

**A PARP és az Akt kettős gátlása metabolikus összeomlást és apoptózist okoz
emlőráksejtekben**

Filozófiai doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Nasreldeen Adam

Témavezető:

Professzor Ferenc Gallyas Jr.



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Molekuláris és Celluláris Biokémia Program

A Doktori Iskola vezetője és programvezető

Professzor Ferenc Gallyas Jr.

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs 2026

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	2
1.1 Az emlőrák háttere és klinikai kihívásai.....	2
1.2 Akt útvonal és Akt inhibitorok az emlőrák terápiájában	2
1.3 PARP enzimek: Biológiai funkció és terápiás célzás	3
1.4 Kombinációs terápia.....	3
2. Kutatási célkitűzései	4
Általános cél.....	4
Specifikus célok.....	4
3. EREDMÉNYEK	5
3.1 Az Olaparib (Op) és a Capivasertib (Cap), valamint a kombinációs kezelés hatása az emlőráksejtek életképességére	5
3.2 Az olaparib, a kapivasertib és a kombináció hatása a telepépződésre	5
3.3 Az olaparib, a kapivasertib és a kombinációs terápia hatása a reaktív oxigénfajták keletkezésére emlőrák sejtekben	5
3.4 Az Olaparib, a Capivasertib és a kombináció hatása a sejthalál-típusok kiváltására	5
3.5 Az Olaparib, a Capivasertib és a kombinációs terápia hatása az energia-anyagcserére emlőráksejtekben	6
3.6 Az olaparib és a kapivasertib kombinációs terápiája szelektíven károsította az oxidatív foszforilációt emberi emlőrákban.....	7
4. ÖSSZEFOGLALÁS.....	8
5. PUBLIKÁCIÓK	9
Publikációk listája	9
Konferenciakivonatok listája.....	9
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	10

1. BEVEZETÉS

1.1 Az emlőrák háttere és klinikai kihívásai

Az emlőrák a leggyakrabban diagnosztizált rákos megbetegedés a nők körében világszerte. A betegség előfordulása körülbelül 2,3 millió, míg a halálozási arány 670 000 haláleset volt az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2022-es adatai szerint. Bár az életkor és a női nem fő kockázati tényezők, az esetek körülbelül fele olyan nőknél fordul elő, akiknek nincsenek azonosítható kockázati tényezőik. A korai felismerés és az átfogó multidiszciplináris kezeléshez való hozzáférés kulcsfontosságú a globális eredmények közötti egyenlőtlenségek csökkentése érdekében (WHO). Az emlőrákot heterogén krónikus betegségnek tekintik, amelyet több kapcsolat szabályoz, beleértve a genetikai, sejtes anyagcsere- és jelátviteli útvonalakat. A kezelési célpontok hiánya és rosszindulatú biológiai jellemzői komoly aggodalomra adnak okot. Az emlőrák klinikai kezelésében a genetikai hátterek és a metabolikus fenotípusok molekuláris markerek jelenlétén alapulnak. Ezek közé tartozik a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2), a progeszteronreceptor (PR) és az ösztrogénreceptor (ER) (Tan et al., 2021). A tripla-negatív emlőrák (TNBC), amelyet a progeszteronreceptorok, az ösztrogénreceptorok és a HER2 expresszió hiánya jellemez, az emlőrák egyik rendkívül agresszív, rossz prognózisú formájának számít, amelyet magas proliferatív kapacitás, genomiális instabilitás, valamint a célzott terápiára és a kiújuló neoplasztikus daganatokra adott korlátozott reagálóképesség jellemez, ami figyelemre méltó kihívást jelent (Jeffrey et al., 2000).

1.2 Akt útvonal és Akt inhibitorok az emlőrák terápiájában

A PI3K útvonal egy erősen konzervált jelátviteli hálózat eukarióta sejtekben, amely különböző sejtes anyagcsere-folyamatokat koordinál, mint például a növekedés, a proliferáció és a makromolekulák bioszintézise (Glaviano et al., 2023). Az Akt gátlása alternatív útvonalakat aktiválhat, beleértve a glikolízistól való fokozott függőséget és a tápanyag-fogyasztás változásait. A Capivasertib (AZD5363), egy ATP-kompetitív pan-Akt inhibitor, PI3K/AKT modulációval gyógyászati lág hatékonynak bizonyult emlődaganatokban. Bármennyire is ígéretes, az Akt gátlás monoterápiaként általában alternatív válaszokat indít el, például fokozza az aerob mitokondriális

légzést vagy különböző anyagcsere-útvonalak beindítását, ami csökkenti a kezelés eredményét (Gris-Oliver et al., 2020).

1.3 PARP enzimek: Biológiai funkció és terápiás célzás

A poli(ADP-ribóz) polimerázok, különösen a PARP1 és a PARP2, a dezoxiribonukleinsav (DNS) károsodás-javítási folyamatainak mediátoraiként szolgáló nukleáris fehérjék. A PARP1 a leggyakoribb és legbőségebb, és a PARP enzimesalád tagjaira jellemző. A PARP1, amelyet főként a DNS egyszálú törései (SSB-k) aktiválnak, közvetíti az ADP-ribóz molekulák nikotinamid-adenin-dinukleotidról (NAD⁺) való átvitelét önmagára és a célfehérjékre, poli(ADP-ribóz) láncokat hozva létre, amelyek vonzzák a DNS-javító mechanizmusokat (Sukhanova et al., 2016). Ezek a mechanizmusok alapvető folyamatok a genomiális stabilitás szempontjából, de módosíthatják a kromatin dinamikáját és a sejtes stresszválaszokat is. A PARP alapvetően a DNS-száltörések érzékelésében és javításában játszik szerepet. A PARP gátlásának terápiás hatását általában a DNS-javítás gyengítésének tekintik. Ezzel szemben a PARP gátlása szabályozza a redox jelátviteli útvonalakat és a mitokondriális homeosztázist, ami fokozott ROS-képződéshez és a metabolikus stresszre való szenzibilizációhoz vezet (Zong et al., 2022). A PARP alapvetően a DNS-száltörések érzékelésében és javításában játszik szerepet.

1.4 Kombinációs terápia

A kombinált kezelés az onkológiában 1965-ben kezdődött, olyan több terápiás szert tartalmazó programok formájában, mint a prednizon, onkovin (vinkrisztin), metotrexát és 6-merkaptopurin POMP protokoll felnőttkor előtti akut limfoblasztos leukémia kezelésére, amelyek kimutatták, hogy bizonyos jelátviteli útvonalak célzása csökkentheti a terápiás rezisztenciát és növelheti a gyógyulási arányt (Bayat Mokhtari et al., 2017). A daganatellenes terápia kombinációja leküzdheti a gyógyszerrezisztenciát és új kezelési lehetőségeket fejleszthet ki. A kombinált kezelés kedvező hatása nem csak a disszeminált tumorokra vonatkozik (Jaaks et al., 2022). Ibrahim és munkatársai kimutatták, hogy a PI3K gátlása érzékenyebbé teszi a BRCA-Proficient tripla negatív emlőráksejteket, beleértve az agresszív típusú MDA-MB-231 sejteket is, a PARP gátlására a BRCA expressziójának csökkentésével és a DNS károsodásának elősegítésével.

2. Kutatási célkitűzései

Általános cél

A mellrák a nők körében világszerte leggyakrabban diagnosztizált rákfajta, agresszív klinikai viselkedést mutat, különösen a TNBC esetében, és rosszul reagál a meglévő célzott terápiára, ami jelentős klinikai aggodalomra ad okot. A PARP-gátlókkal szembeni rezisztencia gyakran a homológ rekombináció vagy metabolikus adaptáció helyreállításából ered, míg az Akt-gátlókkal szembeni rezisztencia jellemzően párhuzamos jelátviteli utak aktiválódásával jár. Ez a tanulmány azt vizsgálta, hogy a PARP és az AKT-gátlók kombinációja fokozza-e a citotoxikus és antiklonogén hatásokat azáltal, hogy megváltoztatja a sejtek energiatermelését, a mitokondriális metabolikus funkciót és a reaktív oxigénfajták termelődését, hogy leküzdje a monoterápiával kezelt mellráksejtvonalakban kialakult rezisztenciát.

Specifikus célok

- A PARP-gátlás, az Akt-gátlás és ezek kombinációjának a sejtek életképességére gyakorolt hatásának összehasonlítása MDA-MB-231 és MCF7 mellráksejtvonalakban.
- A hosszú távú kezelések hatásainak vizsgálata a proliferatív kapacitás csökkentésére a telepépződési vizsgálat segítségével.
- A reaktív oxigénfajták (ROS) termelődésének számszerűsítése a kezelési protokollt követően.
- A sejtek bioenergetikai állapotának Seahorse Mito stressz teszttel történő értékeléséhez megmértük a mitokondriális magparamétereket, az extracelluláris savasodási sebességet és az oxigénfogyasztási sebességet.
- Az apoptotikus indukció meghatározásához Annexin V/propidium-jodid áramlási citometriát alkalmaztunk.

3. EREDMÉNYEK

3.1 Az Olaparib (Op) és a Capivasertib (Cap), valamint a kombinációs kezelés hatása az emlőráksejtek életképességére

Az antineoplasztikus hatások felméréséhez MCF7 és MDA-MB-231 humán sejttypusokat 1 μ M capivasertibbel, 5 μ M olaparibbal és a kombinációval kezeltek 72 órán át. Az emlőráksejtvonalak életképességét szulforodamin B (SRB) kolorimetriás módszerrel értékelték. Az MCF7 sejtekben

Az olaparib és a kapivaszterib vonalakban az életképesség jelentősen csökkent. Továbbá a kombinált kezelés csökkentette a legjelentősebben az életképességet mindkét sejtmodellben.

3.2 Az olaparib, a kapivaszterib és a kombináció hatása a telepképződésre

Ezeket a vizsgálatokat az egyes sejtek telepképződési képességének, valamint az olaparib és a kapivaszterib, valamint a kombináció citosztatikus hatásainak értékelésére használták emberi emlőrák sejtvonalakon hosszú távú kezelés során. A két sejttypusban alkalmazott kombinált kezelés a legjelentősebb csökkenést mutatta a telepek számában.

3.3 Az olaparib, a kapivaszterib és a kombinációs terápia hatása a reaktív oxigénfajták keletkezésére emlőrák sejtekben

A reaktív oxigénfajokat dihidrorodamin 123-mal mérték. Az MCF7 sejtvonalakban a kapivaszterib szignifikánsan növelte a reaktív oxigénfajták keletkezését, ezzel szemben az olaparibnak nem volt szignifikáns hatása a ROS-termelésre mindkét sejttypusban. Míg a kombinált terápia mindkét sejttypusban szignifikánsan növelte a reaktív oxigénfajták termelését, jobban, mint a monoterápia.

3.4 Az Olaparib, a Capivasertib és a kombináció hatása a sejthalál-típusok kiváltására

Áramlási citometriás analízist alkalmaztunk a kezelések által kiváltott sejthalál típusának kimutatására. Az MCF7 és MDA-MB-231 emlősejtvonalakat 5 μ M Olaparibbal, 1 μ M Capivasertibbel és a kombinációval kezeltük 72 órán át. Az MCF7 humán emlősejtekben az olaparib eltérő hatást gyakorolt a sejtek eloszlására, az élő sejtek populációjának enyhén szignifikáns csökkenésével. Míg az MDA-MB-231 sejtekben, a késői apoptotikus sejthalál szakaszában az olaparibnak szignifikáns hatása volt. Ezzel szemben a capivasertibnek nem volt szignifikáns hatása az MDA-MB-231 sejtek eloszlására, sőt, a capivasertib szignifikánsan

csökkentette az életképes sejtek számát az MCF7 sejtvonalak között. Érdekes módon a kombinációs terápia szignifikáns hatással volt a sejtek eloszlására a két sejtvonalban, az apoptotikus sejthalál arányának növekedésével.

3.5 Az Olaparib, a Capivasertib és a kombinációs terápia hatása az energia-anyagcserére emlőráksejtekben

A Seahorse technológiát egy alapvető mitokondriális bioenergetikai paraméter mérésére használták. Az MCF7 és MDA-MB-231 sejtvonalakat 72 órán át 5 μ M Olaparibbal, 1 μ M Capivasertibbel és a kombinációval kezelték. Az Olaparib és a Capivasertib az MCF7 sejtvonalban az alaplégzés jelentős csökkenését mutatta ki. Míg a kombinált kezelés jelentősen csökkentette az alap légzést mindkét sejttypusban. Érdekes módon az MCF7 sejtekben minden kezelés szignifikánsan csökkentette az ATP-termelést, és a kombinatorikus terápia mutatta a legjelentősebb csökkenést. Ezzel szemben a kombinációs terápia önmagában szignifikánsan csökkentette az ATP-képződést az MDA-MB-231 sejtvonalakban. A karbonil-cianid-4(trifluor-metoxi)-fenilhidrazont (FCCP), egy mitokondriális membránpotenciál-megszakítót, használták a maximális légzés számszerűsítésére. Az MCF7 sejtekben minden terápiás szer csökkentette a maximális légzést, és a kombinációs terápia mutatta a legjelentősebb csökkenési arányt. Ezzel szemben az MDA-MB-231 humán rákos sejtekben a kombinációs kezelés az egyetlen terápia, amely szignifikánsan csökkenti a maximális légzést. Továbbá rotenont és antimicin A-t alkalmaztak a nem mitokondriális légzés mérésére az I. és III. komplexek gátlására. A capivasertib szignifikánsan csökkentette a nem mitokondriális légzést az MCF7 sejtekben, míg a két sejttypus közül a kombinációs terápia mutatta a legjelentősebb csökkenést a nem mitokondriális légzésben. Az MCF7 esetében a kombinált kezelés a protonszivárgás jelentős és szignifikáns csökkenését mutatta más kezelésekhez képest. Továbbá a kombinált kezelés jelentősen csökkentette a protonszivárgást az MDA-MB-231 sejtvonalakban. A szabad légzési kapacitást a maximális és a bazális légzés közötti különbségből számítottuk ki. Az MCF7 sejtvonalban a capivasertib szignifikánsan csökkentette a szabad légzési kapacitást. Fontos megjegyezni, hogy mindkét sejtvonalban a kombinált kezelés szignifikánsan csökkentette a szabad légzési kapacitást. Ez a tanulmány kimutatta, hogy a poli(ADP-ribóz) polimeráz és az AKT-gátlók kombinációja megzavarja a mitokondriális energiatermelést a sejtes emlőrákban. A kombinált terápia csökkentette az alapvető mitokondriális bioenergetikai funkciókat, mint például a bazális légzés, a maximális légzés, az adenosin-trifoszfát-termelés, a protonszivárgás és a szabad légzési kapacitás.

Érdekes módon ezek az eredmények azt mutatták, hogy a poli(ADP-ribóz) polimeráz és az AKT kettős gátlása károsította a fontos mitokondriális energetikai paramétereket az emlőrák sejttypusokban.

3.6 Az olaparib és a kapivasertib kombinációs terápiája szelektíven károsította az oxidatív foszforilációt emberi emlőrákban

A Seahorse Mito stressztesztet alkalmazták az olaparib és a kapiverstib kombináció metabolikus hatásainak bemutatására. Az MCF7 és az MDA-MB-231 sejt vonalakat 72 órán át 5 μ M olaparibbal, 1 μ M kapivasertibbel és a kombinációs terápiával kezelték. Az oxigénfogyasztási sebességet (OCR) és az extracelluláris savasodási sebességet (ECAR) 75 perc alatt mérték. Az eredmények azt mutatták, hogy a kombinációs terápia csökkentette leginkább az OCR és az ECAR arányokat. mindkét sejttypusban a monoterápiához képest. Az oxidatív foszforilációból származó adenosin-trifoszfát termelési sebessége szignifikánsan megváltozott a kombinált kezeléssel. Érdekes módon, a glikolízisből származó adenosin-trifoszfát termelési sebessége nem különbözött szignifikánsan a csoportok között. Az eredményeket tovább alátámasztotta az oxigénfogyasztási sebesség és az extracelluláris savasodási sebesség arányának kiszámítása. A két sejt vonal az oxidatív foszforilációból eredő energiatermelés csökkenését mutatta ki a kombinált terápia során, a glikolízis kompenzáló növekedése nélkül.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

A jelenlegi tanulmány kimutatta, hogy a poli(ADP-ribóz) polimeráz és az Akt jelátviteli útvonal kettős gátlása olaparib, illetve kapivasertib alkalmazásával rendkívül erős antineoplasztikus sejtaktivitást mutat az MDA-MB-231 és MCF7 humán sejtvonalakban. A kombinált terápia jelentősen csökkentette a sejtek életképességét és az egysejtek kolóniaképző képességét a monoterápiához képest. Ezenkívül ez a kettős gátlási megközelítés a mitokondriális metabolikus funkció jelentős zavarát okozta, megváltoztatva az oxidatív foszforilációt, csökkentve az adenoszint trifoszfát-termelést és növelve a ROS-termelést.

Fontos megjegyezni, hogy az emlőrák sejtvonalak nem kompenzálták a folyamatot az anyagcsere glikolízis felé történő átalakításával, ami a sejtek anyagcseréjének összeomlásához vezetett, és kiváltotta a redox-függő apoptotikus sejthalált. A Seahorse technológiát alkalmazták az alapvető mitokondriális bioenergetikai paraméter felmérésére, és a kombinált kezelés jelentősen csökkentette az alaplégzést, a maximális légzést, a nem mitokondriális oxigénfogyasztást, a tartalék légzési kapacitást és a protonszivárgást, jobban, mint a monoterápia. Továbbá in vivo kísérletekre van szükség a rákellenes hatékonyság felméréséhez, valamint az ATP-termelés és a zsírsav-oxidáció vizsgálatához magas metabolikus aktivitású szövetekben. Ezek a vizsgálatok fontosak a kombinált terápia terápiás potenciáljának értékeléséhez.

5. PUBLIKÁCIÓK

Publikációk listája

- Adam, Nasreldeen Mohamed Karshom, Eszter Vámos, Hamid Ahmadi, Geoffrey Ouma Maloba, Arshi Arshi és Ferenc Gallyas Junior. 2025. "A PARP és az Akt kettős gátlása metabolikus összeomlást és apoptózist okoz emlőráksejtekben" *Cancers* 17, no. 23: 3828. <https://doi.org/10.3390/cancers17233828> (IF:4.5).
- Maloba, Geoffrey Ouma, Tom Were, Erick Barasa, Nasreldeen Mohamed, Arshi Arshi és Ferenc Gallyas. 2025. "A 2-dezoxiglükóz és a diklofenák-nátrium szinergikus hatásai emlőráksejtekre: MDA-231 és MCF7 sejtek összehasonlító értékelése" *International Journal of Molecular Sciences* 26, no. 10: 4894. <https://doi.org/10.3390/ijms26104894> (IF: 4.9).

Konferenciakivonatok listája

- Adam Nasreldeen Mohamed Karshom, Eszter Vámos, Arshi Arshi és Ferenc Gallyas Jr., "Az AKT és a PARP kettős gátlása mitokondrium-célzott terápiás megközelítésként tripla-negatív emlőrák sejtvonalonban", *Mitochondrial Medicine and Therapeutic Development*, Wellcome Genome Campus, Egyesült Királyság, 2025. november 10–12.
- Adam Nasreldeen Mohamed Karshom és Ferenc Gallyas Jr., "Az Olaparib és a Capivasertib kombinációja metabolikus összeomlást és apoptózist indukál MCF7 emlőrák sejtekben", *NAD for Health*, Dán Királyi Tudományos és Irodalmi Akadémia, Koppenhága, 2026. március 23–25.
- Arshi Arshi, Geoffrey Ouma Maloba, Adam Nasreldeen Mohamed Karshom és Ferenc Gallyas Jr., "A 2-deoxi-glükóz és a diklofenák-nátrium hatása a MCF7 sejtvonalak," *FEBS3+ találkozó 2025* Belgrádban.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretném őszintén megköszönni témavezetőmnek, ifj. Gallyas Ferenc professzornak a kiváló támogatását, tudásának, tapasztalatának és folyamatos útmutatásának megosztását a PhD-képzés során. Folyamatos támogatása és értékes visszajelzései sokat segítettek abban, hogy befejezzem ezt az akadémiai utamat.

Ezenkívül, mint az Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolájának és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Tanszéknek a vezetője, ifj. Gallyas Ferenc professzor kulcsfontosságú adminisztratív és tudományos támogatást nyújtott nekem doktori tanulmányaim során.

Külön köszönettel tartozom a Doktori és Habilitációs Iroda munkatársainak a doktori képzésem során nyújtott útmutatásukért.

Mélységesen hálás vagyok kollégáimnak és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Tanszék minden munkatársának a bátorításukért, valamint a pozitív légkörért, amely barátságos és támogató környezetet teremtett; ez sokat segített abban, hogy jól érezzem magam a kutatási időszakom alatt. Szeretném kifejezni hálámat a Tempus Közalapítványnak is, amiért odaítélték nekem a Stipendium Hungaricum ösztöndíjat, amely lehetővé tette a Pécsi Tudományegyetemen folytatott tanulmányaimat.

Szeretném megköszönni a Kulturális és Innovációs Minisztériumnak, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapnak a TKP2021-EGA-17 program keretében finanszírozott munka támogatását.

Végül, őszintén hálás vagyok családomnak és barátaimnak. Folyamatos bátorításuk, türelmük és támogatásuk segített végig ezen az úton, és nélkülük nem értem volna el ezt a mérföldkövet.