

# EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE INDUCES MESOTHELIOMA CELL DEATH VIA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\_DEPENDENT T-TYPE CA<sup>2+</sup> CHANNEL OPENING

## ABSTRACT

Malignant mesothelioma (MMe) is a highly aggressive, lethal tumour requiring the development of more effective therapies. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits the growth of many types of cancer cells. We found that EGCG is selectively cytotoxic to MMe cells with respect to normal mesothelial cells. MMe cell viability was inhibited by predominant induction of apoptosis at lower doses and necrosis at higher doses. EGCG elicited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release in cell cultures, and exogenous catalase (CAT) abrogated EGCG-induced cytotoxicity, apoptosis and necrosis. Confocal imaging of fluo 3-loaded, EGCG-exposed MMe cells showed significant [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise, prevented by CAT, dithiothreitol or the T-type Ca<sup>2+</sup> channel blockers mibefradil and NiCl<sub>2</sub>. Cell loading with dihydorhodamine 123 revealed EGCG-induced ROS production, prevented by CAT, mibefradil or the Ca<sup>2+</sup> chelator BAPTA-AM. Direct exposure of cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced similar effects on Ca<sup>2+</sup> and ROS, and these effects were prevented by the same inhibitors. Sensitivity of REN cells to EGCG was correlated with higher expression of Cav3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channels in these cells, compared to normal mesothelium. Also, Cav3.2 siRNA on MMe cells reduced in vitro EGCG cytotoxicity and abated apoptosis and necrosis. Intriguingly, Cav3.2 expression was observed in malignant pleural mesothelioma biopsies from patients, but not in normal pleura. In conclusion, data showed the expression of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in MMe tissue and their role in EGCG selective cytotoxicity to MMe cells, suggesting the possible use of these channels as a novel MMe pharmacological target.

## ABSTRACT

Il mesotelioma maligno (MMe) è un tumore letale, ad elevata aggressività che richiede lo sviluppo di terapie più efficaci. Il polifenolo del tè verde epigallocatechina-3-gallato (EGCG) inibisce la crescita di diversi tipi di cellule cancerose. Abbiamo scoperto che la EGCG è selettivamente citotossica nei confronti delle cellule del MMe rispetto alle normali cellule del mesotelio. La vitalità delle cellule MMe è stata inibita da induzione prevalente di apoptosi a dosi più basse e necrosi a dosi più alte. La EGCG induce il rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle colture cellulari e la catalasi esogena (CAT) ha eliminato la citotossicità, l'apoptosi e la necrosi indotte dalla EGCG. L'imaging confocale di cellule MMe colorate con fluo 3 ed esposte a EGCG ha mostrato un aumento significativo di [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, impedito dalla CAT, dal ditiotreitolo o dai bloccanti di canale Ca<sup>2+</sup> T-type mibefranil e NiCl<sub>2</sub>. Il caricamento delle cellule con diidrorodamina 123 ha rivelato produzione di ROS indotta da EGCG, impedita dalla CAT, dal mibefradil o dal chelatore di Ca<sup>2+</sup> BAPTA-AM. L'esposizione diretta delle cellule a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha prodotto effetti simili su Ca<sup>2+</sup> e ROS e tali effetti sono stati impediti dagli stessi inibitori. La sensibilità delle cellule REN a EGCG è stata correlata ad una espressione più elevata dei canali Ca<sup>2+</sup> Cav3.2 T-type in tali cellule, rispetto al normale mesotelio. Inoltre, Cav3.2 siRNA sulle cellule MMe ha ridotto la citotossicità di EGCG in vitro e diminuito l'apoptosi e la necrosi. L'espressione di Cav3.2 è stata osservata nelle biopsie di mesoteliomi maligni della pleura dei pazienti, ma non nella normale pleura. In conclusione, i dati hanno mostrato l'espressione dei canali Ca<sup>2+</sup> T-type nei tessuti MMe e il loro ruolo nella citotossicità selettiva di EGCG per le cellule MMe, suggerendo un eventuale uso di tali canali in qualità di nuovi bersagli farmacologici dell'MMe.