

# Reaktywne formy tlenu i zaburzenia metabolizmu mitochondrialnego w oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych

## Streszczenie

Przewlekła białaczka szpikowa (CML) wywoływana jest obecnością fuzyjnego onkogenu *BCR-ABL1*, w której leczeniu stosuje się imatynib (IM) – inhibitor kinaz tyrozynowych (TKI). Zastosowanie IM, jak i innych TKI, blokuje aktywność *BCR-ABL1* i indukuje w komórkach CML apoptozę. Przerwanie terapii IM skutkuje nawrotem choroby. *BCR-ABL1* prowadzi do licznych zaburzeń i zmian w metabolizmie komórek, w tym związanych z produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), które między innymi wywierają stres genotoksyczny. Mutacje punktowe w *BCR-ABL1* są wskazywane jako jedna z głównych przyczyn rozwoju oporności na IM w trakcie terapii. Wielu pacjentów nabywa w trakcie terapii IM oporności na działanie tego leku, niektórzy wykazują oporność pierwotną od początku terapii.

W niniejszej pracy wykorzystano cztery linie mysich komórek 32D Clone 3 (ATCC® CRL-11346™). Linia oznaczona jako 32D P to komórki dzikiego typu, użyte jako kontrola komórek niebiałaczkowych i porównanie dla stanu sprzed transformacji nowotworowej. Komórki oznaczone 32D BA S transformowano dzikim typem genu *BCR-ABL1* i wykorzystano jako model komórek białaczkowych wrażliwych na IM. Linię oznaczoną jako 32D BA R transformowano wersją onkogenu *BCR-ABL1* zawierającą mutację Y253H i wykorzystano jako model pierwotnej oporności na IM. Jako model komórek z nabytą opornością na IM wykorzystano komórki oznaczone jako 32D BA AR, które otrzymano przez hodowanie linii 32D BA S w stopniowo rosnących stężeniach IM.

W głównych eksperymentach komórki poddawano oddziaływaniu IM przez 24 h,  $H_2O_2$  przez 0,5 h, a także łączonej inkubacji IM +  $H_2O_2$ , gdzie  $H_2O_2$  dodany był w ostatniej półgodzinie inkubacji z IM. Ponadto badano żywotność komórek w zakresie stężeń IM 0–1  $\mu M$ .

Potwierdzono, że tylko komórki wrażliwe reagowały na ekspozycję na IM poprzez istotny spadek żywotności. Komórki białaczkowe akumulowały więcej RFT w warunkach kontrolnych i po ekspozycji na  $H_2O_2$  w porównaniu do komórek typu dzikiego. Komórki wrażliwe na IM miały tendencje do akumulacji wyższego poziomu RFT w porównaniu do komórek wrażliwych w układach eksperymentalnych obejmujących ekspozycję na IM, różnica była najbardziej wyraźna przy ekspozycji na IM +  $H_2O_2$ .

Komórki typu dzikiego charakteryzowały się nieznacznie niższym poziomem akumulacji uszkodzeń DNA w warunkach kontrolnych (różnica nie była istotna statystycznie). Komórki wrażliwe na działanie IM wykazywały wyższy poziom uszkodzeń DNA w porównaniu

do komórek wtórnie opornych i typu dzikiego po ekspozycji na  $H_2O_2$ , a także w porównaniu do wszystkich innych komórek po ekspozycji na IM i IM +  $H_2O_2$ .

Komórki wrażliwe na IM wykazywały wyższy poziom całkowitego GSH w porównaniu do pozostałych komórek w warunkach kontrolnych, choć różnica ta była istotna jedynie w porównaniu do komórek pierwotnie opornych. Różnica zanikała po ekspozycji na  $H_2O_2$ , a stawała się statystycznie istotna po ekspozycji na IM i IM +  $H_2O_2$ . Między liniami nie zaobserwowano różnic w mierzonym stosunku GSH:GSSG z wyjątkiem wyższego stosunku w linii wrażliwej na IM w porównaniu do linii wtórnie odpornej w warunkach kontrolnych.

Komórki wrażliwe we wszystkich warunkach eksperymentalnych charakteryzowały się niższym poziomem aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) w porównaniu do komórek typu dzikiego w każdym warunkach eksperymentalnych. Komórki pierwotnie odporne wykazywały wyższą aktywność GPx w porównaniu do komórek wrażliwych przy traktowaniu IM i IM +  $H_2O_2$ . Komórki wtórnie odporne wykazywały wyższy poziom aktywności GPx w każdym warunkach z wyjątkiem kontrolnych.

Nie zaobserwowano natomiast dużych zmian w ekspresji genu kodującego GPx w wyniku ekspozycji na  $H_2O_2$ , IM i IM +  $H_2O_2$ , ani istotnych różnic między liniami we wzorcach tych zmian, z wyjątkiem linii wtórnie odpornej, u której doszło do statystycznie istotnego wzrostu poziomu ekspresji po ekspozycji na działanie samego IM.

Katalaza (CAT) była bardziej aktywna w komórkach typu dzikiego w porównaniu do komórek wrażliwych w każdym warunkach eksperymentalnych. Komórki pierwotnie odporne wykazywały wyższą aktywność CAT po traktowaniu IM i IM +  $H_2O_2$  w porównaniu do komórek wrażliwych na IM. Komórki wtórnie odporne miały niższą aktywność CAT w warunkach kontrolnych, ale wyższą po traktowaniu IM i IM +  $H_2O_2$  w porównaniu do komórek wrażliwych na IM.

Linia wrażliwa na działanie IM charakteryzowała się wzrostem poziomu ekspresji genu katalazy we wszystkich warunkach eksperymentalnych w porównaniu do poziomu w warunkach kontrolnych. Wzrost ten był statystycznie większy niż w komórkach typu dzikiego we wszystkich układach eksperymentalnych, a także po traktowaniu  $H_2O_2$  i IM +  $H_2O_2$  w porównaniu do komórek pierwotnie opornych, a także po traktowaniu  $H_2O_2$  w porównaniu do komórek wtórnie opornych.

W przypadku aktywności dysmutazy ponadtlenkowej zauważono różnic jedynie przy traktowaniu IM +  $H_2O_2$ , przy czym komórki wrażliwe na IM wykazały w tym układzie eksperymentalnym aktywność SOD wyższą niż pozostałe komórki, zarówno odporne na IM, jak i pozbawione onkogenu BCR-ABL1.

Większość badanych linii komórkowych charakteryzowała się obniżeniem poziomu ekspresji genu kodującego SOD w większości warunków eksperymentalnych, w porównaniu do warunków kontrolnych. Spadek ten był istotnie większy w komórkach 32D P w porównaniu do komórek wrażliwych na IM po traktowaniu IM i IM +  $H_2O_2$ . W komórkach wtórnie opornych zaobserwowano wzrost ekspresji po ekspozycji na  $H_2O_2$ , zaś po ekspozycji na IM dochodziło do wzrostu ekspresji SOD w komórkach wtórnie i pierwotnie opornych, podczas gdy komórki wrażliwe na IM nadal wykazywał spadek ekspresji SOD. Inaczej sytuacja przedstawiała się przy łączonej ekspozycji IM +  $H_2O_2$ , gdzie obserwowano spadek ekspresji w komórkach pierwotnie opornych na IM w porównaniu do nieznacznego wzrostu w komórkach wrażliwych.

Komórki wrażliwe na IM wykazywały w warunkach kontrolnych wyższy potencjał mitochondrialny (MMP) w porównaniu do komórek wtórnie opornych i komórek typu dzikiego. Po traktowaniu  $H_2O_2$  lub IM komórki wrażliwe na IM wykazały wyższy MMP

w porównaniu do wszystkich pozostałych komórek. Po traktowaniu IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> komórki wrażliwe miały wyższy MMP w porównaniu do komórek typu dzikiego, ale nie w porównaniu do komórek opornych na działanie IM.

Podsumowując – o ile różnice między komórkami wrażliwymi a opornymi na działanie IM zależały od specyficznego traktowania, to komórki pozbawione onkogenu BCR-ABL1 miały zawsze niższy MMP niezależnie od warunków doświadczalnych.

W warunkach kontrolnych i po ekspozycji na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> komórki wrażliwe na IM miały niższą liczbę kopii mtDNA przypadających na jedną komórkę w porównaniu do komórek pozbawionych *BCR-ABL1*. Nie stwierdzono żadnej istotnej różnicy między komórkami wrażliwymi a wykazującymi pierwotną oporność na IM w żadnym z zastosowanych układów eksperymentalnych. Z kolei komórki z wtórną opornością na IM wykazały niższą liczbę kopii, ale wyłącznie po traktowaniu IM wraz z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Uszkodzenia mtDNA były, w porównaniu do komórek wrażliwych na działanie IM, mniejsze w komórkach typu dzikiego i pierwotnie opornych na IM po ekspozycji na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a także w komórkach wtórną opornych po traktowaniu IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Podsumowując, zaobserwowaliśmy istotne różnice między komórkami podatnymi na IM a komórkami opornymi na IM w poziomie produkcji ROS, akumulacji uszkodzeń DNA oraz aktywności glutationu i niektórych enzymów o funkcji zmiataczy ROS. Różnice między liniami pod względem zmian w ekspresji genów kodujących wspomniane zmiatacze RFT były mniej jednoznaczne. Zaobserwowaliśmy również zaburzenia w MMP oraz niewielkie różnice w liczbie kopii mtDNA i poziomie uszkodzeń mtDNA. Sugeruje to, że rola ROS w oporności IM jest złożona i może być bardziej związana z działaniem ROS w cytoplazmie i jądrze niż z ich działaniem w mitochondriach.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. G. P.' or similar, with a stylized, cursive script.

## Summary

Chronic myeloid leukemia (CML) is a disease caused by the presence of the fusion *BCR-ABL1* oncogene, which is treated with imatinib (IM), a tyrosine kinase inhibitor (TKI). The use of IM and other TKIs blocks *BCR-ABL1* activity and induces apoptosis in CML cells. Discontinuation of IM therapy results in a relapse. *BCR-ABL1* leads to numerous changes in cell metabolism, including those related to the production of reactive oxygen species (ROS), which exert genotoxic stress and lead to, among others, point mutations in *BCR-ABL1* that have been reported to be one of the major causes of IM resistance development during therapy.

Four lines of murine 32D Clone 3 cells (ATCC® CRL-11346™) were used in this work. The line labeled 32D P was wild-type cells used as a control for non-leukemic cells and a comparison for the pre-tumor transformation state. Cells labeled with 32D BA S were transformed with the wild type *BCR-ABL1* gene and modeled IM sensitive leukemic cells. The line designated 32D BA R was transformed with the version of the *BCR-ABL1* oncogene containing the Y253H mutation and used as a model for primary IM resistance. Cells designated as 32D BA AR, which were obtained by culturing 32D BA S lines in gradually increasing concentrations of IM, were used as a model of acquired resistance to IM.

In the main experiments, cells were exposed to IM for 24h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0.5h, or combination of IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, where H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added in the last half hour of incubation with IM. Moreover, the viability of cells was tested in the IM concentrations range 0–1 μM. It was confirmed that only the IM-sensitive cells exhibited decreased viability after IM treatment.

*BCR-ABL1* positive cells accumulated more ROS in control conditions and after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure compared to wild-type cells. IM sensitive cells tended to accumulate higher levels of ROS compared to sensitive cells in after exposure containing IM, the difference being most pronounced when exposed to IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The wild-type cells were characterized by lower level of DNA damage in control conditions (the difference was not statistically significant though) compared to IM-sensitive ones. The IM sensitive cells showed a higher level of DNA damage compared to the secondary resistant and wild-type cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure and comparable to other cells after exposure to IM and IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The IM-sensitive cells showed in control conditions a higher level of total GSH compared to other cells, although this difference was significant only between susceptible and primarily resistant cells. The difference was not observed after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone and was statistically significant after exposure to IM or IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. There were no differences in the measured GSH: GSSG ratio between cell lines except for a higher ratio in the IM sensitive line in control conditions compared to the cells with acquired resistance.

Cells sensitive to IM showed a lower level of glutathione peroxidase (GPx) activity compared to wild-type cells under all experimental conditions. Primary resistant cells showed higher GPx activity compared to sensitive cells when treated with IM and IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells with acquired resistance showed a higher level of GPx activity under all conditions except control ones.

However, no large changes in the expression of the GPx-encoding gene were observed because of exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IM and IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nor significant differences between lines were in the patterns of these changes, except for the secondary resistant line, which showed a statistically significant increase in the level of expression after exposure to the IM alone.

Catalase (CAT) was more active in wild-type cells compared to IM-sensitive cells under all experimental conditions. Primary resistant cells showed higher CAT activity after IM and IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment compared to IM sensitive cells. Cell with acquired resistance had lower CAT activity under control conditions but higher after IM and IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment compared to IM sensitive cells.

The IM-sensitive line showed an increase in the expression level of the *CAT* gene under all experimental conditions when compared to control conditions. This increase was statistically greater than that of wild-type cells in all conditions. It was also greater than in primarily resistant cells after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and greater than in cells with acquired resistance after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In the case of superoxide dismutase activity (SOD), only after IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment IM-sensitive cells showed increased SOD activity when compared to IM-resistant and wild-type cells.

Most of the tested cell lines were characterized by a decrease in the level of expression of the gene encoding SOD under most of the experimental conditions, as compared to the control conditions. This decrease was significantly greater in 32D P cells compared to IM sensitive cells after IM and IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. In both types of IM-resistant cells there was an increase in SOD expression after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while IM sensitive cells showed a decrease in SOD expression. The situation was different for the combined exposure of IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, where a decrease in expression in primarily IM-resistant cells was observed compared to a slight increase in sensitive cells.

Mitochondrial potential (MMP) was higher in IM-sensitive cells under control conditions when compared to wild type cells and those with acquired resistance to IM. After treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or IM, IM sensitive cells showed higher MMP compared to all other cells. After IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, IM-sensitive cells had a higher MMP compared to wild type, but not compared to IM resistant cells.

In conclusion, while the differences between sensitive and IM resistant cells depended on specific treatment, cells lacking the BCR-ABL1 oncogene always had a lower MMP regardless of the experimental conditions.

Under control conditions and after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IM-sensitive cells had a lower number of mtDNA copies per cell compared to cells lacking BCR-ABL1. There was no significant difference between the sensitive and primary IM resistant cells in any of the experimental setups used. In contrast, cells with secondary IM resistance showed a lower copy number, but only when treated with IM together with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Compared to IM-sensitive cells, mtDNA damage was lower in wild-type and primary IM-resistant cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure, and in cells secondarily resistant to IM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

Overall, we observed important differences between cells susceptible to IM and cells resistant to IM in the levels of ROS production, DNA damage accumulation, and activity of glutathione and some ROS scavenging enzymes. We also observed disturbances in MMP, but not much differences in mtDNA copy number nor in levels of mtDNA damage. This suggests that ROS role in IM resistance is complex and may be more related to how ROS act in cytoplasm and nucleus in leukemic cells rather than its action in mitochondria.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sylvia', is located at the bottom right of the page.