

Il ruolo del Glutathione e la sua correlazione con la radiosensibilità in cellule tumorali in coltura: uno studio NMR

Antonella ROSI¹, Alessandra PALMA¹, Sveva GRANDE¹, Anna Maria LUCIANI¹, Claudio GIOVANNINI², Orazio SAPORA³, Laura GUIDONI¹, Vincenza VITI¹

¹Dipartimento di Tecnologie e Salute e INFN Gruppo Collegato Sanità, Istituto Superiore di Sanità, Roma,

²Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma,

³Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Introduzione

In un precedente studio condotto su due linee cellulari di carcinoma umano (1), abbiamo messo in relazione il livello cellulare di glutathione ridotto (GSH), rivelato attraverso la spettroscopia ¹H NMR, e la radioresistenza cellulare a radiazioni di tipo gamma.

Lo studio è stato ulteriormente approfondito per verificare se: i) un'analoga correlazione possa essere riscontrata anche in cellule tumorali di gliomi umani caratterizzate da una diversa radiosensibilità, e ii) sia possibile ipotizzare un differente ruolo del GSH in cellule tumorali di diversa origine.

A questo scopo sono state confrontate due linee cellulari di adenocarcinoma umano mammario (MCF-7) e della cervice uterina (HeLa) con due linee cellulari di glioma umano (T98G e A172). Queste linee cellulari hanno mostrato una diversa radioresistenza consistente con i livelli iniziali di GSH osservati negli spettri ¹H NMR. Le cellule caratterizzate da una maggiore radioresistenza sono state irradiate dopo trattamento con butionina sulfossimina (BSO), allo scopo di ridurre la concentrazione iniziale di GSH, diminuendone come conseguenza il potenziale radioprotettivo.

Materiali e metodi

Tutte le cellule sono state cresciute adese, secondo quanto descritto in un precedente lavoro (2). Le cellule sono state irradiate con una sorgente gamma di ⁶⁰Co ad una dose di 20 Gy. Per inibire l'attività della γ -glutamylcysteine synthetase, le cellule sono state trattate con una concentrazione 0.1 mM di BSO per 18 ore prima dell'irraggiamento e dei successivi esperimenti NMR.

Gli spettri ¹H NMR sono stati acquisiti a 400.14 MHz su uno spettrometro digitale Avance (Bruker, AG, Darmstadt, Germany) dotato di un *microprobe* da 1 mm. I segnali sono stati acquisiti con un impulso a radiofrequenza di 90° ed una *sweep width* di 4006.4 Hz. La soppressione dell'acqua è stata ottenuta irraggiando selettivamente il segnale.

Risultati e discussione

La Figura 1 mostra lo spettro ¹H NMR delle cellule T98G di glioma umano. Tutti i segnali legati al metabolismo del GSH, assegnati ed etichettati nello spettro in accordo con la letteratura (1, 2), risultano molto intensi, con un *pattern* molto simile a quello osservato per le MCF-7 (1). L'irradiazione di queste due linee cellulari non è stata in grado di indurre morte cellulare a 48 ore dal trattamento (Figura.2).

Al contrario, le altre due linee cellulari HeLa ed A172, caratterizzate da bassi livelli iniziali di concentrazione di GSH, sono risultate molto più sensibili al trattamento con radiazioni (dati non riportati), fornendo quindi un'ulteriore indicazione della correlazione tra livelli bassi di GSH e radiosensibilità.

Nelle due linee radio resistenti, il livello di GSH, misurato attraverso la quantificazione del segnale dell'acido glutammico nel GSH (glu-GSH in Figura 1), è risultato essere più elevato rispetto alle due linee radiosensibili, mentre il glutammico libero è risultato molto meno intenso.

Questo dato è consistente con il ruolo del GSH come protettore cellulare contro la tossicità indotta

da radiazioni.

Le due linee radioresistenti sono state quindi trattate con BSO per ridurre il livello di GSH, inibendo in questo modo la sua funzione di radioprotettore, con lo scopo di aumentare la percentuale di *cell killing*.

Sebbene, però il livello iniziale di GSH sia diminuito della stessa entità in entrambe le linee cellulari, è stato osservato un aumento significativo delle percentuali di apoptosi e di *cell killing* soltanto nelle MCF-7, mentre per le T98G questo effetto non è stato osservato (Fig. 2).

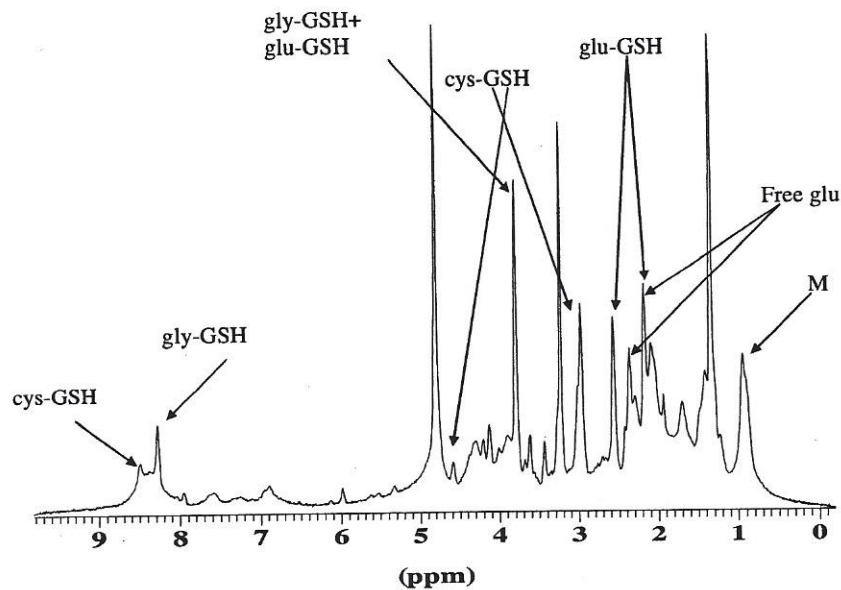


Figure 1 Spettro ^1H NMR delle cellule T98G I segnali provenienti dalla glicina (gly), cisteina (cys), glutammato libero (glu) o nel GSH (glu-GSH) sono indicati in figura. M è il segnale di riferimento proveniente dai gruppi metilici presenti nei polipeptidi

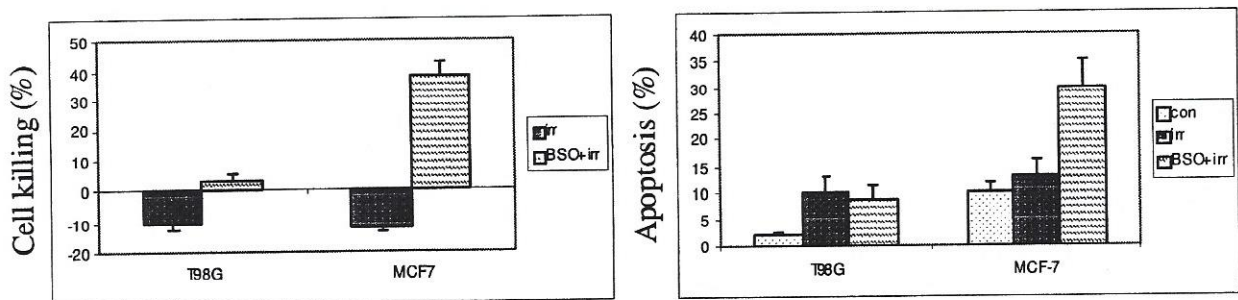


Figure 2 Percentuali di *cell killing* ed apoptosi, misurate 48 ore dopo l'irraggiamento gamma (con una singola dose di 20 Gy), in cellule MCF-7 e T98G. Prima dell'irraggiamento, le cellule sono state trattate con BSO per 18 ore. Le barre rappresentano il valore medio + Dev.st.. Una percentuale significativa di apoptosi è osservabile soltanto nelle cellule MCF-7.

Abbiamo quindi confrontato gli spettri ^1H NMR delle due linee per mettere in evidenza eventuali differenze nelle cinetiche di recupero del GSH. (Fig.3).

Dopo 2 ore dalla fine del trattamento con BSO, entrambe le linee cellulari mostravano una minore intensità del segnale del glutammico nel GSH (glu-GSH vedi freccia), ed una più elevata intensità

del segnale del glutammico libero, come conseguenza del blocco della sintesi del GSH (Fig. 3 a, a').

Successivamente, nelle T98G la concentrazione del GSH aumenta rapidamente, contrariamente a quanto osservato per le MCF-7. Dopo 24 ore dalla fine del trattamento con BSO, i segnali del GSH risultano infatti ancora bassi negli spettri di MCF-7, mentre recuperano negli spettri di T98G (Fig 3 b,b'). L'azione protettiva del GSH viene confermata dal suo consumo nei corrispondenti campioni irradiati (Fig 3 c' confrontata con b').

Il recupero veloce della concentrazione di GSH osservato nelle cellule T98G può essere attribuito ad un sistema efficiente di protezione dagli *stress* ossidativi, producendo glutatione, mostrato da queste cellule.

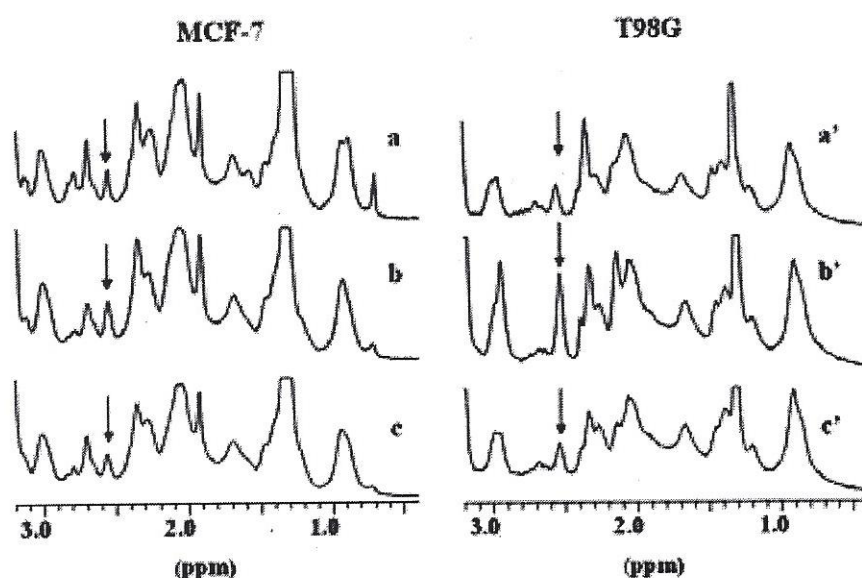


Figure 3 Spettri ^1H NMR di cellule MCF-7 e T98G trattate con BSO. Tracce a,a': spettri misurati 2 ore dopo il trattamento con BSO; b,b': 24 ore dopo il trattamento con BSO; c,c': 24 ore dopo il trattamento con BSO + irraggiamento con radiazione gamma (D=20 Gy).

Conclusioni

Il ruolo del glutatione, il più abbondante componente intracellulare tra i tioli e noto come il maggiore antiossidante ed inibitore dell'apoptosi nelle cellule tumorali, dipende, almeno in parte, dalla sua concentrazione intracellulare, come è stato ampiamente dimostrato in cellule tumorali resistenti all'apoptosi indotta dal trattamento con farmaci (3).

I dati presentati mostrano che i livelli di GSH, rivelati con la spettroscopia ^1H NMR, sono in grado di fornire un metodo per prevedere la sensibilità cellulare al trattamento con radiazioni. Inoltre, tali dati mostrano anche che il metabolismo del GSH di linee tumorali di diversa origine può subire diversi meccanismi di regolazione, permettendo di formulare nuove ipotesi sulla resistenza cellulare ai diversi trattamenti antitumorali.

Bibliografia

- [1] A. Rosi, S. Grande, A.M. Luciani, A. Palma, C. Giovannini, L. Guidoni, O. Sapora, V. Viti. *Role of glutathione in apoptosis induced by radiation as determined by ^1H MR spectra of cultured tumor cells*. Radiat Res. 167, 2007, pp. 268-82.

- [2] S. Grande, A.M. Luciani, A. Rosi, A. Palma, C. Giovannini, O. Saporà, L. Guidoni, V. Viti. *Metabolism of glutathione in tumour cells as evidenced by ^1H MRS*. FEBS Lett. 581, 2007, pp. 637-43.
- [3] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini. *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes*. J. Nutrit. Biochem. 16, 2005, pp. 577-586.