

---

PhD THESIS

# Cellular and molecular changes in breast cancer induced by inhibition of serine biosynthesis pathway

---

PhD candidate: **Ioana-Ecaterina PRALEA**

---

PhD supervisor: **Prof. dr. Cristina-Adela IUGA**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# SUMMARY

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>LITERATURE REVIEW</b>	3
<b>Chapter 1: Triple negative breast cancer – an unmet clinical need</b>	5
1.1 Molecular subtyping of triple negative breast cancer	6
1.2 Metabolic reprogramming in triple negative breast cancer: a mass spectrometry-based omics snapshot	9
1.2.1 Proteomic signature of triple negative breast cancer	10
1.2.2 Metabolomic signature of triple negative breast cancer	12
<b>Chapter 2: De novo serine biosynthesis pathway a central node in TNBC metabolic adaptations</b>	15
2.1 Triple negative breast cancer metabolic features and vulnerabilities as seen through omics studies	15
2.2 Serine metabolism in triple negative breast cancer and implications in tumor progression and aggressiveness	16
2.3 Targeting phosphoglycerate dehydrogenase, the rate limiting enzyme of the serine biosynthesis pathway	18
2.4 Phytochemicals and virtual screening of natural product library	20
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	23
<b>1. Hypothesis and objectives</b>	25
<b>2. General methodology</b>	27
2.1 Cell lines and culture conditions	27
2.1.1 General handling procedures for routine cell culturing	28
2.1.1.1 Handling of frozen cells	28
2.1.1.2 Cell biobanking	28
2.1.1.3 Subculturing procedure	28
2.1.2 Cell culture procedures for <i>in vitro</i> assays	29
2.1.2.1 Cell viability testing by MTT assay	29
2.1.2.2 Colony formation assay	29
2.1.2.3 Wound healing assay	30
2.1.2.4 Morphological analysis by fluorescence microscopy	30
2.1.2.5 Cell culture procedures for mass spectrometry analysis	31
2.2 Label-free nano-LC-IMS-MS and data analysis of the proteome	31
2.2.1 Sample preparation for proteome profiling through mass spectrometry	31
2.2.2 Data acquisition and primary data processing	32
2.2.3 Data analysis	33
2.3 LC-MS analysis of amino acid consumption pattern from the cell culture media	34
2.3.1 Sample preparation	34
2.3.2 Data acquisition and data processing	34
<b>Chapter 3: Proteome heterogeneity of untreated triple negative breast cancer cell lines</b>	35
3.1 Introduction	35
3.2 Aims	35
3.3 Materials and methods	35

3.4 Results and discussions	36
3.4.1 Overview of the intracellular and secreted protein profiles	36
3.4.2 The intracellular proteome of untreated triple negative breast cancer cell lines	36
3.4.3 Secretome profiles of untreated triple negative breast cancer cell lines	42
3.4.4 LC-MS analysis of amino acid consumption pattern of untreated triple negative breast cancer cell lines	44
3.5 Conclusions	47
<b>Chapter 4: Triple negative breast cancer metabolic adaptations after phosphoglycerate dehydrogenase inhibition by NCT-503 and CBR-5884</b>	49
4.1 Introduction	49
4.2 Aims	52
4.3 Results and discussions	52
4.3.1 <i>In vitro</i> impact of NCT-503 and CBR-5884 on triple negative breast cancer cell panel	52
4.3.2 Response to phosphoglycerate dehydrogenase inhibitors at the proteome level	55
4.3.2.1 Differentially expressed proteins induced by NCT-503 treatment	55
4.3.2.2 Differentially expressed proteins induced by CBR-5884 treatment	57
4.3.2.3 Comparison of phosphoglycerate dehydrogenase inhibitors induced differentially expressed proteins within triple negative breast cancer cell lines	60
4.3.2.4 Enrichment analysis of differentially expressed proteins induced by phosphoglycerate dehydrogenase inhibitors	63
4.3.2.5 Reactome GSEA pathway analysis tool	67
4.3.3 Targetable proteins induced by NCT-503 treatment in triple negative breast cancer cell lines	71
4.3.4 Modifications in the amino acid consumption pattern of triple negative breast cancer cell lines following treatment with phosphoglycerate dehydrogenase inhibitors	74
4.4 Conclusions	75
<b>Chapter 5: Virtual screening of natural compounds as potential inhibitors of phosphoglycerate dehydrogenase</b>	77
5.1 Introduction	77
5.2 Aims	78
5.3 Materials and Methods	78
5.3.1 Phosphoglycerate dehydrogenase target enzyme structure	78
5.3.2 Active binding site prediction of phosphoglycerate dehydrogenase	78
5.3.3 Building of natural product-based libraries for virtual screening	78
5.3.4 Virtual screening of in-house natural product-based library in search of potential inhibitors of phosphoglycerate dehydrogenase	79
5.3.5 Prediction of the absorption, distribution, metabolism, excretion properties of compounds	79
5.4 Results and discussions	80
5.4.1 Phosphoglycerate dehydrogenase target enzyme structures	80
5.4.2 Binding site prediction and druggability assessment	83
5.4.3 Virtual screening of the natural compound library	85
5.4.4 Cellular and metabolic alterations of triple negative breast cancer cell panel following caffeic acid treatment	87
5.4.4.1 Response at proteome level of triple negative breast cancer cell panel to caffeic acid	89

5.4.4.2 Enrichment analysis of differentially expressed proteins induced by caffeic acid	89
5.5 Conclusions	92
<b>Chapter 6: Screening of <i>in vitro</i> effects of <i>Leontopodium alpinum</i> Cass. callus cultures extract on triple negative breast cancer cell lines</b>	93
6.1 Introduction	93
6.2 Aims	93
6.3 Materials and methods	93
6.3.1 Biological material	94
6.3.2 Extract preparation	94
6.3.3 Chromatographic method and instrumentation	94
6.4 Results and discussions	95
6.4.1 Characterization of <i>Leontopodium alpinum</i> callus cultures extracts	95
6.4.2 Total polyphenol content, antioxidant properties and <i>in vitro</i> evaluation of <i>Leontopodium alpinum</i> callus cultures extracts on triple negative breast cancer cell lines	99
6.4.3 <i>In vitro</i> evaluation of leontopodic acids on triple negative breast cancer cell lines	102
6.5 Conclusions	103
<b>7. General discussion</b>	105
<b>8. General conclusions</b>	109
<b>9. Originality and innovative contributions</b>	111
<b>BIBLIOGRAPHY</b>	113
<b>ANEXES</b>	121

## INTRODUCTION

Since 2020, breast cancer (BC) has become the most prevalent type of cancer reported among European women accounting for 26.4% of all new cancer cases<sup>1</sup>. BCs exhibit significant heterogeneity at both inter- and intra-tumor levels, with molecular variations observed throughout the progression of the disease. Characterized by the lack of estrogen, progesterone and human epidermal growth factor receptors, triple negative breast cancer (TNBC) is a distinct form of BC, particularly notable for their aggressive nature and cellular diversity translated clinically through high recurrence and metastatic rates and overall low survival. The reported median time to distant metastasis for TNBC patients is roughly 2 years while survival time after diagnosis of distant metastasis ranges from 17-25 months<sup>2</sup>. Treatment options for this specific type of BC is limited to chemotherapy, which has shown limited effectiveness as TNBC patients experience 37% mortality within the first five years following diagnosis<sup>3</sup>. Furthermore, enhancing treatment options has proved challenging due to lack of well-defined molecular targets and inherent heterogeneity of TNBC. It is evident that TNBC constitutes a significant clinical challenge highlighting the necessity to comprehend the molecular basis of TNBC and identify molecular drivers in order to develop effective, targeted treatments.

Cancerous cells exhibit a distinct metabolic reprogramming that enables their survival and rapid proliferation. Unlike regular cells, cancerous cells alter their macromolecule metabolism to meet the high energy and nutrient requirements. Rapidly proliferating cells, including TNBCs, have an increased reliance on glucose, glutamine, and non-glutamine amino acids such as serine to fulfill their energy demands and provide essential carbon and nitrogen units<sup>4</sup>.

Serine plays a crucial role in the regulation of a wide range of biological processes, serving as a central hub that impacts the production and transport of other essential amino acids, the metabolism of nucleic acids and lipids, as well as the control of epigenetic processes and the maintenance of redox status. This nonpolar amino acid can be obtained from the external environment through ASCT transporters, which have been found to be up-regulated in many tumor types. Alternatively, cells have the ability to internally produce serine through the *de novo* serine biosynthesis pathway (SSP), a process that is frequently observed in highly metastatic cancers. The SSP pathway is supported by PHGDH, PSAT1, and PSPH enzymes reported to be highly expressed in various cancer types including TNBC and linked to chemoresistance and cancer aggressiveness.

Considering the heterogeneity of TNBC, the primary aim of the thesis was to assess the impact at the metabolic level of SSP inhibition on a panel of TNBC cell lines displaying different dependency of the SSP rate-limiting enzyme PHGDH, using mass spectrometry-based omics approaches as main tool.

## LITERATURE REVIEW

Triple negative breast cancer represents approximately 15-20% of all breast cancer diagnoses, although there is limited research on the exact prevalence within the European population.

This subtype is regarded as the most aggressive because of its significant molecular heterogeneity<sup>5,6</sup>. In clinical practice, a diagnosis of triple-negative breast cancer (TNBC) results in restricted and non-specific treatment, with chemotherapy and surgery remaining the primary standard of care. Patients often experience elevated relapse rates accompanied by metastatic complications; where the mechanisms of spread are largely unclear, though there is a greater tendency for brain and lung involvement. Consequently, the overall survival rates are notably low (HR =1.69, 95% CI 1.24-2.307).

### Chapter 1: Triple negative breast cancer – an unmet clinical need

Over the past three decades extensive research has focused on understanding the biological traits and substantial variability of TNBC, with the goal of developing systematic and effective treatment approaches. Breast cancer classification relied initially on tumor size, histological grade and status of hormone receptors, assessed through standard immunohistochemistry. This classification was later improved by including the amplification status of the human epidermal growth factor receptor 2 gene (HER2) and led to the categorization of breast cancers into three main groups: hormone sensitive, HER2 positive, and triple-negative breast cancer (TNBC). However, this classification demonstrated limited clinical accuracy as low-risk patients were sometimes diagnosed with aggressive forms of cancer<sup>8</sup>.

Further, TNBCs were primarily linked to the basal-like intrinsic subtype due to their comparable gene expression patterns with basal epithelial layer cells. According to the research conducted by Bertucci et al.<sup>9</sup>, approximately 70% of TNBC cases were identified as belonging to the basal-like subtype, and 76% of basal-like cancers were found to be triple negative, leading to the interchangeable use of these terms<sup>10</sup>; however, it is important to emphasize that the term 'triple-negative' also includes distinct histological types that are not classified as basal-like such as carcinoma with a rich lymphocytic stroma (formerly known as medullary), secretory carcinoma, low-grade metaplastic carcinoma, and adenoid cystic carcinoma.

Several attempts have been made to address the high variability of TNBC through omics-based subtyping. Gene expression-based subtyping of TNBC was proposed by Lehmann et al.<sup>11,12</sup> resulting in the identification of four transcriptional subtypes (BL1, BL2, M, and LAR) collectively known as TNBC type-4. Each subtype revealed unique biological characteristics and potential therapeutic targets. Briefly, the basal-like (BL1) subtype showed a notable enrichment in pathways related to the cell cycle and cell division being clinically associated with lower stages and improved overall and relapse-free survival rates. In contrast, BL2 subtype exhibits unique gene ontologies linked to

growth factor signaling and glucose metabolism while the mesenchymal-like subtype (M) has expression profiles that are indicative of cell motility and differentiation. The LAR subtype is particularly distinguished by its significantly elevated expression of genes involved in hormonally regulated pathways. Notably, this subtype exhibits androgen receptor (AR) expression levels along with the highest expression of genes related to amino acid metabolism. Moreover, the different subtypes display unique progression patterns: LAR subtype show a higher tendency to regional spread and a preference for bone metastasizing; in opposition, mesenchymal tumors primarily metastasize to the lungs. Also, assessment of immune microenvironment status assessment is important as patients with immune-reactive TNBC may gain significant advantages from immunotherapy. Other attempts of TNBC subtyping were made based on the metabolome profile of TNBC cell lines by Beatty et al.<sup>13</sup> while a multi-omics approach was implemented by Gong et al.<sup>14</sup> integrating transcriptomic, genomic, and metabolic data to suggest a sub-classification framework for TNBC across various patient groups.

This chapter further explores the existing literature data of mass spectrometry-driven omics methodologies aimed at exploring metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer (TNBC), utilizing insights from current proteomics and metabolomics research. The analysis of the scientific literature lead to several conclusions: i. TNBC exhibits a significant dependence on the glycolytic pathway, possessing an enhanced glucose uptake and lactate production; ii. Research has shown alterations in the amino acid metabolism in TNBC, including increased uptake of glutamine and cysteine, as well as changes in serine and glycine metabolism; iii. Furthermore, significant alterations in lipid metabolism have also been observed.

## **Chapter 2: De novo serine biosynthesis pathway a central node in TNBC metabolic adaptations**

This chapter discusses the SSP pathway as a key metabolic hub in TNBC, highlighting the metabolic dependencies and unique reprogramming that TNBC demonstrates in relation to this pathway. TNBC, characterized by its rapid cell proliferation, shows a heightened demand for glucose and glutamine; also it has a significant dependence on non-glutamine amino acids such as serine for essential carbon and nitrogen components. Typically, cells can obtain serine from external sources through specialized transporters, but they also possess the capability to synthesize it internally from glucose via the *de novo* serine biosynthetic pathway (SSP). The glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) acts as a crucial link between the glycolytic and SSP pathways, with 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) serving as the initial and rate-limiting enzyme that converts it into 3-phosphonoxyypyruvate. This process is followed by enzymatic reactions involving phosphoserine transaminase (PSAT1) and phosphoserine phosphatase (PSPH), culminating in the production of the amino acid L-serine. Furthermore, this pathway aids in replenishing the tricarboxylic

acid cycle by generating  $\alpha$ -ketoglutarate. Numerous studies have reported the overexpression of SSP enzymes across various cancer types, including breast cancer, linking the genomic amplification of PHGDH to therapeutic resistance and aggressive disease progression, thereby highlighting this pathway as a potential target for pharmacological intervention. The discovery of two effective inhibitors, CBR-5884 and NCT-503, has sparked renewed interest in PHGDH as a viable therapeutic target. Furthermore, the concept of PHGDH-dependent cell lines has played a significant role in enhancing attention towards this enzyme. A thorough review of the literature regarding these inhibitors across various cancer types is provided in this chapter. It also explores the potential of phytochemicals and computational methods in creating new research opportunities, effectively facilitating lead optimization, and enhancing the understanding and prediction of the druggability of potential compounds during the early phases of drug development.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Chapter 3: Proteome heterogeneity of untreated TNBC cell lines**

#### **Hypothesis and goals of the study**

Based on literature evidence and previous results within our research group, the first study aimed to examine the cellular and metabolic reliance TNBC on the SSP pathway, with a specific focus on the potential of targeting serine metabolism in this particular subtype of breast cancer. To address this objective, the *in vitro* models of TNBC to be included in the study should accurately reflect the intrinsic heterogeneity observed in this form of cancer regarding SSP dependency. Consequently, in the first experimental study, three cell lines representative to TNBC were selected, namely MDA-MB-231, MDA-MB-468 and Hs 578T. They were evaluated based on both intracellular and extracellular proteomes (secretome) as well as levels of amino acids secreted into the culture medium, employing mass spectrometry-based techniques. Differences in the expression of SSP enzymes or other pathways known to be directly affected by serine were assessed through employing mass spectrometry-based proteomics and metabolomics techniques. Additionally, the use of bioinformatic tools enabled the translation of proteomic data into pathway-level information, thereby facilitating a comprehensive understanding of the similarities and differences between the native TNBC cell lines.

#### **Main results**

Different dependency of the three TNBC cell lines on SSP was confirmed using the intracellular proteome profile, with MDA-MB-231 showing the lowest expression of SSP enzymes, while the other two cell lines had elevated levels of PHGDH, PSPH and PSAT1 enzymes; thereby confirming the rationale for selecting these specific cell lines for the study. Statistical analysis of the data yielded significant insights into the proteins and

pathways showing distinct expression patterns across the three TNBC cell lines. A total of 264 proteins exhibited unique expression patterns across all TNBC cell lines, with a notable connection to the immune system and interactions between cells and the extracellular matrix. The Hs 578T cell line was distinguished from the MDAs by proteins related to membrane trafficking, protein metabolism, oncogenic MAPK signaling, and extracellular matrix organization. The cell line showing most dependency on SSP, MDA-MB-468 was set apart by proteins with unique expression patterns related to amino acid metabolism, cholesterol biosynthesis, RNA metabolism, and the RHO GTPase signaling pathway. The data obtained for secreted proteins in the medium (secretome) complements and enhances the intracellular profile of TNBC, revealing that the MDA lines show greater similarity, while Hs578T displays distinct behavior associated with a more aggressive phenotype.

The assessment of chiral amino acid levels in the culture media for the three cell lines highlighted different patterns of consumption and secretion. Notably, the MDA-MB-468 cell line exhibited elevated levels of D-amino acids, particularly emphasizing the active secretion of D-Ser in the culture media.

## **Conclusions**

From the analysis of intracellular protein profiles, it can be inferred that TNBC cell lines exhibit inherent variations in the expression of proteins related to glycolysis, *de novo* serine biosynthesis pathway, and the transportation of various molecules across the plasma membrane, specifically nucleotides and amino acids. The secreted protein profiles complement and enhance the intracellular profile of TNBC, indicating that MDAs exhibit greater similarity while Hs 578T display a distinct behavior associated with a more aggressive phenotype. Additionally, the LC-MS analysis of chiral amino acids released into the culture media highlighted distinct consumption patterns of the three TNBC cell lines. Most notably, the MDA-MB-468 cell line showed increased levels of D-amino acids and a significant secretion of D-Ser at the 48-hour time point further confirming the role of D-serine in the cellular metabolism of TNBC.

## **Chapter 4: TNBC metabolic adaptations after PHGDH inhibition by NCT-503 and CBR-5884**

### **Hypothesis and goals of the study**

The second original study aimed to characterize the metabolic response of a TNBC cell panel to two commercially available PHGDH inhibitors, in order to gain a better understanding of the mechanisms employed by the cell lines following SSP inhibition. Therefore, the profiles of intracellular and secreted proteins, along with cellular assays and LC-MS analysis of chiral amino acid consumption from the culture media, were utilized to characterize the cellular adaptations of the cell lines in response to treatment with the two SSP inhibitors.

## **Main results**

The cell functional assays showed that the three TNBC cell lines have different sensitivity to treatment with the two PHGDH inhibitors. NCT-503 showed similar IC50s in MDA-MB-231 and Hs 578T cell lines, whereas the SSP dependent cell line exhibited higher susceptibility. Conversely, CBR-5884 had comparable antiproliferative effects in MDAs, with the HS cell line showing greater sensitivity to treatment; results being confirmed also at the morphological level with cells displaying fragmented cytoskeleton, shrunken nuclei, cytoskeleton rearrangements and cell rounding.

TNBC cell lines responded differently to PHGDH inhibitors, differentially expressed proteins (DEPs) being unique to each cell line. Additionally, a limited number of shared DEPs were observed within the same cell line following treatment with both inhibitors. Nevertheless, as response to treatment, significant changes in cell cycle-related pathways were detected in the MDA-MBs. Specifically, the cell cycle checkpoints and pathways associated with the mitotic G1 phase and G1/S transition were suppressed in MDA-MB-231. On the other hand, the pathways related to the M-phase and G2/M transition were affected in MDA-MB-468 following NCT-503 treatment. Moreover, CBR-5884 treatment negatively impacted the pentose phosphate pathway and carbohydrate metabolism in the MDAs, while a common effect on biological oxidation was seen in MDA-MB-468 and Hs 578T cell lines.

Targetable proteins were identified within DEPs showing up-regulated expression following NCT-503 treatment. Specifically, seven proteins had FDA-approved drugs available namely TUB1A, AKR1C2, DPEP1, MAP4, SOST, EPHA2, and TXNRD1. Notably, DPEP1 and SOST were reported to be upregulated in breast cancer, while SOST, TXNRD1, PKLR, EPHA2, and PLIN3 were found upregulated in leukemia and myeloma. This study proposed three antineoplastic drugs already in use within BC, as well as molecules currently employed in other pathologies such as myeloma, melanoma, and colorectal cancer as viable drugs for repurposing testing in TNBC (including dasatinib, fotemustine, and regorafenib). Additionally, the investigation emphasized several investigational drugs, such as epothilone D (DB01873), patupilone (DB03010), CYT997 (DB05147), PX-12 (DB05448) to be further tested in TNBC.

## **Conclusions**

Distinct DEPs, unique to cell line were obtained following treatment suggesting different mechanisms of response even within the same cell line.

The study identified 13 proteins as potential therapeutic targets, seven of these already having FDA-approved medications for other conditions. This finding opens a new and promising research direction focused on repositioning these drugs or their combinations for the treatment of TNBC.

## Chapter 5: Virtual screening of natural compounds as potential inhibitors of PHGDH

### Hypothesis and goals of the study

Natural compounds offer a vast array of bioactive molecules, making them highly valuable for drug development. A substantial number of chemotherapeutic agents can be traced back to natural products, also their chemo-sensitizing properties have recently increased attention in the scientific community showcasing the immense potential of these compounds.

The objective of this investigation was to propose potential PHGDH binding candidates of natural origin using *in silico* techniques. Initially, an analysis was conducted on the binding mode and residue interactions of available inhibitors to PHGDH using the X-ray crystallographic deposits accessible on the PDB database. Based on the gathered information, the NAD binding pocket was chosen for the virtual screening of a carefully selected natural compound library constructed using a ligand-based virtual screening approach that employed two different algorithms designed for similarity search to known PHGDH inhibitors.

### Main results

Protein Database Bank (RCSB PDB database, <https://www.rcsb.org/>) was used for the retrieval of the structure of target protein PHGDH, the first enzyme in the serine biosynthetic pathway. The PDB structure 2G76 was selected for subsequent virtual screening of a natural compounds database. A comprehensive analysis of the available pockets and subpockets of the target protein was performed, assessing their druggability based on various descriptors such as volume, surface area, depth, amino acid composition, functional groups, and ligand coverage percentage. An alignment of available *Homo sapiens* PDB structures of PHGDH and inhibitors was conducted to pinpoint specific ligand binding locations. This analysis focused on identifying potential binding sites and the critical amino acid residues involved in the binding process. Key residues identified included Pro176, Leu216, Ser212, Gly152, Asp173, Tyr174, Thr213, and Thr207.

A proprietary natural compounds database was constructed, incorporating commercially available analytical standards, and refined to include compounds with favorable ADME properties, specifically in terms of molecular weight, surface polarity, and lipophilicity. A total of 117 compounds were docked to the NAD<sup>+</sup> binding site of 2G76. Following a rigorous elimination process based on adherence to the Lipinski rule, classification as P-glycoprotein transport inactive substrates, and categorization under HIA<sup>+</sup>, 90 compounds were manually screened for known interactions with key amino acids. Notable compounds identified included Chrysophanol, 1,8-Dihydroxyanthraquinone, Terpinolene, Caffeic acid ethyl ester, Caffeic acid, Cannitol, alpha-Asarone, alpha-(-)-Bisabolol, Chalcone, and (-)-Lupinine. Caffeic acid was evaluated in cell-based *in vitro* experiments, demonstrating a consistent IC<sub>50</sub> across

triple-negative breast cancer (TNBC) cell lines within the millimolar range, as anticipated from molecular docking analysis. However, the TNBC cell lines exhibited distinct morphological responses to caffeic acid treatment. At the proteome level, the response was specific to each cell line, with only a few DEPs being common among the selected cell lines. Enrichment analysis indicated that these DEPs were involved in pathways similar to those identified for SSP inhibitors NCT-503 and CBR-5884.

## **Conclusions**

This study implemented a molecular docking approach to identify natural compounds with potential inhibitory effects on human PHGDH. The *in silico* screening revealed that natural compounds, particularly from the phenylpropanoid class, exhibited high potential for inhibiting PHGDH by binding to its co-factor site, with estimated binding affinities in the micromolar range. Caffeic acid was selected for *in vitro* evaluation, demonstrating distinct morphological responses in TNBC cell lines. Additionally, the proteomic response varied by cell line, with few common proteins identified, although these proteins were involved in similar metabolic pathways as those observed for the inhibitors NCT-503 and CBR-5884. This study highlights the effectiveness of *in silico* screening as a pre-selection tool for identifying molecules that may inhibit the biosynthesis of essential compounds for cellular metabolism.

## **Chapter 6: Screening of *in vitro* effects of *Leontopodium alpinum* Cass. callus cultures extract on TNBC cell lines**

### **Hypothesis and goals of the study**

The last original study of the thesis focused on natural sources of caffeic acid and other phenylpropanoids. *Leontopodium alpinum* (LA) is recognized for its antioxidant properties which are primarily linked to its phytochemical profile, rich in phenylpropanoids.

The aim of this study was to perform a comprehensive phytochemical characterization of edelweiss callus cultures. Also, following the assessment of the antioxidant capacity evaluation of the LA callus extract, three major cancer hallmarks were investigated (proliferation, resisting cell death and invasion activation) using the three TNBC cell lines.

### **Main results**

An ion-mobility mass spectrometry approach was implemented for the photochemical analysis of the *Leontopodium alpinum* callus cultures extract. The secondary metabolites in *L. alpinum* callus cultures were glucaric acid derivatives, which are formed through the esterification of D-glucaric acid hydroxyl groups with caffeoyl and 3-hydroxybutanyl groups. Eleven distinct glucaric derivatives were identified, with leontopodic acid A and B being the most prevalent compounds. Leontopodic acid A (C37H34O19) and leontopodic acid B (C33H28O17) were confirmed as the most abundant derivatives. Additionally, a group of di-caffeoyl glucaric acid isomers were

identified, along with a tetra-caffeoyl glucaric acid derivative. Chlorogenic acid and 3,5-dicaffeoyl quinic acid were recognized through standard comparisons, while two additional di-caffeoyl quinic acid isomers were also identified.

The quantitative analysis using LC-MS focused on four predominant compounds: leontopodic acids A and B, chlorogenic acid, and 3-5-dicaffeoylquinic acid. These compounds collectively account for over 57% of the dry-frozen extract and approximately 15% of the dry-frozen callus culture.

Due to the significant presence of phenylpropanoid derivatives the LA callus extract was tested *in vitro* on the TNBC cell panel. The results indicated that TNBC cell lines displayed varying susceptibility to treatment with the LA extract. Notably, the extract impacted cell viability, induced morphological changes, affected colony formation, and altered migration patterns.

Also, this study evaluated the antiproliferative effects of leontopodic acid standards on TNBC cells. The results showed MDA-MB-231 cell line particularly susceptible to both leontopodic acid A and B with  $IC_{50}$  values of 140.1  $\mu$ M and 106.2  $\mu$ M, respectively. In comparison, the MDA-MB-468 cell line showed moderate sensitivity, with  $IC_{50}$  values reaching 250  $\mu$ M for both acids. Conversely, the Hs 578T cell line exhibited the highest resistance, with  $IC_{50}$  values above 300  $\mu$ M.

## Conclusions

The phytochemical analysis of *Leontopodium alpinum* callus extract revealed a significant presence of phenylpropanoid derivatives, accounting for 57.13% of the extract's composition. These compounds exhibit a binding affinity for the cofactor binding site of PHGDH, suggesting the extract potential for *in vitro* testing in TNBC. The evaluation of the LA extract on the TNBC cell panel revealed significant variations in susceptibility among the cell lines with MDA-MB-468 displaying a notable resistance. Also, the primary constituents of the extract identified as leontopodic acids A and B were evaluated *in vitro* indicating more favorable impact on cell viability than previously obtained using caffeic acid.

## GENERAL CONCLUSIONS

The thesis introduces substantial contributions to the study of personalized therapies for triple-negative breast cancer by employing mass spectrometry-based omics tools to investigate the metabolic features of TNBC.

Three cell lines representative of this pathology were selected for study, each exhibiting distinct levels of SSP dependency. The profiles of intracellular and secreted proteins, along with cellular assays and LC-MS analysis of amino acid consumption from the culture media, were utilized to characterize the cellular adaptations of the cell lines under normal conditions and in response to treatment with SSP inhibitors. Furthermore, utilizing bioinformatics tools, metabolic particularities expressed at pathway level were identified for each of the TNBC cell lines (studies 1 and 2). The cell lines dependency on the SSP pathway was inferred from the proteome profiling, which confirmed the

differential expression of enzymes that regulate this pathway in TNBC cell lines included in the studies. In a subsequent experiment, LC-MS analysis of amino acid consumption patterns from the culture media revealed the active secretion of D-Ser in the culture media of PHGDH-dependent cell lines. These findings underscore the potential significance of D-amino acids in the pathology of TNBC and indicate the necessity for further investigation in this area. The response of the cell lines to SSP inhibition was assessed through various cellular assays and the proteome profiling and further complemented by bioinformatic tools, yielding new insights into the molecular adaptations of TNBC cell lines in response to this inhibition. Following SSP inhibition, several druggable proteins with FDA-approved medications for leukemia, melanoma, and colorectal cancer were identified. The repositioning studies of these drugs or their combinations in TNBC presents a new and promising research direction introduced by this study, which has the potential to bring about substantial progress in the personalized therapy in TNBC (study 2).

The chemical diversity of natural compounds was utilized to conduct additional screening for SSP inhibitors. In this regard, a virtual screening approach was implemented using an internally curated library of natural compounds targeting PHGDH. The results of the study led to the identification of several natural compounds from the phenylpropanoid class as promising candidates (study 3). Caffeic acid was chosen for further assessment in cell-based *in vitro* studies.

The aim of the fourth study was to identify a natural source abundant in the active compounds identified through molecular docking. Given the significant presence of phenylpropanoid derivatives, the methanolic extract from callus cultures of *Leontopodium alpinum* (LA) was examined for its antiproliferative properties in TNBC 15 (study 4). These compounds have an affinity for binding to the PHGDH cofactor site (study 3), indicating the high potential of the extract for testing the inhibitory capacity and *in vitro* antitumor potential in TNBC. Additionally, the primary constituents of the LA extract, specifically leontopodic acids, were evaluated, showing a more pronounced antiproliferative effect compared to caffeic acid.

The interdisciplinary nature of the work, which integrates high-resolution mass spectrometry, bioinformatics, molecular modeling, cellular biology, and biochemistry, underscores the potential impact of these findings on the development of personalized therapies in oncology.

## References

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, B. F. Cancer Today. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.who.int/today/en> (2024).
2. Cai, S.-L. et al. Characteristics of recurrence, predictors for relapse and prognosis of rapid relapse triple-negative breast cancer. *Front Oncol* 13, (2023).
3. Kudelova, E. et al. Genetic Heterogeneity, Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 23, 14937 (2022).

4. Pralea, I.-E. et al. Phytochemicals as Regulators of Tumor Glycolysis and Hypoxia Signaling Pathways: Evidence from In Vitro Studies. *Pharmaceuticals* 15, 808 (2022).
5. Kirkby, M., Popatia, A. M., Lavoie, J. R. & Wang, L. The Potential of Hormonal Therapies for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 15, (2023).
6. Fan, L. et al. Optimising first-line subtyping-based therapy in triple-negative breast cancer (FUTURE-SUPER): a multi-cohort, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 25, 184–197 (2024).
7. Pal, S., Lüchtenborg, M., Davies, E. A. & Jack, R. H. The treatment and survival of patients with triple negative breast cancer in a London population. *Springerplus* 3, 1–5 (2014).
8. Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K. & Ortiz-López, R. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Medicina Universitaria* 18, 105–114 (2016).
9. Bertucci, F. et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 123, 236–240 (2008).
10. Peddi, P. F., Ellis, M. J. & Ma, C. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *Int J Breast Cancer* 2012, 1–7 (2012).
11. Lehmann, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750–2767 (2011).
12. Lehmann, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 11, (2016).
13. Beatty, A. et al. Metabolite Profiling Reveals the Glutathione Biosynthetic Pathway as a Therapeutic Target in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 17, 264–275 (2018).
14. Gong, Y. et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metab* 33, 51-64.e9 (2021).
15. Pralea, I.-E. et al. Profiling of Polyphenolic Compounds of *Leontopodium alpinum* Cass Callus Cultures Using UPLC/IM-HRMS and Screening of In Vitro Effects. *Plants* 11, 100 (2021).



---

TEZĂ DE DOCTORAT

# Modificări celulare și moleculare în cancerul de sân induse de inhibiția căii biosintetice a serinei

---

Student doctorand: **Ioana-Ecaterina PRALEA**

---

Coordonator de doctorat: **Prof. dr. Cristina-Adela IUGA**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# Cuprins

<b>INTRODUCERE</b>	1
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	3
<b>Capitol 1: Cancerul de sân triplu negativ – o necesitate clinică</b>	5
1.1 Subclasificarea pe baze moleculare a cancerului de sân triplu negativ	6
1.2 Reprogramarea metabolică în cancerul de sân triplu negativ: un review al studiilor omice bazate pe spectrometria de masă	9
1.2.1 Caracterizarea cancerului de sân triplu negativ din perspectiva studiilor de proteomică	10
1.2.2 Caracterizarea cancerului de sân triplu negativ la nivel metabolomic	12
<b>Capitol 2: Calea de biosinteză a serinei: un rol central în adaptările metabolice ale cancerului mamar triplu negativ</b>	15
2.1 Particularitățile metabolice și vulnerabilitățile cancerului de sân triplu negativ caracterizate prin studii omice	15
2.2 Metabolismul serinei în cancerul de sân triplu negativ și implicațiile acesteia în progresia și agresivitatea tumorală	16
2.3 Țintirea fosfoglicerat dehidrogenazei- enzima cheie a căii de biosinteză <i>de novo</i> a serinei	18
2.4 Compuși naturali și evaluarea acestora prin studii <i>in silico</i>	20
<b>CONTRIBUȚIE PERSONALĂ</b>	23
<b>1. Ipoteze și obiective</b>	25
<b>2. Metodologie generală</b>	27
2.1 Linii celulare și condiții de cultivare a acestora	27
2.1.1 Proceduri generale de cultivare a celulelor aderente	28
2.1.1.1 Procedura de cultivare după dezghetare a liniilor celulare	28
2.1.1.2 Proceduri pentru crearea biobăncii de linii celulare aferente studiilor	28
2.1.1.3 Procedura de subcultivare a liniilor celulare	28
2.1.2 Proceduri de cultivare a celulelor pentru teste <i>in vitro</i>	29
2.1.2.1 Testarea viabilității celulare prin testul MTT	29
2.1.2.2 Testul de formare a coloniilor	29
2.1.2.3 Evaluarea capacității de migrare direcțională a celulelor	30
2.1.2.4 Analiza morfologică a celulelor prin microscopie cu fluorescență	30
2.1.2.5 Proceduri de cultivare a celulelor pentru analiza prin spectrometrie de masă	31
2.2 Label-free nano-LC-IMS-MS pentru analiza profilului proteic	31
2.2.1 Pregătirea probelor pentru analiza proteomului prin spectrometrie de masă	31
2.2.2 Achiziția și prelucrarea datelor primare	32
2.2.3 Analiza datelor	33
2.3 Analiza LC-MS a aminoacizilor din mediul de cultură	34
2.3.1 Pregătirea probelor	34
2.3.2 Achiziția și prelucrarea datelor	34
<b>Capitol 3: Analiza profilului metabolic a linilor celulare reprezentative pentru cancerul de sân triplu negativ</b>	35
3.1 Introducere	35
3.2 Obiective	35
3.3 Materiale și metode	35
3.4 Rezultate și discuții	36

3.4.1 Analiza performanței protocoalelor aplicate pentru extracția și analiza proteinelor intracelulare și secretate	36
3.4.2 Proteomul intracelular al liniilor celulare de cancer de sân triplu negativ netratate	36
3.4.3 Profilul proteinelor secretate al liniilor celulare de cancer de sân triplu negativ netratate	42
3.4.4 Analiza LC-MS a aminoacizilor din mediul de cultură	44
3.5 Concluzii	47
<b>Capitol 4: Adaptările metabolice ale cancerului de sân triplu negativ ca urmare a tratamentului cu NCT-503 și CBR-5884</b>	49
4.1 Introducere	49
4.2 Obiective	52
4.3 Rezultate și discuții	52
4.3.1 Caracterizarea efectului <i>in vitro</i> al NCT-503 și CBR-5884 asupra liniilor celulare reprezentative cancerului de sân triplu negativ	52
4.3.2 Răspunul liniilor celulare reprezentative cancerului de sân triplu negativ la inhibiția fosfoglicerat dehidrogenazei	55
4.3.2.1 Analiza proteinelor semnificativ modificate ca urmare a tratamentului cu NCT-503	55
4.3.2.2 Analiza proteinelor semnificativ modificate ca urmare a tratamentului cu CBR-5884	57
4.3.2.3 Analiza modificărilor apărute la nivelul proteomului în cazul liniilor celulare de cancer de sân triplu negativ ca urmare a tratamentului cu inhibitori ai fosfoglicerat dehidrogenazei	60
4.3.2.4 Tehnici bioinformatică: analiza căilor metabolice afectate utilizând ClueGO	63
4.3.2.5 Tehnici bioinformatică: analiza căilor metabolice afectate utilizând Reactome GSEA	67
4.3.3 Proteinele targetabile induse de tratamentul cu NCT-503 în liniile de celule reprezentative cancerului de sân triplu negativ	71
4.3.4 Modificări în modelul de consum al aminoacizilor al liniilor celulare de cancer de sân triplu negativ ca urmare a tratamentului cu inhibitori ai fosfoglicerat dehidrogenazei	74
4.4 Concluzii	75
<b>Capitol 5: Compuși naturali: posibili inhibitori ai fosfoglicerat dehidrogenazei. O analiză <i>in silico</i></b>	77
5.1 Introducere	77
5.2 Obiective	78
5.3 Materiale și metode	78
5.3.1 Structura enzimei țintă: fosfoglicerat dehidrogenază	78
5.3.2 Predicția locului activ de legare a inhibitorilor pentru fosfoglicerat dehidrogenază	78
5.3.3 Crearea unei baze de date interne pentru compuși naturali	78
5.3.4 Screening-ul virtual a bazei de date de compuși naturali	79
5.3.5 Determinarea proprietăților de absorbție, distribuție, metabolism și excreție ale compușilor naturali	79
5.4 Rezultate și discuții	80
5.4.1 Analiza structurilor cristalografice disponibile pentru fosfoglicerat dehidrogenază	80
5.4.2 Predicția locului de legare la enzima țintă și evaluarea proprietăților ADME a compușilor naturali	83

5.4.3 Screening virtual al bibliotecii de compuși naturali	85
5.4.4 Modificări celulare și metabolice ale liniilor de cancer de sân triplu negativ în urma tratamentului cu acid cafeic	87
5.4.4.1 Modificări ale profilului proteic ca răspuns la trataamentul cu acid cafeic	89
5.4.4.2 Tehnici bioinformatic: analiza căilor metabolice afectate	89
5.5 Concluzii	92
<b>Capitol 6: Evaluarea efectelor <i>in vitro</i> ale extractului din culturi de calusuri de <i>Leontopodium alpinum</i> Cass. asupra liniilor celulare de cancer de sân triplu negativ</b>	93
6.1 Introducere	93
6.2 Obiective	93
6.3 Materiale și metode	93
6.3.1 Material biologic	94
6.3.2 Pregătirea extractelor din culturi de calus de <i>Leontopodium alpinum</i>	94
6.3.3 Caracterizarea fitochimică prin spetrometrie de masă	94
6.4 Rezultate și discuții	95
6.4.1 Caracterizarea fitochimică a extractelor obținute din culturi de calus de <i>Leontopodium alpinum</i>	95
6.4.2 Evaluarea conținutului total de polifenoli, a proprietăților antioxidante și a efectelor <i>in vitro</i> ale extractelor din culturi de calusuri de <i>Leontopodium alpinum</i> asupra liniilor celulare de cancer mamar triplu negativ	99
6.4.3 Evaluarea efectului antiproliferativ al acizilor leontopodici asupra liniilor celulare de cancer de sân triplu negativ	102
6.5 Concluzii	103
<b>7. Discuții generale</b>	105
<b>8. Observații finale</b>	109
<b>9. Originalitatea tezei și contribuțiile inovative în domeniu contributions</b>	111
<b>REFERINȚE BIBLIOGRAFICE</b>	113
<b>ANEXE</b>	121

**Cuvinte cheie:** Proteomica bazată pe spectrometria de masă, secretom, aminoacizi chirali, cancer mamar triplu negativ (TNBC), andocare moleculară, compuși naturali, acid cafeic, acizi leontopodici, inhibarea căii de biosinteză a serinei

## INTRODUCERE

Începând cu anul 2020, cancerul mamar (CM) a devenit cel mai frecvent tip de cancer raportat în rândul femeilor europene, reprezentând 26,4% din toate cazurile noi de cancer<sup>1</sup>. Cancerelor mamare prezintă heterogenitate la nivel inter-tumoral, cât și intra-tumoral, cu variații moleculare observate pe parcursul evoluției CM. O formă distinctă de CM este cancerul mamar triplu negativ (CMTN), caracterizat prin absența receptorilor pentru estrogen, progesteron și factorul de creștere epidermică umană. CMTN este notabil pentru natura sa agresivă și diversitatea celulară, manifestată clinic prin rate ridicate de recidivă și metastaze, precum și o rată scăzută de supraviețuire.

Timpul mediu raportat până la apariția metastazelor la pacienții cu CMTN este de aproximativ 2 ani, iar timpul de supraviețuire mediu raportat după diagnosticarea metastazelor distale variază între 17 și 25 de luni<sup>2</sup>. Opțiunile de tratament pentru acest tip de CM sunt limitate la chimioterapie, care a demonstrat o eficiență redusă, având în vedere mortalitatea raportată pentru pacienți de 37% în primii cinci ani de la diagnostic<sup>3</sup>. În plus, îmbunătățirea opțiunilor de tratament s-a dovedit a fi o provocare din cauza lipsei țintelor moleculare bine definite și a heterogenității inerente a CMTN. Este evident că CMTN reprezintă o provocare clinică, subliniind necesitatea de a înțelege baza moleculară a acestuia și de a identifica factorii moleculari care să permită dezvoltarea unor tratamente eficiente și țintite.

Celulele canceroase prezintă modificări metabolice specifice care le permit să supraviețuiască și să se multiplieze rapid. Spre deosebire de celulele normale, acestea își modifică metabolismul macromoleculilor pentru a satisface cerințele ridicate de energie și nutrienți. Celulele în rapidă proliferare, inclusiv CMTN, depind într-o măsură semnificativă de aportul de glucoză, glutamină și aminoacizi non-glutaminici; precum și de serină pentru a-și îndeplini cerințele energetice și a beneficia de unități esențiale de carbon și azot<sup>4</sup>. Serina joacă un rol esențial în reglementarea unei game variate de procese biologice, acționând ca un nod central în producția și transportul altor aminoacizi esențiali, metabolismul acizilor nucleici și lipidelor, precum și controlul proceselor epigenetice și menținerea stării redox. Acest aminoacid nepolar poate fi obținut din mediu extern prin intermediul transportorilor ASCT1 și ASCT2; transportori ce s-au dovedit supraexprimați în multe tipuri de tumori. Alternativ, celulele au capacitatea de a produce serină intern prin intermediul căii de biosinteză *de novo* a serinei (SSP), un proces frecvent întâlnit în cancerul înalt metastatic. Calea SSP este susținută de enzimele PHGDH, PSAT1 și PSPH supraexprimate în diverse tipuri de cancer, inclusiv CMTN, și care sunt asociate cu chemorezistența și agresivitatea cancerelor.

Având în vedere heterogenitatea CMTN, scopul principal al tezei a fost evaluarea impactului la nivel metabolic al inhibării SSP asupra unui panel de linii celulare reprezentative CMTN cu diferite dependențe față de această cale metabolică, utilizând abordări omice bazate pe spectrometria de masă ca instrument principal.

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

Cancerul mamar triplu negativ reprezintă aproximativ 15-20% din totalul diagnosticului de cancer mamar, deși cercetările privind prevalența sa exactă în rândul populației europene sunt limitate. Acest subtip este considerat cel mai agresiv din cauza heterogenității sale moleculare<sup>5,6</sup>. În practica clinică, diagnosticarea cancerului mamar triplu negativ (CMTN) conduce la un tratament nespecific, chimioterapia și intervenția chirurgicală rămânând principalele metode de tratament. Pacienții se confruntă adesea cu rate ridicate de recidivă, însoțite de complicații metastatice, mecanismele de răspândire fiind în mare parte neclare, deși există o tendință crescută pentru implicarea

creierului și a plămânilor. Drept urmare, ratele generale de supraviețuire sunt notabil scăzute (HR =1.69, 95% CI 1.24-2.307) pentru această formă de CM.

## **Capitolul 1: Cancerul de sân triplu negativ – o necesitate clinică**

În ultimele trei decenii, cercetările ample s-au concentrat pe înțelegerea caracteristicilor biologice și a variabilității semnificative a acestui tip de CM, având ca scop dezvoltarea unor noi abordări terapeutice sistematice și eficiente. Clasificarea CM s-a bazat inițial pe dimensiunea tumorii, gradul histologic și statusul receptorilor hormonal. Această clasificare a fost ulterior îmbunătățită prin includerea prezenței amplificării genei pentru factorul de creștere epidermic uman (HER2), ceea ce a condus la clasificarea CM în trei grupuri principale: cancer de sân hormonodependent, HER2 pozitiv și triplu negativ. Totuși, această clasificare a demonstrat o acuratețe clinică limitată, deoarece pacienții cu risc scăzut erau uneori diagnosticați cu forme agresive de cancer<sup>8</sup>. CMTN este în mod predominant asociat cu subtipul intrinsec bazal datorită similitudinii expresiei genetice cu celulele stratului epitelial bazal. Cercetările realizate de Bertucci și colaboratorii<sup>9</sup> au arătat că aproximativ 70% din cazurile de CMTN au avut subtip bazaloid, iar 76% din cancerelor bazaloide au fost identificate ca fiind triplu negative ceea ce a dus la utilizarea interschimbabilă a acestor termeni<sup>10</sup>. Este esențial să subliniem că termenul 'triplu-negativ' cuprinde și tipuri histologice distincte care nu sunt clasificate ca fiind de tip basal, cum ar fi carcinomul medular, carcinomul secretor, carcinomul metaplastic de grad scăzut și carcinomul adenoid chistic.

De-a lungul ultimilor decenii s-a încercat o abordare sistematică a variabilității moleculare și de răspuns al acestui tip de cancer de sân prin subclasificarea acestuia pe baza evidențelor omice. Subclasificarea CMTN pe baza expresiei genetice a fost propusă de Lehmann și colaboratorii<sup>11,12</sup> rezultând în identificarea a patru subtipuri transcripționale (BL1, BL2, M și LAR), fiecare având caracteristici biologice unice și posibile ținte terapeutice. Pe scurt, subtipul bazal BL1 a prezentat o augmentare semnificativă a căilor metabolice aferente ciclului celular și diviziunii celulare, fiind asociat clinic cu stadii mai puțin avansate și rate de supraviețuire generală și fără recidivă mult mai bune. În contrast, subtipul BL2 a fost caracterizat prin modificări ale metabolismului glucozei și a semnalizării prin factori de creștere, în timp ce subtipul mezenchimal, M a prezentat modificări asociate motilității celulare și diferențierii. Subtipul LAR s-a distins prin prin expresia semnificativ crescută a genelor implicate în căile metabolice mediate hormonal prezentând niveluri crescute de expresie a receptorului pentru androgen și a genelor implicate în metabolismul aminoacizilor. În plus, acestor subtipuri CMTN le-au putut fi asociate modele particulare de progresie: subtipul LAR al CMTN a manifestat o tendință mai mare de răspândire regională și preferință pentru metastazarea la nivel osos spre deosebire de tipul mezenchimal unde metastazarea are loc la nivelul plămânului. Studiile ce au dus la propunerea acestei subclasificări a CMTN a evidențiat importanța evaluării microambientului imun în toate

cazurile de CMTN deoarece pacienții cu status imunoreactiv pot beneficia de pe urma instituirii imunoterapiei.

O subclasificare a CMTN pe baza profilului metabolomic a fost propusă de Beatty și colaboratorii<sup>13</sup> pe când, o abordare multi-omică a fost adoptată de Gong<sup>14</sup>. Aceștia din urmă au integrat datele transcriptomice, genomice și metabolice pentru a propune un cadru de subclasificare a CMTN, aplicabil diverselor grupuri de pacienți. Aceste studii sugerează o direcție promițătoare în înțelegerea și tratamentul CMTN, evidențiind importanța utilizării unor metode variate pentru a obține o clasificare mai precisă a CMTN. Acest capitol se continuă cu o revizuire a literaturii de specialitate în ceea ce privește utilizarea tehnicilor omice bazate pe spectrometrie de masă în evaluarea reprogramării metabolice în cazul CMTN. Rezultatele acestei revizuiți evidențiază următoarele aspecte: i. în primul rând, TNBC prezintă o dependență considerabilă față de calea glicolică; ii. s-au identificat modificări în metabolismul aminoacizilor în CMTN, inclusiv o absorbție crescută a glutaminei și cisteinei, precum și schimbări în metabolismul serinei și glicinei; iii. în plus, au fost observate modificări semnificative în metabolismul lipidic. Aceste descoperiri subliniază complexitatea metabolică a TNBC și sugerează direcții potențiale pentru intervenții terapeutice.

## **Capitol 2: Calea de biosinteză a serinei: un rol central în adaptările metabolice ale cancerului mamar triplu negativ**

Acest capitol analizează importanța căii de sinteză a serinei în cancerul mamar triplu negativ, evidențiind influențele metabolice ale acestei căi în relație cu reprogramarea metabolică raportată în această formă de cancer de sân. Cancerul mamar triplu negativ, caracterizat prin proliferarea rapidă a celulelor, prezintă o dependență crescută față de glucoză și glutamină dar și de aminoacizi non-glutaminici, cum ar fi serina în vederea menținerii nivelurilor necesare de carbon și azot. Celulele pot obține serina din surse externe, prin transportori specializați, dar au și capacitatea de a sintetiza intern din glucoză prin calea de biosinteză *de novo* a serinei (SSP). Intermediarul glicolitic, 3-fosfoglicerat este precursorul căii SSP; acesta este transformat în 3-fosfonooxipiruvat sub acțiunea 3-fosfoglicerat dehidrogenazei (PHGDH), prima enzimă a acestei căi. Acest proces este urmat de reacții enzimatice care implică fosfoserin transaminaza 1 (PSAT1) și fosfoserin fosfataza (PSPH), culminând cu producția aminoacidului L-serină. SSP contribuie la activitatea ciclului acidului tricarboxilic prin generarea  $\alpha$ -ketoglutaratului. Numeroase studii au raportat supraexprimarea enzimelor SSP în diferite tipuri de cancer, inclusiv cancerul de sân, legând amplificarea genomică a PHGDH de rezistența terapeutică și progresia agresivă a bolii, evidențiind astfel această cale drept potențială țintă pentru intervenția farmacologică.

Descoperirea a doi inhibitori ai SSP, CBR-5884 și NCT-503, a reînnoit interesul pentru PHGDH ca țintă terapeutică viabilă. În plus, conceptul de linii celulare PHGDH dependente a jucat un rol important în determinarea impactului inhibiției acestei

enzime în mai multe forme de cancer. În acest capitol este oferită o trecere în revistă a literaturii privind inhibitorii PHGDH raportați și impactul utilizării acestora în diverse patologii. De asemenea, se explorează potențialul compușilor naturali și al metodelor computaționale în crearea de noi oportunități de cercetare ce facilitează descoperirea sau optimizarea compușilor terapeutici cu nucleu natural.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Capitol 3: Analiza profilului metabolic a liniilor celulare reprezentative pentru cancerul de sân triplu negativ

#### Ipoteze și obiective ale studiului

Obiectivul principal al tezei a fost determinarea dependenței celulare și metabolice a cancerului de sân triplu negativ de calea SSP. Pentru a aborda acest obiectiv, modelele *in vitro* alte CMTN incluse în studiu trebuie să reflecte cu exactitate heterogenitatea intrinsecă observată în această formă de cancer în ceea ce privește dependența de SSP. În consecință, în primul studiu experimental, au fost selectate trei linii celulare reprezentative pentru TNBC și anume MDA-MB-231, MDA-MB-468 și Hs 578T. Acestea au fost evaluate pe baza profilului proteomului intracelular și a secretomului precum și pe baza modelelor de consum al aminoacizilor din mediul de cultură folosind tehnici bazate pe spectrometrie de masă. De asemenea, diferențele în exprimarea proteinelor implicate în SSP sau în alte căi cunoscute a fi afectate direct de serină au fost evaluate. În plus, utilizarea instrumentelor bioinformaticice a permis traducerea datelor proteomice în informații la nivel de cale metabolică, facilitând astfel o înțelegere cuprinzătoare a asemănărilor și diferențelor dintre liniile celulare CMTN native.

#### Rezultate principale

Dependența diferită de SSP a celor trei linii celulare CMTN a fost confirmată folosind profilul proteomului intracelular cu MDA-MB-231 prezentând cea mai scăzută expresie a enzimelor SSP, în timp ce celelalte două linii celulare au avut niveluri ridicate a PHGDH, PSPH și PSAT1; confirmând astfel selectarea acestor linii celulare. Analiza statistică a datelor a oferit informații despre proteinele și căile metabolice cu expresie distinctă între liniile celulare.

Un număr de 264 proteine au prezentat expresie diferită între toate liniile celulare fiind asociate în principal cu interacțiunea cu sistemul imunitar. Linia celulară Hs 578T s-a diferențiat de cele două linii MDA prin intermediul proteinelor implicate în traficul de membrană, metabolismul proteinelor, semnalizarea oncogenă mediată MAPK și organizarea matricei extracelulare. Mai mult, linia celulară care prezintă cea mai mare dependență de SSP, MDA-MB-468, s-a diferențiat prin nivelul de expresie diferit al proteinelor asociate cu metabolismul aminoacizilor, biosinteza colesterolului,

metabolismul ARN-ului și calea de semnalizare prin RHO GTPază. Datele obținute pentru proteinele secretate în mediu (secretom) completează și îmbunătățesc profilul intracelular al TNBC, evidențiind că liniile MDA prezintă o similaritate mai mare, în timp ce Hs578T manifestă un comportament distinct asociat cu un fenotip mai agresiv. Diferite profile de consum și secreție a amino acizilor din mediul de cultură au fost evidențiate pentru cele trei linii celulare. Notabil, linia Mda-MB-468 a prezentat nivele crescute de D-amino acizi în mod particular s-a evidențiat secreția activă a D-serinei pentru această linie. Evaluarea nivelurilor de aminoacizi chirali în mediile de cultură pentru cele trei linii celulare a evidențiat dependență diferită, particulară fiecărei linii de consum al aminoacizilor dar și de secreție a acestora. În mod deosebit, linia celulară MDA-MB-468 a prezentat nivele impresionante de D-aminoacizi, subliniind secreția activă a D-serinei în mediul de cultură. Această cercetare subliniază posibila importanță a D-aminoacizilor în patologia CMTN.

### **Concluzii**

Din analiza profilurilor proteice intracelulare, se poate deduce că liniile celulare CMTN prezintă variații inerente în expresia proteinelor asociate cu glicoliza, calea de biosinteză de novo a serinei și transportul diferitelor molecule prin membrana plasmatică, în special nucleotide și aminoacizi. Profilurile proteinelor secretate completează și îmbunătățesc profilul intracelular al CMTN, indicând că liniile MDA prezintă o similitudine mai mare, în timp ce Hs 578T manifestă un comportament distinct asociat cu un fenotip mai agresiv. În plus, analiza LC-MS a aminoacizilor chirali eliberați în mediul de cultură a evidențiat modele distincte de consum pentru cele trei linii celulare TNBC. Cel mai notabil, linia celulară MDA-MB-468 a arătat niveluri crescute de D-aminoacizi și o secreție semnificativă de D-Ser la punctul de timp de 48 de ore, subliniind posibila importanță a D-aminoacizilor în patologia CMTN.

## **Capitol 4: Adaptările metabolice ale cancerului de sân triplu negativ ca urmare a tratamentului cu NCT-503 și CBR-5884**

### **Ipoteze și obiective ale studiului**

Cel de-al doilea studiu original a avut ca scop caracterizarea răspunsului metabolic al unui panel de linii celulare CMTN ca urmare a tratamentului cu doi inhibitori ai PHGDH, pentru o înțelegere aprofundată a mecanismelor utilizate de liniile celulare ca răspuns la blocarea căii SSP. Prin urmare, au fost folosite profilurile proteinelor intracelulare și secretate, împreună cu teste celulare și analiza LC-MS a aminoacizilor din mediile de cultură în vederea caracterizării modificărilor metabolice ale liniilor celulare ca urmare a tratamentului cu cei doi inhibitori SSP.

### **Rezultate principale**

Testele funcționale ale celulelor au evidențiat sensibilitate diferită la tratamentul cu cei doi inhibitori pentru panelul de linii celulare CMTN. NCT-503 a prezentat valori IC<sub>50</sub> similare în cazul liniilor celulare MDA-MB-231 și Hs 578T, în timp ce linia celulară

dependentă de SSP a arătat o susceptibilitate mai mare. Pe de altă parte, CBR-5884 a avut efecte antiproliferative comparabile în cazul liniilor MDA, însă linia HS a demonstrat o sensibilitate mai mare la acest tratament; Rezultatele au fost confirmate și la nivel morfologic, evidențiind celule ce prezintă citoschelet fragmentat, nuclee micșorate, reorganizări ale citoscheletului și fenomenul de rotunjire ca răspuns la tratamentul aplicat. Linile celulare TNBC au răspuns diferit la inhibitorii PHGDH, având proteine diferit exprimate, specifice fiecărei linii celulare. De asemenea, un număr limitat de proteine diferit exprimate, comune au fost observate în cadrul aceleiași linii celulare după tratamentul cu cei doi inhibitori. Ca răspuns la tratament, au fost identificate modificări semnificative ale proteinelor implicate în căi metabolice legate de ciclul celular în cazul liniilor MDA-MBs. În mod specific, punctele de control ale ciclului celular și căile asociate cu faza mitotică G1 și tranziția G1/S au fost suprimate în celulele MDA-MB-231. Pe de altă parte, căile asociate cu faza M și tranziția G2/M au fost afectate în celulele MDA-MB-468 în urma tratamentului cu NCT-503. În plus, CBR-5884 a influențat negativ calea pentozofosfat și metabolismul carbohidraților în celulele MDAs, având totodată un impact asupra oxidării biologice în liniile celulare MDA-MB-468 și Hs 578T.

Proteine ținte terapeutică au fost identificate în cadrul proteinelor care au prezentat o expresie crescută în urma tratamentului cu NCT-503. În mod specific, au fost descoperite șapte proteine cu rol de țintă terapeutică pentru care există medicamente aprobate de FDA, și anume TUB1A, AKR1C2, DPEP1, MAP4, SOST, EPHA2 și TXNRD1. DPEP1 și SOST au fost raportate ca fiind supraexprimate în cancerul mamar, în timp ce SOST, TXNRD1, PKLR, EPHA2 și PLIN3 au fost găsite supraexprimate în leucemii și mielom. Trei medicamente antineoplazice deja utilizate în cancerul mamar, precum și molecule folosite în alte patologii, cum ar fi mielomul, melanomul și cancerul colorectal, au fost identificate ca fiind medicamente viabile pentru teste suplimentare în cancerul mamar triplu negativ, inclusiv dasatinib, fotemustină și regorafenib. În plus, studiul a subliniat mai multe medicamente aflate în studii clinice, cum ar fi epothilone D (DB01873), patupilone (DB03010), CYT997 (DB05147) și PX-12 (DB05448).

## **Concluzii**

Au fost obținute proteine cu expresie modificată ca urmare a tratamentelor aplicate, acestea dovedindu-se specifice fiecărei linii celulare, ceea ce sugerează mecanisme de răspuns diferite chiar și în cadrul aceleiași linii celulare. Cu toate acestea, rezultatele analizelor bioinformatică au evidențiat modificări ale proteinelor asociate în mod obișnuit cu organizarea matricei extracelulare în toate cele trei linii celulare după tratamentul cu NCT-503. În cazul tratamentului cu CBR-5884, au fost identificate mai multe căi metabolice inclusiv biosinteza colesterolului, ciclul TCA, metabolismul nucleotidelor, semnalizarea prin receptorii specifici de moarte celulară. Studiul a identificat 13 proteine drept posibile ținte terapeutice, dintre care șapte au deja medicamente aprobate de FDA pentru alte afecțiuni. Această descoperire deschide o

nouă și promițătoare direcție de cercetare, axată pe re poziționarea acestor medicamente sau a combinațiilor lor în tratamentul TNBC.

## **Capitol 5: Compuși naturali: posibili inhibitori ai fosfoglicerat dehidrogenazei. O analiză in silico**

### **Ipoteze și obiective ale studiului**

Compușii naturali prezintă o gamă largă de molecule bioactive, ceea ce le conferă o valoare semnificativă în dezvoltarea de noi compuși medicamentoși. Mai mult, un număr considerabil de agenți chimioterapeutici își au originea în produsele naturale, iar proprietățile lor chemosensibilizante au atras atenția comunității științifice, evidențiind potențialul imens al acestor compuși.

Scopul acestei cercetări a fost de a identifica compuși naturali cu potențial în țintirea PHGDH aplicând tehnici de andocare moleculară *in silico*. Într-o primă etapă, a fost realizată o analiză a modului de legare și a interacțiunilor cu aminoacizii ale inhibitorilor disponibili pentru PHGDH, folosind datele disponibile în baza de date PDB. Pe baza informațiilor obținute, a fost selectat locul de legare a acestor compuși la proteina țintă (locul de legare a cofactorului) pentru andocarea moleculară a bibliotecii de compuși naturali.

### **Rezultate principale**

Baza de date Protein Database Bank (RCSB PDB, <https://www.rcsb.org/>) a fost utilizată pentru a obține structura proteinei țintă PHGDH, prima enzimă din calea biosintetică a serinei. Structura PDB 2G76 a fost aleasă pentru screeningul virtual al unei baze de date de compuși naturali. A fost realizată o analiză detaliată a buzunarelor și sub-buzunarelor disponibile ale proteinei țintă, evaluându-le potențialul de a fi țintite de compuși medicamentoși. În acest sens au fost evaluați descriptori precum cum volumul, suprafața și adâncimea buzunarului, compoziția aminoacizilor, grupurile funcționale și procentul de acoperire a ligandului original. A fost efectuată o aliniere a structurilor PDB disponibile ale PHGDH pentru a identifica locațiile specifice de legare a liganzilor. Această analiză s-a concentrat pe identificarea posibilelor situsuri de legare și a reziduurilor critice ale aminoacizilor implicați în procesul de legare. Reziduurile cheie identificate au inclus Pro176, Leu216, Ser212, Gly152, Asp173, Tyr174, Thr213 și Thr207. A fost creată o librărie cu compuși naturali, care a inclus standarde comerciale de înaltă puritate, aceasta fiind ulterior filtrată pentru a include compuși cu proprietăți ADME favorabile, în special în ceea ce privește greutatea moleculară, polaritatea de suprafață și lipofilitatea. Un total de 117 compuși au fost andocați la situsul de legare NAD<sup>+</sup> al proteinei 2G76. În urma unui proces riguros de eliminare, 90 de compuși au fost analizați manual pentru interacțiuni cu aminoacizi cheie. Compușii notabili identificați au inclus crisofanolul, 1,8-Dihidroxi-antrachinona, terpinolenul, esterul etilic al acidului cafeic, acidul cafeic, canitol, alfa-asaronul, alfa(-)-bisabololul, calcona și (-)-lupinina. Acidul cafeic a fost evaluat în experimente *in vitro* pe celule, demonstrând un

IC<sub>50</sub> constant în rândul liniilor celulare CMTN în intervalul milimolar. Cu toate acestea, liniile celulare CMTN au prezentat răspunsuri morfologice distincte la tratamentul cu acid cafeic. La nivelul proteomului, răspunsul a fost specific fiecărei linii celulare, cu doar câteva proteine cu expresie modificată comune între liniile celulare selectate. Analiza acestor proteine utilizând tehnici bioinformatiche au indicat implicarea proteinelor modificate ca răspuns la tratamentul cu acid cafeic în căi metabolice similare celor identificate pentru inhibitorii SSP, NCT-503 și CBR-5884.

## **Concluzii**

Această cercetare a aplicat andocarea moleculară pentru a identifica compuși naturali cu potențiale efecte inhibitorii asupra PHGDH, enzima țintă a căii serinei. Screeningul *in silico* a relevat că compușii naturali, în special cei din clasa fenilpropanoizilor, au un potențial ridicat de inhibare a PHGDH prin legarea la situsul cofactorului, prezentând afinități de legare estimate în intervalul micromolar. Acidul cafeic a fost selectat pentru evaluarea *in vitro*, prezentând răspunsuri morfologice distincte în cadrul liniilor celulare de CMTN. În plus, răspunsul la nivelul profilului proteic a variat în funcție de linia celulară, cu puține proteine comune identificate. Proteinele modificate ca urmare a tratamentului sunt implicate în căi metabolice similare cu cele observate pentru inhibitorii NCT-503 și CBR-5884. Această studiu subliniază eficiența screeningului *in silico* ca instrument de pre-selecție pentru identificarea moleculelor cu potențial inhibitor al compușilor esențiali pentru metabolismul celular.

## **Capitol 6: Evaluarea efectelor *in vitro* ale extractului din culturi de calusuri de *Leontopodium alpinum* Cass. asupra liniilor celulare de cancer de sân triplu negativ**

### **Ipoteze și obiective ale studiului**

Ultimul studiu original s-a concentrat pe identificarea de surse naturale alternative, bogate în acizi cafeici și alți compuși din clasa fenilpropanoizilor. *Leontopodium alpinum* (LA) este recunoscut pentru proprietățile sale antioxidante, care sunt în principal asociate cu profilul său fitochimic bogat în această clasă de compuși naturali. Scopul acestui studiu a fost caracterizarea fitochimică cuprinzătoare a culturilor de calus de floare de colț, evaluarea capacității antioxidante a extractului și a activității antitumorale pe un panel de linii celulare reprezentative CMTN.

### **Rezultate principale**

Pentru analiza fitochimică a extractului de calus de *Leontopodium alpinum* a fost implementată spectrometria de masă cu mobilitate ionică. Metaboliții secundari principali din culturile de callus *L. alpinum* au fost derivați ai acidului glucaric, care se formează prin esterificarea grupelor hidroxil ale acidului D-glucaric cu grupările caffeoyl și 3-hidroxi-butanyl. Au fost identificați unsprezece derivați glucarici distincti,

dintre care acidul leontopodic A și B sunt compușii cei mai prevalenți. Acidul leontopodic A (C37H34O19) și acidul leontopodic B (C33H28O17) au fost confirmați ca fiind cei mai abundenti, identificarea lor fiind confirmată cu standard analitice. În plus, au fost identificați izomerii ai acidului di-cafeoil glucaric, acidul clorogenic și acidul 3,5-dicaffeoyl quinic. Analiza cantitativă LC-MS s-a concentrat pe patru compuși predominanți: acizii leontopodici A și B, acidul clorogenic și acidul 3-5-dicaffeoylchinic. Acești compuși au reprezentat peste 57% din extractul uscat. Datorită prezenței semnificative a derivaților fenilpropanici, extractul de callus LA a fost testat *in vitro* pe un panou de celule CMTN. În mod notabil, extractul a influențat viabilitatea celulară, a indus modificări morfologice, a afectat formarea coloniilor și a alterat capacitatea de migrare a acestor celule.

Acest studiu a evaluat efectele antiproliferative ale acizilor leontopodici asupra liniilor celulare CMTN. Rezultatele au arătat că linia celulară MDA-MB-231 a fost deosebit de sensibilă atât la acidul leontopodic A, cât și la B, cu valori  $IC_{50}$  mai mici de 150  $\mu$ M. Comparativ, linia celulară MDA-MB-468 a prezentat o sensibilitate moderată, cu valori  $IC_{50}$  de 250  $\mu$ M pentru acizii leontopodici. Pe de altă parte, linia celulară HS 578T a demonstrat cea mai mare rezistență, cu valori  $IC_{50}$  ce depășesc 300  $\mu$ M.

## Concluzii

Analiza fitochimică a extractului de callus de *Leontopodium alpinum* a evidențiat prezența semnificativă a derivaților fenilpropanici. Acești compuși au afinitate de legare pentru locul de legare al cofactorului PHGDH, sugerând potențialul extractului pentru testare a activității *in vitro*. Evaluarea extractului LA pe un panel celular reprezentativ CMTN a evidențiat variații semnificative în răspunsul liniilor celulare, cu MDA-MB-468 prezentând o rezistență notabilă. De asemenea, constituenții principali ai extractului, identificați ca acizi leontopodici A și B, au fost evaluați *in vitro*, indicând un efect antiproliferativ mai accentuat comparativ cu rezultatele obținute anterior utilizând acidul cafeic.

## OBSERVAȚII FINALE

Teza prezintă aduce contribuții semnificative în studiul terapiilor personalizate pentru cancerul mamar triplu negativ utilizând instrumente omice bazate pe spectrometria de masă pentru a analiza caracteristicilor metabolice ale acestei forme de cancer.

Trei linii celulare reprezentative pentru patologia CMTN au fost selectate pentru studiu, fiecare având niveluri distincte de dependență față de SSP. Profilurile proteinelor intracelulare și secretate, împreună cu teste celulare și analiza LC-MS a profilului de consum al aminoacizilor din mediul de cultură, au fost utilizate pentru a caracteriza adaptările celulare ale liniilor celulare în condiții normale și ca răspuns la tratamentul cu inhibitori ai SSP. În plus, prin utilizarea instrumentelor bioinformatiche, au fost identificate particularități metabolice exprimate la nivel de cale metabolică pentru fiecare dintre liniile celulare CMTN (studii 3 și 4). Dependența liniilor celulare de calea

SSP a fost determinat folosind profilurile proteice, acestea confirmând expresia diferită a enzimelor ce reglează această cale în liniile celulare CMTN incluse în prezentul studiu. Într-un experiment subsecvent, analiza LC-MS a profilului de utilizare al aminoacizilor din mediile de cultură a evidențiat secreția activă de D-Ser în mediul de cultură al liniilor celulare dependente de PHGDH. Aceasta subliniază posibila implicație a D-aminoacizilor în patologia CMTN și indică necesitatea unor investigații suplimentare. Răspunsul liniilor celulare la inhibiția SSP a fost evaluat prin teste *in vitro* ce au vizat capacitatea de proliferare, migrare și formare a coloniilor și analiza profilului proteic; date completate ulterior cu analiza folosind instrumente bioinformatică. Astfel studiul oferă noi perspective asupra adaptărilor moleculare ale liniilor celulare CMTN ca răspuns la inhibiția PHGDH. În urma inhibării SSP, a fost remarcată o creștere semnificativă a proteinelor asociate cu medicamente deja aprobate de FDA pentru leucemie, melanom și cancer colorectal. Studiile de re poziționare a acestor medicamente sau combinațiile lor în CMTN reprezintă o nouă și promițătoare direcție de cercetare introdusă de acest studiu, având potențialul de a aduce progrese substanțiale în terapia personalizată (studiul 4). Tehnici de andocare moleculară au fost utilizate pentru a identifica noi inhibitori ai SSP de origine naturală. În acest sens, a fost construită o bază de compuși naturali ce a fost supusă screeningului virtual pentru legare la situsul cofactorului enzimei țintă a SSP, PHGDH (studiul 5). Rezultatele acestui studiu au evidențiat mai mulți compuși promițători din clasa fenilpropanoizilor, dintre care acidul cafeic a fost selectat pentru evaluare *in vitro*.

Scopul celui de-al patrulea studiu original a fost identificarea unei surse naturale bogate în compuși activi descoperiți anterior prin tehnici de andocare moleculară. Având în vedere prezența semnificativă a derivaților fenolpropanici, extractul metanolic din culturile de callus ale *Leontopodium alpinum* (LA) a fost analizat pentru proprietățile sale antiproliferative în CMTN<sup>15</sup> (studiul 6). Acești compuși au afinitate pentru legarea la situsul-ul cofactorului PHGDH (studiul 5), ceea ce sugerează un potențial ridicat al extractului pentru testarea capacității inhibitoare și a potențialului antitumoral *in vitro*. În plus, constituenții principali ai extractului LA, acizii leontopodici, au fost evaluați, demonstrând un efect antiproliferativ mai pronunțat în comparație cu acidul cafeic.

Caracterul interdisciplinar al cercetării care combină spectrometria de masă de înaltă rezoluție cu tehnici bioinformatică și de modelare moleculară, biologie celulară și biochimie, evidențiază impactul cercetărilor din cadrul cetsei teze în dezvoltarea terapiilor personalizate în oncologie.

## Referințe bibliografice

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, B. F. Cancer Today. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.who.int/today/en> (2024).
2. Cai, S.-L. et al. Characteristics of recurrence, predictors for relapse and prognosis of rapid relapse triple-negative breast cancer. *Front Oncol* 13, (2023).

3. Kudelova, E. et al. Genetic Heterogeneity, Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 23, 14937 (2022).
4. Pralea, I.-E. et al. Phytochemicals as Regulators of Tumor Glycolysis and Hypoxia Signaling Pathways: Evidence from In Vitro Studies. *Pharmaceuticals* 15, 808 (2022).
5. Kirkby, M., Popatia, A. M., Lavoie, J. R. & Wang, L. The Potential of Hormonal Therapies for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 15, (2023).
6. Fan, L. et al. Optimising first-line subtyping-based therapy in triple-negative breast cancer (FUTURE-SUPER): a multi-cohort, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 25, 184–197 (2024).
7. Pal, S., Lüchtenborg, M., Davies, E. A. & Jack, R. H. The treatment and survival of patients with triple negative breast cancer in a London population. *Springerplus* 3, 1–5 (2014).
8. Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K. & Ortiz-López, R. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Medicina Universitaria* 18, 105–114 (2016).
9. Bertucci, F. et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 123, 236–240 (2008).
10. Peddi, P. F., Ellis, M. J. & Ma, C. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *Int J Breast Cancer* 2012, 1–7 (2012).
11. Lehmann, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750–2767 (2011).
12. Lehmann, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 11, (2016).
13. Beatty, A. et al. Metabolite Profiling Reveals the Glutathione Biosynthetic Pathway as a Therapeutic Target in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 17, 264–275 (2018).
14. Gong, Y. et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metab* 33, 51-64.e9 (2021).
15. Pralea, I.-E. et al. Profiling of Polyphenolic Compounds of *Leontopodium alpinum* Cass Callus Cultures Using UPLC/IM-HRMS and Screening of In Vitro Effects. *Plants* 11, 100 (2021)