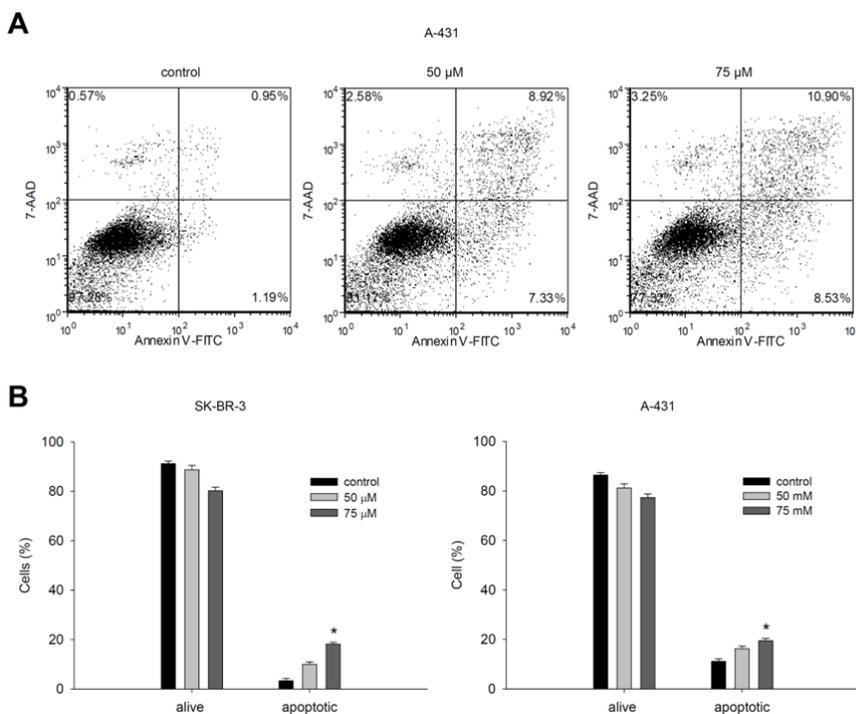
În cazul acestei linii celulare efectul quercetinei a depins de concentrația utilizată (Figura 4). Concentrațiile scăzute de quercetină, în domeniul 5 – 10 μM, au indus blocarea ciclului celular în faza  $G_0/G_1$ . Concentrații mai mari, 50 – 75 μM, au dus la o acumulare moderată a celulelor tumorale în faza S, într-o manieră dependentă de doză. Rezultatele au sugerat din nou un efect al quercetinei bifazic, dependent de doză.

### **Efectul flavonoidelor (quercetină, EGCG, genisteină) asupra apoptozei în liniile celulare SK-BR-3 și A-431**

Pentru investigarea efectului quercetinei asupra apoptozei, liniile celulare SK-BR-3 și A-431 au fost colorate cu Annexin V-FITC și 7-AAD, după care s-au efectuat măsurătorile prin citometrie în flux (Figura 5).



**Figura 4. Efectul quercetinei asupra distribuției ciclului celular în celulele tumorale epidermoide A-431.** Celulele fixate în etanol au fost colorate cu iodură de propidiu și măsurate prin citometrie în flux. (A) Histograme reprezentative pentru celulele tumorale tratate cu 0 și 10 μM quercetină. (B) Datele reprezintă media ± SD ( $n = 3$ ) și asteriscurile indică diferențele semnificative față de probele control,  $*p < 0.05$ .

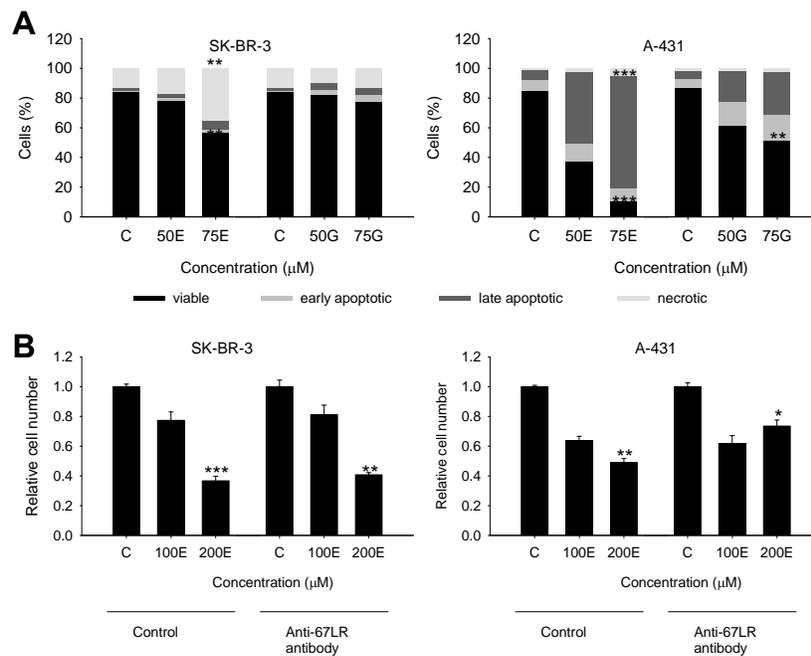


**Figura 5. Efectele quercetinei asupra apoptozei în celulele tumorale SK-BR-3 și A-431.** După tratamentul timp de 72 h cu quercetină, celulele tumorale au fost colorate cu Annexin V-FITC și 7-AAD și măsurate prin citometrie în flux în intervalul de o oră. (A) Diagrame prin puncte, reprezentative pentru celulele A-431. (B) Celulele apoptotice, incluzând atât celulele apoptotice timpurii ( $Ann V^+/7-AAD^-$ ) cât și târzii ( $Ann V^+/7-AAD^+$ ) sunt prezentate comparativ cu celulele vii ( $Ann V^-/7-AAD^-$ ). Datele reprezintă media ± e.m.s. pentru experimentele în triplicat și asteriscurile indică diferențele semnificative față de probele control,  $*p < 0.05$ .

Procentajul de celule apoptotice a fost calculat din suma celulelor apoptotice timpurii (Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) și târzii (Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>). În ambele linii celulare tumorale s-au observat efecte ale quercetinei, moderate și dependente de doză, asupra generării de celule apoptotice. Incubarea cu 75 μM quercetină timp de 72 h a indus o creștere a evenimentelor apoptotice de la 3% la 18% în SK-BR-3 și de la 3% la 19% în A-431. Timpuri de incubare mai reduși (24 h) în prezența quercetinei nu au modificat procentul de celule apoptotice.

Pentru a verifica inducerea morții celulare programate de către EGCG și genisteină, liniile celulare tumorale au fost marcate cu Annexina V-FITC și cu 7-AAD (Figura 6A). După incubarea celulelor tumorale cu 75 μM EGCG cca 80% din celulele tumorale A-431 și cca 40% din celulele tumorale SK-BR-3 au fost încadrate în categoria celulelor apoptotice târzii/necrotice. Genistein a indus apoptoza târzie/necroza în celulele tumorale A-431, dar nu prezentat un efect semnificativ asupra celulelor tumorale SK-BR-3. Aceste experimente sugerează ca linia celulară A-431 este mai sensibilă la efectul citotoxic al EGCG, comparativ cu linia celulară SK-BR-3.

Inhibarea viabilității celulare de către flavonoide (quercetină, EGCG, genisteină) s-ar putea explica cu ajutorul a două mecanisme de acțiune diferite: în primul rând flavonoidele (genisteina și quercetina) pot induce blocarea progresiei ciclului celular într-o manieră dependentă de doză și de linia celulară investigată; în al doilea rând, administrarea unor doze crescute de flavonoide pe o perioadă mai îndelungată de timp conduce la apariția de evenimente apoptotice.



**Figura 6. Inducerea apoptozei târzii/necrozei în liniile celulare tumorale care supereprimă proteinele ErbB.** (A) Liniile celulare SK-BR-3 și A-431 au fost incubate cu 50 și 75 μM EGCG și genisteină pentru 72 h în mediu complet după care au fost marcate cu Annexina V-FITC și 7-AAD pentru măsurătorile apoptotice de citometrie în flux. Coloanele suprapuse indică procentele de celule viabile (Annexin V-FITC<sup>-</sup>/7-ADD<sup>-</sup>), apoptotice timpurii (Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-ADD<sup>-</sup>), apoptotice târzii (Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-ADD<sup>+</sup>) și necrotice (Annexin V-FITC<sup>-</sup>/7-ADD<sup>+</sup>). Pentru măsurătorile de citometrie în flux au fost analizate 10000 evenimente ( $n = 3$ ). (B) Celulele pretratate cu anticorpul anti-67LR pentru 3 h au fost incubate în prezența concentrațiilor indicate de EGCG pentru 24 h. Proliferarea celulară a fost măsurată după îndepărtarea EGCG folosind reactivul WST-1 și măsurători de spectrofotometrie ( $n =$

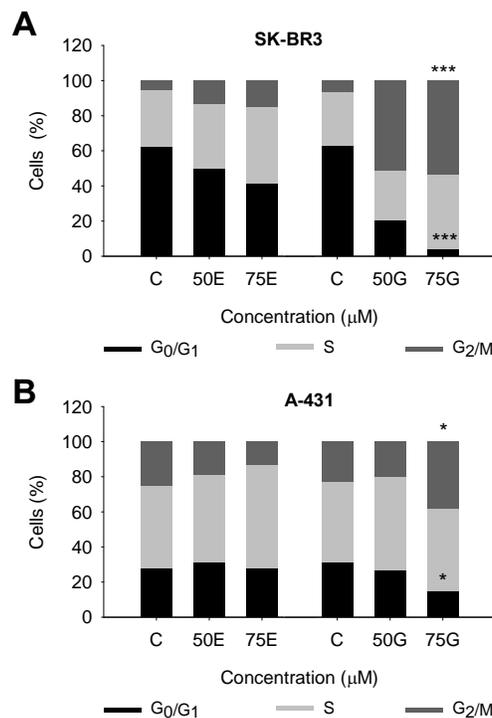
3, media  $\pm$  e.s.m.). Asteriscul indică diferențe semnificative din punct de vedere statistic comparativ cu probele control (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001). E, EGCG; G, genisteina.

### Moartea celulară indusă de EGCG în celulele tumorale este mediată de receptorul pentru laminină, 67LR.

Studii anterioare au raportat că 67LR este un receptor pentru EGCG în celulele tumorale pulmonare A549 (H. Tachibana & al. [39]). Noi am fost interesați să investigăm dacă acest fenomen se confirmă și în celulele tumorale care superexprimă proteinele ErbB. În acest scop celule tumorale au fost incubate inițial cu 20  $\mu$ g/ml anticorp anti-67LR, incubare urmată de menținerea celulelor în prezența EGCG pentru 24 h. Blocarea regiunii extracelulare a receptorului pentru laminină a redus efectul antiproliferativ al EGCG asupra celulelor tumorale SK-BR-3 și A-431 (Figura 6B). Aceste rezultate susțin ipoteza că 67LR este o moleculă implicată în mecanismul de acțiune al EGCG în linile celulare tumorale care superexprimă proteinele ErbB.

### Genisteina produce blocarea ciclului celular în liniile celulare tumorale care superexprimă proteinele ErbB.

Genisteina a fost eficientă în blocarea progresiei ciclului celular în special la concentrații de 50 și 75  $\mu$ M. Celulele tumorale mamare SK-BR-3 au fost blocate în faza G<sub>2</sub>/M după incubarea cu genisteină (Figura 7A), iar această creștere a procentului de celule în faza G<sub>2</sub>/M a fost corelată cu scăderea procentului de celule în faza G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Celulele de carcinom epidermoid A-431 au prezentat un răspuns similar la acțiunea genisteinei ca și celulele tumorale mamare (Figura 7B).



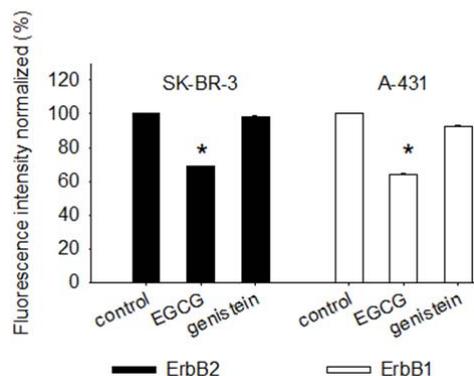
**Figura 7. Analiza ciclului celular în celulele tumorale SK-BR-3 și A-431 tratate cu genisteină.** Celulele tumorale SK-BR-3 (A) și A-431 (B) au fost tratate cu 50 și 75  $\mu$ M EGCG și genisteină pentru 36 h. Distribuția fazelor ciclului celular a fost determinată prin măsurători de citometrie în flux după evaluarea conținutului de ADN marcat cu iodură de propidium (au fost evaluate 10000 evenimente/probă,  $n = 3$ ). Asteriscul reprezintă diferențele semnificative comparative cu probele control (\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001). E, EGCG; G, genistein.

Efectul EGCG asupra progresiei ciclului celular nu a fost la fel pronunțat precum cel al genisteinei, sugerând că genisteina este mult mai eficientă în blocarea ciclului celular decât EGCG. Date contradictorii au fost raportate în legătură cu blocarea ciclului celular în faza  $G_0/G_1$  de către EGCG. În timp ce unele rezultate sugerează un astfel de efect, alte cercetări nu confirmă astfel de efecte (J.F. Sah & al. [40]). Date noastre sunt în acord cu cele care susțin inabilitatea EGCG de a influența semnificativ distribuția fazelor ciclului celular. Pe de altă parte, efectul antiproliferativ al genisteinei pare a se baza aproape exclusiv pe proprietatea acesteia de a bloca progresia ciclului celular în faza  $G_2/M$ . Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultate raportate de alte grupuri de cercetare care au observat că blocarea ciclului celular în faza  $G_2/M$  este corelată cu supexprimarea proteinei p21 și scăderea expresiei ciclului B1; de asemenea, mecanismul molecular de acțiune al genisteinei asupra ciclului celular ar putea implica și interacția acesteia cu microtubuli (S. Mukherjee & al. [41]).

## Obiectiv 2: Investigarea efectului polifenolilor asupra expresiei proteinelor ErbB

### EGCG, dar nu genisteina, induce reducerea expresiei proteinelor ErbB la suprafața celulelor tumorale SK-BR-3 și A-431.

Măsurătorile de citometrie în flux au fost efectuate după incubarea celulelor tumorale pentru 24 h în prezența a 50  $\mu$ M EGCG și genisteină, în absența serului. Linia celulară SK-BR-3 a fost marcată fluorescent pentru ErbB2, iar linia celulară A-431 pentru ErbB1. EGCG a indus scăderea cu 30% a nivelului expresiei proteinelor ErbB1 și ErbB2, în timp ce genisteina nu a afectat în mod semnificativ expresia proteinelor ErbB (Figura 8). Tratamentul celulelor tumorale cu flavonoide în prezența serului nu a modificat semnificativ expresia proteinelor ErbB, sugerând că acest efect a fost amplificat de absența serului.



**Figura 8. EGCG reduce expresia proteinelor ErbB în liniile tumorale mamare și de carcinoma epidermoid. (A)**

Măsurători de citometrie în flux pentru evaluarea nivelului de exprimare a proteinei ErbB1 (linia celulară A-431) și a proteinei ErbB2 (linia celulară SK-BR-3) după tratamentul cu 50  $\mu$ M EGCG și genistein pentru 24 h în mediu fără ser ( $n = 3$ ).

O posibilă explicație a rolului protector al serului împotriva efectului flavonoidelor asupra expresiei proteinelor ErbB în liniile celulare tumorale ar putea fi corelată cu abilitatea unor proteine, de exemplu albumina, de a lega flavonoide (T. Ishii & al. [42]). Este cunoscut faptul că ErbB2 este o proteină rezistentă la procesul de internalizare (A.M. Hommelgaard & al. [43]), iar flavonoide care pot induce internalizarea acesteia pot fi considerate potențiali agenți terapeutici.

## Obiectiv 3: Studiarea efectelor polifenolilor asupra asocierii proteinelor ErbB (interacțiunea dintre proteinele ErbB, $\beta$ 1-integrina, receptorul pentru laminină (67LR); homoasocierea ErbB1, ErbB2)

## Studiul efectului flavonoidelor asupra asocierii proteinelor ErbB la suprafața celulelor tumorale

Celulele tumorale de carcinom epidermoid A-431 au fost marcate fluorescent pentru măsurători FRET cu ajutorul citometriei în flux.

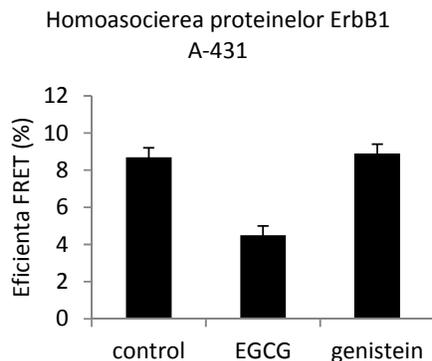


Figura 9: **Homoasocierea proteinelor ErbB1 după tratamentul cu flavonoide.** Celulele A-431 au fost cultivate în absența serului pentru 24 h și incubate cu EGCG și genisteină pentru alte 24 h în mediu complet. Celulele au fost marcate cu anticorpi anti-ErbB1 (Mab528) conjugați cu AlexaFluor 546 sau AlexaFluor 647. Eficiența FRET a fost măsurată folosind citometria în flux.

Astfel proteinele ErbB1 au fost marcate dublu cu anticorpi anti-ErbB1 conjugați cu AlexaFluor 546 și AlexaFluor 647. Eficiența transferului de energie în cazul probei control, celor tratate cu EGCG și cu genisteină au următoarele valori (Figura 9):  $8,7 \pm 0,5$  % (control),  $4,5 \pm 0,3$  (EGCG) și  $8,9 \pm 0,8$  (genisteina).

Se poate observa o tendință de scădere a eficienței transferului de energie după incubarea celulelor tumorale cu EGCG pentru 24 h. În schimb genisteina nu a indus modificări semnificative ale valorii eficienței transferului de energie în cazul homoasocierii proteinelor ErbB1. Tendința de diminuare a eficienței transferului de energie după tratamentele cu EGCG este în concordanță cu datele referitoare la nivelul de expresie al proteinelor ErbB1, astfel doar EGCG, și nu genisteina, influențează homoasocierea proteinelor ErbB1.

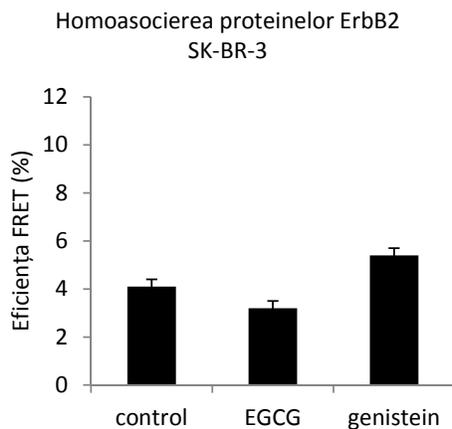


Figura 10: **Homoasocierea proteinelor ErbB2 după tratamentul cu flavonoide.** Celulele SK-BR-3 au fost cultivate în absența serului pentru 24 h și incubate cu EGCG și genisteină pentru alte 24 h în mediu complet. Celulele au fost marcate cu anticorpi anti-ErbB2 (Herceptin) conjugați direct cu AlexaFluor 546 sau AlexaFluor 647. Eficiența FRET a fost măsurată folosind citometria în flux.

În mod similar au fost efectuate măsurători FRET pentru evaluarea asocierii proteinelor ErbB2 la suprafața celulelor tumorale SK-BR-3 (Figura 10). Proteinele ErbB2 au fost dublu marcate cu o combinație de anticorpi anti-ErbB2 conjugați cu AlexaFluor 546 și AlexaFluor 647. Incubarea celulelor tumorale SK-BR-3 cu 50  $\mu$ M EGCG și genisteină nu au condus la modificări semnificative comparativ cu probele control:  $4,1 \pm 0,3$  % (control),  $3,2 \pm 0,4$  (EGCG) și  $5,4 \pm 0,5$  (genisteina).

În linia tumorală A-431 nivelul expresiei proteinelor ErbB1 este în jur de  $1,2 \times 10^6$  receptori/celulă (P. Nagy & al. [44]), iar în linia tumorală SK-BR-3 nivelul de exprimare al proteinelor ErbB2 este de aproximativ  $0,8 \times 10^6$  receptori/celulă (M.M. Mocanu & al. [11]). Cu toate că aceste linii celulare exprimă un număr mare de receptori la suprafața lor, ceea ce ar crea condițiile necesare măsurării homoasocierii proteinelor ErbB, totuși valorile eficienței transferului de energie au fost reduse. Valori crescute ale eficienței transferului de energie se pot măsura cu ușurință în momentul în care se evaluează doi epitopi extracelulari localizați la nivelulul aceleiași molecule, de exemplu ErbB2, în aceste condiții eficiența transferului de energie putând ajunge în jur de 40% (M.M. Mocanu & al. [45]). Date fiind aceste condiții, măsurătorile FRET dintre 67LR și proteinele ErbB sau dintre  $\beta$ 1-integrina și proteinele ErbB nu au mai fost efectuate, ținând cont ca expresia 67LR sau a  $\beta$ 1-integrinei este mult mai redusă decât cea a proteinelor ErbB care sunt superexprimate în celulele tumorale. Aceste măsurători au fost efectuate în colaborare cu Departamentul de Biofizică și Biologie Celulară, Universitatea din Debrecen, Ungaria, grupul de lucru coordonat de Prof. Dr. Janos Szöllösi.

## Concluzii

Studiul de față aduce noi evidențe ce susțin activitatea antiproliferativă a flavonoidelor (quercetina, EGCG, genisteina) în două linii celulare tumorale cu origine epitelială. Luate împreună aceste rezultate sprijină ipoteza noastră centrală privind reducerea viabilității celulare de către flavonoide prin modularea progresiei ciclului celular (quercetina, genisteina) și prin promovarea efectelor pro-apoptotice (EGCG). În studiul de față am arătat că: i) în timp ce EGCG are mai degrabă un efect citotoxic, genisteina și quercetina sunt mult mai eficiente în blocarea progresiei ciclului celular; ii) efectul anti-proliferativ al EGCG este blocat de anticorpi anti-67LR; iii) EGCG, și nu genisteina, produce scăderea expresiei proteinelor ErbB1 și ErbB2 de la nivelul membranei plasmatică. Studii ulterioare vor fi necesare pentru investigarea efectului EGCG sau genisteinei în combinație cu alte molecule terapeutice pentru a evalua impactul antitumoral al acestor flavonoide.

Tehnica FRET se bazează pe principii fizice solide și implică transferul non-radiativ de energie de la o moleculă donor excitată la o moleculă acceptor localizată la o distanță maximă de 2 – 10 nm. De aceea, FRET a mai fost denumită și "riglă spectroscopică" (E.A. Jares-Erijman & al. [33], P. Nagy & al. [36], J. Szollosi & al. [38], L. Stryer [46]). Luând în considerare rezultatele privind modificarea asocierii moleculare în cazul proteinelor ErbB1 și ErbB2 se poate sugera că EGCG determină apariția unei tendințe de reducere a homoasocierii proteinelor ErbB1 la suprafața celulelor tumorale de carcinom epidermoid. Astfel de modificări nu s-au observat în cazul proteinelor ErbB2 sau după tratamente efectuate cu genisteina, ceea ce ne-a determinat să oprim investigarea asocierii proteinelor ErbB cu 67LR sau cu  $\beta$ 1-integrina. Ne propunem să investigăm alte aspecte ale modificării localizării receptorilor membranari în corelație cu asocierea acestora cu regiunile de tip "lipid rafts" din membrana plasmatică.

#### 4. Etapa IV: ianuarie 2013 – octombrie 2014

##### Introducere

Studiul efectului polifenolilor, cu accent pe galatul de epigallocatechină (EGCG) extras din ceaiul verde (*Camellia sinensis*), la nivelul liniilor celulare de adenocarcinom mamar (SK-BR-3) și carcinom epidermoid (A431) a fost continuat în scopul îndeplinirii obiectivelor din planul de realizare a proiectului, respectiv obiectivul 4: investigarea corelației dintre statusul activat al proteinelor ErbB și tratamentele cu polifenoli și obiectivul 5: investigarea efectului polifenolilor asupra căilor de semnalizare ale proteinelor ErbB.

##### Materiale și metode

**Culturi celulare, tratamente cu EGCG și factori de creștere.** Celulele tumorale mamare SK-BR-3 și epidermale A431 au fost crescute până la 60 – 70% confluență în mediul DMEM cu L-glutamină (Sigma) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 unități penicilină/ml și 0.01 mg streptomicină/ml. Culturile celulare au fost menținute la 37 °C în incubator cu atmosferă umedă și CO<sub>2</sub> (5%). Mediul a fost reînnoit la 2 – 3 zile, iar proporția de subcultivare a fost de 1:2 pentru SK-BR-3 și 1:5 pentru A431. Celulele aderente subconfluente au fost tratate cu diferite concentrații de EGCG: 10, 50, 100 și 200 μM (Sigma Aldrich) dizolvată în DMSO (maxim 0,1 %) pentru diferite perioade de timp. Tratamentele cu factori de creștere: factorul de creștere epidermal (EGF) au fost efectuate după pre-tratamentul cu EGCG, fiind folosită o concentrație de 100 ng/ml EGF (Sigma Aldrich), timp de 10 minute, la 37°C.

**Marcarea intracelulară pentru citometria în flux.** Marcarea proteinelor intracelulare a fost realizată după fixare în 3.7% formaldehidă pentru 20 minute la temperatura camerei urmată de permeabilizare cu 0.2% Triton X-100 (proteine citoplasmatică) și 0.1% Triton X-100 (proteine membranare), timp de 15 minute la temperatura camerei. Anticorpilor primari utilizați pentru marcări au fost: pErbB1 (Y1173, Exbio), pErbB1 (Y1068, clona 1H12, Cell Signaling), pErbB2 (Y1428, Ab-18, clona PN2A, ThermoScientific), pAkt(S473)-PE (BD Bioscience), pERK(Y204)-FITC (Santa Cruz), pFAK(S910)-PE (BD Bioscience) și c-fos-PE (Santa Cruz). Anticorpilor secundari: Alexa Fluor 546 (Invitrogen/LifeTechnologies). Celulele au fost incubate pentru 1 oră la 4°C, spălate (10 minute, 1500 rpm) și resuspendate în PBS pentru analiză.

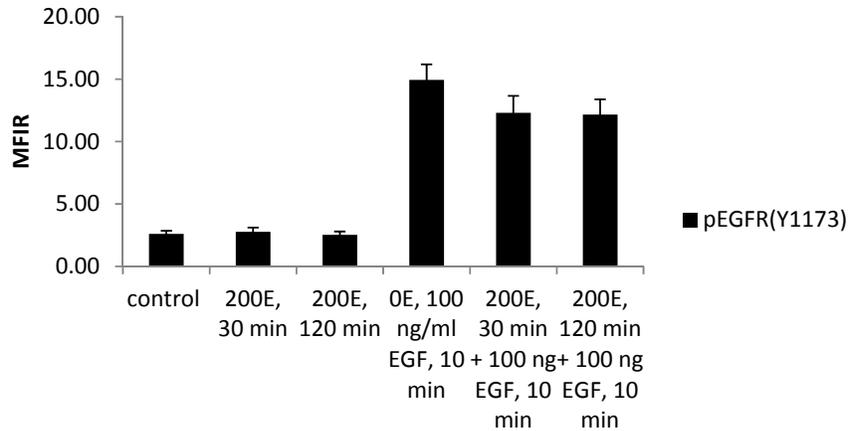
Măsurătorile de citometrie în flux au fost efectuate cu un citometru Beckman Coulter Gallios, excitația fiind la 488 nm (10000 evenimente/probă). Emisia a fost înregistrată cu ajutorul următoarelor filtre: 525/40 nm (FL-1, 525 BP 40) pentru FITC și 575/30 nm (FL-2, 575 BP 30) pentru PE. De asemenea, o parte de măsurători au fost efectuate cu un citometru FACS Array BD Bioscience cu excitație la 532 nm. Emisia a fost înregistrată cu un filtru 585/42 nm bandpass pentru Alexa Fluor 546. Analiza datelor a fost efectuată cu FCS Express și WinMDI 2.9.

##### Rezultate

**Obiectiv 4: Investigarea corelației dintre statusul activat al proteinelor ErbB și tratamentele cu polifenoli.**

Studii recente au confirmat efectul anti-carcinogen al polifenolilor prin modularea fosforilării receptorilor tirozin-kinazici. Rezultate de biochimie moleculară (western blot) au demonstrat blocarea fosforilării EGFR, Akt și mTOR după administrarea a 72 și 256 μM EGCG unei linii celulare de adenocarcinom pulmonar, A-549 pentru 6, 12 și 24 h (J. Relat & al. [47]).

## A-431

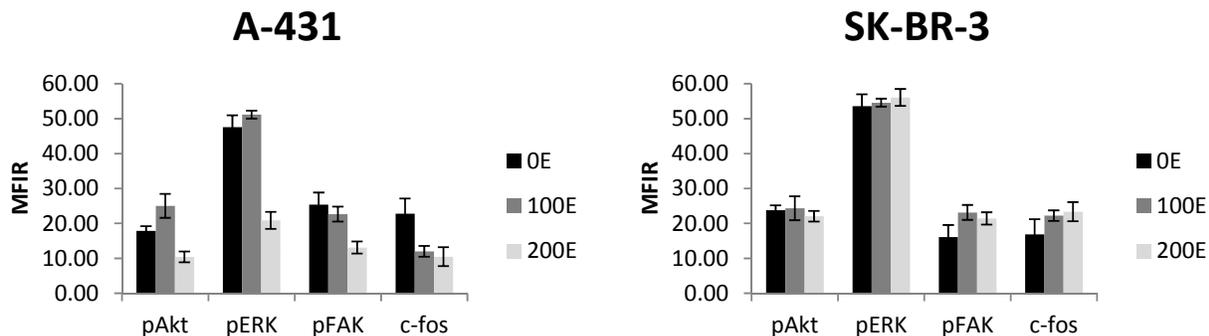


**Figura 1: Efectul EGCG la nivelul situsului de fosforilare Y1173 al EGFR (ErbB1) a fost amplificat în mod semnificativ după stimularea celulelor cu factorul de creștere epidermal (EGF). Variația perioadei de incubare cu EGCG a liniei celulare A-431 de la 30 la 120 minute nu modifică semnificativ efectul EGCG asupra fosforilării EGFR (Y1173).**

Pentru investigarea efectului EGCG asupra activării proteinelor ErbB, acestea au fost marcate cu anticorpi care recunosc situsurile fosforilate ale proteinelor. Astfel receptorul factorului de creștere epidermal (EGFR) a fost marcat pentru situsurile Tyr 1173 și Tyr 1068. Activarea oncoproteinei ErbB2 a fost evaluată cu ajutorul unui anticorp ce recunoaște tirozina fosforilată la nivelul situsului intracelular 1248. Expresia tirozinei fosforilate la nivelul rezidurilor 1173 și 1068 a EGFR a fost investigată prin citometrie în flux și s-a constatat amplificarea fosforilării în urma tratamentelor cu EGF (Figura 1). Varierea perioadei de incubare cu EGCG între 30 și 120 minute nu a modificat rezultate inițiale, ceea ce a determinat continuarea experimentelor cu utilizarea unei perioade de incubare de 30 minute. Doze crescătoare de EGCG au indus reducerea fosforilării intracelulare la nivelul situsurilor Y1173 și Y1068 în mod dependent de doză (Figura 2). Erlotinib, un inhibitor al fosforilării EGFR a fost utilizat cu rol de control negativ. Efectul EGCG a fost investigat și asupra activării ErbB2 (Y1428) utilizându-se doze crescătoare de polifenol, iar ca negativ control a fost utilizat lapatinib, un inhibitor al fosforilării atât a EGFR cât și a ErbB2. Deoarece, oncoproteina ErbB2 este considerată un receptor orfan de ligand, ea existând într-o conformație extinsă ce mimează cuplarea ligandului (N.E. Hynes & al. [30]) nu au fost utilizați factori de creștere pentru investigarea corelării dintre EGCG și factorii de creștere în cazul acesteia. S-a observat că efectul EGCG asupra activării ErbB2 (Y1248) nu a fost semnificativ în cazul incubării în prezența flavonoidului (datele nu sunt prezentate).

### Obiectiv 5: Investigarea efectului polifenolilor asupra căilor de semnalizare ale proteinelor ErbB.

Au fost abordate două modalități de investigare a efectului EGCG asupra fosforilării proteinelor intracelulare din căile de semnalizare ale proteinelor ErbB: i) incubare de scurtă durată (30 minute) și ii) incubare de lungă durată (48 h). Deoarece toți receptorii tirozin-kinazici din familia proteinelor ErbB activează calea de semnalizare a protein kinazelor activate de mitogeni (MAPK) una dintre proteinele de interes a fost kinaza reglată de semnale extracelulare (ERK) (J.W. Park & al. [2]).



**Figura 2: Efectele EGCG asupra căilor de semnalizare la 30 minute, în liniile celulare de carcinom epidermoid A-431 și adenocarcinom mamar SK-BR-3.** EGCG reduce fosforilarea pAkt(S473), pERK(Y204), pFAK(S910), cât și expresia factorul de transcriere nuclear c-fos în mod dependent de doză în linia celulară A-431. Incubarea liniei celulare SK-BR-3 în prezența EGCG pentru 30 minute nu a modificat semnificativ statusul fosforilării proteinelor pAkt(S473), pERK(Y204), pFAK(S910) și nici nu a indus modificări asupra factorului de transcriere c-fos. Ambele linii celulare au fost pre-tratate cu diverse concentrații de EGCG pentru 30 minute în mediu fără ser, după starvarea celulelor în timpul nopții.

Un alt punct nodal al căilor de semnalizare intracelulară a proteinelor ErbB este protein-kinaza B (PKB) sau proteina Akt. Aceasta este o protein kinază ce acționează asupra situsurilor serină/treonină și este implicată în reglarea a diferite funcții celulare, respectiv: apoptoză, supraviețuire sau proliferare; de asemenea este activată în tumorigeneză (Y. Gao & al. [48]).

De interes este și o altă proteină: kinaza de adeziune focală (FAK) aflată la intersecția căilor de semnalizare dintre proteinele ErbB și receptorii pentru matrixul extracelular, integrinele. Activarea ErbB2 induce fosforilarea FAK în tumorigeneză. În celulele normale FAK este implicată în supraviețuire, metabolism și creștere celulară, deleția genei pentru FAK fiind letală (L. Pentassuglia & al. [49]). Totodată a fost investigat efectul EGCG asupra factorului de transcriere nuclear c-fos. Familia factorului de transcriere Fos include mai mulți membri, care împreună cu membrii familiei Jun formează grupul de proteine AP-1 (proteine activatoare-1) implicate în tumorigeneză. AP-1 poate regla gene ce sunt implicate în: proliferare, metastazare, apoptoză, angiogeneză, diferențiere (K. Milde-Langosch [50]). Incubarea de scurtă durată a liniei celulare de carcinom epidermoid A-431 cu 100 și 200  $\mu\text{M}$  EGCG a determinat inhibarea parțială a fosforilării proteinelor intracelulare pAkt(S473), pERK(Y204), pFAK(S910), cât și a expresiei factorului de transcriere nuclear c-fos (Figura 2). Reducerea fosforilării la nivelul proteinelor intracelulare a fost observată ca fiind dependentă de doza administrată. În mod diferit, la nivelul liniei de adenocarcinom mamar SK-BR-3, EGCG nu a indus reducerea fosforilării după o incubare de scurtă durată (Figura 2). Menținerea liniilor celulare A-431 și SK-BR-3 în prezența unei concentrații mai mici de EGCG 50  $\mu\text{M}$ , dar pe o perioadă mai lungă de timp, 48 h în mediu complet a condus la reducerea parțială a semnalului provenit de la fosforilarea proteinelor intracelulare, în cazul ambelor linii investigate.

## Concluzii

Rezultatele obținute demonstrează că efectul galatului de epigallocatechină asupra activării receptorilor tirozin-kinazici din familia proteinelor ErbB2, cât și asupra fosforilării unor proteine cheie din căile de semnalizare ale acestora (pAkt, pERK, pFAK) depinde de tipul de linie celulară investigat, de doza administrată, cât și de perioada în care se aplică tratamentul. Aceste observații susțin efectul anti-carcinogenic al polifenolilor de tip EGCG, iar terapii combinate cu anticorpi monoclonali sau alte molecule cu acțiune anti-tumorală ar putea reprezenta o viitoare posibilă abordare experimentală.

## Bibliografie selectivă

1. Y. YARDEN, M.X. SLIWKOWSKI. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*,**2**(2), 127-137 (2001)
2. J.W. PARK, R.M. NEVE, J. SZOLLOSI, C.C. BENZ. Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer*,**8**(5), 392-401 (2008)
3. T. GELARDI, V. DAMIANO, R. ROSA, R. BIANCO, R. COZZOLINO, G. TORTORA, P. LACCETTI, G. D'ALESSIO, C. DE LORENZO. Two novel human anti-ErbB2 immunoagents are active on trastuzumab-resistant tumours. *British journal of cancer*,**102**(3), 513-519 (2010)
4. M. SHIMIZU, Y. SHIRAKAMI, H. MORIWAKI. Targeting receptor tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechin, EGCG. *International journal of molecular sciences*,**9**(6), 1034-1049 (2008)
5. H. FUJIKI, M. SUGANUMA, K. IMAI, K. NAKACHI. Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer letters*,**188**(1-2), 9-13 (2002)
6. H. TACHIBANA. Green tea polyphenol sensing. *Proceedings of the Japan Academy*,**87**(3), 66-80 (2011)
7. T. KUZUHARA, Y. SEI, K. YAMAGUCHI, M. SUGANUMA, H. FUJIKI. DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins. *The Journal of biological chemistry*,**281**(25), 17446-17456 (2006)
8. M. SHIMIZU, A. DEGUCHI, A.K. JOE, J.F. MCKOY, H. MORIWAKI, I.B. WEINSTEIN. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *Journal of experimental therapeutics & oncology*,**5**(1), 69-78 (2005)
9. M. MASUDA, M. SUZUI, I.B. WEINSTEIN. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin. Cancer. Res.*,**7**(12), 4220-4229 (2001)
10. C.S. YANG, J.D. LAMBERT, J. JU, G. LU, S. SANG. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicology and applied pharmacology*,**224**(3), 265-273 (2007)
11. M.M. MOCANU, Z. FAZEKAS, M. PETRAS, P. NAGY, Z. SEBESTYEN, J. ISOLA, J. TIMAR, J.W. PARK, G. VEREB, J. SZOLLOSI. Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer Lett.*,**227**(3), 201-212 (2005)
12. D. SADAHA, E. WHITLOCK, S.E. KANE. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate inhibits telomerase and induces apoptosis in drug-resistant lung cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*,**360**(1), 233-237 (2007)
13. G.S. KELLY. Quercetin. Monograph. *Altern. Med. Rev.*,**16**(2), 172-194 (2011)
14. F. DAJAS. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J. Ethnopharmacol.*,**143**(2), 383-396 (2012)
15. A.J. VARGAS, R. BURD. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr. Rev.*,**68**(7), 418-428 (2010)
16. L. GIBELLINI, M. PINTI, M. NASI, J.P. MONTAGNA, S. DE BIASI, E. ROAT, L. BERTONCELLI, E.L. COOPER, A. COSSARIZZA. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*,**2011**(ID591365), 1-15 (2011)
17. G. WANG, J.J. WANG, X.L. CHEN, S.M. DU, D.S. LI, Z.J. PEI, H. LAN, L.B. WU. The JAK2/STAT3 and mitochondrial pathways are essential for quercetin nanoliposome-induced C6 glioma cell death. *Cell Death Dis.*,**4e746** (2013)
18. I. BARAN, C. GANEA, A. SCORDINO, F. MUSUMECI, V. BARRESI, S. TUDISCO, S. PRIVITERA, R. GRASSO, D.F. CONDORELLI, I. URSU, V. BARAN, E. KATONA, M.M. MOCANU, M. GULLINO, R. UNGUREANU, M. SURCEL, C. URSACIUC. Effects of menadione, hydrogen peroxide, and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell Biochem. Biophys.*,**58**(3), 169-179 (2010)
19. S.U. MERTENS-TALCOTT, S.S. PERCIVAL. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett.*,**218**(2), 141-151 (2005)
20. J.H. JEONG, J.Y. AN, Y.T. KWON, J.G. RHEE, Y.J. LEE. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J. Cell. Biochem.*,**106**(1), 73-82 (2009)
21. K. BISHAYEE, S. GHOSH, A. MUKHERJEE, R. SADHUKHAN, J. MONDAL, A.R. KHUDA-BUKHSH. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Prolif.*,**46**(2), 153-163 (2013)
22. M. YOSHIDA, M. YAMAMOTO, T. NIKAIDO. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.*,**52**(23), 6676-6681 (1992)
23. H. ZHANG, M. ZHANG, L. YU, Y. ZHAO, N. HE, X. YANG. Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.*,**50**(5), 1589-1599 (2012)
24. M.H. LEE, D.W. HAN, S.H. HYON, J.C. PARK. Apoptosis of human fibrosarcoma HT-1080 cells by epigallocatechin-3-O-gallate via induction of p53 and caspases as well as suppression of Bcl-2 and phosphorylated nuclear factor-kappaB. *Apoptosis*,**16**(1), 75-85 (2010)
25. M. KUMAZOE, K. SUGIHARA, S. TSUKAMOTO, Y. HUANG, Y. TSURUDOME, T. SUZUKI, Y. SUEMASU, N. UEDA, S. YAMASHITA, Y. KIM, K. YAMADA, H. TACHIBANA. 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis. *J. Clin. Invest.*,**123**(2), 787-799 (2013)
26. H.C. HUANG, T.D. WAY, C.L. LIN, J.K. LIN. EGCG stabilizes p27kip1 in E2-stimulated MCF-7 cells through down-regulation of the Skp2 protein. *Endocrinology*,**149**(12), 5972-5983 (2008)
27. C.S. YANG, X. WANG, G. LU, S.C. PICINICH. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat. Rev. Cancer*,**9**(6), 429-439 (2009)
28. S.J. PARK, M.J. KIM, Y.K. KIM, S.M. KIM, J.Y. PARK, H. MYOUNG. Combined cetuximab and genistein treatment shows additive anti-cancer effect on oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.*,**292**(1), 54-63 (2010)
29. M. SHIMIZU, A. DEGUCHI, J.T. LIM, H. MORIWAKI, L. KOPELOVICH, I.B. WEINSTEIN. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin. Cancer. Res.*,**11**(7), 2735-2746 (2005)
30. N.E. HYNES, H.A. LANE. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*,**5**(5), 341-354 (2005)
31. N.E. HYNES, G. MACDONALD. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*,**21**(2), 177-184 (2009)
32. M.P. WILLIAMSON, M.J. SUTCLIFFE. Protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans*,**38**(4), 875-878 (2010)
33. E.A. JARES-EURIJMAN, T.M. JOVIN. FRET imaging. *Nat Biotechnol*,**21**(11), 1387-1395 (2003)
34. E. HAUSTEIN, P. SCHWILLE. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*,**36**151-169 (2007)
35. H. VAN DER WOUDE, A. GLISZCZYNSKA-SWIGLO, K. STRUIJS, A. SMEETS, G.M. ALINK, I.M. RIETJENS. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.*,**200**(1), 41-47 (2003)
36. P. NAGY, G. VEREB, S. DAMJANOVICH, L. MATYUS, J. SZOLLOSI. Measuring FRET in flow cytometry and microscopy. *Curr Protoc Cytom*,**Chapter 12**Unit12 18 (2006)
37. G. SZENTESI, G. HORVATH, I. BORI, G. VAMOSI, J. SZOLLOSI, R. GASPARD, S. DAMJANOVICH, A. JENEI, L. MATYUS. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput Methods Programs Biomed*,**75**(3), 201-211 (2004)
38. J. SZOLLOSI, S. DAMJANOVICH, P. NAGY, G. VEREB, L. MATYUS. Principles of resonance energy transfer. *Curr Protoc Cytom*,**Chapter 1**Unit1 12 (2006)
39. H. TACHIBANA, K. KOGA, Y. FUJIMURA, K. YAMADA. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat. Struct. Mol. Biol.*,**11**(4), 380-381 (2004)
40. J.F. SAH, S. BALASUBRAMANIAN, R.L. ECKERT, E.A. RORKE. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J. Biol. Chem.*,**279**(13), 12755-12762 (2004)
41. S. MUKHERJEE, B.R. ACHARYA, B. BHATTACHARYYA, G. CHAKRABARTI. Genistein arrests cell cycle progression of A549 cells at the G(2)/M phase and depolymerizes interphase microtubules through binding to a unique site of tubulin. *Biochemistry*,**49**(8), 1702-1712 (2010)
42. T. ISHII, K. MINODA, M.J. BAE, T. MORI, Y. UEKUSA, T. ICHIKAWA, Y. AIHARA, T. FURUTA, T. WAKIMOTO, T. KAN, T. NAKAYAMA. Binding affinity of tea catechins for HSA: characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column. *Mol. Nutr. Food Res.*,**54**(6), 816-822 (2010)
43. A.M. HOMMELGAARD, M. LERDRUP, B. VAN DEURS. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol. Biol. Cell*,**15**(4), 1557-1567 (2004)
44. P. NAGY, J. CLAUD, T.M. JOVIN, D.J. ARNDT-JOVIN. Distribution of resting and ligand-bound ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases in living cells using normal and brightness analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,**107**(38), 16524-16529 (2010)

45. M.M. MOCANU, T. VARADI, J. SZOLLOSI, P. NAGY. Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA). *Proteomics*,**11**(10), 2063-2070 (2011)
46. L. STRYER. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*,**47**819-846 (1978)
47. J. RELAT, A. BLANCAFORT, G. OLIVERAS, S. CUFI, D. HARO, P.F. MARRERO, T. PUIG. Different fatty acid metabolism effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate and C75 in adenocarcinoma lung cancer. *BMC Cancer*,**12**280 (2012)
48. Y. GAO, A. MOTEN, H.K. LIN. Akt: a new activation mechanism. *Cell Res*,**24**(7), 785-786 (2014)
49. L. PENTASSUGLIA, D.B. SAWYER. ErbB/integrin signaling interactions in regulation of myocardial cell-cell and cell-matrix interactions. *Biochim Biophys Acta*,**1833**(4), 909-916 (2013)
50. K. MILDE-LANGOSCH. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer*,**41**(16), 2449-2461 (2005)

## Diseminarea rezultatelor 2011 - 2014

### Articole ISI

1. Mocanu Maria-Magdalena, Surcel Mihaela, Ursaciuc Cornel, Katona Eva, Ganea Constanta, Antiproliferative effect of quercetin in mammary and epidermoid cancer, Romanian Biotechnological Letters, 2013, IF: 0.363 (sc: 0.115)
2. M.M. Mocanu, C. Ganea, L. Georgescu, T. Varadi, D. Shrestha, I. Baran, E. Katona, P. Nagy, J. Szöllősi, Epigallocatechin-gallate determines ErbB proteins downregulation, cell death mediated by 67kDa laminin receptor and altered lipid order in mammary and epidermoid carcinoma cells, J. Nat. Prod., 2014, IF: 3.285 (sc: 1.588)
3. Mocanu MM, Ganea C, Siposova K, Filippi A, Demjen E, Marek J, Bednarikova Z, Antosova A, Baran I, Gazova Z, Polymorphism of HEW lysozyme amyloid fibrils influences the cytotoxicity in LLC-PK1 epithelial kidney cells, International Journal of Biological Macromolecules, 2014, IF: 2.596 (sc: 0.652)
4. M.M. Mocanu, T. Picot, P. Nagy, J. Szöllősi, L. Campos, C. Ganea, Epigallocatechin-3-O-gallate attenuates phosphorylation of ErbB proteins pathways and inhibits migration of cancer cells, 2014, manuscris trimis spre publicare

### Participări la Conferințe Naționale și Internaționale

1. Gazova Z., Siposova K., Koneracka M., Zavisova V., Kopcansky P., Filippi A., Ganea C., Baran I., Mocanu M.M., Magnetic fluids attenuate the cytotoxic effect of amyloid fibrils, poster, 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, September 4th - 9th, 2012, Sevilla, Spania
2. M.M. Mocanu, C. Ganea, I. Baran, E. Katona, C. Ursaciuc, M. Surcel, P. Nagy, J. Szöllősi, Polyphenolic compounds induce the blockage of the cell cycle progression on tumor cell lines overexpressing ErbBs proteins, poster, ISAC XXVII International Congress, June 23 – 27, 2012, Leipzig, Germany
3. M. M. Mocanu, K. Siposova, M. Muckova, J. Lazova, C. Ganea, I. Baran, Z. Gazova, Magnetic fluid reverses inhibition of cell growing caused by protein amyloid fibrils, 9th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, May 22-26, 2012, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
4. M. M. Mocanu, K. Siposova, C. Ganea, I. Baran, A. Antosova, Z. Gazova, Protective role of nanoparticles against cytotoxic effect induced by amyloid fibrils, XXIII Biochemical Congress, August 26-29, 2012, Brno, Czech Republic

5. Filippi A., K. Siposova, A. Nedelcu, C. Ursaciuc, M. Surcel, A. Antosova, Z. Gazova, M.M. Mocanu, Lysozyme amyloid fibrils induce apoptosis on LLC-PK1 cells, poster, 8th National Citometry Congress, May 10 – 11, 2012, Bucharest, Romania
6. Mocanu MM, Nagy P, Georgescu L, Varadi T, Shrestha D, Baran I, Katona E, Szollosi J, Ganea C, The effect of flavonoids in mammary and epidermoid tumor cells with ErbB proteins overexpression, oral communication, 8th International Conference "Structure and Stability of Biomacromolecules" (SSB 2013), September 10-13, 2013, Kosice, Slovakia
7. Mocanu MM, Ganea C, Siposova K, Filippi A, Radu E, Demjen E, Marek J, Bednarikova Z, Antosova A, Gazova Z, Distinct fibrils morphology induces different cytotoxicity in renal cells 8th International Conference "Structure and Stability of Biomacromolecules" (SSB 2013), September 10-13, 2013, Kosice, Slovakia
8. Gazova Z, Siposova K, Filippi A, Demjen E, Marek J, Ganea C, Mocanu MM, Polymorphism of lysozyme amyloid fibrils and cell viability, poster, 9th European Biophysics Congress (EBSA2013), July 13-17, 2013 Lisbon, Portugal
9. M.M. Mocanu, E. Katona, M. Surcel, L. Georgescu, T. Varadi, I. Baran, P. Nagy, C. Ursaciuc, J. Szöllősi, C. Ganea, Effect of flavonoids on cell cycle and apoptosis in tumor cell lines overexpressing ErbB proteins, oral communication, 9th National Congress of Cytometry, May 16-18, 2013, Bucharest, Romania
10. Z. Gazova, K. Sipošova, M. Koneracka, V. Zavisova, A. Filippi, D. Ionescu, P. Kopcansky and M.M. Mocanu, Anti-amyloid effect of magnetic fluid in vitro and in cells, poster, 13th International Conference on Magnetic Fluid, January 7-11, 2013, New Dehli, India
11. M.M. Mocanu, T. Picot, E. Radu, I. Baran, E. Katona, P. Nagy, J. Szöllősi, L. Campos, C. Ganea, Modulation of cell motility and signaling pathways of ErbB proteins in tumor cell lines by epigallocatechin-3-O-gallate, poster, FEBS EMBO 2014 Conference, Paris August 30 – September 4, 2014, FEBS Journal 281 (Suppl. 1) 65–784 (IF: 3.986)
12. M.M. Mocanu, T. Picot, E. Radu, M.M. Iordache, C.M. Aanei, C. Ganea, L. Campos, Signaling pathways in cancer cells, oral communication, 10th National Congress of Cytometry, May 21-24, 2014, Bucharest, Romania; cartea de rezumate, pg. 15-17.
13. M.M. Mocanu, C. Ganea, K. Siposova, E. Demjen, J. Marek, Z. Bednarikova, M.M. Iordache, T. Savopol, A. Antosova, Z. Gazova, Differential cytotoxic effect in response to polymorphism of amyloid fibrils, IUPAB, August 3 – 7, 2014, Brisbane, Australia

**Pagina web a proiectului:**

<http://biofizica-umfcd.ro/research/te-111/index.html>

Director proiect,

Dr. Maria-Magdalena Mocanu

-----