

A checkpoint kinase 1 expressziója és gátlása *TP53*-mutációt hordozó rosszindulatú daganatokban

ÓSZ ÁGNES^{1,2}, ASZÓDI BOGLÁRKA^{1,2}, VAJDA RÉKA^{1,2}, KESERŐ GYÖRGY MIKLÓS³, MOLL HERWIG P⁴, CASANOVA EMILIO^{4,5}, GYÖRFFY BALÁZS^{1,2}

¹Semmelweis Egyetem, II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, ²TTK, Enzimológia Intézet, Lendület Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, ³TTK SZKI, Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, Budapest, ⁴Department of Physiology, Center of Physiology and Pharmacology, Comprehensive Cancer Center (CCC), Medical University of Vienna, ⁵Ludwig Boltzmann Institute for Cancer Research (LBI-CR), Bécs, Ausztria

Levelezési cím:

Prof. Dr. Gyórfy Balázs, Semmelweis Egyetem,
II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, 1094 Budapest, Tűzoltó utca
7–9., e-mail: gyorffy.balazs@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2019. szeptember 19.

Elfogadva:

2019. november 11.

Rosszindulatú daganatos megbetegedésekben leggyakrabban a prognózissal is összefüggő, *TP53* gént érintő mutációk azonosíthatóak. Azonban mind ez idáig nem járt sikerrel a *TP53*-mutáns tumorok célzott kezelése. Célunk volt *in silico* azonosítani a *TP53* gén mutációinak hatását a túléléssel is összefüggő és terápiásan célozható gének expressziójára, majd az így kapott eredményeket *in vitro* igazolni *TP53*-vad és -mutáns izogén sejtvonalpárokon végzett gátlószeres kezeléssel. A *TP53*-mutációs státusz alapján 994 beteget két csoportra osztottunk, majd az összes génre Mann–Whitney-tesztet végeztünk, hogy meghatározzuk, a mutáció mely gének kifejeződésével áll kapcsolatban. A célozható kinázok közt a *CHEK1* expressziójának szignifikáns növekedését mutattuk ki a *TP53*-mutáns csoportban. Az A549 izogén tüdőkarcinóma-sejtvonalakon igazoltuk a *CHEK1*-expresszió változását a mutációval összefüggésben, majd egy Chk1 (checkpoint kinase 1) fehérjére specifikus gátlószer hatását vizsgáltuk a sejtek működésére. A gén prognosztikus szerepét Cox-regresszió és Kaplan–Meier túlélési analízis használatával, 1926 tüdőkarcinómás betegen vizsgáltuk, mely során a *CHEK1* expressziójának növekedése rosszabb prognózissal társult. Eredményeink igazolják, hogy a *CHEK1* kifejeződése nagymértékben összefügg a *TP53*-mutációval és a túléléssel is a tüdő rosszindulatú daganatai esetében. *Magy Onkol* 63:345–352, 2019

Kulcsszavak: *TP53*-mutáció, *CHEK1*, tirozinkináz, tüdőtumor, célzott terápia

The most frequently mutated gene in human tumors is TP53 and its mutation significantly deteriorates patients' survival. However, to date no targeted therapy is established for TP53 mutated tumors. Here, our aim was to identify druggable kinases with higher expression in TP53 mutated tumors, as well as relate these to altered prognosis. We also aimed to validate a target gene in TP53 wild type and mutant isogenic cell lines using a specific kinase inhibitor. Gene expression and mutation data were collected from 994 lung tumor samples. Samples were separated based on TP53 mutation status, and differential gene expression was compared using Mann–Whitney test between patient cohorts. Prognostic value of identified genes was validated in an array-based lung cancer dataset (n=1926). Survival analysis was performed using Cox proportional hazards regression and Kaplan–Meier survival plots. Effect of TP53 mutations on CHEK1 expression was validated in the A549 isogenic lung cancer cell line. The cell line was also treated using Chk1 protein specific kinase inhibitor to monitor cell functions. Expression of CHEK1 was elevated significantly among targetable kinases and higher expression of CHEK1 related to worse prognosis. Our results confirm the higher expression of CHEK1 kinase associated to TP53 mutations and to shorter survival.

Ósz Á, Aszodi B, Vajda R, Keserő GM, Moll Herwig P, Casanova E, Gyórfy B. *CHEK1 expression and inhibitors in TP53 mutant cancer. Magy Onkol* 63:345–352, 2019

Keywords: *TP53 mutation, CHEK1, tyrosine kinase, lung cancer, personalized therapy*

BEVEZETÉS

A rosszindulatú daganatos megbetegedések közt a tüdőkarcinóma a leggyakrabban előforduló (12%) és halált okozó (18%) betegség. A GLOBOCAN adatai alapján 2018-ban 1,8 millió ember halt meg tüdődaganatban, és 2,1 millió új esetet diagnosztizáltak (1). Az Európai Unió tagállamai közt Magyarországon a legmagasabb a 100 000 főre jutó halálozási ráta a tüdőkarcinómára nézve (100 000 lakosból 89) (2).

Hisztopatológiai szempontból a tüdő rosszindulatú daganatai kissejtes (15%) és nem kissejtes (85%) tumorra, azon belül főként laphámsejtes (30%) és adenokarcinómára (60%) különíthetők el. A megfelelő kezelés megválasztásához a szövettani besorolás mellett szükséges az altípusok genetikai jellemzése is. A nem kissejtes tüdődaganatok ellenállóbbak (20–50% válaszadási arány) a platinaalapú kemoterápiával szemben a kissejtes tüdődaganathoz viszonyítva (60–80% válaszadási arány). Ez az eltérés a személyre szabott terápia jelentőségét növeli (3). A kissejtes tüdőkarcinómás betegek többségénél megfigyelhető a daganat kialakulása szempontjából kulcsfontosságú tumorprotein p53 (*TP53*, 90%) és retinoblasztóma-1 (*RB1*, 65%) tumorszuppresszor gének funkcióvesztéses mutációja. Emellett a MYC protoonkogén fehérjecsald tagjainak fokozott megjelenése, a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) és Notch jelátviteli útvonalak megváltozása is jellemző (4). A nem kissejtes tüdődaganatok esetén gyakoriak az epidermális növekedési faktor receptor (*EGFR*, 10–60%) és az anaplasztikus limfóma kináz (*ALK*, 3–5%) onkogének aktiváló mutációi is. A *TP53* (50%) és az *RB1* (10%) gének mutációja gyakori a nem kissejtes tüdődaganatok esetében is. Az adenokarcinómákban ezen felül nagy arányban (30%) megfigyelhető a *KRAS* onkogén mutációja is, amely a laphámsejtes betegekénél jóval ritkább (5, 6).

Jelenleg az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerhatóság (Food and Drug Administration, FDA) 19 célzott daganatterápiás szert fogadott el a tüdődaganat kezelésére. Ezek közül mind alkalmas a nem kissejtes tüdőkarcinóma különböző altípusainak kezelésére, azonban csak egy gyógyszer alkalmazható kissejtes tüdődaganatban szenvedő betegekénél. A felsorolt genetikai változások közül a legtöbb gyógyszer a főként adenokarcinómában előforduló, mutáció hatására túltermelő EGFR fehérjét célozza. Az első generációs EGFR-gátlók (például gefitinib, erlotinib) a fehérje tirozinkináz alegységéhez (EGFR-TK) kötődnek (7). A betegek többsége egy éven belül rezisztenssé válik az EGFR-TK-inhibitorokra, ekkor a második (például dakomitinib, afatinib), és a harmadik generációs (például ozimertinib) gátlók alkalmazása javasolt. A másodvonalbeli tirozinkináz-gátlók az EGFR-TK alegység mellett a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) fehérjéhez is képesek kötődni, és az első generációs gyógyszerekhez képest még hosszabb progressziómentes túlélést biztosítanak a kemoterápiás kezeléssel szemben, azonban az okozott mellékhatásaik is súlyosabbak (8). Az *ALK*- vagy *ROS1*-mutációt hordozó nem kissejtes tüdőkarcinómás betegekben alkalmazható a krizo-

tinib tirozinkináz-gátló, ami növeli a progressziómentes túlélést, valamint elősegíti a sugárkezelés sikerességét (9). Rezisztencia vagy agyi áttétek megjelenése esetén a második generációs (például ceritinib, brigatinib és alektinib), majd a harmadik generációs (lorlatinib) *ALK*-tirozinkináz-gátlók alkalmazása javasolt (10). Megfelelő biomarkerek megléte esetén a nem kissejtes tüdődaganatok kezelésében a programmed cell death protein 1-et (PD-1) célzó nivolumab vagy pembrolizumab, és a programmed death ligand 1-et (PD-L1) célzó atezolizumab, durvalumab vagy avelumab monoklonális antitestek alkalmazása is lehetséges (7). A kissejtes tüdődaganat esetén elsősorban kemoterápiát, agyi áttétek kialakulása után pedig sugárterápiát is kapnak a betegek. A PD-L1-et célzó monoklonális antitest, az atezolizumab az egyetlen FDA által elfogadott célzott terápiás szer előrehaladott stádiumú kissejtes tüdőrák kezelésére. Kombináltan alkalmazva kemoterápiával jelentősen megnöveli a betegek progressziómentes és teljes túlélését is az önmagában alkalmazott kemoterápiával szemben (11).

A tüdődaganatokban leggyakrabban mutálódó *TP53* tumorszuppresszor gén fő szerepe a DNS-hibák után a sejtciklus leállítására és a programozott sejthalál beindítására, ezáltal a további mutációk kiküszöbölésére. A génről képződő p53 fehérje körülbelül 500 gén átíródására van közvetlen hatással, ezáltal számos sejtbiológiai folyamatot befolyásol (12). A gén mutációja rendszerint gyorsabb lefolyású betegséggel társul (13). Funkcióvesztés mellett a p53 fehérje mutációja a tumorok fejlődését elősegítő funkcióbeli változásokhoz is vezethet (14). Több kísérleti gyógyszer van e mutációt hordozó betegek célzott kezelésére, de összetett szerepe és funkciónyerő mutációi miatt a klinikai gyakorlatban továbbra sincs jóváhagyott kezelés (15). Számos gén kifejeződésének változása egyértelműen összefüggésbe hozható a *TP53* gén mutációjával több tumortípussal is (4, 16, 17), melyek közt több tirozinkináz túléléssel kapcsolatos szerepét is kimutatták (18, 19). Ezek alapján célul tűztük ki nagy adatbázisok használatával olyan a *TP53*-mutációval összefüggő expresszióváltozást mutató, terápiásan célozható tirozinkinázok azonosítását, melyek megnövekedett kifejeződése rosszabb prognózissal társul. Az így kapott eredményeket *TP53*-vad és -mutáns izogén sejtvonalpárokon végzett célzott gátlószerekkel kivántuk igazolni.

ANYAG ÉS MÓDSZEREK

Statisztikai elemzés, kinázok szűrése, túlélés-analízis

A The Cancer Genome Atlas (TCGA) adatbázisból 1053 rosszindulatú tüdődaganatos beteg új generációs szekvenálással nyert (NGS) adatát töltöttük le. A *TP53* gén mutációs státusza alapján felosztott két betegcsoportot Mann-Whitney-analízissel hasonlítottuk össze a Genotype-2-Outcome rendszer során leírt algoritmussal (<http://www.g-2-o.com>) (20). A *TP53*-mutációval szignifikánsan összefüggő expresszióváltozást mutató gének listájából kiszűrtük a felülexpresszáldó kinázokat, majd ezek prognosztikus szerepét Cox-regresszióval és

Kaplan–Meier túlélési vizsgálattal határoztuk meg (<http://kmpplot.com/analysis>) [21]. Ennek eredményeként kiszűrtük a TP53-mutációval összefüggő, felülexpresszázó kinázokat, melyek magas expressziója rossz prognózissal társul tüdő-karcinómás betegekben, melyek közül a checkpoint kinase 1-et (gén: CHEK1, fehérje: Chk1) vizsgáltuk tovább (1.a ábra).

Sejtek fenntartása

Az *in vitro* vizsgálathoz TP53-gén-kiütött (TP53 mut), valamint a gén vad allélját hordozó (WT) A549 nem kissejtes tüdő-karcinóma-sejtvonalakat használtunk. A TP53 gén funkcióvesztéses mutációját CRISPR-Cas9 technológiával idéztük elő, aminek eredményeképp nem képződik a génről p53 fehérje a mutáns sejtvonalban. A sejtvonalakat 10% FBS-sel (borjúmagzatszérum, EuroClone, Olaszország) és 1% penicillin/sztreptomycin/amfotericin B oldattal (Lonza, Svájc) kiegészített RPMI 1640 médiumban (Corning, Egyesült Államok), 37 °C-os inkubátorban, 5%-os CO₂-szint mellett tartottuk.

Mutáció és génexpresszió vizsgálata

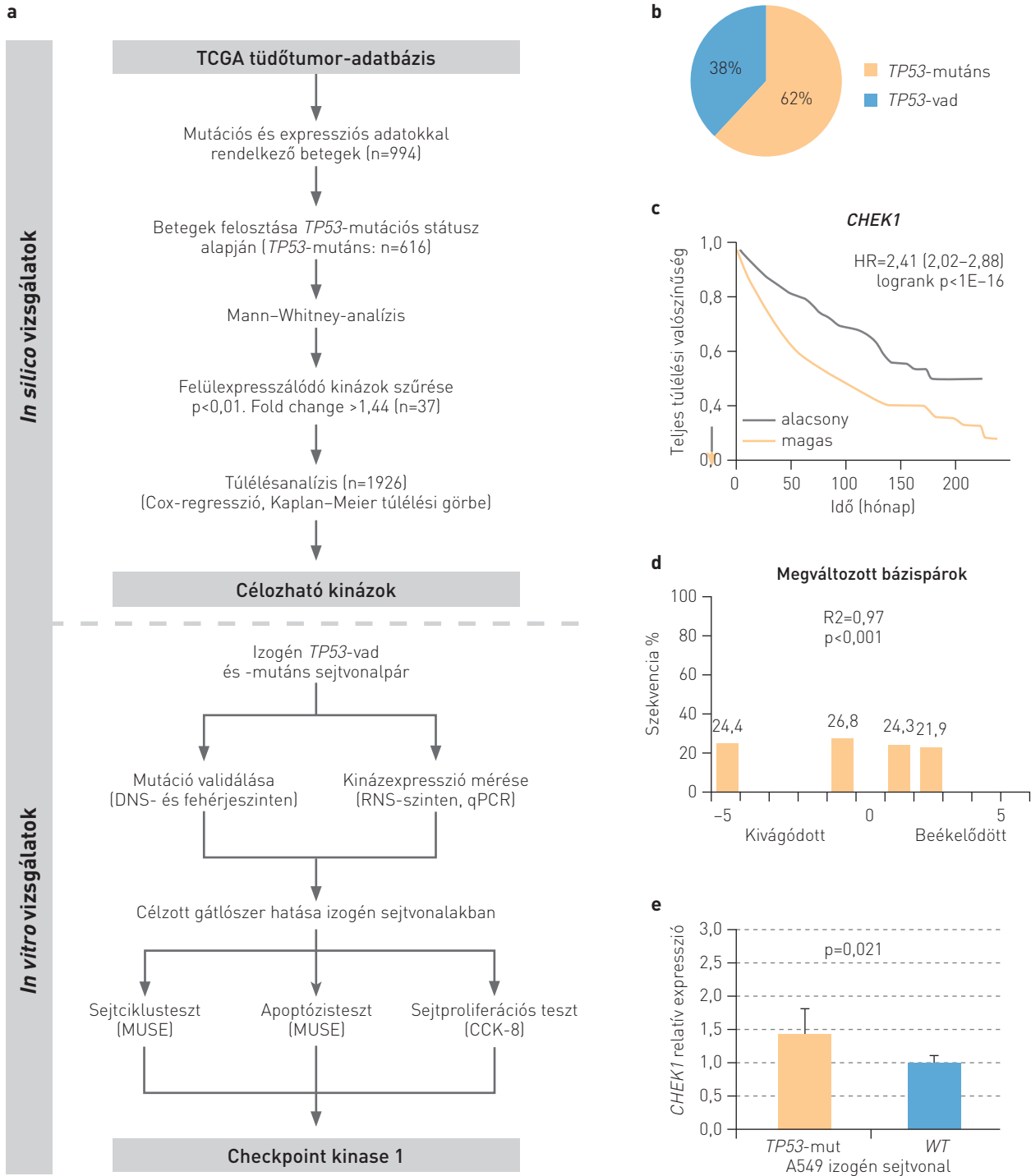
A TP53 gén mutációjának és a CHEK1 gén expresszióváltozásának igazolásához DNS-t és RNS-t izoláltunk mindkét sejtvonalból AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Németország) felhasználásával a gyártó utasításai alapján. Az izolátumok nukleinsav-koncentrációját spektrofotométerrel (Nanodrop-1000, Thermo Fisher Scientific, Egyesült Államok) állapítottuk meg. A mutáció vizsgálatához a TP53 gén kódoló szakaszát polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszoroztuk fel. A reakciókat 50 µl végtérfogatban végeztük

el, ami 100 ng DNS-t, 2× DreamTaq Green PCR Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific), 500 nM forward és reverse primert tartalmazott. A kezdő denaturációt (95 °C, 3 perc) követően az alábbi protokollt ismételtettük 40-szer Esco Swift Maxi (Thermo Fisher Scientific) készülékben: denaturáció 95 °C-on 30 mp-ig, bekötés 55 °C-on 30 mp-ig, lánchosszabbítás 72 °C-on 30 mp-ig, majd a végén egy 7 perces 72 °C-os szakasz következett. Az így kapott termékek Sanger-féle szekvenálását a Microsynth cég (<https://www.microsynth.ch/home-ch.html>) végezte el. A szekvenciákat a BioEdit szoftver [22] segítségével illesztettük a TP53 gén genomi (NG017013) és exonszekvenciáihoz (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A CHEK1 gén mennyiségi vizsgálatához 1–1 µg RNS-ből cDNS-t készítettünk Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) használatával. A kvantitatív PCR (qPCR) reakciót Rotor-Gene Q (Qiagen) készülékben az alábbi hőprofíllal végeztük el: polimeráz aktiváció 95 °C 2 perccig, majd 36-szor ismételve 95 °C 10 mp-ig, 62 °C 10 mp-ig, 72 °C 20 mp-ig. Egy reakcióhoz 10 µl végtérfogatban 1 µl 10-szeresre hígított cDNS-t, 2× SensiFAST SYBR No-ROX Kitet (Bioline Reagents, Egyesült Királyság), és 250 nM forward és reverse primert adtunk. Minden mintát összesen háromszor ismétlésben mértünk le, majd a kísérletet négyszer ismételtük. A relatív expresszió kiszámításához a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztuk, a CHEK1 gén kifejeződését a GAPDH és ACTB gének expressziójához, a mutáns vonalat pedig a vad típusúhoz viszonyítottuk. A primereket exon-exon határra terveztük. A PCR-hez és qPCR-hez használt primereket az 1. táblázat tartalmazza.

1. TÁBLÁZAT. A vizsgálat során alkalmazott PCR és kvantitatív PCR primer szekvenciák

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')	Termék	Exon	Intron
TP53	p53-E2-4-F	TCCTCTGCAGCAGCCAGACTGC		2-	2
TP53	p53-E2-4-R	GGCATTGAAAGTCTCATGGAAGC	620 bp	4	3
TP53	p53-E5-6F	CTTCCTACAGTACTCCCCTGC		5-	5
TP53	p53-E5-6R	ACTGACAACCACCCTTAACC	441 bp	6	6
TP53	p53-E7-9F	CTCATCTGGGCTGTGTTATCTCC		7-	7
TP53	p53-E7-9R	CCACTTGATAAGAGGTCCCAAGACTTAG	760 bp	9	8
TP53	p53-E10-11F	CCTCCTCTGTTGCTGCAGATCC		10	10
TP53	p53-E10-11R	GGCTGTCAAGTGGGAACAAGAAG	1110 bp	11	
Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')	Termék		
CHEK1	CHEK1_F	CTCATGGCAGGGGTGGTTTAT			
CHEK1	CHEK1_R	CTGTTGCCAAGCCAAAGTCTG	121 bp		
GAPDH	GAPDH_F	AAATCAAGTGGGGCGATGCT			
GAPDH	GAPDH_R	CAATGAGCCCCAGCCTTCT	86 bp		
ACTB	ACTB_F	CTGTGGCATCCACGAAACTA			
ACTB	ACTB_R	AGTACTTGCCTCAGGAGGA	200 bp		



1. ÁBRA. *TP53*-mutációval és a túléléssel összefüggő kinázok keresése. a) A vizsgálat folyamata. b) *TP53*-mutáns tüdőrákos betegek aránya a TCGA adatbázis adatai alapján. c) *CHEK1* expressziójának hatása a teljes túlélésre tüdőrákos betegek esetén. d) A CRISPR-Cas rendszerrel létrehozott változások aránya az A549 *TP53*-mutáns sejtvonalban. e) *CHEK1* expressziójának vizsgálata az izogén A549 sejtvonalakban kvantitatív PCR-rel

Gyógyszeres kezelés, sejtproliferáció, apoptózis és sejtciklus mérése

A TP53-mutáns és -vad A549 sejtvonalakat a Chk1-specifikus, prexasertib-mezilát (szinonimák: LY2606368, LY2940930, fejlesztő: Array BioPharma) kis molekulású inibitorral kezeltük (2.a ábra). A gátlószer hatását a sejtek proliferációs képességére CCK8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japán) kolorimetriás teszttel vizsgáltuk a gyártó ajánlása alapján. A két sejtvonalból 1000 sejt/100 µl mennyiséget osztottunk ki 96 lyukú lemezekre. Egyéjszakás inkubáció után a sejteket a teljes médiummal hígított LY2940930 gátlószerrel kezeltük az alábbi koncentrációkban: 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 1000 nM. A kontrollsejteket a gyógyszer oldószerével, a 2,5 µM-os kezelésnek megfelelő mennyiségű (0,05%) médiumban bekevert DMSO-val kezeltük, ezzel párhuzamosan lemértük a kezeletlen kontrollsejteket. 72 órás kezelés után hozzáadtuk a CCK-8 festéket a sejtekhez, majd 2 órás inkubáció végeztével 450 nm és 650 nm hullámhosszon lemértük a lemezeket EnSpire Multimode Plate Reader készülékkel (PerkinElmer, Egyesült Államok). Minden koncentrációt kilencszeres ismétlésben vizsgáltunk sejtvonalanként. A sejtek relatív proliferációját a DMSO-val kezelt és a kezeletlen kontrollsejtek abszorbanációjához viszonyítva számoltuk ki, majd ez alapján a GraphPad PRISM szoftver (GraphPad Software Inc., Egyesült Államok) használatával kiszámoltuk a LY2940930 inhibitor 50%-os, 75%-os és 90%-os gátlási koncentrációit (IC₅₀, IC₇₅, IC₉₀).

Az apoptózisteszthez a TP53-mutáns és -vad A549 sejtvonalakból 6000 sejt/100 µl mennyiséget osztottunk ki 96 lyukú lemezre. A sejtciklusvizsgálathoz pedig a két sejtvonalból 300 000 sejt/2 ml mennyiséget osztottunk ki 6 lyukú lemezekre. Egyéjszakás inkubáció után a sejteket 10 nM, RPMI médiumban hígított LY2940930 gátlószerrel kezeltük. A kontrollsejteket a médiummal bekevert DMSO-val kezeltük (0,01%). 24 órás inkubáció után, a gyártó ajánlásait követve, az apoptotikus sejtek arányát MUSE Annexin V & Dead Cell Reagent kittel (Merck Millipore, Egyesült Államok), a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek arányát pedig MUSE Cell Cycle Reagent kittel (Merck Millipore), MUSE Cell Analyzer áramlási citométer (Merck Millipore) használatával határoztuk meg. Minden koncentrációt hatszoros ismétlésben vizsgáltunk sejtvonalanként. A két sejtvonal közti különbségek kimutatására a különböző fázisban lévő sejtek arányát Kruskal-Wallis- és Mann-Whitney-teszttel hasonlítottuk össze és GraphPad PRISM szoftverrel ábráztuk.

EREDMÉNYEK

Statisztikai elemzés, kinázok szűrése, túlélés-analízis

A TCGA adatbázisból származó 994 tüdőcarcinómából 616 (62%) tumorban volt megtalálható a TP53 gén mutációja (1.b ábra). A vad és mutáns betegcsoportok összehasonlítása alapján 2133 gén expresszióváltozása statisztikailag összefügg (fold change (FC)>1,44, p<0,01) a TP53-mutációval rosszindulatú tüdődaganatos betegek esetében (kiegészítő

1. táblázat; a kiegészítő táblázatok az online változatban tekinthetők meg) Ezek közül 953 gén mutatott magasabb kifejeződést a TP53-mutáns betegcsoportban a mutációt nem hordozó betegekhez képest (kiegészítő 2. táblázat). A mutáns betegcsoportban felülexpresszáldó gének közt 37 kinázt találtunk, melyek közül a 10 legerősebb szignifikanciát mutató gén túléléssel való összefüggését vizsgáltuk tovább.

Tüdőcarcinómás betegek (n=1926) génexpressziós és túlélési adatainak elemzése alapján a legerősebb szignifikanciát mutató kinázok magasabb expressziója a rövidebb teljes túléléssel mutat összefüggést. Az összes paramétert figyelembe véve a CHEK1-et vizsgáltuk tovább a kísérleteink során. A TP53-mutációt hordozó betegcsoportban a CHEK1 kifejeződése 1,88-szoros a vad típusú betegcsoportéhoz képest (p=2,25E-32). Ez a különbség a túléléssel is összefügg, a betegek medián túlélése az alacsonyabb CHEK1-expressziójú csoportban 128,8 hónap, míg magas CHEK1-expresszió esetén 51,53 hónap volt (HR=2,41, p<1E-16) (1.c ábra).

Mutáció és génexpresszió vizsgálata

Az izogén A549 sejtvonalak TP53 génjének szekvenciális összehasonlításával igazoltuk a TP53 gén mutációját. A mutáns sejtvonalban a TP53 gén 5. exonjának 100. bázispárjánál a CRISPR-Cas rendszer által okozott szekvenciaváltozások (kivágódás és beékelődés) figyelhetőek meg, melynek következtében nincs működőképes p53 fehérje a sejtvonalban (1.d ábra). A valós idejű PCR-vizsgálatok eredménye alapján azt is igazoltuk, hogy a CHEK1 expressziója szignifikánsan megnövekedett a TP53-mutációt hordozó A549 sejtvonalban a vad típusú sejtvonalhoz képest (FC=1,43, p=0,021) (1.e ábra).

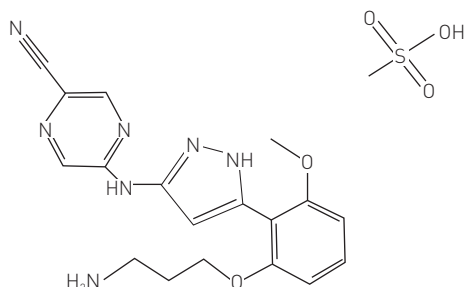
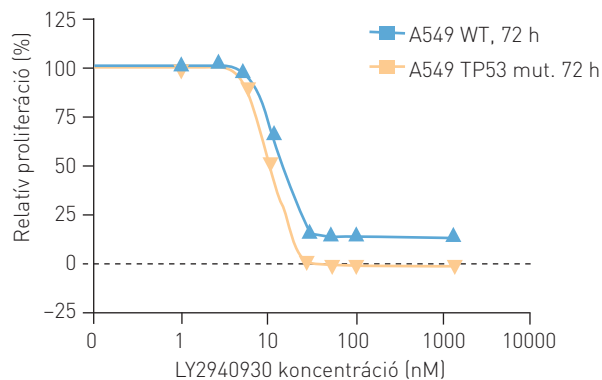
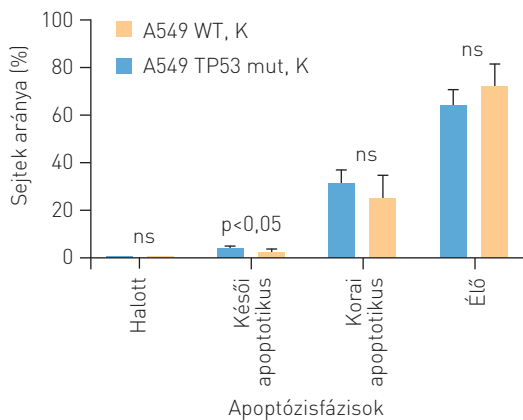
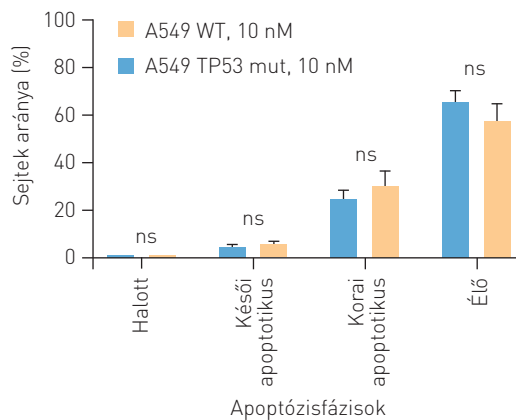
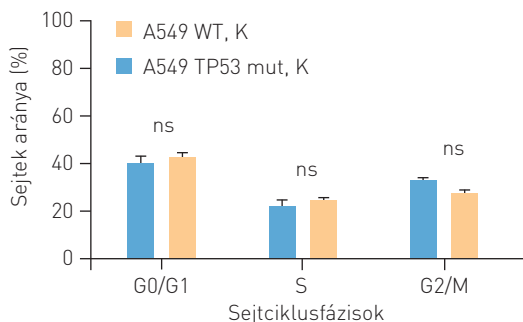
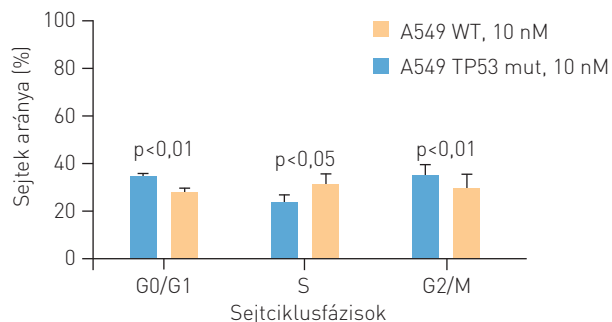
Gyógyszeres kezelés, sejtproliferáció, apoptózis és sejtciklus mérése

A TP53-mutáns és vad típusú A549 sejtek 72 órás, LY2940930 Chk1-inhibitorral végzett kezelésének hatására csökkent a sejtek relatív proliferációja, és 10, 25, 50, 100 és 1000 nM LY2940930 gátlószeres kezelés esetében a két sejtvonal közt szignifikáns különbséget figyeltünk meg (p<0,0001) (2.b ábra). A LY2940930 gátlószer IC₅₀-értéke az A549 WT sejtvonal esetében 10,2 nM, az A549 TP53-mutáns sejtvonalban 9,2 nM. A vad sejtvonalat vizsgálva a sejtek 16,5%-a még 1000 nM-os koncentráció mellett is proliferált, míg a mutáns sejtvonalban már 25 nM-os kezelés is indukálta a proliferáció megszűnését. A dózis-válasz görbe nemlineáris regressziós modellje alapján a LY2940930 inhibitor IC₇₅- és IC₉₀-értéke az A549 WT sejtvonalban 13,9 nM és 18,9 nM, az A549 TP53-mutáns sejtvonalban 12,4 nM és 16,8 nM. A sejtek ugyanakkora mértékű gátlásához a TP53-mutáns vonal esetében kevesebb gátlószer elegendő.

Az apoptotikus sejtek arányának vizsgálata során az A549 vad típusú kontroll és kezelt csoport között egyik sejtpopuláció sem mutatott szignifikáns változást a 10 nM LY2940930 kezelés során. Az A549 TP53-mutáns sejtvonalban a késői apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan megnőtt (p<0,05)

a Prezasertib (LY2606368, LY2940930)

Forrás: Array BioPharma (Originator)
Moláris tömeg: 479,50 g/mol

**b** A549 WT vs. TP53 mut – Chk1-inhibitor**c** A549 WT vs. TP53 mut – Chk1-inhibitor
Kontroll**d** A549 WT vs. TP53 mut – Chk1-inhibitor
Kezelt**e** A549 WT vs. TP53 mut – Chk1-inhibitor
Kontroll**f** A549 WT vs. TP53 mut – Chk1-inhibitor
Kontroll

2. ÁBRA. A checkpoint kinase 1 célzott gátlása A549 izogén sejtvonalakon. a) Prezasertib kémiai képlete. b) A549 izogén sejtvonalak relatív proliferációja 72 órás Chk1-gátló kezelés hatására. c, d) Apoptotikus sejtek aránya A549 izogén sejtvonalakban 24 órás kontroll (0,05% DMSO) (c), illetve 10 nM Chk1-gátló kezelés (d) hatására. e, f) A sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek aránya az A549 izogén sejtvonalakban 24 órás kontroll (0,05% DMSO) (e), illetve 10 nM Chk1-gátló kezelés (f) hatására

a kezelés hatására a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Az élő sejtek aránya 75,2%-ról 62,4%-ra csökkent ($p < 0,05$), a programozott sejthalál által elpusztult sejtek aránya pedig 24,6%-ról 37,6%-ra növekedett ($p < 0,05$). Az A549 *TP53*-vad és -mutáns sejtvonal kontrollcsoportjainak összehasonlítása során szintén a késői apoptotikus sejtek számában mutatunk ki szignifikáns különbséget ($p < 0,05$). Azonban a 10 nM LY2940930 kezelés hatására az A549 *TP53*-vad és -mutáns sejtvonal közt nem volt különbség (2.c,d ábra).

A sejtciklusvizsgálat során a kezelés hatására különbséget mutattunk ki a sejtfázisok között megoszló sejtek arányában mindkét sejtvonalban. Az A549 vad sejtvonalban a G0/G1 és a G2/M fázisban lévő sejtek megoszlása fordított arányban változott ($p < 0,05$), míg a *TP53*-mutáns sejtvonal esetén az S fázisban lévő sejtek aránya 20,5%-ról 23,1%-ra növekedett ($p < 0,05$). Az A549 vad és *TP53*-mutáns sejtvonalat összehasonlítva a kontrollkezelés során a különböző fázisokban lévő sejtek arányában nincs eltérés, azonban a LY2940930-kezelés hatására mindhárom fázisban szignifikáns különbség volt megfigyelhető a két sejtvonal közt ($p < 0,05$) (2.e,f ábra).

MEGBESZÉLÉS

Tüdőkarcinómás betegekben összefüggést találtunk a *CHEK1* magas kifejeződése és a *TP53*-mutációk megjelenése közt. Ahogy a *TP53*-mutáció megléte, úgy a *CHEK1* nagyobb mértékű kifejeződése is összefüggést mutat a rosszabb teljes túléléssel. A *CHEK1* gén kifejeződésének prognosztikus szerepét többek közt kimutatták petefészek-, kolorektális és emlőtumorban is (23, 24).

A *TP53*-mutációval és a túléléssel összefüggő szerepe a Chk1 kináz összetett funkcióiból ered. Fő feladata a DNS-károsodások kiküszöbölése. Egyszálú DNS-törések vagy a replikációs villa hibája esetén az *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) és *ATR* (ataxia telangiectasia and RAD3-related) géneken keresztül aktiválhatja a checkpoint kinase 1 működését, ami a sejtciklus megakasztását és a replikáció javítását indukálja a mitózis előtti S és G2 fázisokban. A sejtciklus lefékezésében és a programozott sejthalál indukálásában a *TP53* génnel párhuzamosan és együttműködve fejt ki hatását (25, 26).

Sejtciklusgátló funkciójából eredően ellentmondásos a Chk1 túléléssel kapcsolatos szerepe, azonban *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok is igazolták, hogy a checkpoint kinase 1 gátlása nagymértékben csökkenti a *TP53*-mutációval rendelkező rosszindulatú daganatsejtek túlélését (27, 28). Ezt az eredményt a mi kísérleteink is alátámasztják, mivel a LY2940930 inhibitor az irodalomban fellelhető adatokkal megegyező, 10 nM koncentrációban elérte a tüdőkarcinóma-sejtek proliferációjának 50 százalékos csökkentését (29). A mi eredményeinkkel korrelálva számos esetben megfigyelték az S fázisban lévő sejtek számának növekedését a Chk1-gátlás hatására. E sejtek instabil osztódási állapotban kerülnek át az S fázisba, mely végül a sejtek pusztulásához vezet (30, 31).

Klinikai vizsgálatok keretében már több Chk1-inhibitor szerepét vizsgálták, azonban napjainkig nincs elfogadott célzott gátlószer. A vizsgált inhibitorok kombinált alkalmazásával sugár- és kemoterápiával szembeni nagyobb érzékenységet értek el preklinikai és klinikai vizsgálatokban. Klinikai egyes fázisban a LY2940930 inhibitor monoterápiában alkalmazott biztonságos dózisa 105 mg/m² kéthetenkénti adagolással szolid tumorok esetében (32).

In silico eredményeink alapján a *TP53*-mutációval rendelkező, rosszindulatú tüdőtümosos betegek esetén a checkpoint kinase 1 gátlása potenciálisan csökkentheti a tumorsejtek proliferációját és ezáltal növelheti a betegek teljes túlélését. *In vitro* eredményeink alapján a LY2940930 Chk1-gátlószer már 10 nM koncentrációban hatékonyan csökkentette a *TP53*-mutáns és -vad tüdőkarcinóma-sejtek proliferációját és a két sejtvonal közt a sejtciklus megváltozásában szignifikáns különbséget mutattunk ki, amit az irodalmi adatok is alátámasztanak. Apoptózis kiváltásához valószínűsíthetően ennél magasabb koncentráció szükséges. Ez alapján javasolható a Chk1 fehérjére specifikus LY2940930 inhibitor további vizsgálata *TP53*-mutáns rosszindulatú tumorok esetében.

Köszönetnyilvánítás

A projekt az NVKP_16-1-2016-0037 pályázat keretében a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatásával valósult meg. A módszer szabadalmaztatása folyamatban van.

IRODALOM

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424, 2018
2. Menyhart O, Fekete JT, Györfy B. Demographic shift disproportionately increases cancer burden in an aging nation: current and expected incidence and mortality in Hungary up to 2030. *Clin Epidemiol* 10:1093–1108, 2018
3. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* 1:15009, 2015
4. George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 524:47–53, 2015

5. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489:519–525, 2012
6. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511:543–550, 2014
7. Dong J, Li B, Lin D, et al. Advances in targeted therapy and immunotherapy for non-small cell lung cancer based on accurate molecular typing. *Front Pharmacol* 10:230, 2019
8. Gao J, Li HR, Jin C, et al. Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 21:1287–1301, 2019
9. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer* 137:262–266, 2015

10. Kumarakulasinghe NB, van Zanwijk N, Soo RA. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Respirology* 20:370–378, 2015
11. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 379:2220–2229, 2018
12. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ* 25:104–113, 2018
13. Zhao Y, Varn FS, Cai G, et al. A p53-deficiency gene signature predicts recurrence risk of patients with early-stage lung adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 27:86–95, 2018
14. Baugh EH, Ke H, Levine AJ, et al. Why are there hotspot mutations in the *TP53* gene in human cancers? *Cell Death Differ* 25:154–160, 2018
15. Guo XE, Ngo B, Modrek AS, et al. Targeting tumor suppressor networks for cancer therapeutics. *Curr Drug Targets* 15:2–16, 2014
16. Lehmann BD, Ding Y, Viox DJ, et al. Evaluation of public cancer datasets and signatures identifies TP53 mutant signatures with robust prognostic and predictive value. *BMC Cancer* 15:179, 2015
17. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 19:495–509, 2019
18. Van den Bossche J, Deben C, Op de Beeck K, et al. Towards prognostic profiling of non-small cell lung cancer: new perspectives on the relevance of polo-like kinase 1 expression, the *TP53* mutation status and hypoxia. *J Cancer* 8:1441–1452, 2017
19. Győrffy B, Bottai G, Lehmann-Che J, et al. *TP53* mutation-correlated genes predict the risk of tumor relapse and identify MPS1 as a potential therapeutic kinase in *TP53*-mutated breast cancers. *Mol Oncol* 8:508–519, 2014
20. Pongor L, Kormos M, Hatzis C, et al. A genome-wide approach to link genotype to clinical outcome by utilizing next generation sequencing and gene chip data of 6,697 breast cancer patients. *Genome Med* 7:104, 2015
21. Győrffy B, Surowiak P, Budczies J, Lániczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *Plos One* 8:e82241, 2013
22. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98, 1999
23. Alcaraz-Sanabria A, Nieto-Jimenez C, Corrales-Sanchez V, et al. Synthetic lethality interaction between aurora kinases and CHEK1 inhibitors in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 16:2552–2562, 2017
24. Carrassa L, Damia G. Unleashing Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle* 10:2121–2128, 2011
25. Dai Y, Grant S. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res* 16:376–383, 2010
26. Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J* 436:527–536, 2011
27. King C, Diaz H, Barnard D, et al. Characterization and preclinical development of LY2603618: a selective and potent Chk1 inhibitor. *Invest New Drugs* 32:213–226, 2014
28. Hsu WH, Zhao X, Zhu J, et al. Checkpoint kinase 1 inhibition enhances cisplatin cytotoxicity and overcomes cisplatin resistance in SCLC by promoting mitotic cell death. *J Thorac Oncol* 14:1032–1045, 2019
29. Garrett MD, Collins I. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? *Trends Pharmacol Sci* 32:308–316, 2011
30. King C, Diaz HB, McNeely S, et al. LY2606368 causes replication catastrophe and antitumor effects through CHK1-dependent mechanisms. *Mol Cancer Ther* 14:2004–2013, 2015
31. van Harten AM, Buijze M, van der Mast R, et al. Targeting the cell cycle in head and neck cancer by Chk1 inhibition: a novel concept of bimodal cell death. *Oncogenesis* 8:38, 2019
32. Hong D, Infante J, Janku F, et al. Phase I study of LY2606368, a checkpoint kinase 1 inhibitor, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 34:1764–1771, 2016