

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ МИШЕНЕЙ НА ПРИМЕРЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.Н. Коборова¹, Д.А. Филимонов¹, А.В. Захаров¹, А.А. Лагунин¹, А. Кель²,
Ф. Колпаков³, Ю.В. Кондрахин³, Р. Шарипов^{3,4}, В.В. Поройков¹

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, Россия, e-mail: okoborova@gmail.com; ² BIOBASE GmbH, Halchtersche Strasse 33, D-38304 Wolfenbüttel, Germany; ³ООО «Институт системной биологии», Новосибирск, Россия; ⁴ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Актуальность поиска новых мишеней противоопухолевых препаратов обусловлена низкой эффективностью существующей терапии. Нами предложен и реализован в компьютерной программе NetFlowEx алгоритм, имитирующий поведение регуляторной сети на основе дихотомической модели. Путем инактивации отдельных вершин или их парных комбинаций моделируется воздействие лекарственных препаратов, ингибирующих отдельные белки-мишени в регуляторной сети либо их комбинации. Для генерализованного рака молочной железы мы применили метод к участку регуляторной сети, содержащему белки, связанные с регуляцией клеточного цикла, апоптоза и вовлеченные в прогрессию рака молочной железы, а также в формирование самой железы. В результате были идентифицированы две группы перспективных мишеней, одна из которых связана с инициацией апоптоза (фибронектиновый рецептор alpha5 beta1, фибронектин, белки Bcl-2, c-Jun, Jak2, Jak3, STAT3), а вторая – с остановкой клеточного цикла (Cyclin A, Cyclin B, Cyclin E, Cyclin D1, CDK1, CDK2, пары Histone H1 и Cyclin B, PDK1 и Cyclin B, PKAC и Cyclin B). Для некоторых из идентифицированных мишеней известны ингибиторы, изучаемые как потенциальные препараты для терапии злокачественных новообразований, и в частности рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, моделирование, системная биология, регуляторные сети, перспективные мишени.

Введение

Актуальность поиска новых мишеней противоопухолевых препаратов обусловлена низкой эффективностью существующей терапии (Bange *et al.*, 2001; Kaye, Workman, 2002). В последние годы происходит накопление обширной геномной, транскриптомной и протеомной информации о структурной организации и функционировании регуляторных сетей в норме и при патологиях. Путем анализа этой информации можно идентифицировать белки, участвующие в возникновении и развитии злокачественных новообразований, и отобрать среди них наиболее перспективные мишени для будущих лекарств (Hill, Khalil, 2005).

Существующие на данный момент статические методы анализа (Spainhour, 2005; Ulitsky, Shamir, 2007) дают возможность работать с большими регуляторными сетями, однако не позволяют моделировать процессы в динамике. А динамические методы, наиболее перспективные из которых гибкие методы моделирования, где в зависимости от изученности системы применяются либо неравновесный (Лихошвай и др., 2004; Zhang *et al.*, 2006; Gea *et al.*, 2008), либо квазистационарный подход (Лихошвай и др., 2004; Millata *et al.*, 2007), либо метод обобщенных функций Хилла (Likhoshvai, Ratushny, 2007), используются пока только для отдельных путей регуляции. В связи с возможными изменениями в динамике поведения живых систем

большинство параметров для детализованного моделирования должно быть взято из экспериментальных данных (Millata *et al.*, 2007), которые отсутствуют для большого числа белков (Gea *et al.*, 2008), а имеющиеся данные, приведенные в различных публикациях, порой противоречат друг другу (Materi, Wishart, 2007). Дискретные методы моделирования могут быть применены к большой регуляторной сети, отображающей такой процесс, как клеточный цикл, где основную информацию несут последовательность состояний клетки и влияние активности отдельных компонентов на выбор дальнейшего пути (Tyson *et al.*, 2001). В этом случае время, которое занимают протекающие процессы, не столь важно. Недавние исследования показывают, что некоторые молекулярные сети сконструированы настолько устойчиво, что время не является критическим фактором (Braunewell *et al.*, 2006).

Целью нашей работы являются разработка алгоритма выявления наиболее перспективных мишеней для противоопухолевых препаратов на основе дискретных подходов моделирования регуляторных сетей и апробация данного алгоритма на примере генерализованного рака молочной железы.

Материалы и методы

Нами применен алгоритм, имитирующий поведение регуляторной сети на основе дихотомической модели, в рамках которой отдельные вершины сети (белки и/или гены) могут быть в одном из двух состояний: активном и неактивном. Состояния изменяются в дискретные моменты времени. Активное состояние гена соответствует экспрессии его белка, активное состояние белка – его способности связывать свои субстраты. При таком подходе каждый ген и каждый белок представлены в виде вершины направленного графа, в котором ребра проводятся между вершинами тогда и только тогда, когда между ними имеется взаимодействие. Новое состояние вершины на следующем шаге вычисляется как функция от состояний вершин, с которыми она связана входящими в нее ребрами.

Входными данными модели являются состояния вершин (белков и/или генов) в начальный момент времени. Состояние узла обозначено

S_i – для активного узла $S_i = 1$, а для неактивного $S_i = 0$. Свойства ребер опишем матрицей \mathbf{B} , элемент которой $b_{ik} = 1$, если ребро выходит из узла i и активирует узел k ; $b_{ik} = -1$, если ребро выходит из узла i и инактивирует узел k ; $b_{ik} = 0$ во всех остальных случаях, а $b_{ii} = 0$ означает, что узел не активирует сам себя; только одно из двух чисел: b_{ik} или b_{ki} может быть отличным от нуля.

В разработанном нами варианте дихотомических сетей моделирование процесса регуляции состоит в вычислении последовательности состояний узлов сети $\mathbf{S}(0), \mathbf{S}(1), \mathbf{S}(2), \dots, \mathbf{S}(k)$ из заданного начального состояния $\mathbf{S}(0)$ посредством набора дихотомических функций:

$$S_i(k+1) = F_i(S_1(k), S_2(k), \dots, S_n(k)), \quad (1)$$

где $i = 1, \dots, n$; $S_i(k)$ – состояние узла i сети из n узлов на шаге k , F_i – функция перехода, определяемая структурой сети и правилами комбинирования состояния узлов, связанных с узлом i входящими в него ребрами. Например, если количество активных узлов, связанных с узлом i , больше количества связанных с ним неактивных узлов, то узел i будет активен; если количество активных узлов меньше количества неактивных, то узел i будет неактивен; если это количество одинаково, то предпочтение отдается активному состоянию узла i .

Функции перехода дихотомической сети представлены в нашей модели в виде:

$$F_i(S_1, S_2, \dots, S_n) = \Theta(a_i + \sum_k S_k \cdot b_{ki}), \quad (2)$$

где пороговая функция $\Theta(z) = 0$ при $z \leq 0$ и $\Theta(z) = 1$ при $z > 0$. Параметры a_i могут отражать неизвестный участок регуляторной сети. В данной работе все $a_i \equiv 0$. В дальнейшем мы планируем варьировать a_i для более точной настройки модели по известным данным о процессе регуляции.

Последовательность $\mathbf{S}(0), \mathbf{S}(1), \mathbf{S}(2), \dots, \mathbf{S}(k)$ называется траекторией. Подмножества состояний узлов сети $\{\mathbf{S}\} \subset 2^n$ называются событиями. Вычисление траектории останавливается после наступления некоторого события, интересующего исследователя, например апоптоза, когда запускается каскад каспаз, и процесс становится необратимым, или остановки клеточного цикла на одной из его фаз.

Молекулы-мишени в нашей модели – это узлы регуляторной сети, воздействие на ко-

торые наиболее существенно изменяет траектории желательным образом: наступление апоптоза или остановка клеточного цикла. Для выявления молекул-мишеней состояние узлов, соответствующих определенным белкам, фиксируется согласно виду предполагаемого воздействия, например $S_i \equiv 0$ при ингибировании соответствующего белка.

В качестве входной информации для моделирования были взяты данные об экспрессии генов из Cyclonet (<http://cyclonet.biouml.org>). База данных Cyclonet также содержит разнобразную информацию о регуляции клеточного цикла млекопитающих в норме и при патологиях (Kolpakov *et al.*, 2007). Участки регуляторных сетей были взяты из базы данных TRANSPATH® (<http://www.biobase.de>), содержащей информацию о сигнальных молекулах, их взаимодействиях и путях, которые складываются из этих взаимодействий (Krull *et al.*, 2006).

Описанная дихотомическая модель реализована нами в компьютерной программе NetFlowEx на платформе Java.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что модель воспроизводит процессы регуляции деления клетки в норме, процесс апоптоза в здоровой клетке и не противоречит патологическим процессам при опухоли молочной железы (Коборова и др., 2008). В данной работе метод был применен к большому участку регуляторной сети, состоящему из 828 вершин и 1849 ребер и содержащему различные фрагменты путей, связанных с регуляцией клеточного цикла и апоптоза, такие, как каскады каспаз и MAP киназ, пути TNFalpha, IL-6, TGFbeta, HIF-1alpha, VEGF, Fas, EGF, Wnt/beta-catenin и другие пути и входящие в них белки, которые вовлечены в прогрессию рака молочной железы, а также в формирование самой железы. Кроме того нами были использованы данные об экспрессии для генерализованного случая рака молочной железы, содержащие 42 гипер- и 48 гипоэкспрессированных белков, входящих в выбранную сеть.

Процесс регуляции клеточного цикла был промоделирован с помощью NetFlowEx. За 9 шагов моделирования происходит одно деление клетки. На большем количестве шагов

также происходят клеточные деления, и моделируемый процесс остается стабильным и итеративным, поэтому для удобства расчетов было взято количество шагов, соответствующее одному делению.

Инициация апоптоза. Результаты моделирования с использованием данных об экспрессии в случае генерализованного рака молочной железы показали, что апоптоз заблокирован, и происходят последующие генерации новых делений. В качестве конечного эффекта, который относится к инициации апоптоза, была выбрана активация цитохрома C. При ингибировании вершин было выявлено, что инактивация фибронектинового рецептора alpha5 beta1, фибронектина и белков Bcl-2, c-Jun, Jak2, Jak3, STAT3 по отдельности ведет к выбранному нами эффекту. На рис. 1 представлен фрагмент сети, содержащий некоторые мишени.

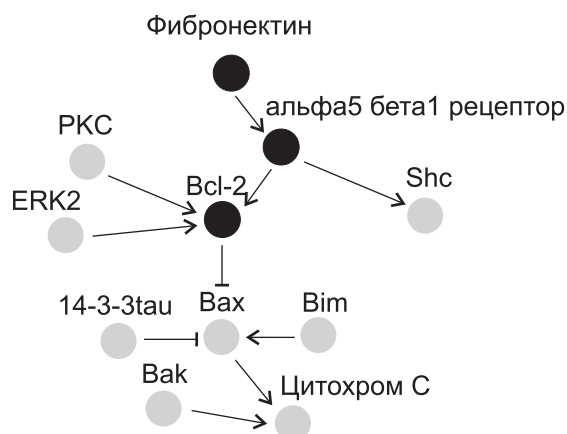


Рис. 1. Фрагмент регуляторной сети, содержащий некоторые выявленные мишени.

Темным цветом обозначены белки – выявленные мишени, светлым – некоторые связанные с ними белки.

Остановка клеточного цикла. В качестве конечного желаемого эффекта нами было выбрано ингибирование комплексов Cyclin/CDK, так как это ведет к остановке клеточного цикла. Данные комплексы могут быть ингибированы непосредственно или непрямым воздействием через ингибирование или активацию других белков/генов.

Сначала ингибирование каждого комплекса Cyclin/CDK было рассмотрено отдельно, и промоделировано ингибирование всех других вершин в сети по одной и попарно. Для комплекса

Cyclin A:CDK1, который обладает повышенной экспрессией во время S фазы, были найдены следующие пары: Cyclin A и Cyclin B, Cyclin B и Cyclin E, Cyclin B и PDK1, Cyclin B и HISTONE H1, Cyclin B и PKAC. Для комплексов Cyclin E: CDK2 и Cyclin B: CDK1 пары не были найдены, но независимое ингибирование составных частей этих комплексов Cyclin E и CDK2, Cyclin B и CDK1 приводит к остановке клеточного цикла.

Список перспективных мишеней, выявленных в данном исследовании, включает циклины, важные для осуществления клеточного деления. Выявленные пары Cyclin B и PKAC, Cyclin B и PDK1 более интересны по сравнению с парами, содержащими только циклины, так как их комбинации не настолько очевидны.

При рассмотрении ингибирования всех комплексов Cyclin/CDK одновременно в качестве желаемого эффекта нами не были найдены нетривиальные комбинации мишеней, блокирование которых ведет к такому эффекту. Это связано с тем, что одновременно множество различных белков участвуют в регуляции комплексов Cyclin/CDK, блокада одного и даже пары таких регуляторов не приводит к единовременному ингибированию комплексов Cyclin/CDK.

Оценка выявленных мишеней. Дополнительными критериями для ранжирования мишеней являются: 1) относительная важность требуемого состояния (например остановка клеточного деления или переход клетки в апоптоз) для достижения конечного эффекта (терапия опухоли); 2) наличие измененной экспрессии данной мишени при рассматриваемой патологии; 3) количество ребер, входящих и выходящих из данной вершины, соответствующее количеству взаимодействий с другими белками и/или генами. Ингибирование белка с малым числом функций по сравнению с остальными выявленными мишенями может вносить несущественный вклад в исследуемый процесс. Белки с большим числом функций могут относиться к процессам жизнедеятельности клетки, влияние на которые было бы нежелательным. В связи с этим белки со средним количеством функций считаются нами более приоритетными.

Инициация апоптоза в раковых клетках, т. е. их гибель, нами рассматривается как более важный процесс для лечения опухолевых заболеваний, чем остановка клеточного цикла опу-

холевых клеток, т. е. их сохранение, поскольку остановленный клеточный цикл при различных условиях может запуститься вновь, и рост опухоли продолжится. Таким образом, мишени, ингибирование которых приводит к апоптозу, были нами отнесены к первой группе наиболее перспективных (табл. 1). Среди данной группы мишени ранжировались на основе перечисленных выше критериев 2 и 3.

Например, фибронектину присвоен первый ранг, так как он гиперэкспрессирован в генерализованном случае рака молочной железы (Kolpakov *et al.*, 2007), имеет среднее число функций и соответствующее им малое число взаимодействий с другими белками. Кроме того, фибронектин вовлечен в механизм клеточной адгезии, процессы миграции клеток, включая эмбриогенез, заживление ран, свертывание крови, метастазирование.

Ко второй, менее приоритетной, группе отнесены мишени, воздействие на которые приводит к остановке клеточного цикла на одной из его фаз. Например, Cyclin A имеет первый ранг в данной группе, так как он обладает только одной функцией, являясь участником перехода из фазы S в фазу G2 клеточного цикла. Для пары необходимо искать либо лиганд, который воздействует на оба белка в паре, либо пару лигандов, что сложнее по сравнению с поиском одного лиганда для одной мишени.

Нами была проведена проверка полученных результатов на нашей модели в норме и при патологии (данные Cyclonet – Kolpakov *et al.*, 2007). Для этого были взяты две выявленные мишени: фибронектин, который гиперэкспрессирован при патологии, и Jak2 киназа, которая не гиперэкспрессирована при патологии, однако выявлена нами как перспективная мишень. При ингибировании домена фибронектина, отвечающего за проведение ростового сигнала, в норме цитохром C остается неактивным, каскад каспаз не запускается, комплексы Cyclin/Cdk активны, клетка претерпевает деление (рис. 2, а). При патологии в нашей модели активируется цитохром C, далее следует каскад каспаз, и клетка уходит в апоптоз, несмотря на активные комплексы Cyclin/Cdk (рис. 2, б).

При ингибировании киназы Jak2 в норме клетка претерпевает деление и не уходит в

Таблица 1

Оценка перспективных мишеней для генерализированного случая рака молочной железы

Эффект	Название мишени		Количество входящих/выходящих вершин	Количество функций
Инициация апоптоза	Одиночные мишени	1. Фибронектин*	1/3	9
		2. Фибронектиновый рецептор (alpha5 beta1)	1/2	8
		3. Bcl-2	8/3	3
		4. Jak3	1/2	10
		5. Jak2	6/6	17
		6. c-Jun	13/28	5
		7. STAT3	18/32	16
Остановка клеточного цикла	Одиночные мишени	1. Cyclin A	2/1	1
		2. Cyclin B	3/1	3
		3. Cyclin E	2/1	5
		4. Cyclin D1	4/2	1
		5. CDK1	3/4	9
		6. CDK2	1/1	11
	Пары	7. Histone H1 (с Cyclin B)	1/1	3
		8. PDK1 (с Cyclin B)	4/4	7
		9. PKAC (с Cyclin B)	2/16	7

* Данный белок гиперэкспрессирован в начальный момент времени.

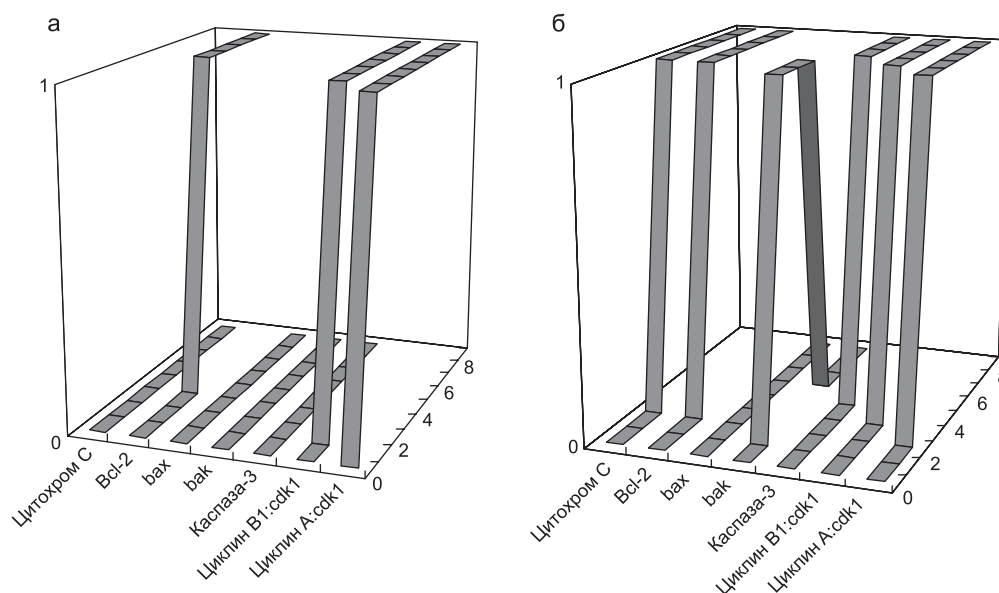


Рис. 2. Результаты моделирования для некоторых белков, отвечающих за апоптоз и деление при ингибировании фибронектина.

По оси X отложены белки, по оси Y – состояния белков, по оси Z – дискретные единицы времени. а – ингибирование фибронектина в норме; б – при патологии.

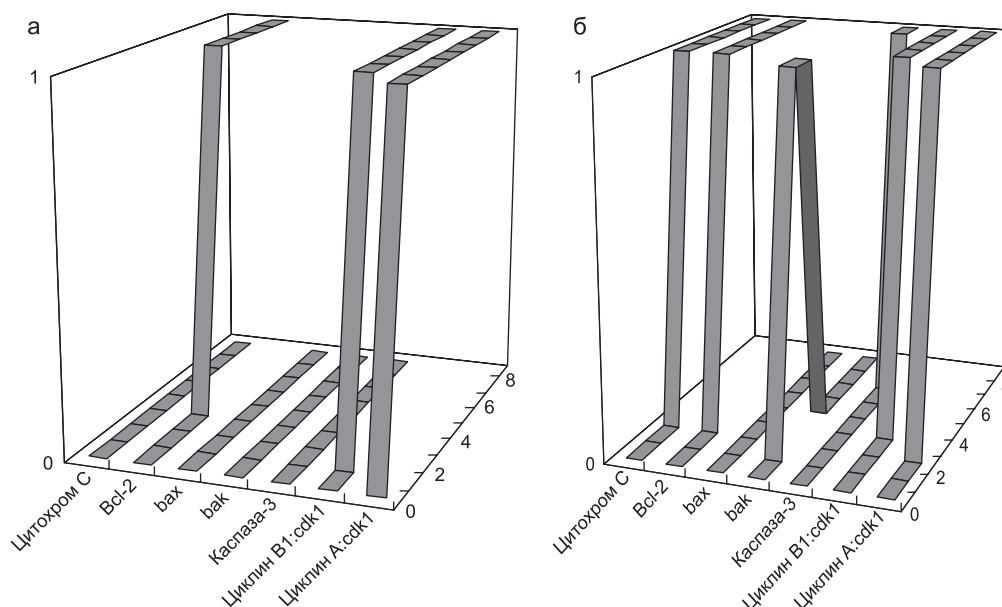


Рис. 3. Результаты моделирования для некоторых белков, отвечающих за апоптоз и деление при ингибировании Jak2.

По оси X отложены белки, по оси Y – состояния белков, по оси Z – дискретные шаги времени. а – ингибирование Jak2 киназы в норме; б – при патологии.

апоптоз (рис. 3, а). При патологии видно, что белок bak становится активным, способствует выходу цитохрома С из митохондрии, а Bcl-2 становится активным на третьем шаге и уже не способен сдерживать выход цитохрома С (рис. 3, б).

Как видно из результатов моделирования, ингибирование выявленных нами мишеней в норме не приводит к апоптозу, однако в опухоли это происходит. Кроме того, по данным Integrity (Prous Science – www.prous.com), существуют ингибиторы, например, фибронектина, которые относятся к онколитической группе препаратов и уже используются в клинической практике. Кроме того, ингибиторы циклинзависимых киназ и циклинов также используются для терапии рака. Например, UCN-01 является ингибитором CDK1, CDK2, CDK6, CDK4, PI3K, CHK1, CHK2, PKC, PDK1, т. е. индуктором апоптоза и ингибитором некоторых сигнальных путей; находится на второй фазе клинических испытаний (Welch *et al.*, 2007).

Заключение

Нами разработан алгоритм выявления перспективных противоопухолевых мишеней и их сочетаний, основанный на существующих

дискретных подходах моделирования, который обеспечивает анализ регуляторных сетей и доступных для большого количества белков данных об их генной экспрессии. Результаты апробации данного алгоритма для генерализованного рака молочной железы показали, что для выявленных нами мишеней известные ингибиторы принадлежат к группе противоопухолевых препаратов, находящихся на различных стадиях доклинических и клинических исследований. Ингибиторы для STAT3, Cyclin E, Cyclin D1 уже исследуются как препараты для терапии рака молочной железы.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Европейской комиссии № 037590 (FP6-2005-LIFESCIHEALTH-7).

Литература

- Коборова О.Н., Филимонов Д.А., Захаров А.В. и др. Выявление противоопухолевых мишеней с использованием биоинформационных технологий // Рос. биотерапевт. журнал. 2008. Т. 7. № 2. С. 54–56.
- Лихошвай В.А., Фадеев С.И., Матушкин Ю.Г. и др. Математическое моделирование регулярных

- контуров генных сетей // Журн. вычисл. математики и матем. физики. 2004. Т. 44. № 10. С. 1921–1940.
- Bange J., Zwick E., Ullirich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention // *Nature medicine*. 2001. V. 7. № 5. P. 548–552.
- Braunewell S., Bornholdt S. Superstability of yeast cell-cycle dynamics: ensuring causality in the presence of biochemical stochasticity // *J. Theor. Biol.* 2006. V. 245. № 4. P. 638–643.
- Gea H., Qian H., Qian M. Synchronized dynamics and non-equilibrium steady states in a stochastic yeast cell-cycle network // *Math. Biosci.* 2008. V. 211. № 1. P. 132–152.
- Hill C., Khalil I.G. Systems biology for cancer // *Curr. Opin. Oncol.* 2005. V. 17. № 1. P. 44–48.
- Kaye S.B., Workman P. Translating basic cancer research into new cancer therapeutics // *Trends Mol. Med.* 2002. V. 8. № 4. P. 1–9.
- Kolpakov F., Poroikov V., Sharipov R. et al. CYCLONET—an integrated database on cell cycle regulation and carcinogenesis // *Nucl. Acids Res.* 2007. № 35. P. 550–556.
- Krull M., Pistor S., Voss N. et al. TRANSPATH: an information resource for storing and visualizing signaling pathways and their pathological aberrations // *Nucl. Acids Res.* 2006. № 34. P. 546–551.
- Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized hill function method for modeling molecular processes // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. № 2B. P. 521–531.
- Materi W., Wishart D.S. Computational systems biology in drug discovery and development: methods and applications // *Drug Discov. Today*. 2007. V. 12. № 7/8. P. 295–303.
- Millata T., Bullinger E., Rohwer J., Wolkenhauer O. Approximations and their consequences for dynamic modelling of signal transduction pathways // *Mathem. Biosci.* 2007. V. 207. № 1. P. 40–57.
- Spainhour C.B. *Drug Discovery Handbook* / Ed. S.C. Gad. N.Y.: Wiley-InterScience, 2005. P. 41–43.
- Tyson J., Chen K., Novak B. Network dynamics and cell physiology // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001. № 2. P. 908–916.
- Ulitsky I., Shamir R. Identification of functional modules using network topology and high-throughput data // *BMC Systems Biol.* 2007. V. 1. № 8. P. 1–17.
- Welch S., Hirte H.W., Carey M.S. et al. UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: a study of the Princess Margaret Hospital Phase II consortium // *Gynecol. Oncol.* 2007. V. 106. № 2. P. 305–310.
- Zhang Y., Yu H., Deng M., Qian M. Nonequilibrium Model for Yeast Cell Cycle // *Computational Intelligence and Bioinformatics*. 2006. V. 4115. P. 786–791.

MODELLING OF REGULATORY NETWORKS IN IDENTIFICATION OF PROMISING DRUG TARGETS FOR BREAST CANCER THERAPY

O.N. Koborova¹, D.A. Filimonov¹, A.V. Zakharov¹, A.A. Lagunin¹, A. Kel², F. Kolpakov³, R. Sharipov^{3,4}, Y. Kondrachin³, V.V. Poroikov¹

¹The Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Rus. Acad. Med. Sci., Moscow, Russia, e-mail: okoborova@gmail.com; ²BIOBASE GmbH, Germany; ³LTD «Institute of Systems Biology», Novosibirsk, Russia; ⁴Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Low efficacy of current therapy is the reason for investigation of new anticancer drug targets. We proposed an algorithm for anticancer drug target identification, which is implemented in NetFlowEx program. The algorithm simulates behavior of a regulatory network on the basis of dichotomy model. The effect of drugs, which inhibit particular protein or combination of proteins in the regulatory network, is simulated by inhibition of single nodes or their pairwise combinations.

The method was applied to the case of generalized breast cancer using fragment of the regulatory network, which contains proteins involved in cell cycle regulation, apoptosis, breast cancer progression and normal formation of breast. As a result, two groups of promising targets were identified: the first – a number of targets, inhibition of which is connected with initiation of apoptosis (fibronectin receptor alpha5 beta1, fibronectin, Bcl-2, c-Jun, Jak2, Jak3, STAT3) and the second – a number of targets, inhibition of which is connected with cell cycle arrest (Cyclin A, Cyclin B, Cyclin E, Cyclin D1, CDK1, CDK2, pairs Histone H1 and Cyclin B, PDK1 and Cyclin B, PKAC and Cyclin B). Inhibitors of some identified targets are known and considered as potential drugs for therapy of malignant diseases and, in particular, for breast cancer.