

## LOS OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENSE POTENCIAN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA IDARUBICINA EN LA LINEA CELULAR K-562\*

LUCIANO VELLON, TERESA CUELLO, PATRICIA GARGALLO, IRENE LARRIPA

*Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

**Resumen** La línea celular K-562, portadora del rearrreglo bcr/abl de tipo b3a2 es resistente a la apoptosis inducida por inhibidores de topoisomerasa II. Se trataron células de dicha línea con complejos de liposomas catiónicos (DMRIE-DOPE y Dcchol-DOPE) y oligonucleótidos *antisense* (ODNs AS) dirigidos contra el ARNm bcr/abl de tipo b3a2, y *non sense* (ODNs NS), en una razón 3:1 lípido/ADN, durante 72 horas, luego se incubaron durante 24 horas con idarubicina (IDA), 0.5 µg/ml, para inducir apoptosis. La misma se evaluó por observación morfológica al microscopio de fluorescencia. Las células tratadas con los conjugados DMRIE-DOPE y Dcchol/DOPE con el ODN AS específico mostraron un mayor porcentaje de apoptosis inducida por IDA ( $X \pm DS$ : 14.74  $\pm$  2.07 y 20.43  $\pm$  4.58, respectivamente) comparadas con los controles no tratados con ODNs ( $X \pm DS$ : 8.08  $\pm$  0.82); ( $p < 0.005$ ). Los datos indican que los ODNs-AS dirigidos contra el ARNm bcr-abl de tipo b3a2 vuelven a las células de la línea K-562 sensibles a la IDA a la concentración mencionada.

**Abstract** *Antisense oligonucleotides increase the apoptotic effect of idarubicin in K-562 cell line.* The cell line K-562, which carries bcr/abl rearrangement of type b3a2 is resistant to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. K-562 cells were treated with complexes of cationic liposomes (DMRIE-DOPE and Dcchol-DOPE) and antisense oligonucleotides (AS-ODNs) directed against the b3a2 type of bcr/abl mRNA and non sense oligonucleotides (NS-ODNs), in a 3:1 lipid/DNA ratio during 72 hours, then they were incubated for a further 24 hours with idarubicin (IDA), 0.5 µg/ml, to induce apoptosis. It was evaluated by morphology to the microscope of fluorescence. Cells treated with the complexes DMRIE-DOPE and Dcchol/DOPE with the specific AS-ODN showed a higher apoptosis percentage induced by IDA ( $X \pm SD$ : 14.74  $\pm$  2.07 and 20.43  $\pm$  4.58, respectively) compared with controls not treated with ODNs ( $X \pm SD$ : 8.08  $\pm$  0.82); ( $p < 0.05$ ). These data indicate that the AS-ODNs directed against the b3a2 type of bcr-abl mRNA renders the cell line K-562 sensitive to IDA at the mentioned concentration.

**Key words:** chronic myelogenous leukemia, apoptosis, antisense, idarubicin, K-562

La característica citogenética de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una translocación recíproca balanceada entre los cromosomas 9 y 22 t(9; 22) (q34; q11)<sup>1</sup>. El resultado de esta translocación es un gen híbrido BCR/ABL y una proteína de fusión, p210<sup>bcr/abl</sup>. Esta proteína posee una actividad tirosina quinasa incrementada, comparada con el producto normal del gen c-abl<sup>2</sup>. Hay evidencia de que la p210<sup>bcr/abl</sup> puede actuar como un factor antiapoptótico<sup>3</sup>. Se han usado oligonucleótidos antisense dirigidos al sitio de empalme del ARNm bcr/abl, para correlacionar el efecto de los mismos con una disminución del transcripto bcr/abl o de su producto proteico<sup>4, 5</sup>.

La línea celular K-562, derivada de un paciente con LMC en crisis blástica y portadora del cromosoma Philadelphia<sup>6</sup>, es resistente a la apoptosis inducida por una variedad de agentes, (irradiación, luz UV, inductores químicos e inhibidores de la síntesis proteica)<sup>7</sup>. La disminución de la síntesis de la p210<sup>bcr/abl</sup> en la línea K-562 vuelve a éstas células más susceptibles a la inducción de la apoptosis por agentes químicos o carencia de suero<sup>7, 8</sup>.

En el presente trabajo se utilizaron oligonucleótidos *antisense* naturales (ODN-AS) de 18 bases, dirigidos contra el ARNm bcr/abl en la línea celular K-562 y oligonucleótidos *non sense* (ODN-NS), con la misma composición de bases que el AS-ODN pero con una secuencia aleatoria. Las células se incubaron en RPMI 1640 con 1 µg/ml de los oligonucleótidos (ODNs). Para incrementar el *uptake* de los mismos, se utilizaron dos formulaciones de liposomas catiónicos, DCCHOL/DOPE (3 beta [N-(N', N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol/(1,2-dioleil-fosfatidiletanolamina) y DMRIE/DOPE (1,2-dimiristopropil-3-dimetil-hidroxietyl bromuro de

\* Este trabajo mereció el Premio Cherny otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) durante su reunión anual en Mar del Plata, noviembre 1999.

amónio)/(DOPE). Para la formación de los complejos lípido: ADN, se disolvieron los ODNs y los liposomas en un volumen total de 20 µl de medio de cultivo, en una relación lípido: ADN de 3:1 p/p y se los dejó durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual se adicionaron gota a gota a la suspensión celular ( $50 \times 10^3$  células en 180 µl de RPMI 1640). En estas condiciones, se realiza la transfección, durante 12 horas. Posteriormente, se completó con medio de cultivo hasta un volumen total de 500 µl y un 10% de suero fetal bovino. Se incubaron de este modo las células durante 72 horas. Luego de este período se incubaron durante 24 horas con el inhibidor de Topoisomerasa II Idarubicina (IDA) a una concentración de 0.5 µg/ml, a fin de inducir la apoptosis.

Las células apoptóticas se detectaron por observación al microscopio de fluorescencia, utilizándose para ello una mezcla de los fluorocromos naranja de acridina y bromuro de etidio.

También se observó al microscopio de fluorescencia el *uptake* de oligonucleótidos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en el extremo 3', para lo cual se realizó el tratamiento de las células con los complejos lípido: ADN del modo mencionado, y se observó el *uptake* de los ODNs a las 2 y a las 24 horas de realizada la transfección. Para esto se fijaron las células en paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, se goteó la suspensión de célu-

las fijadas en un portaobjetos tratado con xylane, luego de lo cual, se efectuó un lavado durante 5 minutos en 2X SSC, se coloreó con una solución de DAPI (4.6-diamino 2-fenil indol) 0.2 µg/ml en 2X SSC durante 10 minutos, y por último se efectuó un lavado en 2X SSC con un 0.05% de *nonidet*-P40 (NP-40). Se colocó medio de montaje y se procedió a la observación al microscopio de fluorescencia.

Las células tratadas con los conjugados DMRIE-DOPE y DCCHOL/DOPE con el ODN AS específico para el rearreglo b3a2 mostraron un mayor porcentaje de apoptosis inducida por IdA ( $X \pm DS$ :  $14.74 \pm 2.07$  y  $20.43 \pm 4.58$ , respectivamente) comparadas con los controles no tratados con ODNs ( $X \pm DS$ :  $8.08 \pm 0.82$ ); ( $p < 0.005$ ) (Fig. 1). Los cultivos con ODN-NS no difirieron significativamente de los controles. En cuanto al *uptake* y distribución intracelular de los ODNs, se observó al microscopio de fluorescencia que los ODNs presentan una localización citoplasmática, en estructuras del tipo vesicular a las 2 horas de la transfección, con la utilización de las formulaciones lipídicas, mientras que sin las mismas no son tomados por las células en ese tiempo. A las 24 horas, se observa en las células tratadas con los complejos lípido: ADN que la distribución de los ODNs es predominantemente citoplasmática, observándose las estructuras de tipo vesicular y una pequeña fracción de células en las que la localización de los ODNs es nuclear.

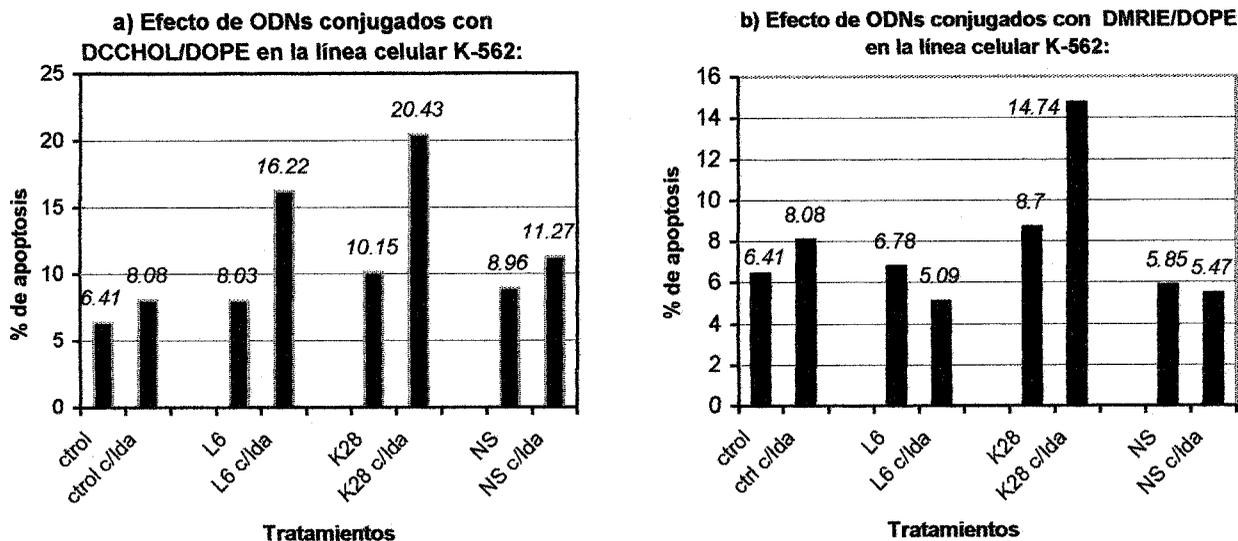


Fig. 1.— a y b: porcentajes de apoptosis obtenidos con los ODNs a una concentración de 1 µg/ml conjugados con las formulaciones DCCHOL/DOPE (a) y DMRIE/DOPE (b). Referencias: control, cultivos sin ODNs. L6, ODN complementario al sitio de empalme del ARNm bcr/abl del tipo b2a2. K28, ODN complementario al sitio de empalme del ARNm bcr/abl del tipo b3a2. NS, oligonucleótido *nonsense*.

Las observaciones realizadas sugieren que, con la utilización de las formulaciones lipídicas, los ODNs son captados de forma más rápida y eficiente por las células de la línea K-562, pues a las dos horas de realizada la transfección se observa una distribución citoplasmática de los ODNs, mientras que la penetración espontánea de los mismos es poco eficiente.

La localización de los ODNs en supuestas estructuras vesiculares sugiere que los ODNs serían tomados activamente por endocitosis, y estos gránulos podrían representar endosomas y lisosomas, que liberarían los ODNs al citoplasma y serían importados al núcleo<sup>9</sup>.

Por otra parte, nuestros datos muestran que el citostático IDA a 0.5 µg/ml no indujo un incremento significativo en la apoptosis a las 24 hs del tratamiento. El pretratamiento con ODNs sin utilizar los lípidos tampoco modificó los porcentajes de apoptosis. Sin embargo el tratamiento previo con ODN-AS conjugados con las formulaciones lipídicas (DCCHOL/DOPE y DMRIE/DOPE) elevó significativamente ( $p < 0.005$ ) los porcentajes de apoptosis inducida por IDA en las condiciones mencionadas, sugiriendo que el tratamiento con ODN-AS dirigidos contra el ARNm *bcr/abl* puede revertir la resistencia a la apoptosis en células de la línea K-562.

**Agradecimientos:** Queremos agradecer a los Dres. Gerardo Glikin y Armando Carara por habernos facilitado las formulaciones lipídicas empleadas y por sus valiosos consejos.

## Bibliografías

1. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
2. Rosti V, Bergamaschi G, Ponchio L, et al. *c-abl* function in normal and chronic myelogenous leukemia hematopoiesis: in vitro studies with antisense oligomers. *Leukemia* 1992; 6: 1-7.
3. Evans C, Owen-Lynch P, Whetton AD, et al. Activation of the abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. *Cancer Research* 1993; 53: 1735-8.
4. Szczyluk C, Skorski T, Nicolaidis J, et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by *bcr/abl* antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 1991; 253: 562-5.
5. de Fabritiis, Skorki T, de Propis MS, et al. Effect of *bcr/abl* oligodeoxynucleotides on the clonogenic growth of chronic myelogenous leukaemia cells. *Leukemia* 1997; 11: 811-9.
6. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45: 321-34.
7. McGahon A, Bissonette R, Schmitt M, et al. *Bcr/Abl* maintain resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 1994; 83: 1179-87.
8. Rowley PT, Keng PC, Kosciulek BA. The effect of *bcr/abl* antisense oligonucleotide on DNA synthesis and apoptosis in K-562 chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia Research* 1996; 20: 473-80.
9. Kronenwett R, Steidl Kirsch M, Sczakiel G, et al. Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. *Blood* 1998; 91: 852-62.

-----

*I seem to have been only like a boy playing on the sea-shore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.*

Me parece que he sido como un niño que jugara en la playa, y que me divertiera cuando hallaba alguna piedrita muy pulida o una concha más bonita que las comunes, mientras el gran océano de la verdad permanecía ante mí totalmente desconocido.

Isaac Newton (1642-1727)

*Brewster's Memoirs*