



Modeling & Simulation
Decisions

XII КОНФЕРЕНЦИЯ ПО МАТЕМАТИЧЕСКИМ МОДЕЛЯМ И
ЧИСЛЕННЫМ МЕТОДАМ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Москва, 2-3 ноября 2020

Компьютерные методы медицинской системной биологии в исследовании функционирования NRF2-KEAP1 антиоксидантной системы в клеточных линиях рака яичников

АН Гольцов

alexry.goltsov@gmail.com

Московский технологический университет (МИРЭА), MS Decisions, Москва

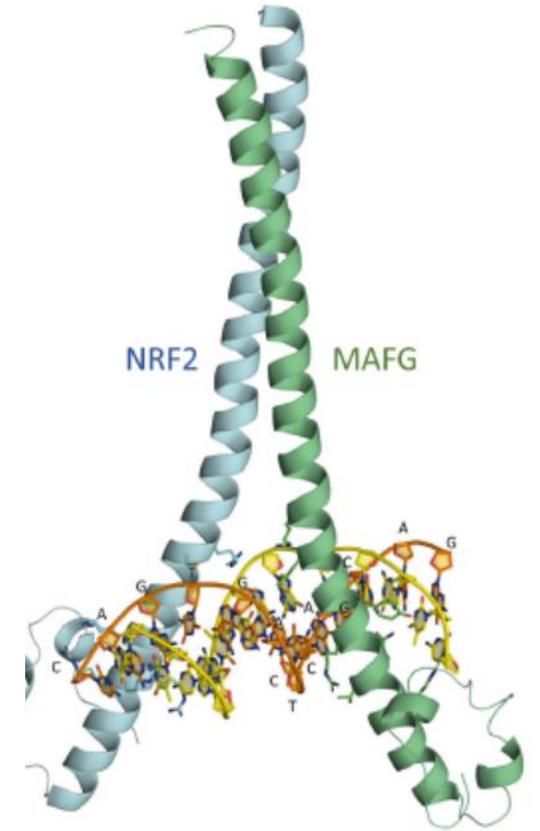
J. Bown

Abertay University, Dundee, United Kingdom,

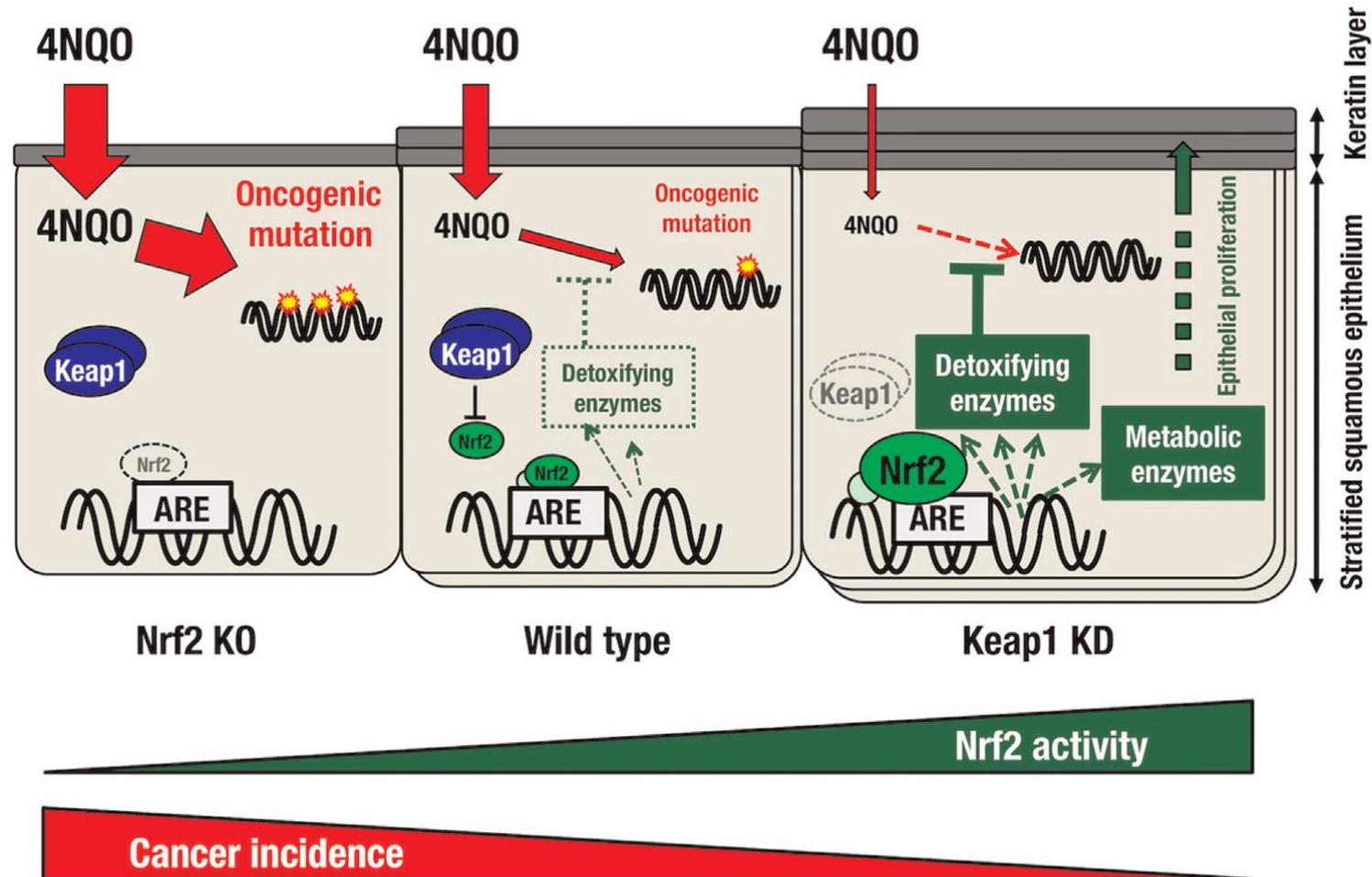
Y. Deeni

СОДЕРЖАНИЕ

- Цель исследования: роль окислительного стресса в развитии патологии и онкотерапии
- Метод системной биологии в разработке математических моделей клеточных сигнальных систем
- Модели функционирования NRF2-KEAP1 антиоксидантной системы
- Комбинация лабораторных и *in silico* экспериментов в исследовании NRF2-KEAP1 антиоксидантной системы в раковых клетках
- Разработка, калибровка и валидация модели на основе экспериментальных данных
- Выводы и перспективы

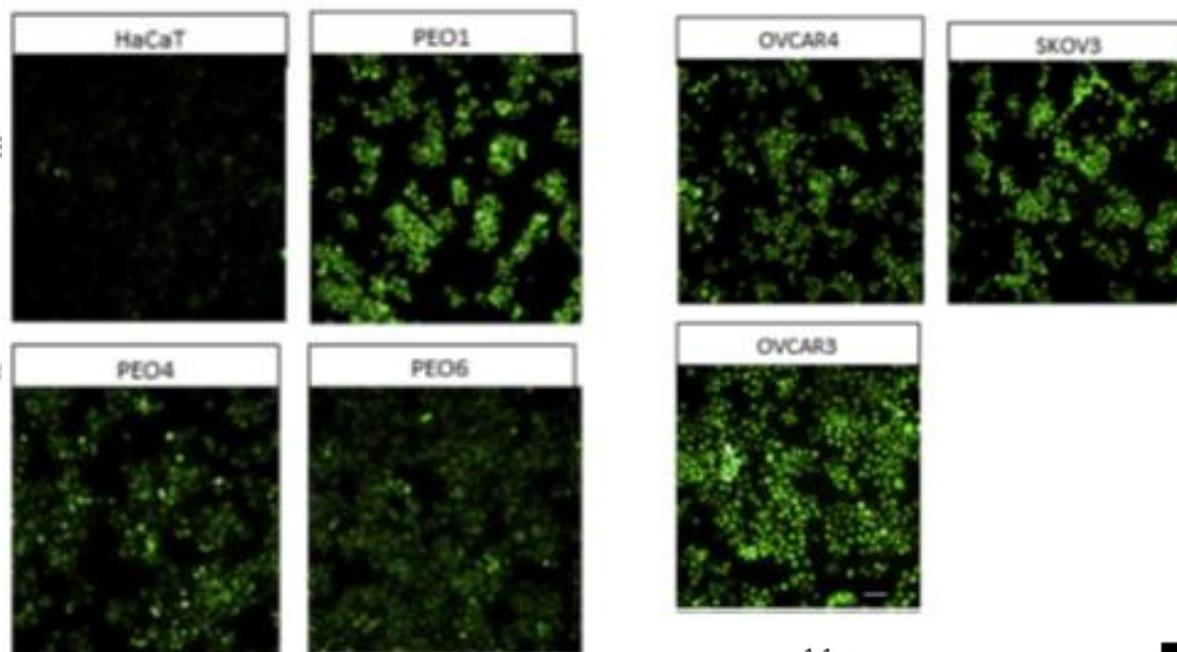
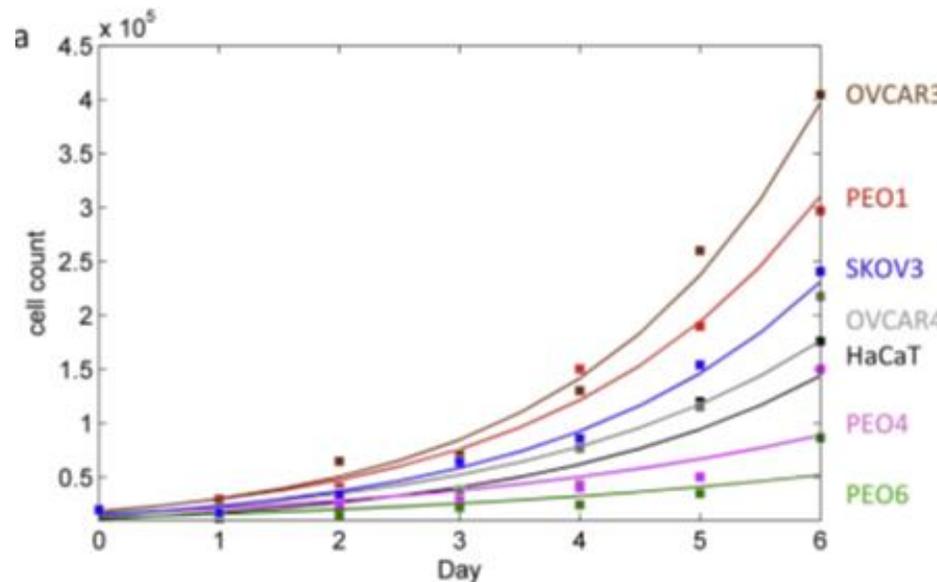


Роль Nrf2 антиоксидантной системы в детоксикации клеток, понижении уровня активного кислорода и предотвращении канцерогенеза



Влияние уровня активного кислорода и состояния антиоксидантной клеточной системы на рост линий раковых клеток яичника

Высокая скорость роста раковых клеток наблюдается с повышенным уровнем активного кислорода

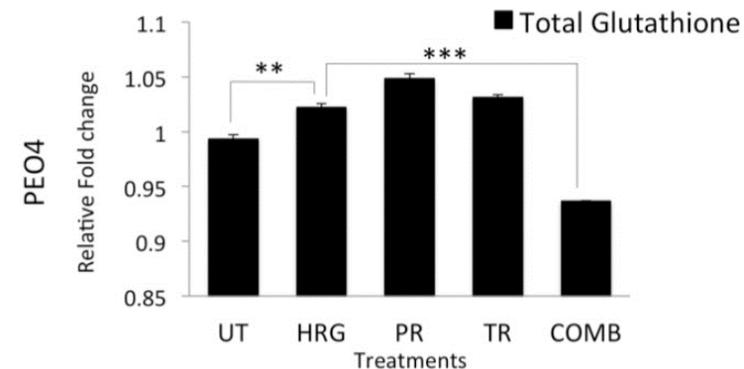


Активация антиоксидантной системы при таргетной терапии

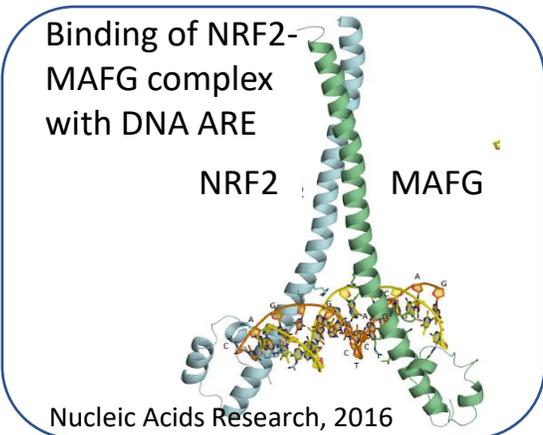
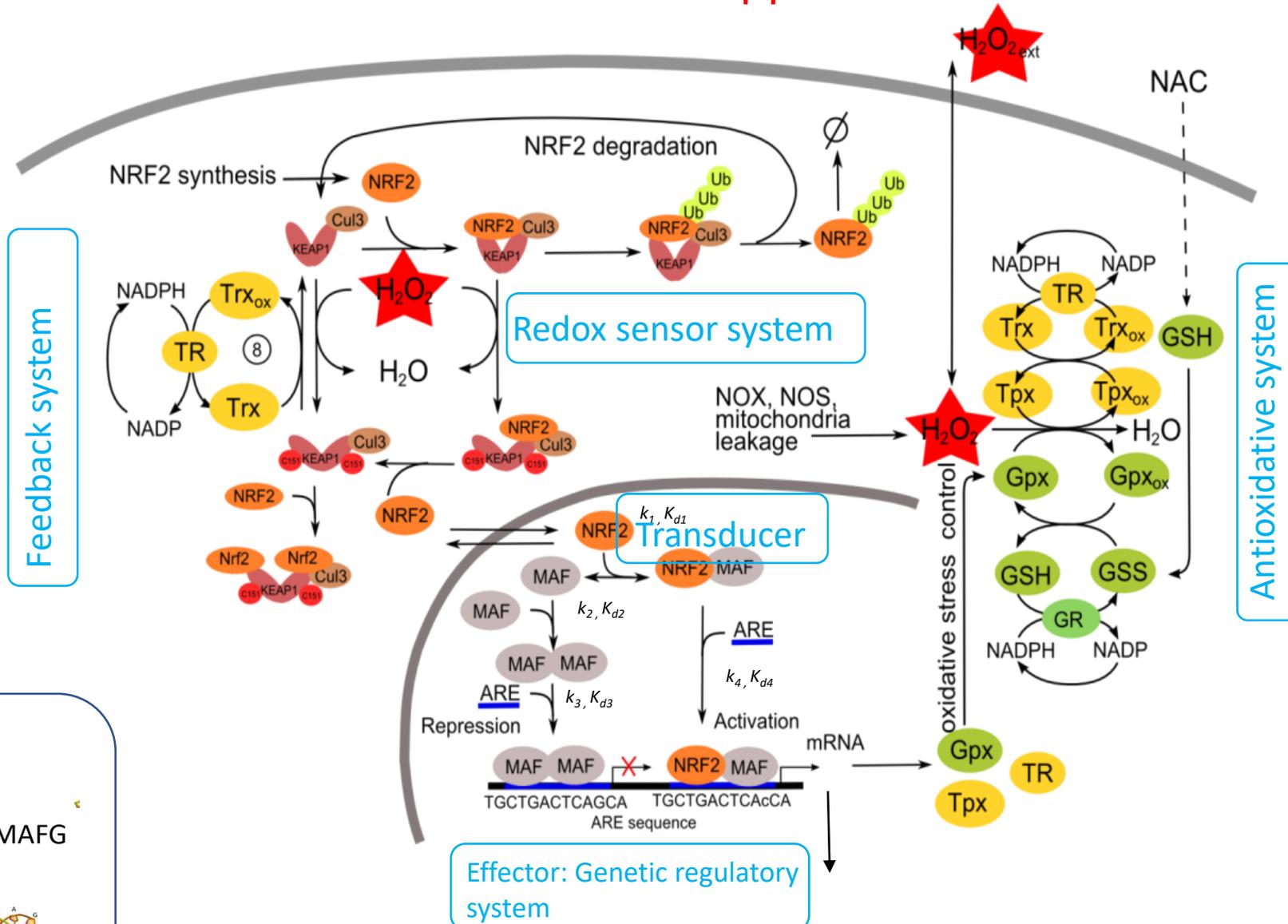
(S. Khalil, S. Langdon, Goltsov et al. Oncotarget. 2016)

Проблема: Эффективность комбинации таргетной, хемо- и радио- терапий с антиоксидантной терапией.

Разработка биомаркеров эффективности комбинационной терапии



Модель NRF2-KEAP1-sMAF-ARE антиоксидантной системы клетки



Glutathione synthesis (Gclc, Gclm); Elimination of ROS (Txnrd1, Prdx1)
 Detoxification of xenobiotics (Gst, Nqo1); Drug transport (Mrp)

Уравнения реакций модели NRF2-KEAP1-sMAF-ARE антиоксидантной системы клетки

Reaction	Rate equation
Null \rightarrow Nrf2	$V_{Nrf2,syn}$
KEAP1 + NRF2 \rightarrow KEAP1 ^o NRF2	$V_{Nrf2,KEAP1} = k_{1,Nrf2} \cdot (KEAP1 \cdot NRF2 - K_{1,Nrf2} \cdot KEAP1^o NRF2)$
KEAP1 ^o NRF2 \rightarrow KEAP1 ^o NRF2 ^o Ub	$V_{KEAP1,Nrf2ub} = k_2 \cdot KEAP1^o NRF2$
KEAP1 ^o NRF2 ^o Ub \rightarrow KEAP1 + NRF2 _{Ub}	$V^{KEAP1,Nrf2ub,dis} = k_3 \cdot KEAP1^o NRF2^o Ub$
NRF2 \rightarrow Null	$V_{Nrf2,deg} = k_{Nrf2,deg} \cdot NRF2$
Null \rightarrow H2O2	$V^{H2O2,prod}$
H2O2 + Px \rightarrow Px _{ox} + H2O	$V_{Px,ox} = k_{Px,ox} \cdot Px \cdot H2O2$
KEAP1 + H2O2 \rightarrow KEAP1 _{ox}	$V_{KEAP1,ox} = k_{KEAP,ox} \cdot KEAP1 \cdot H2O2$
KEAP1 _{ox} + TRX \rightarrow KEAP1 + TRX _{ox}	$V_{KEAP1,red} = k_{TRX} \cdot KEAP1_{ox} \cdot H2O2$
TRX _{ox} \rightarrow TRX	$V_{TRX,red} = \frac{k_{TR} \cdot TR \cdot TRX_{ox} \cdot NADPH}{K_{TR,TRX} \cdot K_{TR,NADPH} \cdot (1 + TRX_{ox} / K_{TR,TRX} + NADPH / K_T)}$
KEAP1 _{ox} + 2 NRF2 \rightarrow NRF2 ^o KEAP1 _{ox}	$V_{Nrf2,KEAP1ox} = k_{2,Nrf2} \cdot (2 \cdot KEAP1_{ox} \cdot NRF2 - K_{d2,Nrf2} \cdot NRF2^o KEAP1_{ox})$
NRF2 ^o KEAP1 _{ox} + H2O2 \rightarrow NRF2 ^o KEAP1 _{ox}	$V_{KNrf2,KEAP1ox} = k_{KEAP,ox} \cdot KEAP1^o NRF2$
Px _{ox} + PSS \rightarrow Px + PSH	$V_{Px,red} = k_{Px,red} \cdot Px_{ox} \cdot PSS$
PSH \rightarrow PSS	$V_{PSH,red} = \frac{k_{Red} \cdot Red \cdot PSH \cdot NADPH}{K_{Red,PSH} \cdot K_{Red,NADPH} \cdot (1 + PSH / K_{Red,PSH} + NADPH / K)}$
NRF2 \rightarrow NRF2 _{nucl}	$V_{Nrf2,micf} = k_{nucl} \cdot (NRF2 - NRF2_{micf})$
NRF2 _{nucl} + MAF \rightarrow NRF2 ^o MAF	$V_{Nrf2,Maf} = k_{Nrf2,Maf} \cdot (NRF2_{nucl} \cdot MAF - K_{Nrf2,Maf} \cdot NRF2^o MAF)$
NRF2 ^o MAF + NAREARE \rightarrow NRF2 ^o MAF ^o ARE	$V_{Nrf2,ARE} = k_{Nrf2,ARE} \cdot (NARE \cdot NRF2^o MAF \cdot ARE - K_{Nrf2,ARE} \cdot NRF2^o MAF^o ARE)$
MAF + MAF \rightarrow MAF ^o MAF	$V_{2Maf} = k_{Maf2} \cdot (2 \cdot MAF - K_{d,Maf2} \cdot MAF^o MAF)$
MAF + NAREARE \rightarrow MAF ^o ARE	$V_{Maf2,ARE} = k_{Maf2,ARE} \cdot (NARE \cdot MAF \cdot ARE - K_{Maf2,ARE} \cdot MAF^o ARE)$
Null \rightarrow Px	$V_{Px,syn} = F \cdot NRF2^o MAF^o ARE$
Px \rightarrow Null	$V_{Px,deg} = k_{Px,deg} \cdot Px$
H2O2 \rightarrow H2O2 _{ext}	$V_{H2O2,out} = p \cdot A_{cell} \cdot N_{cell} \cdot (H2O2_{ext} - H2O2)$

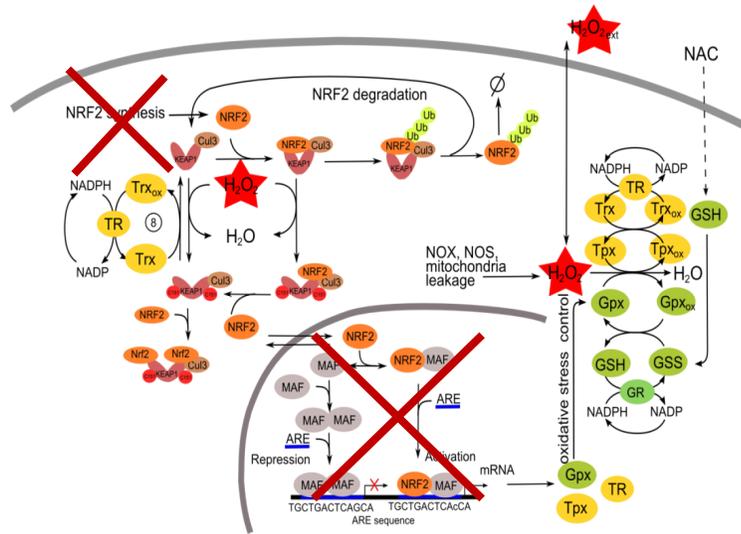
NRF2-KEAP1 сенсорная система

Антиоксидантная система, гидролиз H2O2

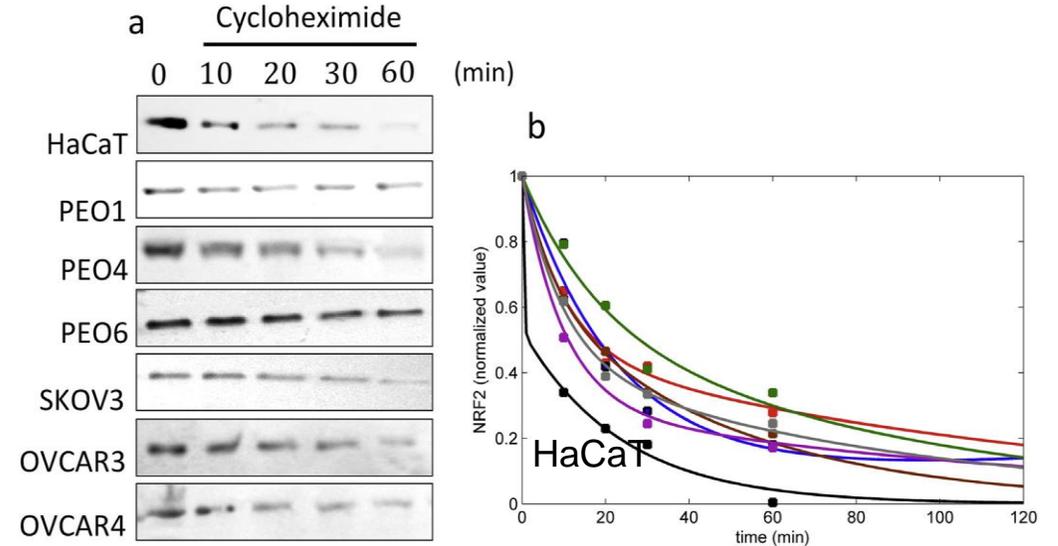
Генетическая система управления и экспрессии

Включение протеомных данных в разработку NRF2-KEAP1-MAFG антиоксидантной модели в HaCaT и клеточных линиях рака яичников

Исследование KEAP1-зависимой деградации NRF2 Cycloheximide treatment

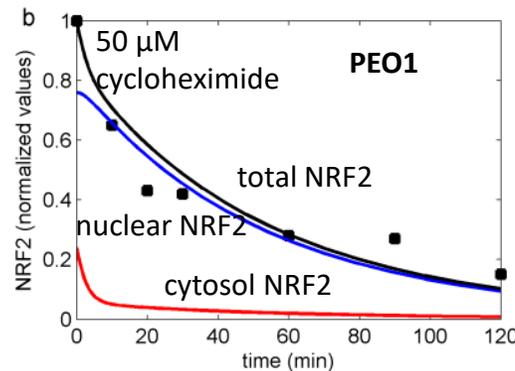
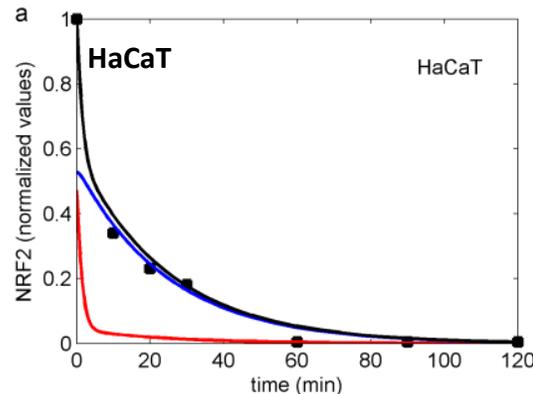


Скорость деградации NRF2 в раковых клетках в 2-3 раза ниже, чем в HaCaT клетках



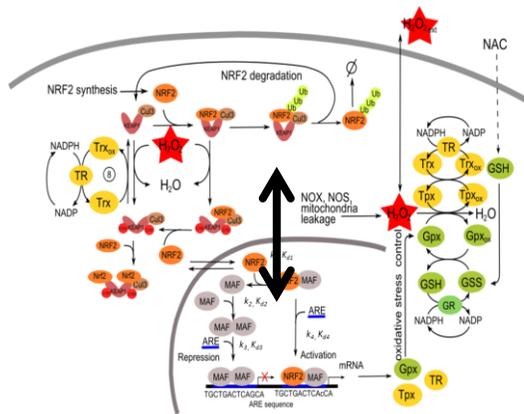
Модель двухэкспоненциальной KEAP1-зависимой деградации NRF2

$$NRF2(t) = Ae^{-k_{fast}t} + (1 - A)e^{-k_{slow}t}$$

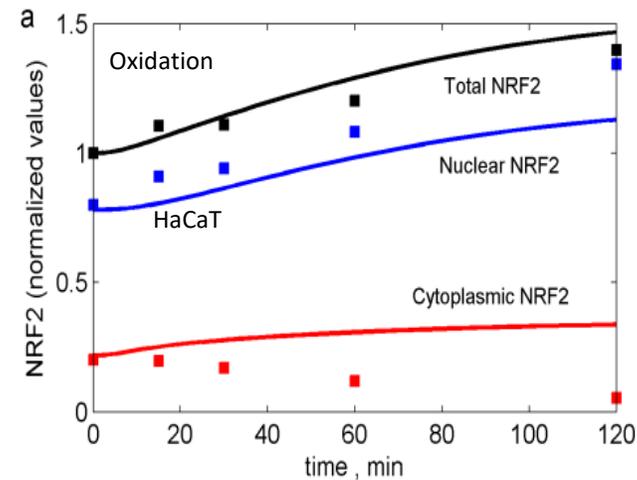


Результат: Оценены вклады цитозольной и ядерной деградации NRF2

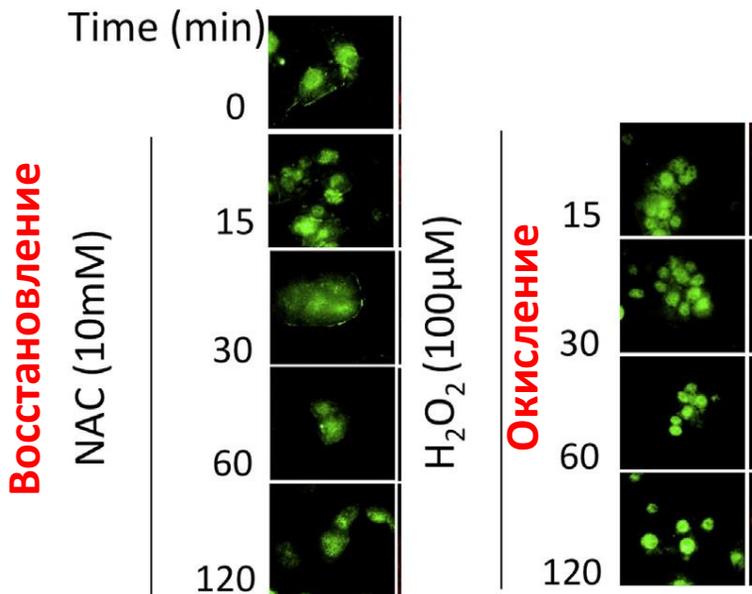
Исследование транспорта транскрипционного фактора NRF2 между цитозолем и ядром в ответ на окислительный и восстановительный стимулы



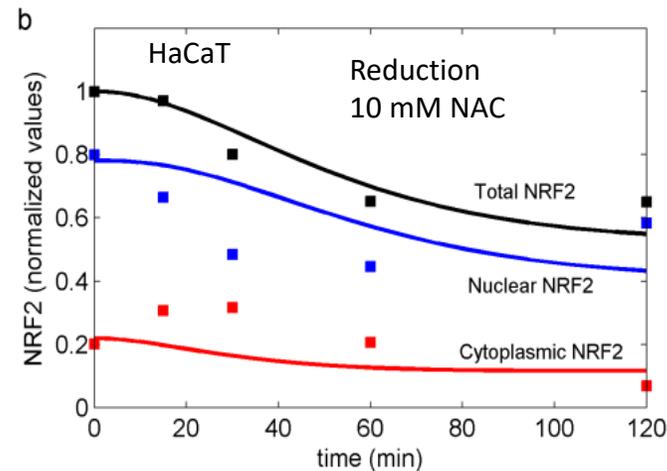
NRF2 shuttling at oxidation by 5 uM H2O2



NRF2 динамика при действии окислительного и восстановительного агентов

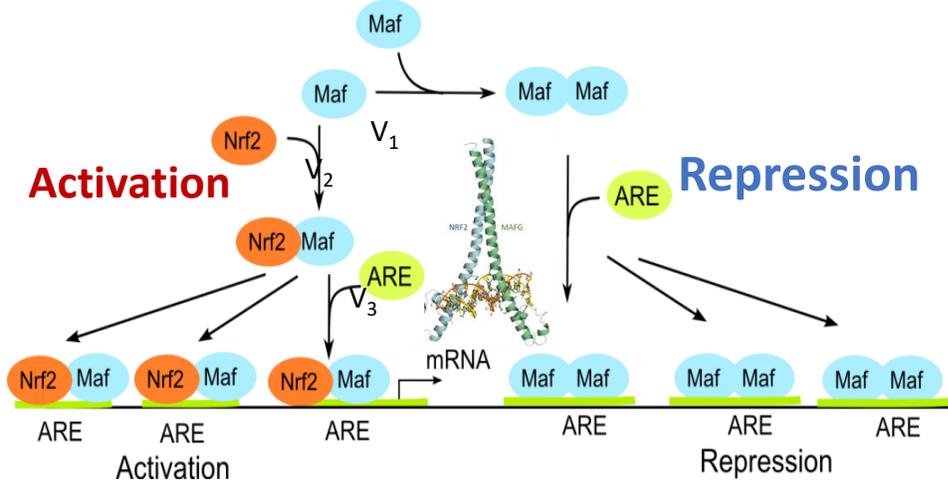


NRF2 kinetics at reduction by 10 mM N-acetyl cysteine



Учет генетических данных по связыванию NRF2-MAFG транскрипционного фактора с нуклеотидной последовательностью промотора ARE (antioxidant response element)

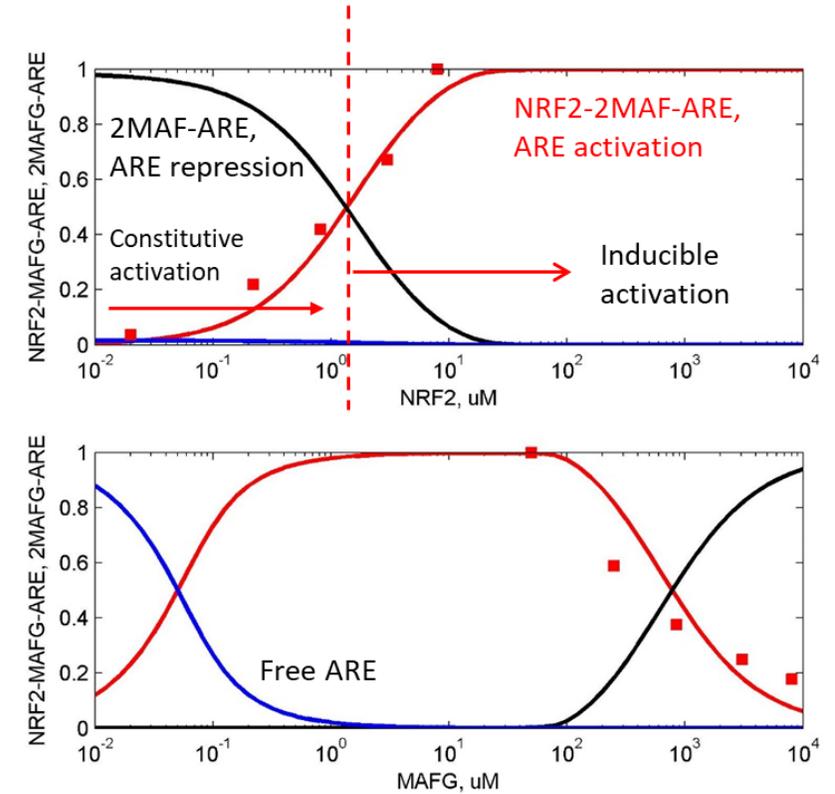
Ma_fia: Модель активации и репрессии промотора ARE



Экспериментальные данные (SPR) по связыванию NRF2-MAFG и MAFG-MAFG с 20 различными нуклеотидными последовательностями ARE

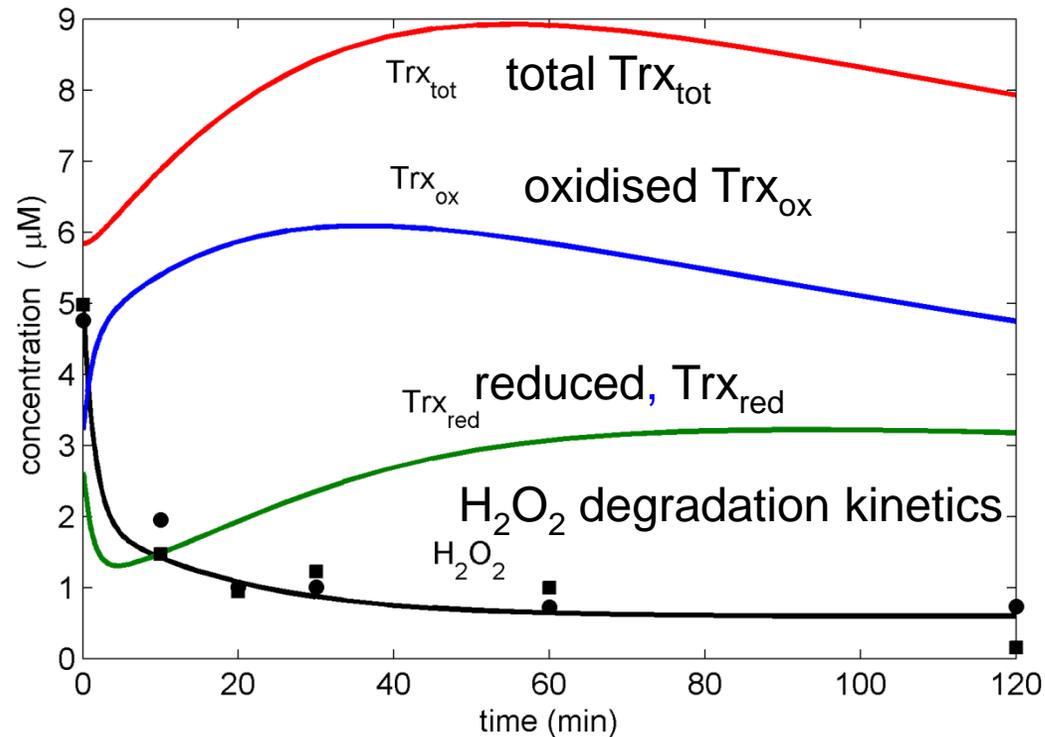
MARE-related sequence with base alterations	SPR kinetics of homodimer		
-6 -4 -2 0 +2 +4 +6	k_a [10^4 /M/s]	k_d [10^{-4} /s]	K_D [10^{-8} M]
TGCTGACTCAGCA	7.71 ± 3.25	3.83 ± 2.29	0.46 ± 1.28
TGCTGAGTCAGCA	7.24 ± 0.69	4.80 ± 0.67	0.61 ± 0.65
TGCTGcCgCAGCA	12.64 ± 3.47	43.95 ± 10.45	3.44 ± 12.3
TGCTGtCaCAGCA	12.09 ± 2.81	33.84 ± 7.51	2.70 ± 7.62
TGCTaACTtAGCA	10.36 ± 0.4	23.01 ± 3.37	2.07 ± 3.44
TGCaGACTcGCA	10.05 ± 1.14	30.66 ± 8.31	2.80 ± 5.99

(Yamamoto et al, Gene Cells, 2006, Chorley Nucl Acid Res 2012) .



Расчет дозовых зависимостей активации ARE промотора от концентрации NRF2 в ядре (upper) and sMAF (bottom). Точки – экспериментальные данные (Dhakshinamoorthy S, et al. JBC 2000) (sMAF=1 μ M)

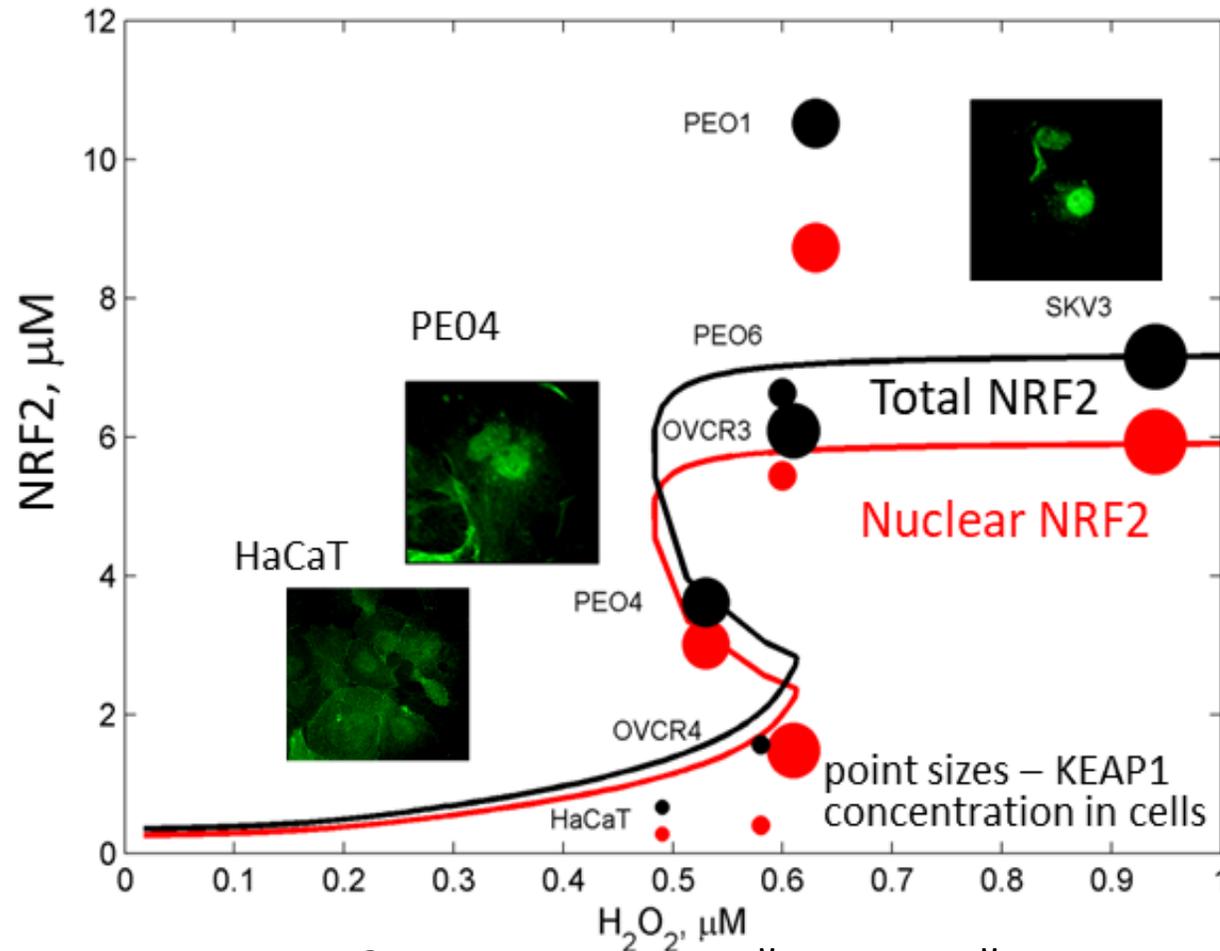
Валидация модели: моделирование ответа раковых клеток на окислительный стресс, добавление H_2O_2 в клеточную среду



Points – experimental data for HaCaT (black squares) and OVCAR3 (black circles) cells

Degradation of extracellular H_2O_2 occurs due to Trx/GSH scavenging system and its up-regulation (Trx, Tpx, Gpx) as a result of NRF2-KEAP1-MAFG genetic regulation.

Моделирование ответа NRF2-KEAP1-MAFG антиоксидантной системы клетки на окислительный стресс в клеточных линиях рака яичников



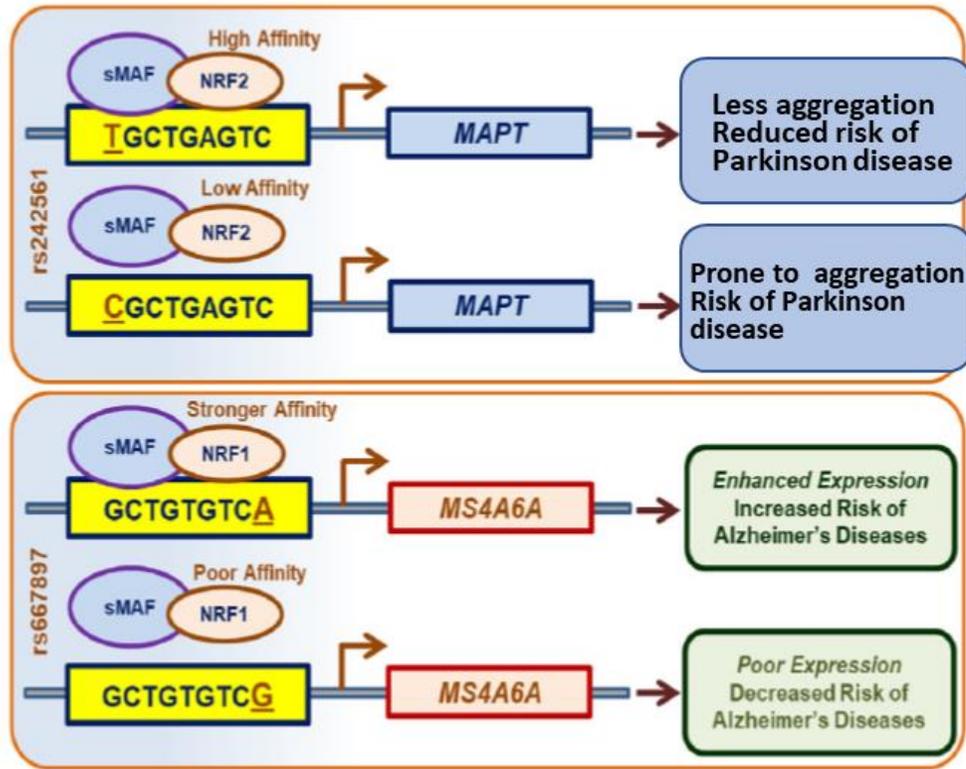
Точки – экспериментальные данные для уровней H_2O_2 и NRF2. Показаны снимки локализации NRF2 в клетках (immunofluorescent labelling of NRF2).

NRF2- H_2O_2 регуляторная кривая: Зависимость полной и ядерной концентрации NRF2 от клеточного уровня H_2O_2 . S-форма кривой отражает генетическое регулирование ответа клетки на возрастающий уровень H_2O_2 :

- экспрессии NRF2 (ослабление KEAP1-зависимой деградации и NRF2 автоэкспрессия)
- Экспрессия антиоксидантных ферментов, гидролизующих H_2O_2

Включение в модель биоинформационных и фармакогенетических данных

The ARE SNPs (single nucleotide polymorphism) alter the affinity of the transcription complex to AREs and modulate expression of target genes related to the diseases.



(Kagihara A. et al. REDOX BIOLOGY. 2018)

The ARE SNPs related to the diseases

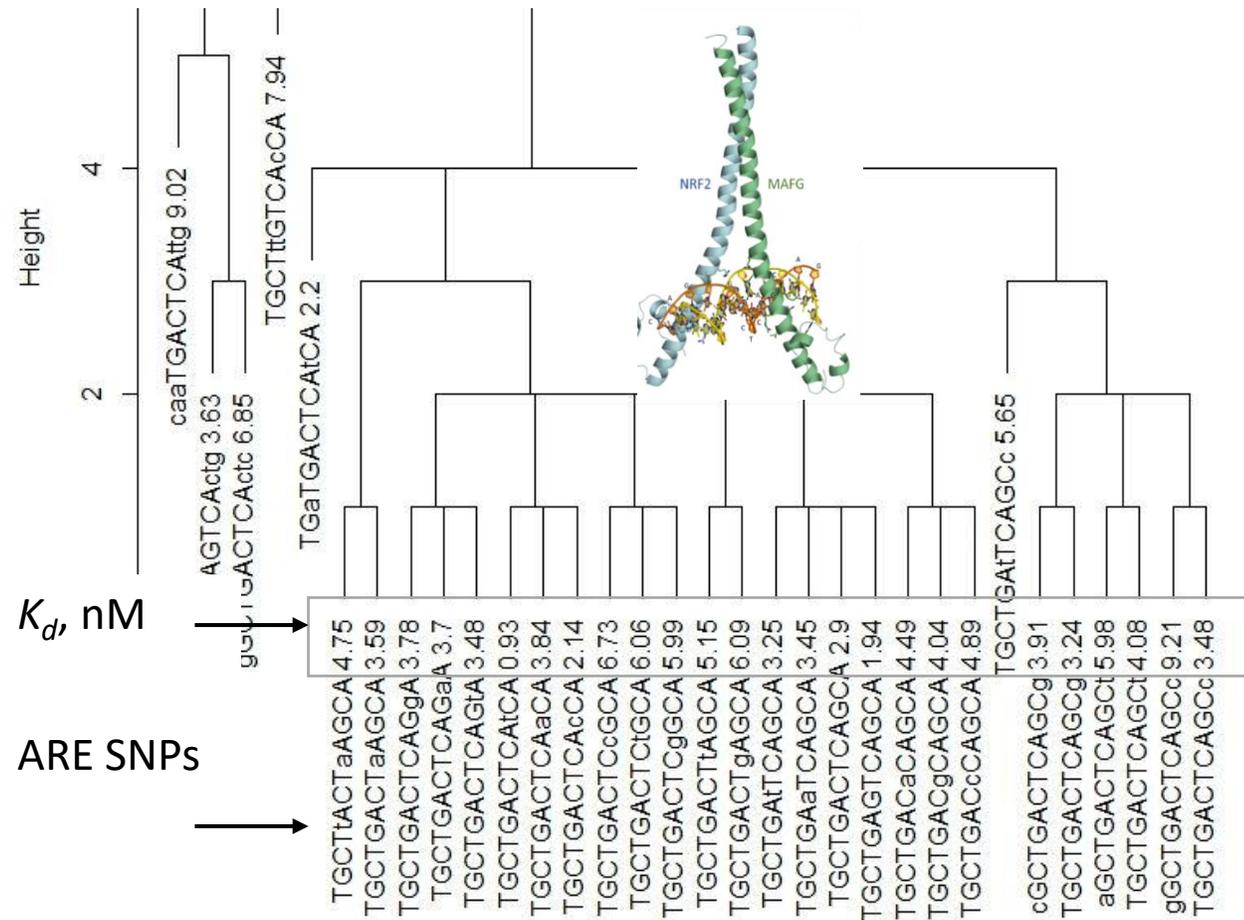
SNP ID	Sequence	Reported trait
rs16913624	GTGACTCAGCC	Inflammatory biomarkers
rs2454138	GTGAGTCATCG	Epstein_Barr virus immune response (EBNA-1), Hepatitis B vaccine response, Inflammatory bowel disease
rs3026775	GTGAATAAGCA	Hirschprung disease, protection against
rs34171066	CTGACTCAGCA	Bone mineral density
rs34608229	ATGACACAGCA	Height Height
rs4545169	ATGACTAAGCA	Autoimmune and infectious diseases
rs4798979	GTGACTCAGCT	Subcutaneous adipose tissue
rs62052186	GTGACACAGCA	Skin/hair/eye pigmentation 2, red hair/fair skin
rs62096279	ATGATACAGCA	Multiple sclerosis
rs6448280	ATGACTAATCA	Myopia (pathological)
rs71565194	ATGATGCAGCA	Immune response to smallpox (secreted IL-2)
rs76845667	GTGACTCAGCT	Brain structure, Hippocampal volume, Subcortical brain region volumes
rs8027358	ATGATTCAGCA	Periodontitis (DPAL)
rs9274490	GTGAGGCAGCA	

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Understanding of the molecular mechanism of effect of SNPs in AREs on the cellular antioxidative response can facilitate the development of therapeutic agents against *diseases with oxidative stress*

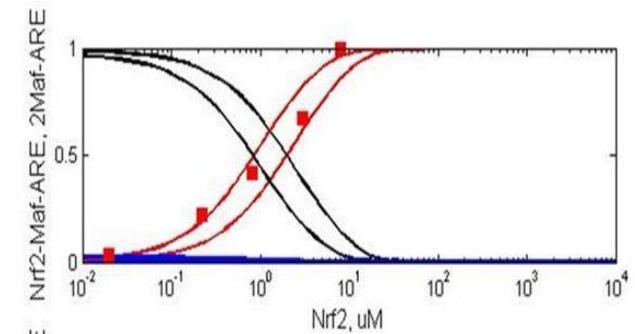
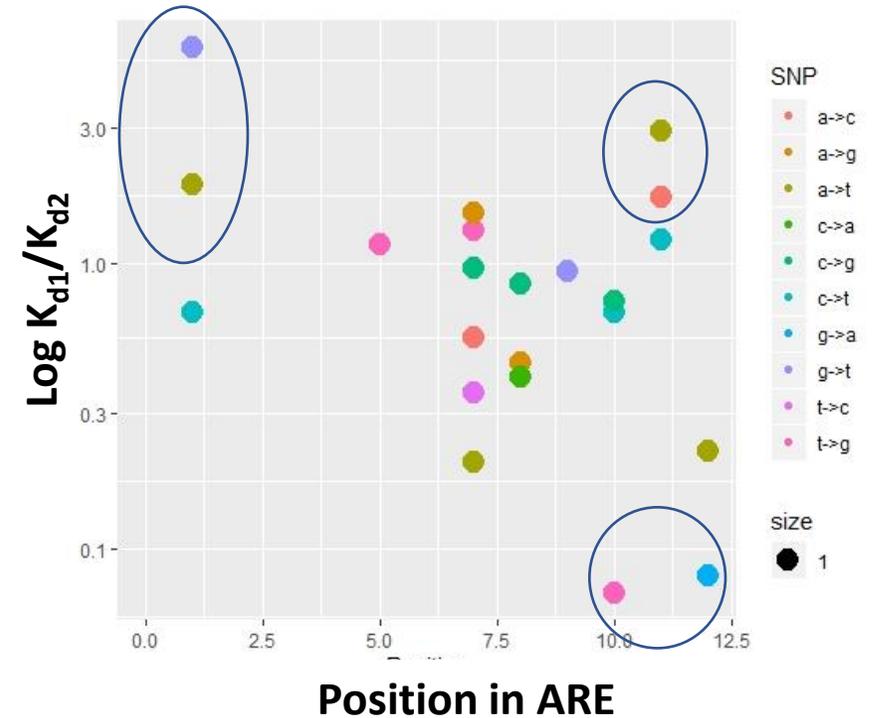
Учет влияния SNP в ARE последовательности промотора на NRF2-MAF-ARE связывание и ARE активацию

Clustering of AREs: Bottom clusters corresponds to ARE SNPs. K_d of binding of ARE with NRF2-MAFG are shown in the frame.



A change in K_d at the ARE SNP causes a shift of dose dependence of ARE activation

Ratio K_{d1}/K_{d2} for binding of NRF2 with ARE for SNP vs. SNP position in ARE sequence

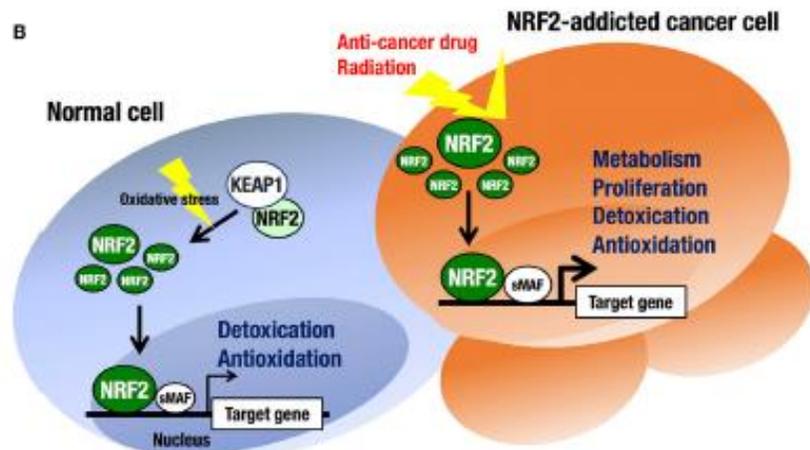


Выводы и перспективы

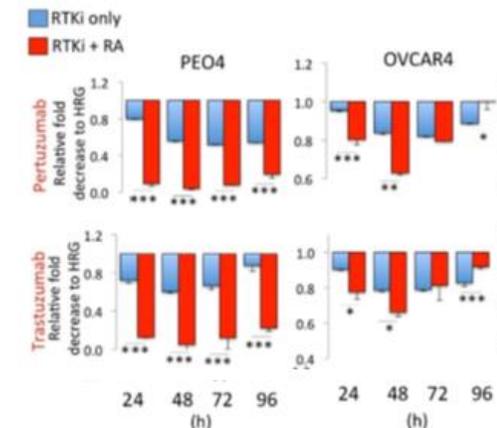
Применение разработанной модели к следующим проблемам онкотерапии:

- **Определение эффективных лекарственных таргетов в NRF2-KEAP1-MAF сигнальной системе:** Применение разработанной модели антиоксидантной системы к исследованию эффективности действия ингибиторов NRF2-KEAP1-MAF сигнальной системы.
- **Исследование молекулярных механизмов резистентности к таргетной, радио- и хими-терапии:** Моделирования влияния мутаций в NRF2-KEAP1-MAF системе на антиоксидантный ответ в раковых клетках на окислительный стресс
- **In silico разработка биомаркеров чувствительности различных типов рака к комбинации онкотерапии с ингибированием NRF2-KEAP1-MAF сигнальной системы**

NRF2-addicted cancer cells



Ингибирование NRF2 увеличивает чувствительность к трастузумабу и пертузумабу в некоторых раковых клетках яичника



Collaboration and Acknowledgment



***University of St Andrews
School of Medicine***

Prof David J. Harrison
Dr Peter Mullen



***Institute of Genetics and
Molecular Medicine***

Dr Simon P. Langdon,



Prof James Bown
Dr Yusuf Deeni

PhD Steph Wilson
MSc Tero Soinenen
MSc Stilianos Kyriakidis



MS Decisions, Москва
Юрий Косинский
Кирилл Песков

