

Wee1-kinaasin toiminnan estäminen korkean
pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin munasarjasyöpäsoluissa

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Biokemian laitos
Molekulaarinen solubiologia
Elokuu 2020
Sanna Pikkusaari

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

PIKKUSAARI, SANNA: Wee1-kinaasin toiminnan estäminen korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin munasarjasyöpäsoluissa

Pro gradu -tutkielma 45 s.
Molekulaarinen solubiologia
Elokuu 2020

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Wee1-kinaasi on tärkeä solusyklin etenemisen säätelijä. Se estää solua etenemästä G₂-tarkastuspisteestä mitooseen, jos solussa on havaittu DNA-vaurioita. Wee1-kinaasi inhiboi mitoosissa tarvittavaa syklinistä riippuvaista kinaasia, mikä johtaa solusyklin pysähtymiseen. Solusyklin pysähtyminen antaa solulle aikaa korjata DNA-vauriot. DNA-vaurioita voidaan korjata myös solusyklin G₁-tarkastuspisteessä, jossa vaurioiden korjaus on riippuvaista *TP53*-geenin koodaamasta p53-proteiinista. Korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin munasarjasyöpäsolut (HGSOC) ovat *TP53*-mutatoituneita, joten ne ovat riippuvaisia G₂-tarkastuspisteestä DNA-vaurioiden korjaamiseksi. Jos Wee1-kinaasin toiminta estetään, HGSOC-solut etenevät mitooseen vaurioituneella DNA:lla, mikä voi johtaa solun kuolemaan. Lisäksi noin 50 % HGSOC:ssä DNA-vaurioiden korjaaminen homologisen rekombinaation (HR) avulla on puutteellista mm. *BRCA1/2*-mutaatioiden takia. HR:n puutteellisuus voi herkistää solut G₂-tarkastuspisteen inhibiittoreille.

Wee1-kinaasin inhibiittorin (AZD1775) vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin yksin sekä kahden HGSOC:n hoidossa käytettävän lääkeaineen, sisplatiinin ja olaparibin, kanssa kaupallisilla sekä potilasperäisillä HGSOC-solulinjoilla. Lääkeaineiden vaikutus solujen elinkelpoisuuteen määritettiin ATP:n määrän mittaamiseen perustuvalla CTG-analyysillä, joka ilmaisi solujen metabolisen aktiivisuuden määrän näytteessä. Tutkimukseen valittiin solulinjoja, joissa DNA-vaurioiden korjaus HR:n avulla toimii sekä HR-puutteellisia solulinjoja. HR:n tila testattiin immunofluoresenssiin perustuvalla funktionaalisella menetelmällä. Lisäksi tutkittiin AZD1775:n solujen DNA:han aiheuttamia katkoksia Comet assay-menetelmällä.

Tutkimuksessa havaittiin sisplatiinin ja AZD1775:n yhdistelmän heikentävän HGSOC-solujen elinkelpoisuutta enemmän kuin sisplatiinin ja olaparibin tai olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmän. Kaikkien HR-puutteellisten solulinjojen ei havaittu olevan herkempiä AZD1775:lle kuin solulinjojen, joissa HR on toimivaa. AZD1775:n havaittiin aiheuttavan DNA-katkoksia HR-puutteellisissa soluissa enemmän, kuin solulinjoissa, joissa HR oli toimivaa. Hoidon aikana lääkeaineille kehittyvä resistenssi on HGSOC:ssä ongelma, johon ratkaisua haetaan lääkeaineiden yhdistelmistä. Tulosten perusteella, AZD1775 on potentiaalinen lääkeaine HGSOC:n hoitoon yhdistelmänä sisplatiinin ja olaparibin kanssa.

Avainsanat: Wee1-kinaasi, Homologinen rekombinaatio, *TP53*, HGSOC, AZD1775

SISÄLLYS

LYHENTEET	3
1 JOHDANTO	4
1.1 Munasarjasyöpä	6
1.2 Munasarjasyövän suoja- ja riskitekijät	7
1.3 Munasarjasyövän hoito	8
1.4 Korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin munasarjasyöpä	9
1.5 DNA-vaurioiden korjaus	10
1.5.1 DNA-vaurioiden tarkastuspisteet	10
1.5.2 DNA-vaurioiden korjausmekanismit	13
1.5.3 DNA-vaurioiden korjaus homologisen rekombinaation avulla	14
1.6 DNA-vaurioiden korjausmekanismeihin kohdennetut lääkkeet HGSOC:ssä	17
1.6.1 Wee1-kinaasin inhibitio	17
1.6.2 PARP-estäjät	19
2 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS	21
3 AINEISTO JA MENETELMÄT	22
3.1 Soluviljely	22
3.1.1 Solujen mykoplasmatetestaus	22
3.2 Homologisen rekombinaation toiminnan määrittäminen	23
3.3 Wee1-kinaasin inhibointi AZD1775:llä	25
3.4 Sisplatiinin, olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmäkokeet	25
3.5 Comet assay -analyysi	26
3.5.1 Tilastollinen analysointi	27
4 TULOKSET	28
4.1 Soluviljelmien testaus mykoplasmakontaminaation varalta	28
4.2 Homologisen rekombinaation toiminnan määrittäminen	29
4.3 Lääkekäsittelyjen vaikutukset solujen elinkelpoisuuteen	31
4.3.1 Yksittäisten lääkeaineiden vaikutus solujen elinkelpoisuuteen	31
4.3.2 Kahden lääkeaineen yhdistelmän vaikutus solujen elinkelpoisuuteen.....	34

4.3.3	Sisplatiinin, olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmän vaikutus solujen elinkelpoisuuteen.....	36
4.4	AZD1775:n aiheuttamat DNA-katkokset soluissa	37
5	TULOSTEN TARKASTELU.....	40
5.1	Homologisen rekombinaation puutteellisuus ei näytä herkistävän soluja AZD1775:lle.....	40
5.2	Vaste sisplatiinin ja AZD1775:n yhdistelmälle on voimakkain kahden lääkeaineen yhdistelmistä.....	42
5.3	AZD1775:llä on solujen elinkelpoisuutta heikentävä vaikutus myös yhdistelmässä sisplatiinin ja olaparibin kanssa.....	42
5.4	AZD1775 aiheuttaa DNA-katkoksia erityisesti soluissa, joissa HR on puutteellista.....	43
6	YHTEENVETO	45
	LÄHTEET	46

LYHENTEET

BER	Base excision repair, emäksen korjausmekanismi
Cdk	Cyclin dependent kinase, sykliineistä riippuvaiset kinaasit
EGF	Epidermal growth factor, epidermaalinen kasvutekijä
FBS	Fetal bovine serum, naudan sikiön seerumi
FGF	Fibroblast growth factor, fibroplastien kasvutekijä
HGSOC	High grade serous ovarian carcinoma, korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjasyöpä
HR	Homologous recombination, homologinen rekombinaatio
MMR	Mismatch repair, kahdentumisvirheiden korjaus
NER	Nucleotide excision repair, nukleotidinpoistokorjaus
NHEJ	Non-homologous end joining, ei-homologisten päiden yhdistäminen
PARP	Poly(ADP-riboosi)-polymeraasi

1 JOHDANTO

Munasarjasyöpä on seitsemänneksi yleisin syöpä ja kahdeksanneksi yleisin syöpäkuoleman syy naisilla maailmanlaajuisesti. Munasarjasyövän osuus uusista syöpätapauksista on melko pieni (3,4 %) verrattuna esimerkiksi naisten yleisimpään syöpään eli rintasyöpään (24,2 %), mutta sen ennuste on huono. Suhteellinen elossaololuku kertoo, kuinka suuri osa syöpäpotilaista on elossa tietyn ajan kuluttua syövän toteamisesta suhteutettuna saman ikäisen väestön odotettuun elossaololukuun. Viiden vuoden suhteellinen elossaololuku munasarjasyöväälle Suomessa on vain 42 %, kun sama luku rintasyöväälle on 91 %. (GLOBOCAN 2018 ; Syöpä 2017 -raportti.)

Munasarjasyövän matalaan elossaololukuun vaikuttaa taudin diagnosoiminen vasta edenneessä vaiheessa, jolloin tauti on ehtinyt levitä munasarjan ulkopuolelle. Munasarjasyöpä diagnosoidaan usein vasta edenneessä vaiheessa, sillä tauti voi olla pitkään oireeton tai oireet voivat olla epämääräisiä ja moninaisia. Munasarjasyöpää seulotaan transvaginaalisella ultraäänitutkimuksella sekä CA 125 -merkkiaineen pitoisuuden mittauksella verestä. Seulontakeinot eivät kuitenkaan ole osoittautuneet tehokkaiksi, koska seulonta ei ole vähentänyt munasarjasyövän kuolleisuutta. Parempien seulontakeinojen kehittäminen on tärkeää, sillä varhaisessa vaiheessa diagnosoitujen munasarjasyöpätapausten viiden vuoden elossaololuku on yli 90 %. (Pinsky ja muut 2016; Torre ja muut 2018.)

Munasarjasyövän matalaan elossaololukuun vaikuttaa myös resistenssin kehittyminen käytössä oleville solunsalpaajille. Vaikka vaste kemoterapiaan on aluksi erittäin hyvä, sairauden uusiutuminen kemoterapialle resistenttinä on erittäin yleistä. Syöpäsolupopulaatiot ovat geneettisesti monimuotoisia, joten osa syöpäsoluista voi olla tietyille lääkeaineelle resistenttejä tai kehittää sille resistenssin. Resistentit solut selviävät ja jakautuvat hoidosta huolimatta, mikä johtaa syövän uusiutumiseen. Resistenssin kehittymistä voidaan estää tai hidastaa hoitamalla potilaita lääkeyhdistelmillä, sillä resistenssi tai sen kehittyminen samanaikaisesti useammalle eri signalointireitteihin kohdennetuille lääkeaineille on epätodennäköisempää kuin yhdelle lääkeaineelle. Vaste useamman lääkeaineen yhdistelmälle on myös yleensä voimakkaampi kuin yhdelle lääkkeelle. (Bozic ja muut 2013; Lisio ja muut 2019.)

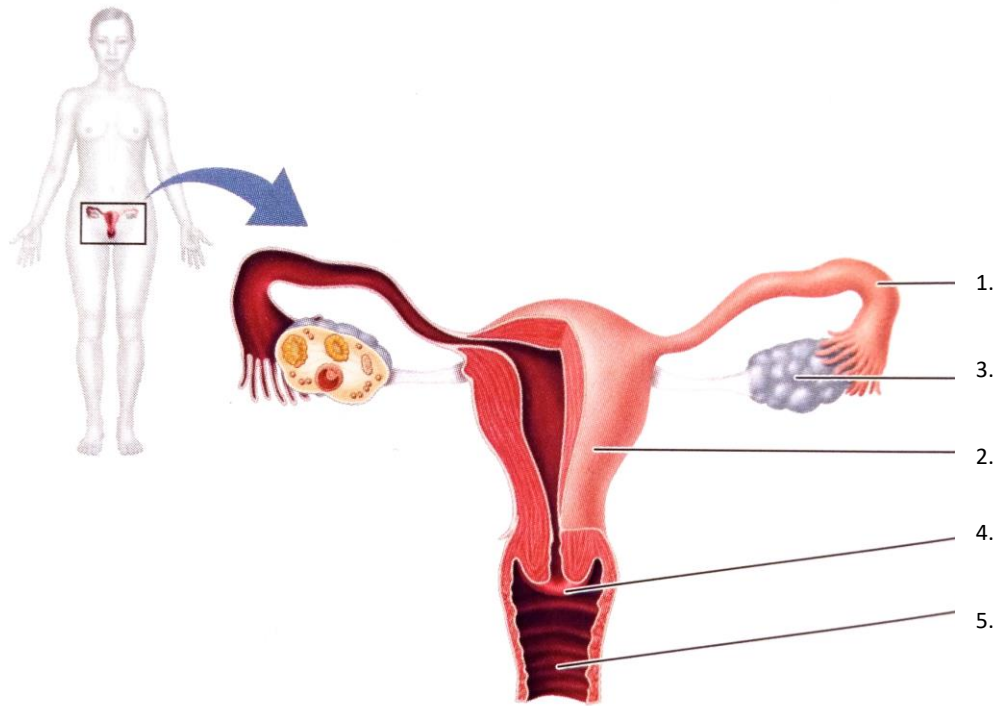
Tässä pro gradu -tutkimuksessa selvitettiin potentiaalisen lääkeaineen, Wee1-kinaasin estäjän eli inhibiittorin, vaikutuksia korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin munasarjasyöpäsolujen (engl. *high-grade serous ovarian cancer*, HGSOC) elinkelpoisuuteen. Wee1-kinaasin inhibiittorin vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin yksin, sekä yhdistelmässä kahden munasarjasyövän hoidossa tällä hetkellä käytössä olevan lääkeaineen, sisplatiinin ja olaparibin, kanssa kaupallisissa sekä potilasperäisissä HGSOC-solulinjoissa. Tutkimuksen valittiin solulinjoja, joissa DNA-vaurioiden korjaus homologisen rekombinaation (engl. *homologous recombination*, HR) avulla toimii, sekä solulinjoja, joissa HR:n avulla tapahtuva DNA-vaurioiden korjaus on puutteellista.

1.1 Munasarjasyöpä

Munasarjasyöpä terminä viittaa ryhmään erillisiä sairauksia, joita yhdistää sijainti samassa anatomisessa paikassa. Munasarjasyöväksi luokiteltavat sairaudet eroavat toisistaan alkuperältään, riskitekijöiltään ja ennusteeltaan, sekä molekulaariselta koostumukseltaan ja patologiselta asteeltaan. Munasarjasyövät jaotellaan alatyyppeihin kasvaimen histologian perusteella. Noin 90% kaikista munasarjasyöpätapauksista on alatyypiltään epiteliaalisia. Epiteliaalinen munasarjasyöpä voi saada alkunsa epiteelikudoksesta munasarjassa tai sen ulkopuolella esimerkiksi vatsakalvosta, munanjohtimista tai kohdun limakalvon kaltaisesta kudoksesta. Muita kuin epiteliaalisia munasarjasyöpätyyppejä ovat itusolu- ja sukupienakasvaimet, jotka ovat harvinaisia. (Vaughan ja muut 2011; Matulonis ja muut 2016.)

Epiteliaaliset munasarjasyövät jaotellaan edelleen kasvaimen histologian perustella seroosiin, endometrioidiin, kirkassoluisen ja musinoosiin alatyyppeihin. Näistä alatyypeistä yleisin on korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjasyöpä. Tämänhetkisen tiedon mukaan epiteliaaliset munasarjasyövät eivät ole peräisin munasarjan epiteelikudoksesta, vaan alkuperäinen pahanlaatuinen muutos on peräisin munasarjan ulkopuolelta ja leviää vasta sekundäärisesti munasarjaan. Korkean ja matalan pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjasyövät ovat peräisin munanjohtimen epiteelikudoksesta (kuva 1.). Kirkassoluiset ja endometrioidit munasarjasyövät ovat peräisin kohdun limakalvon kaltaisesta kudoksesta, jota endometrioosin seurauksena löytyy kohdun ulkopuolelta. Musinoosin munasarjasyövän alkuperästä ei ole varmuutta. (Kurman ja Shih 2010.)

Epiteliaaliset munasarjasyövät voidaan jaotella kahteen ryhmään ensisijaisesti genomien stabiiliuden perusteella. Endometrioidit, kirkassoluiset, musinoosit ja matalan pahanlaatuisuusasteen seroosit kasvaimet kuuluvat tyyppiin I. Ne kasvavat hitaammin ja ovat genomiltaan stabiilimpia kuin tyyppin II kasvaimet. Tyyppiin II kuuluvat korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin kasvaimet, joille on ominaista aggressiivinen kasvu ja leviäminen, sekä merkittävä genomien epästabiilius verrattuna tyyppin I kasvaimiin. Tyyppin II kasvaimien geneettinen epästabiilius johtuu häiriöistä DNA-vaurioiden korjauksessa tarvittavissa signaalintireiteissä. (Torre ja muut 2018; Lisio ja muut 2019.)



Kuva 1. Kudokset, joista epiteelialiset munasarjasyövät ovat peräisin. Korkean ja matalan pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjasyövät ovat peräisin munanjohtimen (1) epiteelikudoksesta. Kirkassoluiset ja endometrioidit munasarjasyövät ovat peräisin kohdun (2) limakalvon kaltaisesta kudoksesta. Musinoosin munasarjasyövän alkuperästä ei ole varmuutta. Epiteelialiset munasarjasyövät leviävät munasarjoihin (3) vasta sekundäärisesti. Kuvassa esitetty lisäksi kohdunkaula (4) ja emätin (5). Kuva kirjasta *Biology: how life works*, Morris ja muut 2016.

1.2 Munasarjasyövän suoja- ja riskitekijät

Periytyvät mutaatiot *BRCA1*- ja *BRCA2*-geeneissä ovat merkittävimpiä geneettisiä riskitekijöitä munasarjasyöpään sairastumiselle. Noin 17 %:lla munasarjasyöpäpotilaista on periytyvä mutaatio *BRCA1*- tai *BRCA2*-geeneissä. Nämä mutaatiot altistavat myös rintasyövälle. *BRCA1*- ja *BRCA2*-proteiineja tarvitaan DNA:n kaksoisjuostekatkosten korjaamisessa HR:n avulla. Periytyvät mutaatiot myös muissa DNA:n korjaamiseen liittyvissä geeneissä, kuten *RAD51C*, *RAD51D* ja *BRIP1*, lisäävät riskiä sairastua munasarjasyöpään. Vaihdevuosisoireiden hormonikorvaushoidon on havaittu lisäävän riskiä sairastua munasarjasyöpään ja yhdistelmäehkäisytablettien käytön on havaittu pienentävän sairastumisriskiä. Lisäksi naisilla, jotka ovat synnyttäneet on pienempi riski sairastua munasarjasyöpään verrattuna naisiin, jotka eivät ole synnyttäneet. Imettäminen pienentää myös sairastumisriskiä naisilla, joilla on periytyvä *BRCA*-mutaatio. Endometrioidin munasarjasyövän riskiä lisää endometriosisi,

sillä endometrioidin munasarjasyövän on todettu saavan alkunsa kohdun ulkopuolisesta, kohdun limakalvon kaltaisesta kudoksesta. (Matulonis ja muut 2016; Lisio ja muut 2019.)

1.3 Munasarjasyövän hoito

Munasarjasyövän hoito koostuu leikkauksesta ja solunsalpaajahoidosta. Hoidossa käytetään platinapohjaisia sisplatiinia ja karboplatiinia yhdistelmänä taksoidien, paklitaxelin ja dosetakselin, kanssa. Sisplatiini ja karboplatiini aiheuttavat DNA-juosteiden sisäisiä ja juosteiden välisiä ristsidoksia, jotka häiritsevät DNA:n korjausmekanismien toimintaa aiheuttaen DNA-vaurioita. Solun DNA:han kertyvät vauriot johtavat apoptoosiin. Taksoidit stabiloivat mikrotubulusten rakennetta, minkä seurauksena mikrotubulusten normaali toiminta estyy. Mitoosissa mikrotubuluksista koostuva tumasukkula ei muodostu normaalisti ja solun jakautuminen estyy, mikä voi johtaa apoptoosiin. Sisplatiinin ja karboplatiinin lisäksi munasarjasyövän hoitoon on hyväksytty poly(ADP-riboosi)-polymeraasien (PARP) estäjä olaparib ja angiogeneesin estäjä bevasitumabi. (Rowinsky 1997; Konstantinopoulos ja muut 2015; Matulonis ja muut 2016; Lisio ja muut 2019.)

Epiteliaalinen munasarjasyöpä diagnosoidaan yleensä vasta taudin edettyä. Tauti on usein herkkä platinapohjaiselle kemoterapialle, mutta taudin uusiutuminen on yleistä erityisesti potilailla, joilla se on ennen diagnoosia ehtinyt edetä. Uusiutuneelle epiteliaaliselle munasarjasyöpäsyöväälle kehittyy usein resistenssi platinapohjaiselle kemoterapialle. Resistenssin kehittyminen on suuri ongelma munasarjasyövän hoidossa. Munasarjasyöpäpotilaita, joille on kehittynyt resistenssi platinapohjaiselle kemoterapialle, voidaan hoitaa käyttämällä pegyloitua doksorubisiinia, topotekaania, gemsitabiinia, etoposidiä ja vinorelpiiniä, mutta vaste näille lääkeaineille on vain noin 10-15 %. Noin 80 % potilaista, joilla sairaus diagnosoitiin alun perin edenneessä vaiheessa, kehittyy resistenssi hoidolle, mikä johtaa lopulta kuolemaan. (Matulonis ja muut 2016; Lisio ja muut 2019.)

1.4 Korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjasyöpä

Korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjasyöpä on munasarjasyöpätyypeistä yleisin ja aiheuttaa eniten kuolemia. HGSO:n ennuste ei ole juurikaan parantunut vuosikymmeniin. Vaikka tauti luokitellaan munasarjasyöväksi, useiden tutkimusten mukaan suurin osa HGSO-tapauksista saa alkunsa todennäköisesti munanjohtimen epiteelikudoksesta. Kim (2015) ja muiden HGSO:n hiirimallilla tekemän tutkimuksen mukaan osa HGSO-tapauksista saattaa kuitenkin saada alkunsa munasarjan soluista. (Konstantinopoulos ja muut 2015; Bowtell ja muut 2015.)

Antionkogeeni *TP53*, joka koodaa solusyklin säätelyyn osallistuvaa p53-transkriptiofaktoria, on lähes poikkeuksetta mutatoitunut HGSO:ssä ja noin 50 %:ssa tautitapauksista DNA:n kaksoisjuostekatkosten korjaaminen HR:n avulla on puutteellista. DNA-vaurioiden korjaamisen puutteellisuus johtuu pääasiassa mutaatioista tai epigeneettisistä muutoksista *BRCA1*- ja *BRCA2*-geeneissä tai muissa HR-signaalintiketjun komponenteissa. HGSO:t ovat usein herkkiä platinapohjaiselle kemoterapialle. Herkkyyden ajatellaan johtuvat puutteista DNA-vaurioiden korjauksessa HR:n avulla, sillä potilaat, joilla *BRCA1* tai *BRCA2*-geeni on mutatoitunut, ovat herkempiä platinapohjaiselle kemoterapialle. (Konstantinopoulos ja muut 2015.)

HGSO diagnosoidaan usein vasta edenneessä vaiheessa ja noin 80-90 %:lla kyseisistä potilaista ilmenee resistenssi platinapohjaiselle kemoterapialle. Resistenssin syntyyn voivat johtaa esimerkiksi mutaatiot, jotka palauttavat DNA:n korjauksessa tarvittavien proteiinien toiminnan normaaliksi. (Bowtell ja muut 2015; Konstantinopoulos ja muut 2015.)

1.5 DNA-vaurioiden korjaus

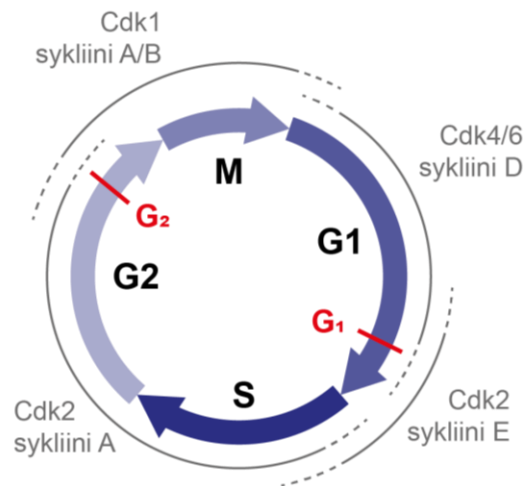
DNA-vaurioita syntyy soluissa valtava määrä sattumanvaraisesti. Genomin stabiiliuden säilyttämiseksi soluille on kehittynyt monimutkainen DNA-vauriovaste, jonka tarkoitus on havaita ja korjata DNA-vaurioita, sekä pysäyttää solusykli, jotta vauriot ehditään korjaamaan ennen solunjakautumista. Jos DNA-vauriot ovat liian suuria korjattavaksi, DNA-vauriovaste käynnistää apoptoosin. DNA-vaurioista vain hyvin pieni osa jää pysyviksi muutoksiksi DNA:han, sillä DNA:n korjausmekanismit korjaavat vaurioita normaalissa solussa hyvin tehokkaasti. (Ronco ja muut 2017.)

Eri DNA-vauriovasteen signalointireitit aktivoituvat riippuen vaurion tyypistä. DNA-vauriot voivat olla kaksoisjuostekatkoksia, yhden juosteen katkoksia tai muita muutoksia DNA:n normaalissa rakenteessa. DNA-vauriot aiheutuvat sisäsyntyisistä tai ulkosyntyisistä tekijöistä. Esimerkiksi DNA:n replikaatiossa syntyneet virheet ja solun metabolian sivutuotteiden aiheuttamat vauriot ovat sisäsyntyisiä DNA-vaurioita. Ulkosyntyisiä DNA-vaurioita aiheuttavat esimerkiksi kemialliset aineet ja UV-säteily. DNA-vauriot, joita ei korjata voivat johtaa syöpään. Perinnöllinen rinta- ja munasarjasyöpä on yksi useista sairauksista, joiden syntyyn on yhdistetty perinnölliset mutaatiot DNA-vaurioiden korjaukseen liittyvissä geneeissä. Perinnöllinen rinta- ja munasarjasyöpä johtuu mutaatioista *BRCA1*- ja *BRCA2*-geneeissä, joita tarvitaan DNA:n kaksoisjuostekatkosten korjaamisessa HR:n avulla. (Ronco ja muut 2017.)

1.5.1 DNA-vaurioiden tarkastuspisteet

Solusyklissä on tarkastuspisteitä, joissa solut tarkastavat ovatko olosuhteet sopivat solunjakautumiselle. Tarkastuspisteissä tarkastetaan muun muassa onko ravintoaineita tarpeeksi saatavilla, onko uusille soluille tilaa tai onko solun DNA vaurioitunut. G₁- ja G₂-tarkastuspisteet ovat tärkeitä DNA-vaurioiden havaitsemisessa ja korjaamisessa (kuva 2.). DNA-vaurioiden tarkastuspisteet käynnistävät signalointiketjuja, jotka aktivoivat vaurioiden korjaamisessa tarvittavia proteiineja ja antavat soluille aikaa korjata mahdolliset DNA-vauriot ennen siirtymistä solusyklin seuraavaan vaiheeseen. DNA-vaurioista käynnistyvät signalointiketjut pysäyttävät solusyklin etenemisen vaikuttamalla solusykliä kontrolloiviin sykliineihin ja sykliineistä riippuvaisiin kinaaseihin (engl. *cyclin dependent kinase*, Cdk). G₁-tarkastuspisteessä mahdolliset DNA-vauriot havaitaan ja korjataan ennen DNA:n kahdentumista solusyklin S-

vaiheessa. G₂-tarkastuspisteessä korjataan DNA-vauriot, joita G₁-tarkastuspisteessä ei ole havaittu tai jotka ovat syntyneet DNA:n kahdentuessa esimerkiksi DNA-polymeraasientsyymin tekemien virheiden vuoksi, ennen solusyklin etenemistä M-vaiheeseen eli mitooseen. (Geenen ja Schellens 2017.)



Kuva 2. Solusyklin vaiheet. Mitosin (M) jälkeen alkaa ensimmäinen kasvuvaihe (G₁). G₁:n loppuvaiheessa on ensimmäinen DNA-vaurioiden tarkastuspiste, eli G₁-tarkastuspiste. Solun DNA kahdentuu S-vaiheessa, jota seuraa toinen kasvuvaihe (G₂). G₂:n lopussa on toinen DNA-vaurioiden tarkastuspiste, eli G₂-tarkastuspiste. G₂-tarkastuspisteessä DNA-vauriot korjataan ennen solusyklin etenemistä mitooseen. Solusyklin eri vaiheissa tarvittavat sykliinit ja sykliineistä riippuvaiset kinaasit (Cdk) säätelevät solusyklin vaiheiden etenemistä. Sykliinien ja Cdk:den määrä vaihtelee solusyklin aikana soluissa, minkä seurauksena solu siirtyy syklin vaiheesta toiseen. Muokattu kuvasta Boxem 2006.

Riippuen DNA-vaurion tyypistä, solussa aktivoituvat eri signalointireitit. MRN-proteiinikompleksi (Mre11-Rad50-NBS1) havaitsee DNA:n kaksoisjuostekatkokset ja aktivoi puolestaan ATM-kinaasia (engl. *ataxia-telangiectasia mutated*). Rad9-Hus1-Rad1-kompleksi havaitsee DNA:n yhden juosteen katkokset ja yhteistyössä useiden muiden proteiinien kanssa aktivoi ATR-kinaasia (engl. *ataxia-telangiectasia and Rad3-related*). ATR ja ATM vaikuttavat useisiin kohdeproteiineihinsa, minkä seurauksena, DNA-vaurion vakavuudesta riippuen, solusykli pysähtyy tilapäisesti tai solu kuolee apoptoottisesti. (Ronco ja muut 2017.)

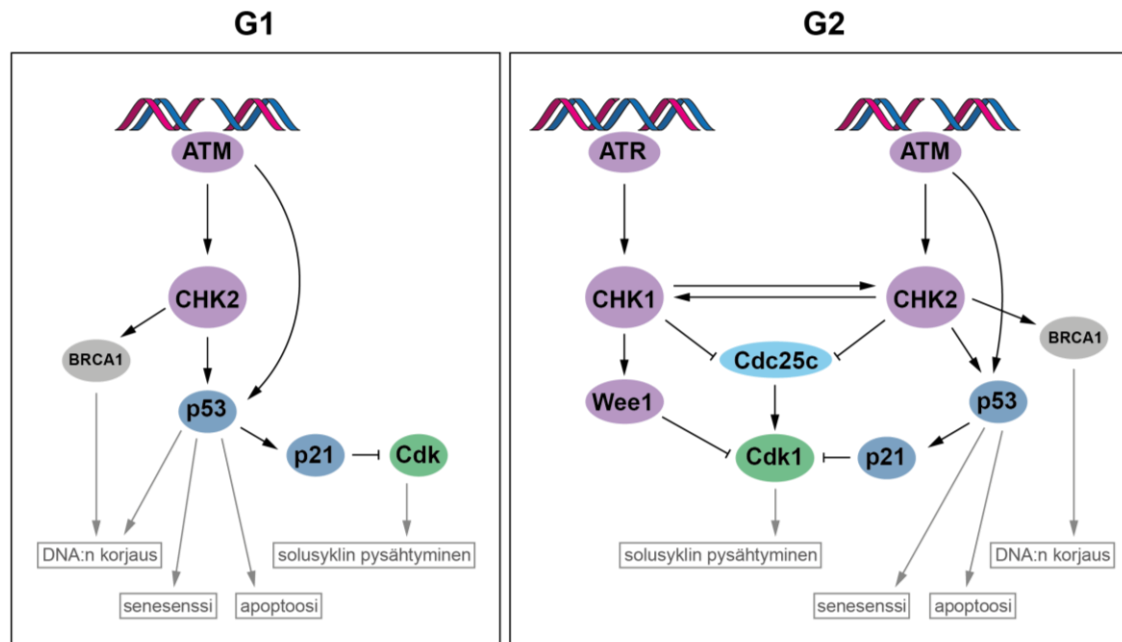
G₁-tarkastuspiste estää vaurioituneen DNA:n replikaation (kuva 3). G₁-tarkastuspisteessä kaksoisjuostekatkosten aiheuttamasta solusyklin pysähtymisestä vastaa pääasiassa ATM-kinaasin aktivaatiosta alkava signalointiketju. MRN-proteiinikompleksin aktivoima ATM aktivoi fosforyloimalla CHK2-kinaasia (engl.

checkpoint kinase 2). CHK2-kinaasi ja ATM aktivoivat transkriptiofaktori p53:a fosforyloimalla sitä. Normaalisti jakautuvassa solussa E3 ubikitiini-proteiiniligaasi Mdm2 merkitsee p53:n ubikitiinilla proteasomissa tapahtuvaa hajottamista varten. Mdm2 ei kuitenkaan tunnista DNA-vaurion seurauksena fosforyloitua p53:a, jolloin p53 on vapaa vaikuttamaan kohdegeeniensä transkriptioon. Fosforyloitu p53 aktivoi muun muassa Cdk-inhibiittori p21:n geenin transkriptiota, minkä seurauksena solusyklin etenemisessä tarvittavien Cdk:en toiminta estyy ja solu saa aikaa DNA-vaurioiden korjaamiseen. Riippuen DNA-vaurion vakavuudesta, p53:n aktivaatio voi johtaa apoptoosiin tai lopulliseen solunjakautumisen lopettamiseen eli replikaatiiviseen senesenssiin. (Barnum ja O'Connell 2014.)

G₂-tarkastuspiste estää solua etenemästä mitooseen, jos DNA on vaurioitunut (kuva 3). ATM:n aktivoima CHK2 ja ATR:n välityksellä aktivoitua CHK1-kinaasi (engl. *checkpoint kinase 1*) edistävät solusyklin pysähtymistä G₂-tarkastuspisteessä fosforyloimalla Cdc25c-fosfataasia (engl. *cell division cycle 25 homolog*), joka inaktivoituu. Inaktiivinen Cdc25c ei defosforyloi Cdk1/sykliini B -kompleksia, jolloin kompleksi pysyy fosforyloituna eli inaktiivisena eikä solusykli etene mitooseen. Aktiivinen Cdc25c edistää solusyklin etenemistä mitooseen defosforyloimalla mitosia edistävää Cdk1/sykliini B -kompleksia. (Geenen ja Schellens 2017.)

CHK1 edistää solusyklin pysähtymistä G₂-vaiheeseen fosforyloimalla Cdc25c:n lisäksi Wee1-kinaasia, mikä johtaa Wee1:n aktivaation. Aktiivinen Wee1 fosforyloi Cdk1/sykliini B -kompleksia, jolloin se pysyy inaktiivisena, solusykli pysähtyy G₂-vaiheeseen ja solu saa aikaa DNA-vaurioiden korjaamiseen. Kun DNA-vaurioita on havaittu, Wee1 fosforyloi Cdk1/sykliini B -kompleksia ja Cdc25c ei defosforyloi sitä, jolloin kompleksi pysyy inaktiivisena eikä solusykli etene. Jos DNA vaurioita ei havaita, Wee1 ei ole aktiivinen ja Cdc25c defosforyloi Cdk1/sykliini B -kompleksin, joka aktivoituu, jolloin solusykli etenee mitooseen. (Konstantinopoulos ja muut 2015; Geenen ja Schellens 2017; Ronco ja muut 2017.)

Transkriptiofaktori p53 on osallisena myös G₂-tarkastuspisteessä, jossa p53:n aktivoima p21 inhiboi mitoosia edistävää Cdk1:tä. Cdk1:n inhibitio estää solusyklin etenemisen mitoosiin. DNA-vaurion vakavuudesta riippuen p53:n aktivaatio voi johtaa solun senesenssiin tai apoptoosiin myös G₂-tarkastuspisteessä. (Hakem 2008.)



Kuva 3. DNA-vaurioiden tarkastuspisteet. G₁-tarkastuspisteessä kaksoisjuoste-katkoksen havaitsemista seuraa ATM:n aktivaatio. ATM ja sen aktivoima CHK2 aktivoivat p53:a, joka aktivoi puolestaan Cdk-inhibiittori p21:ä. CHK2 aktivoi myös BRCA1:tä. BRCA1, p53 ja p21:n aktivaation seurauksena solusykli pysähtyy, DNA-vaurio korjataan, solu menee senesenssiin tai solu kuolee apoptoottisesti DNA-vaurion vakavuudesta riippuen. G₂-tarkastuspisteessä ATM:stä lähtevän signalointireitin lisäksi, yhden juosteen katkoksen havaitsemisesta seuraa ATR:n aktivaatio. ATR aktivoi CHK1:tä, joka CHK2:n kanssa aktivoivat toisiaan ristiin. CHK1 ja CHK2 inhiboivat Cdc25c:tä, jolloin Cdk1 pysyy inaktiivisena ja solusykli pysähtyy. CHK1 aktivoi myös Wee1:tä, joka myös inhiboi Cdk1:tä johtaen solusyklin pysähtymiseen.

1.5.2 DNA-vaurioiden korjausmekanismit

Solut altistuvat jatkuvasti DNA:ta vaurioittaville tekijöille. Genomin stabiiliuden säilyttämiseksi, DNA-vaurioiden korjaus on erittäin tärkeää. DNA-vaurioiden korjaamista varten, soluissa on viisi pääasiallista korjausmekanismia: kahdentumisvirheiden korjaus (engl. *mismatch repair*, MMR), nukleotidinpoistokorjaus (engl. *nucleotide excision repair*, NER), emäksen korjausmekanismi (engl. *base excision repair*, BER), homologinen rekombinaatio (HR) ja ei-homologisten päiden yhdistäminen (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ). (Chatterjee ja Walker 2017.)

MMR-mekanismilla korjataan DNA:n kahdentumisen yhteydessä syntyneitä emäspariutumavirheitä ja yhden tai muutaman emäksen insertioita ja deleetioita. NER-mekanismilla korjataan yhden juosteen vaurioita, jotka häiritsevät DNA:n normaalia kaksoiskierrerakennetta. Vauriot yksittäisissä DNA-juosteen emäksissä, jotka eivät häiritse DNA:n kaksoiskierrerakennetta ja yhden DNA-juosteen katkokset korjataan BER-mekanismilla. Yhden juosteen katkoksen korjaamisessa BER-mekanismilla tarvitaan PARP-entsyymiä, joka havaitsee yhden juosteen katkokset DNA:ssa ja aktivoi muita korjaamisessa tarvittavia entsyymejä. (Giglia-Mari ja muut 2011; Chatterjee ja Walker 2017.)

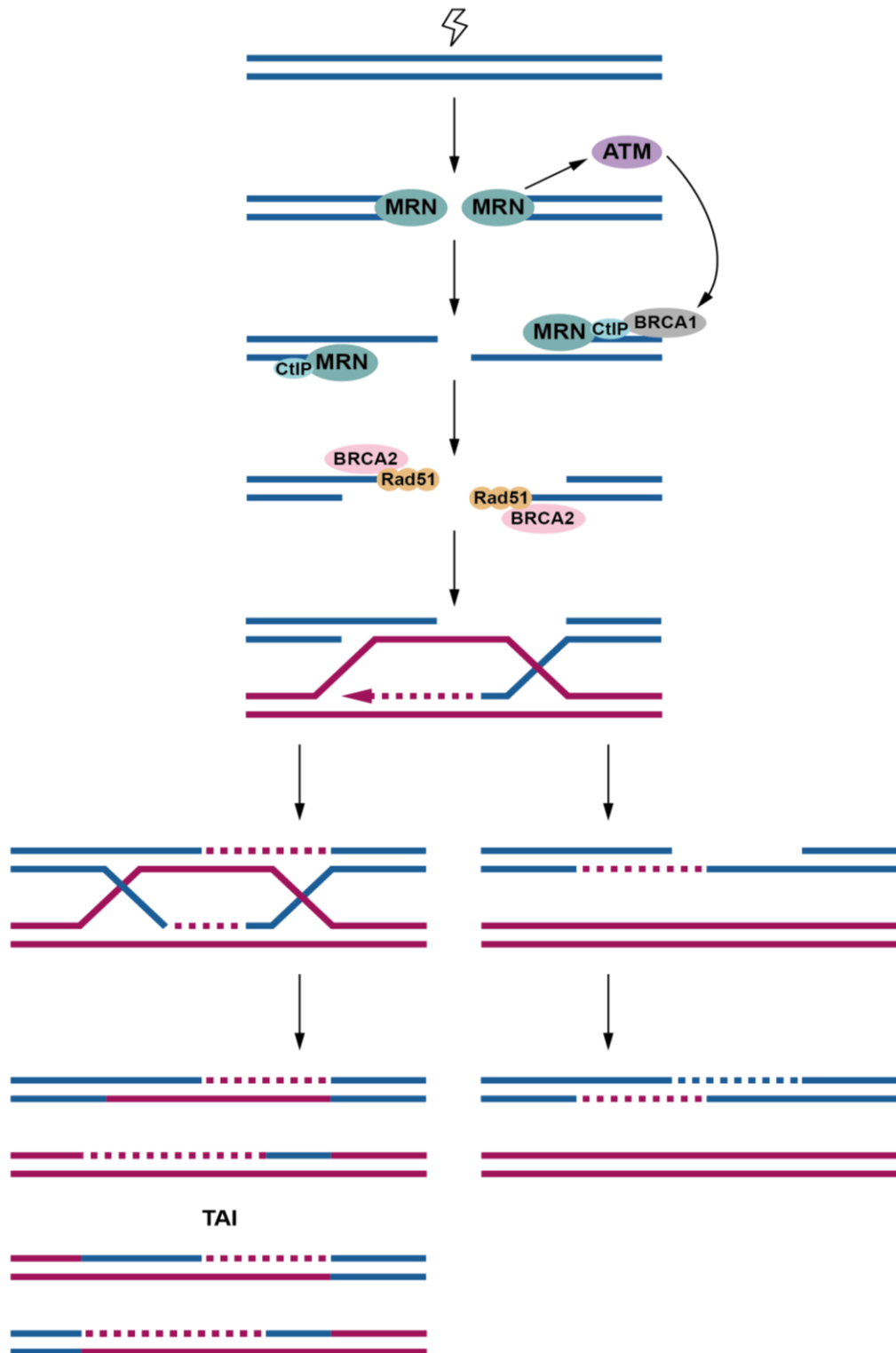
DNA:n kaksoisjuostekatkokset ovat DNA-vaurioista vakavimpia ja hankalimpia korjata, koska vaurion korjaamiseksi ei ole saatavilla vaurioitumatonta juostetta, jonka perusteella vaurioitunut juoste voitaisiin korjata. DNA:n kaksoisjuostekatkoksia korjataan homologiseen rekombinaatioon (HR) ja ei-homologisten päiden yhdistämiseen (NHEJ) perustuvien korjausmekanismien avulla. HR:ään perustuvassa korjauksessa tarvitaan homologinen sisarkromatidi, joten se toimii vain solusyklin S- ja G₂-vaiheissa, eli DNA:n kahdentumisen jälkeen. Kaksoisjuostekatkokset voidaan korjata NHEJ-mekanismilla kaikissa solusyklin vaiheissa, sillä siinä ei tarvita sisarkromatidia. Kaksoisjuostekatkosten korjaaminen HR:lla on virheetöntä, sillä katkos korjataan käyttäen sisarkromatidia mallina. NHEJ-mekanismissa tapahtuvassa DNA-päiden prosessoinnissa voi hävitä tai aiheutua muutoksia nukleotideissa, mikä johtaa mekanismin virhealttiuteen. (Giglia-Mari ja muut 2011.)

1.5.3 DNA-vaurioiden korjaus homologisen rekombinaation avulla

Kaksoisjuostekatkosten korjaamisessa HR:n avulla käytetään mallina sisarkromatidia, jonka homologisen DNA-sekvenssin avulla vaurioitunut DNA voidaan korjata virheettömästi (kuva 4). MRN-kompleksi havaitsee kaksoisjuostekatkoksen DNA:ssa ja aktivoi ATM-kinaasia. ATM ja sen aktivoiva CHK2 edistävät HR:n avulla tapahtuvaa DNA:n kaksoisjuostekatkoksien korjaamista fosforyloimalla BRCA1-proteiinia. Kaksoisjuostekatkoksen seurauksena syntyneitä DNA-juosteiden päitä muokataan siten, että syntyy yksijuosteiset DNA-päät. BRCA1-proteiini osallistuu DNA-juosteiden päiden prosessointiin yhdessä muun muassa endonukleaasi CtIP:n kanssa. BRCA2-proteiinia tarvitaan syntyneiden yksijuosteisten DNA-päiden päällystämiseen RAD51-proteiinilla. Yksijuosteinen RAD51-proteiinilla ja muilla tekijöillä päällystetty DNA-

juoste tunkeutuu sisarkromatidin kaksoisjuosterakenteeseen, josta etsitään komplementaarinen sekvenssi. Komplementaarisen sekvenssin löydyttyä, uutta DNA:ta syntetisoidaan käyttäen sisarkromatidin juostetta templaattina. Syntetisoitu DNA-juoste liittyy takaisin vaurioituneeseen juosteeseen ja komplementaarinen juoste syntetisoidaan. (Evers ja muut 2010; Chatterjee ja Walker 2017; Wright ja muut 2018.)

Munasarjasyövän hoidossa käytetyt platinajohdokset aiheuttavat DNA juosteiden sisäisiä ja välisiä ristsidoksia. Ristsidokset ovat erittäin haitallisia soluille, sillä ne estävät DNA:n transkription, replikaation ja korjauksen. Ristsidosten korjaamisessa tarvitaan Fanconi Anemia -proteiineja (FA) sekä HR:ää. DNA:n replikaatiossa replikaatiohaarukka ei pysty etenemään ristsidoksen yli. FA-proteiinit tunnistavat pysähtyneen replikaatiohaarukan ja katkaisevat DNA-juosteet. Syntynyt kaksoisjuostekatkos korjataan HR:n avulla. (Konstantinopoulos ja muut 2015.)



Kuva 4. DNA-vaurioiden korjaus homologisen rekombinaation avulla. MRN kompleksi havaitsee kaksoisjuostekatkoksen DNA:ssa ja aktivoi ATM:ää. ATM puolestaan aktivoi BRCA1:tä. BRCA1 ja CtIP osallistuvat DNA-juosteiden päiden prosessointiin. Yksijuosteiset DNA-päät päällystetään RAD51:llä BRCA2:n avustuksella. RAD51:llä päällystetty DNA-juoste tunkeutuu sisarkromatidin kaksoisjuosterakenteeseen. Komplementaarisen sekvenssin löydyttyä sisarkromatidista, uutta DNA:ta syntetisoidaan käyttäen juostetta templaattina. Syntetisoitu DNA-juoste liittyy takaisin vaurioituneeseen juosteeseen ja komplementaarinen juoste syntetisoidaan.

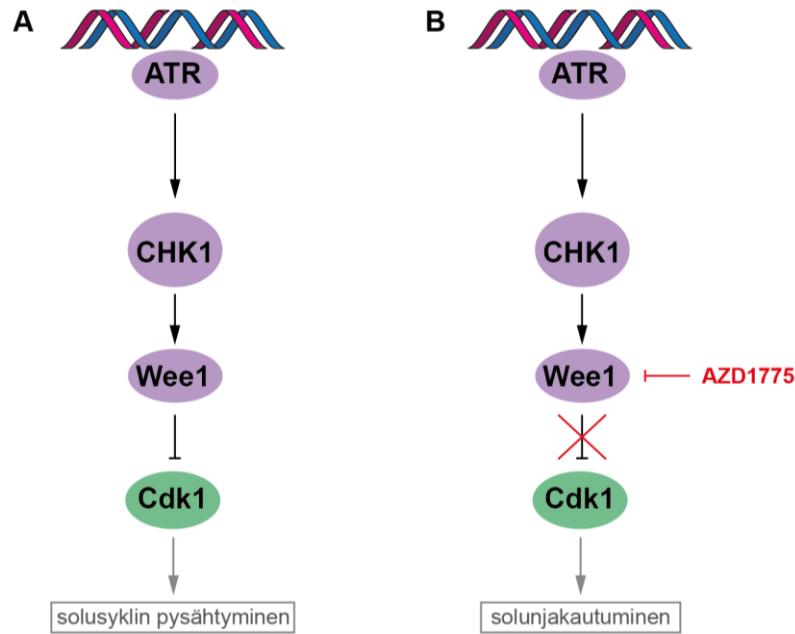
1.6 DNA-vaurioiden korjausmekanismeihin kohdennetut lääkkeet

HGSOC:ssä

TP53-geeni on mutatoitunut HGSOC:ssä ja noin 50 %:ssa tautitapauksista DNA:n kaksoisjuostekatkosten korjaaminen HR:n avulla on puutteellista mutaatioiden tai epigeneettisten muutosten takia. Näiden mutaatioiden ja muutosten takia HGSOC-solujen DNA-vaurioiden korjaus on vaarantunut. DNA-vaurioiden korjauksen puutteellisuuden takia, HGSOC:n hoitoon on kehitetty ja kehitetään lääkkeitä, jotka edelleen heikentävät HGSOC-solujen kykyä korjata DNA-vaurioita. Kun DNA:n korjausmekanismit eivät toimi jatkuvasti jakautuvissa syöpäsoluissa normaalisti, voi seurauksena olla mitoottinen katastrofi. Mitoottinen katastrofi tarkoittaa tilannetta, jossa solusyli etenee mitoosiin ennen aikaisesti tai väärään aikaan, mikä johtaa solun kuolemaan. Jos solu siirtyy mitoosiin vaurioituneella DNA:lla, DNA-vauriot voivat saada aikaan mitoottisen katastrofin. DNA-vaurioiden korjausmekanismeihin kohdennetulla hoidolla ei ole niin suuria vaikutuksia normaaleihin soluihin kuin HGSOC-soluihin, sillä normaaleissa soluissa ei ole mutaatioita, joiden takia DNA-vaurioiden korjaus olisi alun perin vaarantunut.

1.6.1 Wee1-kinaasin inhibitio

Wee1 on tyrosiinikinaasi, joka säätelee solusyklin G_2 -tarkastuspistettä ja estää solusyklin etenemisen mitoosiin, jos DNA-vaurioita on havaittu. Wee1-kinaasi aktivoituu, jos DNA-vaurioita havaitaan G_2 -tarkastuspisteessä. Aktiivinen Wee1 fosforyloi CDK1-sykliini B-kompleksia, joka pysyy inaktiivisena ja solusyklin eteneminen mitoosiin estyy. Wee1:n inhibitio johtaa CDK1-sykliini B-kompleksin aktivaatioon ja solusyklin etenemiseen mitoosiin myös vaurioituneella DNA:lla (kuva 5). Vaurioitunut DNA mitoosissa voi johtaa mitoottiseen katastrofiin ja solun kuolemaan. (Ronco ja muut 2017.)



Kuva 5. Wee1-kinaasin inhiboiminen. A. Wee1-kinaasi aktivoituu ATR:n ja CHK1:n välityksellä, kun DNA-vaurio on havaittu. Wee1-kinaasi inhiboi solusyklin etenemisessä tarvittavaa Cdk1:tä, jolloin solusykli pysähtyy ja solu saa aikaa DNA-vaurion korjaamiseen. B. Jos Wee1-kinaasin toiminta estetään Wee1-kinaasin inhibiittorilla (AZD1775), Wee1-kinaasi ei inhiboi Cdk1:tä, minkä seurauksena solusykli etenee mitooseen. Mitosissa DNA-vaurio voi johtaa solun kuolemaan.

HGSOC-solut ovat riippuvaisia G₂-tarkastuspisteessä tapahtuvasta solusyklin pysäyttämisestä ja DNA-vaurioiden korjaamisesta vaurioiden aiheuttaman solukuoleman estämiseksi, sillä G₁-tarkastuspisteessä tarvittava TP53 on niissä mutatoitunut. Wee1-kinaasin inhiboiminen ja siten G₂-tarkastuspisteen syrjäyttäminen ajaa HGSOC-solut mitooseen, jossa DNA-vauriot aiheuttavat mitoottisen katastrofin ja solun kuoleman. Wee1:n inhibitio siis herkistää G₂-tarkastuspisteestä riippuvaiset syöpäsolut lääkeaineiden aiheuttamille sekä sisäsyntyisille DNA-vaurioille. Solut, joilla on villityypin TP53-geeni, voivat pysäyttää solusyklin ja korjata mahdolliset DNA-vauriot myös G₁-tarkastuspisteessä. Normaaleissa soluissa on villityypin TP53-geeni, joten G₂-tarkastuspisteen inhiboimisella ei ole niin suurta vaikutusta normaaleihin soluihin kuin HGSOC-soluihin. (Matheson ja muut 2016.)

Noin 50%:ssa HGSOC-tapauksista DNA:n kaksoisjuostekatkosten ja DNA:n ristisidosten korjaaminen HR:n avulla on puutteellista. Nämä solut ovat herkempiä G₂-tarkastuspisteen inhibiittoreille, kun ne yhdistetään DNA:ta vaurioittavien kemoterapeuttisten lääkeaineiden kanssa kuin solut, joissa DNA-vaurioiden korjaus HR:n avulla toimii. Suurempi herkkyys johtuu G₁-tarkastuspisteen toimimattomuuden

lisäksi lääkeaineiden aiheuttamien DNA-vaurioiden puutteellisesta korjauksesta. Myös sisäsyntyiset DNA-vauriot soluissa, joissa HR on puutteellista, saattavat herkistää solut tarkastuspisteen inhibiittoreille. (Konstantinopoulos ja muut 2015.)

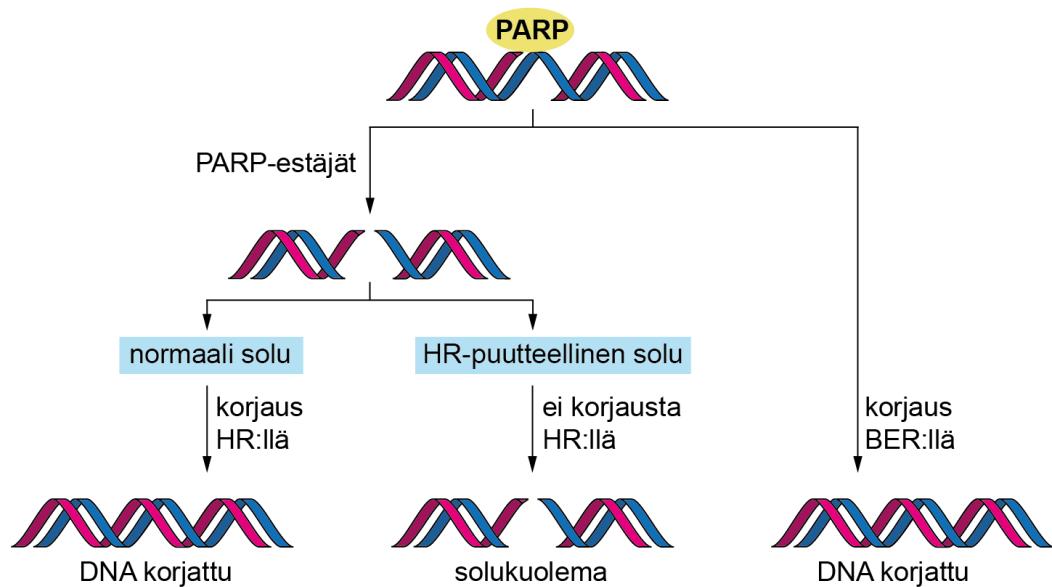
AZD1775 on pienimolekyylinen tyrosiinikinaasi-inhibiittori, joka inhiboi valikoivasti Wee1-kinaasia. AZD1775:tä on tutkittu muutamissa kliinisissä tutkimuksissa ja useita kliinisiä tutkimuksia on käynnissä. AZD1775:tä on tutkittu monoterapiana ja yhdistelmänä muiden kemoterapeuttisten lääkeaineiden kanssa munasarjasyövässä sekä useissa muissa syövissä, kuten keuhko- ja rintasyövässä sekä leukemian hoidossa. Khanh Do (2015) tutkimusryhmineen tutkivat AZD1775:tä monoterapiana faasin I kliinisessä tutkimuksessa potilailla, joilla oli huonosti hoitoon reagoivia kiinteitä kasvaimia. Tutkimuksessa AZD1775:n havaittiin olevan kliinisesti aktiivinen monoterapiana potilailla, joilla oli BRCA-mutaatio. Munasarjasyöpäpotilailla tehdyssä faasin II kliinisessä tutkimuksessa, Leijen (2016) tutkimusryhmineen havaitsi AZD1775:n tehostavan karboplatiinin tehokkuutta *TP53*-mutatoituneissa syöpäkasvaimissa.

1.6.2 PARP-estäjät

DNA-vaurioiden puutteellinen korjaus HR:n avulla herkistää solut myös muille DNA-korjausmekanismien inhibiittoreille. Syöpäsolut, joissa DNA:n korjaus HR:n avulla on puutteellista, ovat riippuvaisia muista DNA-vaurioiden korjausmekanismeista. Soluissa syntyy DNA-vaurioita jatkuvasti ja jos ne jäävät korjaamatta, solu kuolee.

PARP:t ovat suuri ryhmä entsyymejä, joilla on moninaisia tehtäviä solussa. PARP-entsyymejä tarvitaan muun muassa DNA:n yhden juosteen katkoksen korjaamisessa BER-mekanismilla. Jos PARP:n toiminta estetään ja solussa tapahtuu DNA:n replikaatio, seurauksena molempiin juosteisiin tulee katkos (kuva 6). Kaksoisjuostekatkokset korjataan HR:n avulla normaaleissa soluissa, mutta HGSOc soluissa, joissa DNA-vaurioiden korjaus HR:n avulla ei toimi normaalisti, kaksoisjuostekatkokset voidaan korjata virhealttiilla NHEJ-mekanismilla. Virheet DNA-vaurioiden korjauksessa johtavat genomien epästabiiliuteen ja edelleen solun kuolemaan. PARP-estäjät aiheuttavat synteettistä letaaliutta vain soluissa, joissa DNA:n kaksoisjuostekatkosten korjaus HR:n avulla on puutteellista. Synteettinen letaalius tarkoittaa ilmiötä, jossa solu sietää yhden geenin mutaation tai inhibition aiheuttamat

vaikutukset, mutta samanaikainen toisen geenin tai signaalintireitin toiminnan menetys johtaa solun kuolemaan. (Konstantinopoulos ja muut 2015; Lisio ja muut 2019.)



Kuva 6. PARP-estäjien toimintamekanismi. PARP:a tarvitaan DNA:n yhden juosteen katkoksen korjaamisessa BER-mekanismilla. Jos PARP:en toiminta solussa estetään, yhden juosteen katkokset muuttuvat kaksoisjuostekatkoksiksi. Normaalissa solussa kaksoisjuostekatkokset korjataan HR:llä, mutta HR-puutteellisessa solussa korjausta HR:llä ei tapahdu ja DNA-vaurio voi johtaa solun kuolemaan. Myös muita toimintamekanismeja PARP-estäjille on ehdotettu. Muokattu kuvasta Sonnenblick ja muut 2015.

Yhdysvaltain lääke- ja elintarvikevirasto (FDA) ja Euroopan lääkevirasto (EMA) hyväksyivät PARP-estäjä olaparibin käytön munasarjasyövän hoitoon vuonna 2014. Olaparibin käyttö on hyväksytty potilaille, joilla on somaattinen tai ituradan BRCA-mutaatio ja vähintään osittainen vaste platinapohjaiselle kemoterapialle. Olaparibia käytetään pääasiassa uusiutuneen munasarjasyövän ylläpito-hoidossa. Sen käyttö ei paranna syöpää, vaan estää sen etenemistä. Olaparibin käytöstä saattaisi olla hyötyä useammalle potilaalle, sillä DNA-vaurioiden korjaus HR:n avulla voi olla puutteellista myös ilman BRCA-mutaatiota.

2 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Tutkimusprojektin tarkoituksena oli: 1. Verrata Wee1-kinaasin inhibiittorin AZD1775:n vaikutusta elinkelpoisuuteen HGSOE-soluissa, joissa HR on toimivaa tai puutteellista. 2. Tutkia AZD1775 vaikutusta yhdessä muiden lääkeaineiden kanssa. 3. Selvittää aiheuttaako AZD1775 käsittely solujen DNA:han katkoksia.

AZD1775 oli tutkimusryhmäni aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu lupaavaksi lääkeaineeksi HGSOE:n hoidossa. Tutkimusryhmässä oli tutkittu HGSOE-solulinjojen herkkyyttä ja resistenssiä 306:lle lääkeaineelle DSRT-testillä (engl. *drug sensitivity and resistance testing*, DSRT, Yadav ja muut 2014). Tutkituista lääkeaineista AZD1775:n havaittiin tehokkaimmin estävän HGSOE-solujen proliferaatiota (artikkeli valmisteilla).

Tutkimukseen valittiin neljä kaupallista HGSOE-solulinjaa, joista kahdessa HR:n tiedettiin olevan puutteellista ja kahdessa toimivaa (Tumiati ja muut 2018). Kaupalliset solulinjat oli todettu HGSOE-solulinjoiksi Domcke (2013) ja muiden tutkimuksessa. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin potilasperäisiä HGSOE-solulinjoja, jotka olivat peräisin Turun yliopistollisessa keskussairaalassa hoidettujen, tutkimukseen suostumuksensa antaneiden, munasarjasyöpäpotilaiden askitesnesteestä tai kasvainkudoksesta. Potilasperäisten HGSOE-solulinjojen HR:n tila määritettiin immunofluoresenssiin perustuvalla menetelmällä. Potilasperäiset solulinjat oli todennettu syöpäsoluiksi *TP53*-geenistä löytyvän mutaation perusteella.

AZD1775:n vaikutusta HGSOE-soluihin tutkittiin yksin sekä kahden munasarjasyövän hoidossa tällä hetkellä käytössä olevan lääkeaineen, sislatiinin ja olaparibin, kanssa. Hypoteesina oli, että vaste AZD1775:lle yksin ja yhdistelmässä sislatiinin ja olaparibin olisi voimakkaampi HR-puutteellisissa soluissa, kuin soluissa, joissa HR on toimivaa, sillä DNA-vaurioiden korjaaminen on HR-puutteellisissa soluissa heikentynyt jo ennen lääkeaineiden vaikutusta. Vastetta lääkeaineille seurattiin määrittämällä solujen elinkelpoisuus luminesenssiin perustuvalla menetelmällä, joka ilmaisee metabolisesti aktiivisten solujen olemassaolon mittaamalla ATP:n määrää. Eniten solujen elinkelpoisuutta heikentävällä lääkeaineella tai lääkeaineyhdistelmällä oli siis paras vaste.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Soluviljely

Tutkimuksessa käytettiin neljää kaupallista HGSOC-solulinjaa; OVCAR8- (National Cancer Institute, Bethesda, MD, Yhdysvallat), OVCAR3- (American Type Culture Collection, Manassas, VA, Yhdysvallat) Kuramochi- (Anna Vähäraution tutkimusryhmä, Helsingin yliopisto) ja COV318-solulinjoja (Liisa Kaupin tutkimusryhmä, Helsingin yliopisto) sekä kolmea potilasperäistä solulinjaa; M048i, H002i ja OC002. Soluja kasvatettiin solukasvatuspulloissa kasvatusliuoksessa. Kuramochi-, OVCAR8- ja OVCAR3-solulinjoja kasvatettiin adherentteina RPMI-1640-kasvatusliuoksessa (Lonza, Basel, Sveitsi), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Lonza), 2 mM UltraGlutamiini™ I:tä (Lonza) ja 100 µg/ml penisilliinistreptomysiiniä (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). COV318-solulinjan soluja kasvatettiin adherentteina DMEM-kasvatusliuoksessa (Lonza), johon oli lisätty 10 % FBS, 2 mM UltraGlutamiini™ I:tä ja 100 µg/ml penisilliinistreptomysiiniä.

Potilasperäisiä M048i-, H002i- ja OC002-solulinjoja kasvatettiin DMEM/F-12-sferoidikasvatusliuoksessa (Lonza), johon oli lisätty B27-supplementtia (Gibco Life Technologies) valmistajan ohjeiden mukaan, 100 µg/ml penisilliinistreptomysiiniä, 20 ng/ml kasvutekijöitä EGF (Gibco Life Technologies) ja bFGF (Gibco Life Technologies) (Kaipio ja muut 2020). Kyseiset potilasperäiset solulinjat kasvoivat adherentteina sferoidikasvatusliuoksessa. Soluja kasvatettiin inkubaatiokaapissa +37°C:ssa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa. Solujen jakamista tai 96-kuoppalevyille pipetointia varten solut irrotettiin kasvatuspullon pohjasta Accutase®:lla (Invitrogen, Carlsbad, CA, Yhdysvallat).

3.1.1 Solujen mykoplasmatestaus

OVCAR3-, OC002-, H002i- ja M048i-soluviljelmät testattiin mykoplasma-kontaminaation varalta MycoAlert™ PLUS -analyysillä (Lonza). OVCAR8-, Kuramochi- ja COV318-soluviljelmät olivat jo aikaisemmin todettu mykoplasma-negatiivisiksi. Soluilla vähintään 24 tuntia ollutta kasvatusliuosta sentrifugoitiin 200 x g (5810R, Eppendorf, Hampuri, Saksa) viiden minuutin ajan, jonka jälkeen supernatanttia

kerättiin eppendorf-putkiin. 96-kuoppalevyn kuoppiin pipetoitiin 100 µl näytettä. Kuoppiin lisättiin 100 µl MycoAlert™ PLUS reagenssia (Lonza) ja luminesenssi mitattiin Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter -laitteella (PerkinElmer, Waltham, MA, Yhdysvallat). Mittauksen jälkeen 100 µl MycoAlert™ PLUS substraattia (Lonza) lisättiin jokaiseen kaivoon ja luminesenssi mitattiin uudelleen. Toisen mittauksen arvot jaettiin ensimmäisen mittauksen arvoilla ja saatu suhdeluku kertoi mahdollisesta mykoplasma-kontaminaatiosta. Jos suhdeluku oli alle 1, soluviljelmässä ei ollut mykoplasmaa. Soluviljelämä oli mykoplasma-kontaminoitunut, jos suhdeluku ylitti arvon 1,2. Näytteet, joiden suhdeluku oli 1-1,2 testattiin uudelleen.

3.2 Homologisen rekombinaation toiminnan määrittäminen

Kaupallisten OVCAR8-, OVCAR3-, Kuramochi- ja COV318-solulinjojen sekä potilasperäisten M048i-, H002i-, ja OC002-solulinjojen HR:n tila määritettiin immunofluoresenssiin perustuvalla menetelmällä (Tumiati ja muut 2018). GelTrex™:llä (Gibco Life Technologies) pinnoitettuihin 96-kuoppalevyn kuoppiin pipetoitiin 5000 solua 100 µl:ssa kasvatusliuosta ja solujen annettiin kasvaa 48 tuntia inkubaatiokaapissa.

Solujen DNA:han aiheutettiin vaurioita säteilyttämällä kuoppalevyillä olevia soluja 5 Gy:llä. Säteilytyksessä käytettiin MultiRad 350 -laitetta (Faxitron, Tucson, AZ, Yhdysvallat). Säteilyttämättömiä soluja käytettiin kontrolleina. Säteilytettyjen solujen annettiin toipua 8 tuntia inkubaatiokaapissa ennen fixaatiota 2% paraformaldehydillä PBS++:ssa (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, johon oli lisätty 1mM CaCl₂ and 0,5 mM MgCl₂). Solut säilytettiin PBS++:ssa värjäykseen asti.

Solukalvot saatiin läpäisemään vasta-aineita käsittelemällä solut permeabilisointipuskurilla (0,2% Triton X-100 PBS++:ssa), jotta solujen sisällä sijaitsevat antigeenit voitiin havaita. Värjäyspuskuria (PBS++, jossa 0,5% BSA, 0,15% glysiini and 0,1% triton X-100) käytettiin vasta-aineiden epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi. Soluja inkuboitiin yön yli +4°C:ssa primääristen RAD51 ja A2-sykliinin vasta-aineiden kanssa. Seuraavana päivänä soluja inkuboitiin tunnin ajan sekundääristen fluoroforileimattujen vasta-aineiden kanssa. Värjäyspuskuriin laimennettua 10-prosenttista kanin seerumia käytettiin vasta-aineen epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi, ennen inkubaatiota fluoroforileimatulla sytokeraatiini 7 vasta-aineella.

Taulukossa 1 on lueteltu käytettyjen vasta-aineiden isäntälajit, isotyypit, laimennokset sekä valmistajat. Solujen tumat värjättiin DNA:han kiinnittyvällä Hoechst 33342 -värillä (Invitrogen).

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt vasta-aineet.

Primääriset vasta-aineet	Isäntä	Isotyyppi	Laimennos	Valmistaja
RAD51	Kani	IgG	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, Yhdysvallat) (sc-8349)
A2-sykliini	Hiiri	IgG1	1:300	Abcam (Cambridge, Iso-Britannia) (ab16726)
Sytokeratiini 7 – Alexa 568	Kani	IgG1	1:300	Abcam (ab209602)
Sekundääriset vasta-aineet				
Hiiren IgG – Alexa 488	Vuohi	IgG	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR, Yhdysvallat) (A11029)
Kanin IgG – Alexa 647	Vuohi	IgG	1:1000	Molecular Probes (A21245)

Solut kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (CSU-WI spinning disk, 3i, Denver, CO, Yhdysvallat) 20-kertaisella suurennoksella. Kuvaamisessa käytettiin neljää eri fluoresenssikanavaa, jotta kaikki värjäykset saatiin näkyviin. Tumaväriä varten käytettiin 405 nm kanavaa, A2-sykliinille 488 nm, sytokeratiini 7:lle 561 nm ja RAD51:lle 640 nm.

Kuvat analysoitiin käyttämällä ImageJ-ohjelmaa (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, Yhdysvallat). Jokaisesta solulinjasta laskettiin vähintään sata solua, jotka olivat värjäytyneet A2-sykliinillä ja sytokeratiini 7:llä käyttämällä ImageJ:n cell counter -liitännäisohjelmaa. A2-sykliinillä ja sytokeratiini 7:llä värjäytyneistä soluista laskettiin solut, jotka olivat lisäksi värjäytyneet RAD51:llä. Näistä saatiin prosenttiosuus RAD51 positiivisille soluille. (RAD51, A2-sykliini ja sytokeratiini 7 positiiviset solut / A2-sykliini ja sytokeratiini 7 positiiviset solut x 100 %). Jos saatu prosenttiosuus oli alle 20 %, HR:n avulla tapahtuva DNA-vaurioiden korjaus soluissa

oli puutteellista. Jos saatu tulos oli yli 35 %, HR oli toimivaa. Välille 20-35 % jääneet tulokset kertoivat, että HR oli osittain toimivaa.

3.3 Wee1-kinaasin inhibiointi AZD1775:llä

Wee1-kinaasin inhibiittorin AZD1775 vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin kaupallisilla Kuramochi-, OVCAR3- ja COV318-solulinjoilla, sekä potilasperäisellä H002i-solulinjalla. AZD1775:n vaikutus potilasperäisten OC002- ja M048i-solulinjojen ja kaupallisen OVCAR8-solulinjan elinkelpoisuuteen oli testattu jo aikaisemmin. 96-kuoppalevyn kuoppiin pipetoitiin 3000 solua 50 µl:ssa ja solujen annettiin kasvaa 24 tuntia inkubaatiokaapissa ennen lääkekäsittelyä 1, 10, 100, 1000 ja 10000 nM:lla Wee1-inhibiittorilla (AZD1775). Kontrollisoluille pipetoitiin pelkkää kasvatusliuosta ilman lääkeainetta. Inhibiittorin annettiin vaikuttaa 72 tuntia, jonka jälkeen solujen elinkelpoisuus määritettiin luminesenssianalyysillä. CellTiter-Glo® (CTG) -reagenssia (Promega Corporation, Madison, WI, Yhdysvallat) pipetoitiin 80 µl/kaivo ja luminesenssi mitattiin Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter -laitteella. Koe toistettiin vähintään kolme kertaa jokaisella solulinjalla.

3.4 Sisplatiinin, olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmäkokeet

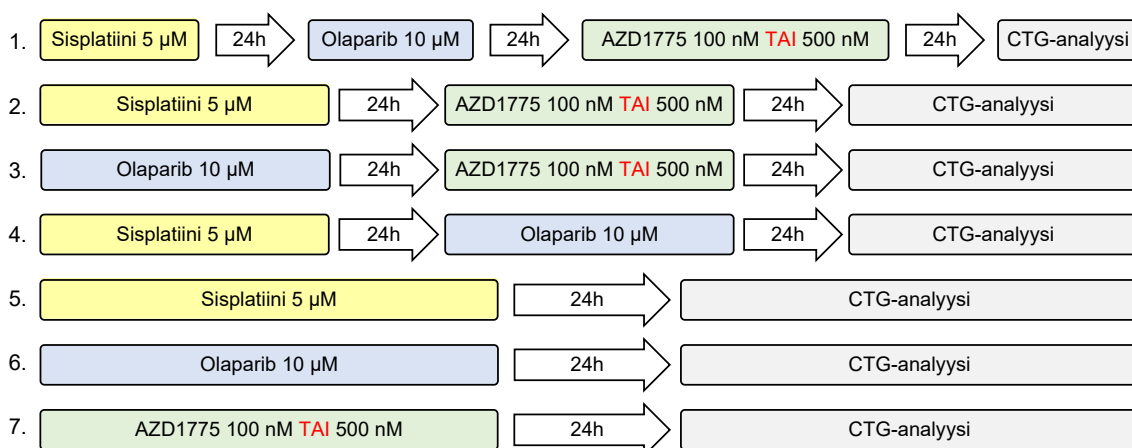
Wee1-kinaasin estäjä AZD1775:n vaikutuksia solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin yhdessä PARP-estäjä olaparibin ja platinajohdos sisplatiinin kanssa. AZD1775:stä käytettiin 100 nM ja 500 nM pitoisuuksia. Olaparibista käytettiin 10 µM pitoisuutta ja sisplatiinista 5 µM pitoisuutta. Kaikista lääkaineista tehtiin laimennokset kolmeen eri kasvatusliuokseen solujen kasvatusliuosten mukaisesti. AZD1775:n vaikutusta soluihin tutkittiin kolmessa eri yhdistelmässä: 1. olaparib ja AZD1775, 2. sisplatiini ja AZD1775 sekä 3. Sisplatiini, olaparib ja AZD1775.

Kaupallisia OVCAR8-, OVCAR3-, Kuramochi- ja COV318-soluja sekä potilasperäisiä M048i-, H002i- ja OC002-soluja pipetoitiin 96-kuoppalevyn kuoppiin 3000 solua 50 µl:ssa kasvatusliuosta. Solujen annettiin kasvaa 24 tuntia inkubaatiokaapissa, jonka jälkeen kasvatusliuos poistettiin kuopista ja tilalle pipetoitiin 100 µl lääkeaineen laimennosta. Lääkeaineen annettiin vaikuttaa soluilla 24 tuntia, jonka jälkeen lääkeainetta sisältävä kasvatusliuos pipetoitiin pois kuopista. Solut huuhdeltiin PBS:llä, jonka jälkeen seuraava lääkeaine pipetoitiin kuoppiin ja annettiin vaikuttaa 24 tuntia.

Kontrollisolujen kanssa toimittiin samoin, mutta lääkeainelaimennoksen sijaan kontrollisoluille pipetoitiin pelkkää kasvatusliuosta. Solujen elinkelpoisuus määritettiin CTG-analyysillä 24 tuntia viimeisen lääkeaineen lisäämisen jälkeen.

Olaparibin, sisplatiinin ja AZD1775:n vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin myös yksittäisten lääkeaineiden osalta 24 tunnin vaikutusajalla. Lisäksi tutkittiin sisplatiinin ja olaparibin vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen yhdistelmässä, jossa sisplatiinin annettiin vaikuttaa soluihin ensin 24 tuntia ja sen jälkeen olaparibin 24 tuntia. Taulukossa 2 on esitetty kaikki erilaiset lääkeaineyhdistelmät, konsentraatioineen ja vaikutusaikoinaan. Kaikki kokeet toistettiin vähintään kolme kertaa.

Taulukko 2. Lääkeyhdistelmät. Taulukossa esitetty kaikki tehdyt lääkeyhdistelmäkokeet vaikutusaikoinaan ja konsentraatioineen.



3.5 Comet assay -analyysi

Comet assay -analyysi tehtiin kaupallisilla Kuramochi-, OVCAR3-, OVCAR8- ja COV318-solulinjoilla. Jokaisesta solulinjasta pipetoitiin kahteen 96-kuoppalevyn kuoppaan 15000 solua 50 µl:ssa mediumia. Solujen annettiin kasvaa 24 tuntia inkubaatiokaapissa ennen käsittelyä 500 nM:lla Wee1-inhibiittori AZD1775:llä. Kontrollisoluille lisättiin vain mediumia ilman Wee1-inhibiittoria. Inhibiittorin annettiin vaikuttaa soluihin 24 tuntia.

Solut irrotettiin kuopilta käyttämällä trypsiiniä (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Yhdysvallat) 50 µl/kuoppa ja kerättiin eppendorf-putkiin 100 µl mediumia. Putket fuugattiin ja supernatantti kaadettiin pois. Solut resuspensoitiin putkeen jääneeseen

pieneen määrään mediumia. Solususpensioon sekoitettiin 150 µl matalan sulamispisteen omaavaa agarosia (1% H₂O, Lonza). Näyte pipetoitiin agarosilla päällystetylle objektilasille ja peitettiin peitinlasilla. Agarosin annettiin jähmettyä 5 minuuttia, jonka jälkeen peitinlasi poistettiin. Objektilasit laitettiin värjäysastiaan lyysispuskuriin (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % Triton X-100, pH 10,5) tunnin ajaksi +4°C:seen. Lasit asetettiin jäällä olevaan elektroforeesi-laitteeseen pitkittäin. Lasit peitettiin elektroforeesipuskurilla (0,3 M NaOH, 1 nM EDTA) 20 minuutin ajaksi, jonka jälkeen elektroforeesi käynnistettiin (30 V, 300 mA, 25 min). Elektroforeesin jälkeen lasit huuhdeltiin neutralisointipuskurilla (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) kolme kertaa. Kaikki edeltävät vaiheet pyrittiin tekemään niin valolta suojattuna kuin mahdollista.

Näytteet värjättiin käyttämällä DNA:han sitoutuvaa propidiumjodidia (Invitrogen) laimennettuna 1:100 TE-EF -puskuriin (Macherey-Nagel, Düren, Saksa) ja peitettiin peitinlasilla. Lasit kuvattiin seuraavana päivänä fluoresenssimikroskooppiin (Eclipse Ni-U, Nikon) yhdistetyllä kameralla (DS-Qi2, Nikon). Kuvat analysoitiin käyttämällä CometScore 2.0 -ohjelmaa (Hoover). Ohjelma antoi jokaiselle yksittäiselle solulle prosenttimäärään komeetan hännässä ja päässä olevalle DNA:lle.

3.5.1 Tilastollinen analysointi

Jokaisesta solulinjasta analysoitiin noin 100 yksittäistä AZD1775:llä käsiteltyä solua ja noin 100 käsittelemätöntä solua CometScore 2.0 -ohjelmalla. Komeetan päässä olevan DNA:n määrää verrattiin käsittelemättömien ja AZD1775-käsiteltyjen solujen välillä. Saatujen tulosten tilastollinen merkitsevyys analysoitiin Studentin t-testillä. Tulokset todettiin tilastollisesti merkitseviksi, kun p-arvo oli pienempi kuin 0,05. Tilastollisessa analysoinnissa käytettiin Excel-ohjelmaa (Microsoft, Redmond, WA, Yhdysvallat).

4 TULOKSET

Tutkimuksessa käytettyjen solulinjojen kyky korjata DNA-katkoksia HR:n avulla määritettiin käyttämällä funktionaalista immunofluoresenssiin perustuvaa menetelmää. Wee1-kinaasin inhibiittorin AZD1775:n vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin yksin, sekä erilaisissa yhdistelmissä sisplatiinin ja olaparibin kanssa CTG-analyysillä. Solulinjojen, joissa HR on toimivaa sekä HR-puutteellisten solulinjojen tuloksia vertailtiin keskenään. AZD1775:n solujen DNA:han aiheuttamien katkosten määrää tutkittiin comet assay -analyysillä.

4.1 Soluviljelmien testaus mykoplasmacontaminaation varalta

Mykoplasmat ovat useille antibiooteille resistenttejä, pienikokoisia ja soluseinättömiä bakteereja. Mykoplasma voi olla lukematon määrä vaikutuksia kontaminoituneeseen soluviiljelmään ja soluilla tehtyjen tutkimusten tuloksiin. Mykoplasma saattaa estää solujen kasvua ja aiheuttaa soluissa morfologisia muutoksia, DNA:n fragmentoitumista ja apoptoosia (Nikfarjam ja Farzaneh 2012). Tutkimuksessa käytetyt soluviiljelmät testattiin mykoplasman varalta, jotta mykoplasman vaikutus tuloksiin voitiin poissulkea. OVCAR8-, Kuramochi- ja COV318-solulinjat oli testattu jo aiemmin ja todettu mykoplasmanegatiivisiksi. Taulukossa 3 on esitetty MycoAlert™ PLUS -analyysillä saadut OVCAR3-, OC002-, H002i- ja M048i-solulinjojen tulokset. Kaikkien solulinjojen tulokset olivat < 1, joten kaikkien solulinjojen todettiin olevan mykoplasmanegatiivisia.

Taulukko 3. Mykoplasmacontaminaation tulokset.

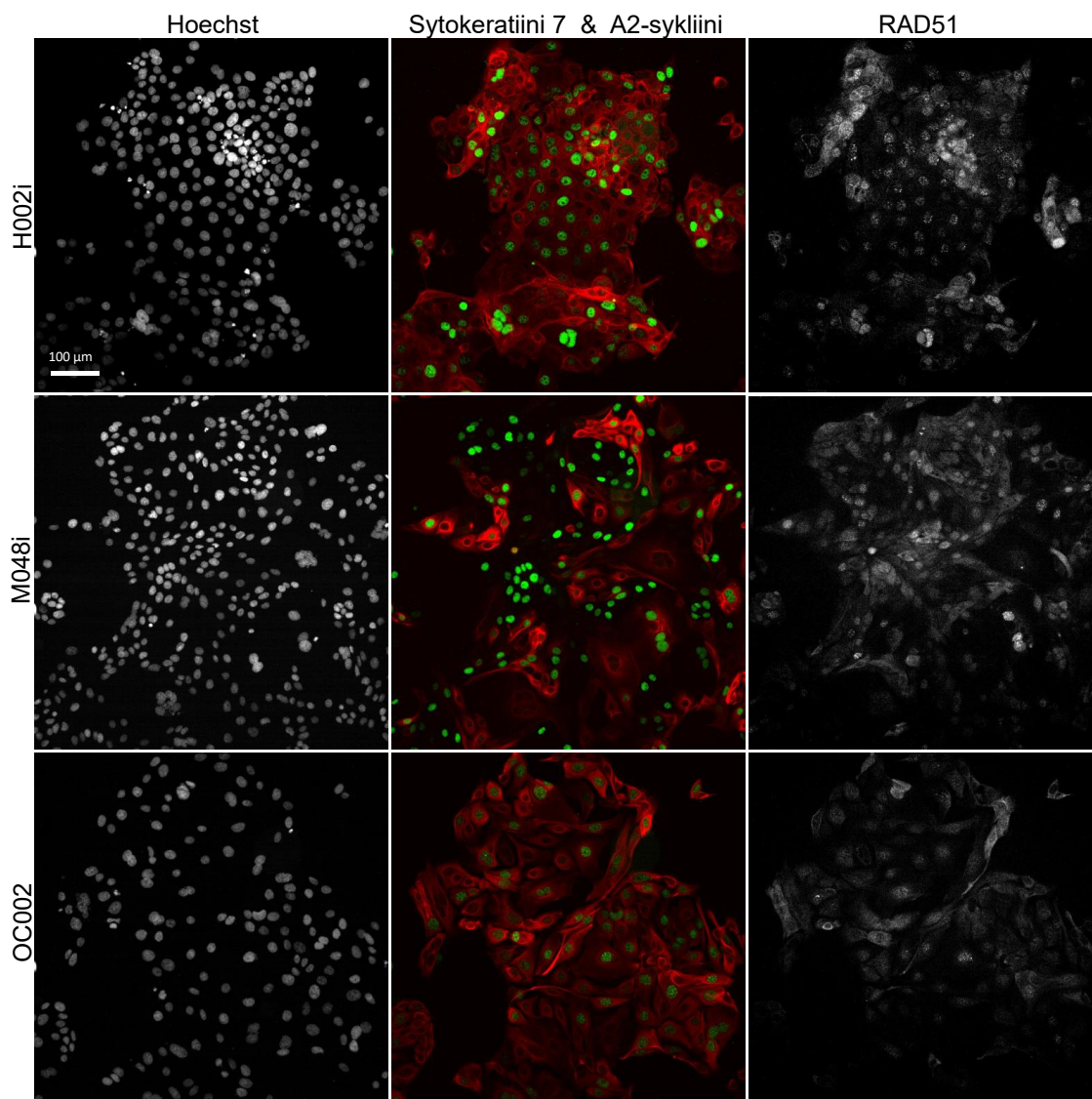
Solulinja	MycoAlert™ PLUS -tulos
OVCAR3	0,69
OC002	0,93
H002i	0,78
M048i	0,96

4.2 Homologisen rekombinaation toiminnan määrittäminen

Puutteellisuus DNA-vaurioiden korjaamisessa HR:n avulla voi johtua *BRCA1/2*-mutaatioiden lisäksi epigeneettisistä muutoksista tai muiden HR:ään liitettyjen geenien inaktivaatiosta, joten pelkkä *BRCA1/2*-mutaatioiden geneettinen testaus ei riitä HR:n toimivuuden tai puutteellisuuden määrittämiseksi. Lisäksi *BRCA1/2*-mutaation vaikutuksen kumoava mutaatio voi palauttaa *BRCA1/2*-geenin toimintakykyiseksi. Näistä syistä HR:n tila testattiin funktionaalisella menetelmällä, joka perustuu HR:ssä tärkeässä osassa olevan RAD51-proteiinin paikallistamiseen solun tumaan immunofluoresenssitekniikalla. (Tumiati ja muut 2018.)

Solujen DNA:han aiheutettiin vaurioita säteilyttämällä niitä ennen RAD51 vasta-ainekäsittelyä, koska RAD51-proteiini on havaittavissa solujen tumassa vain vasteena DNA-vauriolle (Tumiati ja muut 2018). Menetelmässä käytettiin RAD51:n lisäksi vasta-aineita A2-sykliin ja sytokeratiini 7:n havaitsemiseksi. A2-sykliin avulla voitiin tunnistaa proliferoivat solut, jotka olivat solusyklin G₂- tai S-vaiheessa. G₂- tai S-vaiheessa olevien solujen tunnistaminen oli tärkeää, sillä DNA-vaurioiden korjaus HR:n avulla voi tapahtua vain solusyklin S- ja G₂-vaiheissa. Epiteeliaalisten munasarjasyöpösolujen tiedetään ekspressoivan sytokeratiini 7:ää, joten sitä käytettiin epiteeliaalisten munasarjasyöpösolujen erottamiseksi strooman soluista (Chu ja muut 2000). Solujen tumat värjättiin Hoechst 33342 -värillä.

Konfokaalimikroskoopilla otetuista kuvista (kuva 7) laskettiin vähintään 300 solua, jotka olivat A2-sykliini ja sytokeratiini 7 positiivisia. Näistä soluista laskettiin ne solut, joiden tumassa oli kirkkaita pisteitä eli RAD51-proteiinipesäkkeitä. Näin saatiin prosenttiluku RAD51 positiivisille soluille, joka on niin kutsuttu HR-tulos. H002i- ja M048i- solulinjoissa HR tulos oli yli 35 %, joten DNA:n korjauksen HR:n avulla todettiin olevan toimivaa. OC002-solulinjassa HR tulos oli välillä 20-35 %, joten HR:n todettiin olevan osittain toimivaa.



Kuva 7. Potilasperäiset solulinjat värjättyinä immunofluoresenssitekniikalla. Kuvan vasemmassa reunassa näkyvät eri solulinjojen solujen tumat Hoechst-tumavärillä värjättyinä. Keskimmaisissa kuvissa on yhdistetty A2-sykliini (vihreä) ja sytokeratiini 7 (punainen) värjäykset. Oikean puoleisissa kuvissa näkyy RAD51-värjäys. RAD51 positiivisissa soluissa näkyy kirkkaita pilkkuja tumassa. Kuvat on otettu CSU-WI spinning disk -konfokaalimikroskoopilla 20-kertaisella suurennoksella.

Myös kaupallisten COV318-, OVCAR3, OVCAR8- ja Kuramochi-solulinjojen HR:n tila testattiin samalla menetelmällä. Tumiati (2018) ja muiden artikkelin perusteella COV318- ja OVCAR3-solulinjoissa HR oli toimivaa ja OVCAR8- ja Kuramochi-solulinjoissa puutteellista. Saadut tulokset poikkesivat hieman artikkelissa julkaistuista HR-tuloksista (COV318 65 %, OVCAR3 52 %, OVCAR8 3 % ja Kuramochi 12 %), mutta kaikki solulinjat pysyivät saman HR-kategorian sisällä. Taulukossa 4 on esitetty kaikkien tutkimuksessa käytettyjen solulinjojen HR-tulokset.

Taulukko 4. Solulinjojen HR-testauksen tulokset. Homologisen rekombinaation toiminta potilasperäisissä ja kaupallisissa solulinjoissa. Suluissa esitetty Tumiaati (2018) ja muiden artikkelissaan julkaisemat HR tulokset kaupallisille solulinjoille.

Solulinja	HR-tulos %	HR:n tila
H002i	55 %	Toimivaa
M048i	40 %	Toimivaa
OC002	28 %	Osittain toimivaa
COV318	54 % (65 %)	Toimivaa
OVCAR3	54 % (52 %)	Toimivaa
OVCAR8	7 % (3 %)	Puutteellista
Kuramochi	17 % (12 %)	Puutteellista

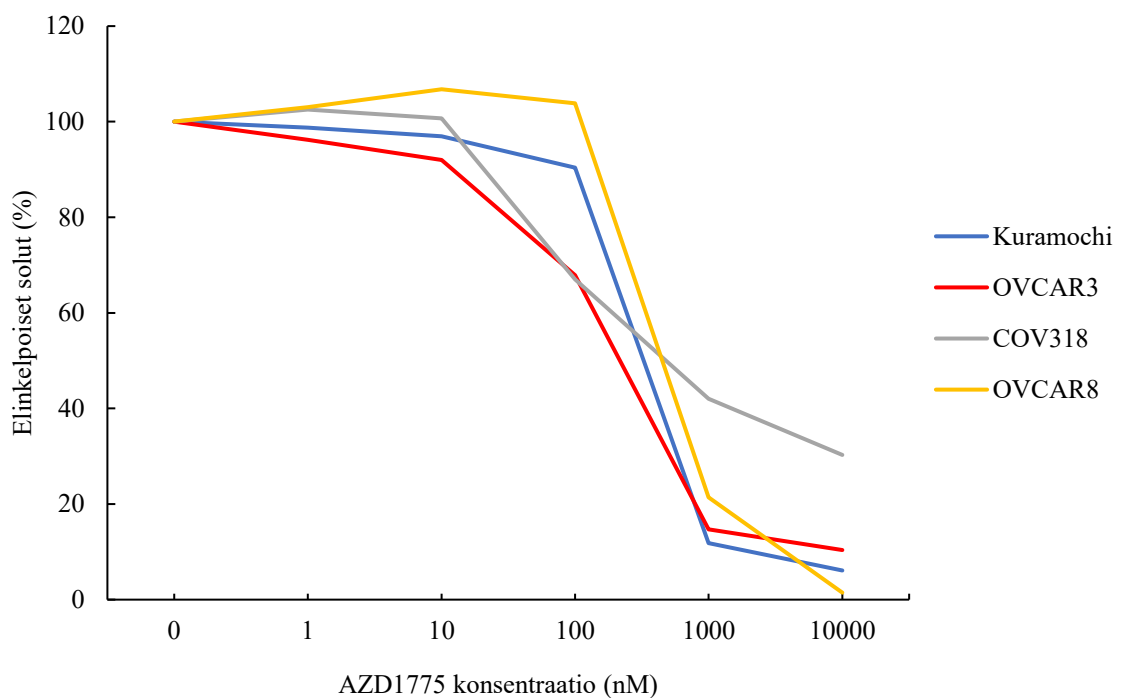
4.3 Lääkekäsittelyjen vaikutukset solujen elinkelpoisuuteen

Lääkekäsittelyjen vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen mitattiin CTG-analyysillä (Promega). Analyysi perustuu ATP:n määrän määrittämiseen soluviljelmässä, mikä ilmaisee soluviljelmässä olevien solujen metabolisen aktiivisuuden määrän. CTG-reagenssi sisältää lusiferiinia, joka tuotti reaktio-olosuhteissa luminesoivan signaalin. Luminesoivan signaalin määrä korreloi näytteessä olevan solumäärän kanssa. Lääkeaineiden ja lääkeaineyhdistelmien vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin kaupallisilla Kuramochi-, OVCAR8-, OVCAR3- ja COV318-solulinjoilla sekä potilasperäisillä OC002-, M048i- ja H002i-solulinjoilla. Käsittelemättömien kontrollisolujen CTG-analyysistä saatu luminesenssin arvo määritettiin solujen 100 % elinkelpoisuudeksi. Lääkeaineilla käsiteltyjen solujen luminesenssiarvoa verrattiin kontrollisoluihin, mistä saatiin elinkelpoisten solujen prosenttiosuus kunkin lääkekäsittelyn jälkeen.

4.3.1 Yksittäisten lääkeaineiden vaikutus solujen elinkelpoisuuteen

Wee1-kinaasin inhibiittorin vaikutusta Kuramochi-, OVCAR3-, COV318- ja H002i-solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin 1, 10, 100, 1000 ja 10000 nM:lla AZD1775:llä. Luminesenssi mitattiin 72 tunnin kuluttua lääkeaineen lisäämisestä. OVCAR8-, OC002- ja M048i-solulinjoilla aiemmin saadut tulokset on yhdistetty nyt testattujen solulinjojen tulosten kanssa kuvissa 8 ja 9. Tulokset normalisoitiin vertaamalla AZD1775 käsiteltyjen solujen luminesoivan signaalin määrää käsittelemättömien kontrollisolujen signaaliin.

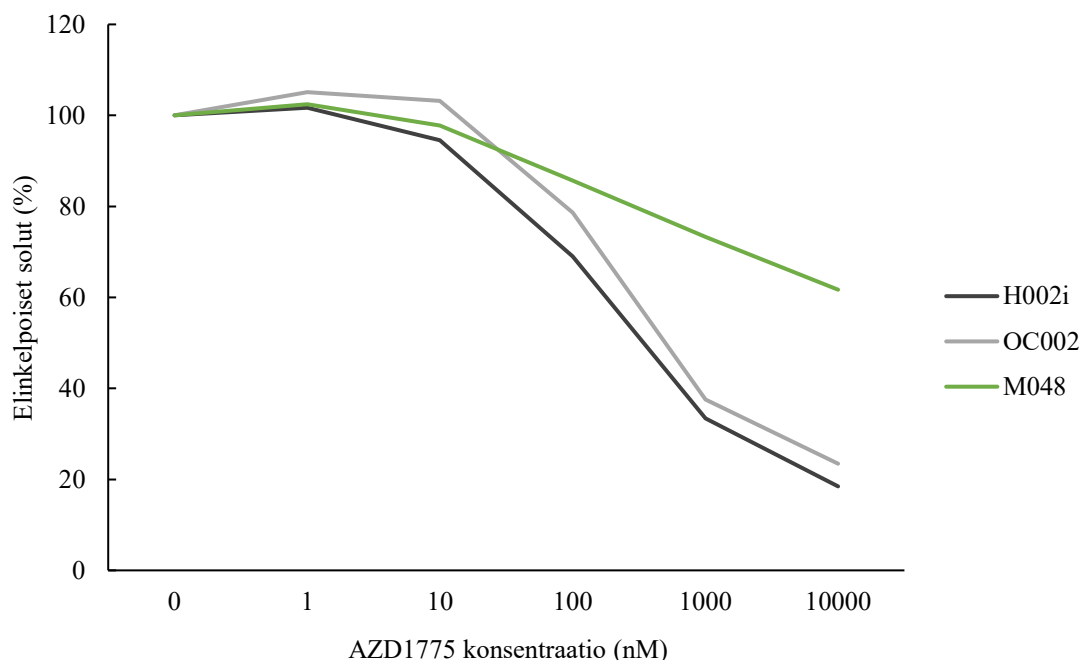
Vasta yli 100 nM:n AZD1775 pitoisuudet heikensivät selkeästi kaupallisten solulinjojen elinkelpoisuutta (kuva 8). Käsittely 10000 nM:lla AZD1775:llä 72 tunnin ajan vähensi elinkelpoisten solujen määrän Kuramochi-soluilla 6,1 %:iin, OVCAR8-soluilla 1,5 %:iin, OVCAR3-soluilla 10,4 %:iin ja COV318-soluilla 30,3 %:iin käsittelemättömiin kontrollisoluihin verrattuna. Kuvaajasta laskettiin suoran yhtälöllä kullekin solulinjalle IC50-arvo olettaen, että 100 nM:n ja 1000 nM:n AZD1775-konsentraatioiden välissä solujen elinkelpoisuus heikkenee lineaarisesti. IC50-arvo kertoo siis AZD1775:n pitoisuuden, jossa solujen elinkelpoisuus on vähentynyt puoleen käsittelemättömien solujen elinkelpoisuudesta. AZD1775:n IC50-arvo Kuramochi-soluilla oli 563 nM, OVCAR8-soluilla 688 nM, OVCAR3-soluilla 402 nM ja COV318-soluilla 712 nM (taulukko 5). OVCAR3- ja COV318-solulinjoissa HR on toimivaa ja Kuramochi ja OVCAR8-soluilla puutteellista, mutta kokeessa ei havaittu eroa solulinjojen välillä, joissa HR oli toimivaa tai puutteellista.



Kuva 8. 1, 10, 100, 1000 ja 10000 nM:n AZD1775:n vaikutus kaupallisten solujen elinkelpoisuuteen 72 tunnin vaikutusajalla. Solujen elinkelpoisuus heikkenee huomattavasti vasta yli 100 nM:n AZD1775-konsentraatiolla kussakin solulinjassa.

Potilasperäisissä solulinjoissa elinkelpoisten solujen määrä putosi käsittelemättömiin kontrollisoluihin verrattuna OC002-soluilla 23,4 %:iin, H002i-soluilla 18,5 %:iin ja M048i-soluilla 61,7 %:iin 72 tunnin käsittelyssä 10000 nM AZD1775:llä (kuva 9). IC50-arvo määritettiin potilasperäisille solulinjoille samoin kuten kaupallisille

solulinjoille. AZD1775:n IC50-arvo oli OC002-soluilla 726 nM, H002i-soluilla 580 nM ja M048i-soluilla 1960 nM (taulukko 5). M048- ja H002i-solulinjoissa HR oli toimivaa ja OC002 solulinjassa osittain toimivaa, mutta kokeessa ei havaittu solulinjojen välisiä eroja toimivan tai osittain toimivan HR:n välillä.

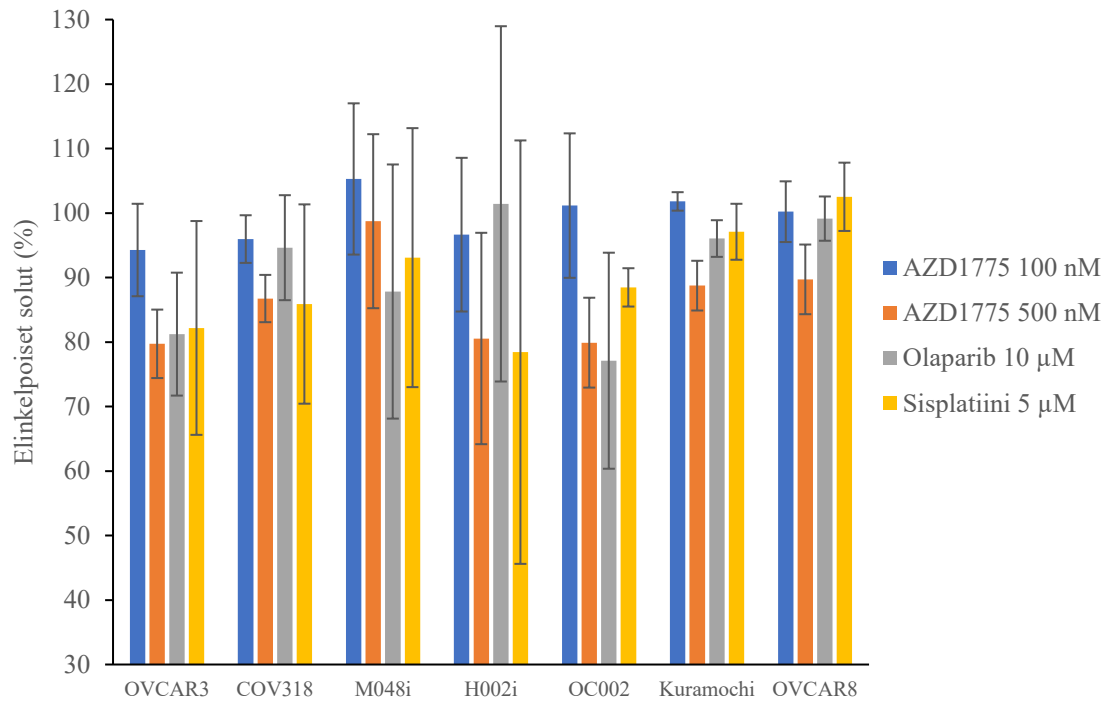


Kuva 9. 1, 10, 100, 1000 ja 10000 nM:n AZD1775:n vaikutus potilasperäisten solujen elinkelpoisuuteen 72 tunnin vaikutusajalla.

Taulukko 5. Solulinjojen AZD1775:n IC50-arvot sekä HR:n tila.

Solulinja	IC50 (nM)	HR:n tila
H002i	580	Toimivaa
M048i	1960	Toimivaa
OC002	726	Osittain toimivaa
COV318	712	Toimivaa
OVCAR3	402	Toimivaa
OVCAR8	688	Puutteellista
Kuramochi	563	Puutteellista

AZD1775:n vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin myös 24 tunnin vaikutusajalla. Samalla vaikutusajalla tutkittiin myös sisplatiinin ja olaparibin vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen. Vaikutusaika oli kuitenkin niin lyhyt, että selkeitä ja toistuvia eroja lääkeaineiden välillä ei havaittu (kuva 10).



Kuva 10. AZD1775:n, sisplatiinin ja olaparibin vaikutus solujen elinkelpoisuuteen 24 tunnin vaikutusajalla. Kuvassa on esitetty kunkin lääkeainekäsittelyn kolmesta toistosta saadut keskiarvot ja keskihajonnat.

4.3.2 Kahden lääkeaineen yhdistelmän vaikutus solujen elinkelpoisuuteen

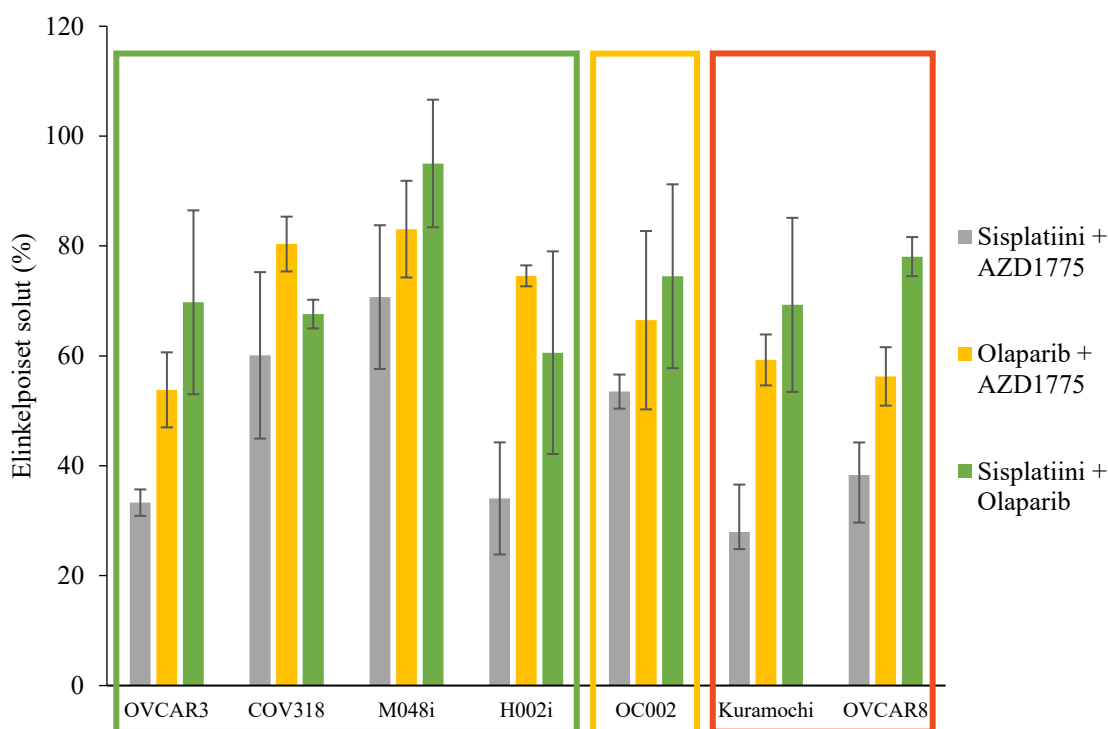
Kahden lääkeaineen yhteisvaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin sisplatiinin ja AZD1775:n, olaparibin ja AZD1775:n sekä sisplatiinin ja olaparibin yhdistelmillä. Ensimmäinen lääkeaine sai ensin vaikuttaa soluilla 24 tunnin ajan, jonka jälkeen se pestiin pois ja toisen lääkeaineen annettiin vaikuttaa soluilla seuraavat 24 tuntia ennen luminesenssimittausta. Fang (2019) ja muut havaitsivat tutkimuksessaan, että olaparibin ja AZD1775 peräkkäinen annostelu on normaaleille soluille vähemmän toksista kuin yhtäaikainen annostelu, ja peräkkäin annosteltuna lääkeyhdistelmä säilyttää kuitenkin tehokkuutensa syöpäsoluja vastaan. Tutkimuksen perusteella päädyimme myös annostelemaan lääkeaineet soluille peräkkäin.

Koska 72 tunnin AZD1775-käsittelyjen tuloksista voitiin havaita, että solulinjojen IC-50 arvo AZD1775:lle oli lähempänä 500 nM:n kuin 100 nM:n AZD1775:tä, kuvassa 11 on esitetty vain 500 nM:lla AZD1775:llä saadut tulokset. Lääkeaineyhdistelmät tehtiin myös 100 nM:lla AZD1775:llä ajatellen, että jo pienemmällä pitoisuudella olisi vaikutusta lääkeaineyhdistelmässä. Sisplatiinia käytettiin 5 µM:n ja olaparibia 10 µM:n konsentraatioissa. Kyseiset konsentraatiot valittiin, sillä ne oli optimoitu

tutkimusryhmäni yhteistyölaboratoriossa Helsingin yliopistossa. Tulokset normalisoitiin vertaamalla niitä käsittelemättömiin kontrollisoluihin.

Kahden lääkeaineen yhdistelmästä sisplatiinin ja AZD1775:n yhdistelmä vähensi elinkelpoisten solujen määrää eniten solulinjasta riippumatta (kuva 11). Olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmä heikensi solujen elinkelpoisuutta enemmän kuin sisplatiinin ja olaparibin yhdistelmä kaikissa muissa solulinjoissa paitsi COV318- ja H002i-solulinjoissa.

OVCAR3-, COV318-, M048i- ja H002i-solulinjoissa HR oli toimivaa, OC002-solulinjassa osittain toimivaa sekä Kuramochi- ja OVCAR8-solulinjoissa puutteellista, mutta solulinjojen välillä ei havaittu HR:n tilaan yhdistettäviä eroja vasteessa kahden lääkeaineen yhdistelmille.



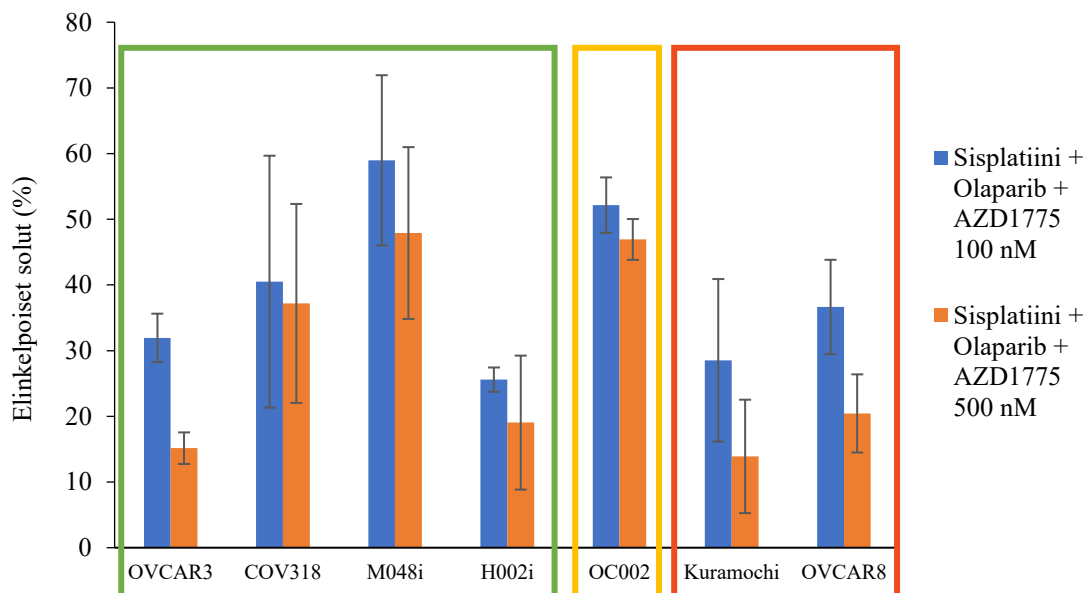
Kuva 11. Kahden lääkeaineen yhdistelmän vaikutus solujen elinkelpoisuuteen. Sisplatiinin ja AZD1775:n yhdistelmä vähentää elinkelpoisten solujen määrää enemmän kuin olaparibin ja AZD1775:n tai sisplatiinin ja olaparibin yhdistelmä solulinjasta riippumatta. Vihreässä laatikossa solulinjat, joissa HR on toimivaa. Keltaisessa laatikossa solulinjat, joissa HR on osittain toimivaa. Punaisessa laatikossa solulinjat, joissa HR on puutteellista. Kuvassa on esitetty kunkin käsittelyn kolmesta toistosta saadut keskiarvot ja keskihajonnat. Käytetyt lääkeainekonsentraatiot: sisplatiini 5 μM , AZD1775 500 nM ja olaparib 10 μM .

4.3.3 Sisplatiinin, olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmän vaikutus solujen

elinkelpoisuuteen

Sisplatiinin, olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmän vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin 24 tunnin vaikutusajalla. Sisplatiinia käytettiin 5 μM :n ja olaparibia 10 μM :n konsentraatioissa. AZD1775:stä käytettiin 100 nM:n ja 500 nM:n konsentraatioita. Siplatiinin annettiin vaikuttaa soluilla 24 tuntia, jonka jälkeen se pestiin pois ja olaparibin annettiin vaikuttaa soluilla seuraavat 24 tuntia. Olaparibin poispesun jälkeen soluille lisättiin AZD1775:ttä joko 100 nM tai 500 nM konsentraatioissa. Lääkeaineiden järjestys valittiin sillä perusteella, että sisplatiinin ajateltiin aiheuttavan ensin solujen DNA:han vaurioita. Seuraavaksi olaparibin ajateltiin estävän DNA-vaurioiden korjaamista ja lopuksi AZD1775 estäisi solusyklin pysähtymisen ennen mitoosia, jolloin DNA-vauriot mitoosissa aiheuttaisivat mitoottisen katastrofin ja solun kuoleman.

Kolmen lääkeaineen yhdistelmä, jossa AZD1775:n konsentraatio on 500 nM vähensi elinkelpoisten solujen määrää enemmän kuin yhdistelmä, jossa AZD1775:n konsentraatio on 100 nM (kuva 12). HR:n tilan ei havaittu vaikuttavan lääkeyhdistelmän tehokkuuteen.

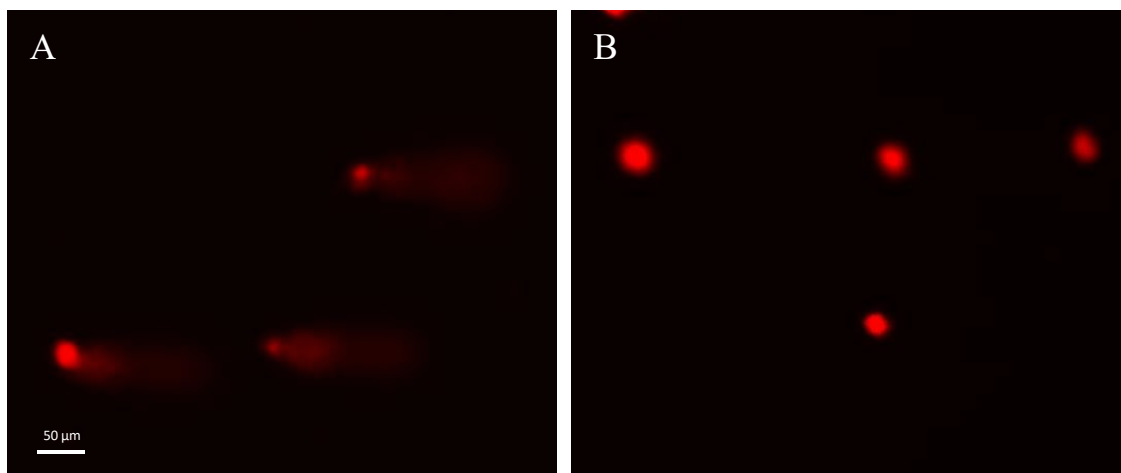


Kuva 11. Kolmen lääkeaineen yhteisvaikutus solujen elinkelpoisuuteen. Sisplatiinin (5 μM), olaparibin (10 μM) ja 500 nM:n AZD1775:n yhdistelmä vähentää elinkelpoisten solujen määrää enemmän kuin yhdistelmä, jossa AZD1775:stä käytettiin 100 nM:n konsentraatiota. Vihreässä laatikossa solulinjat, joissa HR on toimivaa. Keltaisessa laatikossa solulinja, jossa HR on osittain toimivaa. Punaisessa laatikossa solulinjat, joissa HR on puutteellista. Kuvassa on esitetty kunkin käsittelyn kolmesta toistosta saadut keskiarvot ja keskihajonnat.

4.4 AZD1775:n aiheuttamat DNA-katkokset soluissa

Comet assay -analyysi on geelielektroforeesiin perustuva menetelmä, jonka avulla voidaan mitata DNA-vaurioita yksittäisten solujen DNA:ssa. Jos solun negatiivisesti varautuneessa DNA:ssa oli katkoksia, DNA:n superkierrakerakenne löystyi ja katkenneet päät siirtyivät kohti anodia elektroforeesin aikana. DNA värjättiin fluoresoivalla propidiumjodidilla, jolloin fluoresenssimikroskoopilla voitiin nähdä komeettamaisia rakenteita. ”Komeetat” muodostuivat yksittäisten solujen DNA:sta. ”Komeetan pää” sisälsi vaurioitumatonta DNA:ta ja ”komeetan häntä” sisälsi vaurioitunutta DNA:ta, joka oli elektroforeesin aikana kulkeutunut komeetan päästä kohti anodia.

Comet assay -analyysi tehtiin emäksisissä olosuhteissa, joissa DNA denaturoituu yksijuosteiseksi ja havaitaan DNA:n kaksoisjuostekatkosten lisäksi DNA:n yhden juosteen katkokset. Näytelaseja pyrittiin pitämään valolta suojattuna valon aiheuttamien DNA-vaurioiden estämiseksi. Lasit kuvattiin fluoresenssimikroskooppiin yhdistetyllä kameralla ja kuvat analysoitiin CometScore 2.0 -ohjelmalla (Hoover). Kuvista analysoitiin jokaisen yksittäisen solun DNA:n prosentuaalinen osuus komeetan päässä ja komeetan hännässä (kuva 13). Mitä suurempi osuus DNA:ta on komeetan hännässä, sitä enemmän DNA:ssa on vaurioita.

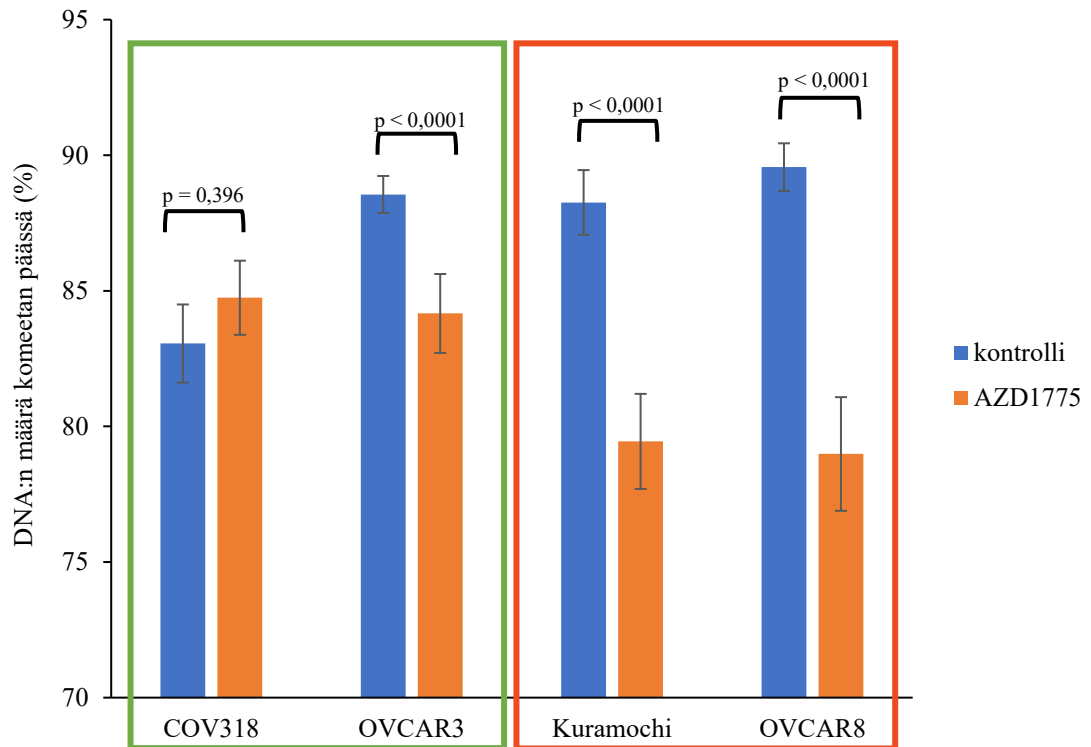


Kuva 13. Esimerkkejä comet assay -kuvista, joissa solujen DNA on värjätty propidiumjodidilla. Kuvassa A kolmen yksittäisen solun DNA:t muodostavat komeettamaisia rakenteita, koska solujen DNA:ssa on ollut katkoksia. Kuvassa B neljän yksittäistä solua, joiden DNA:ssa ei ole vaurioita ja komeettaa ei synny.

Comet assay -analyysi tehtiin kaupallisilla COV318-, OVCAR3-, Kuramochi ja OVCAR8-solulinjoilla. AZD1775:llä käsiteltyjen solujen DNA-vaurioiden määrää verrattiin käsittelemättömiin kontrollisoluihin. DNA:n määrä komeetan päässä väheni

24 tunnin ajan AZD1775:llä käsitellyillä Kuramochi-soluilla keskimäärin 8,9 prosenttiyksikköä verrattuna käsittelemättömiin kontrollisoluihin (kuva 14). Muutos todettiin tilastollisesti merkitseväksi t-testillä ($p < 0,0001$). Samassa käsittelyssä OVCAR8-soluilla DNA:n määrä komeetan päässä väheni keskimäärin 10,6 prosenttiyksikköä ($p < 0,0001$) verrattuna kontrollisoluihin. OVCAR3-soluilla DNA:n määrä komeetan päässä väheni 4,4 prosenttiyksikköä ($p < 0,0001$) 24 tunnin käsittelyssä AZD1775:llä. COV318-soluilla DNA:n määrä komeetan päässä kasvoi 1,6 % samassa käsittelyssä, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä (p-arvo 0,396). HR-puutteellisissa Kuramochi- ja OVCAR8-solulinjoissa DNA:n määrä komeetan hännässä kasvoi käsittelyssä enemmän kuin solulinjoissa, joissa HR oli toimivaa.

Comet assay -analyysissä havaittiin myös, että käsittelemättömissä COV318-kontrollisoluissa komeetan päässä olevan DNA:n määrä oli matalampi kuin muiden solulinjojen käsittelemättömissä kontrollisoluissa (kuva 14). Käsittelemättömissä COV318-kontrollisoluissa DNA:n määrä komeetan päässä oli keskimäärin vain 83 %, kun käsittelemättömissä OVCAR3-kontrollisoluissa DNA:ta oli komeetan päässä keskimäärin 88,6 %, Kuramochi-kontrollisoluissa 88,3 % ja OVCAR8-kontrollisoluissa 89,6 %.



Kuva 14. DNA:n prosentuaalinen määrä komeetan hännässä. DNA:n määrä komeetan päässä vähenee OVCAR3-, Kuramochi- ja OVCAR8-solulinjoissa 24 tunnin AZD1775-käsittelyn jälkeen verrattuna käsittelemättömiin kontrollisoluihin. COV318-solulinjassa DNA:n määrä komeetan päässä kasvaa käsittelyssä, mutta muutos ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Vihreässä laatikossa solulinjat, joissa HR on toimivaa ja punaisessa laatikossa solulinjat, joissa HR on puutteellista. Kuvassa on esitetty kunkin solulinjan noin sadan käsittelemättömän ja AZD1775-käsiteltyjen solujen keskiarvot ja keskivirheet sekä tulosten p-arvot.

5 TULOSTEN TARKASTELU

Resistenssin kehittyminen platinapohjaiselle kemoterapialle on ongelma HGSOc:n hoidossa, johon haetaan ratkaisua useiden lääkeaineiden yhdistelmistä. Yksi lääkeainekandidaatti HGSOc:n hoitoon on wee1-kinaasin inhibiittori AZD1775, joka on osoittautunut potentiaaliseksi lääkeaineeksi syövän hoitoon muutamissa kliinisissä kokeissa, joissa sitä on tutkittu sekä monoterapiana, että yhdistelmässä karboplatiinin kanssa (Khanh Do ja muut 2015; Leijen ja muut 2016). Tietoa AZD1775:n toiminnasta on kuitenkin vasta vähän. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää HR:n tilan mahdollisia vaikutuksia vasteeseen AZD1775:lle kaupallisissa ja potilasperäisissä HGSOc-solulinjoissa.

5.1 Homologisen rekombinaation puutteellisuus ei näytä herkistävän soluja AZD1775:lle

Funktionaalilla HR testauksella OVCAR8- ja Kuramochi-solulinjat todettiin HR-puutteellisiksi ja COV318- ja OVCAR3-solulinjoissa HR:n todettiin olevan toimivaa. Domcke (2013) ja muiden julkaisemassa artikkelissa Kuramochi-solulinjassa kerrotaan olevan *BRCA2*-mutaatio, mutta OVCAR8-solulinjasta *BRCA*-mutaatiota ei löydy. OVCAR8-soluissa HR on siis puutteellista johtuen epigeneettisistä muutoksista tai muiden HR:ään liitettyjen geenien inaktivaatiosta.

Hypoteesina oli, että AZD1775-käsittelyssä HR-puutteellisten solujen elinkelpoisuus heikentyisi enemmän kuin solujen, joissa HR on toimivaa, sillä DNA-vaurioiden korjaaminen on HR-puutteellisissa soluissa heikentynyt jo entuudestaan. Kaupallisista solulinjoista HR-puutteellisilla OVCAR8- ja Kuramochi-solulinjoilla sekä COV318-solulinjalla, jossa HR oli toimivaa saadut tulokset olivat odotetun kaltaiset, mutta OVCAR3-solulinja poikkesi odotetusta. OVCAR3-solulinjassa HR on toimivaa, mutta solut käyttäytyivät kokeissa kuin HR-puutteellisten solulinjojen solut. Käsittely 10000 nM:lla AZD1775:llä 72 tunnin ajan vähensi elinkelpoisten solujen määrän Kuramochi-soluilla 6 %:iin, OVCAR8-soluilla 1,5 %:iin, OVCAR3-soluilla 10,4 %:iin ja COV318-soluilla 30,3 %:iin käsittelemättömiin kontrollisoluihin verrattuna. Kuramochi- ja OVCAR8-solulinjoissa, joissa HR on puutteellista, elinkelpoisten solujen määrä on selkeästi matalampi kuin COV318-solulinjassa, jossa HR on toimivaa. OVCAR3-

solulinjassa, jossa HR on toimivaa, solujen elinkelpoisuus heikentyy kuitenkin lähes samalle tasolle kuin HR-puutteellisten solulinjojen. DNA-vaurioita korjataan kuitenkin useilla muillakin mekanismeilla, joiden toiminnan puutteellisuus mutaatioiden tai epigeneettisen hiljentämisen seurauksena voi vaikuttaa OVCAR3-solujen heikkoon AZD1775:n kestävykseen.

Useita potilasperäisiä solulinjoja herätettiin kasvuun tutkimusta varten ja funktionaalinen HR-testaus tehtiin yli kymmenelle parhaiten kasvavalle potilasperäiselle solulinjalle. Yksikään testatuista potilasperäisistä solulinjoista ei ollut HR-puutteellinen, mikä herätti kysymyksen siitä, että vaikuttaako HR-puutteellisuus heikentävästi solujen kasvuun soluviljelmässä. Lääkeainetesteihin valittiin potilasperäisistä solulinjoista H002i- ja M048i-solulinjat, joissa HR:n todettiin olevan toimivaa sekä OC002-solulinja, jossa HR:n todettiin olevan osittain toimivaa. Kasvainten, joissa HR on osittain toimivaa on havaittu käyttäytyvän kliinisesti kuten HR-puutteelliset kasvaimet (Tumiati ja muut 2018).

Myöskään potilasperäisten solulinjojen tuloksissa ei havaita, että HR:n puutteellisuus vaikuttaisi AZD1775:n solujen elinkelpoisuutta heikentävään vaikutukseen 72 tunnin käsittelyssä. OC002-solujen, joissa HR on osittain toimivaa, elinkelpoisuus heikentyi 23,4 %:iin 72 tunnin käsittelyssä 10000 nM AZD1775:llä verrattuna käsittelemättömiin kontrollisoluihin. H002i- ja M048i-soluissa HR oli toimivaa, mutta elinkelpoisten H002i-solujen määrä tippuu 18,5 %:iin 72 tunnin käsittelyssä 10000 nM AZD1775:llä, kun taas elinkelpoisten M048i-solujen määrä väheni vain 61,7 %:iin käsittelemättömien kontrollisolujen määrästä. H002i-solut jakautuivat huomattavasti hitaammin kuin muiden solulinjojen solut, millä voi olla vaikutusta tuloksiin.

Kahden ja kolmen lääkeaineen yhdistelmissä ei myöskään havaittu solulinjan HR:n tilaan yhdistettäviä eroja elinkelpoisten solujen määrissä lääkeainekäsittelyjen jälkeen kaupallisilla tai potilasperäisillä solulinjoilla. Koska vasteessa ei havaittu eroja, saattaa olla, että AZD1775 herkistää myös solut, joissa HR on toimivaa sisplatiinille. AZD1775:n onkin havaittu haimasyöpäsoluilla tehdyssä tutkimuksessa, herkistävän solut, joissa oli villin tyypin *BRCA2*-geeni, haimasyövän hoidossa käytetylle solunsalpaajalle, gemsitabiinille (Kausar ja muut 2015).

5.2 Vaste sisplatiinin ja AZD1775:n yhdistelmälle on voimakkain

kahden lääkeaineen yhdistelmistä

Kahden lääkeaineen yhdistelmistä sisplatiinin ja AZD1775:n yhdistelmä vähentää elinkelpoisten solujen määrää enemmän kuin sisplatiinin ja olaparibin tai olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmä solulinjasta riippumatta. HGSOC:t ovat *TP53*-mutatoituneita ja hiirimallilla tehdyssä tutkimuksessa, AZD1775:n onkin havaittu herkistävän *TP53*-mutatoituneet pään ja kaulan alueen syöpäsolut sisplatiinille (Osman ja muut 2015). Lisäksi tutkimuksessa havaittiin AZD1775:n lisäävän sisplatiinin tehoa *in vivo* kasvaimissa, joissa oli *TP53* mutaatio. Näiden tulosten perusteella AZD1775 on erittäin potentiaalinen lääkeaine HGSOC:n hoitoon yhdistelmässä sisplatiinin kanssa.

Vaste olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmälle on voimakkaampi kuin sisplatiinin ja olaparibin yhdistelmälle kaikissa muissa solulinjoissa paitsi COV318- ja H002i-solulinjoissa. Tuloksen perusteella tällä hetkellä HGSOC:n hoidossa käytössä olevien sisplatiinin ja olaparibin yhdistelmä ei ole paras vaihtoehto HGSOC:n hoitoon. Meng (2018) tutkimusryhmineen ovat osoittaneet tutkimuksessaan AZD1775:n lisäävän herkkyttä olaparibille soluissa, joissa on *TP53*-mutaatio, mikä kertoo yhdistelmän potentiaalista myös HGSOC:n hoitoon.

5.3 AZD1775:llä on solujen elinkelpoisuutta heikentävä vaikutus

myös yhdistelmässä sisplatiinin ja olaparibin kanssa

Sisplatiinin, olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmä, jossa AZD1775:stä käytettiin 500 nM:n konsentraatiota on tehokkaampi kuin sama yhdistelmä, jossa AZD1775:stä käytettiin 100 nM:n konsentraatiota. Tulos kertoo, että AZD1775:llä on solujen elinkelpoisuutta heikentävä vaikutus myös yhdistelmässä sisplatiinin ja olaparibin kanssa, koska solujen elinkelpoisuus oli heikompi yhdistelmässä, jossa AZD1775:stä käytettiin korkeampaa konsentraatiota.

HGSOC:t ovat usein herkkiä platinapohjaiselle kemoterapialle, mutta resistenssin synty on yleistä. Syöpäsolupopulaatiot ovat geneettisesti monimuotoisia, joten osa syöpäsoluista voi olla tietyille lääkeaineelle resistenttejä tai kehittää sille resistenssin. Resistentit solut selviävät ja jakautuvat hoidosta huolimatta, mikä johtaa syövän

uusiutumiseen. Kahden tai useamman lääkeaineen yhdistelmät voivat olla keino välttää resistenssin syntyminen ja saavuttaa voimakkaampi vaste. Lääkeaineyhdistelmien avulla lääkeaineiden toksisuutta on mahdollista vähentää, kun yksittäisestä lääkeaineesta voidaan käyttää matalampaa pitoisuutta lääkeyhdistelmässä. AZD1775 lisää HGSOC:n hoidossa jo käytössä olevien sisplatiinin ja olaparibin solujen elinkelpoisuutta heikentävää vaikutusta, mikä kertoo AZD1775:n potentiaalista HGSOC:n hoidossa.

Aikaisempaa tutkimustietoa sisplatiinin, olaparibin ja AZD1775:n yhteisvaikutuksista ei ole. Olisi mielenkiintoista tutkia, kuinka lääkeaineet ja niiden yhdistelmät vaikuttavat normaaleihin soluihin, jotta lääkeaineiden sivuvaikutusten voimakkuudesta saataisiin tietoa. Olisi kiinnostavaa myös nähdä onko lääkeaineiden annostelujärjestyksen muuttamisella vaikutusta vasteeseen.

5.4 AZD1775 aiheuttaa DNA-katkoksia erityisesti soluissa, joissa HR on puutteellista

Comet assay -analyysissä 24 tunnin AZD1775-käsittelyn havaittiin lisäävän komeetan hännässä olevan DNA:n määrää Kuramochi-, OVCAR8- ja OVCAR3-solulinjoissa. Vastaavaa vaikutusta COV318-soluihin ei havaittu. Mitä suurempi määrä solun DNA:sta on komeetan hännässä, sitä enemmän solun DNA:ssa on katkoksia. AZD1775 aiheuttaa siis Kuramochi-, OVCAR8- ja OVCAR3-solujen DNA:han katkoksia, mutta ei COV318-solujen DNA:han. DNA:n määrä komeetan hännässä kasvaa Kuramochi-soluilla 8,9 prosenttiyksikköä, OVCAR8-soluilla 10,6 prosenttiyksikköä ja OVCAR3-soluilla 4,4 prosenttiyksikköä. Kuramochi- ja OVCAR8-solut, joissa DNA-katkosten määrää lisääntyy eniten, ovat HR-puutteellisia. HR on toimivaa OVCAR3-soluissa, joissa DNA-katkosten määrää lisääntyy hieman. HR on toimivaa myös COV318-soluissa, joissa AZD1775 ei lisää DNA-katkosten määrää. Käsittely AZD1775:llä 24 tunnin ajan aiheuttaa siis erityisesti HR-puutteellisten solujen DNA:han katkoksia.

Käsitlemättömissä COV318-kontrollisoluissa DNA:n määrä komeetan päässä on matalampi kuin muiden solulinjojen käsitlemättömissä kontrollisoluissa. Valolle altistuminen comet assay -analyysin aikana voi aiheuttaa vaurioita DNA:han, mutta soluja pyrittiin suojaamaan valolta mahdollisimman hyvin ja kaikkien solulinjojen

soluja käsiteltiin samalla tavoin. Tuloksen perusteella COV318-soluissa on enemmän endogeenisiä DNA-katkoksia jo ennen käsittelyä AZD1775:llä kuin muissa solulinjoissa.

Comet assay -analyysistä tehtiin vain yksi toisto kaupallisilla solulinjoilla ja ainoastaan AZD1775:llä käsitellyillä soluilla. Olisi kiinnostavaa tutkia toistuuko saatu tulos ja saadaanko potilasperäisillä soluilla samanlainen tulos. Lisäksi olisi kiinnostavaa tutkia kuinka paljon olaparib ja sislplatiini sekä erilaiset lääkeyhdistelmät saavat aikaan DNA-vaurioita soluissa.

6 YHTEENVETO

Tutkimuksen tavoitteena oli verrata Wee1-kinaasin inhibiittorin AZD1775:n vaikutusta elinkelpoisuuteen HGSOc-soluissa, joissa HR on toimivaa tai puutteellista, tutkia AZD1775 vaikutusta yhdessä muiden lääkeaineiden kanssa ja selvittää aiheuttaako AZD1775 käsittely solujen DNA:han katkoksia. HR-puutteellisuuden ei havaittu vaikuttavan AZD1775:n solujen elinkelpoisuutta heikentävään vaikutukseen. AZD1775:n vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen tutkittiin kuitenkin vain pienellä määrällä solulinjoja, joten selkeää johtopäätöstä ei voida tehdä. AZD1775:n havaittiin kuitenkin aiheuttavan erityisesti HR-puutteellisten solujen DNA:han katkoksia.

Kahden lääkeaineen yhdistelmistä sisplatiinin ja AZD1775:n yhdistelmän havaittiin heikentävän solujen elinkelpoisuutta enemmän kuin sisplatiinin ja olaparibin tai olaparibin ja AZD1775:n yhdistelmän solulinjasta riippumatta. Kolmen lääkeaineen yhdistelmässä AZD1775:n havaittiin lisäävän sisplatiinin ja olaparibin solujen elinkelpoisuutta heikentävää vaikutusta. Näiden tulosten perusteella AZD1775 on potentiaalinen lääkeaine HGSOc:n hoitoon sisplatiinin ja olaparibin kanssa.

Kliinistä tutkimustietoa AZD1775:n vaikutuksista ja sivuvaikutuksista on vielä hyvin vähän. AZD1775:ttä ei myöskään ole aikaisemmin tutkittu yhdistelmässä sisplatiinin ja olaparibin kanssa. Lisää sekä kliinistä että perustason tutkimusta AZD1775:n vaikutuksista ja yhteisvaikutuksista sisplatiinin ja olaparibin kanssa tarvitaan ennen kuin lääkeainetta voidaan käyttää syövän hoidossa. AZD1775 saattaa olla potentiaalinen lääkeaine myös muiden *TP53*-mutatoituneiden syöpien hoidossa HGSOc:n lisäksi.

LÄHTEET

Barnum, K.J. & O'Connell, M.J. (2014) Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol Biol* **1170**:29-40.

Bowtell, D.D., Böhm, S., Ahmed, A.A., Aspuria, P., Bast, R.C., Beral, V., Berek, J.S., Birrer, M.J., Blagden, S., Bookman, M.A., Brenton, J., Chiappinelli, K.B., Martins, F.C., Coukos, G., Drapkin, R., Edmondson, R., Fotopoulou, C., Gabra, H., Galon, J., Gourley, C., Heong, V., Huntsman, D.G., Iwanicki, M., Karlan, B.Y., Kaye, A., Lengyel, E., Levine, D.A., Lu, K.H., McNeish, I.A., Menon, U., Narod, S.A., Nelson, B.H., Nephew, K.P., Pharoah, P., Powell, D.J., Ramos, P., Romero, I.L., Scott, C.L., Sood, A.K., Stronach, E.A. & Balkwill, F.R. (2015) Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nature reviews. Cancer* **15**:668.

Boxem, M. (2006) Cyclin-dependent kinases in *C. elegans*. *Cell Div* **1**:6.

Bozic, I., Reiter, J.G., Allen, B., Antal, T., Chatterjee, K., Shah, P., Moon, Y.S., Yaquibie, A., Kelly, N., Le, D.T., Lipson, E.J., Chapman, P.B., Diaz, L.A., Vogelstein, B. & Nowak, M.A. (2013) Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *Elife* **2**:e00747.

Chatterjee, N. & Walker, G.C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis* **58**:235-263.

Chu, P., Wu, E. & Weiss, L.M. (2000) Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: A Survey of 435 Cases. *Modern pathology* **13**:962-972.

Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C. & Schultz, N. (2013) Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature communications* **4**:2126.

Evers, B., Helleday, T. & Jonkers, J. (2010) Targeting homologous recombination repair defects in cancer. *Trends Pharmacol Sci* **31**:372-380.

Fang, Y., McGrail, D.J., Sun, C., Labrie, M., Chen, X., Zhang, D., Ju, Z., Vellano, C.P., Lu, Y., Li, Y., Jeong, K.J., Ding, Z., Liang, J., Wang, S.W., Dai, H., Lee, S., Sahni, N.,

Mercado-Uribe, I., Kim, T., Chen, K., Lin, S., Peng, G., Westin, S.N., Liu, J., O'Connor, M.J., Yap, T.A. & Mills, G.B. (2019) Sequential Therapy with PARP and WEE1 Inhibitors Minimizes Toxicity while Maintaining Efficacy. *Cancer Cell* **35**:851-867.

Geenen, J.J.J. & Schellens, J.H.M. (2017) Molecular Pathways: Targeting the Protein Kinase Wee1 in Cancer. *Clin Cancer Res* **23**:4540-4544.

Giglia-Mari, G., Zotter, A. & Vermeulen, W. (2011) DNA Damage Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a000745.

GLOBOCAN 2018 Global Cancer Observatory. WWW-sivusto:

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id= (Luettu 27.7.2020)

Hakem, R. (2008) DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* **27**:589-605.

Hoover, R. CometScore. 2.0.

Kaipio, K., Chen, P., Roering, P., Huhtinen, K., Mikkonen, P., Östling, P., Lehtinen, L., Mansuri, N., Korpela, T., Potdar, S., Hynninen, J., Auranen, A., Grénman, S., Wennerberg, K., Hautaniemi, S. & Carpén, O. (2020) ALDH1A1-related stemness in high-grade serous ovarian cancer is a negative prognostic indicator but potentially targetable by EGFR/mTOR-PI3K/aurora kinase inhibitors. *The Journal of Pathology* **250**:159-169.

Kausar, T., Schreiber, J.S., Karnak, D., Parsels, L.A., Parsels, J.D., Davis, M.A., Zhao, L., Maybaum, J., Lawrence, T.S. & Morgan, M.A. (2015) Sensitization of Pancreatic Cancers to Gemcitabine Chemoradiation by WEE1 Kinase Inhibition Depends on Homologous Recombination Repair. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **17**:757-766.

Khanh Do, Deborah Wilsker, Jiuping Ji, Jennifer Zlott, Tomoko Freshwater, Robert J Kinders, Jerry Collins, Alice P Chen, James H Doroshow & Shivaani Kummar (2015) Phase I Study of Single-Agent AZD1775 (MK-1775), a Wee1 Kinase Inhibitor, in Patients With Refractory Solid Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**:3409-3415.

Kim, J., Coffey, D.M., Ma, L. & Matzuk, M.M. (2015) The ovary is an alternative site of origin for high-grade serous ovarian cancer in mice. *Endocrinology* **156**:1975-1981.

Konstantinopoulos, P.A., Ceccaldi, R., Shapiro, G.I. & D'Andrea, A.D. (2015) Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer discovery* **5**:1137.

Kurman, R.J. & Shih, I. (2010) The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol* **34**:433-443.

Leijen, S., Geel, Robin M. J. M. van, Sonke, G.S., Jong, D.d., Rosenberg, E.H., Marchetti, S., Pluim, D., Werkhoven, E.v., Rose, S., Lee, M.A., Freshwater, T., Beijnen, J.H. & Schellens, J.H.M. (2016) Phase II Study of WEE1 Inhibitor AZD1775 Plus Carboplatin in Patients With TP53-Mutated Ovarian Cancer Refractory or Resistant to First-Line Therapy Within 3 Months. *Journal of Clinical Oncology* **20**:4354-4361.

Lisio, M., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z. & Telleria, C. (2019) High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci* **20**:952.

Matheson, C.J., Backos, D.S. & Reigan, P. (2016) Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci* **37**:872-881.

Matulonis, U.A., Sood, A.K., Fallowfield, L., Howitt, B.E., Sehouli, J. & Karlan, B.Y. (2016) Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2**:1-22.

Meng, X., Bi, J., Li, Y., Yang, S., Zhang, Y., Li, M., Liu, H., Li, Y., Mcdonald, M.E., Thiel, K.W., Wen, K., Wang, X., Wu, M. & Leslie, K.K. (2018) AZD1775 Increases Sensitivity to Olaparib and Gemcitabine in Cancer Cells with p53 Mutations. *Cancers* **10**:149.

Morris, J., Hartl, D., Knoll, A., Lue, R., Michael, M., Berry, A., Biewener, A., Farrell, B. & Holbrook, N.M. (2016) *Biology: How life works*. W.H. Freeman.

Nikfarjam, L. & Farzaneh, P. (2012) Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. *Cell J* **13**:203-212.

Osman, A.A., Monroe, M.M., Alves, M.V.O., Patel, A.A., Katsonis, P., Fitzgerald, A.L., Neskey, D.M., Frederick, M.J., Woo, S.H., Caulin, C., Hsu, T., McDonald, T.O., Kimmel, M., Meyn, R.E., Lichtarge, O. & Myers, J.N. (2015) Wee-1 Kinase Inhibition Overcomes Cisplatin Resistance Associated with High-Risk TP53 Mutations in Head and Neck Cancer through Mitotic Arrest Followed by Senescence. *Molecular cancer therapeutics* **14**:608-619.

Pinsky, P.F., Yu, K., Kramer, B.S., Black, A., Buys, S.S., Partridge, E., Gohagan, J., Berg, C.D. & Prorok, P.C. (2016) Extended Mortality Results for Ovarian Cancer Screening in the PLCO Trial with Median 15 Years Follow-up. *Gynecol Oncol* **143**:270-275.

Ronco, C., Martin, A.R., Demange, L. & Benhida, R. (2017) ATM,ATR,CHK1,CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. *Medchemcomm* **8**:295-319.

Rowinsky, M., Eric K. (1997) The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med* **48**:353-374.

Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A. & Piccart, M. (2015) An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* **12**:27-41.

Syöpä 2017 -raportti. WWW-sivusto:

https://syoparekisteri.fi/assets/files/2019/10/syöpä2017_raportti.pdf (Luettu 27.7.2020)

Torre, L.A., Trabert, B., DeSantis, C.E., Miller, K.D., Samimi, G., Runowicz, C.D., Gaudet, M.M., Jemal, A. & Siegel, R.L. (2018) Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**:284-296.

Tumiati, M., Hietanen, S., Hynninen, J., Pietilä, E., Färkkilä, A., Kaipio, K., Roering, P., Huhtinen, K., Alkods, A., Li, Y., Lehtonen, R., Erkan, E.P., Tuominen, M.M., Lehti, K., Hautaniemi, S.K., Vähärautio, A., Grénman, S., Carpén, O. & Kauppi, L.

(2018) A Functional Homologous Recombination Assay Predicts Primary Chemotherapy Response and Long-Term Survival in Ovarian Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **24**:4482-4493.

Vaughan, S., Coward, J.I., Bast, R.C., Berchuck, A., Berek, J.S., Brenton, J.D., Coukos, G., Crum, C.C., Drapkin, R., Etemadmoghadam, D., Friedlander, M., Gabra, H., Kaye, S.B., Lord, C.J., Lengyel, E., Levine, D.A., McNeish, I.A., Menon, U., Mills, G.B., Nephew, K.P., Oza, A.M., Sood, A.K., Stronach, E.A., Walczak, H., Bowtell, D.D. & Balkwill, F.R. (2011) Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* **11**:719-725.

Wright, W.D., Shah, S.S. & Heyer, W. (2018) Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry* **293**:10524-10535.

Yadav, B., Pemovska, T., Szwajda, A., Kuleskiy, E., Kontro, M., Karjalainen, R., Majumder, M.M., Malani, D., Murumägi, A., Knowles, J., Porkka, K., Heckman, C., Kallioniemi, O., Wennerberg, K. & Aittokallio, T. (2014) Quantitative scoring of differential drug sensitivity for individually optimized anticancer therapies. *Scientific reports* **4**:5193.