
Rezumatul Tezei de Doctorat

**Studii la nivel celular și metabolic pe
linii celulare din cancer de sân după
expunere la izoflavone**

Doctorand: **Alina Brad (Uifălean)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Corina Ionescu**

Cluj-Napoca 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Cancerul de sân	19
1.1. Incidență și epidemiologie	19
1.2. Subtipuri moleculare	20
1.3. Modificări metabolice apărute în cancerul de sân	22
1.4. Studii de metabolomică aplicate în cancerul de sân	29
2. Utilizarea izoflavonelor din soia în chemoprevenția cancerului de sân	31
2.1. Consumul și valoarea nutritivă a semințelor de soia	31
2.2. Izoflavonele din soia: farmacocinetică și potență estrogenică	32
2.3. Mecanismele celulare ale izoflavonelor din soia observate în studii <i>in vitro</i>	35
2.4. Mecanismele metabolice ale izoflavonelor din soia observate în studii <i>in vitro</i>	44
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	45
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	47
2.1. Linii celulare și condiții de cultură	48
2.2. Materiale și reactivi	50
3. Studiul 1. Evaluarea potențialului citotoxic al izoflavonelor din soia pe linii celulare din cancer de sân	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru	52
3.3. Materiale și metode	52
3.4. Rezultate	54
3.5. Discuții	55
3.6. Concluzii	58
4. Studiul 2. Evaluarea metaboliților extracelulari rezultați după expunerea celulelor tumorale de sân la izoflavone	59
4.1. Introducere	59
4.2. Ipoteza de lucru	60
4.3. Materiale și metode	60
4.4. Rezultate	62
4.5. Discuții	64
4.6. Concluzii	67
5. Studiul 3. Evaluarea metaboliților intracelulari rezultați după expunerea celulelor tumorale de sân la izoflavone	69
5.1. Introducere	69
5.2. Ipoteza de lucru	70
5.3. Materiale și metode	70
5.4. Rezultate și discuții	74

4.6. Concluzii	88
6. Studiul 4. Influența izoflavonelor din soia asupra principalelor citokine implicate în angiogeneză	89
6.1. Introducere	89
6.2. Ipoteza de lucru	90
6.3. Materiale și metode	90
6.4. Rezultate	95
6.5. Discuții	96
6.6. Concluzii	99
7. Discuții generale	101
8. Concluzii generale	103
9. Originalitatea și caracterul inovativ al tezei	105
REFERINȚE	107
ANEXE	119

CUVINTE CHEIE: izoflavone din soia, genisteină, daidzeină, cancer de sân, chemoprevenție, *in vitro*, celule MCF-7, celule MDA-MB-231, metabolomică, ¹H-RMN, GC-MS, LC-MS, angiogeneză, matrice multiplex ELISA

INTRODUCERE

La nivel mondial, cancerul de sân reprezintă al doilea tip de cancer ca frecvență și, de departe, cel mai des tip de cancer în rândul femeilor. Cu toate că actualele strategii de tratament au condus la o scădere a mortalității datorate acestei maladii, efectele secundare ale chimioterapicelor, precum și rezistența crescândă continuă să fie bariere importante în managementul cancerului de sân. Ca urmare, tratamentul cancerului de sân este adesea reconsiderat, o atenție crescândă oferindu-se reprogramării metabolice ca particularitate recunoscută a cancerului. Analiza aprofundată și cuprinzătoare a profilului metabolic cade în sarcina metabolomicii, cea mai tânără ramură din familia științelor "-omice". Interesul susținut pentru investigarea cancerului din perspectivă metabolomică (oncometabolomică) este susținut și de progresele tehnologice realizate în acest domeniu, cele mai utilizate platforme analitice fiind spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară și tehnicile cromatografice cuplate cu spectrometria de masă.

Până în prezent, diferiți compuși naturali au fost investigați ca potențiali agenți chemopreventivi în cancerul de sân. Un exemplu promițător în acest sens este reprezentat de către izoflavonele din soia (*Glycine max*), intens studiate în ultimii 20 de ani ca urmare a controverselor legate de efectul lor dual. Numeroase studii au investigat aceste efecte din perspectivă genomică sau proteomică, însă puține studii au vizat investigarea modificărilor metabolice generate de acești compuși.

Prin urmare, obiectivul general al tezei a fost evaluarea mecanismelor celulare și metabolice ale celulelor tumorale mamare estrogen-dependente (MCF-7) și estrogen-independente (MDA-MB-231), după expunere la diferite izoflavone din soia: genisteină (Gen), daidzeină (Dai) și un extract din semințe de soia (Ext).

Obiectivele specifice au fost următoarele: i) evaluarea potențialului citotoxic al izoflavonelor din soia prin expunerea celor două linii tumorale la concentrații crescătoare de izoflavone și investigarea modificărilor apărute la nivelul endo- și exometabolomului; ii) evaluarea proprietăților anti-angiogenetice ale izoflavonelor din soia pe cele două linii celulare utilizând o matrice multiplex ELISA.

Teza de față este structurată în două părți principale: stadiul actual al cunoașterii, care cuprinde cele mai noi cercetări legate de aplicațiile metabolomicii în cancerul de sân și utilizarea izoflavonelor din soia, și partea de contribuții personale, cuprinzând patru studii, care descriu în amănunt toate experimentele efectuate, împreună cu prezentarea datelor și discutarea rezultatelor.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1. Evaluarea potențialului citotoxic al izoflavonelor din soia pe linii celulare din cancer de sân

Ipoteza de lucru: Scopul acestui studiu a fost evaluarea potențialului citotoxic (IC_{50} , IC_{20} , SC_{20}) al Gen, Dai și al Ext asupra liniilor tumorale mamare MCF-7 și MDA-MB-231, utilizând testul cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (testul MTT).

Materiale și Metode: Celulele MCF-7 și MDA-MB-231 au fost cultivate în plăci cu 96 de godeuri și incubate pentru 24h pentru a permite atașarea celulelor. În continuare, celulele au fost incubate în mediu de cultură conținând concentrații serie de Gen, Dai (1.56 - 100 μ M) sau Ext (6.25 - 400 μ g/mL). Pe fiecare placă a fost inclus un blank control (mediu de cultură), un solvent control (DMSO 0.4%) și un control pozitiv (Etoposid în concentrații IC_{50} pentru fiecare linie). Fiecare tratament a fost aplicat în opt replicare per placă. După 72h, celulele au fost expuse la 0.5mg/mL MTT. Cristalele de formazan rezultate au fost solubilizate în DMSO și absorbanta soluției a fost determinată la lungimea de undă de 550nm. Fiecare experiment a fost efectuat în cuadruplicat. Ulterior, fiecare tratament a fost comparat cu controlul corespunzător, conform testului one-way ANOVA, urmat de corecție cu testul Dunnett.

Rezultate: Pentru celulele MCF-7, toți compușii testați au indus un efect bifazic. La concentrații relativ mici (1.56-13.06 μ M pentru Gen, 1.56-34.28 μ M pentru Dai și 6.25-67.61 μ g/mL pentru Ext), izoflavonele au stimulat proliferarea celulară comparativ cu controlul, în timp ce concentrații mai mari au avut un efect inhibitor. Pentru celulele MDA-MB-231 a fost observat doar un efect doză-dependent. Mai mult,

aceleași concentrații de izoflavone au cauzat un efect inhibitor mai pronunțat în cazul celulelor MDA-MB-231 decât în cazul celulelor MCF-7. Pe baza curbelor doză-răspuns, au fost selectate concentrațiile test pentru următoarele experimente. Astfel, pentru celulele MCF-7, au fost selectate concentrațiile test care au condus la o creștere cu 20% a proliferării celulare (SC_{20}) și concentrațiile care au inhibat creșterea celulară cu 20% comparativ cu controlul (IC_{20}). În schimb, pentru celulele MDA-MB-231, doar concentrațiile inhibitorii IC_{20} au fost selectate.

Discuții: Testul MTT de viabilitate celulară se bazează pe capacitatea oxidoreductazelor NAD(P)H-dependente din celulele viabile de a reduce MTT la formazan, un compus violet, a cărui absorbanță poate fi determinată spectrofotometric. Efectele proliferative observate în celulele MCF-7 după expunere la concentrații mici de izoflavone se datorează, cel mai probabil, interacțiunii izoflavonelor cu receptorii estrogenici, dată fiind similitudinea structurală și funcțională a acestora cu 17- β -estradiolul. În schimb, efectele antiproliferative, observate la doze mari, sunt considerate independente de receptorii estrogenici și sunt atribuite proprietăților proapoptotice, antiangiogenetice și antioxidante ale izoflavonelor (1). Celulele MDA-MB-231 sunt mai sensibile la acțiunea izoflavonelor, răspunzând la concentrații mult mai mici. Dintre compuși, Gen a demonstrat cea mai înaltă activitate, urmată de Dai și Ext. Valorile IC_{20} și SC_{20} pentru Ext au fost cele mai ridicate, cel mai probabil datorită conținutului bogat în formele glicozidate ale izoflavonelor, care sunt lipsite de activitate estrogenică.

Concluzii: Toți compușii au manifestat un efect bifazic asupra celulelor estrogen-dependente MCF-7, concentrații mici stimulând proliferarea celulară în timp ce concentrații mari au determinat un efect inhibitor. Pentru linia celulară MDA-MB-231, estrogen-independentă, a fost observat doar un efect doză-dependent. Înțelegerea efectelor duale ale izoflavonelor reprezintă un pas esențial pentru studiile următoare, ce vor oferi o analiză în profunzime a modificărilor metabolice induse ca urmare a inhibiției, respectiv proliferării celulare.

Studiul 2. Evaluarea metaboliților extracelulari rezultați după expunerea celulelor tumorale de sân la izoflavone

Ipoteza de lucru: Scopul acestui studiu a fost evaluarea profilurilor exometabolomice ale celulelor tumorale mamare MCF-7 și MDA-MB-231 după expunere la Gen, Dai sau Ext, utilizând spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (1H -RMN).

Materiale și Metode: Celulele tumorale MCF-7 și MDA-MB-231 au fost cultivate în plăci de cultură timp de 24h după care au fost expuse la concentrațiile selectate anterior de Gen, Dai, Ext și la DMSO, utilizat ca solvent control. După 72h de tratament, una dintre plăci a fost utilizată pentru pregătirea probelor, iar o altă placă, identică, a servit la numărarea celulelor. Pentru pregătirea probelor, 1.5mL mediu de cultură proaspăt și post-expunere a fost filtrat steril și congelat imediat la $-20^{\circ}C$. Analiza metaboliților extracelulari a fost efectuată utilizând o metodă 1H -RMN, descrisă anterior (2). Toate experimentele au fost realizate în quintuplicat.

Rezultate: În urma analizelor 1H -NMR, 31 de metaboliți extracelulari au fost identificați și cuantificați relativ față de aria standardului intern. Acești metaboliți fac parte din diferite clase de compuși, precum aminoacizi esențiali și neesențiali, glucide sau acizi, fiind implicați în numeroase căi metabolice. Pentru fiecare metabolit s-a calculat diferența dintre concentrația sa relativă la sfârșitul experimentului și concentrația sa relativă în mediul proaspăt, iar această diferență a fost normalizată cu numărul final de celule obținute. Astfel, pentru fiecare metabolit în parte s-a obținut rata relativă de consum sau eliberare per celulă. În continuare, aceste profile de consum sau eliberare au fost comparate cu proba control corespunzătoare fiecărei linii.

Discuții: În toate probele, cei mai consumați metaboliți au fost glucoza și glutamina, urmate de piruvat, care a fost adăugat mediului de cultură ca o sursă adițională de energie. De asemenea, izoleucina, lizina și leucina au fost intens consumate din mediu. Datorită glicolizei aerobe specifice celulelor canceroase, glucoza și piruvatul sunt rapid convertiți în lactat, cel mai excretat metabolit pentru ambele linii celulare. Consumul ridicat de piruvat a fost asociat cu eliberarea crescută de lactat. Concentrația mare de lactat extracelular poate proveni și ca urmare a unui flux glutaminolitic intensificat, care determină și o eliberare crescută de glutamat, alanină și aspartat, după cum s-a observat în toate probele. După cum era

de așteptat, celulele MDA-MB-231 au avut un consum de glucoză mai crescut și o eliberare de lactat mai accentuată comparativ cu celulele MCF-7. După expunerea celulelor MCF-7 la IC₂₀ de Gen, Dai sau Ext, s-au observat modificări similare în ceea ce privește consumul de piruvat și eliberarea de format, ornitină și prolină, sugerând faptul că toți compușii au indus modificări la nivelul biosintezei sau degradării aminoacizilor. Expunerea la concentrații inhibitorii de Ext a condus la cele mai multe modificări metabolice comparativ cu proba control, iar majoritatea metaboliților semnificativ modificați au fost comuni tratamentului cu Gen și/sau Dai. Când celulele MCF-7 au fost expuse concentrațiilor stimulatorii (SC₂₀) de Gen, Dai sau Ext, un număr limitat de metaboliți a fost semnificativ modificat comparativ cu proba control. În cazul celulelor MDA-MB-231, tratamentul cu Gen (IC₂₀) nu a indus o modificare semnificativă a profilului metabolic, dar s-a remarcat o scădere a consumului de glucoză și glutamină. Dozele inhibitorii de Ext și Dai au indus în celulele MDA-MB-231 modificări metabolice care s-au suprapus parțial cu modificările induse de aceiași compuși, la concentrații inhibitorii, în celulele MCF-7.

Concluzii: În urma analizei ¹H-RMN, profilurile extracelulare obținute au arătat că glucoza, glutamina și piruvatul au fost metaboliții cei mai consumați, în timp ce lactatul, alanina și aspartatul au fost metaboliții cei mai eliberați. Pentru celulele MCF-7, concentrații inhibitorii (IC₂₀) ale izoflavonelor au indus modificări metabolice mai importante decât dozele stimulatorii SC₂₀. Cel mai probabil, la concentrații inhibitorii toți compușii testați afectează aceleași căi metabolice, iar modificările induse de Ext sunt cauzate, cel puțin parțial, de conținutul în Gen și/sau Dai. Asemănările observate în exometabolomul celulelor MCF-7 și MDA-MB-231 expuse la concentrații inhibitorii de izoflavone sugerează că mecanismele inhibitorii sunt parțial identice.

Studiul 3. Evaluarea metaboliților intracelulari rezultați după expunerea celulelor tumorale de sân la izoflavone

Ipoteza de lucru: Obiectivul principal al acestui studiu a fost evaluarea profilurilor intrametabolomice ale celulelor tumorale mamare MCF-7 și MDA-MB-231 după expunere la Gen, Dai sau Ext, utilizând tehnici cromatografice cuplate cu spectrometria de masă (HPLC-MS, GC-MS).

Obiectivele specifice au fost următoarele: i) evaluarea modificărilor metabolice induse de fiecare compus în parte, comparativ cu controlul ii) identificarea modificărilor metabolice apărute în caz de inhibiție sau proliferare celulară iii) identificarea modificărilor metabolice care sunt dependente de prezența receptorilor estrogenici prin compararea profilurilor metabolice a celor două linii, după expunere la același compus test, la concentrații echivalente.

Materiale și Metode: Celulele tumorale MCF-7 și MDA-MB-231 au fost cultivate în plăci de cultură pentru 24h după care au fost expuse la concentrațiile selectate anterior de Gen, Dai, Ext și la DMSO, utilizat ca solvent control. După 72h de tratament, una dintre plăci a fost utilizată pentru pregătirea probelor, iar o altă placă identică a servit la numărarea celulelor. Pentru etapele de prelucrare a probelor, abolirea metabolismului celular și extracția metaboliților s-au urmat procedurile descrise de Gierok et al (3), cu modificări minore. Pentru analiza GC-MS a metaboliților intracelulari, probele liofilizate au fost mai întâi derivatizate și apoi analizate GC-MS urmând parametrii descriși anterior (4). Pentru analiza HPLC-MS a metaboliților intracelulari, probele liofilizate au fost resolubilizate în apă ultrapură și centrifugate. Analiza HPLC-MS a fost realizată utilizând metoda și parametrii descriși anterior (4). Toate experimentele au fost efectuate în quintuplicat.

Rezultate și Discuții: În urma analizelor GC-MS și HPLC-MS, 106 metaboliți intracelulari au fost detectați în celulele MCF-7, din care 104 au fost identificați și cuantificați relativ. Pentru celulele MDA-MB-231, din cei 98 de metaboliți detectați 96 au fost identificați și cuantificați relativ față de aria standardului intern. Metaboliții identificați fac parte din diferite clase de compuși, precum aminoacizi, glucide, acizi grași sau nucleotide mono-, bi- sau trifosforilate. Diferențele majore dintre date s-au datorat în principal celor două genotipuri celulare. Pentru celulele MCF-7, cei mai mulți metaboliți modificați semnificativ după expunere la izoflavone au fost comuni tuturor compușilor test. Ext a generat cele mai multe modificări metabolice, cuprinzând metaboliții semnificativ modificați după expunere la Gen și/sau Dai. Concentrații inhibitorii a compușilor test au indus modificări la nivelul căii glicolitice, scăzând aportul intracelular de glucoză. Conform datelor existente, Gen poate limita transportul glucozei atât în mod direct, scăzând afinitatea

glucozei pentru situsul extracelular de legare a transportorilor de glucoză GLUT1 (5) precum și prin modularea căilor de semnalizare responsabile pentru reglarea GLUT1, precum calea fosfatidilinozitol 3-kinaza Akt (PI3K/Akt) (6) sau factorul inductibil prin hipoxie (HIF-1) (7). După expunerea celulelor MCF-7 la concentrații stimulatorii de izoflavone, a avut loc o creștere a nivelelor de 6-fosfogluconat și riboză 5-fosfat, sugerând faptul că glucozo-6-fosfatul este parțial redirectionat către calea pentozofosfat (PPP). Modificări similare au fost descrise în urma expunerii celulelor MCF-7 la estradiol (8). Întrucât izoflavonele sunt compuși estrogen-like, este foarte probabil ca efectele lor stimulatorii să inducă aceleași modulări metabolice. Pentru celulele MDA-MB-231, doze inhibitorii de izoflavone au determinat modificări ale metaboliților glicolitici comparabile cu cele observate în celulele MCF-7. În primul rând, concentrația intracelulară de glucoză a scăzut comparativ cu controlul, mai ales după expunere la Gen. Similar, alte două flavonoide, quercetina și epigallocatechin galatul, au demonstrat capacitatea de a bloca transportorii GLUT1, restricționând aportul intracelular de glucoză, independent de expresia receptorilor estrogenici (9). Prin urmare, mecanismele de inhibare a glucozei par a fi independente de prezența receptorilor estrogenici. În plus, în celulele MDA-MB-231 s-a observat și o reducere a concentrației de glutamină. Această reducere se datorează, cel mai probabil, modulării căilor de reglare a expresiei transportorilor de glutamină ASCT-2, decât unei blocări directe a acestora. Studii suplimentare sunt necesare pentru investigarea exactă a impactului izoflavonelor asupra transportorilor de glutamină și a metabolismului glutaminei.

Concluzii: În urma analizei metaboliților intracelulari a fost confirmat faptul că cei mai mulți metaboliți semnificativ modificați au fost comuni tuturor compușilor test, sugerând faptul că modificările metabolice induse de izoflavone sunt comune, iar efectele Ext se datorează, cel puțin parțial, conținutului în Gen și/sau Dai. După expunerea celulelor MCF-7 la concentrații joase de izoflavone (SC_{20}), o parte din glucozo-6-fosfat pare a fi redirectionat către calea PPP, generând astfel mai multe riboze și NADPH pentru creșterea celulară. Expunerea ambelor tipuri celulare la concentrații mari de izoflavone (IC_{20}) a condus la restricționarea aportului intracelular de glucoză, principala sursă de energie pentru celule. Influxul de glucoză a fost mai puternic restricționat în celulele MCF-7 decât în celulele MDA-MB-231. În schimb, în celulele MDA-MB-231 s-a observat o scădere a concentrației intracelulare de glutamină. Întrucât celulele MDA-MB-231 sunt considerate "glutamin dependente", aportul defectuos de glutamină, corelat cu scăderea concentrației intracelulare de glucoză pot determina modificări importante la nivelul biosintezei proteice, contribuind la moartea celulară.

Studiul 4. Influența izoflavonelor din soia asupra principalelor citokine implicate în angiogeneză

Ipoteza de lucru: Scopul acestui studiu a fost evaluarea proprietăților antiangiogenetice ale Gen, Dai și Ext asupra celulelor MCF-7 și MDA-MB-231, prin măsurarea concentrației a 30 de citokine implicate în angiogeneză, utilizând o matrice ELISA pe suport de sticlă.

Materiale și Metode: Pentru cuantificarea celor 30 de citokine implicate în procesul de angiogeneză s-a utilizat o matrice multiplex ELISA pe suport de sticlă cu detecție de fluorescență. Pentru cuantificare, s-a utilizat un mix de standarde de citokine cu concentrație predeterminată, care a servit la generarea curbelor de calibrare pentru fiecare citokină în parte. Celulele tumorale MCF-7 și MDA-MB-231 au fost cultivate în plăci de cultură pentru 24h după care au fost expuse la concentrațiile selectate anterior de Gen, Dai, Ext și la DMSO, utilizat ca solvent control pentru 72h. În continuare, 1.5mL de mediu de cultură a fost centrifugat, iar supernatantul a fost păstrat la $-80^{\circ}C$ până la efectuarea determinărilor. Pentru prelucrarea probelor și utilizarea matricilor ELISA s-a urmat protocolul de lucru recomandat de către producător (10).

Rezultate: Expunerea celulelor MCF-7 la concentrații mici (SC_{20}) de izoflavone a determinat o creștere a concentrației ligandului 16 al chemokinei motif C-X-C (CXCL16), creșterea fiind semnificativă statistic pentru Gen și Dai. Totodată, expunerea la aceleași concentrații de izoflavone a cauzat o creștere a concentrației factorului vascular endotelial de creștere A (VEGF-A), creșterea fiind semnificativă statistic pentru Gen și Ext. Pentru celulele MDA-MB-231, concentrații inhibitorii ale izoflavonelor au determinat o scădere a concentrației VEGF-A, scăderea fiind semnificativă statistic pentru Dai și Ext.

Discuții: CXCL16 aparține superfamiliei de citokine chemotactice cu rol esențial în mobilitatea celulelor sistemului imun, cum ar fi migrarea celulară pentru dezvoltarea celulelor imune, în inflamație, creștere tumorală, invazie, angiogeneză și metastazare. Mecanismele propuse pentru explicarea efectelor proliferative ale CXCR6/CXCL16 în cancerul de sân implică fie activarea căii ERK1/2, fie proprietățile estrogenice manifestate de izoflavone la concentrații mici. VEGF-A este un pion central în procesul de angiogeneză, stimularea receptorilor pentru VEGF-A activând numeroase căi de semnalizare care promovează creșterea, migrarea și expansiunea celulară. În celulele MCF-7, tratamentul cu izoflavone în concentrații mici mimează din nou acțiunea estrogenică, stimulând secreția de VEGF-A. Întrucât VEGF-A stimulează proliferarea celulară, reglarea pozitivă a secreției de VEGF-A ar putea contribui la efectele de stimulare celulară observate în urma tratamentului cu izoflavone (SC₂₀). În schimb, în celulele MDA-MB-231, concentrații inhibitorii (IC₂₀) de Dai sau Ext au determinat scăderea secreției de VEGF-A.

Concluzii: În celulele MCF-7, izoflavonele în concentrații stimulatorii au determinat o creștere a secreției de CXCL16 și VEGF-A, două citokine cu rol de promotor al angiogenezei și metastazării în cancerul de sân. Prin urmare, stimularea secreției acestora ar putea reprezenta unul dintre mecanismele ce stau la baza efectului proliferativ al izoflavonelor din soia în celulele MCF-7. Pe de altă parte, concentrații inhibitorii au determinat diminuarea secreției de VEGF-A în celulele estrogen independente. Inhibarea expresiei VEGF reprezintă una dintre potențialele strategii de tratament, mai ales pentru cancerul "triplu negativ", acest subtip fiind lipsit până în acest moment de o terapie specifică și având cel mai rezervat prognostic.

Concluzii generale

Scopul general al celor patru studii a fost investigarea mecanismelor celulare și metabolice induse de diferite izoflavone din soia (genisteină, daidzeină și un extract obținut din semințe de soia), la diferite nivele de concentrații, pe linii celulare din cancer de sân, estrogen dependente (MCF-7) și estrogen independente (MDA-MB-231).

În primul studiu, s-a evaluat potențialul citotoxic al izoflavonelor din soia asupra liniilor tumorale selectate, utilizând testul MTT de viabilitate celulară. Rezultatele au confirmat efectul dual, atât de stimulare, cât și de inhibare a creșterii celulare a compuşilor test asupra celulelor estrogen dependente și efectele inhibitorii observate în cazul celulelor estrogen-independente.

În studiile doi și trei s-au evaluat profilurile metabolice rezultate în urma tratamentului cu izoflavone, din perspectivă metabolomică. S-a urmărit evaluarea globală, atât a metaboliților extracelulari, cât și a celor intracelulari. În acest scop, s-au utilizat tehnici complementare precum ¹H-RMN, GC-MS și LC-MS. Prin identificarea și cuantificarea a diferiți metaboliți, s-a realizat reconstrucția căilor metabolice afectate de tratamentul cu izoflavone.

În cel de-al patrulea studiu s-a urmărit modul în care izoflavonele pot influența procesul de angiogeneză în liniile tumorale de sân, prin evaluarea expresiei a 30 de citokine implicate în angiogeneză utilizând o metodă modernă bazată pe o matrice sandwich ELISA pe suport de sticlă cu detecție de fluorescență.

Toate studiile aduc contribuții importante referitoare la mecanismele izoflavonelor din soia în cancerul de sân, oferind o imagine cuprinzătoare a modificărilor celulare și metabolice induse de acestea în celulele estrogen dependente și estrogen independente.

Originalitatea și caracterul inovativ al tezei

Toate studiile incluse în teza de față au design-uri individuale originale care servesc împreună scopului principal al tezei, acela de a investiga mecanismele celulare și metabolice ale celulelor tumorale de sân după expunere la diferite izoflavone din soia.

În primul studiu s-a urmărit evaluarea potențialului citotoxic al izoflavonelor utilizând un test validat de viabilitate celulară. În urma acestui studiu, au fost selectate concentrațiile test pentru următoarele studii. Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care utilizează concentrații specifice (IC₂₀, SC₂₀) pentru fiecare compus în parte pentru a obține efecte comparabile. Utilizând concentrații egale pentru

fiecare compus ar fi condus la rezultate predictibile, dată fiind afinitatea și potența estrogenică diferită a izoflavonelor.

Studiile doi și trei au avut ca scop investigarea modificărilor metabolice induse de izoflavone la diferite nivele de concentrație. În acest scop, a fost utilizat, pentru prima dată, un studiu metabolomic global, în care au fost evaluați atât metaboliții intracelulari cât și cei extracelulari, utilizând două linii tumorale din cancer de sân. În acest scop, s-au utilizat tehnici complementare precum ¹H-RMN, GC-MS și LC-MS, împreună oferind o imagine de ansamblu privind modificările metabolice induse de izoflavone în liniile tumorale de sân.

Studiul patru a avut ca scop evaluarea potențialului antiangiogenetic al izoflavonelor asupra principalelor citokine implicate în angiogeneză. Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care a evaluat potențialul unor compuși naturali utilizând o matrice multiplex ELISA ce permite cuantificarea simultană a 30 de citokine implicate în angiogeneză.

Toate studiile reprezintă puncte de plecare către idei noi de cercetare pentru exploatarea multipleror mecanisme chemopreventive ale izoflavonelor din soia în cancerul de sân.

Bibliografie selectivă

1. Uifalean A, Schneider S, Ionescu C, Lalk M, Iuga CA. Soy Isoflavones and Breast Cancer Cell Lines: Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *Molecules*. 2015;21(1).
2. Dorries K, Lalk M. Metabolic footprint analysis uncovers strain specific overflow metabolism and D-isooleucine production of *Staphylococcus aureus* COL and HG001. *PloS one*. 2013;8(12):e81500.
3. Gierok P, Harms M, Richter E, Hildebrandt JP, Lalk M, Mostertz J, et al. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin mediates general and cell type-specific changes in metabolite concentrations of immortalized human airway epithelial cells. *PloS one*. 2014;9(4):e94818.
4. Dorries K, Schlueter R, Lalk M. Impact of antibiotics with various target sites on the metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(12):7151-63.
5. Perez A, Ojeda P, Ojeda L, Salas M, Rivas CI, Vera JC, et al. Hexose transporter GLUT1 harbors several distinct regulatory binding sites for flavones and tyrphostins. *Biochemistry*. 2011;50(41):8834-45.
6. Chen J, Duan Y, Zhang X, Ye Y, Ge B, Chen J. Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Food & function*. 2015;6(3):995-1000.
7. Gacche RN, Shegokar HD, Gond DS, Yang Z, Jadhav AD. Evaluation of Selected Flavonoids as Antiangiogenic, Anticancer, and Radical Scavenging Agents: An Experimental and In Silico Analysis. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2011;61(3):651-63.
8. Forbes NS, Meadows AL, Clark DS, Blanch HW. Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis. *Metab Eng*. 2006;8(6):639-52.
9. Moreira L, Araujo I, Costa T, Correia-Branco A, Faria A, Martel F, et al. Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental cell research*. 2013;319(12):1784-95.
10. RayBiotech webpage - Quantibody Human Angiogenesis Array Q3 [Available from: <http://www.raybiotech.com/quantibody-human-angiogenesis-array-3-1-slide.html>.]

Summary of the PhD Thesis

Cellular and metabolic studies in breast
cancer cell lines after exposure to
isoflavones

PhD Student: **Alina Brad (Uifălean)**

Scientific supervisor: **Prof. Corina Ionescu, PhD**

Cluj-Napoca 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
REVIEW OF THE LITERATURE	17
1. Breast cancer	19
1.1. Incidence and epidemiology	19
1.2. Molecular subtypes	20
1.3. The metabolic reprogramming in breast cancer	22
1.4. Metabolomics in breast cancer research	29
2. Soy isoflavones in breast cancer chemoprevention	31
2.1. Soy consumption and nutritional value	31
2.2. Soy isoflavones: pharmacokinetics and estrogenic potency	32
2.3. <i>In vitro</i> cellular mechanisms	35
2.4. <i>In vitro</i> metabolic mechanisms	44
PERSONAL CONTRIBUTIONS	45
1. Working hypothesis/objectives	47
2. General methodology	47
2.1. Cell lines and culture conditions	48
2.2. Materials and reagents	50
3. Study 1. Evaluation of the cytotoxic potential of soy isoflavones on breast cancer cells	51
3.1. Introduction	51
3.2. Work hypothesis	52
3.3. Materials and methods	52
3.4. Results	54
3.5. Discussions	55
3.6. Conclusions	58
4. Study 2. Exometabolome analysis of breast cancer cells exposed to isoflavones	59
4.1. Introduction	59
4.2. Work hypothesis	60
4.3. Materials and methods	60
4.4. Results	62
4.5. Discussions	64
4.6. Conclusions	67
5. Study 3. Endometabolome analysis of breast cancer cells exposed to isoflavones	69
5.1. Introduction	69
5.2. Work hypothesis	70
5.3. Materials and methods	70
5.4. Results and Discussions	74

4.6. Conclusions	88
6. Study 4. Influence of soy isoflavones on the main cytokines involved in angiogenesis	89
6.1. Introduction	89
6.2. Work hypothesis	90
6.3. Materials and methods	90
6.4. Results	95
6.5. Discussions	96
6.6. Conclusions	99
7. General discussions	101
8. General conclusions	103
9. Originality and innovative contributions of the thesis	105
REFERENCES	107
ANNEXES	119

KEYWORDS: soy isoflavones, genistein, daidzein, breast cancer, chemoprevention, *in vitro*, MCF-7 cells, MDA-MB-231 cells, metabolomics, ¹H-NMR, GC-MS, LC-MS, angiogenesis, multiplexed sandwich ELISA-based array

INTRODUCTION

Breast cancer is the second most common cancer in the world and, by far, the most frequent cancer among women. Although current treatment strategies have led to substantial decline in breast cancer mortality, the chemotherapy side effects and resistance continue to be important millstones. In this light, breast cancer approaches are being reconsidered and special attention is given to metabolic reprogramming, an acknowledged hallmark of cancer. The thorough and comprehensive analysis of tens of metabolites represent the main task of metabolomics, the youngest member of the “-omics” family. Moreover, the metabolomic perspective over breast cancer is supported by the improvements of metabolomics technologies, such as proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$), liquid or gas chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS or GC-MS).

So far, different natural compounds have been investigated as promising anti-cancer agents, with tremendous potential in chemoprevention and chemotherapy. One example is soy (*Glycine max*) isoflavones, extensively studied over the past 20 years. The cytotoxic potential of soy isoflavones has been explored mainly in breast cancers, where the dose dependent effects of soy isoflavones have raised many controversies. Although gene and protein expression have been profiled in breast cancer cells after isoflavone exposure, little is known about the metabolic alterations that characterize their effects.

Therefore, the general objective of the thesis was to investigate the cellular (cytotoxic and anti-angiogenic) and metabolic mechanisms of different soy isoflavones, at inhibitory and stimulatory growth concentrations, using an estrogen responsive (MCF-7) and an estrogen non-responsive (MDA-MB-231) breast cancer cell line.

The specific objectives were the following: i) to assess the basic toxic potential of soy isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines using a cell viability assay and to get insight into the metabolic alterations that triggered their effects using a global (intracellular and extracellular) metabolomic approach ii) to evaluate the anti-angiogenic properties of soy isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 cells using a multiplex sandwich ELISA-based quantitative array.

The present thesis is structured in two main parts: the current state of knowledge, presenting the cutting-edge findings related to breast cancer metabolomics and soy isoflavones and the part of personal contributions, composed of four studies, which closely describe all the performed experiments along with data interpretation and discussions.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1. Evaluation of the cytotoxic potential of soy isoflavones on breast cancer cells

Work hypothesis: The aim of the present study was to evaluate the basic toxic potential (IC_{50} , IC_{20} , SC_{20}) of genistein (Gen), daidzein (Dai) and a soy seed extract (Ext) on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines, by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Materials and Methods: MCF-7 and MDA-MB-231 cells were plated in 96-well plates and incubated for 24h to allow attachment and grow. Next, the cells were incubated in medium containing serial dilutions of Gen, Dai (1.56-100 μM) or Ext (6.25-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A blank control (medium only), a solvent control (DMSO 0.4%) and a positive control (the IC_{50} of Etoposide corresponding to each cell line) were included in every plate. Each treatment had eight replicate wells per plate. After 72h incubation, the cells were incubated with medium containing 0.5mg/mL MTT. The resultant formazan crystals were dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 550nm. Each experiment was repeated four times. Every treatment was compared to the corresponding solvent control according to one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-comparison test.

Results: All test compounds induced a biphasic effect on estrogen responsive MCF-7 cells. At relatively low concentrations (1.56-13.06 μM for Gen, 1.56-34.28 μM for Dai and 6.25-67.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Ext), isoflavones stimulated the cell growth compared to control, while higher concentrations had an inhibitory effect. For MDA-MB-231 cells, only a dose-dependent inhibitory effect was observed. Moreover, the same isoflavone concentrations caused a greater inhibitory effect in MDA-MB-231 cells compared to MCF-7

cells. Based on dose-response curves, the concentrations of test compounds were selected for the continuing experiments. For MCF-7 cells, the test concentrations that resulted in a 20% higher proliferation compared to control (SC_{20}) and the test concentrations that inhibit cell growth by 20% compared to control (IC_{20}) were selected. For MDA-MB-231 cells, only the IC_{20} concentrations were selected.

Discussions: The MTT test is a cell viability assay based on the capacity of NAD(P)H-dependent oxidoreductase enzymes from viable cells to reduce the yellow MTT to purple formazan, which can be quantified spectrophotometrically. The proliferative effects of isoflavones, observed in MCF-7 cells, at low exposure doses, are believed to be estrogen receptor mediated, as isoflavones display structural and functional similarities to 17- β -estradiol. The antiproliferative effects of isoflavones, observed at high doses, are considered to be ER independent and are mostly attributed to the proapoptotic, anti-angiogenetic and antioxidant properties of isoflavones (1). MDA-MB-231 cells proved to be more responsive than MCF-7 cells, since the same isoflavone concentrations caused a greater inhibitory effect in MDA-MB-231 cells. Gen demonstrated the highest activity, followed by Dai and Ext. The Ext doses were the highest, most probably due to its high amount of isoflavone glycosides or esterified glycosides.

Conclusions: All test compounds displayed a biphasic effect on estrogen responsive MCF-7 cells, low concentrations promoting cell growth, while high concentrations induced a dose-dependent effect. For MDA-MB-231, an estrogen non-responsive cell line, only a dose-dependent effect was observed. Understanding the two fold effect of isoflavones represents an essential step for the continuing experiments, which will offer an in depth analysis of isoflavones inhibitory or stimulatory effects.

Study 2. Exometabolome analysis of breast cancer cells exposed to isoflavones

Work hypothesis: The aim of the present study was to evaluate the exometabolome profiles of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to Gen, Dai or Ext, by using 1H -NMR spectroscopy.

Materials and Methods: MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells were seeded in complete growth medium. After 24h incubation the medium was replaced with fresh medium containing the selected concentrations of Gen, Dai, Ext or DMSO as solvent control. After 72h incubation, one plate was used for subsequent sampling experiments and one served for cell counting. For sampling, 1.5mL of fresh and conditioned medium were filtered and immediately frozen. For the analysis of extracellular metabolites, 1H -NMR analysis was performed using the method described before (2). All experiments were performed in quintuplicate.

Results: Following 1H -NMR analysis, 31 extracellular metabolites were identified and relatively quantified to the area of internal standard. These metabolites belong to various chemical classes, such as essential and non-essential amino acids, sugars or acids and are involved in different metabolic pathways. For each metabolite, the difference in relative concentration from conditioned to fresh medium was calculated and normalized to the yielded cell number. Based on these, the net balances representing the metabolite consumption or release rates/cell were obtained for each treatment condition. Next, we related the extracellular metabolite profiles of each treated sample to the solvent control of the respective cell line.

Discussions: In all samples, the most consumed metabolites were glucose and glutamine. The next most consumed nutrient was pyruvate, which was added to the medium as an additional energy source. Isoleucine, lysine and leucine were also highly consumed by all cells. Due to the increased aerobic glycolysis specific to cancerous cells, glucose and pyruvate are largely converted to lactate, the most secreted metabolite. The extracellular lactate can originate also from the intensified glutaminolytic flux, which is accompanied by high glutamate, alanine and aspartate release, as observed in all samples. As expected, MDA-MB-231 cells displayed higher glucose consumption and higher lactate secretion compared to MCF-7 cells. After exposure to IC_{20} of Gen, Dai or Ext, similar changes in pyruvate uptake and formate, ornithine and proline release were observed, suggesting that similar pathways in amino acid biosynthesis or degradation were affected. The enhanced pyruvate uptake was associated with increased lactate release. Exposure to IC_{20} of Ext generated most of significantly changed metabolites, comprising

the metabolites induced by Gen or/and Dai. When MCF-7 cells were exposed to SC₂₀ of Gen, Dai or Ext only few metabolites were significantly changed compared to control. For MDA-MB-231 cells, no significant alteration was seen following Gen treatment (IC₂₀), but we remarked a decrease in glucose and glutamine consumption. IC₂₀ of Ext and Dai induced distinct changes that partially superposed with the exometabolome changes which occurred in MCF-7 cells after exposure to the same test concentrations.

Conclusions: The extracellular profiles of net fluxes obtained by ¹H-NMR analysis showed that glucose, glutamine and pyruvate were the most consumed metabolites, while lactate, alanine and aspartate were the most released metabolites. For MCF-7 cells, IC₂₀ of test compounds induced greater alterations in the extracellular metabolome than SC₂₀. Most likely, IC₂₀ of all test compounds alter the same metabolic pathways and the inhibitory effects of Ext are caused, at least partly, to the Gen or/and Dai content. Similarities in the exometabolome profiles of MCF-7 and MDA-MB-231 cells when exposed to IC₂₀ of test compounds suggest that, at least partially, the molecular mechanisms that inhibit the cell growth are identical.

Study 3. Endometabolome analysis of breast cancer cells exposed to isoflavones

Work hypothesis: The main objective of the study was to evaluate the endometabolome profiles of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to Gen, Dai or Ext, by using GC-MS and HPLC-MS.

The specific objectives were the following: i) to evaluate the specific metabolomic changes induced by each test compound, in relation to control ii) to identify which metabolic modulations are specific to breast cancer cell inhibition or proliferation, and iii) to identify which modulations are dependent on the estrogen receptors, by comparing the metabolome of MCF-7 cells to the metabolome of MDA-MB-231, exposed to the same test compound, at equivalent concentrations.

Materials and Methods: MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells were seeded in cell culture dishes in complete growth medium. After 24h incubation, the medium was replaced with fresh medium containing the selected concentrations of Gen, Dai, Ext or DMSO as solvent control. After 72h incubation, one plate was used for subsequent sampling experiments and one served for cell counting. For cell sampling, quenching and extraction steps followed the procedures described by Gierok et al (3), with minor modifications. For the GC-MS analysis of intracellular metabolites, the lyophilized samples were first derivatized, as described (4), and the GC-MS analysis was carried out using the parameters previously established (4). For the HPLC-MS analysis of intracellular metabolites, the lyophilized samples were dissolved in ultrapure water and centrifuged. HPLC-MS analysis was performed using the method and the parameters previously described (4). All experiments were performed in quintuplicate.

Results and Discussions: By using both GC-MS and HPLC-MS methods, 106 intracellular metabolites were detected in MCF-7 cells, of which 104 were identified and relatively quantified. For MDA-MB-231 cells, 96 out of 98 intracellular metabolites were identified and relatively quantified. The quantified metabolites belong to various chemical classes, including amino acids, sugars, fatty acids or mono-, di-, and tri- phosphorylated nucleotides. The major differences within the data were clearly attributed to the two genotypes. For MCF-7 cells, most of the significantly changed metabolites were common to all test compounds. The Ext generated most of the significantly changed metabolites, comprising the metabolites induced by Gen and/or Dai. Inhibitory concentrations of test compounds caused alteration in the glycolytic pathway, decreasing glucose uptake. Apparently, Gen can decrease glucose uptake in breast cancers, acting either directly, by decreasing the affinity of glucose for the external binding site of glucose transport, GLUT1 (5), or by modulating the signaling pathways responsible for GLUT1 regulation, such as the phosphatidylinositol 3-kinase Akt (PI3K/Akt) pathway (6) or the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)(7).

Exposing MCF-7 cells to SC₂₀ of test compounds increased 6-phosphogluconate and ribose 5-phosphate levels, suggesting that glucose 6-phosphate is partially redirected towards the pentose phosphate pathway (PPP). Similar modulations were described after MCF-7 cells were exposed to estradiol (8). As isoflavones are estrogen-like compounds, it is likely that their growth promoting effects induce the same metabolic changes. For MDA-MB-231 cells, IC₂₀ of test compounds triggered comparable alterations in the glycolytic pathway as for MCF-7 cells. Foremost, the concentration of intracellular glucose decreased

compared to control, especially following Gen treatment. Two other flavonoids, quercetin and epigallocatechin gallate, have shown to inhibit GLUTs-mediated uptake of glucose in breast cancer cells, independently of estrogen signaling (9). Therefore, the glucose inhibitory mechanisms of isoflavones appear to be ER-independent. Moreover, a significant decrease in glutamine uptake was observed for MDA-MB-231 cells. The decreased glutamine concentration observed in our study is, most likely, due to the modulation of more upstream regulators, rather than a direct inhibition of ASCT-2 glutamine transporters. Further studies are needed to investigate the specific impact of isoflavones on ASCT-2 transporters and glutamine metabolism.

Conclusions: Intracellular data confirmed that most of the altered metabolites are common to all test compounds, suggesting that the metabolic pathways affected by isoflavones were communal and the metabolic effects of the soy seed extract are in fact, due to the Gen and Dai content. Exposure of MCF-7 cells to low isoflavone doses (SC_{20}) seem to redirect a part of glucose-6-phosphate towards PPP, ensuring cells with more ribose sugars and NADPH. Exposing MCF-7 and MDA-MB-231 cells to high isoflavones doses (IC_{20}) led to a deficient glucose uptake, depriving cells of their main energy source. The glucose influx was restricted more in MCF-7 cells than in MDA-MB-231 cells. Instead, the glutamine uptake was significantly inhibited only in MDA-MB-231 cells. As MDA-MB-231 cells are considered “glutamine addicted”, an impaired glutamine uptake, correlated with a defective glucose import led to alterations of protein biosynthesis and contributed to cell death.

Study 4. Influence of soy isoflavones on the main cytokines involved in angiogenesis

Work hypothesis: The aim of this study was to evaluate the anti-angiogenic properties of Gen, Dai and Ext on MCF-7 and MDA-MB-231 cells by measuring the concentration of 30 cytokines involved in angiogenesis using a glass slide ELISA-based array.

Materials and Methods: For the quantification of the angiogenesis related cytokines, a multiplex sandwich ELISA-based glass slide platform with fluorescence detection was used. This array allows the identification and quantification of 30 cytokines involved in angiogenesis. For cytokine quantification, specific cytokine array standards with predetermined concentration were provided to generate standard curves for each cytokine. For cell treatment, MCF-7 cells or MDA-MB-231 cells were seeded in cell culture dishes in complete growth medium and incubated for 24h. Next, the medium was replaced with fresh medium containing the selected concentrations of Gen, Dai, Ext or DMSO as solvent control. For sampling, 1.5mL conditioned medium were centrifuged and the supernatant was immediately frozen at $-80^{\circ}C$ until measurement. The cytokine array was conducted according to manufacturer recommended protocol (10).

Results: Exposing MCF-7 cells to SC_{20} of isoflavones resulted into an increase of C-X-C motif chemokine ligand 16 (CXCL16) level. This increase was statistically significant for Gen and Dai. The same treatment caused an increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) signal intensity, which was statistically significant for Gen and Ext. For MDA-MB-231 cells, IC_{20} of isoflavones triggered an important decrease in the VEGF-A signal intensity.

Discussions: CXCL16 belongs to the superfamily of chemotactic cytokines and has an essential role in immune cell movements, such as the cell migration for immune cell development, in inflammation, tumor growth, invasion, angiogenesis and metastasis. The mechanisms proposed for explaining the proliferative effects of isoflavones on CXCR6/CXCL16 can involve either the activation of ERK1/2 signaling pathway or imply the estrogenic effects of low isoflavones doses. VEGF-A is a well-known player in the process of tumor angiogenesis and activation of the VEGF-receptor pathway triggers a network of signaling processes that promote cell growth, migration and survival from pre-existing vasculature. In MCF-7 cells, low isoflavone doses seem to mimic again the estrogen action, stimulating the secretion of VEGF-A. As VEGF-A promotes cell proliferation, upregulation of VEGF-A secretion could be one of the mechanisms explaining the proliferative effects of isoflavones. In return, in MDA-MB-231 cells, IC_{20} of Dai and Ext triggered VEGF-A decrease. Inhibition of VEGF expression is one of the potential treatment strategies especially in the triple negative breast cancer, the cancer subtype that lacks any targeted therapy and with the worst prognosis among all breast cancer subtypes.

Conclusions: In MCF-7 cells, SC_{20} of isoflavones are capable of stimulating CXCL16 and VEGF-A, two promoters of angiogenesis and metastasis in breast cancer. Therefore, the stimulation of these two angiogenesis-related cytokines could represent one of the mechanisms explaining the proliferative effects of soy isoflavones in MCF-7 cells. On the other hand, IC_{20} of isoflavones inhibited VEGF-A secretion in MDA-MB-231 cells. As these cells belong to the “triple negative” subtype, the anti-angiogenetic properties of isoflavones could be further exploit as an effective chemopreventive strategy.

General conclusions

The purpose of our studies was to investigate both cellular and metabolic mechanisms of different soy isoflavones (genistein, daidzein and a soy seed extract), at different concentration levels, on estrogen responsive and non-responsive breast cancer cell lines.

In the first study, we evaluated the basic toxic potential of soy isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines using MTT test, a validated viability assay. The results confirmed the two fold effects of isoflavones on estrogen responsive cells and the dose-dependent effects on estrogen non-responsive cells. The second and the third study evaluated the metabolic alterations triggered by isoflavones using a global (intracellular and extracellular) metabolomic approach. For this, complementary techniques such as 1H -NMR, LC-MS and GC-MS were performed. By measuring the expression of dozen of metabolites, we retraced the metabolic pathways that were altered or upregulated following isoflavone exposure.

In the fourth study, we investigated how isoflavones can regulate the angiogenesis process, by assessing the expression of 30 cytokines involved in angiogenesis using a modern multiplexed sandwich ELISA-based quantitative array.

All studies contribute together to the current knowledge, offering a comprehensive assessment of the cellular and metabolic alterations induced by isoflavones in breast cancer cells.

Originality and innovative contributions of the thesis

The studies included in the present doctoral thesis have individual designs, but they all uphold the common purpose of investigating the cellular and metabolic effects of isoflavones in breast cancer cells.

In the first study, we assessed the basic toxic potential of isoflavones using a validated cell viability assay. Following this study, we established the test concentrations that will be used in the further studies. To our knowledge, this is the first study to use specific concentrations (IC_{20} and SC_{20} , respectively) for each test compound in order to obtained comparable effects. Using equal $\mu g/mL$ concentrations for each test compound would have led to expected different results, impossible to compare, as isoflavones have proved different binding capacities and estrogenic potencies.

In the second and third study we aimed to investigate the metabolic alterations induced by isoflavones at different test concentrations. For this purpose, we implied, for the first time, a global metabolomic approach, tackling both extracellular and intracellular metabolites, using two different breast cancer cell lines, an estrogen responsive one and an estrogen non-responsive one. In order to complete this task, we used complementary technologies such as 1H -NMR, HPLC-MS and GC-MS, all offering a comprehensive overview of the metabolic alterations induced by isoflavones in breast cancer cells.

In the fourth study, we aimed to evaluate the anti-angiogenetic potential of soy isoflavones on the main cytokines involved in angiogenesis. For this purpose, we used a modern multiplexed sandwich ELISA-based quantitative array that allows identification and quantification of 30 cytokines involved in angiogenesis. To date, this is the first study to test the anti-angiogenetic potential of a natural compound on breast cancer cells using this approach.

All studies provide starting points for new research idea that could exploit the multiple molecular mechanisms of isoflavones into a powerful weapon in breast cancer chemoprevention.

Selective references

1. Uifalean A, Schneider S, Ionescu C, Lalk M, Iuga CA. Soy Isoflavones and Breast Cancer Cell Lines: Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *Molecules*. 2015;21(1).
2. Dorries K, Lalk M. Metabolic footprint analysis uncovers strain specific overflow metabolism and D-isoleucine production of *Staphylococcus aureus* COL and HG001. *PloS one*. 2013;8(12):e81500.
3. Gierok P, Harms M, Richter E, Hildebrandt JP, Lalk M, Mostertz J, et al. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin mediates general and cell type-specific changes in metabolite concentrations of immortalized human airway epithelial cells. *PloS one*. 2014;9(4):e94818.
4. Dorries K, Schlueter R, Lalk M. Impact of antibiotics with various target sites on the metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(12):7151-63.
5. Perez A, Ojeda P, Ojeda L, Salas M, Rivas CI, Vera JC, et al. Hexose transporter GLUT1 harbors several distinct regulatory binding sites for flavones and tyrphostins. *Biochemistry*. 2011;50(41):8834-45.
6. Chen J, Duan Y, Zhang X, Ye Y, Ge B, Chen J. Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Food & function*. 2015;6(3):995-1000.
7. Gacche RN, Shegokar HD, Gond DS, Yang Z, Jadhav AD. Evaluation of Selected Flavonoids as Antiangiogenic, Anticancer, and Radical Scavenging Agents: An Experimental and In Silico Analysis. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2011;61(3):651-63.
8. Forbes NS, Meadows AL, Clark DS, Blanch HW. Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis. *Metab Eng*. 2006;8(6):639-52.
9. Moreira L, Araujo I, Costa T, Correia-Branco A, Faria A, Martel F, et al. Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental cell research*. 2013;319(12):1784-95.
10. RayBiotech webpage - Quantibody Human Angiogenesis Array Q3 [Available from: <http://www.raybiotech.com/quantibody-human-angiogenesis-array-3-1-slide.html>.]