

Descriere proiect

Proiectul „*Studii la nivel celular și molecular privind activitățile biologice ale curcuminei în vederea evaluării potențialului terapeutic*” are ca **obiectiv general** un studiu complex, la nivel celular și molecular, pe linii celulare tumorale din carcinomul mamar (MDA-MB-231 și MDA-MB-435) privind activitățile biologice ale curcuminei (**CM**) în vederea evaluării potențialului său terapeutic. **CM** [diferuloilmetan; 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-dionă], un precursor al curcuminoidelor, derivat din rizomul unei plante medicinale, *Curcuma longa*, exercită proprietăți anti-inflamatorii, anti-oxidante și anti-tumorale. În prezent, există o bogată literatură care sugerează că acest produs natural are un potențial în prevenirea și tratarea cancerului dar bazele celulare și moleculare ale acțiunii sale sunt incomplet elucidate.

La nivel național, singura instituție care a efectuat cercetări în domeniul proiectului este Universitatea din București. Proiectul are la bază *formarea unui consorțiu* reprezentat de o universitate (*Universitatea din București*), două institute de cercetare (*Institutul de Virusologie „Șt. S. Nicolau”* și *Institutul Oncologic „Prof. Dr. Alex. Trestoreranu”*) și o instituție de cercetare privată (*SC Natural Research SRL, Craiova*). Contractul va avea un impact vizibil asupra calității cercetării fiecărui partener, pregătind resursa umană (în special prin Programele de Master și Doctorat) pentru piața muncii din România.

În acest context, studiul prezent are în vedere activitatea biologică și potențiala implicare a **CM** în terapia cancerului prin realizarea unor studii *in vitro* pe celule mamare tumorale cu grade diferite de malignitate MDA-MB-231 < MDA-MB-435. De asemenea, ne propunem să evidențiem efectul citoprotector sau citotoxic al **CM** față de alterările la nivel celular și molecular produse de speciile reactive de oxigen (SRO) și efectul său asupra eficienței anti-tumorale a unui medicament utilizat în chimioterapie – adriamicina.

Colectivele de cercetători și specialiști care formează consorțiul pentru realizarea acestui contract fac parte din unități cu preocupări în domeniu. Potențialii utilizatori ai rezultatelor obținute sunt unitățile sanitare și producătorii de extracte vegetale și medicamente.

Pentru realizarea acestui proiect complex se vor face cercetări privind:

1. fenotipul celulelor tumorale mamare MDA-MB-231 și MDA-MB-435 prin studiul factorilor transcripționali AP1 și NFκB și al rolului lor în modularea expresiei metaloproteinazelor matriceale (MMP) și potențialului invaziv;
2. evaluarea *in vitro* a potențialului citotoxic al **CM**;
3. influența **CM** asupra expresiei și sintezei proteice a MMP;
4. evidențierea efectului citoprotector sau citotoxic al **CM** față de alterările la nivel celular și molecular produse de SRO;
5. stabilirea efectului **CM** asupra eficienței anti-tumorale a adriamicinei.

Obiectivele măsurabile finale ale contractului sunt: dobândirea de noi cunoștințe privind efectul **CM** asupra celulelor tumorale, ceea ce ar putea conduce la utilizarea ei în prevenirea și/sau tratamentul cancerului; consolidarea colaborării și lărgirea unor parteneriate specializate în domeniu și atragerea pe parcursul proiectului și a altor colective cu preocupări similare; diseminarea cunoștințelor, informarea reciprocă și contacte cu parteneri interni și externi cu preocupări științifice similare sau complementare, în vederea unor participări viitoare comune la proiecte internaționale.

Prin multitudinea obiectivelor propuse și complexitatea tehnicilor folosite, prezentul contract se caracterizează printr-o abordare nouă a activității biologice manifestată de **CM**. Studiile vor fi realizate pe linii celulare de carcinom uman mamar-MDA-MB-231 și MDA-MB-435. Aceste linii sunt utilizate în mod regulat în studiile privind cancerul mamar fiind bine caracterizate în ceea ce privește creșterea, invazivitatea și caracteristicile metastazice. Se vor realiza tratamente ale liniilor celulare luate în studiu cu o doză unică (25 μM) de **CM**, cunoscut fiind că dozele pentru care s-au obținut efecte maxime pe alte linii celulare se încadrează în domeniul 20 μM - 50 μM și că această doză este echivalentul concentrației

fiziologice care poate fi atinsă *in vivo*. Evoluția celulelor în cultură va fi monitorizată prin observare directă în microscopia în contrast de fază.

În **etapa I** s-au fundamentat științific direcțiile de cercetare ale proiectului și s-au întreprins **studii in vitro, pe liniile celulare tumorale mamare privind influența CM asupra reglării expresiei MMP de către factorii transcripționali AP-1 și NFκB.**

MMP sunt Zn-endopeptidaze, înrudite din punct de vedere structural și funcțional, capabile să degradeze componentele structurale ale matricei extracelulare (MEC) (colagene, proteoglicani, laminină, fibronectină etc.) atât *in vitro* cât și *in vivo*. Una din etapele principale ale progresiei tumorale este transformarea celulei dintr-un fenotip non-invaziv într-unul invaziv. În timpul acestui proces este esențial pentru celulele tumorale să distrugă membrana bazală subcelulară și apoi MEC. Mai mult, pentru a se ajunge la răspândire sistemică, matricea vaselor sanguine și limfatice trebuie degradată pentru ca celulele tumorale să aibă acces la circulația sanguină și limfatică. Aceasta cascadă complexă de evenimente este imposibilă fără activarea căilor proteolitice. Publicații pe sisteme model de linii celulare de carcinom mamar arată că există o asociere între producția de MMP și comportamentul biologic al celulelor. Aceleași surse susțin că o creștere semnificativă în cantitatea de MMP sintetizate este corelată cu creșterea invazivității și a potențialului metastazic.

TIMP (inhibitorii tisulari endogeni ai MMP) sunt capabili de a lega MMP, blocând astfel activitatea lor proteolitică. Câteva studii indică că reducerea concentrației TIMP coincide cu tumorigeneza crescută, ceea ce sugerează un rol biologic direct al TIMP asupra celulelor tumorale. Pentru a stabili manifestarea unui posibil dezechilibru între expresia MMP și inhibitorilor săi endogeni, noi ne-am propus să studiem și expresia TIMP în experimentele de modulare ale factorilor de transcripție.

Stimulii extracelulari induc expresia mai multor MMP prin căi de semnalizare, în principal mediate de către factorii de transcripție **NFκB** și **AP-1**. Acești stimuli activează factorul de transcripție nuclear AP-1 (complex format din familiile de proteine Fos, Jun și factori înrudiți), care se leagă la motivul *cis*-AP-1 din promotorul genelor MMP și determină transcrierea genelor corespunzătoare.

Altă cale majoră de semnalizare, indusă de citokine, implică translocarea factorului nuclear -κB (NFκB) din citoplasmă în nucleu. După legarea unor citokine la receptorii lor, factorul de creștere transformant β devine activ, conduce la activarea kinazei inductoare a NFκB (NIK), aceasta fiind responsabilă de fosforilarea și activarea kinazei inhibitorului κB (IKKs), care apoi fosforilează subunitatea IκB. După fosforilare, proteina IκB devine ubiquitinată și ținta pentru degradarea mediată de proteazom. Dimerii p50/p65 liberi de IκB se translochează în nucleu și transactivează mai multe gene, inclusiv acelea pentru MMP.

Evaluarea potențialului citotoxic al CM s-a realizat prin testul de proliferare celulară cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT) și prin testul de citotoxicitate, de monitorizare a eliberării în mediul de cultură a lactat dehidrogenazei (LDH).

Rolul factorilor transcripționali NFκB și AP1 asupra reglării expresiei și activității MMP în celulele tumorale a fost urmărit prin modularea expresiei componentelor AP-1: c-Jun și c-Fos (supra-exprimare și *silencing*) și prin studii de inhibare (*silencing*) pentru subunitatea p65 a factorului transcripțional NFκB, urmate de determinări ale expresiei genice (prin RT-PCR). Studiile de **supra-exprimare a proteinelor c-Jun și c-Fos** au fost realizate prin tehnici de transfecție celulară cu vectori de expresie a proteinelor țintă. Studiile de inhibare (*silencing*) au fost realizate prin tehnici de transfecție celulară cu molecule sintetice dublu catenare de ARN (ARNsi), care interferează în procesele de transcriere pentru proteinele țintă și implicit scad expresia lor proteică. Efectele acestor modulări moleculare au fost determinate prin prisma influenței acestora asupra potențialului invaziv (*studii de chemotaxie*) și asupra **expresiei și activității MMP** (*western-blot* și *zimografie*).

În vederea **evaluării potențialului invaziv** al celulelor luate în studiu s-a investigat capacitatea lor de a migra printr-o membrană bazală reconstituită. Suspensia celulară s-a aplicat pe un filtru (membrană) captușit cu collagen tip IV sau cu o soluție de Matrigel, sub acest filtru existând o soluție ce conține chemoattractant, totul într-o cameră Boyden.

Celulele cu capacitate migratoare, respectiv invazivă, au trecut prin acest filtru au fost colorate și numărate, raportându-le la control (fără chemoattractant-control negativ; fără tratament cu **CM**- control pozitiv).

Studiile întreprinse în cadrul etapei I au evidențiat că: activitățile factorilor transcripționali AP-1 și NFκB cresc odată cu scăderea densității celulare, ceea ce conduce la activități proteolitice MMP crescute; supra-exprimarea și inhibarea proteinelor complexului AP-1 au efecte complementare astfel încât supra-exprimarea factorului AP-1 induce expresia MMP și inhibă pe cea a inhibitorilor TIMP iar *silencing* anti-cJun exercită efecte opuse; transfecția cu vectorul de expresie c-fos a determinat o inducție semnificativă a invazivității celulelor MDA-MB-231 și MDA-MB-435 dar cu o mai mică amploare comparativ cu efectele induse de c-jun. Curcumina exercită efecte citotoxice, de inhibare a expresiei și activității MMP și a capacității invazive a celulelor tumorale.

Etapa II se va referi la **cercetarea rolului CM în manifestarea fenotipurilor apoptotic și proliferativ de către liniile celulare tumorale mamare luate în studiu.**

Activitățile avute în vedere sunt următoarele:

- Activitatea II.1:* Influența CM asupra potențialului apoptotic al celulelor tumorale mamare;
- Activitatea II.2:* Efectul CM asupra expresiei markerilor apoptotici (Bcl-2, Bax), determinat la nivel mRNA și al proteinelor codificate;
- Activitatea II.3:* Influența CM asupra activității caspazei 3 manifestată de celulele mamare tumorale;
- Activitatea II.4:* Modularea expresiei și sintezei proteice a p53 de către CM;
- Activitatea II.5:* Influența CM asupra potențialului proliferativ al celulelor tumorale mamare;
- Activitatea II.6:* Rolul curcuminei în modularea funcționalității factorilor transcripționali NFκB și AP1;
- Activitatea II.7:* Rolul CM asupra expresiei și activității MMP prin inhibarea (silencing) proteinei p65;
- Activitatea II.8:* Influența CM asupra fosforilării subunității IκB a factorului transcripțional NFκB în prezența sau absența TNFα

În **etapa III** se va testa **efectul CM asupra răspunsului celular la stresul oxidativ indus în liniile celulare tumorale mamare prin tratament cu H₂O₂**. Parametri urmăriți vor fi statusul oxidativ al celulelor, expresia și activitatea proteinei p53, expresia genelor care codifică proteinele AMPK, LKB1, TSC2, mTOR și S6K1 și prezența formelor fosforilate/nefosforilate ale acestora, potențialul apoptotic (inclusiv markerii apoptotici Bax și Bcl-2, caspaza-3) și potențialul proliferativ (ciclul celular, markerii de proliferare PCNA și Ki67).

Activitățile întreprinse vor fi:

- Activitatea III.1:* Realizarea de variante experimentale de inducere a stresului oxidativ prin tratament cu H₂O₂;
- Activitatea III.2:* Investigarea citotoxicității tratamentelor aplicate;
- Activitatea III.3:* Modalități de evaluare a statusului oxidativ celular;
- Activitatea III.4:* Determinarea mutațiilor la nivelul genei p53 în liniile celulare luate în studiu;
- Activitatea III.5:* Efectul tratamentelor asupra expresiei și activității proteinei p53;
- Activitatea III.6:* Stabilirea rolului CM în mecanismele de semnalizare celulară;
- Activitatea III.7:* Implicarea curcuminei în apoptoza indusă prin stres oxidativ;
- Activitatea III.8:* Determinarea influenței CM asupra potențialului proliferativ al celulelor tratate și netratate;
- Activitatea III.9:* Evaluarea caracterului celular invaziv prin determinarea profilului MMP și a potențialului migrator.

Etapa IV va cuprinde **evaluarea beneficiului utilizării CM ca adjuvant în chimioterapie** (tratament cu adriamicină). Parametri urmăriți vor fi aceeași cu cei menționați anterior iar activitățile ce vor fi efectuate sunt:

- Activitatea IV.1:* Realizarea variantelor de tratament asociat adriamicina – curcumina;
- Activitatea IV.2:* Investigarea citotoxicității tratamentelor aplicate;
- Activitatea IV.3:* Modificarea statusului oxidativ celular sub influența tratamentului aplicat;

- Activitatea IV.4:* Efectul tratamentelor asupra expresiei și activității proteinei p53;
Activitatea IV.5: Stabilirea rolului curcuminei în mecanismele de semnalizare celulară;
Activitatea IV.6: Implicarea curcuminei în apoptoza indusă prin chimioterapie;
Activitatea IV.7: Determinarea influenței CM asupra potențialului proliferativ al celulelor tratate cu adriamicină-curcumină;
Activitatea IV.8: Evaluarea caracterului celular invaziv prin determinarea profilului MMP și a potențialului migrator.

Mecanismele care supresează tumorigeneza implică adesea modularea căilor de transducție a semnalelor conducând la alterări în expresia genică, oprirea progresiei ciclului celular sau apoptoza. Mai multe studii au demonstrat că apoptoza poate fi implicată în moartea celulară indusă de agenți chimioterapeutici ca cisplatin, camptotecin, etopozide etc. Există tot mai multe dovezi că eficiența agenților anti-tumorali este legată de proprietatea intrinsecă a celulelor tumorale țintă de a răspunde la acești agenți prin apoptoză. Studii recente arată că supresia apoptozei de către agenți pro-tumorali în celule pre-neoplazice pare să fie un mecanism important în promovarea tumorală.

În scopul evidențierii evenimentelor apoptotice în celulele tratate se vor utiliza: metoda **citometriei în flux** și analiza aspectului morfologic celular prin **microscopie de fluorescență**. **Evaluarea apoptozei târzii** se va realiza prin tehnica colorării cu iodură de propidiu (IP) și citometrie în flux. De asemenea se va folosi **tehnica colorării cu anexină V**.

Supresorul tumoral p53 este important în etiologia cancerului și poate suferi, mutații, deleții sau rearanjări genice în mai mult de jumătate din toate tumorile umane. P53 mediază fie apoptoza fie oprirea ciclului celular ca răspuns la alterarea ADN, acționând ca „gardian molecular” al genomului, fiecare dintre acestea funcționând într-un context diferit. Analiza expresiei genei p53 la nivel mRNA se va face prin **RT-PCR**. Expresia proteinelor p53 și evidențierea formei active se va realiza prin **Western Blotting** folosind anticorpi care recunosc forma fosforilată a proteinei sau proteina fosforilată la nivelul restului de serină din poziția 15.

De asemenea, s-a demonstrat că proteina Bax, componenta pro-apoptotică a familiei Bcl-2 este țintă a p53 și este activată în o serie de sisteme în timpul apoptozei mediate de către p53. Pe de altă parte, au fost evidențiate stimularea expresiei Bax și inhibarea Bcl-2 în timpul apoptozei. Observații relativ recente au arătat că nu numai calea de semnalizare p53 ce implică activarea proteinei Bax în apoptoză dar și modificarea raportului dintre expresia Bcl-xL (component pro-proliferativ al familiei Bcl-2) și a proteinei Bax îndeplinesc un rol important ca factor de decizie a evoluției celulei. Totuși, rolul **CM** în reglarea echilibrului dintre acești factori pro- și anti-apoptotici nu a fost demonstrat. În consecință, noi ne propunem să evidențiem **rolul proteinelor Bax și Bcl-2 în apoptoza celulelor tumorale mamare** MDA-MB-231 și MDA-MB-435, indusă de **CM**, prin metode de Western blot și RT-PCR. Aceste studii multi-markeri ale căilor apoptotice pot fi utile pentru individualizarea strategiilor terapeutice în viitor.

Un alt marker al procesului apoptotic este reprezentat de **caspaze** (cysteinyll aspartate-specific proteinases) ce îndeplinesc un rol central în reglarea inflamațiilor cât și apoptozei. Ele sunt exprimate ca pro-enzime inactive și participă într-o cascadă declanșată ca răspuns la semnale pro-apoptotice. Până în prezent au fost implicate în calea apoptotică umană 14 caspaze. Deși majoritatea caspazelor sunt situate în citoplasmă, anumiți membri pot fi găsiți în aparatul Golgi (CP12) sau în asociere cu mitocondriile (CP2, CP3 și CP9). Noi ne propunem **evidențierea printr-un studiu ELISA a caspazei 3** deoarece este considerată efectatorul proteazic major.

În cadrul studiilor întreprinse de către grupul nostru se va avea în vedere și **capacitatea proliferativă** a celulelor tratate cu **CM**, supuse stresului oxidativ prin tratament cu H₂O₂ și tratamentului cu adriamicină. Astfel, se vor realiza **studii de citometrie în flux pentru determinarea ciclului celular** precum și de **evidențiere a exprimării markerilor de proliferare (PCNA și Ki67)**. Factorul de proliferare nucleară – PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), denumit și proteina auxiliară a ADN polimerazei delta este o proteină

nucleară de 36 kDa, sintetizată în principal în faza S a ciclului celular, a cărei rată de sinteză se corelează cu statusul proliferativ al celulelor în cultură. Acest antigen este absent sau prezent în cantități foarte mici în celulele nepliferative și reprezintă o componentă centrală ce intervine în replicarea ADN și diviziunea celulară. Antigenul Ki67 este o proteină non-histonice cu localizare în matricea nucleară ce se exprimă în celulele ce se divid activ.

Realizarea de variante experimentale de inducere a stresului oxidativ prin tratament cu H₂O₂. Celulele tumorale mamare vor fi tratate cu 10-500 μM H₂O₂ administrat ca agent unic sau în asociere cu **CM**. În cazul tratamentelor asociate, administrarea celor doi agenți se va face atât concomitent, cât și secvențial, celulele fiind pre-tratate cu **CM**, iar apoi transferate într-un mediu conținând H₂O₂. În vederea determinării statusului oxidativ celular se vor doza **SRO, glutatiunul total și redus** precum și **activitatea enzimatică a glutatiun peroxidazei**.

Este cunoscut faptul că H₂O₂ modifică raportul celular AMP/ATP. AMP se leagă la AMPK determinând modificarea conformațională a heterotrimerului, fapt care favorizează activarea kinazei de către un complex proteic în alcătuirea căruia intră proteina p53 activată și kinaza LKB1/ST11. Expresia proteinei p53 și absența mutațiilor genice care să-i afecteze situsurile de fosforilare condiționează formarea complexului proteic. Activarea AMPK determină, pe de o parte stimularea sintezei de ATP, pe de altă parte fosforilarea TSC2. Activarea TSC2 conduce la inhibarea mTOR (mammalian target of rapamycin) și prin aceasta, la inhibarea sintezei proteice și, posibil, a proliferării celulare. Astfel, se poate presupune că administrarea de **CM** prin efectele exercitate asupra proteinei p53, ar putea inhiba sau stimula activarea căii de semnalizare AMPK→TSC2→mTOR, favorizând continuarea sau încetarea sintezei proteice și a proliferării celulare în condițiile existenței unui dezechilibru celular în raportul AMP/ATP.

Tehnica **RT-PCR** va fi utilizată pentru **studiul expresiei genelor care codifică proteinele AMPK, LKB1, TSC2, mTOR și S6K1**, în timp ce evidențierea prin **Western blotting** a formelor proteice nefosforilate/fosforilate va oferi informații cu privire la nivelul activității kinazice. Determinările se vor efectua pe celule netratate sau supuse tratamentelor prezentate anterior.

Gradul de originalitate și complexitate ridicat al proiectului implică utilizarea de **tehnic și metodologii specifice de cercetare științifică** la un nivel ridicat de performanță. Pentru cercetările experimentale se vor utiliza echipamente și aparatură de înaltă acuratețe și sensibilitate, capabile să asigure reproductibilitatea rezultatelor. Creșterea stării de sănătate a populației se înscrie în politica națională cât și europeană. Prin natura lui, proiectul este complex și de mare importanță teoretică și practică în prevenirea și/sau tratarea cancerului.

Prin antrenarea unor tineri absolvenți se va realiza creșterea nivelului de cunoștințe și formarea acestora ca cercetători în domeniile la care vor participa, cu perspective de continuare a activității de cercetare în domeniile respective, inclusiv prin teze de doctorat și disertație.