

На правах рукописи

Гольцов Алексей Николаевич

Компьютерные методы системной биологии в
персонализированной лекарственной онкотерапии

Специальность 03.01.02 – «Биофизика», 03.01.08 – «Биоинженерия»

диссертация на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Москва 2017

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ОНКОТЕРАПИИ ..	18
ГЛАВА 2. ВЛИЯНИЯ ОНКОМУТАЦИЙ НА ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК	29
2.1. Разработка модели действия лекарственных препаратов на сигнальных пути пролиферации раковых клеток	30
2.2. Комбинационная активация системы клеточных рецепторов эпидермального фактора роста ErbB.....	36
2.3. Моделирование функционирования сигнальных белков и действия ингибиторов	44
2.4. Действие ингибиторов рецепторов эпидермального фактора роста на активацию PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы в опухолевых клетках	66
2.5. Исследованию механизмов резистентности PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы к действию ингибитора клеточных рецепторов	70
2.6. Анализ экспериментальных и клинических данных по проверке механизмов резистентности к ингибиторам клеточных рецепторов.....	72
ГЛАВА 3. МЕТОДЫ КОМБИНИРОВАННОЙ ОНКОТЕРАПИИ ПО ПОДАВЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ.....	77
3.1. Определение управляющего параметра PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы.....	78
3.2. Метод декомпозиции сигнальных систем и анализ выходных характеристик сигнальной системы.....	80

3.3. Методы анализа чувствительности сигнальных систем к параметрам сигнальных белков и действию ингибиторов	82
3.4. Анализ выходных характеристик системы клеточных рецепторов	84
3.5. Влияние онкомутаций на выходные характеристики протеин-киназной сигнальной системы	91
3.6. Моделирование действия комбинационной терапии, направленной на подавление резистентности в сигнальных системах клетки	96
3.7. Влияние онкомутаций на чувствительность сигнальных систем клетки к действию лекарственных препаратов	104
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ В СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ РАКОВЫХ КЛЕТОК	110
4.1. Биоинформационный анализ экспериментальных данных по экспрессии генов при активации сигнальных путей клетки.....	112
4.2. Модель генетической регуляции сигнальных систем	118
4.3. Моделирование осцилляторных режимов как метод исследования обратных связей в сигнальных системах	120
ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМЫ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ КОМБИНАЦИЙ.....	125
5.1. Биоинформационный анализ экспрессии генов при действии лекарственных препаратов.....	127
5.2. Репрограммирование сигнальных сетей при действии лекарственных препаратов и их комбинаций.....	133
ГЛАВА 6. БИОМАРКЕРЫ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИН-КИНАЗ ПРИ ОНКОМУТАЦИЯХ В РІЗК СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК	139
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РЕГУЛЯЦИЮ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ.....	147

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	154
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ	157
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ...	163
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. МОДЕЛЬ NRF2 СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ	170
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	175

Введение

В последние два десятилетия в онкологии, наряду с радио- и химиотерапией, успешно развивается лекарственная онкотерапия (ЛОТ), нацеленная на ингибирование основных сигнальных путей опухолевых клеток. Начиная с 1998 г., когда был введен в клиническую практику первый эффективный лекарственный препарат для лечения рака молочной железы, Герцептин (трастузумаб), разработаны и успешно применено большое количество лекарственных препаратов (ЛП) по ингибированию роста и метастазирования раковых опухолей в различных тканях и органах. Успехи в этой области онкотерапии главным образом достигнуты за счет разработки высокоизбирательных препаратов, ингибирующих основные сигнальные пути и клеточные рецепторы, участвующие в передаче сигналов и управлении пролиферацией и апоптозом раковых клеток. Терапия моноклональными антителами (трастузумаб, пертузумаб и др.) и химическими препаратами (лапатиниб, gefitinib и др.), ингибирующими семейство рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) и их тирозин-киназы, подавляют активацию сигналов пролиферации и вызывают апоптоз раковых клеток. Другой класс, разрабатываемых и применяющихся в клинике лекарственных препаратов, нацелен на ингибирование протеин-киназ, участвующих в сигнальных путях пролиферации клетки и клеточного цикла (ингибиторы циклин-зависимых киназ). В настоящее время ЛОТ применяется как самостоятельная терапия, так и в комбинации с радио- и химиотерапией для повышения эффективности лечения и уменьшения побочных эффектов.

Широкое применение лекарственной онкотерапии в клинической практике выявило высокую эффективность препаратов для групп пациентов с определенным набором онкомутаций и отсутствие терапевтического действия для других групп. Это избирательное действие лекарственной онкотерапии привело к развитию персонализированной терапии в онкологии (personalised

therapy), когда выбор эффективной ЛОТ тесно связан с генетическим статусом клеток опухоли пациента. Так Герцептин проявляет высокую эффективность только для пациентов с амплификацией гена *ErbB2* (*HER2*), кодирующего один из рецепторов семейства EGFR, ErbB2. В настоящее время для стратификации пациентов и выбора эффективной лекарственной онкотерапии для выделенных групп пациентов используются наборы молекулярных биомаркеров, которые определяют эффективность данного ЛП в зависимости от набора онкомутаций для данной группы пациентов.

Более того, в настоящее время персонализированная терапия определяет весь процесс разработки и применения лекарств в онкологии и включает в себя также разработку методов диагностики: новые лекарственные препараты разрабатываются непосредственно для подавления роста раковых клеток с определенными генетическими отклонениями, которые характеризуются набором биомаркерами. Одновременно с созданием новых ЛП ведется разработка молекулярных биомаркеров, определяющих эффективность данного препарата при терапии определенной группы пациентов. Это направление в персонализированной онкотерапии получило название «совместной разработки препарата и диагностики» (companion development and diagnostics).

Одной из главных проблем в персонализированной лекарственной онкотерапии является разработка надежных биомаркеров, определяющих эффективность того или иного ЛП для отобранной группы пациентов. Основной трудностью на этом пути является *de novo* и приобретенная резистентность к ЛОТ, когда ЛП не проявляет терапевтического эффекта для данного типа опухоли в начале лечения (*de novo* резистентность) или теряет свою начальную эффективность после 2-3 месяцев успешного подавления роста опухоли (приобретенная резистентность). В настоящее время молекулярные механизмы *de novo* и приобретенной резистентности для многих антираковых препаратов до конца не выяснены и являются предметом интенсивных экспериментальных и

клинических исследований. Успешные результаты этих исследований непосредственно становятся основанием для разработки молекулярных биомаркеров, определяющих эффективность того или иного препарата и выбора оптимальной лекарственной терапии для конкретной группы пациентов с определенным генотипом и фенотипом опухоли в персонализированной терапии.

Анализ большого объема полученных на сегодняшний день экспериментальных и клинических данных по геномному, протеомному и метаболомному скринингу раковых клеток и тканей показал, что главные проблемы успешного развития лекарственной онкотерапии связаны с высокой сложностью клеточных сигнальных путей, которые являются основными мишенями ЛОТ. Сегодня стало понятно, что для решения многих проблем ЛОТ требуется развитие и применение интегрального подхода системной биологии. Среди компьютерных методов, разрабатываемых для системного анализа большого объема экспериментальных и клинических данных, в настоящее время интенсивно развиваются методы компьютерного моделирования сложных сигнальных сетей клетки, как дополнительного инструмента для повышения эффективности совместных экспериментальных и клинических исследований новых стратегий ЛОТ. Преимущества использования методов компьютерной системной биологии в ЛОТ заключаются в разработке моделей сигнальных путей клетки на основе интеграции современных биофизических методов ферментативной кинетики, методов нелинейной динамики сложных регуляторных систем и биоинформационных методов анализа генетической регуляции в раковых клетках.

Сегодня в области компьютерной системной биологии ведутся разработки компьютерных моделей сложных сигнальных сетей и проводятся исследования механизмов их регуляции в норме и патологии. В результате интенсивных исследований выявлены основные регуляторные механизмы сигнальных сетей, реализующиеся за счет положительных/отрицательных прямых/обратных связей

в системе, выделены структурные модули усиления и стабилизации рецепторных сигналов в сигнальных сетях, определены логические элементы интеграции и дискриминации параллельных и последовательных сигналов, обнаружены элементы переключения сигнальных, генетических и метаболических клеточных путей в зависимости от внешних условий. Во многих университетских центрах по системной биологии и фармакологических компаниях (GSK, Roche, Genentech и др.) полученные результаты по функционированию и регуляции сигнальных сетей клетки непосредственно используются для поиска и анализа новых белково-мишеней для ЛОТ и анализа эффективности новых ЛП. В частности, на основе компьютерного моделирования сигнальных путей фармакологическая компания Merrimack Pharmaceuticals, USA разработала ингибитор ErbB3 рецепторов двойного действия, MM-121, проходящий в настоящее время клинические испытания.

К настоящему времени область компьютерной системной биологии в области лекарственной онкологии развиваются преимущественно по направлению моделирования сигнальных путей клетки и исследования различных режимов их функционирования в норме, когда ингибирование отдельных рецепторов и сигнальных белков при действии ЛП, как правило, приводит к эффективному подавлению выходного сигнала полной системы. Применение разработанных моделей к исследованию ответов сигнальных систем на действия ЛП в раковых клетках, в общем случае, не дает надежных результатов. Это связано с существенными изменениями функционирования многих сигнальных путей и их генетической регуляции в раковых клетках, происходящими в результате онкомутаций, а также активации компенсаторных механизмов раковых клеток при их адаптации к ЛОТ, что ведет к развитию лекарственной резистентности. В связи с этим актуальным является задача развития методов моделирования функционирования сигнальных систем при их модификациях в результате онкомутаций в опухолевых клетках и их применение к разработке эффективных

стратегий лекарственной онкотерапии, направленных на преодоления лекарственной резистентности.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является разработка компьютерных методов моделирования ингибирующего действия новых лекарственных препаратов на клеточные сигнальные пути опухолевых клеток при онкомутациях и применение развитых методов в совместных экспериментальных и клинических исследованиях, направленных на создание новых стратегий в лекарственной персонализированной онкотерапии и преодоление лекарственной резистентности при различных онкомутациях в раковых клетках. Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи**:

- Разработка компьютерной модели активации RAS/RAS/MEK/ERK (ERK) и PI3K/PTEN/AKT/mTOR/S6K1 (PI3K) сигнальных путей, контролирующих пролиферацию и апоптоз в раковых клетках. Определение параметров модели на основе *in vitro* экспериментальных данных для линий опухолевых клеток яичников с различным набором онкомутаций генов, кодирующих сигнальные белки.
- Применение разработанной модели для тестирования действия лекарственных препаратов, ингибирующих клеточных рецепторов ErbB2,3 и PI3K сигнальный путь в линиях опухолевых клеток яичников.
- Разработка математических методов исследования молекулярных механизмов потери чувствительности и возникновения резистентности раковых клеток к действию лекарственных препаратов, ингибирующих клеточные рецепторы, при различных онкомутациях генов, кодирующих белки в PI3K сигнальном пути опухолевых клеток.
- Разработка методов комбинированной лекарственной терапии с целью

подавления резистентности к ингибиторам клеточных рецепторов при различных онкомутациях генов, кодирующих белки в PI3K сигнальном пути.

- Разработка методов исследования генетической регуляции в сигнальных системах клетки на основе биоинформационного анализа экспериментальных данных по изменению экспрессии генов при активации сигнальных систем и действии лекарственных препаратов.
- Развитие методов исследования систем обратных связей и генетической регуляции в ERK и PI3K сигнальных путях на основе анализа возникновения осцилляторных режимов в сигнальных системах, вызванных влиянием онкомутаций и действием ингибиторов сигнальных белков.
- Применение развитых методов компьютерного моделирования для исследования эффективности ингибиторов протеин-киназ в ERK и PI3K сигнальных путях: ингибитора mTOR1 комплекса, ингибитора PI3K киназы и ингибитора двойного действия в клеточных линиях опухолей яичников.
- Разработка методов исследования эффективного действия ЛП в *in vivo* экспериментах на опухолях ксенотрансплантатных мышей на основе анализа экспериментальных биоинформационных данных по изменению экспрессии генов в раковых клетках, вызванных лекарственной интервенцией.
- Применение развитых методов моделирования сигнальных систем для разработки комбинированной лекарственной терапии с целью преодоления лекарственной резистентности, вызванной модификацией (репрограммированием) сигнальных путей при генетической активации адаптационных механизмов клетки в результате действия лекарственных препаратов.
- Разработка модели NRF2-сигнальной регуляции антиокислительной системы клетки и ее применение к описанию окислительного стресса, вызванного действием ингибиторов ErbB2 рецепторов в клеточных линиях рака яичников.

Научная новизна. В работе впервые развиты методы компьютерного моделирования молекулярных механизмов резистентности сигнальных путей пролиферации раковых клеток к ингибирующему действию лечебных препаратов при различных мутациях генов, кодирующих белки в сигнальных путях раковых клеток. При этом впервые получены следующие конкретные результаты:

1. Показана эффективность применения нового лекарственного препарата, пертузумаба (ингибитора ErbB2 рецепторов), для ингибирования PI3K сигнального пути в линиях опухолевых клеток яичников. Определен молекулярный биомаркер эффективного действия данного ЛП: соотношение экспрессии рецепторов ErbB3/ErbB2.
2. Установлено, что в PI3K сигнальном пути происходит потеря чувствительность к ингибитору ErbB2 рецепторов при 50% потере активности фосфатазы PTEN в результате мутаций или делеции гена *PTEN*. Показано, что мутации *PTEN* являются компенсаторным механизмом, вызывающим активацию PI3K сигнальной системы при ингибировании рецепторных сигналов в опухолевых клетках.
3. Полученные результаты подтверждены в *in vitro* экспериментах на клеточных линиях опухоли яичников и в клинических исследованиях на группе онкологических пациентов с мутациями гена *PTEN*.
4. На основе анализа выходных характеристик сигнальной системы определен биомаркер эффективности ингибитора ErbB2 рецепторов при мутациях белков в PI3K сигнальной системе: соотношение активностей белков PTEN, PI3K и АКТ.
5. Применение анализа чувствительности выходных характеристик сигнальной системы к разработке методов комбинированной онкотерапии для подавления резистентности к ингибиторам клеточных рецепторов при

различных мутациях генов, кодирующих белки в PI3K сигнальном пути.

6. Установлено, что ингибирование PI3K киназы восстанавливает чувствительность PI3K сигнальной системе к действию ингибитора ErbB2 рецептора при онкомутациях генов *PTEN*, *PIK3CA* и *AKT1,2*. Эффективность комбинации ингибиторов ErbB2 рецепторов и PI3K киназы подтверждена в *in vitro* экспериментах на клетках опухоли яичников.
7. Разработка методов исследования генетической регуляции в кинетических моделях сигнальных систем на основе биоинформационного анализа экспериментальных данных по изменению экспрессии генов, вызванной активацией сигнальных систем и действием лекарственных препаратов.
8. Показано, что отрицательная обратная связь в ERK сигнальной системе модулируется генетической регуляцией и приводит к осцилляциям выходного сигнала в данной системе при нарушении генетической регуляции. Установлено существование положительной связи между ERK и PI3K сигнальными путями на основе исследования возникновения осцилляторных режимов, вызванных действием ингибиторов и онкомутаций.
9. Развита методы для тестирования ингибиторов киназ в PI3K сигнальном пути: ингибиторов mTOR1 комплекса, PI3K и ингибитора двойного действия для линий клеток опухолей яичников с различными мутациями в сигнальных системах. Установлено, что действие рапамицина приводит к эффективному ингибированию выходного сигнала S6K1 киназы и подавлению отрицательных обратных связей в PI3K сигнальной системе, что вызывает активацию промежуточного AKT сигнала в данной системе. Показано, что в исследуемых клетках активации AKT является биомаркером эффективного действия ингибитора mTOR1 комплекса.
10. Показано, что для анализа длительного действия лекарственных препаратов необходимо учитывать эффекты модификации (репрограммирования) сигнальных путей в результате изменения экспрессии генов, вызванных

действием лекарственных препаратов.

Научная и практическая значимость. Развитые компьютерные методы непосредственно использованы в совместных экспериментальных и клинических исследованиях эффективности действия новых лекарственных препаратов в онкотерапии, которые были проведены в Центре Исследования Рака Эдинбургского Университета и West General Hospital Эдинбурга. Результаты работы применялись при планировании *in vitro* экспериментов и анализа промежуточных и окончательных экспериментальных результатов. В результате работы были предложены биомаркеры эффективности ряда ЛП, которые были проверены в экспериментах и клинических испытаниях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Компьютерная модель сигнальных систем клетки для исследования влияния онкомутаций на эффективность лекарственных препаратов и изучения молекулярных механизмов возникновения резистентности к антираковым лекарственным препаратам, ингибирующим ERK и PI3K сигнальные пути для различных линий раковых клеток.
2. Методы компьютерного моделирования для исследования чувствительности и резистентности клеточных сигнальных путей на действия ингибиторов ErbB рецепторов при моно- и комбинированной терапии при следующих мутациях онкогенов и генов-онкосупрессоров в сигнальных путях: *GrbB2 (HER2)*, *PTEN*, *PIK3CA*, *АКТ*.
3. Метод определения биомаркеров эффективности лекарственных препаратов, ингибиторов клеточных рецепторов в опухолевых клетках.. Показано, что мутация гена-онкосупрессора *PTEN* является биомаркером к действию ErbB рецепторов. Установлено, что баланс активностей киназы PI3K и фосфатазы PTEN обеспечивает чувствительность PI3K сигнального пути к рецепторным

сигналам и действию ингибиторов ErbB2,3 рецепторов.

4. Концепция компенсаторной регуляции сигнальных путей в раковых клетках при действии ингибиторов клеточных рецепторов. Методами численного моделирования показано, что компенсаторные мутации в сигнальных сетях обеспечивают робастность сигналов клеточной пролиферации при действии лекарственных препаратов и приводят к потере чувствительности к лекарственной онкотерапии.
5. Методы анализа обратных связей и генетической регуляции в сигнальных системах на основе анализа осцилляторных режимов, возникающих в системах. Влияние лекарственных препаратов на систему обратных связей и осцилляции в сигнальных системах раковых клеток.
6. Методов разработки эффективной комбинационной терапии с учетом изменением экспрессии генов при длительном действии лекарственных препаратов, вызывающих активацию адаптационных механизмов клетки.
7. Совместная кинетическая модель PI3K сигнальных систем и NRF2-зависимой регуляции антиокислительной системы клетки, на основе анализа которой установлено, что действию ингибиторов ErbB2 рецепторов сопровождается окислительным стрессом в раковых клетках.

Личный вклад автора. Представленные в диссертации результаты теоретических исследований выполнены лично автором в рамках совместных проектов в коллаборации с экспериментальными группами Эдинбургского, Астон, Сент-Эндрюс и Абертей Университетов Великобритании. Разработанные автором компьютерные модели клеточных сигнальных систем полностью оригинальны. Автор также внес существенный вклад в планирование проведенных экспериментов по параметризации разработанных моделей и проверке теоретических предсказаний. Экспериментальные работы были выполнены коллабораторами проекта в Центре Исследования Рака

Эдинбургского университета, в Астон, Сент-Эндрюс и Абертей Университетах. Статистический и бионформационный анализы полученных экспериментальных данных были выполнены также лично автором.

Апробация результатов. Результаты работы докладывались на научных семинарах Центра Системной Биологии Эдинбургского университета и Абертей университета, г. Данди, Великобритания, а также были представлены на 17 международных конференциях.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 статьи в рецензируемых научных изданиях, из которых 18 входят в библиографические базы Scopus (15) и Web of Science (3), а также 3 главы в коллективных монографиях.

Публикации автора в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, опубликованные по теме диссертации

1. **Goltsov A**, Tashkandi G, Langdon SP, Harrison DJ, Bown JL. Kinetic modelling of in vitro data of PI3K, mTOR1, PTEN enzymes and on-target inhibitors Rapamycin, BEZ235, and LY294002. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (2017) 170–181.
2. Bown, J.L., Shovman, M., Robertson, P., Boiko, A., **Goltsov, A.**, Mullen, P., Harrison, D.J., A signaling visualization toolkit to support rational design of combination therapies and biomarker discovery: SiViT. *Oncotarget*. 2017; 8:29657-29667. doi: 10.18632/oncotarget.8747
3. Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Sokolovski S.G., **Goltsov A.**, Gekaluyk A.S., Saranceva E.I., Bragina O.A., Tuchin V.V., Rafailov E.U. Laser-induced generation of singlet oxygen and its role in the cerebrovascular physiology.

Progress in Quantum Electronics, 2017, 25 May,
doi.org/10.1016/j.pquantelec.2017.05.001

4. **Goltsov A.**, Anisimova A.V., Zakharkina M., Krupatkin A.I., Sidorov V.V., Sokolovski S.G., Rafailov E.U. Bifurcation in blood oscillatory rhythms for patients with ischemic stroke: a small scale clinical trial using laser Doppler flowmetry and computational modelling of vasomotion. *Frontiers in Physiology*, 23 March 2017 doi.org/10.3389/fphys.2017.00160.
5. Khalil, H.S., Langdon, S.P., **Goltsov, A.**, Soininen, T., Harrison, D.J., Bown, J., Deeni, Y.Y., A novel mechanism of action of HER2 targeted immunotherapy is explained by inhibition of NRF2 function in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2016. 2016 Nov 15;7(46):75874-75901. doi: 10.18632/oncotarget.12425.
6. Khalil HS, **Goltsov A**, Langdon SP, Harrison DJ, Bown J, Deeni Y. Quantitative analysis of NRF2 pathway reveals key elements of the regulatory circuits underlying antioxidant response and proliferation of ovarian cancer cells. *J Biotechnology*, 11, 2014; DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.027
7. **Goltsov, A**, Langdon SP, Goltsov G, Harrison DJ, Bown J. Customizing the therapeutic response of signaling networks to promote antitumor responses by drug combinations. *Front. Oncol.* 2014, 4, 13.
8. Sokolovski S, Zolotovskaya S, **Goltsov A**, Pourreyaon C, South A, Rafailov E. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Scientific Reports*, 2013, 3:3484.
9. Sokolovski SG, **Goltsov A**, Rafailov EU. Modelling the hypersensitivity of cancer cells to infra-red laser pulse: breaking ROS defence machinery. *Proc. SPIE 8568*, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXII, 85680E, 2013, doi:10.1117/12.2001715.
10. Hu H, **Goltsov A**, Bown J, Sims AH, Langdon SP, Harrison DJ, Faratian D. Feedforward and feedback regulation of the MAPK and PI3K oscillatory circuit in breast cancer. *Cellular Signalling*. 2013 Jan;25(1):26-32.

11. **Goltsov A**, Faratian D, Langdon SP, Harrison DJ, Bown J. Features of the reversible sensitivity-resistance transition in ERK/PI3K/PTEN/AKT signalling network at HER2 inhibition. *Cellular Signalling*. 2012 Feb;24(2):493-504.
12. Lebedeva G, Sorokin A, Faratian D, Mullen P, **Goltsov A**, Langdon SP, Harrison DJ, Goryanin I. Model-based global sensitivity analysis as applied to identification of anti-cancer drug targets and biomarkers of drug resistance in the ErbB2/3 network. *Eur J Pharm Sci*. 2012, Jul 16;46(4):244-58.
13. Bown J, Andrews PS, Deeni Y, **Goltsov A**, Idowu M, Polack FAC, Sampson AT, Shovman M, Stepney S. Engineering simulations for cancer systems biology. *Curr Drug Targets*. 2012 Nov;13(12):1560-74.
14. Tummala H, **Goltsov A**, Khalil HS, Sproul A, Scott F, Mitev V, Zhelev N. Advocating the need of prediction models for individualized prognosis and treatment in B-CLL disease patients. *BioDiscovery* 2012, Dec 6: 3.
15. **Goltsov A**, Faratian D, Langdon SP, Bown J, Goryanin I, Harrison DJ. Compensatory effects in the PI3K/PTEN/AKT signaling network following receptor tyrosine kinase inhibition. *Cellular Signalling*. 2011, 23, 407-416.
16. **Goltsov A**, Lebedeva G, Humphery-Smith I, Goltsov G, Demin O, Goryanin I. *In Silico* Screening of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Their Combined Action on Prostaglandin H Synthase-1. *Pharmaceuticals* 2010, 3, 2059-2081.
17. Faratian D, **Goltsov A**, Lebedeva G, Moodie S, Mullen P, Kay C, Um IH, Langdon S, Goryanin I, and Harrison DJ. Systems biology reveals new strategies for personalising cancer medicine and confirms PTENs role in resistance to trastuzumab, *Cancer Research* 2009, 69, 6713.
18. **Goltsov A**, Maryashkin A, Swat M, Kosinsky Y, Humphery-Smith I, Demin O, Goryanin I, Lebedeva G. Kinetic modelling of NSAID action on COX-1: Focus on *in vitro/in vivo* aspects and drug combinations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 2009, 122-136.

Публикации автора в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных PubMed и Science Citation Index, опубликованные по теме диссертации

19. Adams R, Clark A, Yamaguchi A, Hanlon N, Tsorman N, Ali S, Lebedeva G, Goltsov A, Sorokin A, Akman OE, Troein C, Millar AJ, Goryanin I, Gilmore S. SBSI: An extensible distributed software infrastructure for parameter estimation in systems biology. *Bioinformatics*. 2013 Mar 1;29(5):664-5.
20. Goltsov A., Deeni Y., Khalil H.S., Soininen T., Kyriakidis S., Hu H., Simon Langdon P., Harrison D.J. and Bown J. Systems Analysis of Drug-Induced Receptor Tyrosine Kinase Reprogramming Following Targeted Mono- and Combination Anti-Cancer Therapy. *Cells* 2014, 3(2), 563-591; doi:10.3390/cells3020563.

Главы в коллективных монографиях

1. **Goltsov A**, Deeni Y, Khalil H, Idowu M, Kyriakidis S, Goltsov G, Langdon SP, Harrison DJ, Bown J. Role of Post-translational Regulation of PTEN Activity in Cancer Cell Addiction to Heterozygous PTEN Mutations. In book *PTEN: Structure, Mechanisms-of-Action, Role in Cell Signaling and Regulation*. Editors: Ke Xu. Nova Science Publishers, 2013 (pp. 173-210)
2. **Goltsov, A**, Langdon SP, Goltsov G, Harrison DJ, Bown J. Customizing the therapeutic response of signaling networks to promote antitumor responses by drug combinations. In e-book *Drug-Diagnostics Co-Development in Oncology*. Ed. JT Jørgensen. Frontiers in Oncology. 2014, ISBN 978-2-88919-332-5
3. Bown J, Deeni Y, **Goltsov A**, Khalil H, Isaacs J, Li Y, Sampson AT, Savage A., Zhelev N. Cancer systems biology: Integrating experimental and theoretical systems at cellular and tissue scales. In book *Current Application of Biotechnology*. Ed. M. Dunder, 357-386, Erciyes University Publishing, 2015, ISBN: 978-605-85579-0-1.

Глава 1. Компьютерное моделирование динамических свойств клеточных сигнальных системы в лекарственной онкотерапии

В настоящее время методы компьютерной системной биологии развиваются в направлении прикладных исследований в области лекарственной онкотерапии. Методами компьютерного моделирования ведутся исследования функционирования клеточных сигнальных систем регуляторов роста раковых опухолей – основных мишеней лекарственных препаратов антираковой терапии. Применение системного подхода обусловлено высокой сложностью сигнальных систем и их регуляцией на системном уровне. Сложность исследований существенно возрастает при учете влияния онкомутаций, вызывающих потерю чувствительности к действию лекарственных препаратов и приводящих к лекарственной резистентности. Методы системной биологии в онкологии направлены на исследование влияния действия лекарств, ингибирующих отдельные белки-мишени на такие системные функционирование сигнальных систем клетки, как пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и адаптацию к лекарственной интервенции в раковых клетках.

Применение методов компьютерного моделирования в онкологических исследованиях и терапии требует создание надежных компьютерных моделей динамики сложных сигнальных систем клетки и их регуляции. С этой целью при развитии системных подходов в области онкологии используется богатый арсенал теоретических методов кинетики ферментативных реакций (Рубин, Пытьева, & Ризниченко, 1987), (Березин & Варфоломеев, 1979), (Cornish-Bowden, 2004), биофизики и молекулярной биологии клеточных процессов (Иваницкий, Кринский, & Сельков, 1978), (Волькенштейн, 1988), нелинейной динамики сложных систем и биоинформатики генетических регуляторных сетей.

Большие успехи достигнуты в исследовании системных и регуляторных свойств основных сигнальных систем в раковых клетках, которые ответственны

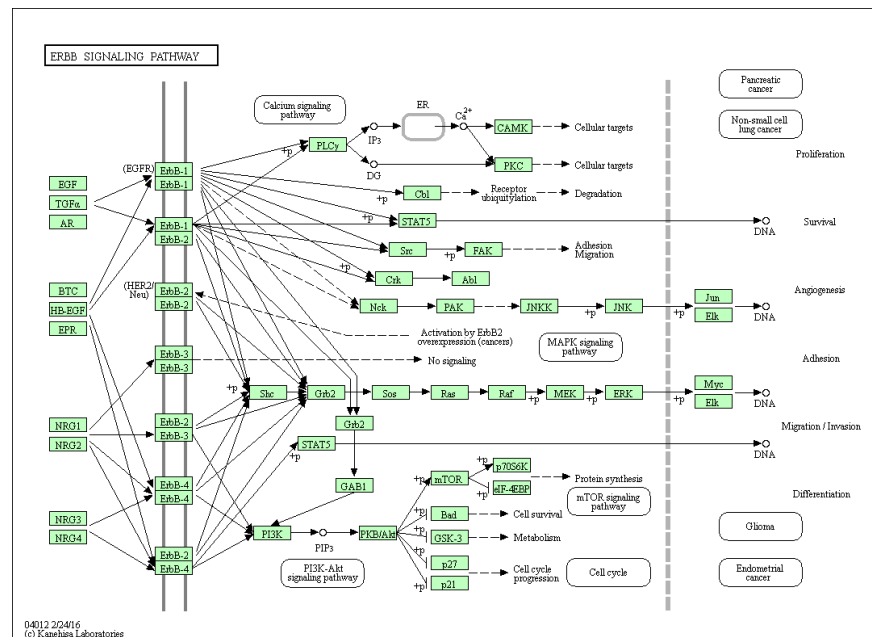


Рис. 1-1. Схема ErbB-зависимой сигнальной системы, включающей семейство ErbB клеточных рецепторов (ErbB1, ErbB2, ErbB3 и ErbB4) и сигнальных пути пролиферации, дифференцировки и апоптоза клетки, PI3K/PTEN/AKT и RAS/MEK/ERK (KEGG база данных (<http://www.genome.jp>))

за рост раковой опухоли. Одним из важных сигнальных путей, проявляющих повышенную активность в раковых клетках, является сигнальная система клетки под управлением рецепторов эпидермальных факторов роста (EGFR, ErbB) (Citri & Yarden, 2006). Активации ErbB клеточных рецепторов ведет к передаче сигнала по PI3K/PTEN/AKT и RAS/MEK/ERK сигнальным путям, которые регулируют клеточную пролиферацию, процессы дифференцировки клетки, синтез белков и апоптоз клеток. Схема ErbB-зависимой сигнального пути приведена на Рис. 1. Сигнальная система включает следующие подсистемы: семейство ErbB тирозинкиназных рецепторов; систему белков-адаптеров и протеин-киназную PI3K/PTEN/AKT и RAS/MEK/ERK системы передачи

сигналов. Семейство тирозинкиназных рецепторов включает в себя следующие рецепторы: ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4), которые обладают тирозинкиназной активностью в цитоплазматическом домене рецептора (Citri & Yarden, 2006). Рецепторы ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) обладают следующими особенностями.

Рецептор ErbB2 не имеет известных лигандов, а ErbB3 обладает слабой тирозинкиназной активностью и требует для своей активации связывания с другими членами ErbB семейства (Citri & Yarden, 2006). Связывание рецепторов с соответствующими лигандами вызывает гомо- и гетеродимеризации рецепторов, что приводит к активации рецепторных тирозин киназ (RTK) и транс- и авто-фосфорилирование тирозиновых остатков на цитоплазматическом доменах рецепторов. Кинетика активации рецепторов существенно зависит от уровней экспрессии ErbB1-4 рецепторов, которые существенно отличаются для различных клеток. Например, повышенная экспрессия ErbB2 рецепторов в раковых клетках приводит к спонтанной активации сигнальных путей пролиферации клетки в отсутствии лигандов в результате гомодимеризации и авто-фосфорилирования тирозиновых остатков ErbB2 рецепторов (Ghosh et al., 2011; Landgraf, 2007). При нормальном уровне экспрессии ErbB2 рецепторы являются ко-рецепторами для ErbB1,3,4 и образуют активные гетеродимеры при связывании с лигандами. ErbB1,3,4 рецепторы связываются с лигандами, которые специфичны к определенному типу рецепторов. ErbB1 (EGFR) активируется, по крайней мере, шестью лигандами, среди которых EGF, NGF α (transforming growth factor α), HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), AREG (amphiregulin), EREG (epiregulin), и BTC (betacellulin) (Yarden & Sliwkowski, 2001). ErbB3,4 рецепторы активируются в результате связывания с лигандами нейрегулина NRG1, NRG2, NRG3 и NRG4 (Holbro & Hynes, 2004) (Рис. 1-1).

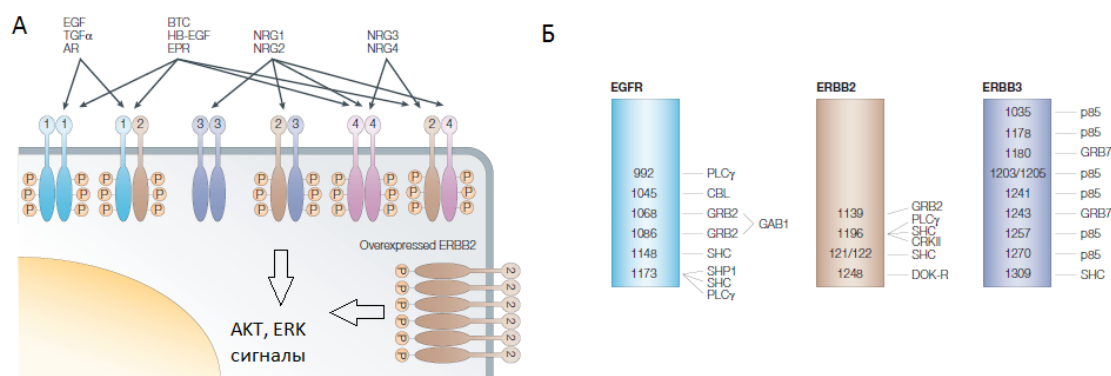


Рис. 1-2. Димеризация ErbB1, ErbB2, ErbB3 и ErbB4 рецепторов, вызывающая активацию PI3K/PTEN/AKT и RAS/MEK/ERK сигнальных путей (А). Фосфо-сайты связывания рецепторной системы с белками-адаптерами и сигнальными белками (Б).

Ко-экспрессия различных типов рецепторов семейства ErbB и их лигандов приводит к комбинаторной сложности динамики активации ErbB рецепторной сети. Предполагается, что такая структура и избыточность в системе обеспечивает робастность генерации и передачи клеточных сигналов (Citri & Yarden, 2006). Модель ErbB рецепторной сети, учитывающая ее комбинаторную сложность, развита в работе (Samaga et al., 2009). Кинетическая модель сигнальной системы, учитывающая трансактивацию ErbB рецепторной сети и интеграцию сигналов от различных димерных рецепторных комплексов, разработана в работе (Joslin et al., 2010).

Сложная регуляция ко-экспрессии различных рецепторов в сети ErbB рецепторов и их лигандов происходит в клетках при нормальном развитии тканей. При этом независимые программы регулируют экспрессию ErbB рецепторов на различных этапах развития органов обеспечивают согласованный рост и миграцию клеток при морфогенезе (Bubliil & Yarden, 2007; Holbro & Hynes, 2004). В опухолевых тканях ErbB рецепторы и их лиганды играют существенную роль при трансформации клеток и формировании различных фенотипов раковых клеток (Normanno et al., 2005).

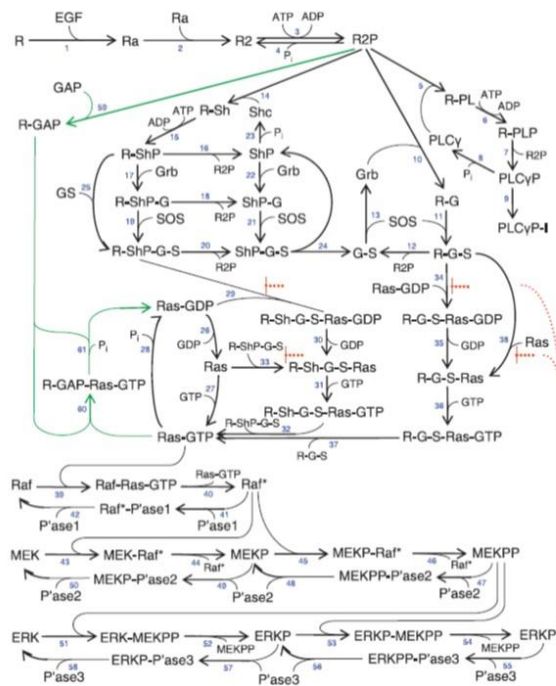


Рис. 1-3. Схема кинетической модели активации RAS/MEK/ERK сигнального пути, учитывающей кинетику связывания рецепторов с белками-адаптерами Shc, GAP и Grb2 (Wolf, Dronov, Tobin, & Goryanin, 2007).

Следующий уровень сложности ErbB рецепторной сети связан с системой белков-адаптеров, которые связываются с фосфо-тирозиновыми остатками рецепторов и образуют сайты связывания для белков сигнальных путей PLC γ , PI3K/AKT/mTOR, MAPK, и STAT (Alroy & Yarden, 1997; Schulze, Deng, & Mann, 2005) (Рис. 1-1). На Рис. 1-2 показаны сайты связывания для белков-адаптеров Shc и Grb2, которые связывают SOS белок и p85 регуляторную субъединицу киназы PI3K. Видно, что рецепторы могут связывать белки сигнальных систем как напрямую, так и посредством белков-адаптеров. Учет данной системы связи между ErbB рецепторной сети и сигнальными путями передачи сигналов существенно усложняет модели сигнальных путей. Кинетические модели, учитывающие данные процессы, были разработаны в работах нескольких исследовательских групп (Wolf et al., 2007), (Nguyen, Matallanas, Croucher, von

Kriegsheim, & Kholodenko, 2013), (W. W. Chen et al., 2009). На Рис. 1-3 приведена схема кинетической модели активации RAS/MEK/ERK сигнального пути, учитывающая кинетику связывания рецепторов с белками-адаптерами Shc, GAP и Grb2 (Wolf et al., 2007).

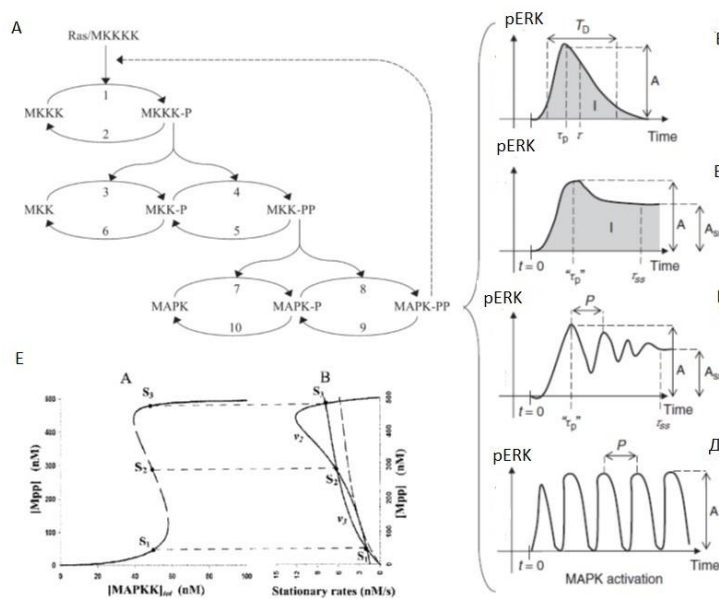


Рис. 1-4. Схема модели MAP киназного сигнального пути (А). Различные pERK сигналы, в сигнальной системе: переходный сигнал (А); постоянный сигнал (Б); затухающие осцилляции (Г) и осцилляторный сигнал (Д). Зависимость выходного сигнала сигнальной системы от входного сигнала (Е).

Следующий уровень сложности ErbB сигнальной системы связан с путями передачи и распространения рецепторных сигналов в клетку и клеточное ядро, которые включают PI3K/АКТ/mTOR/S6K1, и MAP киназный (RAS/MEK/ERK) сигнальные пути (Рис. 1-1), состоящие из каскадов реакций фосфорилирования и десфосфорилирования протеин-киназ. Выходными сигналами этих сигнальных сетей являются фосфорилированные формы киназ АКТ, mTOR1, S6K1 и ERK, которые либо активируют факторы транскрипции, регулирующие экспрессию белков пролиферации, либо передают сигнал в другие сигнальные пути и регуляторные сети (апоптоза, трансляции белков и т.д.). Моделированию этих

сигнальных путей посвящено большое количество работ. Так в работе (W. W. Chen et al., 2009) разработана модель PI3K/AKT и RAS/MEK/ERK сигнальных путей, учитывающая ко-экспрессию ErbB1,2,3,4 рецепторов. Модель включает 28 белков и рецепторов, 471 белковых комплексов, возникающих в результате 828 реакций, и описывается 499 обыкновенными дифференциальными уравнениями. В результате моделирования установлено, что сигнальная система обладает усилительными свойствами: AKT и ERK выходные сигналы формируются при низких рецепторных сигналах, гораздо ниже констант диссоциации для связывания рецептор-лиганд. Усилительные свойства RAS/MEK/ERK сигнального пути также были исследованы в работе (Sturm et al., 2010). Взаимодействие между PI3K/AKT и RAS/RAF/MEK/ERK сигнальными путями за счет ингибирования киназы RAF киназой AKT исследовано в рамках модели, развитой в работе (Wang, Cirit, & Haugh, 2009).

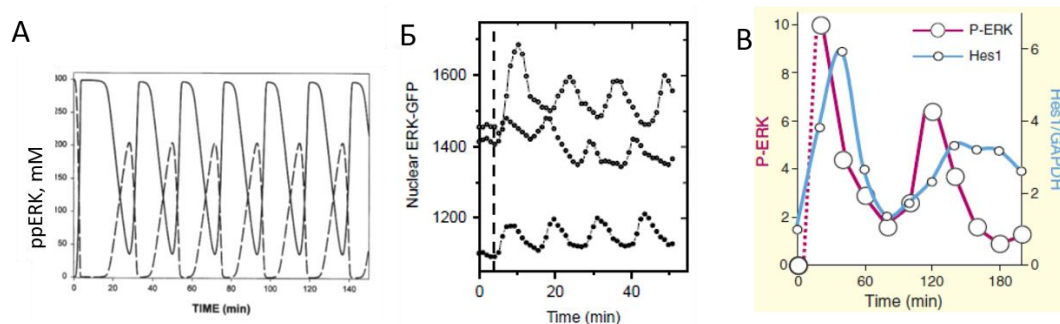


Рис. 1-5. Осцилляции в RAS/MEK/ERK сигнальной системе. Осцилляции концентрации pERK, предсказанные теоретически в модели сигнальной системе (B N Kholodenko, 2000) (A). Экспериментальное наблюдение pERK осцилляций (Shankaran et al., 2009) (Б) и (Nakayama, Satoh, Igari, Kageyama, & Nishida, 2008) (B).

Теоретические исследования динамических особенностей функционирования RAS/RAF/MEK/ERK сигнального пути были выполнены в группе под руководством Б.Н. Холоденко в серии работ (B N Kholodenko, 2000),

(Borisov et al., 2009), (Boris N. Kholodenko & Birtwistle, 2009). Результаты моделирования показали, что в системе каскадных реакций фосфорилирования/дефосфорилирования протеин-киназ с отрицательной обратной связью (Рис. 1-4 (А)) в зависимости от параметров модели и силы обратной связи могут наблюдаться следующие выходные сигналы: постоянный сигнал (Рис. 1-4Б)), переходный сигнал (одиночный импульс) (Рис. 1-4В), а также возникать затухающие и незатухающие осцилляции выходного сигнала pERK (Рис. 1-4Г,Д). Показано, что в данной нелинейной системе функция отклика может изменяться от плавной сигмоидной кривой до кривой с высоким коэффициентом Хилла, что соответствует возникновению в системе гиперчувствительного режима с усилением. Также работе показано, что функция отклика данной системы может иметь гистерезисный характер, что соответствует возникновению бистабильного режима (режима переключения) в системе или переходу системы в осцилляторный режим (Рис. 1-4Е). На основе проведенного анализа в работе (B N Kholodenko, 2000) была предсказана возможность возникновения осцилляций pERK сигнала в MAP киназной системе (Рис. 1-5А). Возникновение осцилляторного режима в RAS/RAF/MEK/ERK сигнальном пути был подтвержден экспериментально в работах (Shankaran et al., 2009), (Nakayama et al., 2008) (Рис. 1-5Б,В) .

Следующий уровень сложности в сигнальных системах возникает при учете генетической регуляции, которая приводит не только к изменению экспрессии сигнальных белков, но также формирует петли отрицательной обратной связи в сигнальных системах. Так в работе (Nakakuki et al., 2010) развита модель RAS/MEK/ERK сигнального пути с учетом генетической регуляции, формирующейся за счет экспрессии фосфатазы DUSP и фактора транскрипции c-FOS (Рис. 1-6А). В результате анализа функционирования системы была разработана логическая схема регуляции, которая позволяет дискриминировать постоянный и переходный pERK сигналы в системе (Рис. 1-6Б).

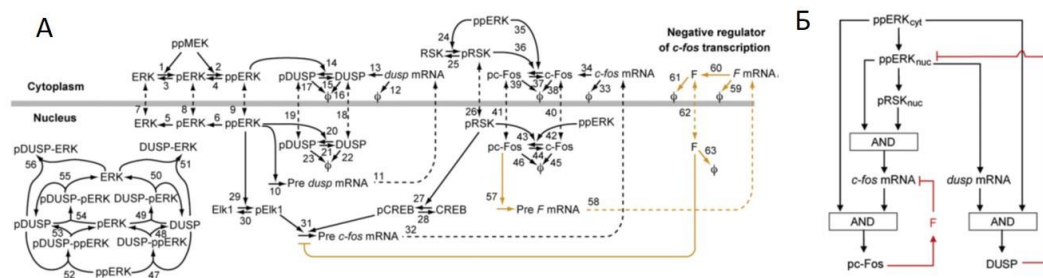


Рис. 1-4. Схема кинетической модели RAS/MEK/ERK сигнального пути с учетом генетической регуляции за счет экспрессии фосфатазы DUSP и фактора транскрипции c-FOS (А). Логическая, схема регуляции, предложенная на основе моделирования RAS/MEK/ERK сигнальной системы с генетической регуляцией (Б) (Nakakuki et al., 2010).

Разработанные модели сигнальных путей применяются в настоящее время для исследования действия антираковых лекарственных препаратов, ингибирующих ErbB1,2,3,4 рецепторы, их тирозин-киназы, а также протеинкиназы в PI3K/АКТ и RAS/RAF/MEK/ERK сигнальных путях. Так в совместной работе Массачусетского Технологического Института (MIT) и фармацевтической компании Merrimack Pharmaceuticals USA была разработана модель активации PI3K/АКТ и RAS/RAF/MEK/ERK сигнальных путей (499 ОДУ) и применена к исследованию действия лекарственных препаратов gefitinib (Iressa) и lapatinib (Tyverb), ингибиторов тирозин-киназ ErbB1 и ErbB2 рецепторов (W. W. Chen et al., 2009). Результаты моделирования показали хорошее согласие с экспериментальными дозовыми зависимостями, полученными для указанных ингибиторов в экспериментах на клеточных линиях эпидермальной карциномы A431 с высоким уровнем экспрессии ErbB1 рецепторов.

Действие ингибитора MEK киназы U0126 было исследовано в модели PI3K/АКТ и RAS/RAF/MEK/ERK сигнальных путей, развитой в группе под руководством Б.Н. Холоденко (Birtwistle et al., 2007). Полученная в модели дозовая

зависимость для U0126 удовлетворительно описывают экспериментальные данные, полученные для MCF-7 клеточной линии рака молочной железы.

В Отделении Системной биологии Фармацевтической компании Merrimack Pharmaceuticals USA была развита кинетическую модель PI3K/AKT и RAS/RAF/MEK/ERK сигнального путей для тестирования нового ингибитора ErbB рецепторов (Schoeberl et al., 2009). В совместных теоретических и экспериментальных исследованиях был разработан новый лекарственный препарат MM-1221 (моноклональное антитело), ингибирующий связывание лиганда HRG с ErbB3 рецепторами. Новый ингибитор показал высокую эффективность подавления роста опухоли в ксенотрансплантатных мышцах и в настоящее время разработанный ингибитор проходит клинические испытания.

Все работы обсужденные выше посвящены моделированию сигнальных путей и применению к анализу действия лекарственных препаратов для случая функционирования систем в норме, когда в клетке отсутствуют мутации. В работах исследуются, главным образом, режимы функционирования систем, когда выходной сигнал системы является плавной функцией входного рецепторного сигнала. Действие ингибиторов рецепторов или протеин-киназ в системе приводит к ингибированию выходного сигнала в соответствии с передаточной функцией системы (W. W. Chen et al., 2009). Влияние онкомутаций на функционирование сигнальных систем и действие лекарственных препаратов было исследовано в нескольких работах. Так в рамках модели PI3K/AKT и RAS/RAF/MEK/ERK сигнальной системы, развитой в группе под руководством Б.Н. Холоденко (Birtwistle et al., 2007), было показано, что повышенная экспрессия ErbB2 рецепторов, наблюдающаяся в 25% рака молочной железы, приводит к трансформации переходного выходного ERK сигнала к постоянному сигналу. В цитированной выше работе (W. W. Chen et al., 2009) в рамках развитой модели PI3K/AKT и RAS/RAF/MEK/ERK сигнальных путей была показано эффективность действия лекарственных препаратов

гефитиниб и лапатиниб, ингибиторов тирозин-киназ ErbB1 и ErbB2 рецепторов, на клеточные линии эпидермальной карциномы A431 с высоким уровнем экспрессии ErbB1 рецепторов.

Данная работа посвящена применению методов компьютерного моделирования к исследованию функционирования клеточных сигнальных сетей как в норме, так и при наличии онкомутации генов, кодирующих сигнальные белки. Разработанные модели применяются к анализу действия лекарственных препаратов на сигнальные системы при онкомутациях. В работе рассмотрены мутации генов, кодирующие ErbB рецепторы и белки в PI3K/АКТ и RAS/RAF/MEK/ERK сигнальных путях, которые встречаются наиболее часто в различных типа рака (Yuan & Cantley, 2008). Так мутации *PIK3CA*, *PTEN* и *ErbB2* входят число в 10 наиболее мутирующих генов, которые составляют 62% всех мутаций, обнаруженных в результате полного секвенирования генома 560 пациентов рака молочной железы (Nik-Zainal et al., 2016). Указанные мутации приводят к резистентности раковых клеток к действию лекарственных препаратов, которые показали высокую эффективность ингибирования сигнальных путей и роста раковых опухолей, не содержащих онкомутаций. Таким образом, онкомутации существенно изменяют функционирование сигнальных путей и приводят к потере их чувствительности к ингибированию сигналов лекарственными препаратами. В работе разрабатываются методы моделирования для исследования нарушений механизмов регуляции сигнальных систем при онкомутациях в опухолевых клетках, которые приводят к лекарственной резистентности.

Глава 2. Влияния онкомутаций на действие лекарственных препаратов, ингибирующих сигнальные системы опухолевых клеток

Во настоящей главе дается подробное описание метода разработки математической модели действия лекарственных препаратов (ЛП) на сигнальные пути пролиферации раковых клеток. С целью наиболее надежного описания эффекта ЛП большое внимание уделяется разработке кинетических моделей сложных сигнальных путей и их регуляторных механизмов. Метод включает детальное описание как функционирования системы на уровне отдельных сигнальных белков и рецепторов, так и на системном уровне полной сигнальной системы. Описывается разработанный метод определения модельных параметров системы на основе экспериментальных данных, полученных как для отдельных белков системы, так и данных, определенных в экспериментах на клеточных линиях раковых клеток. Далее дается описание метода валидации разработанных моделей сигнальных систем с целью проверки их надежности и предсказательной способности. Описывается применение разработанного метода к построению и валидации компьютерных моделей RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT/mTOR сигнальных путей и их активации рецепторами эпидермального фактора роста ErbB1-4. Разработанная модель применяется к исследованию действия нового антиракового ЛП, пертузумаба, ингибитора рецепторов эпидермальных факторов роста ErbB3. Приводятся результаты моделирования ингибирующего эффекта пертузумаба на RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальные пути и проводится сравнение теоретических результатов с экспериментальными данными, полученными для линии раковых клеток яичника PE04. Приводится метод исследования действия ЛП на сигнальные пути с различным набором онкомутаций генов, кодирующих PI3K, PTEN и AKT белки. Описываются методы верификации модели, включающие проверку предсказаний модели в *in vitro* экспериментах на линиях

раковых клеток. Приводятся результаты по применению предсказаний модели в клинических исследованиях по персонализированной терапии пациентов с раком молочной железы с определенным набором онкомутаций в PI3K/PTEN/АКТ сигнальной системе.

2.1. Разработка модели действия лекарственных препаратов на сигнальных пути пролиферации раковых клеток

Для моделирования действия ЛП, ингибиторов рецептора ErbB2, пертузумаба на сигнальные пути раковых клеток в работе развита кинетическая модель RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/АКТ/mTOR сигнальных путей при различных мутациях генов, кодирующих сигнальные белки. Модель описывает процессы активации сигнальной системы и распространение сигнала в каскаде реакций фосфорилирования протеин-киназ. С целью исследования ответа сигнальной сети на действие ЛП разработана кинетическая модель ее функционирования при активации рецепторов эпидермального факторов роста при их связывании с лигандом, нейрегулином-1-β (HRG). Схема модели представлена на Рис. 1-1.

Модель полной сигнальной системы представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), описывающих кинетику передачи сигналов в системе:

$$\begin{cases} \frac{dS_i}{dx} = k_i S_j S_k - k_{-i} S_i \\ \frac{d(pS_i)}{dx} = V_{p,i}(S_i, S_j, p_i) - V_{d,i}(pS_i, S_j, p_j). \end{cases} \quad (2.1)$$

$$\quad (2.2)$$

Уравнения (2.1) и (2.2) описывают, соответственно, кинетику образования рецепторных или белковых комплексов S_i и кинетику фосфорилирования и

дефосфорилирования сигнальных белков системы pS_i . Скорости реакций фосфорилирования $V_{p,i}(S_i, S_j, p_i)$ и дефосфорилирования $V_{d,i}(pS_i, S_k, p_i)$ сигнальных белков описываются в рамках метода ферментативной кинетики. Система ОДУ (2.1)-(2.2) содержит 32 уравнения и 53 кинетических параметра: скорости прямых k_i и обратных k_{-i} реакций образования рецепторных комплексов и кинетические параметры отдельных ферментов p_i . Полная система кинетических уравнений модели приведена в работе [17] из списка опубликованных работ.

Изложим основные процессы и реакции, учтенные в модели (2.1), (2.2) сигнальных систем. Модель включает в себя следующие подсистемы:

- Модель комбинационной активации ErbB1-4 рецепторной системы
- Модель интерфейса между рецепторной системой и системой передачи сигналов
- Модель PI3K/PTEN/AKT сигнального пути
- Модель RAS/MEK/ERK сигнального пути
- Модель mTOR1/S6K1/4EBP1 сигнального пути

Модель рецепторной подсистемы описывает инициализацию передачи клеточных сигналов в результате активации клеточных рецепторов при их связывании с соответствующими лигандами. В модели рассмотрена инициализация рецепторных сигналов в результате активации семейства клеточных рецепторов эпидермального факторов роста: ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4). При связывании рецепторов с лигандами происходит гетеродимеризация и гомодимеризация рецепторов с образование активных рецепторных комплексов. Благодаря тирозинкиназной активности цитоплазматических доменов рецепторов происходит автофосфорилирование тирозиновых остатков в димерных рецепторных комплексах. В модели кинетики клеточных рецепторов учтены ингибиторы трастузумаб и пертузумаба, которые, связываясь с рецептором ErbB2, ингибируют образование

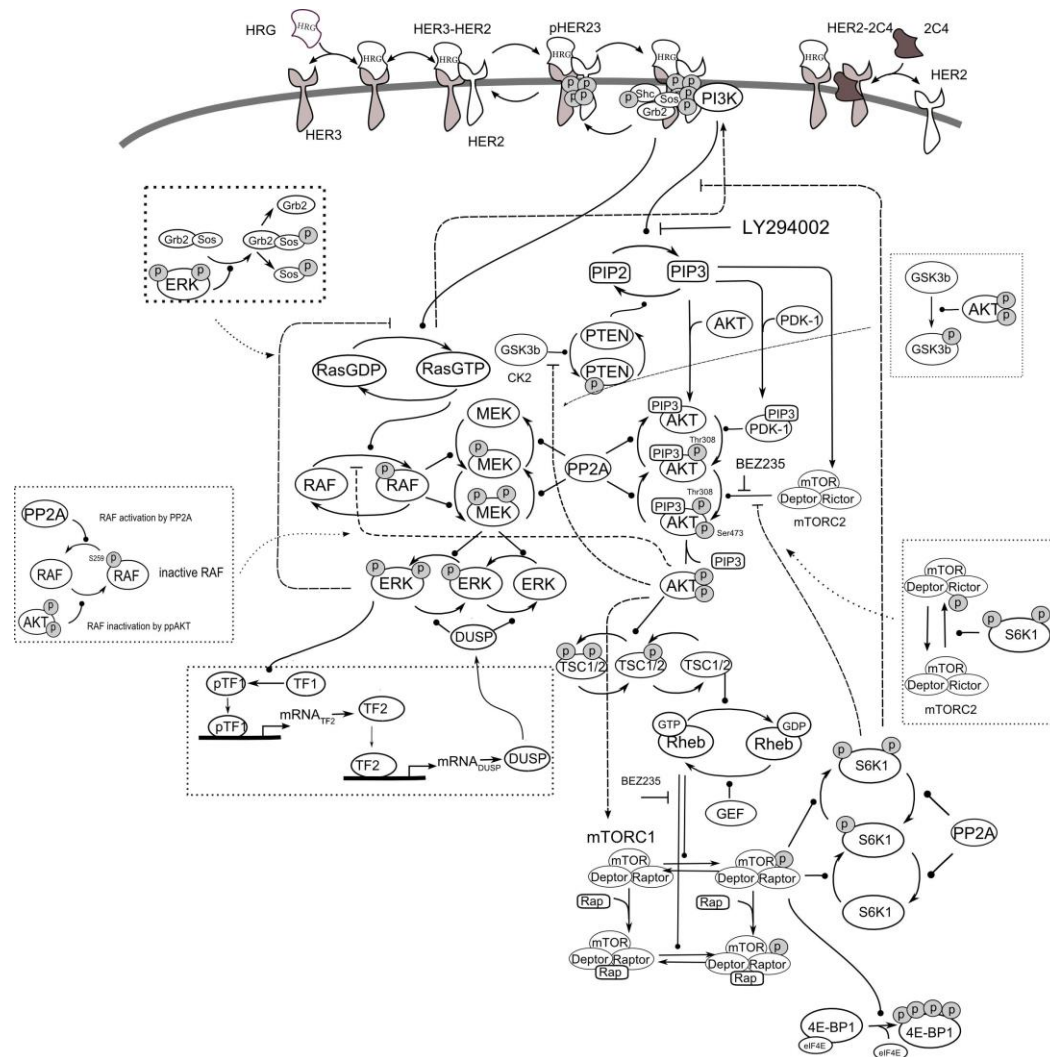


Рис. 2-1. Схема модели RAS/MEK/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путей, активируемых HER2 и HER3 рецепторами. Пунктирными линиями показаны отрицательные обратные связи, учтенные в модели. Показаны ингибиторы, исследованные в модели: ингибитор HER2 рецепторов, пертузумаб (2C4 моноклональное антитело); ингибитор киназы PI3K, LY294002; ингибитор киназы mTOR1 рапамицин и препарат двойного действия, BEZ235, ингибирующий PI3K и mTOR1,2 киназы.

комплексов ErbB2/ErbB2 (трастузумаб) и ErbB2/ErbB3 (трастузумаб), соответственно. Подробное обсуждение модели кинетики активации рецепторов

обсуждается в разделе 2.1.1.

Модель включает две сигнальные системы: RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT/mTOR, которые осуществляют передачу сигналов клеточной пролиферации и дифференцирования от рецепторной подсистемы в клеточное ядро и другие сигнальные системы (см. Рис. 2-1). Связь между рецепторной и сигнальными системами реализуется за счет белков-адаптеров, которые образуют интерфейс между двумя указанными системами. Белки-адаптеры связываются с фосфорилированными тирозиновыми остатками клеточных рецепторов и являются местами связывания и активации протеин-киназ на начальных стадиях активации RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT/mTOR сигнальных систем. К белкам-адаптерам относятся следующие белки: Sch, Grb2, Grb10, Gab1 (Lemmon & Schlessinger, 2010). В модели учтено, что активация Ras киназы происходит в результате связывания Grb2 белка-адаптера с SOS белком, который является белковым фактором обмена гуанин нуклеотидов GDP/GTP (RasGEF). Связывание цитоплазматического белка SOS с мембранным рецептором является процессом инициализации передачи сигнала в RAS/MEK/ERK сигнальной системе.

В модели инициализации PI3K/PTEN/AKT/mTOR сигнальной системы происходит в результате связывания PI3-киназы (p85 регуляторной субъединицы PI3K) непосредственно с фосфотирозиновым остатком ErbB рецепторов, либо с белками-адаптерами Grb2 и GAB1. Активация PI3K происходит в результате фосфорилирование p85 сигнальной субъединицы PI3-киназы, что приводит к синтезу фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3) при фосфорилировании фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP2). В модели учтена реакция дефосфорилирования PIP3 фосфатазой PTEN, которая вместе с киназой PI3K контролирует баланс сигнального липида PIP3 в процессе передачи клеточных сигналов. В модели учтено также, что фосфатаза PTEN обладает как липидной, так и белковой фосфатазной активностями, а также подвергается пост-

трансляционной модификации за счет ее фосфорилирования киназами GSK3 β и CK2, что приводит к инактивации PTEN.

Генерация PIP3 на внутренней поверхности клеточной мембраны приводит к связыванию многих цитоплазматических белков с мембраной с последующей их активацией и образованием мембранных белок-белковых и белок-рецепторных сигнальных комплексов. В модели учтено связывание PIP3 с протеинкиназой B (AKT), фосфоинозитол-зависимыми киназами PDK1 и mTOR2, что приводит к их закреплению на плазматической мембране. Киназы PDK1 и mTOR2 активируют протеин-киназу AKT в результате фосфорилирования AKT(Thr308) и AKT(Ser473), соответственно. В модели полностью активированная протеин-киназа AKT (ppAKT(Thr308, Ser473)) диссоциирует от клеточной мембраны и мигрирует в цитоплазму, где активирует множество сигнальных путей. Активация AKT является выходным сигналом системы и зависимости концентрации pAKT от времени сравнивалась в работе с экспериментальными данными для выбора параметров модели, при которых теоретическая модель наилучшим образом описывает экспериментальных данных.

Модель также описывает активацию RAS/MEK/ERK сигнального пути. Как было уже сказано, связывание цитоплазматического белка SOS с мембранным рецептором является процессом инициализации передачи сигнала в RAS/MEK/ERK сигнальной системе. SOS является белковым фактором обмена гуанин нуклеотида RasGEF для Ras киназы, которая связывается с клеточной мембраной посредством гидрофобного остатка фарнезила, в результате чего происходит образование активного комплекса RasGTP. В модели учтен белок активации GTPase, RasGAP, который переводит Ras в неактивную форму RasGDP. Далее в модели учтено, что активированная форма RasGTP фосфорилирует Raf киназу, которая в свою очередь фосфорилирует два фосфосайта MEK киназы MEK(Ser217/221). Фосфатаза PPA2 дефосфорилирует ppMEK

(Ser217/221). Активная MEK киназа фосфорилирует ERK киназу ERK(Thr202,Tyr204). Фосфатаза DUSP дефосфорилирует ppERK (Thr202,Tyr204).

В модели также рассмотрен один из сигнальных путей, активируемый протеин-киназой АКТ, который является эффективной мишенью лекарственной онкотерапии (Efeyan & Sabatini, 2010): каскад реакций активации киназного комплекса mTOR1. В модель включен следующий механизм регуляции mTOR1 комплекса. АКТ фосфорилирует TSC1/2 комплекс, который является GTPase активирующим белком (GAP) Rheb киназы (Inoki, Li, Xu, & Guan, 2003). Фосфорилирование TSC1/2 приводит к инактивации гидролазной активности TSC1/2 комплекса (за счет его связывание с 14-3-3 белком) и накоплению киназы Rheb в активном состоянии Rheb(GTP). В модели принят один из обсуждаемых в литературе механизмов активации mTOR1 комплекса: фосфорилирование mTOR1(Ser2448) Rheb(GTP) киназой (Memmott & Dennis, 2009). Субстратами pmTOR1(Ser2448) являются S6 киназа и eIF4E связанный белок, 4EBP1, ингибирующий кэп-зависимую трансляцию. Фосфорилирование S6K и 4EBP1 киназ приводит к инициализации трансляции и росту клеток. В модели рассмотрены следующие ЛП, ингибиторы mTOR1 комплекса: рапамицин, аллостерический ингибитор и BEZ235, АТФ-конкурентный ингибитор. Действие этих ЛП на mTOR1/S6K/4EBP1 сигнальный путь синтеза белка подробно рассматривается в главе 6.

С целью определения кинетических параметров модели был развит метод калибровки модели по кинетическим данным, полученных в различного типа экспериментах. Для этого был разработан план экспериментов по кинетике активации и ингибированию PI3K/PTEN/АКТ и RAS/MEK/ERK сигнальных путей линии раковых клеток яичников PE04. В экспериментах, выполненных коллабораторами проекта в Центре Исследования Рака Эдинбургского Университета, была измерена кинетика фосфорилирования основных

сигнальных белков после добавления в популяцию клеток 1 нМ HRG1- β в отсутствие и присутствии ингибитора. Кинетические параметры модели определялись на основе наилучшего согласия расчетных и экспериментальных кинетических кривых с использованием вычислительных методов минимизации для квадратичного отклонения. Для ряда известных кинетических параметров реакций образования молекулярных комплексов и реакций фосфорилирования белков были использованы литературные данные. Особое внимание в этом методе уделяется надежному определению кинетических параметров белков, которые являются мишенями ЛП. С этой целью был разработан метод определения кинетических параметров отдельных сигнальных белков и их взаимодействия с ингибиторами на основе наборов *in vitro* данных, полученных в различных экспериментальных условиях. Описание метода приведено в разделе 2.3.

2.2. Комбинационная активация системы клеточных рецепторов эпидермального фактора роста ErbB

В кинетической модели рецепторной системы была рассмотрена кинетика активации системы рецепторов эпидермального фактора роста ErbB и их ингибирование в результате действия ЛП пертузумаба и трастузумаба отдельно и в комбинации. В модели учтена реакция гетеродимеризации ErbB2/ErbB3 рецепторов, индуцированная связыванием лиганда нерегулина (HRG) с ErbB3 рецептором. На основе многочисленных исследований считается, что активация комплекс ErbB2/ErbB3 рецепторов приводит к активации митогенного сигнала ответственного за рост многих типов раковых опухолей (Flågåeng, Knappskog, Haynes, Lønning, & Mellgren, 2013; Lee-Hoeflich et al., 2008; Nagumo et al., 2009).

На Рис. 2-2 приведена общая схема реакций активации и ингибирования системы рецепторов эпидермального фактора роста, рассмотренных в модели. Лиганд HRG связывается с доменами I и III рецептора ErbB3 и вызывает конформационные изменения рецептора из неактивного состояния в активное, в частности, конформация домена II становится «открытой» (Landgraf, 2007). Эта конформация рецептора приводит к димеризации и стабилизации комплекса ErbB2/ErbB3 за счет взаимодействия доменов II в ErbB2 и ErbB3 рецепторах.

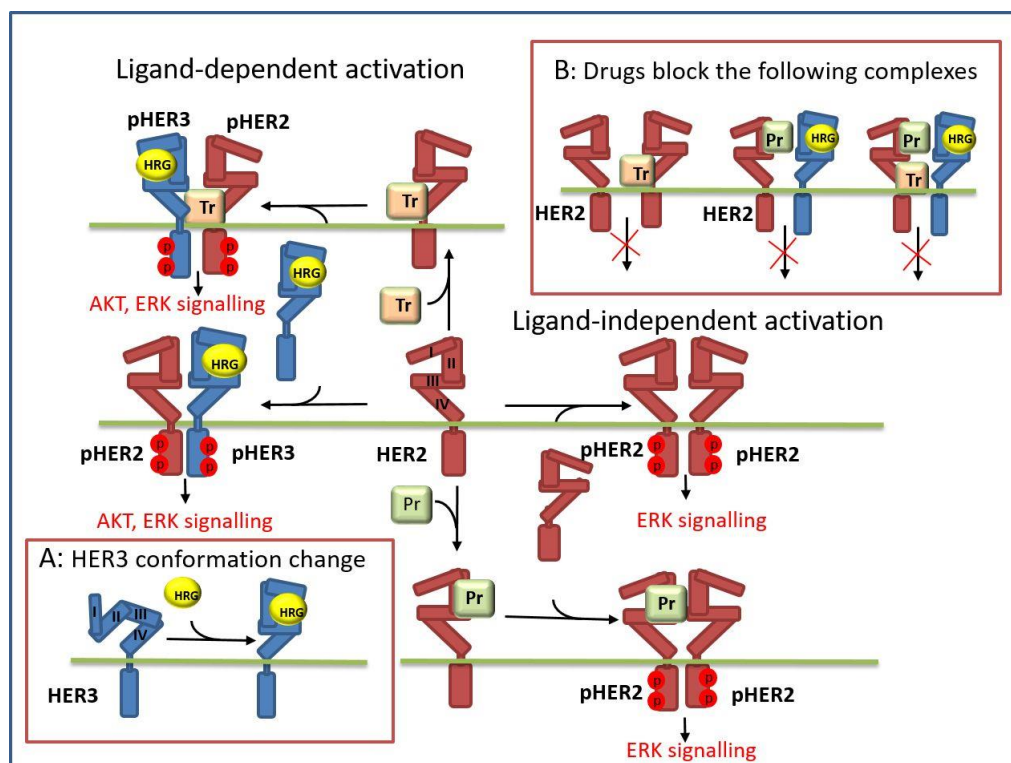


Рис. 2-2. Схема модели рецепторной системы. Кинетика лиганд-зависимой и независимой гомо- и гетеродимеризации ErbB3 и ErbB2 рецепторов в отсутствии и присутствии лекарственных препаратов пертузумаба и трастузумаба. Вставка (A) показывает конформационное изменение ErbB3 рецептора при его связывании с лигандом HRG. Вставка (B) показывает димерные комплексы, которые блокируются этими лекарственными препаратами.

В противоположность рецепторам ErbB3, рецептор ErbB2 имеет все внеклеточные домены в «открытых» конформациях, что, как предполагается, определяет его неконтролируемую гомодимеризацию и активацию сигнальных путей. Также предполагается, что трансмембранный домен ErbB2 также дает вклад в гомодимеризацию и активацию ErbB2 рецепторов, не требующую взаимодействия с лигандом (Landgraf, 2007). В модели рассмотрена лиганд-независимая гомодимеризация ErbB2 рецепторов при его повышенной экспрессии в раковых клетках. Подробно моделирование этого механизма проведено в главе 5.

Формирование ErbB2/ErbB2 гомодимеров и ErbB2/ErbB3 гетеродимеров приводит к активности рецепторных тирозин киназ (RTK) и транс и автофосфорилированию тирозиновых остатков на цитозольных доменах рецепторов. В модели предполагается, что при повышенной экспрессии ErbB2 рецепторов в раковых клетках активация ErbB2 рецепторов может происходить за счет как лиганд-независимого, так и лиганд-зависимого механизма, в частности, через связывание с ErbB3 рецептором.

При повышенной экспрессии ErbB2 рецепторов (при амплификации *ErbB2* гена) активация рецепторных тирозин-киназ идет, главным образом, по лиганд-независимому механизму активации за счет ErbB2 гомодимеризации. При нормальной экспрессии ErbB2 рецепторов ErbB2 связывается с другими рецепторами ErbB семейства за счет лиганд-зависимого механизма, в частности, через связывание с ErbB3 рецептором.

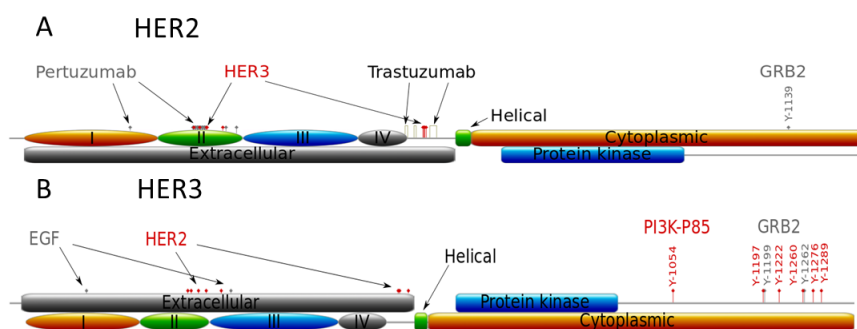


Рис. 2-3. Схема структуры вне- и внутриклеточного доменов ErbB2 и ErbB3 рецепторов. Показаны сайты связывания рецепторов между собой, пертузумаба и трастузумаба, а также фосфо-тирозин-остатки связывания с белком адаптером Grb2 и p85 регуляторной субъединицей PI3 киназы.

Тирозин-фосфорилированные сайты рецепторов являются местами связывания и активации различных белков-адаптеров, которые связывают сигнальные белки начальной стадии активации PI3K/PTEN/AKT и RAS/MEK/ERK сигнальных путей (Schulze et al., 2005). На Рис. 2-3 показаны схемы ErbB2 и ErbB2 рецепторов с тирозиновыми остатками внутриклеточных доменов, являющиеся местами связывания для белком адаптером и сигнальных белков. В модели учтено, что ErbB2 и ErbB3 по-разному взаимодействуют с сигнальными белками и могут по-разному активировать PI3K/PTEN/AKT и RAS/MEK/ERK сигнальные пути. ErbB2 рецептор имеет несколько сайтов взаимодействия с белками адаптерами Shc и Grb2, которые связывают SOS белок и активизирует RAS/MEK/ERK сигнальный путь. Как видно, ErbB2 рецептор не имеет мест связывания для p85 регуляторной единицы PI3 киназы, которая активирует PI3K/PTEN/AKT сигнальный путь. Рецептор ErbB3 имеет места связывания как для белков адаптеров Shc и Grb2, так и PI3 киназы, что приводит к активации как PI3K/PTEN/AKT, так и RAS/MEK/ERK сигнальных путей

одновременно (Schulze et al., 2005). Таким образом, в модели предполагается, что образование гомодимерных комплексов ErbB2/ErbB2 приводит к, главным образом, к активации RAS/MEK/ERK сигнальных путей, в то время как гетеродимерные комплексы ErbB2/ErbB3 активируют как RAS/MEK/ERK, так и PI3K/PTEN/AKT сигнальные пути. Отметим, что в модели не учитывается возможность активации PI3 киназы комплексом ErbB2/ErbB2 за счет образования белковых комплексов Grb2-GAB1-PI3K (Yarden & Sliwkowski, 2001). Сделанное предположение и его следствия, полученные в результате моделирования были проверены на экспериментальных данных. Было показано, что комплексы ErbB2/ErbB3 являются наиболее сильными активаторами PI3K/PTEN/AKT сигнальные пути за счет прямого связывания PI3K с фосфотирозиновыми остатками ErbB3 рецептора как при высокой, так и при нормальной экспрессии ErbB2 рецепторов в раковых клетках (Choi, Fan, Deng, Zhang, & An, 2012). Активация гомодимерных ErbB2 комплексов приводит, главным образом, к активации RAS/MEK/ERK сигнального пути.

Таким образом, в модели учтено, что, несмотря на то, что трастузумаб и пертузумаб связываются с одним и тем же рецептором ErbB2, они оказывают различные ингибирующие действие на RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальные пути за счет различных эффектов на кинетику гомо- и гетеродимеризации ErbB2 и ErbB3 рецепторов. Это приводит к тому, что различный уровень экспрессии ErbB2 и ErbB3 рецепторов в различных линиях раковых клетках, определяющий баланс ErbB2/ErbB3 и ErbB2/ErbB2 рецепторных комплексов, вызывает различный уровень активации RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных путей. Отметим, что различные эффекты трастузумаба и пертузумаба на ингибирование кинетики рецепторов определяются различием взаимодействия этих моноклональных антител с ErbB2: трастузумаб связывается с IV внеклеточным доменом рецептора (Cho et

al., 2003), в то время как пертузумаб взаимодействует с I доменом (Franklin et al., 2004) (Рис. 2-2).

Таблица 2-1. Ингибирующий эффект трастузумаба и пертузумаба на кинетику гомо- и гетеро-димеризации ErbB2 и ErbB3 рецепторов в присутствии и отсутствии лигандов ErbB3 рецептора.

ЛП	Рецептор 1	Рецептор 2	Лиганд	Ингибирующий эффект	
Трастузумаб	ErbB2	ErbB3	+	слабый	(Austin et al., 2004)
Трастузумаб	ErbB2	ErbB3	-	+	(Junttila et al., 2009)
Трастузумаб	p95ErbB2		-	+	(Molina et al., 2001)
Трастузумаб	ErbB2	ErbB2	-	+	(Ghosh et al., 2011)
Пертузумаб	ErbB2	ErbB3	+	+	(Agus et al., 2002)
Пертузумаб	ErbB2	ErbB3	-	слабый	(Junttila et al., 2009)
Пертузумаб	ErbB2	ErbB2	-	-	(Ghosh et al., 2011)

Для описания ингибирующих эффектов пертузумаба и трастузумаба на активацию рецепторов в модели были учтены следующие экспериментальные данные. Пертузумаб эффективно ингибирует кинетику лиганд-зависимого образования гетеродимеров ErbB2/ErbB3, в то время как трастузумаб не блокирует гетеродимеризацию ErbB2 с ErbB1 (EGFR) и с ErbB3 (Junttila et al., 2009), (Austin et al., 2004). При отсутствии рецепторных лигандов, эффект этих ЛП – обратный: пертузумаб не ингибирует, а трастузумаб ингибирует образование гетеродимеров ErbB2/ErbB3 (Junttila et al., 2009), (Austin et al., 2004). Трастузумаб эффективно ингибирует формирование гомодимеров ErbB2/ErbB2 и не способен ингибировать лиганд-зависимое образование гетеродимеров

ErbB2/ErbB3 (Ghosh et al., 2011). В модели также рассмотрена возможность связывания комбинации трастузумаба и пертузумаба с ErbB2 рецептором, что приводит к блокировке формирования ErbB2/ErbB2 гомодимеров (Fuentes, Scaltriti, Baselga, & Verma, 2011). Приведенные выше эффекты трастузумаба и пертузумаба на ингибирование кинетики рецепторов кратко представлены в Таблице 2-1.

В модели рассматривается как лиганд-зависимая, так и лиганд-независимая кинетика активации рецепторной системы. Модель учитывает экспериментальные данные, указывающие на преобладание лиганд-независимой кинетики формирования комплексов ErbB2/ErbB3 и ErbB2/ErbB2 при повышенной экспрессии ErbB2 рецепторов в раковых клетках (Garrett, Sutton, Kuba, Cook, & Arteaga, 2013; Junttila et al., 2009). При нормальной экспрессии рецепторов образование лиганд-зависимых комплексов ErbB2/ErbB3 идет более интенсивно, и они являются более стабильными, чем лиганд-независимые комплексы ErbB2/ErbB3 (Junttila et al., 2009). В модели рецепторной системы не учитывается экспрессия «укороченного» ErbB2 рецептора, p95ErbB2, являющегося активной формой рецептора (Molina et al., 2001; Sims et al., 2012) и не учитывается его ингибирование трастузумабом.

Модель кинетики активации системы ErbB рецепторов используется в полной модели RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных путей и применяется к исследованию эффективности ингибирующего действия ЛП, ингибиторов рецепторов трастузумабом и пертузумабом, а также ингибиторов протеин-киназ, LY294002 и BEZ235 для пяти линиях раковых клеток яичников с различным уровнем экспрессии ErbB1-4 рецепторов и с различным набором онкомутаций в PI3K/PTEN/AKT и RAS/MEK/ERK сигнальных путях В Таблицах 2-2 и 2-3 приведены данные о мутациях и уровнях экспрессии ErbB1-4 рецепторов в исследуемых клетках.

Таблица 2-2. Мутаций в RAS/MEK/ERK и PI3K/PTEN/АКТ сигнальных путях в клеточных линиях рака яичников (<https://cansar.icr.ac.uk/cansar/cell-lines/A2780/-mutations/>)

Клеточная линия	Мутации
A2780	PTEN (p. k128_R130del)
SKOV3	PIK3CA (c.3140A>G) TP53 (c.267delC)
OVCAR3	TP53 (c.743G>T)
TOV21G	PIK3CA (c.3139C>T) KRAS (c.37G>T) PTEN (p. 425delG), (c.795delA)
PE04	Дикий тип

Таблица 2-3. Уровни экспрессии ErbB рецепторов в клеточных линиях рака яичников (Gilmor et al. 2001; Prasasya et al 2013).

Клеточная линия	ErbB1	ErbB2	ErbB3	ErbB4
PE04	низкий	средний	средний	высокий
A2780	-	низкий	средний	средний
SKOV3	-	высокий	средний	низкий
TOV21G	низкий	средний	низкий	низкий

2.3. Моделирование функционирования сигнальных белков и действия ингибиторов

С целью детального описания кинетики сигнальных белков и их взаимодействия с лекарственными препаратами был применен метод моделирования ферментативного катализа на основе *in vitro* экспериментальных данных, полученных в различных экспериментальных условиях. Схема метода приведена на Рис. 2-4. Для разработки кинетических моделей сигнальных белков, их калибровки и валидации в методе используются два типа экспериментальных данных: зависимости активности киназ от концентрации субстратов, измеренных в отсутствии и присутствии ингибиторов и дозовые зависимости активности ферментов от концентрации ингибиторов. Данный метод позволяет интегрировать экспериментальные данные, полученные в различных экспериментальных условиях, с целью повышения точности определения кинетических параметров ферментов и их ингибиторов за счет использования расширенного набора экспериментальных точек (Cornish-Bowden, 2014). Также при разработке моделей принимается во внимание экспериментальные данные по молекулярной структуре фермент-субстратного и фермент-ингибиторного комплексов, что позволяет дискриминировать различные механизмы катализа и действия ингибиторов на этапе разработки кинетических моделей. В данном методе оценка надежности разработанных моделей осуществляется путем проверки предсказательных способностей моделей на основе экспериментальных данных, не использованных при разработке моделей. В частности, модели используются для расчета и сравнения с экспериментом дозовых активностей ферментов при различных концентрациях субстратов и зависимостей IC_{50} для ЛП от концентраций субстратов. Разработанный метод был успешно применен для описания сложной кинетики различных ферментов, функционирующих в разных сигнальных системах

клетки и результаты моделирования были опубликованы в следующих работах (Goltsov et al., 2009, 2010, 2015; Goltsov, Tashkandi, Langdon, Harrison, & Bown, 2017; Sokolovski et al., 2013).

Разработанные модели сигнальных белков использованы в полной модели сигнальных систем клетки с целью повышения ее надежности и предсказательной способности за счёт использования многочисленных экспериментальных данных по ингибированию сигнальных белков лекарственными препаратами, полученных в

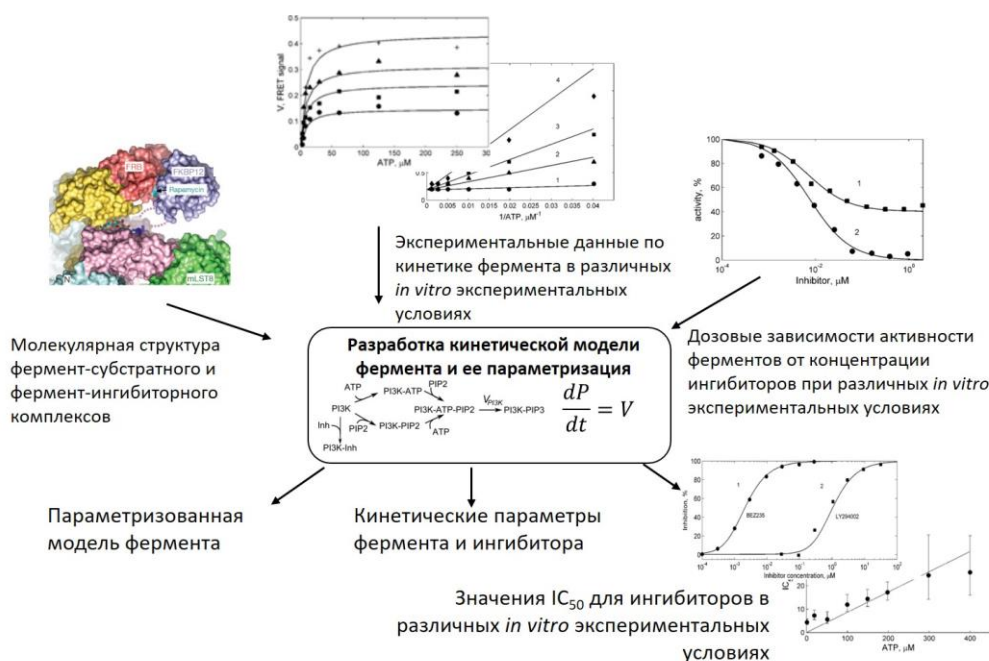


Рис. 2-4. Схема метода разработки кинетических моделей отдельных сигнальных белков. Метод включает разработку каталитического цикла фермента, дискриминацию механизмов действия ингибиторов и калибровку модели на основе набора экспериментальных данных. Разработанные модели используются для определения значений кинетических параметров ферментов и оценки значений IC_{50} ингибиторов для различных экспериментальных условий.

экспериментах на очищенных белках. Тестирование моделей при различных концентрациях субстратов и ингибиторов позволяет повысить надежность использования моделей отдельных белков при клеточных концентрациях субстратов, отличающихся, в общем случае, от концентраций в экспериментах

на очищенных белках. Сравнение действия лекарств на клеточном уровне с данными, полученными на отдельных белках, выделенных из клеточного экстракта, позволяет анализировать системные эффекты, влияющие на эффективность действия ЛП на клеточном уровне. В частности, в работе анализируется потеря эффективности действия ЛП на уровне полной сигнальной системы при сохранении его действия на белок-мишень. Также разработанные модели могут быть использованы при испытаниях новых ЛП и оценки значений их IC_{50} в различных экспериментальных условиях функционирования фермента.

Кинетические параметры моделей были определены в результате наилучшего описания наборов экспериментальных данных с использованием методов оптимизации в среде Matlab (MathWorks Inc.).

Для оценки точности кинетических параметров протеин-киназ, полученных в разработанных моделях, был применен статистический метод бутстрепинга (bootstrapping method) (Draper & Smith, 2014; Efron & Tibshirani, 1994). Расчета доверительных интервалов для полученных кинетических параметров был выполнен с использованием процедуры бутстрап-выборки (ресамплинга). Краткое изложение метода приведено в Приложении 1.

2.3.1. Кинетическая модель PI3K киназы и действия ее ингибиторов

В данном разделе приводятся результаты по кинетическому моделированию функционирования PI3K киназы и действия ее ингибиторов, BEZ235 и LY294002, исследованные в работе. Разработанная модель каталитического цикла PI3K киназы включает реакцию фосфорилирования фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP2) и образование продукта фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3) (Рис. 2-5). Каталитический цикл также учитывает действие АТР-конкурентных ингибиторов BEZ235 и LY294002.

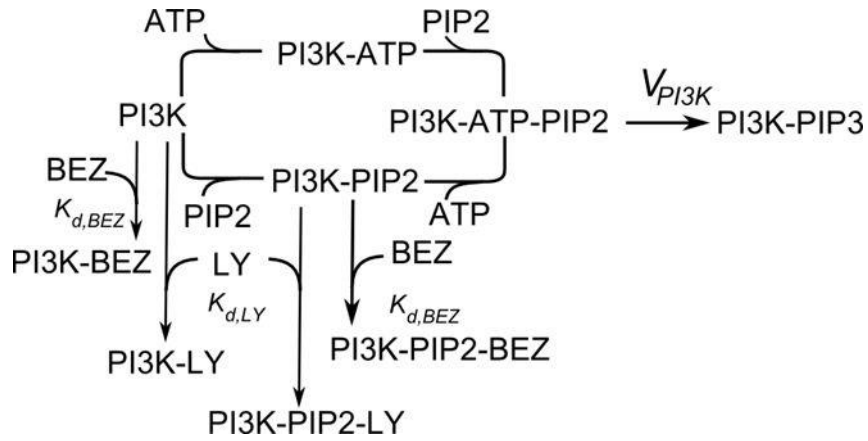


Рис. 2-5. Каталитический цикл киназы PI3K с учетом АТР-конкурентных ингибиторов BEZ235 и LY294002.

В соответствии с разработанным каталитическим циклом было получено уравнение для скорости реакций в приближения случайного связывания субстратов, АТР и PIP2, для двух-субстратной ферментативной реакции в предположении быстрого связывания субстратов (Cornish-Bowden, 2004).

$$V_{PI3K} = \frac{k_{PI3K} \cdot PI3K \cdot PIP2 \cdot ATP}{K_{d,PIP2} \cdot K_{d,ATP} \cdot \Delta_{PI3K}}, \quad (2.3)$$

где

$$\Delta_{PI3K} = \left(1 + \frac{PIP2}{K_{d,PIP2}}\right) \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} + \frac{LY}{K_{d,LY}} + \frac{BEZ}{K_{d,BEZ}}\right).$$

Кинетические параметры PI3K киназы были определены в результате фиттирования зависимости скорости реакции V_{PI3K} (ур. (2.3)) по экспериментальным данным (Huang et al., 2011; Vlahos, Matter, Hui, & Brown, 1994). На Рис. 2-6 представлены результаты фиттирования зависимости скорости реакции V_{PI3K} (ур. (2-3)) от концентрации субстрата PIP2 в присутствии и отсутствии ингибитора LY294002.

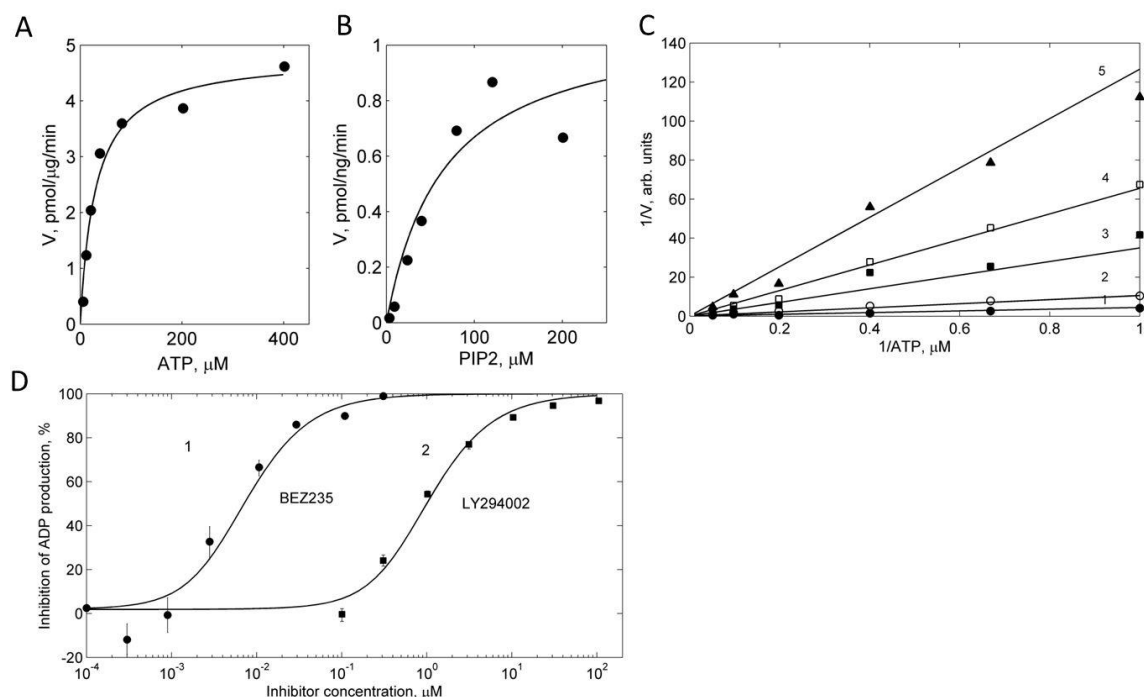


Рис. 2-6. (А): Зависимость скорости реакции PI3K киназы от АТФ концентрации. Линии-теоретические зависимости. Точки—экспериментальные данные: 2 μM PIP2 в эксперименте (Huang et al., 2011). (В): Зависимость скорости реакции PI3K киназы от PIP2 концентрации. Точки — экспериментальные данные: 2 mM АТФ в эксперименте (Huang et al., 2011). (С): Графика Лайнвивера -Берка для скорости реакции PI3K для различных концентраций ингибитора LY294002: линия 1 - 0 μM , линия 2 - 1 μM , линия 3 - 5 μM , линия 4 - 10 μM и линия 5 - 20 μM LY294002. Точки — экспериментальные данные: 400 μM PIP2 в эксперименте (Vlahos et al., 1994). (D): Дозовая зависимость накопления продукта реакции ADP от концентрации ингибиторов BEZ235 (линия 1) и LY294002 (линия 2). Точки — экспериментальные данные для PI3K α (p85/p110 α) изоформы: 20 μM АТФ, 10 μM PIP2, 0.4 $\mu\text{g/mL}$ PI3K α в эксперименте (Maira et al., 2008).

Таблица 2-4. Кинетические параметры PI3K киназы и ее ингибиторов, BEZ235 и LY294002. Указаны значения медиан и в скобках даны доверительные интервалы, полученные методом бутстрапинга. Приведены также экспериментальные данные, полученные на очищенном ферменте. K_m и K_i константы Михаэлиса и ингибирования.

Кинетические параметры	Экспериментальные данные
<i>Максимальная скорость реакции, V_{max}</i>	
160 pmol/ μ g/min (54; 200)	
<i>Константа диссоциации ATP, $K_{d,ATP}$</i>	
30.3 μ M (27.1; 85.1)	$K_m = 24 \pm 4.2$ μ M (Huang et al., 2011)
<i>Константа диссоциации PIP2, $K_{d,PIP2}$</i>	
70.3 μ M (27.1; 85.1)	$K_m = 68.7 \pm 5.2$ μ M (Huang et al., 2011)
<i>Константа диссоциации LY294002, $K_{d,LY}$</i>	
0.6 μ M (0.3; 0.7)	$K_i = 1.6$ μ M (Vlahos et al., 1994)
0.21 μ M ¹⁾ (0.18; 0.24), (p85/p110 α)	$IC_{50} = 1.43$ μ M p85/p110 α (Huang et al., 2011)
0.19 μ M ²⁾ (0.16; 0.22), (p85/p110 α)	$IC_{50} = 1$ μ M p85/p110 α (Maira et al., 2008)
	$IC_{50} = 0.186$ μ M p110 α (Gharbi et al., 2007)
	$K_{d,LY} = 0.21 \pm 0.04$ μ M, PI3K γ (Walker et al., 2000)
<i>Константа диссоциации BEZ235, $K_{d,BEZ}$</i>	
1.6 nM ³⁾ (1.2; 2.1) (p85/p110 α)	$IC_{50} = 5 \pm 4$ nM, p110 γ (Maira et al., 2008)
	$IC_{50} = 4 \pm 2$ nM, p110 α (Maira et al., 2008)
0.50 nM ⁴⁾ (0.45; 0.51) (p85/p110 α)	$IC_{50} = 75 \pm 45$ nM, p110 β (Maira et al., 2008)
	$IC_{50} = 7 \pm 6$ nM, p110 δ (Maira et al., 2008)

^{1),3)} Эти оценки получены при фиттировании экспериментальных данных, измеренных MaxiSorpTM эксперименте (Maira et al., 2008)

^{2),4)} Эти оценки получены при фиттировании экспериментальных данных по измерению ADP концентрации (Maira et al., 2008).

Линейная зависимость скорости реакции в обратных координатах графика Лайнвивера-Берка подтверждает АТР-конкурентный механизм действия ингибитора LY294002 (Рис. 2-6). Полученные кинетические параметры приведены в Таблице 2-4.

Для оценки константы диссоциации ингибитора BEZ235 были использованы экспериментальные данные по дозовой зависимости накопления продукта реакции ADP от концентрации BEZ235 для PI3K α изоформы (Maira et al., 2008). Кинетики ADP была рассчитана путем решения кинетического уравнения с начальными условиями, соответствующими экспериментальным условиям:

$$\frac{dADP}{dt} = V_{PI3K}, \quad (2.4)$$

где скорость реакции V_{PI3K} определяется уравнением (2-3). В результате наилучшего согласия с экспериментальными данными (Рис. 2-6D) была определена константа диссоциации для ингибитора BEZ235 $K_{d,BEZ}=1.6$ nM (1.2; 2.1) (Таблица 2-4). Для оценки константы диссоциации ингибитора LY294002 были также использованы экспериментальные данные по дозовой зависимости накопления продукта реакции ADP от концентрации ингибитора для PI3K α изоформы (Maira et al., 2008). Сравнение дозовых зависимостей для BEZ235 и LY294002 показано на Рис. 2-6D. Константа диссоциации ингибитора LY294002, полученная в расчете $K_{d,LY}=0.21$ μ M CI(0.18; 0.24), ниже значения $K_{d,LY}=0.6$ μ M CI(0.3; 0.7), полученного в предыдущем расчете для PI3K киназы, изолированной из клеток мозга быка, и близка к экспериментальной константе диссоциации $K_{d,LY}=0.21\pm0.04$ μ M, полученной для PI3K γ изоформы в работе (Walker et al., 2000) (Таблица 2-4).

С целью проверки надежности полученной модели PI3K (ур. (2.3)) были проведены расчеты зависимости значения IC_{50} для BEZ235 и LY294002 от концентрации АТР и выполнено сравнение с экспериментальными данными для PI3K γ изоформы (Maira et al., 2008). Значение IC_{50} рассчитывалось для дозовой зависимости производства ADP от концентрации ингибитора. Теоретическая зависимость значения IC_{50} от начальной концентрации ATP_0 была получена на основе аналитического решения ур. (2-4) в следующем виде

$$IC_{50} = K_{d,i} \left(\frac{\ln \left(\frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right) - B t_m}{2 \ln \left(\frac{1}{2} \left(1 + \frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right) \right)} - 1 \right), \quad (2.5)$$

где

$$B = \frac{k_{PI3K} \cdot PI3K \cdot PIP2}{K_{d,PIP2} \cdot K_{d,ATP}} \left(1 + \frac{PIP2}{K_{d,PIP2}} \right)^{-1}.$$

Здесь $ATP_{I0} = ATP(t_m, I = 0)$ - конечная концентрация АТР при остановке реакции в момент времени t_m в отсутствии ингибитора, полученная при решении уравнения (2.4). Вывод соотношения (2.5) приведен в Приложении 1. Полученное уравнение (2.5) позволяет рассчитывать зависимость IC_{50} от начальной концентрации ATP_0 на основе решения уравнения (2.4) $ATP(t_m, I = 0) = ATP_0 - ADP(t_m, I = 0)$ при нулевой концентрации ингибитора $I = 0$. Отметим, что полученное соотношение (2.5) не требует расчетов дозовых зависимостей для различных концентраций АТР и численного расчета соответствующих значений IC_{50} .

Уравнение (2.5) было использовано для расчетов зависимостей значений IC_{50} для ингибиторов BEZ235 и LY294002 от концентрации ATP_0 в модели с начальными значениями, соответствующими экспериментальным условиям работы (Maira et al., 2008). На Рис. 2.7А,В проведено сравнение полученных зависимостей IC_{50} для ингибиторов BEZ235 и LY294002 от концентрации ATP_0 с экспериментальными данными (Maira et al., 2008). Зависимость значения IC_{50} для АТР-конкурентного ингибитора от концентрации АТР также можно получить на основе зависимости скорости реакции V_{PI3K} (ур. (2-3) от концентрации субстрата АТР в следующем виде

$$IC_{50} = K_{d,BEZ} \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} \right). \quad (2.6)$$

Вывод соотношения (2.6) дан в Приложении 1. На Рис. 2-7 зависимость (2-5) приведена для сравнения с зависимостью (2-6). Совпадение двух зависимостей позволяет оценить значение IC_{50} при $ATP=0$ μM . Согласно уравнению (2-6) значение IC_{50} при $ATP=0$ μM равно константе диссоциации $K_{d,BEZ}$ для данного ингибитора. Пересечение прямых для BEZ235 и LY294002 с осью Y дает $K_{d,BEZ} = 2$ нМ и $K_{d,LY} = 0.7$ μM , соответственно, что удовлетворительно согласуется с полученными в расчете константами диссоциации, приведенными в Таблице 2-4.

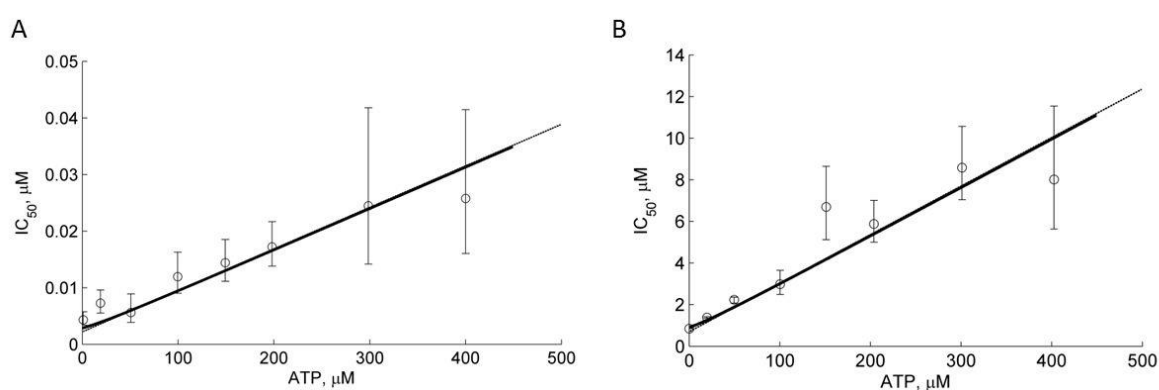


Рис. 2-7. Зависимости значений IC_{50} для BEZ235 (A) и LY294002 (B) для PI3K киназы от ATP концентрации, рассчитанные на основе дозовых зависимостей производства ADP от концентрации ингибиторов. Линии – теоретические расчеты. Точки – экспериментальные данные для PI3K α : 10 μM PIP2, 10 нМ PI3K α в эксперименте, реакции были остановлены на 60 мин (Maira et al., 2008).

2.3.2. Кинетическая модель mTOR1 комплекса и действия ингибиторов рапамицина и BEZ235.

В данном разделе приводится модель mTOR1 киназного комплекса. В работе разработан каталитический цикл mTOR киназы, который включает фосфорилирование S6K1 и 4EBP1 киназ (Рис. 2-8). Также в каталитическом

рапамицина с FKBP12 белком (0.2 nM (Banaszynski et al., 2005)), он связывается с mTOR-киназой через образование тройного комплекса FKBP12-Rapamycin-FRB с константой диссоциации 12 ± 0.8 nM (Banaszynski et al., 2005). В каталитическом цикле этот механизм учтен за счет включения двух реакций связывания, идущих в отсутствие и присутствии FKBP12 белка, с соответствующим константами диссоциации $K_{d,Rap1}$ and $K_{d,Rap2}$. Также было учтено, что при связывании рапамицина или комплекса рапамицин-FKBP mTOR-киназа сохраняет остаточную каталитическую активность в реакции фосфорилирования 4EBP1 и полностью ее теряет по отношению к киназе S6K1 (Choo, Yoon, Kim, Roux, & Blenis, 2008; Tao, Barker, Shi, Gehring, & Sun, 2010; Toral-Barza et al., 2005).

В соответствии с разработанным каталитическим циклом было получено уравнение для скоростей реакций с использованием приближения случайного связывания субстратов для двух-субстратной ферментативной реакции в предположении быстрого связывания субстратов (ATP, S6K1 и 4EBP1) (Cornish-Bowden, 2004).

Уравнения скоростей реакций фосфорилирования субстратов 4EBP1, V_{4EBP1} , и S6K1, V_{S6K1} в присутствии аллостерического ингибитора рапамицина и АТР-конкурентных ингибиторов BEZ235 и LY294002 имеют следующий вид

$$V_{4EBP1} = \frac{k_{4EBP1} \cdot mTOR1 \cdot 4EBP1 \cdot ATP}{K_{d,4EBP1} \cdot K_{d,ATP} \cdot \Delta_{mTOR}} (1 + \eta_{4EBP1} \cdot R) \quad (2.7)$$

$$V_{S6K1} = \frac{k_{S6K1} \cdot mTOR1 \cdot S6K1 \cdot ATP}{K_{d,S6K1} \cdot K_{d,ATP} \cdot \Delta_{mTOR}}, \quad (2.8)$$

где

$$\Delta_{mTOR} = \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} + \frac{LY}{K_{d,LY}} + \frac{BEZ}{K_{d,BEZ}} \right) \left(1 + \frac{4EBP1}{K_{d,4EBP1}} + \frac{S6K1}{K_{d,S6K1}} \right) (1 + R),$$

$$R = \frac{Rap}{K_{d,Rap1}} + \frac{Rap_FKBP}{K_{d,Rap2}}.$$

Здесь $K_{d,i}$ - константы диссоциации субстратов АТР, 4EBP1, S6K1 и ингибиторов рапамицина (Rap), BEZ235 (BEZ) и LY294002 (LY). k_{4EBP1} и k_{S6K1} - скорости каталитических реакций. Параметр $\eta_{4EBP1}=k_{4EBP1,Rap}/k_{4EBP1}$ – отношение скоростей реакции фосфорилирования 4EBP1 mTOR-киназой в присутствии и отсутствии рапамицина, который определяет степень ингибирования каталитической активности киназы mTOR рапамицином. Отметим, что уравнения (2.7) и (2.8) описывают конкурентную кинетику двух субстратов, 4EBP1 и S6K1, катализируемых одним ферментом mTOR1, что соответствует двух-субстратной реакции фосфорилирования, катализируемой mTOR1 киназой в клетке.

Для определения кинетических параметров, входящих в уравнения (2.7) и (2.8) были использованы *in vitro* экспериментальные данные для реакций фосфорилирования 4EBP1(Thr46) и S6K1(Thr389) киназ, катализируемых mTOR киназой (Tao et al., 2010; Toral-Barza et al., 2005). Процедура фиттирования модели была реализована на основе набора экспериментальных данных, который включал зависимости скорости реакции V_{4EBP1} (уравнение (2.7) от АТР и 4EBP1 и концентраций, измеренные при различных концентрациях рапамицина (Tao et al., 2010). Результаты фиттирования экспериментальных данных показаны на Рис. 2-9А и Б. В Таблице 2-5 приведен набор полученных кинетических параметров с указанием доверительных интервалов (в скобках), рассчитанных бутстрапинг методом (см. Приложение 1).

В соответствии с полученными результатами mTOR киназа сохраняет около 40% своей активности при связывании с ингибитором рапамицином: константа скорости k_{4EBP1} уменьшается на фактор $\eta_{4EBP1}=0.43$ (0.38; 0.44). Это видно по остаточному уровню активности на Рис. 2-9С. Найденная константа диссоциации $K_{d,Rap2}=6$ нМ (3.1; 6.9) близка к экспериментальному значению

12 ± 4.2 нМ для тройного комплекса FKBP12-рапамицин-FRB-домен, измеренному методом поверхностного плазмонного резонанса (Banaszynski et al., 2005).

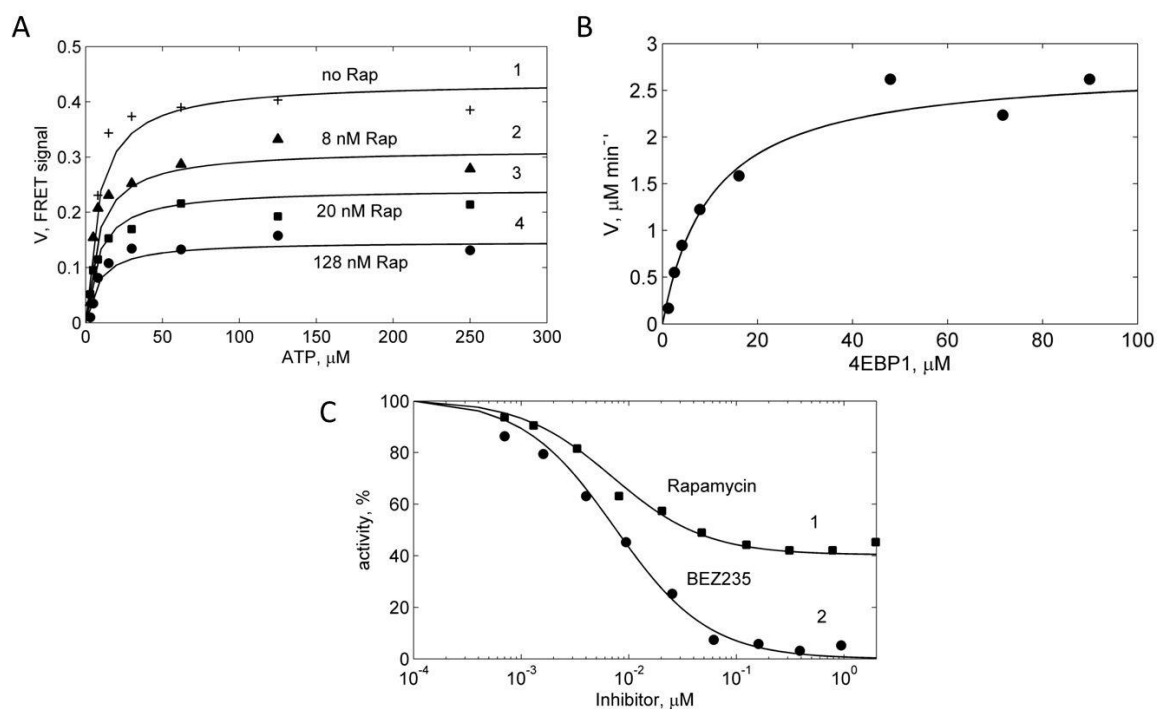


Рис. 2-9. (А): Зависимость скорости реакции 4EBP1(Thr46) фосфорилирования, катализируемой mTOR киназой, от концентрации АТФ при разных значениях концентрации рапамицина: линия 1 0 нМ, линия 2 – 8 нМ, линия 3 – 20 нМ, линия 4 – 128 нМ. Точки – экспериментальные данные: 200 нМ 4EBP1, 3 нМ mTOR, 200 нМ FKBP12 в TR-FRET эксперименте (Tao et al., 2010). (В): Зависимость скорости реакции 4EBP1(Thr46) фосфорилирования от концентрации субстрата 4EBP1. Линия – теоретическая зависимость. Точки – экспериментальные данные: 300 μМ АТФ, 6.7 нМ mTOR в радиометрическом эксперименте (Tao et al., 2010). (С): Дозовая зависимость скорости реакции mTOR1 от концентрации рапамицина (линия 1) и BEZ235 (линия 2). Линии теоретической зависимости. Точки – экспериментальные данные: 40 μМ 4EBP1, 20 нМ mTOR1 и 100 μМ АТФ в радиометрическом эксперименте (Tao et al., 2010).

Значение константы диссоциации АТР, $K_{d,ATP} = 8.4 \text{ } \mu\text{M}$ (6.2; , 38.9), полученное в расчете, значительно ниже, чем значение константы Михаэлиса, $74 \text{ } \mu\text{M}$, полученное в работе (Tao et al., 2010) на основе фиттирования экспериментальных данных уравнением Михаэлиса-Ментен. Можно назвать две возможные причины этого различия. Первая причина может быть за счет того, что данный расчет проведен на более широком наборе экспериментальных данных, чем расчет (Tao et al., 2010), в результате чего получена более надежная оценка для этой константы. Вторая причина может быть связана с тем, что в данном расчете определялась истинная константа диссоциации, в то время как в работе (Tao et al., 2010) была найдена кажущаяся константа Михаэлиса.

С целью валидации модели с набором полученных кинетических параметров был проведен расчет зависимость скорости реакции mTOR1 от концентрации рапамицина (ур. (2.7)) и проведено сравнение с экспериментальными данными (Tao et al., 2010). Сравнение показало удовлетворительное согласие расчета с экспериментом (Рис. 2-9С, линия 1). Также было проведено сравнение расчетной дозовой зависимости активности mTOR1 (скорости реакции) от концентрации ингибитора BEZ235 с экспериментальными данными (Tao et al., 2010), что также показало удовлетворительное согласие теории с экспериментом (Рис. 2-9С, линия 2).

При сопоставлении дозовых зависимостей для рапамицина и BEZ235 на Рис. 2-9С, (линии 1 и 2) видно, что рапамицин ингибирует около 60% активности mTOR1 в то время как BEZ235 подавляет ее полностью. В результате фиттинга модели по экспериментальным данным для дозовых зависимостей активности mTOR1 (скорости реакции) от концентрации ингибитора BEZ235 была оценена константа диссоциации для BEZ235 $K_{d,BEZ} = 0.56 \text{ nM}$ (0.48; 0.57), значение которой ниже, чем экспериментальные значения констант ингибирования $K_m = 2.5 \text{ nM}$ и 1.7 nM , полученные в результате фиттинга радиометрических и FRET экспериментальных данных в работе (Tao et al., 2010).

Полученное значение константы диссоциации $K_{d,BEZ}$ позволяет оценить значения IC_{50} для различных значений концентрации АТР, использованных в эксперименте:

$$IC_{50} = K_{d,BEZ} \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} \right). \quad (2.9)$$

Уравнение (2-5) следует из уравнения (2-1) и определения IC_{50} как значения концентрации ингибитора, при которой достигается 50% ингибирование активности фермента. Вывод уравнения (2.9) дан в Приложении 1. Для концентрации АТР=100 μ М уравнение (2.9) дает значение $IC_{50} = 8 \mu$ М, что близко к экспериментальному значению $IC_{50} = 10$ нМ, полученному на основе дозовой зависимости (Тао et al., 2010) (см. экспериментальные данные на Рис. 2-9С). Таким образом соотношение (2.9) позволяет оценить IC_{50} значения для ингибитора BEZ235 для различных экспериментальных условий и для различных клеток, используя известные значения внутриклеточной концентрации АТР.

В противоположность зависимости значения IC_{50} от концентрации АТР для АТР-конкурентного ингибитора, значение IC_{50} для аллостерического ингибитора рапамицина не зависит от концентрации АТР и в соответствии с уравнением (2.7) равняется константе диссоциации рапамицина:

$$IC_{50} = K_{d,Rap}, \quad (2.10)$$

где $K_{d,Rap}$ – константа диссоциации либо $K_{d,Rap1}$ или $K_{d,Rap2}$ в зависимости от присутствия или отсутствия FKBP12 белка в эксперименте. Это точное равенство (2.10)

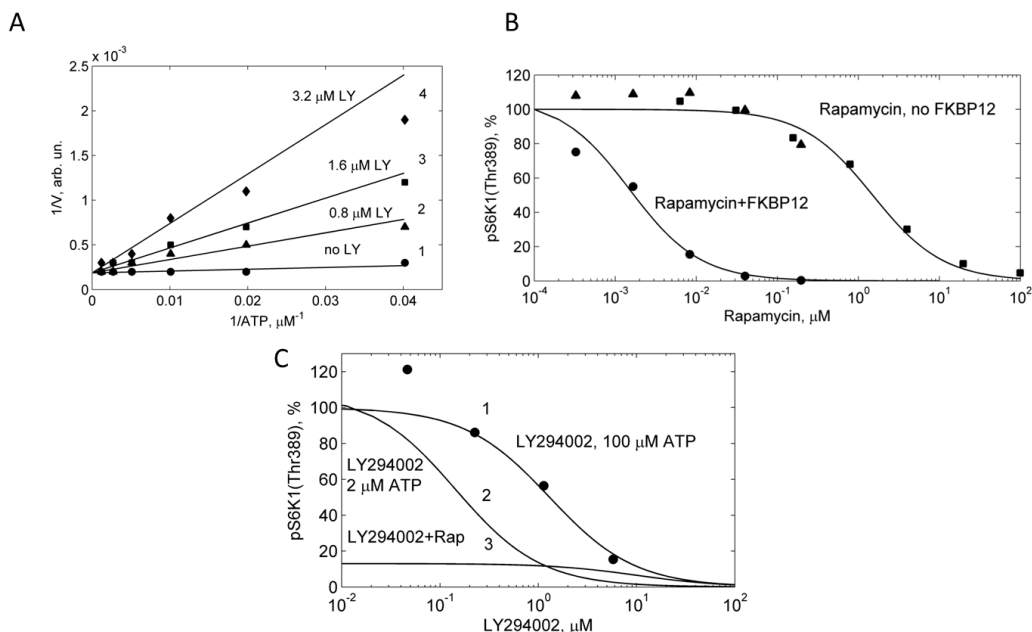


Рис. 2-10. (А): Зависимость скорости реакции S6K1(Thr389) фосфорилирования, катализируемой mTOR киназой, от концентрации АТФ при разных значениях концентрации ингибитора LY294002: линия 1 - 0 нМ, линия 2 - 0.8 μM , линия 3 - 1.6 μM и линия 4 - 3.2 μM LY294002. Точки - экспериментальные данные: 1.25 μM S6K1, АТФ 100 μM , 6 нМ FLAG-TOR в эксперименте (Torral-Barza et al., 2005). (В): Дозовая зависимость скорости реакции mTOR1 от концентрации рапамицина в присутствии (линия 1) и отсутствии (линия 2) FKBP12 белка. Линии - теоретические результаты. Точки - экспериментальные данные: кружки и треугольники (Torral-Barza et al., 2005) и квадраты (Shor et al., 2008). Экспериментальные условия: 1.25 μM S6K1, 6 нМ FLAG-TOR. (С): Дозовая зависимость ингибирования FLAG-mTOR1 скорости реакции фосфорилирования S6K1(Thr389) ингибитором LY294002. Линии 1 и 2 - теоретические расчеты при 100 μM и 2 μM АТФ, соответственно. Точки - экспериментальные данные при 1.25 μM S6K1, 100 μM АТФ, 6 нМ FLAG-TOR(3.5) в эксперименте (Torral-Barza et al., 2005). Линия 3 - теоретическая дозовая зависимость ингибирования активности mTOR комбинацией ингибиторов LY294002 и рапамицина (10 нМ) при 100 μM АТФ.

следует из уравнения для скорости реакции V_{4EBP1} (2.7) и определения значения IC_{50} . Вывод соотношения (2.10) приведен в Приложении 1. Близость значений IC_{50} для рапамицина $\text{IC}_{50}=9.6$ нМ (+FKBP12) и $\text{IC}_{50}>1$ μM (без FKBP12) с

константами диссоциации $K_{d,Rap2} = 6 \text{ нМ}$ (3.1; 6.9) (+FKBP12) и $K_{d,Rap1} = 1.7 \text{ мМ}$ (1.3; 1.8) (без FKBP12) подтверждает полученное соотношение (2.10).

Таким образом, если в эксперименте на клеточной популяции получено существенное отличие значения IC_{50} от значения константы диссоциации для аллостерического ингибитора, то, вероятнее всего, подавление его ингибирующей способности связано с мутациями в сигнальной системе. В случае АТР-конкурентного ингибитора это различие может быть также связано с зависимостью IC_{50} от АТР концентрации согласно ур. (2.9).

Для определения кинетических параметров скорости реакции V_{S6K1} фосфорилирования S6K1 киназы (ур. (2.8)) были использованы экспериментальные данные по зависимости скорости реакции от АТР концентрации при различных концентрациях ингибитора LY294002 (Toral-Barza et al., 2005). Учитывая, что LY294002 является неспецифическим ингибитором PI3K (Vlahos et al., 1994), а также то, что PI3K и mTOR киназы обладают высокой гомологичностью структур их каталитических сайтов, было предположено, что механизм ингибирования mTOR киназы ингибитором LY294002 является таким же, как для PI3K киназы. Результаты фиттирования экспериментальных данных и найденные кинетические параметры приведены на Рис. 2-10 и Таблице 2-5. Представление кинетических данных в форме графика Лайнвивера — Берка на Рис. 2-10А подтверждают АТР-конкурентный механизм ингибирования mTOR киназы ингибитором LY294002. Таким образом, аналогично ингибитору BEZ235, LY294002 является также ингибитором двойного действия для PI3K и mTOR киназ.

С целью определения констант диссоциации рапамицина $K_{d,Rap1}$ и $K_{d,Rap2}$ с mTOR1 в отсутствии и присутствии FKBP12 белка были использованы экспериментальные данные по дозовым зависимостям ингибирования реакции фосфорилирования S6K1(Thr389) ингибитором рапамицином (Toral-Barza et al., 2005). При фиттировании были получены следующие константы диссоциаций

$K_{d,Rap1}=1.7 \mu\text{M}$ (1.3; 1.8) и $K_{d,Rap2}=1.6 \text{ nM}$ (1.2; 1.7) в отсутствии и присутствии FKBP12 белка, соответственно (линии 1 и 2 на Рис. 2-12В). Сравнение

Таблица 2-5. Кинетические параметры mTOR1 киназы и ее ингибиторов, рапамицина, BEZ235 и LY294002. Указаны значения медиан и в скобках приведены доверительные интервалы, полученные методом бутстрапинга. Приведены также экспериментальные данные, полученные на очищенном ферменте. K_m и K_i константы Михаелиса и ингибирования.

Кинетические параметры	Экспериментальные значения
<i>Константа скорости реакции, k_{4EBP1}</i>	
0.47 min ⁻¹ (0.41; 0.48)	0.47 min ⁻¹ (Tao et al., 2010)
<i>Константа диссоциации АТР, $K_{d,ATP}$</i>	
8.4 μM (6.2; 8.9)	$K_m=74 \mu\text{M}$ (Tao et al., 2010)
<i>Константа диссоциации 4EBP1, $K_{d,4EBP1}$</i>	
11.1 μM (7.8; 11.8)	$K_m=9.5 \mu\text{M}$ (Tao et al., 2010)
<i>Константа диссоциации S6K1, $K_{d,S6K1}$</i>	
0.42 μM (10 ⁻³ ; 0.5)	$K_m=0.8 \mu\text{M}$ (Tao et al., 2010)
<i>Коэффициент ингибирования скорости реакции mTOR для субстрата 4EBP1 ингибитором рапамицином, η_{Rap}</i>	
0.43 (0.38; 0.44)	
<i>Константа диссоциации рапамицина, $K_{d,Rap1}$</i>	
1.7 μM (1.3; 1.8); -FKBP12 и +S6K1	$IC_{50}>1 \mu\text{M}$ (Toral-Barza et al., 2005) $K_d=490\pm39 \text{ nM}^{(1)}$, FPA (Banaszynski et al., 2005) $K_d=26 \pm 0.8 \text{ nM}^{(1)}$, SPR (Banaszynski et al., 2005)
<i>Константа диссоциации рапамицина, $K_{d,Rap2}$</i>	
6 nM (3.1; 6.9); +FKBP12 и +4EBP1	$IC_{50}=9.6 \text{ nM}$ (Tao et al., 2010) $K_d=0.35 \text{ nM}^{(2)}$, FPA (Banaszynski et al., 2005) $K_d=12\pm4.2 \text{ nM}^{(2)}$, SPR (Banaszynski et al., 2005) $K_d=3 \text{ nM}^{(2)}$ (Chen et al., 1995)
1.6 nM (1.2; 1.7); +FKBP12 и +S6K1	$IC_{50}=2 \text{ nM}$ (Toral-Barza et al., 2005)
<i>Константа диссоциации BEZ235, $K_{d,BEZ}$</i>	
0.56 nM (0.48; 0.57)	$K_i=2.5 \text{ nM}$, 1.7 nM (Tao et al., 2010) $IC_{50}=10 \text{ nM}$ (Tao et al., 2010)

Константа диссоциации LY294002, $K_{d,LY}$

0.12 μM (0.09; 0.13)

$IC_{50}=1.5 \mu\text{M}$ (Tao et al., 2010)

¹⁾ Экспериментальные константы диссоциации, полученные в отсутствии FKBP12 белка методом флуоресцентной поляризационной спектроскопии (FPA) и методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

²⁾ Экспериментальные константы диссоциации получены в присутствии FKBP12 белка.

полученных констант показывает, что присутствие FKBP12 белка существенно увеличивает сродство рапамицина к mTOR киназе. Также полученная константа диссоциации в присутствии FKBP12 белка $K_{d,Rap2}=1.6 \text{ nM}$ (1.2; 1.7) согласуется с экспериментальными значениями 0.35 нМ и $12 \pm 0.8 \text{ нМ}$, полученными методами поляризационно-флуоресцентной спектроскопии и поверхностно-плазмонного резонанса, соответственно (Banaszynski et al., 2005). Для константы диссоциации в отсутствии FKBP12 белка экспериментальные значения, полученные указанными методами, находятся в микромолярном диапазоне $490 \pm 39 \text{ нМ}$ и $26 \pm 0.8 \text{ нМ}$ (Banaszynski et al., 2005). Отметим, что значения констант диссоциации рапамицина, полученные в модели и эксперименте, близки к значению $IC_{50}=2 \text{ нМ}$ в присутствии FKBP12 белка и $IC_{50} > 1 \mu\text{M}$ в его отсутствии (Toral-Barza et al., 2005). Близость значений констант диссоциации и IC_{50} для ингибитора рапамицина подтверждает соотношение равенства K_d и IC_{50} (ур. (2.10)) для аллостерических ингибиторов.

Для валидации модели mTOR1 киназы (ур. (2.7)) был выполнен расчет дозовой зависимости ингибирования S6K1(Thr389) фосфорилирования ингибитором LY294002 (Рис. 2-10С) и проведено сравнение с экспериментальными данными (Toral-Barza et al., 2005). По аналогии с ур. (2.), зависимость значения IC_{50} для LY294002 от концентрации АТФ дается уравнением

$$IC_{50} = K_{d,LY} \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} \right), \quad (2.11)$$

которое позволяет рассчитывать LY294002 IC_{50} значения при различных концентрациях АТР. При концентрации АТР 100 μM , использованной в эксперименте (Toral-Barza et al., 2005) ур. (2.11) дает значение $IC_{50}=1.5 \mu\text{M}$, что соответствует экспериментальной величине, определенной в этом эксперименте (см. экспериментальные данные на Рис. 2-10С). Таким образом надежное определение параметров ур. (2.7), $K_{d,LY}$ и $K_{d,ATP}$, позволяет использовать это уравнение для расчета значений IC_{50} для ингибитора LY294002 при произвольных концентраций АТР как в *in vitro* экспериментах, так и в экспериментах на клеточных популяциях.

Уравнение (2.11) было использовано при сравнении расчетов дозовых зависимостей ингибирования mTOR1 ингибитором LY294002 при концентрациях АТР 2 μM и 100 μM (линии 1 и 2 на Рис. 2-10С). Так как LY294002 является АТР-конкурентным ингибитором, значение IC_{50} уменьшается при уменьшении уровня АТР с $IC_{50}=1.5 \mu\text{M}$ при 100 μM АТР до $IC_{50}=0.15 \mu\text{M}$ при 2 μM АТР. Таким образом, LY294002 становится более сильным ингибитором mTOR1 при низких концентрациях АТР, и его ингибирующая активность становится ниже при повышении концентрациях АТР. Так при концентрациях АТР 5 мМ, характерной для внутриклеточной среды (McLaughlin, Wang, Gambhir, & Murray, 2002), ур. (2.11) дает значение $IC_{50}=71 \mu\text{M}$. Заметим, что согласно ур. (2.10) действие аллостерического ингибитора рапамицина не зависит от клеточной концентрации АТР. Это согласуется с экспериментальными данными по IC_{50} , полученными на клеточных популяциях.

Полученная модель mTOR киназы была использована для исследования действия комбинации двух лекарств: аллостерического ингибитора рапамицина и АТР-конкурентного ингибитора LY294002. Была рассчитана дозовая зависимость ингибирования активности mTOR1 от концентрации LY294002 при концентрации рапамицина 10 нМ и 100 μM АТР (линия 3 на Рис. 2-10С). Расчет показал аддитивный эффект двух ингибиторов и возрастание IC_{50} значения с 1.5

μМ до 30 μМ. Этот результат указывает на отсутствие синергетического эффекта рапамицина и LY294002 при их комбинации.

2.3.3. Кинетическая модель PTEN фосфатазы

Для определения параметров модели фосфатазы PTEN были использованы экспериментальные кинетические данные, измеренные на униламелярных смешанных фосфатидилхолиновых везикулах, содержащих липидный субстрат PIP3 (McConnachie, Pass, Walker, & Downes, 2003). В этом эксперименте объемная концентрация PIP3 в везикулах варьировалась при фиксированной поверхностной концентрации липида X_{PIP3} (мольная фракция). В результате, зависимость активности PTEN от объемной концентрации PIP3 была определена при различных мольных фракциях X_{PIP3} на поверхности везикул. Для моделирования экспериментальных данных, полученных в работе (McConnachie et al., 2003), было использовано уравнение Михаелиса-Ментен для скорости реакции

$$V_{PTEN} = \frac{k_{PTEN} \cdot PTEN \cdot PIP3_s}{K_{PIP3} + PIP3_s} \quad (2.12)$$

где k_{PTEN} и K_{PIP3} – константа каталитической скорости реакции и константа Михаэлиса.

$$PIP3_s = X_{PIP3} PIP3.$$

На Рис. 2-11 показаны результаты фиттирования зависимости скорости реакции V_{PTEN} (ур. (2.12)) от объемной концентрации PIP3 при четырех поверхностных концентрациях PIP3, X_{PIP3} по экспериментальным данным (McConnachie et al., 2003). Представление теоретических и экспериментальных данных в обратных координатах $1/PIP3$ и $1/V_{PTEN}$ показывает, что уравнение скорости реакции (2-4) удовлетворительно описывает скорость реакции при различных значениях X_{PIP3} . Более того, прямые линии, соответствующие

различным фракциям X_{PIP3} , пересекаются в одной точке, что указывает на независимость максимальной скорости реакции от поверхностной концентрации X_{PIP3} . Полученный набор кинетических констант PTEN приведен в Таблице 2-6.

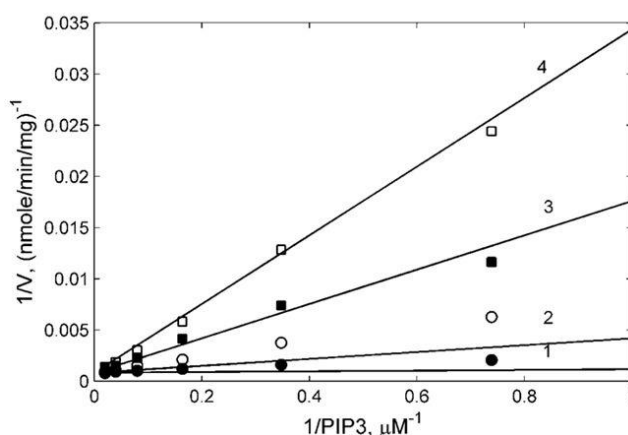


Рис.2-11. Зависимость скорости реакции PTEN от PIP3 различных концентрациях поверхностной фракции PIP3 в везикулах X_{PIP3} . Зависимость дана в обратных координатах $1/V_{PTEN}$ и $1/PIP3$. Линии-теоретические результаты, точки- экспериментальные данные по PTEN гидролазной активности в фосфатидилхолиновых везикулах при $X_{PIP3}=0.1$ (темные кружки), 0.01 (светлые кружки), 0.002 (темные квадраты), 0.001 (светлые квадраты) (McConnachie et al., 2003).

Таблица 2-6. Кинетические параметры PTEN фосфатазы. Указаны значения медиан и в скобках приведены доверительные интервалы, полученные методом бутстрапинга. Приведены также экспериментальные данные, полученные на очищенном ферменте. K_m и K_i константы Михаелиса и ингибирования.

Параметр	Значение	Экспериментальные данные
k_c	48 min ⁻¹ (41; 49)	$k_c = 73 \pm 4.4$ min ⁻¹ (McConnachie et al., 2003) $k_c = 120$ min ⁻¹ (Maehama et al., 2001)
K_{PIP3}	29 nM (20; 31)	$K_m < 50$ μM (Maehama et al., 2001) $ik_m = 0.04 \pm 0.005^1$ (mol%) (McConnachie et al., 2003) $K_S = 84 \pm 9.0^1$ mM (McConnachie et al., 2003)

¹ Параметры уравнения скорости (McConnachie et al., 2003)

$$V_{PTEN} = \frac{V_{max} \cdot X_{PIP3} \cdot PIP3}{ik_m \cdot K_S + PIP3 \cdot (ik_m + X_{PIP3})}$$

2.4. Действие ингибиторов рецепторов эпидермального фактора роста на активацию PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы в опухолевых клетках

Разработанная модель PI3K/PTEN/AKT и RAS/RAF/ERK сигнальных систем была применена к исследованию действия лекарственных препаратов, ингибиторов рецепторов эпидермального фактора роста, на клеточные линии рака яичников с различным набором онкомутаций. Для определения полного набора кинетических параметров данной сигнальной системы были спланированы эксперименты по измерению кинетики активации и ингибирования PI3K/PTEN/AKT и RAS/RAF/ERK сигнальных систем в клеточных популяциях. Для калибровки модели была выбрана клеточная линия PE04, для которой отсутствуют мутации в генах, кодирующих ErbB рецепторы и сигнальные белки в PI3K/PTEN/AKT сигнальном пути (Cooke et al., 2010) (см. Таблицу 2-2). Для моделирования действия ЛП на клеточные линии с онкомутациями в PI3K/PTEN/AKT пути в разработанной модели изменялись кинетические параметры и концентрации тех сигнальных белков, в генах которых обнаружены онкомутации. Экспериментальные работы были выполнены участниками проекта в Центре исследования рака Эдинбургского университета. В экспериментах измерялась кинетика фосфорилирования основных сигнальных белков в PI3K/PTEN/AKT пути клеточной линии рака яичников PE04 в течении 1 часа после добавления в клеточную популяцию лиганда HRG в отсутствии и присутствии ингибиторов. Методом Вестерн-блоттинга были измерены концентрации следующих белков: рецептора ErbB2(Tyr877), киназы pAKT(Ser473), фосфатазы pPTEN и киназы pERK (Faratian et al., 2009).

В результате фиттирования экспериментальных данных был получен набор

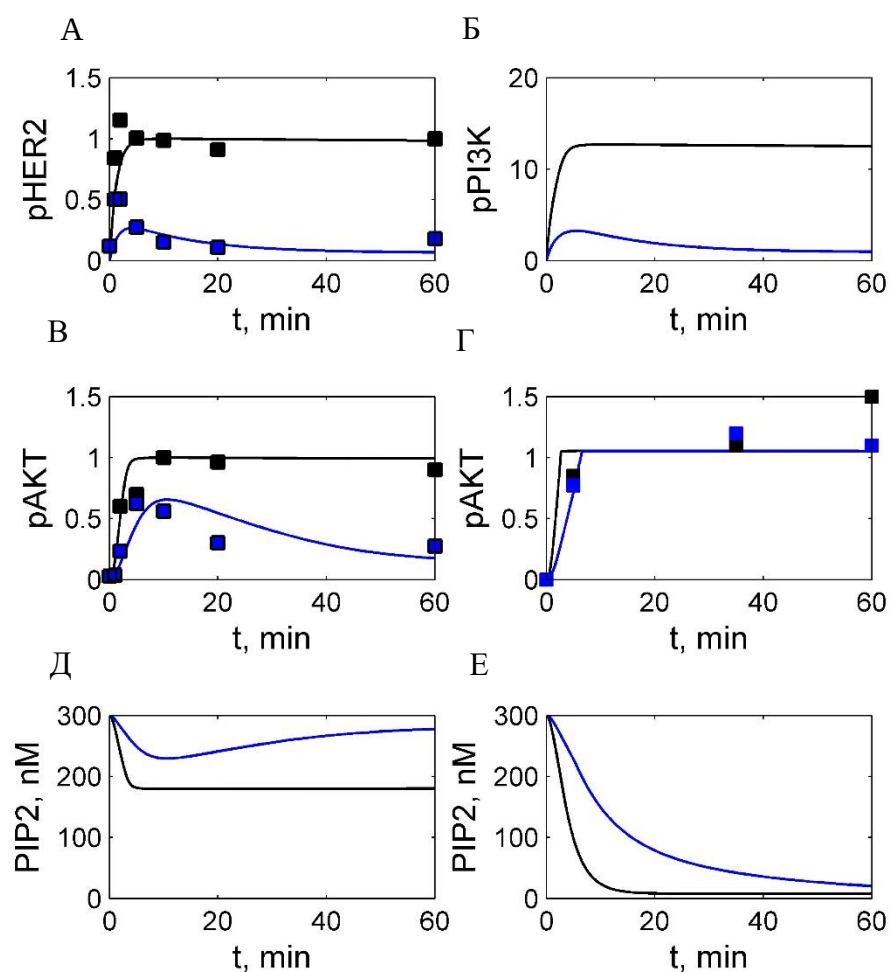


Рис. 2-12. Результаты компьютерного моделирования кинетики активации и ингибирования PI3K/PTEN/AKT сигнального пути в опухолевой линии PEO4 клеток яичников. Кинетика pErbB2 (A), pPI3K (Б), pAKT (B) и PIP2 (Г) при активации HRG (—) и ингибировании ЛП пертузумабом (2C4) (—). Результаты моделирования действия ЛП пертузумаба при ингибировании активности PTEN (50 nM bpV(pic)) на кинетику pAKT (Д) и PIP2 (Е). Точки - экспериментальные данные для pErbB2(Tyr877), pAKT(Ser437) при 1 нМ HRG (черные точки), 100 нМ пертузумаба (синие точки) и 100 нМ пертузумаба при 50 нМ bpV(pic) (синие точки на Рис. 2-12Г).

кинетических параметров модели, при котором модель наилучшим образом описывает кинетику активации сигнальной системы. Результаты расчетов кинетики фосфорилирования рецептора ErbB2, (pErbB2), АКТ киназы (pАКТ), PI3K (pPI3K) и кинетики PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата) вместе с экспериментальными данными приведены на Рис. 2-12.

Анализ полученных результатов показал, что модель удовлетворительно описывает динамику PI3K/PTEN/АКТ сигнальной системы при активации ErbB рецепторов лигандом HRG. В модели рассмотрен одним из основных миогенных механизмов активации PI3K/PTEN/АКТ пути пролиферации раковых клеток за счет образования активированного лиганд-рецепторного комплекса ErbB3-HRG с рецептором ErbB2 (Yarden & Sliwkowski, 2001). В результате формирования ErbB3/ErbB2 комплексов происходит фосфорилирование тирозиновых остатков ErbB3/ErbB2 рецептов, что вызывает связывание p85 регуляторной субъединицы PI3K киназы и фосфорилирование ее каталитической субъединицы p100. В расчете этот процесс соответствует возрастанию концентрации фосфо-PI3K, pPI3K (Рис.2-12) и синтезу PIP3. Как видно, активация рецептора ErbB2 и киназы АКТ происходит в течение первых 5 мин. после действия начального стимула – добавления лиганда HRG (Рис. 2-12Б).

Анализ полученных результатов показал, что пертузумаб является эффективным ингибитором активации АКТ сигнала. Его связывание с ErbB2 рецептором приводит к ингибированию 70% и 90% фосфорилирования ErbB2 на 5 мин и 60 мин, соответственно, после начала действия ингибитора. Это приводит к подавлению активации PI3K киназы, низкому уровню синтеза PIP3 и, как следствие, к ингибированию активации АКТ сигнала. Как видно, пертузумаб вызывает, соответственно, 50% и 80% ингибирование pАКТ концентрации на 10 мин и 60 мин после начала действия ингибитора, соответственно.

В моделировании показано, что основным управляющим элементом в

данной системе является цикл PIP2/PIP3, в котором синтезируется PIP3 (фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат) – сигнальных липид, участвующий в начальной стадии активации АКТ (Рис. 2-1). Этот цикл находится под управлением киназы PI3K и фосфатазы PTEN – белков, для которых обнаружена высокая частота мутаций в различных типах раковых опухолей. Мутации *PIK3CA* гена вызывают повышение активности киназы, в то время как мутации *PTEN* гена приводят к делеции или пониженной фосфатазой активностью PTEN. С целью выяснения влияния мутаций генов *PIK3CA* и *PTEN* на действие ингибиторов рецепторов был исследован ответ сигнальной системы при ингибировании рецепторного сигнала при различных концентрациях сигнальных белков. Показано, что при высоком уровне экспрессии PTEN пертузумаб ингибирует активацию рецепторного сигнала pErbB2, что вызывает эффективное ингибирование выходного сигнала системы pАКТ (Рис. 2-12). При уменьшении экспрессии PTEN более чем на 50% ингибирование pErbB2 рецепторов не вызывает ингибирование pАКТ в области физиологических концентраций пертузумаба 100 нМ (Рис. 2-12).

Таким образом в результате анализа теоретических результатов предложен механизм возникновения резистентности PI3K/PTEN/АКТ сигнального пути к действию ЛП пертузумаба, ингибирующего активацию ErbB3 рецепторов. В результате уменьшения активности фосфатазы PTEN выходной сигнал PI3K/PTEN/АКТ сигнального пути становится нечувствительным к действию лекарств, ингибирующих сигналы ErbB рецепторов. С целью проверки предложенного механизма резистентности к моноклональной лекарственной терапии были спланированы эксперименты на клеточных линиях рака яичников, которые были проведены участниками проекта в Центре исследования рака Эдинбургского университета (Faratian et al., 2009).

2.5. Исследованию механизмов резистентности PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы к действию ингибитора клеточных рецепторов

С целью проверки предложенного механизма резистентности к ЛП пертузумабу были проведены эксперименты на клеточных линиях рака яичников PE04. Цель экспериментов состояла в выяснении роли уровня экспрессии PTEN фосфатазы в возникновении резистентности в раковых клетках к действию ингибитора ErbB3 рецепторов (Faratian et al., 2009). В проведенных экспериментах потеря активности PTEN вызывалась путем его ингибирования специфическим ингибитором bpV(pic) (Vlahos et al., 1994). Проводились измерения концентрации фосфорилированной киназы pAKT(Ser473) и уровня ингибирования роста клеточной популяции при действии пертузумаба.

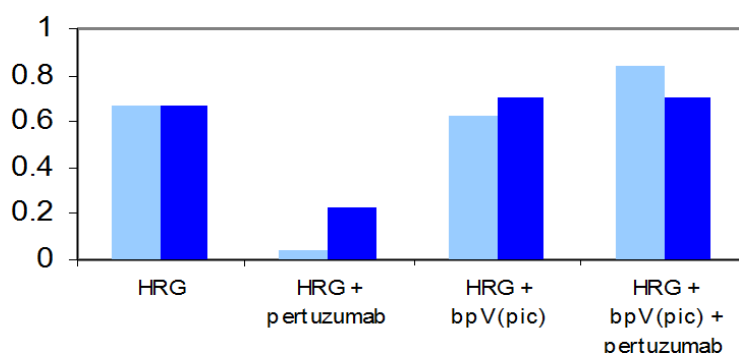


Рис. 2-13. Сравнение теоретических результатов (темные столбцы) с экспериментальными данными (светлые столбцы) по ингибирующему действию пертузумаба. Активация pAKT на 30 минуте после добавления 1 нМ HRG (столбец 1); ингибирование pAKT при действии пертузумаба (столбец 3). Отсутствие ингибирующего эффекта пертузумаба при ингибировании активности PTEN при действии 50 нМ bpV(pic) (столбец 4).

Экспериментальные результаты подтвердили предсказания модели по потере чувствительности выходного сигнала системы pAKT(Ser473) к ингибированию входного рецепторного сигнала. На Рис. 2-12Д представлено сравнение теоретических и экспериментальных результатов кинетики, которое

показывает, что уровень pAKT(Ser473) сигнала остается высоким и не зависит от 90% ингибирования ErbB рецепторов пертузумабом при ингибировании активности фосфатазы PTEN. На Рис. 2-13 приведено сравнение экспериментальных и теоретических уровней фосфорилированной киназы pAKT(Ser473). Видно, что пертузумаб ингибирует начальную активации AKT(Ser473) (столбец 1) на уровне 90%-80% (столбец 2). Ингибирование PTEN не оказывает влияния на активации AKT(Ser473) (столбец 3), но приводит к подавлению ингибирующего эффекта пертузумаба (столбец 4).

Расчеты также показали, что система теряет чувствительность к ингибированию ErbB рецепторов при увеличении активности киназы PI3K (>2 раз), а также при увеличении активности AKT киназы. Эти результаты будут приведены и проанализированы в главе 3.

Таким образом, результаты проведенных совместных теоретических и экспериментальных исследований показали, что изменения активностей киназ PI3K, AKT и фосфатазы PTEN вызывают резистентность к ингибированию ErbB2,3 рецепторов. Анализ полученных результатов показал, что изменения активностей указанных белков приводят к нарушению функционирования основного управляющим элемента системы цикла PIP2/PIP3, приводящему к повышенному уровню сигнального липида PIP3. В результате данного нарушения происходит потеря чувствительности всей сигнальной системы PI3K/PTEN/AKT к действию ингибиторов клеточных рецепторов. Далее в работе предполагается, что исследованное изменение активностей указанных белков, может происходить в раковых клетках при мутациях генов, кодирующих данные белки. Изменение соотношения активностей белков при мутациях приводит к нарушению баланса в цикле PIP2/PIP3 и, как следствие, к возникновению резистентности к рецепторному сигналу. Для всех трех исследованных белков обнаружена высокая частота мутаций в онкологии молочной железы и яичников (около 30%) (Yuan & Cantley, 2008). Мутации *PIK3CA* гена вызывают повышение

активности киназы, в то время как мутации *PTEN* гена приводят к делеции или пониженной фосфатазой активность *PTEN*. Повышенная активность *АКТ* в раковых клетках связана, главным образом, с амплификацией гена *АКТ*.

С целью проверки предсказаний модели по влиянию активностей белков *PI3K*, *PTEN* и *АКТ* на возникновение резистентности сигнальной системы *PI3K/PTEN/АКТ* с при онкомутациях были спланированы эксперименты на серии клеточных линий рака яичников с различными наборами мутаций в генах, кодирующих указанные белки. Было приведено измерение ингибирующего действия пертузумаба на роста клеточных популяций 13 линий рака яичников с одновременным выполнением генетического и протеомного анализа для определения мутаций *PIK3CA* гена и уровней экспрессии *ErbB* рецепторов и белков, входящих в *PI3K/PTEN/АКТ* сигнальный путь. Спланированные эксперименты были проведены участниками проекта в Центре Исследования Рака Эдинбургского университета (Faratian et al., 2009).

2.6. Анализ экспериментальных и клинических данных по проверке механизмов резистентности к ингибиторам клеточных рецепторов

С целью проверки предложенного механизма резистентности были проанализированы данные экспериментов, проведенных на клеточных линиях рака яичников с различным набором мутаций. В экспериментах было проведено измерение степени ингибирования роста популяций 13 клеточных линий при действии пертузумаба, а также были определено наличие мутаций *PIK3CA* гена и измерены уровни экспрессии *ErbB1*, *ErbB2* и *ErbB3* рецепторов и белков *PTEN*, *АКТ*, *pАКТ*, *ERK* и *pERK*. Экспериментальные данные приведены на Рис. 2-14. Как показали результаты анализа экспериментальных данных, резистентность к ингибитору пертузумабу (ингибирование <15%) наблюдается у клеточных линии с низким уровнем экспрессии *PTEN*, повышенным уровнем экспрессии

АКТ, pАКТ, ERK и pERK, а также с мутациями *PIK3CA* (левая часть верхней и нижней диаграмм на Рис. 2-14). В то время как клетки с высоким уровнем экспрессии PTEN и низкими уровнями АКТ и pАКТ проявляют чувствительность к действию пертузумаба и ингибирующий эффект пертузумаба для них достигает 40%.

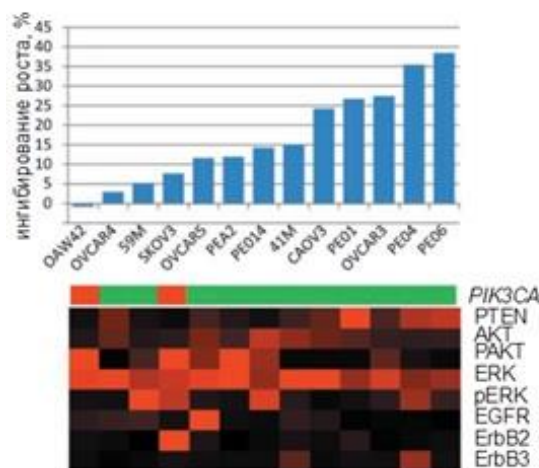


Рис.2-14. Экспериментальные данные по ингибирующему действию пертузумаба на рост 13 линий раковых клеток яичников (верхняя диаграмма) и уровням экспрессии ErbB рецептором и основных белков в PI3K/PTEN/AKT сигнальном пути, а также мутации *PIK3CA* гена в исследуемых клетках (нижняя диаграмма).

Для клинической проверки полученных результатов были собраны и проанализированы клинические данные для пациентов с раком молочной железы, проходящих курс моноклональной терапии в Western General Hospital Эдинбургского университета. В проведенных клинических исследованиях был использован препарат трастузумаб (Герцептином), который аналогично пертузумабу является ингибитором ErbB2 рецепторов. Отличие действия двух препаратов состоит в том, что трастузумаб ингибирует, главным образом, гомодимеризацию ErbB2 рецепторов и рекомендован для терапии рака груди с

амплификацией гена *ErbB2*. В остальном, действия трастузумаба и пертузумаба схожи – они оба направлены на ингибирование PI3K/PTEN/АКТ сигнального пути пролиферации раковых клеток. Отметим, что использование трастузумаба в проведенных клинических исследованиях связано с тем, что исследуемый ЛП пертузумаб не мог быть использован в клинических испытаниях, проводимых в 2009 г. потому, что был утвержден для клинического применения только в 2013 г.

В Таблице 2-7 приведены характеристики 122 пациентов, проходящих курс лечения трастузумабом и участвующих в данном исследовании. В результате проведенного анализа кривых Каплан-Мейера (Рис. 2-15) для 122 пациентов с раком молочной железы было показано, что выживаемость пациентов с высоким уровнем экспрессии *PTEN* приблизительно в 3 раза выше, чем у пациентов с низким уровнем экспресс *PTEN*. Полученные данные показывают, что чувствительность пациентов к ингибитору ErbB2 рецепторов существенно ослабевает при уменьшении активности фосфатазы PTEN.

Таблица 2-7. Клиникопатологические характеристики пациентов 122 пациентов рака молочной железы, проходящих курс лечения трастузумабом

Характеристики пациентов	Количество пациентов	Процент	Log-ранг выживаемости
Возраст (лет)			0.49
<50	49	40.1	
>50	73	59.9	
Нет данных	0	0	
Индекс прогноза			
<3.4	2	1.6	
3.4-5.4	47	38.5	
>5.4	62	50.8	
Нет данных	11	9.0	

Стадия рака			0.024
I	35	28.7	
II	64	52.5	
III	12	9.8	
IV	3	2.5	
Нет данных	8	6.6	
Стадии поражения лимфотических узлов			0.20
Отрицательная	26	21.3	
Положительная	87	71.3	
Нет данных	9	7.4	
Статус эстроген рецепторов			0.038
>3	72	59.0	
≤3	41	36.6	
Нет данных	9	7.3	
ErbB2 статус			0.38
Положительный	90	73.7	
Отрицательный	32	26.3	
Нет данных	0	0	
Химиотерапия			<0.0001
Антрациклин терапия	66	54.1	
Таксан терапия	53	43.4	
Нет данных	3	2.5	

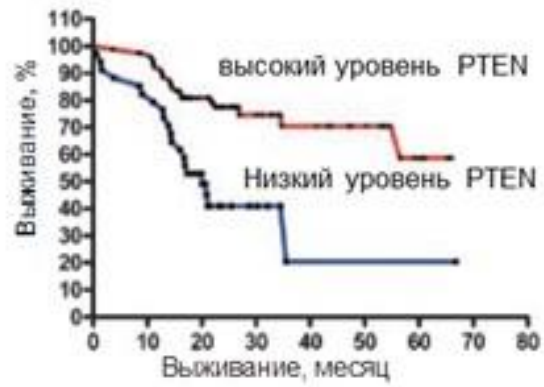


Рис. 2-15. Кривые Каплан-Мейера для выживаемости 122 пациентов с раком груди, проходящих курс лечения трастузумабом с низким (синяя линия) и высоким (красная линия) уровнями экспрессии PTEN.

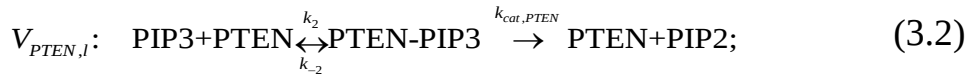
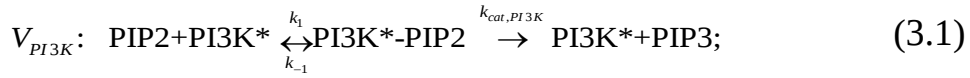
Глава 3. Методы комбинированной онкотерапии по подавлению лекарственной резистентности

В данной главе представлены компьютерные методы моделирования для разработки комбинированной лекарственной онкотерапии (КЛОТ), нацеленной на преодоления *de novo* и приобретенной резистентности к лекарственным препаратам, ингибиторам клеточных рецепторов. Развивается метод математического моделирования для исследования основных механизмов резистентности, возникающей за счет мутаций генов, кодирующих белки в PI3K/PTEN/AKT сигнальном пути раковых клеток молочной железы и яичников. Также разрабатываются компьютерные методы анализа чувствительности и резистентности сигнальных путей к действию ЛП. Методами компьютерного моделирования показывается, что резистентность раковых клеток к ингибиторам клеточных рецепторов обусловлена компенсаторными механизмами сигнальных систем. На основе компьютерного моделирования развит метод восстановления чувствительности PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы с мутациями генов *PIK3CA* и *PTEN* к действию ингибиторов клеточных рецепторов. Метод заключается в модификации характеристик выходных сигналов системы при действии дополнительного лекарственного препарата (модификаторов). Разработанный метод для подавления резистентности к ингибиторам клеточных рецепторов заключается в модификации выходных сигналов «мутированной» системы таким образом, чтобы восстановить исходные характеристик выходных сигналов исходной системы, чувствительной к ингибированию рецепторного сигнала. При этом достигается синергетическое действие комбинации двух ЛП: ингибитора входного рецепторного сигнала и лекарственного препарата - модификатора «мутированной» сигнальной системы.

3.1. Определение управляющего параметра PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы

Как показал предыдущий теоретический анализ и экспериментальные данные, основным управляющим элементом в данной системе является цикл PIP2/PIP3, в котором синтезируется PIP3 (фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат) – сигнальных липид, участвующий в начальной стадии активации АКТ (Рис. 1-1). Этот цикл находится под управлением киназы PI3K и фосфатазы PTEN – белков, для которых обнаружена высокая частота мутаций в онкологии молочной желез и яичников (около 30%) (Yuan & Cantley, 2008). С целью определения управляющего параметра PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы, ответственного за возникновение резистентности, были аналитически исследованы кинетические свойства данной подсистемы (Goltsov et al., 2011).

Были исследованы стационарные состояния кинетической модели PI3K/PTEN/AKT подсистемы, которая включает следующие реакции (см. схему на Рис. 1-1):



В результате анализа стационарных решений системы ОДУ, соответствующей модели (3.1)-(3.3), было получено соотношение между стационарными концентрациями для PIP2_s , AKT-PIP3_s , PIP3_s и PTEN_s

$$\frac{K_{m,PI3K}}{k_{cat,PI3K}} \frac{k_{cat,PTEN} \text{PTEN}_s}{K_{m,PTEN}} \frac{K_{d,AKT}}{\text{AKT}_o} = \text{PIP2}_s \left(\frac{1}{\text{AKT-PIP3}_s} - \frac{1}{\text{AKT}_o} \right), \quad (3.4)$$

где $K_{m,i}$, $k_{cat,i}$, $K_{d,i} = k_{-i}/k_i$ – константы Михаэлиса, диссоциации и каталитическая константа соответственно. k_i и k_{-i} – константы прямой и обратной реакций.

Для приближенной оценки было принято, что стационарные концентрации $PI3K_s$, $PTEN_s$ и AKT_s близки к их начальным концентрациям $PI3K_0$, $PTEN_0$ и AKT_0 . Тогда на основе соотношения (3.4) можно определить безразмерный параметр Γ :

$$\Gamma = \frac{K_{m,PI3K}}{k_{cat,PI3K}PI3K_o} \frac{k_{cat,PTEN}PTEN_o}{K_{m,PTEN}} \frac{K_{d,AKT}}{AKT_o} = \frac{v_{PTEN}}{v_{PI3K}v_{AKT}}. \quad (3.5)$$

Параметр Γ определяет баланс активностей ферментов PTEN, PI3K и AKT: v_{PTEN} , v_{PI3K} , и v_{AKT} , где

$$v_{PTEN} = \frac{k_{cat,PTEN}PTEN_o}{K_{m,PTEN}}; \quad v_{PI3K} = \frac{k_{cat,PI3K}PI3K_o}{K_{m,PI3K}}; \quad v_{AKT} = \frac{K_{d,AKT}}{AKT_o}.$$

Параметр Γ , найденный для PI3K/PTEN/AKT подсистемы был использован для исследования кинетики ответа всей сигнальной системы на активацию и ингибирование рецепторных сигналов. Очевидно, что введение одного параметра для столь сложной сигнальной системы может позволить исследовать только основные особенности поведения системы без детального описания всех особенностей ее ответа на внешние сигналы.

Введенный параметр Γ может изменяться в результате следующих процессов: 1) ингибирования ферментов, приводящего к уменьшению эффективной концентрации ферментов несвязанных с ингибитором; 2) изменения концентрации сигнальных белков при изменении уровней их экспрессии; 3) изменения либо константы скорости реакции k_{cat} , либо константы Михаэлиса K_m , либо констант диссоциации K_d сигнальных белков при мутациях генов, кодирующих данные белки. Далее в работе будет использоваться параметр $\gamma = \Gamma/\Gamma_o$, нормализованный на величину Γ_o , которая соответствует активности ферментов PTEN, PI3K и AKT для референтной системы в отсутствии мутаций в PI3K/PTEN/AKT сигнальной системе ($\gamma=1$, $\Gamma_o = 3 \cdot 10^4$). Отклонение параметра γ для системы с мутациями от $\gamma=1$ референтной системы позволяет оценить влияние мутаций на отклик «мутированной» системы на

действие лекарств. Введенный управляющий параметр γ используется в следующем разделе для исследования зависимости выходных сигналов системы от изменений кинетических параметров системы, происходящих в результате онкомутаций и характеризующихся параметром γ

3.2. Метод декомпозиции сигнальных систем и анализ выходных характеристик сигнальной системы

С целью анализа динамического ответа сигнальной системы в работе развит метод расчета выходной характеристики системы $C_{out} = R_{SN}(C_{in}, D, P_{SN}, t)$, которая определяет зависимость выходного сигнала системы C_{out} от ее входного сигнала C_{in} (Рис. 3-1). Функция отклика R_{SN} системы зависит от кинетических параметров и уровней экспрессии сигнальных белков P_{SN} . Функция отклика R_{SN} также определяется концентрацией ЛП D , которые ингибируют отдельные сигнальных белков системы. Выходных характеристик системы R_{SN} могут быть определены экспериментально путем изменения дозовых зависимостей выходного сигнала, например, концентрация фосфорилированного белка, от входного сигнала, например, концентрации рецепторных лигандов или концентрации ЛП, ингибирующих входной сигнал.

Для анализа действия различных лекарственных препаратов, ингибирующих различные ферменты сигнальной системы, предложен метод декомпозиции полной сигнальной системы на отдельные подсистемы, являющиеся мишенями для данных ЛП. Отклик полной сигнальной системы R_{SN} может быть представлен в виде функций R_{USP} и R_{DSP} двух подсистем («верхней» и «нижней» на Рис. 3-1), которые являются мишенями для лекарственных препаратов D1 и D2, соответственной (Рис. 3-1). Тогда функцию отклика R_{SN} всей системы можно представить в виде $R_{SN} = R_{DSP}(R_{USP})$, где $R_{USP} = C_{out,UPS}(C_{in}, P_{USP}, D_1, t)$

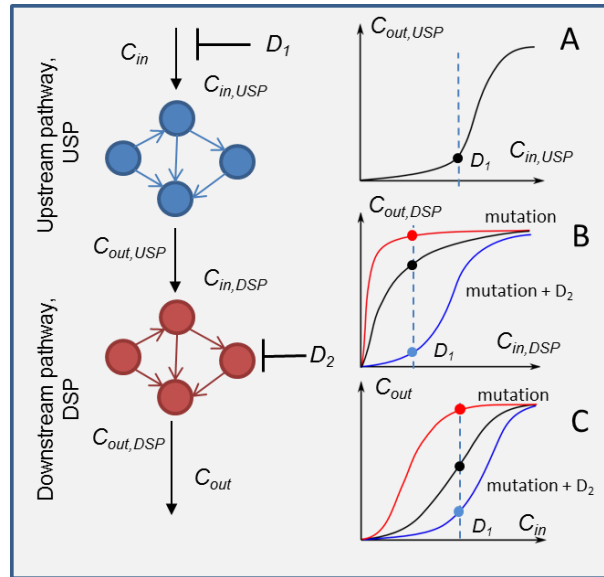


Рис. 3-1. Метод декомпозиции полной сигнальной системы на подсистемы, обладающие различными функциями отклика $R_{USP} = C_{out,USP}(C_{in,USP}, D_1)$ и $R_{DSP} = C_{out,DSP}(C_{in,DSP}, D_2)$ и являющиеся мишенями для различных ЛП D_1 и D_2 . На вставках справа приведены примеры функций отклика для подсистемы 1 (USP) (A); 2 (DSP) (B) и полной системы (C). Показаны примеры функций отклика для сигнальной системы без окомутаций (черная линия), с онкомутациями (красная линия) и системы с мутациями при действии ЛП D_2 (голубая линия).

и $R_{DSP} = C_{out,DSP}(C_{in,DSP}, P_{DSP}, D_2, t)$. При этом предполагается, что $C_{in,DSP} = C_{out,USP}$ и $C_{out,DSP} = C_{out}$ (подсистемы не образуют ветвящихся процессов). Теоретически, функции откликов R_{SN} , R_{USP} и R_{DSP} могут быть рассчитаны на основе модели и измерены экспериментально на основе двух дозовых зависимостей: дозовой зависимости R_{SN} и дозовой зависимости активации/ингибирования рецепторов от концентрации лиганда/ингибитора R_{USP} на основе соотношения $R_{DSP} = C_{out}(R_{USP}, P_{DSP}, D_2, t)$.

3.3. Методы анализа чувствительности сигнальных систем к параметрам сигнальных белков и действию ингибиторов

С целью исследования чувствительности сигнальных систем к действию лекарственных препаратов и анализа лекарственной резистентности при различных онкомутациях в опухолевых клетках в работе вводятся следующие параметры чувствительности, резистентности и робастности сигнальных систем.

Чувствительность PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы к действию ингибиторов клеточных рецепторов определяется, как изменение выходного сигнала $\Delta pAKT$ при изменении концентрации ингибитора ΔI :

$$S_{SN}(p, E_0, I, t) = \left| \frac{\Delta pAKT}{\Delta I} \right| \quad (3.1)$$

Чувствительность $S_{SN}(p, E_0, I, t)$ зависит от каталитических параметров сигнальных белков K , их концентрации E_0 , концентрации ингибитора I и времени t , при котором измерялся отклик системы. Здесь и далее анализируются абсолютные значения чувствительности.

С целью определения соотношения между чувствительностями полной, рецепторной и протеин-киназной системами был введен в рассмотрение сигнал $pErbB2$, который является выходным сигналом рецепторной системы и входным сигналом для протеин-киназной системы. С учетом этого чувствительность $S_{SN}(p, E_0, I, t)$ может быть представлена в следующем виде

$$\begin{aligned} S_{SN}(p, E_0, I, t) &= \left| \frac{\Delta pAKT}{\Delta I} \right| = \left| \frac{\Delta pAKT}{\Delta pErbB2} \frac{\Delta pErbB2}{\Delta I} \right| = \\ &= S_{PKS}(p_{PKS}, t) \cdot S_{RS}(p_{RS}, ErbB_0, t), \end{aligned} \quad (3.2)$$

где введена функции, описывающие чувствительности рецепторной и протеин-киназной систем

$$S_{RS}(p_{RS}, ErbB_o, t) = \left| \frac{\Delta pErbB2}{\Delta I} \right| \quad (3.3)$$

$$S_{PKS}(p_{PKS}, t) = \left| \frac{\Delta pAKT}{\Delta pErbB2} \right|. \quad (3.4)$$

Функция S_{RS} описывает изменение рецепторного сигнала $\Delta pErbB2$ при изменении концентрации ингибитора ΔI , и функция S_{PKS} определяет изменение выходного сигнала $\Delta pAKT$ при изменении входного сигнала $\Delta pErbB2$.

Таким образом, согласно соотношению (3-2), чувствительность полной системы S_{SN} определяется чувствительностями ее подсистем S_{PKS} и S_{RS} . Это соотношение в дальнейшем используется для анализа потери чувствительности системы к действию ЛП для рецепторной системы, а также к входному сигналу pErbB2 для протеин-киназной системы при изменениях параметров системы, вызванных мутациями генов, кодирующих сигнальные белки и рецепторы системы.

Для определения чувствительности сигнальной системы к параметрам системы были введены следующие функции, описывающие чувствительности рецепторной и протеин-киназной систем к изменению соответствующих параметров (кинетических параметров сигнальных белков, рецепторов и их концентраций):

$$S_{RS,i}(p_i, I, ErbB_o, t) = \left| \frac{\Delta pErbB2/pErbB2}{\Delta p_i/p_i} \right| \quad (3.5)$$

$$S_{PK,i}(p_i, pErbB, E_o, t) = \left| \frac{\Delta pAKT/pAKT}{\Delta p_i/p_i} \right|.$$

Относительные чувствительности $S_{RS,i}$ и $S_{PK,i}$ (3.5) равны отношениям относительного отклика систем $\Delta pErbB2/pErbB2$ и $\Delta pAKT/pAKT$ к относительному изменению параметров $\Delta p_i/p_i$, входящих либо в рецепторную, либо в протеин-киназную системы, соответственно. В дальнейшем расчеты проведены для 0.1% изменения параметров $\Delta p_i/p_i$.

С учетом введенных функций чувствительностей (3.5) можно определить робастность сигнальной системы по отношению к набору параметров системы в данном диапазоне входного сигнала, если система сохраняет определенную чувствительность к набору параметров системы $\{p_i\}$ в данном диапазоне входного сигнала (ΔI или $\Delta pErbB$).

$$\begin{aligned} S_{RS,i}(p_i, I, ErbB_o, t) &\cong const \\ S_{PK,i}(p_i, pErbB, E_o, t) &\cong const \end{aligned} \quad (3.6)$$

или

$$S_{RS,i}(p_i, I, ErbB_o, t) = \frac{\partial^2 S_{RS,i}}{\partial p_i \partial I} \cong 0 \quad (3.7)$$

Введенные характеристики чувствительности системы используются в дальнейшем анализе чувствительности выходных характеристик сигнальных систем к действию ингибиторов и применяются к исследованию влияния онкомутаций на изменение чувствительности сигнальных систем к лекарственным препаратам.

3.4. Анализ выходных характеристик системы клеточных рецепторов

В соответствии с методом декомпозиции сигнальной системы на рецепторную и протеин-киназную системы были исследованы выходные характеристики этих подсистем в отдельности. В данном разделе анализируются выходные характеристики рецепторной сигнальной системы. Разработанная модель сигнальных систем была применена к расчету дозовой зависимости уровня фосфорилирования ErbB2 рецепторов от концентрации двух внешних сигналов: лиганда (HRG) и ЛП пертузумаба (моноклонального антитела 2C4), а также концентрации ErbB2 рецепторов в опухолевой клетке.

Результаты расчетов зависимостей уровня фосфорилированного рецептора pErbB2 от концентрации HRG, pErbB2(HRG) и пертузумаба pErbB2 (2C4) приведены на Рис. 3-2. Дозовая зависимость pErbB2(HRG) имеет характер сигмоидной кривой с показателем Хилла $n=2$, что соответствует режиму «переключателя» в рецепторной системе: активация рецепторов от 10% до 100% происходит в узкой области концентраций HRG. Такое поведение коррелирует с экспериментальными данными, которые показывают насыщение концентрации активированных рецепторов pErbB2(HRG) при 1 нМ HRG (см. экспериментальные данные на Рис. 3-2Е). Значения EC_{50} для HRG было определено путем аппроксимации дозовой зависимости pErbB2(HRG) функцией Хилла $pErbB2(HRG)=HRG^n/(HRG^n+K^n)$, что дало значение $EC_{50}=3$ нМ близкое к экспериментальному (Franklin et al., 2004). Константа Хилла $n=2$, определённая при расчете, соответствует режиму переключения рецепторной системы в узкой области концентраций лиганда.

Расчет дозовой зависимости для полной системы pAKT(HRG) показал также активацию в узком диапазоне концентраций HRG с насыщением при концентрациях 0.06 нМ, что коррелирует с экспериментальной концентрации насыщения HRG при 0.1 нМ (Рис. 3-2Е).

Функция отклика рецепторной системы RSS, pErbB2(2C4), и полной сигнальной системы SN, pAKT(2C4), от концентрации пертузумаба (2C4) приведена на Рис. 3-2В. Отличие между полученными функциями откликов определяется функцией отклика протеин-киназной сигнальной системы STS, особенности которой будут обсуждаться в следующих разделах. На основе

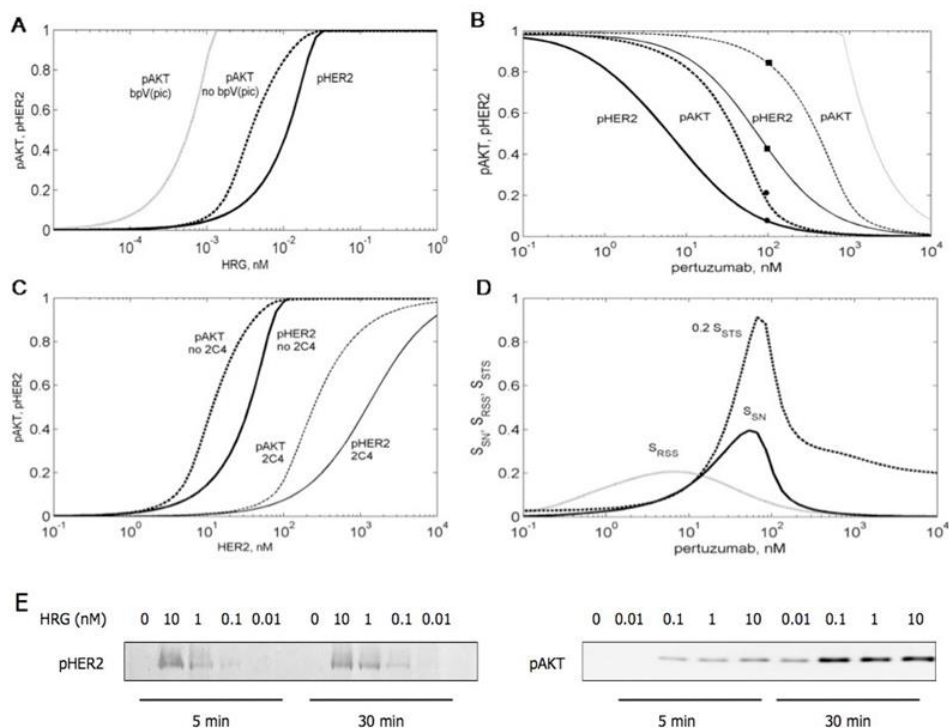


Рис. 3-2. Функции отклика ErbB рецепторной системы. (А) Дозовые зависимости уровней pErbB2 (pERBB2) и pAKT от концентрации герегулин- β (HRG). Тонкой линией показана дозовая зависимость pAKT(HRG) в присутствии ингибитора PTEN bpV(pic) (50 nM). (В) Дозовые зависимости pErbB2 (pHER2) и pAKT от концентрации пертузумаба (сплошная и прерывистая линии, соответственно) при 95 нМ и 1 μ М ErbB2 (толстые и тонкие линии, соответственно). Серая тонкая линия – дозовая зависимость pAKT, рассчитанная при возрастании в три раза скорости реакции фосфорилирования PTEN, катализируемой киназами CK2 и GSK3 β . Точки – экспериментальные данные. (С) Дозовые зависимости pErbB2 (pHER2) (сплошная линия) и pAKT (прерывистая линия) от концентрации рецепторов ErbB2 в отсутствии (тонкая сплошная линия) и присутствии 100 нМ (тонкая сплошная линия) пертузумаба. (D) Зависимости чувствительности полной сигнальной системы S_{SN} (сплошная линия), рецепторной системы S_{RSS} (прерывистая линия) и киназной сигнальной системы S_{STS} (серая линия) от концентрации пертузумаба. (Е) Результаты Вестерн блотинг анализа для pErbB2 (pHER2) (левая панель) и pAKT (правая панель) при различных концентрациях HRG: 0 нМ (контроль), 0.01 нМ, 0.1 нМ, 1 нМ и 10 нМ, проведенного на 5 и 30 минутах после добавления в клеточную среду HRG.

полученных кривых видно, что 90% ингибирование рецепторного сигнала, pErbB2, приводит к 80% ингибированию выходного сигнала pАКТ.

Поведение функции отклика была исследована в зависимости от концентрации рецепторов ErbB2. В модели анализировалась зависимость эффективности действия пертузумаба при повышенных концентрациях ErbB2 рецепторов в раковых клетках. Расчеты были выполнены в модели при соотношении концентраций рецепторов ErbB3/ErbB2=1.4, которое близко к экспериментальным данным для клеточной линии рака яичников PE04, 1.6 (Nagumo et al., 2009). Как следует из проведенных расчетов, повышение концентрации ErbB2 рецепторов в 10 раз приводит к сдвигу дозовых зависимостей для pАКТ сигнала в сторону высоких концентраций пертузумаба (Рис. 3-2В,С). Вследствие этого возрастают почти в 200 раз значения EC_{50} и IC_{50} для pErbB2 и pАКТ, соответственно. При этом 50% ингибирование pErbB2 приводит к 10% ингибированию pАКТ при концентрации пертузумаба 100 нМ (Рис. 3-2В). Этот результат показывает, что повышенная экспрессия ErbB2 рецепторов приводит к уменьшению чувствительности рецепторной и полной сигнальных систем к действию пертузумаба при его физиологических концентрациях 100 нМ вблизи его значения $IC_{50}=40$ нМ.

Исследование функции отклика pErbB2 и pАКТ сигналов на действие пертузумаба было выполнено при повышенных уровнях экспрессии ErbB2 рецепторов. Результаты расчетов дозовых зависимостей pErbB2 и pАКТ от концентраций ErbB2 рецепторов, проведенных в отсутствии и присутствии 100 нМ пертузумаба (2С4 антитела), приведены на Рис. 3-2С. Как видно из полученных данных, при концентрации рецепторов ErbB2=100 нМ обе системы, рецепторная и протеин-киназная, находятся в насыщенном активированном состоянии и ненасыщенном состоянии в присутствии пертузумаба. При повышении уровня ErbB2 рецепторов обе системы приходят в насыщенное активированное состояние в присутствии 100 нМ пертузумаба (Рис. 3-2С), что

указывает на потерю чувствительности рецепторной и протеин-киназной систем к действию пертузумаба.

Отметим, что в данном расчете не были учтены механизмы лиганд-независимой активации рецепторной системы за счет гомодимеризации ErbB2 рецепторов, которая, как предполагается, доминирует при повышенном уровне ErbB2 рецепторов в раковых клетках (Park, Neve, Szollosi, & Benz, 2008). Цель данного расчета состояла в исследовании потери чувствительности рецепторной систем к пертузумабу, действие которого заключается в ингибировании активации рецепторной системы за счет подавления гетеродимеризации ErbB2 и ErbB3 рецепторов.

Результаты расчетов показали, что ErbB2/ErbB3 механизм активации рецепторной системы становится нечувствительным (резистентным) к действию пертузумаба при повышенном уровне ErbB2 рецепторов. Полученные результаты относятся к случаю повышения уровня ErbB2 (до 10 раз), которое может происходить за счет транскрипционных и трансляционных механизмов (Park et al., 2008), а не за счет амплификации *ErbB2* гена, что приводит к возрастанию экспрессии рецепторов больше, чем в 100 раз. Т.е. в данном расчете предполагается, что лиганд-зависимый ErbB2/ErbB3 механизм активации рецепторной системы остается доминирующим в данной области соотношений концентраций рецепторов ErbB2/ErbB3. В главе 5 в расчете учитывается лиганд-независимый механизм активации рецепторной системы за счет образования активных ErbB2/ErbB2 комплексов при высоких концентрациях ErbB2 рецепторов и исследуется действие трастузумаба, лекарственного препарата, ингибирующего формирование этих комплексов в ErbB2+ раковых клетках.

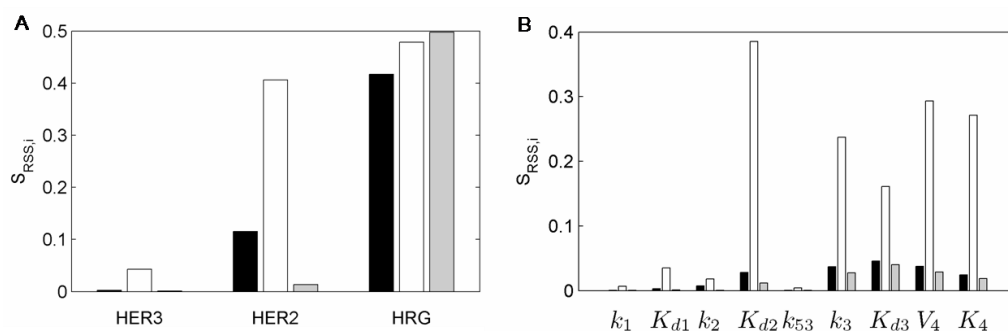


Рис. 3-3. Результаты расчета чувствительности сигнальной системы $S_{RSS,i}$ к начальным концентрациям ErbB2 (HER2) и ErbB3 (HER3) рецепторов (A) и к кинетическим параметрам системы (B). Черные и белые столбцы соответствуют чувствительности системы в отсутствии и присутствии 100 нМ пертузумаба, соответственно. Серые столбцы – чувствительность системы при повышенной концентрации ErbB2 (HER2) рецепторов в присутствии 100 нМ пертузумаба.

С целью анализа влияния лекарственных препаратов на чувствительность рецепторной системы были проведены расчеты чувствительности рецепторной системы RSS к входному сигналу и кинетическим параметрам системы $S_{RSS,i}$, (3.5) в отсутствии и присутствии 100 нМ пертузумаба (Рис. 3-3). Как видно из полученных данных, пертузумаб вызывает возрастание чувствительности системы к начальной концентрации ErbB2 (HER2) и ErbB3 (HER3) рецепторов, а также к кинетическим параметрам рецепторной системы, p_i , по сравнению с чувствительностью системе в отсутствии пертузумаба. Этот эффект связан с переходом системы из активного состояния с сигналом близким к насыщению к состоянию с выходным ненасыщенным сигналом ингибированным лекарственным препаратом. При ингибировании входного сигнала система становится более чувствительной как к входному сигналу, так и параметрам системы.

Переход от ненасыщенного к насыщенному выходному сигналу при возрастании концентрации ErbB2 рецепторов приводит к уменьшению чувствительности системы $S_{RSS,i}$ при действии пертузумаба (серые столбцы на Рис. 3-3). Следовательно, подавление ингибирующего эффекта пертузумаба при повышении экспрессии ErbB2 рецепторов вызывает переход системы в начальное активное состояние с насыщенным pErbB2 сигналом (Рис. 0-2С) и низкой чувствительностью рецепторной системы (RSS).

Приведенные расчеты дозовых зависимостей pErbB2(2C4) и pAKT(2C4) показали различие в дозовых зависимостях для рецепторной и киназ-протеинной сигнальных систем (Рис. 3-2А-С). С целью анализа соотношения между выходными характеристиками этих двух систем, были рассчитаны их чувствительности к действию пертузумаба S_{RSS} и S_{STS} , а также чувствительность полной сигнальной системы S_{SN} (Рис. 0-2D). Чувствительности S_{RSS} и S_{SN} были рассчитаны согласно уравнениям (3.5) на основе результатов расчета дозовых зависимостей pErbB2(2C4) и pAKT(2C4) от концентрации пертузумаба (2C4). Чувствительность S_{STS} рассчитывалась, как отношение $S_{STS} = S_{SN}/S_{RSS}$. Как видно из результатов расчетов, приведенных на Рис. 3-2D, чувствительности рецепторной и полной сигнальных систем перекрываются в области выше физиологических концентраций пертузумаба (100 нМ). Полученное в расчете отличие чувствительностей рецепторной и полной сигнальных систем определяется чувствительностью протеин-киназной сигнальной подсистемы S_{SN} (пунктирная линия на Рис. 3-3D), особенности которой исследуются в следующем разделе.

3.5. Влияние онкомутаций на выходные характеристики протеин-киназной сигнальной системы

Разработанная модель PI3K/PTEN/AKT сигнального пути была использована для исследования влияния различных онкомутаций на выходных характеристик протеин-киназной сигнальной системы (Рис. 1-1). В расчете были рассмотрены влияния мутаций генов, кодирующих фосфатазу PTEN и протеин-киназы PI3K и AKT1/2, на выходной сигнал системы pAKT. Для количественного анализа этого влияния использовался управляющий параметра γ (ур. (3.4)), который определяет баланс киназной и фосфатазной активностей в PI3K/PTEN/AKT сигнальной системе. В расчете анализировался выходной сигнал системы pAKT(pErbB2, γ) в зависимости от уровня входного сигнала, концентрации фосфорилированного рецептора pErbB2 для различных значений параметра γ . В расчете величина pErbB2 сигнала изменялась путем увеличения концентрации ингибитора pErbB2 рецептора, пертузумаба, от нулевой концентрации до концентрации, при которой полностью ингибируется pErbB2 сигнал. В свою очередь, параметра γ в расчете изменялся путем варьирования концентрации фосфатазы PTEN. На Рис. 3-4 представлены расчётные характеристика отклика PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы pAKT(pErbB2, γ) для семи значений управляющего параметра: 0.3 (50% PTEN); 0.5 (50% PTEN); 0.7 (70% PTEN); 0.8; 0.9; 1 (значение для референтной системы) и 1.3).

Полученные характеристика сигнальной системы позволяют проанализировать поведение pAKT сигнала при ингибировании рецепторного сигнала pErbB2 независимо от типа ингибитора. Для референтной системы со значением управляющего параметра $\gamma=1$ выходная характеристика системы представляет собой плавную сигмоидную функцию входного сигнала pErbB2 (HER2) (Рис. 3-4). При такой выходной характеристике система проявляет чувствительность к входному рецепторному сигналу: уменьшение pErbB2

сигнала при его ингибировании вызывает ингибирование выходного сигнала pAKT. При этом 80%-90% ингибирование pErbB2 сигнала при физиологической концентрации пертузумабом 100 нМ приводит к 80%-70% ингибированию pAKT сигнала.

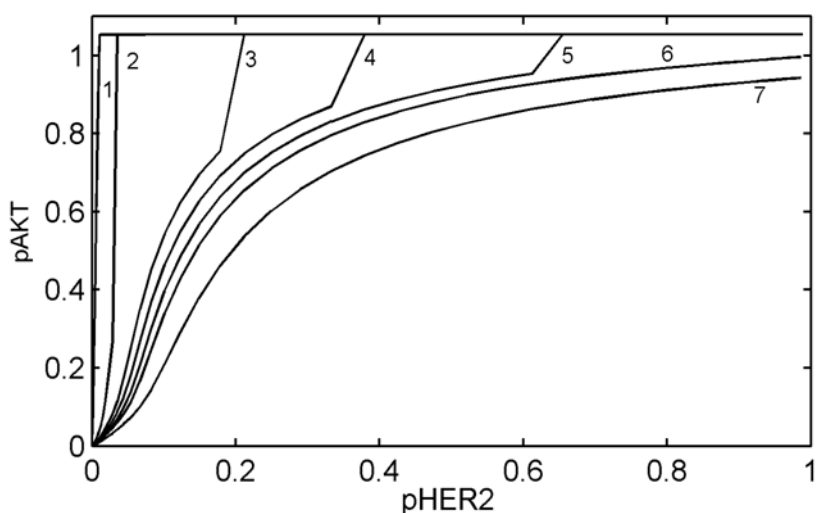


Рис. 3-4. Зависимость выходного сигнала pAKT от входного сигнала pErbB2 (pHER2) PI3K/PTEN/AKT сигнального пути при различных значениях управляющего параметра γ : линия 1 – $\gamma=0.1$; 2 – 0.5; 3 – 0.7; 4 – 0.8; 5 – 0.9; 6 – 1; 7 – 1.3. pAKT и pHER2 сигналы нормализованы к их максимальным значениям.

Расчеты при значениях $\gamma < 1$ показали существенное изменение отклика системы на ее входной сигнал. Выходная характеристика при 50%-70% потере активности PTEN имеет вид ступенчатой функции, соответствующей переключению системы из неактивного в активное состояние в области значений входного сигнала 0.2. При значениях $\gamma < 0.5$ система обладает гиперчувствительным характером ответа на входной рецепторный сигнал. Сигнальная система усиливает слабые входные рецепторные сигналы pErbB2 в области значений 0.1-0.2 до максимального выходного сигнала pAKT=1. В широкой области значений входного сигнала pErbB2 (0.1-1) система

нечувствительна к входному сигналу: выходной сигнал $pAKT=1$ в области значений 0.1-1 для входного сигнала $pErbB2$ система. Таким образом при $\gamma < 0.5$ система приобретает резистентность к действию ингибитора рецепторного сигнала $pErbB2$: ингибиторные рецептора не приводит к ингибированию выходного сигнала $pAKT$ системы.

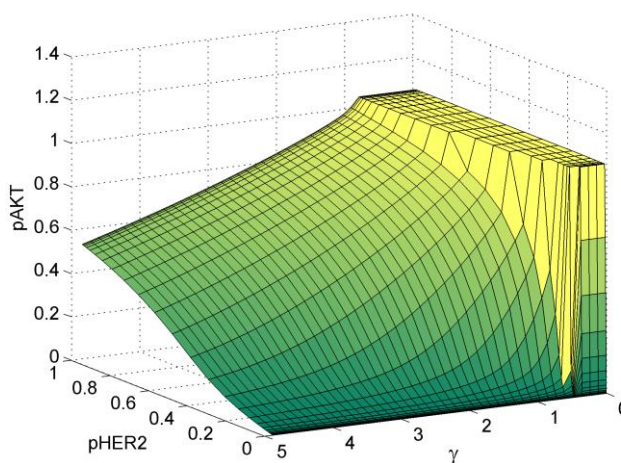


Рис. 3-5. 3D представление выходной характеристик $pAKT(pHER2, \gamma)$ в широком диапазоне управляющего параметра $\gamma > 1$.

Таким образом при изменении управляющего параметра в сигнальной системе происходит переход «чувствительность-резистентность», в результате которого система, обладающая чувствительностью к действию ингибиторов рецепторных сигналов, переходит в режим резистентности к действию ингибиторов входного сигнала. Состояние резистентности сигнальной системы реализуется при значениях управляющего параметра $\gamma < 0.5$ за счет усиления слабых рецепторных сигналов при действии ингибитора до максимального уровня выходного сигнала. Согласно ур. (3.4) параметр γ может уменьшаться либо при делеции и мутации гена *PTEN*, либо при мутации гена *PIK3CA*, приводящей к повышенной активности киназы PI3K, а также при повышенной экспрессии киназы АКТ. Аналогичная выходная характеристика была получена при уменьшении параметра γ , вызванном активационной мутацией *PIK3CA* гена.

Расчет выходных характеристик $pAKT(pErbB2, \gamma)$ при $\gamma > 1$ показал, что сигнальная система подавляет входной рецепторный сигнал и проявляет ингибирующий эффект по сравнению с выходной характеристикой при $\gamma = 1$ во всей области значений $pErbB2$ сигнала (линия 7 на Рис. 3-4). Таким образом в области управляющего параметра сигнальная система переходит в режим подавления входного сигнала. Все три режима функционирования сигнальной системы хорошо видны на 3D представлении выходной характеристики $pAKT(pErbB2, \gamma)$ в широком диапазоне управляющего параметра $\gamma > 1$ (Рис. 3-5): режим резистентности при $\gamma < 1$, режим чувствительности к рецепторным сигналам при $\gamma \approx 1$ и режим подавления при $\gamma > 1$.

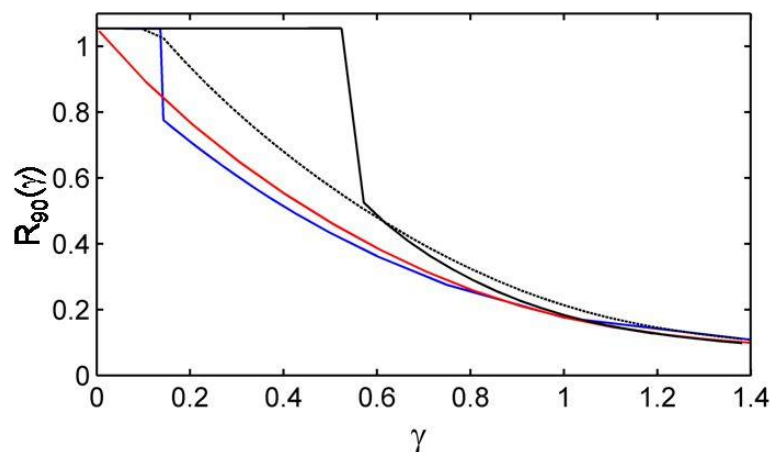


Рис. 3.6. Зависимость индекса резистентности сигнальной системы R_{90} от управляющего параметра γ . В расчете γ изменялась за счет изменения активностей $PTEN$ (черная линия), $PI3K$ (синяя линия), AKT (красная линия) и $PTEN$ в отсутствии $CK2/GSK3$ ферментов в модели (черная прерывистая линия).

На основе полученных результатов был введен индекс резистентности сигнальной системы $R_{90} = pAKT_{90}/pAKT_0$, показывающий относительный уровень активации АКТ сигнала ($pAKT$) при 90% ингибировании рецепторного сигнала. На Рис. 3-6 приведен расчет индекса резистентности R_{90} в зависимости

от параметра γ , который характеризует различные режимы функционирования системы. При $\gamma \cong 1$ индекс резистентности $R_{90} = 1$, что соответствует 80% ингибированию выходного сигнала pAKT при 90% ингибировании рецепторного сигнала. Уменьшение управляющего параметра ведет к возрастанию индекса резистентности R_{90} , что показывает потерю чувствительности системы к ингибирующему действию лекарственного препарата. На Рис. 3-6 приведены расчеты R_{90} , соответствующие различным мутациям, приводящим к возрастанию резистентности системы: мутации *PTEN*, приводящие к потере активности фосфатазы PTEN (черная линия), мутации гена *PIK3CA*, приводящие к повышенной активности киназы PI3K, а также при повышенной экспрессии киназы АКТ. Как видно из сравнения полученных результатов, наиболее резкий переход «чувствительность-резистентность» происходит при потере активности фосфатазы PTEN при $\gamma \cong 0.5$, т.е. при 50% потере активности PTEN. В данном расчете это связано с пост-трансляционной модификацией PTEN (Goltsov et al., 2013). Как обсуждалось ранее, в модели учтено, что активность PTEN определяется степенью фосфорилирования фосфатазы: фосфатазы PTEN активна в полностью дефосфорилированном состоянии. Как показано в (Goltsov et al., 2012) при уменьшении экспрессии PTEN баланс активной и неактивной форм PTEN нарушается, в результате чего возрастает концентрация фосфорилированной неактивной формы, что приводит к дополнительному падению фосфатазной активности и эффективному уменьшению параметра γ . Этот эффект приводит к резкому скачку в индексе резистентности по сравнению с влиянием изменений активностей PI3K и АКТ. Чтобы показать это, был выполнен расчет без учета реакций фосфорилирования/дефосфорилирования PTEN, который продемонстрировал исчезновение резкого перехода

«чувствительность-резистентность» в зависимости индекса резистентности от параметра γ . (пунктирная линия на Рис. 3-6).

Расчеты показали, что при увеличении управляющего параметра $\gamma > 1$ PI3K/PTEN/AKT система подавляет входной рецепторный сигнал, оказывая дополнительный ингибирующий эффект к действию ингибитора рецепторов. Высокие значения управляющего параметра могут быть получены в экспериментах на клетках с высокой активностью PTEN при его амплификации *PTEN* гена (Kitano, 2004), уменьшении активности PI3K киназы при ее ингибировании (Vlahos et al., 1994) и уменьшении активности AKT киназы при ее ингибировании или мутации (Noske et al., 2007).

3.6. Моделирование действия комбинационной терапии, направленной на подавление резистентности в сигнальных системах клетки

Для определения эффективных комбинаций лекарственных препаратов, восстанавливающих чувствительность к анти-рецепторной терапии, разработан математический метод, основанный на анализе чувствительности характеристик выходных сигналов системы к изменению ее входного сигнала и к вариации кинетических параметров сигнальной сети. В развиваемом подходе предполагается, что изменения кинетических параметров сигнальной системы клетки могут происходить в результате соматических мутаций сигнальных белков, приводящих к изменению их активности, а также в результате репрессии и экспрессии генов при канцерогенезе или адаптации раковых клеток к онкотерапии. Метод был применен для восстановления чувствительности сигнала AKT к ингибитору HER2 рецептора, пертузумабу, путем комбинированной терапии.

Для подавления резистентности PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы к

действию ингибиторов рецепторных сигналов, возникающей при мутациях генов *PIK3CA* и *PTEN* в раковых клетках, был предложен метод модификации выходной характеристики «мутированной» системы с целью восстановления ее исходных характеристик, при которых она обладает чувствительностью к ингибиторам рецепторных сигналов. Метод основан на предположении, что переход «чувствительность-резистентность» в сигнальной системе при изменении управляющего параметра γ является обратимым и система может быть переведена из резистентного состояния при малых γ в режим чувствительности путем увеличения γ . Идея метода проиллюстрирована на Рис. 3-7, на котором приведена расчётная зависимость резистентного индекса R_{90} , связанного с уровнем рАКТ, в зависимости от управляющего параметра γ и экспериментальные данные концентрации активной киназы рАКТ для различных раковых клеток с разным уровнем экспрессии *PTEN*. Как видно, уменьшение управляющего параметра γ при падении уровня экспрессии *PTEN* переводит сигнальную систему из области чувствительности ($\gamma=1$) к рецепторным сигналам в область резистентности при $\gamma<1$, что соответствует прямому переходу «чувствительность-резистентность» (красная стрелка на Рис. 3-7. Предполагается, что в системе возможно реализовать обратный переход «чувствительность-резистентность», если увеличить управляющий параметр γ за счет внешнего воздействия и вернуть его значение в область $\gamma=1$. Этот обратный переход показан на Рис. 3-7 черной стрелкой.

Учитывая полученную выше зависимость параметра γ от активностей трех белков $\gamma=PTEN/PI3K/AKT$ (ур. (3.5)) в работе рассмотрен один из возможных способов увеличения параметра γ за счет уменьшения активности *PI3* киназы при ее ингибировании.

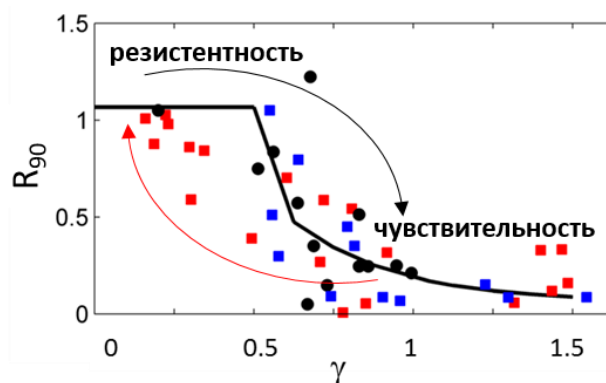


Рис. 3.7. Зависимость индекса резистентности R_{90} (рАКТ при 90% ингибировании рецепторного сигнала) от управляющего параметра γ (линия). Красной и черной стрелками показаны прямой и обратный переходы «чувствительность-резистентность». Точки - экспериментальные данные для различных раковых клеток с разным уровнем экспрессии PTEN. Черные точки – данные для 12 раковых клеточных линий яичников (Goltsov et al. 2010), синие точки – данные для клеточных линии рака молочной железы (Marty et al. Breast Cancer Res 2008), красные точки – данные для клеток 20 пациентов с эндометриальным раком (синие точки) (Endocrine-related Cancer, 2002).

Для моделирования предложенного метода был рассмотрен ингибитор PI3K киназы LY294002 (Vlahos et al., 1994) и выполнен расчет влияния ингибитора PI3K киназы на выводные характеристики PI3K/PTEN/АКТ сигнальной системы рАКТ(рErbB2, γ). На Рис. 3-8 (линия 4) приведен расчет зависимости уровня выходного сигнала рАКТ от нормированной величины входного рецепторного сигнала рErbB2 в присутствии 0.5 μ M ингибитора LY294002. Расчет был выполнен с набором кинетических параметров LY294002, определенным в разделе 2. Как видно, действие ингибитора PI3K приводит к эффективному ослаблению активности PI3K и, соответственно, к уменьшению

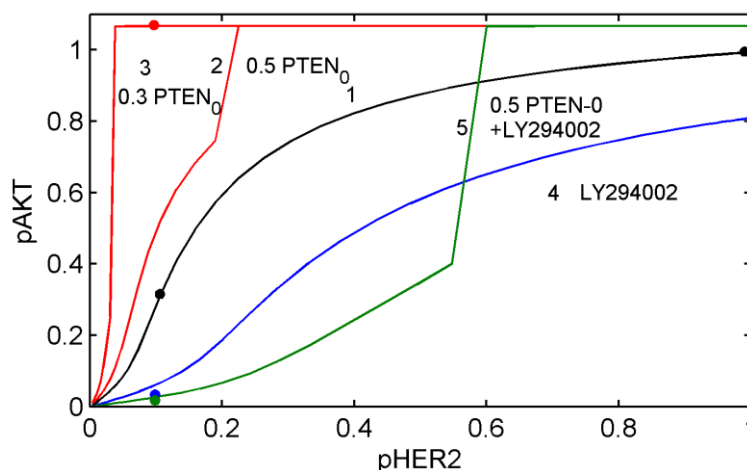


Рис. 3-8. Модификация выходной характеристики PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы при мутации PTEN фосфатазы и действии комбинации ЛП. Зависимость выходного сигнала $pAKT$ от входного сигнала $pHER2$ системы при нормальном уровне PTEN (линия 1), при его пониженном уровне (линии 1 и 2), при действии ингибитора PI3K, LY294002 (линия 4) и при действии LY294002 при пониженном уровне экспрессии PTEN (линия 5). $pAKT$ и $pHER2$ сигналы нормализованы к их максимальным значениям.

управляющего параметр γ , который принимает значение $\gamma \approx 1.5$. Выходные характеристики системы позволяют проанализировать эффект ингибитора PI3K на выходную характеристику при 50% уменьшении активности PTEN, которая имеет ступенчатую форму и соответствует резистентному режиму функционирования сигнальной системы (см предыдущий раздел). В результате расчета было получено, что действия ингибитора PI3K модифицирует выходную ступенчатую характеристику (линия 3 на Рис. 3-8) в выходную характеристику, имеющую степенную зависимость в области входного сигнала 0 – 0.5 и ступеньку при значении ErbB2 в области 0.5 (линия 5 на Рис. 3-8). Модифицированная характеристика $pAKT(pErbB2, \gamma)$ обладает чувствительностью к входному рецепторному сигналу в области $pErbB2$ сигнала

0 – 0.5: ингибирование входного ErbB2 сигнала приводит к ингибированию выходного pAKT сигнала. Причем степень ингибирования в системе с модифицированной характеристикой существенно выше, чем для исходной системы.

Таким образом, проведенные расчеты выходной характеристики pAKT(pErbB2, γ) сигнальной системы при ингибировании PI3K показали, что чувствительность системы к действию ингибитора рецептора, пертузумаба, восстанавливается при низкой активности PTEN в области ингибирования входного сигнала, pErbB2, выше 50% (линия 5 на Рис. 3-8). При этом величина ингибирования выходного сигнала pAKT превышает 95% при ингибировании pErbB2 в области выше 80%. В данной модели это происходит за счет обратного перехода «чувствительность-резистентность» при увеличении управляющего параметр γ в результате внешнего воздействия – ингибирования киназы PI3K. Это ведет к восстановлению значения γ в области $\gamma=1$, соответствующей области чувствительности системы к рецепторным сигналам (черная стрелка на Рис. 3-8). Отметим, что, хотя значение γ близко к 1 ($\gamma \cong 1$) при 50% потере активности PTEN и ~50% ингибировании PI3K, модифицированная характеристика (линия 5 на Рис. 3-8) отличается от характеристики исходной системы с $\gamma=1$ (линия 3 на Рис. 3-8).

Полученные результаты расчетов модификации выходных характеристик системы, соответствующих переходу «чувствительность-резистентность», были использованы для исследования влияния модификаций системы на дозовые зависимости сигнала pAKT от концентрации пертузумаба. На Рис. 3-9 приведены результаты расчетов дозовых зависимостей pAKT сигнала от концентрации ингибитора pErbB2 рецептора, пертузумаба, при его одиночном действии и в комбинации с ингибитором PI3K, LY294002, на исходную сигнальную систему и систему с мутацией PTEN. Как видно из полученных результатов, при потере активности PTEN происходит сдвиг дозовой зависимости в область

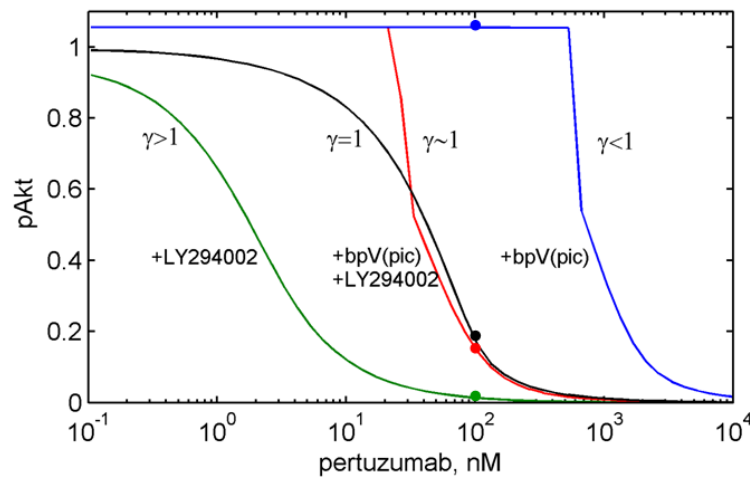


Рис. 3-9. Эффект возникновения и подавления резистентности к действию ингибитора рецепторов. Теоретические дозовые зависимости pAKT сигнала от концентрации ингибитора pErbB2 рецептора, пертузумаба при его одиночном действии и в комбинации с ингибитором PI3K LY294002 на исходную сигнальную систему и систему с мутацией PTEN. Дозовые зависимости для исходной системы с управляющим параметром $\gamma=1$ (—); в присутствии ингибитора PTEN, bpV(pic) (50 nM), $\gamma=0.5$ (—); в присутствии ингибитором PI3K киназы LY294002 (5 μM), $\gamma=1.5$ (—); в присутствии ингибитором LY294002 (5 μM) и bpV(pic) (50 nM), $\gamma \approx 1$ (—). Концентрация pAKT взята равной расчетному значению на 30 мин после инициации сигнала при действии HRG. Точки – экспериментальные данные для клеточной линии PE04.

высоких концентраций пертузумаба. При этом IC_{50} возрастает с 40 нМ для исходной (немодифицированной системы) до 1 μM для системы с потерей активности PTEN и управляющим параметром $\gamma=0.5$. Полученная дозовая зависимость свидетельствует о резистентности системы к действию пертузумаба при его физиологических концентрациях в области 100 нМ (экспериментальные точки). Как показали расчеты, добавление ингибитора PI3K, LY294002 (5 μM),

сдвигает модифицированную дозовую зависимость (линия 2) в область исходной дозовой зависимости с $IC_{50} \cong 40$ нМ (линия 3), что возвращает исходную чувствительность системы к ингибирующему действию пертузумаба в области его концентраций 100 нМ.

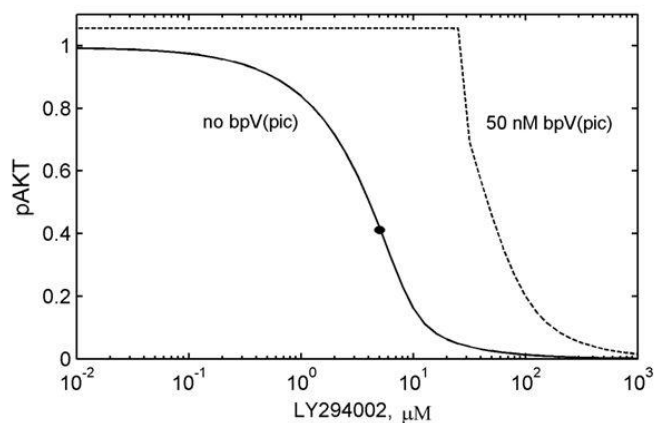


Рис. 3-10. Расчет дозовой зависимости pAKT сигнала от концентрации ингибитора PI3K, LY294002 для исходной сигнальной системы (сплошная кривая) и при пониженной активности PTEN (пунктирная кривая) при действии ингибитора PTEN, bpV(pic), (50 нМ).

Отметим, что согласно расчетам, падение уровня PTEN приводит также к резистентности к ингибитору PI3K, LY294002. Как видно из приведенной на Рис. 3-10 дозовой зависимости pAKT сигнала от концентрации ингибитора PI3K, LY294002, при пониженной активности PTEN сигнальная система нечувствительна к действию ингибитора в области его физиологических концентраций 2 μ M - 5 μ M. Таким образом уменьшение активности PTEN, вызванное мутациями гена *PTEN*, приводит к резистентности как к действию ингибитора рецепторов, так и к действию ингибитора киназы PI3K. Но вместе с тем, как показали результаты моделирования приведенные выше, их совместное действие приводит к подавлению резистентности, вызванной потерей активности PTEN.

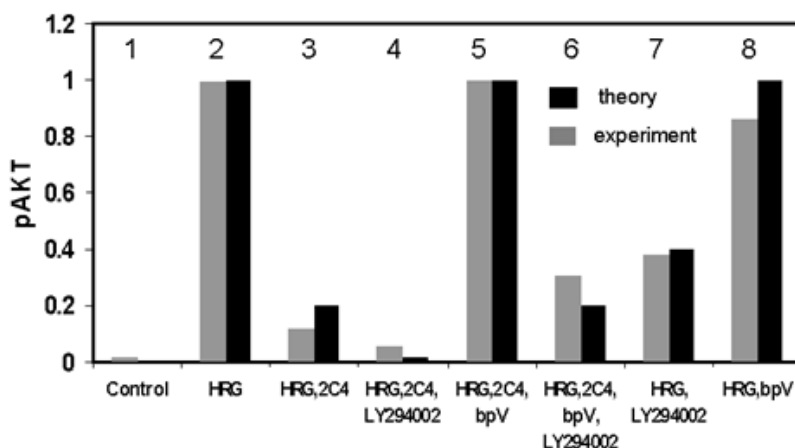


Рис. 3-11. Сравнение экспериментальных и теоретических результатов по ингибирующему действию пертузумаба, возникновения резистентности к его действию при низкой активности PTEN и эффекта подавления резистентности при комбинационной терапии. Активация pAKT на 30 минуте после добавления 1 нМ HRG (столбец 2), ингибирование pAKT при действии пертузумаба, 2C4 (3). Действие комбинации двух ингибиторов: пертузумаба и ингибитора PI3K, 5 μ M LY294004 (4). Отсутствие ингибирующего эффекта пертузумаба при ингибировании активности PTEN при действии 50 нМ bpV(pic) (5). Восстановление ингибирующего эффекта пертузумаба при пониженной активности PTEN путем добавления ингибитора PI3K, 5 μ M LY294004 (6). Действие ингибитора LY294004 (7). Действие ингибитора PTEN, 50 нМ bpV(pic) (8). Результаты моделирования показаны черным цветом, экспериментальные данные - серым цветом. Величина pAKT сигнала нормирована на его максимальную величину при активации HRG.

С целью проверки результатов моделирования и сделанных предсказаний были проведены экспериментальные исследования действия комбинации ингибиторов пертузумаба и LY2940002 на активацию АКТ в опухолевых клетках PE04 при различных уровнях активности PTEN фосфатазы.

Эксперименты были выполнены коллабораторами проекта в Центре Исследования Рака Эдинбургского Университета. На Рис. 3-11 приведено сравнение экспериментальных результатов с результатами компьютерного моделирования следующих эффектов: ингибирующего действия пертузумаба, возникновения резистентности к его действию при низкой активности PTEN и эффекта подавления резистентности при комбинационной терапии. Столбцы 2, 3 и 4 на Рис. 3-11 соответствуют уровню pAKT при активации системы при добавлении в клеточную среду HRG, ингибированию pAKT сигнала пертузумабом (2C4) и ингибитором PI3K LY294002, соответственно. Столбец 5 соответствует подавлению ингибирующего эффекта пертузумаба при уменьшении активности PTEN. В экспериментах активность PTEN была снижена действием ингибитора bpV(pic). Экспериментальные данные подтверждают результат компьютерного моделирования по возникновению резистентности к действию ингибитора рецепторного сигнала при потере активности фосфатазы PTEN. Эксперименты показали, что действие комбинации пертузумаба с ингибитор PI3K, LY2940002, на клетки с пониженной активностью PTEN приводит к подавлению резистентности pAKT сигнала к действию пертузумабу, вызванной потерей активности фосфатазы PTEN, и восстанавливает ингибирующее действие пертузумаба (столбец 6).

3.7. Влияние онкомутаций на чувствительность сигнальных систем клетки к действию лекарственных препаратов

С целью определения ключевых элементов сигнальной сети, оказывающих наибольшее влияние на выходной сигнал системы, развит метод исследования чувствительности выходного сигнала системы к кинетическим параметрам сигнальных белков и уровням их экспрессии. Определение наиболее

чувствительных элементов сигнальной системы в результате анализ чувствительности сигнальных систем применяется в дальнейшем для 1) определения белков-мишеней для эффективной лекарственной терапии; 2) определения механизмов резистентности к действию отдельных ЛП при онкомутациях и 3) определению комбинаций ЛП для преодоления лекарственной резистентности при онкомутациях.

Для исследования чувствительности PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы к кинетическим параметрам белков были применены методы локального и глобального анализа чувствительности и проведено сравнение их результатов (Lebedeva et al., 2012).

В работе проведено дальнейшее развитие метода анализа чувствительности сигнальных систем для случая, когда система находится под действием ЛП или комбинации лекарственных препаратов, а также на случай наличия мутаций белков в сигнальной системе. В работе проведено исследование влияния ЛП на величину чувствительности $S_{AKT,p}$ к кинетическим параметрам системы и уровням их экспрессии, которая была введена в разделе 3.3. (ур. (3.4)). Исходя из того, что чувствительность $S_{AKT,p}$ не может быть напрямую измерена экспериментально, в работе проанализирована связь $S_{AKT,p}$ с чувствительностью выходного сигнала, pAKT, системы к ее входному сигналу, pHER2, S_{AKT} (ур. 3.1).

Чувствительность S_{AKT} напрямую связана с функцией отклика системы на входной сигнал и может быть непосредственно получена на основе анализа изменений функции отклика. В работе показано, что чувствительность $S_{AKT,p}$ и S_{AKT} связаны: изменение $S_{AKT,p}$ происходит в области величин входного сигнала, где существенно изменяется чувствительность S_{AKT} .

На Рис. 7 приведены результаты расчета значений чувствительности $S_{AKT,p}$ и S_{AKT} для PI3K/PTEN/AKT сигнального пути при действии пертузумаба и его комбинации с ингибитором PI3K, LY2940002, для исходной системы и при наличии мутаций PTEN. Показано, что ЛП, ингибирующий входной сигнал

системы, приводит к возрастанию чувствительности сигнальной системы как к входному сигналу (рост S_{AKT}), так и к параметрам сигнальной системы (рост $S_{AKT,p}$). На основе полученных данных в работе обсуждается возрастание чувствительности сигнальной системы к кинетическим параметрам белков и их уровням экспрессии как одна из возможных причин активации компенсаторных механизмов сигнальной системы в результате действия лекарственных препаратов.

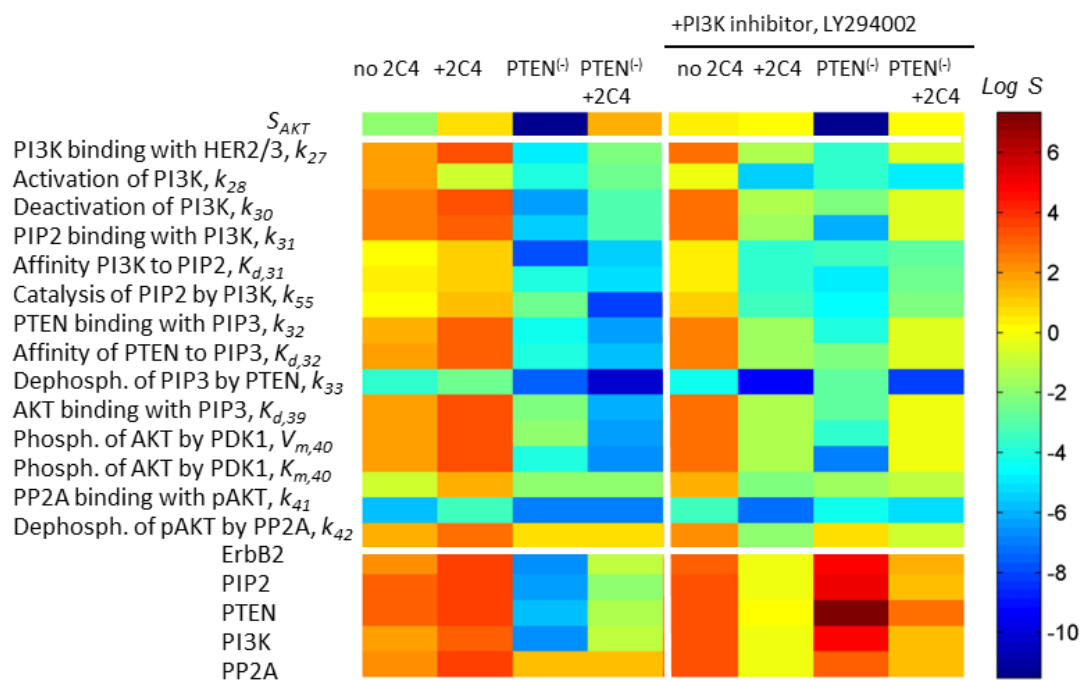


Рис. 3-12. Влияние лекарственных препаратов и мутаций белков на чувствительность PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы S_{AKT} и $S_{AKT,p}$. Колонки 1-4 показывают, соответственно, значения чувствительности pAKT сигнала для исходной системы, при действии пертузумаба (+2C4), при 50% потере активности PTEN (PTEN⁽⁻⁾) и при действии пертузумаба и мутации PTEN (PTEN⁽⁻⁾, +2C4). Колонки 5-8 показывают, соответственно, значения чувствительности pAKT сигнала при дополнительном действии ингибитора PI3K, LY294002. Расчет проведен для чувствительности к параметру k_{31} , расчеты для других параметров системы дали аналогичные результаты.

Проведенные расчеты влияния мутаций в системе на ее чувствительность показали, что мутации гена *PTEN*, вызывающие уменьшение фосфатазной активности *PTEN*, приводят к потере чувствительности как к входному сигналу, (S_{AKT}), так и к изменению параметров белков системы $S_{AKT,p}$ (Рис. 3-12, колонка 3). При этом в системе наблюдается максимальная активность АКТ, которая не чувствительна к ингибированию входного сигнала при действии ингибитора: пертузумаб не влияет как на выходной сигнал, так и на чувствительность системы (Рис. 3-12, колонка 4).

Таким образом, система под действием ингибитора внешнего сигнала проявляют повышенную чувствительность к мутациям, приводящим к резистентности по отношению к действию данного ингибитора. Проведенные расчеты показывают высокий уровень робастности PI3K/PTEN/АКТ сигнальной системы в опухолевых клетках, что обеспечивает пониженную чувствительность системы как к ингибированию внешних (рецепторных) сигналов, так и к изменению внутренних параметров системы за счет компенсаторных мутации в онкогенах и генах онкосупрессоров.

Результаты расчетов чувствительности системы при действии комбинации пертузумаба и ингибитора PI3 киназы показали, что чувствительность $S_{AKT,p}$ к параметрам сигнальных белков уменьшается (Рис. 3-12, колонка 6). Это приводит к подавлению чувствительности системы к потере активности онкосупрессора *PTEN* при его мутации: уменьшение экспрессии *PTEN* не влияет на ингибирующее действие комбинации двух лекарственных препаратов. Этот вывод подтверждает также выполненный расчет действия комбинации двух ЛП: эффективность ингибирующего действия комбинации ЛП не изменяется при мутации *PTEN*, приводящей к потере его активности *PTEN* (Рис. 3-10 и 3-11). Таким образом, комбинация пертузумаба с ингибитором киназы PI3K приводит к повышению робастности ответа системы на ингибирующее действие ЛП при онкомутациях в PI3K/PTEN/АКТ сигнальной сети.

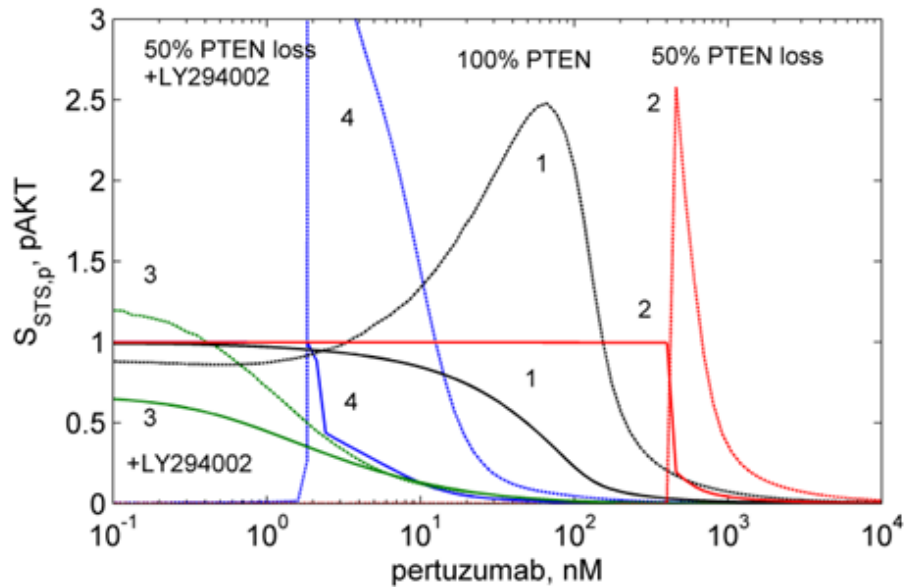


Рис. 3-13. Зависимость pAKT сигнала (сплошные линии) и чувствительности $SAKT,p$ (пунктирные линии) от концентрации пертузумаба при различных модификациях сигнальной системы: для исходной системы (линии 1); при 50% потере экспрессии PTEN (линии 2); при комбинации с ингибитором PI3K, LY294002 (линии 3); при 50% потере экспрессии PTEN и комбинации с ингибитором LY294002 (линии 4). Чувствительности $SAKT,p$ рассчитана для параметра скорости реакции связывания PIP2 с PI3K, k_{31} .

Метод анализ функции отклика сигнальной системы был применен для исследования дозовой зависимости выходного сигнала pAKT при онкомутациях в системе и действии второго ЛП, ингибитора киназы PI3K. На Рис. 3-13 приведены результаты расчета зависимости выходного сигнала pAKT от концентрации пертузумаба в системе без мутаций и при мутации *PTEN*, а также при действии ингибитора киназы PI3K. Показано, что чувствительность $SAKT,p$ к параметрам системы возрастает в области значения $IC_{50}=50$ nM для пертузумаба (Рис. 3-13, пунктирная линия 1). Уменьшение экспрессии PTEN приводит к сдвигу значения IC_{50} для пертузумаба в область его высоких концентраций (IC_{50}

=800 нМ) относительно исходного значения, что ведет к резистентности при его физиологических концентрациях в области 10 нМ-100 нМ. Действие второго ЛП, ингибитора киназы PI3K, при потере экспрессии PTEN сдвигает значение IC_{50} =800 нМ для пертузумаба в область его физиологических концентраций (Рис. 3-13, сплошная линия 3). Низкая чувствительность $S_{AKT,p}$ к параметрам системы при действии PI3K ингибитора для концентрации пертузумаба 100 нМ свидетельствуют, в частности, о подавлении чувствительность системы к мутациям *PTEN* в этой области концентраций ЛП (Рис. 3-13, пунктирные линии 3 и 4). В работе также проведены расчеты дозовой зависимости с учетом мутаций PI3K и АКТ, которые дали аналогичные результаты.

Отметим, что действия лекарственных препаратов, не вызывающих приобретенную резистентность (устойчивость), были продемонстрированы в онкологической и антибактериальной терапии при комбинационной терапии и для ЛП, обладающих паллиативным действием.

Глава 4. Влияние лекарственных препаратов на генетическую регуляцию в сигнальных системах раковых клеток

В настоящей главе излагаются результаты исследований по влиянию противораковых лекарственных препаратов на систему обратных связей (ОС) и генетическую регуляцию в сигнальных сетях раковых клеток. Как показали многочисленные экспериментальные и теоретические исследования, эффективность многих ЛП, ингибирующих сигнальные пути раковых клеток, зависит от регуляторных обратных связей в системе, которые могут как повышать, так и понижать эффективность действия ЛП (Rodrigues, Falasca, Zhang, Ong, & Schlessinger, 2000). В последнее время исследование петель ОС в сигнальных путях и их роли в механизмах действуют ЛП становится важной задачей как при разработке новых лекарственных препаратов, так и при выборе оптимальной терапии в персонализированной онкологии. Учитывая, что сила ОС и их вклад в регуляцию системы существенно зависят от мутаций генов, кодирующих сигнальные белки, формирующих ОС, влияние обратных связей на эффективность ЛП будет определяться набором мутаций, выявленных у различных групп пациентов. Так понижение эффективности ЛП может происходить при ингибировании белков, формирующих петли отрицательных ОС (ООС), что приводит к подавлению силы ООС и вызывает возрастание сигналов в подсистемах, охваченных данной ООС. В случае ингибирования белков, формирующих отрицательные связи между различными сигнальными путями, действие ЛП может приводить к активации связанного сигнального пути, ведущего, например, к пролиферации клетки и, следовательно, к уменьшению эффективности ЛП. Так, отрицательные взаимосвязи между анти-апоптотическим PI3K/PTEN/АКТ путем и RAS/MEK/ERK сигнальным путем пролиферации клетки приводит в некоторых линиях опухолевых клеток к

уменьшению эффективности ряда лекарственных препаратов, ингибирующих одну из этих сигнальных систем (Turke et al., 2012).

В основе метода, разработанного для анализа обратных связей в сигнальных системах клетки, лежит исследование механизмов осцилляторных режимов, возникающих в сигнальных сетях при наличии отрицательных обратных связей, генетической регуляции и взаимосвязей между различными сигнальными путями.

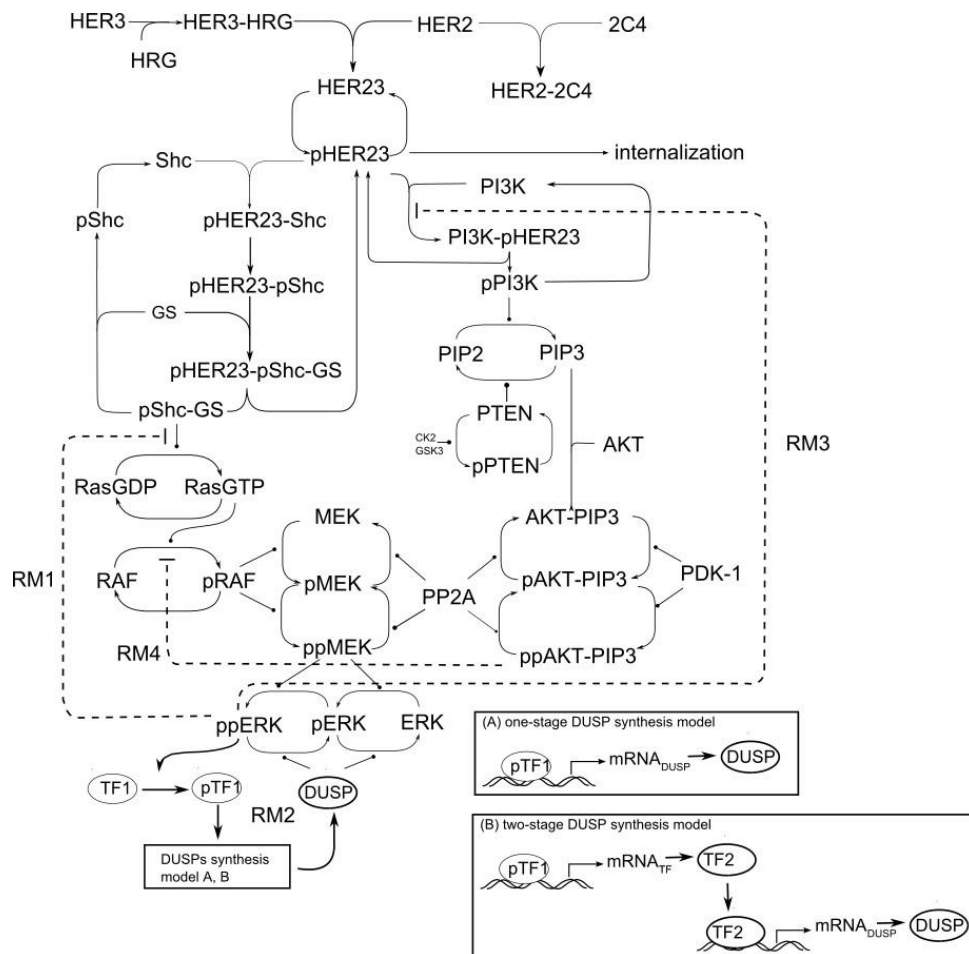


Рис. 4-1. Отрицательные обратные связи и генетическая регуляция в объединенной модели Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных систем.

На Рис. 4-1 приведены отрицательные обратные связи и система генетической регуляции, рассмотренные в модели Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных систем. Ras/MEK/ERK сигнальная система

находится под контролем отрицательной обратной связи, которая реализуется за счет эффективного ингибирования входного сигнала системы ее выходным сигналом ppERK. В результате происходит эффективное ингибирование входного сигнала системы ее выходным сигналом, pERK (RM1 на Рис. 4-1). Молекулярный механизм этой ООС определяется взаимодействием pERK с белком SOS (фактором обмена гуанин нуклеотида для RasGDPase, GEF, guanine nucleotide exchange factor), что ведет к фосфорилированию SOS с последующей диссоциацией комплекса-адаптера SOS-Grb2. Это приводит к эффективному ингибированию RasGDPase в начале Ras/MEK/ERK сигнального пути. В кинетической модели ООС RM1 pERK-Ras была учтена феноменологически, путем ингибирования активации RasGDPase выходным сигналом ppERK. С целью исследования влияния силы ООС pERK-Ras на выходной сигнал системы и возникновение осцилляторных режимов в системе в модели была учтена генетическая регуляция Ras/MEK/ERK пути, которая находится под контролем ppERK сигнала и показана на вставке на Рис. 4-1.

В результате исследования осцилляторных режимов в PI3K/PTEN/AKT и Ras/MEK/ERK сигнальных путях показано, что мутации и действие ЛП приводят как к возникновению, так и затуханию осцилляций в сигнальных системах за счет влияния на силу обратных связей. Метод был апробирован в *in vitro* экспериментах на MCF-7 линии опухолевых клеток молочной железы, для которой в эксперименте наблюдались колебания сигналов pERK и pAKT.

4.1. Биоинформационный анализ экспериментальных данных по экспрессии генов при активации сигнальных путей клетки

С целью теоретического исследования генетической регуляции в Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных системах был проведен биоинформационный анализ экспериментальных данных по экспрессии генов

при активации сигнальных путей клетки. Эксперименты по экспрессии генов проводились коллабораторами проекта в Центре Исследований Рака Эдинбургского Университета. Клетки рака молочной железы MCF-7 были активированы геругулиром HRG (1nM) и после 5, 10, 20 и 40 мин экстракт RNA был проанализирован с использованием оборудования Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit (амплификация комплементарной РНК (cRNA)) и Illumina® HT-12 Beadchips (гибридизация). В результате статистического анализа экспрессии генов с использованием t-теста (значение $p < 0.05$) были определены гены со статистически значимым изменением их экспрессии по сравнению с контролем.

На Рис. 4-2 приведены результаты статистического анализа экспериментальных данных для экспрессии генов на 10, 20 и 40 мин. после добавления 1 нМ HRG в клеточную среду. На данном рисунке представлены, главным образом гены, которые находятся под управлением Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных путей.

В результате проведенного анализа были обнаружены гены, экспрессируемые в результате активации Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных путей. В Таблице 4-1 приведены гены, кодирующие белки, которые модулируют активность сигнальных белков в Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных путях и могут участвовать в формировании обратных связей в системе (Amit, Wides, & Yarden, 2007). Согласно полученным данным, экспрессия генов *DUSP1,2,5*, кодирующих фосфатазы для ERK1/2 киназы, увеличилась в 2-3.5 раза при добавлении HRG в клеточную среду по сравнению с контролем. На Рис. 4-3 приведены зависимости экспрессии генов на 10, 20 и 40 мин. после добавления 1 нМ HRG в клеточную среду. Эти кинетические данные были учтены в кинетической модели генетической регуляции в Ras/MEK/ERK сигнальном пути, которая обсуждается в следующем разделе.

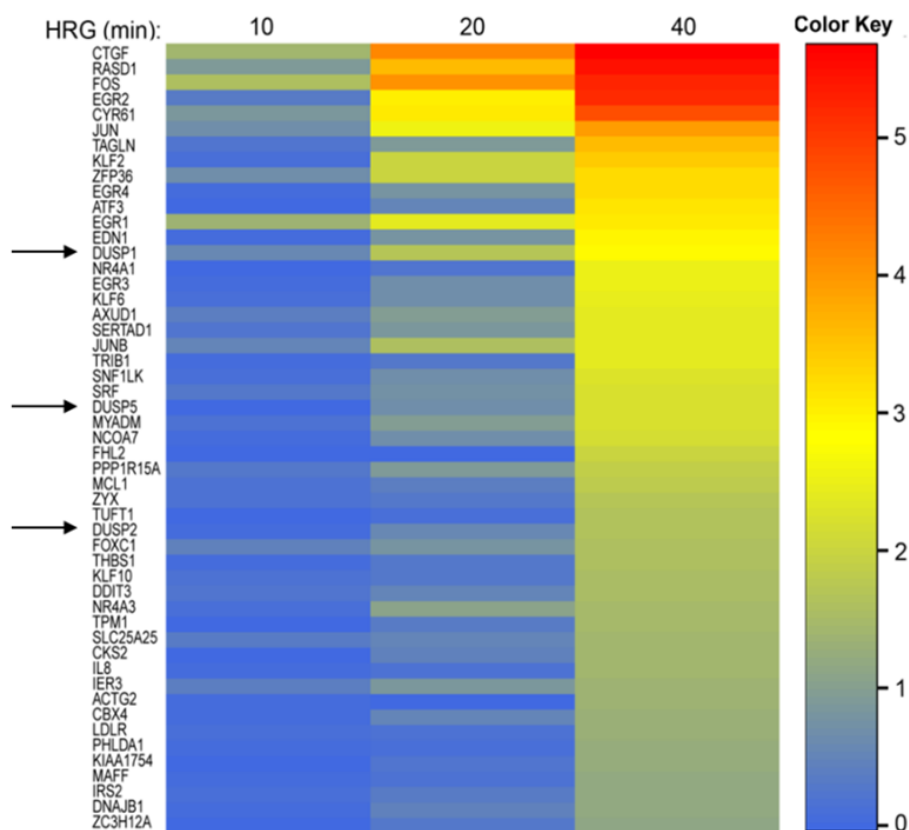


Рис. 4-2. Генетическая регуляция в Ras/MEK/ERK сигнальном пути в MCF-7 клетках. А – экспериментальные данные по экспрессии 50 генов, полученные на 10, 20 и 40 мин. после добавления 1 нМ HRG в клеточную среду. Стрелками показаны *mRNA* для *DUSP1,2,5* генов. Цвет соответствует изменению экспрессии по сравнению с контролем в соответствии со шкалой, приведенной справа.

Таблица 4-1. Гены кодирующие белки, которые участвуют в формировании обратных связей в Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальных путях.

<i>Гены</i>	<i>Регуляторный элемент в ERK и Akt путях</i>
DUSP1	ERK1/2 дефосфорилирование
DUSP2	ERK1/2 дефосфорилирование
DUSP5	ERK1/2 дефосфорилирование
CYR61	Активация Akt и ERK1/2
CTGF	Активация AKT
RASD1	Ингибирование ERK1/2
PPP1R15A	Ингибирование дефосфорилирования AKT PP1 фосфатазой

В результате анализа было обнаружено, что число экспрессирующийся генов изменяется со временем с существенным увеличением уровня экспрессии после 10 мин (160 транскриптов), после 20 мин (450 транскриптов) и 40 мин (390 транскриптов). Проведенный Анализ Представленности Функциональных Групп Генов (functional enrichment analysis) показал, что HRG приводит к существенному увеличению экспрессии генов, находящихся под контролем MAPK сигнального пути, в MCF-7 клетках после 20 мин активации (Nagashima et al., 2007). Среди основных генов, являющиеся маркерами активации MAPK сигнального пути, были обнаружены следующие гены с высоким уровнем экспрессии *DUSP1*, *DUSP5*, *EGR1*, *KLF2*, *JUNB*, *ZPF36*, *DDIT3*, *CTGF*, *FOS*, *FOSB* и *MYC*. Результаты полного анализа представленности функциональных групп генов даны в Приложении 2. На Рис. 4-2 представлены 50 генов с наибольшим уровнем экспрессии, полученные в проведенном анализе.

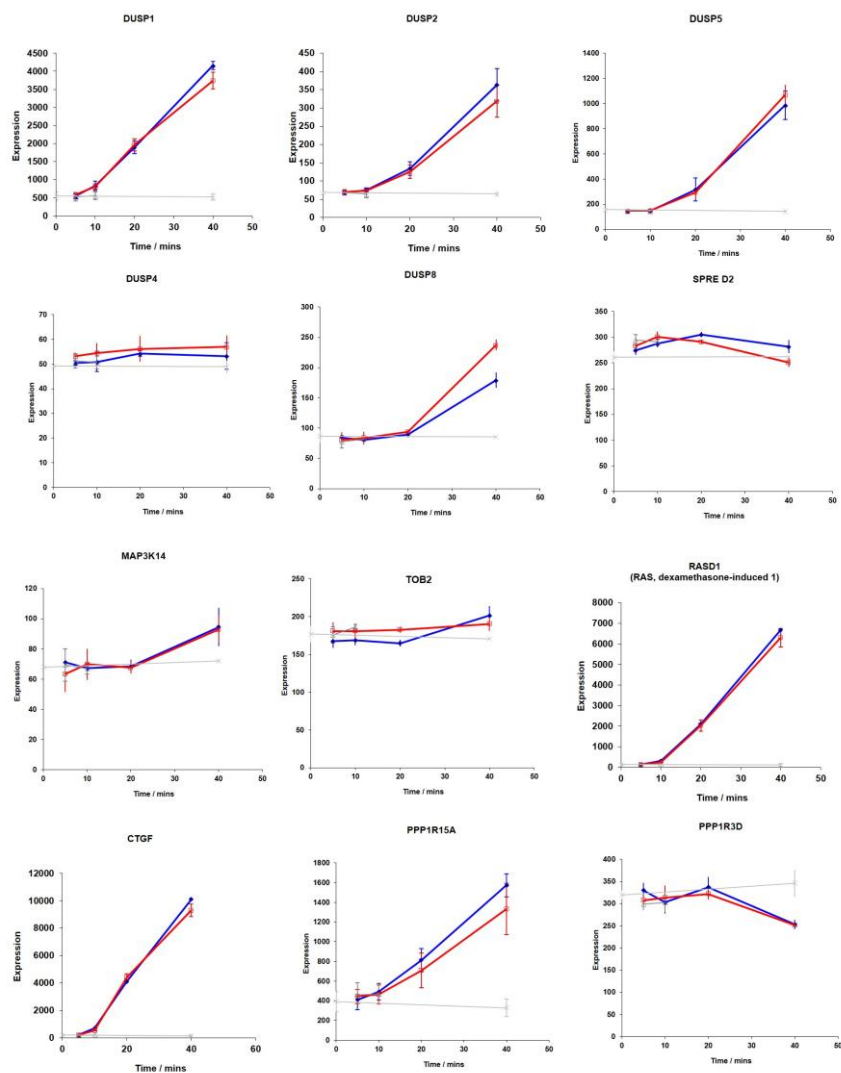


Рис. 4-3. Зависимость экспрессии генов от времени с начала активации *Ras/MEK/ERK* сигнального пути при активации популяцию MCF-7 клеток лигандами HRG и EGF (красная и синяя линии, соответственно).

На основе полученных результатов по зависимости экспрессии генов от времени была предложена схема активации ERK1/2 киназой факторов транскрипции, регулирующих экспрессию генов на начальной стадии (IEG, immediate-early gene) и на второй стадии (DEG, delayed-early gene) генетической регуляции (Amit et al., 2007). Схема генетической регуляции представлена на Рис. 4-4.

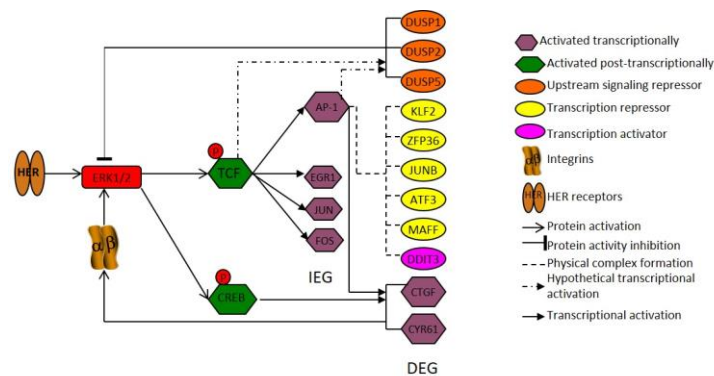


Рис. 4-4. Схема активации ERK1/2 киназой факторов транскрипции, регулирующих экспрессию генов на первой стадии (IEG, immediate-early gene) и второй стадии (DEG, delayed-early gene) генетической регуляции (*Amit et al., 2007*).

Согласно модели генетической регуляции на начальной стадии ERK1/2 киназа фосфорилирует фактор транскрипции Elk-1 (ETS domain-containing protein), который относится к TCF (ternary complex factor), в результате чего происходит экспрессия генов начальной стадии регуляции (IEG: *FOS*, *JUN*, *EGR1*) после 10-20 мин с начала активации клеток лигандом HRG. На второй стадии после 40 мин происходит формирование фактора транскрипции AP-1 (Activator protein 1), который в качестве субъединиц включает гетеродимер FOS и JUN. AP-1 является фактором транскрипции для генов второй стадии регуляции, которые экспрессируются на 40 мин. На основе проведенного анализа следующие гены были отнесены к группе генов, экспрессирующийся на второй стадии регуляции: *DUSP1*, *DUSP5*, *KLF2*, *JUNB*, *ZFP36*, *DDIT3*, *CTGF*, *FOSB*, *MYC*, *EGR3* и др.

Гены *DUSP1*, *DUSP2* и *DUSP5* кодируют фосфатазы DUSP1,2,5 (dual-specificity phosphatase DUSP-family), которые дефосфорилируют киназу pERK1/2 и реализуют отрицательную обратную связь в генетической регуляции

Ras/MEK/ERK сигнального пути. На основе полученных данных была разработана модель генетической регуляции и развита объединенная модель Ras/MEK/ERK сигнального пути с учетом генетической регуляции.

4.2. Модель генетической регуляции сигнальных систем

Разработанная модель генетической регуляции описывает ERK-зависимый механизм активации транскрипционных факторов, которые контролируют экспрессию генов *DUSP1,2,5*, реализующих отрицательную обратную связь в Ras/MEK/ERK сигнальном пути. В кинетической модели генетической регуляции был реализован двухступенчатый механизм экспрессии фосфатаз *DUSP1,2,5* при активации ERK киназы (см. схему модели на Рис. 4-4 и 4-5).

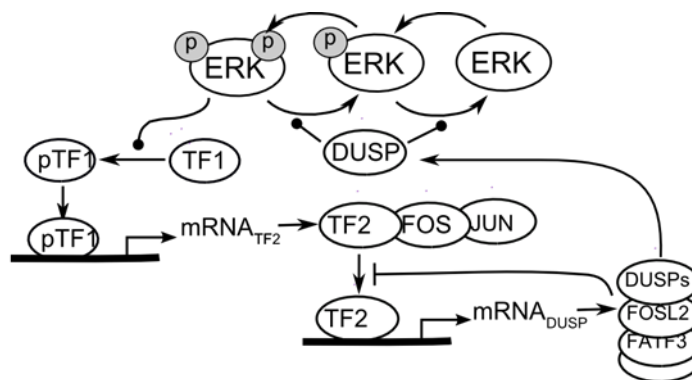


Рис. 4-5. Схема двухступенчатой модели экспрессии фосфатаз *DUSP1,2,5*, включающей раннюю и позднюю экспрессию генов.

Модель включает в себя 4 ОДУ, описывающих кинетику mRNA второго фактора транскрипции $mRNA_{TF2}$ и фосфатазы DUSP, а также второго фактора транскрипции *TF2* и экспрессируемых белков DUSP:

$$\begin{cases} \frac{dmRNA_{TF2}}{dt} = \alpha_{R1} \cdot F(ppERK, TF1) - \beta_{R1} \cdot mRNA_{TF2} \end{cases} \quad (4.1)$$

$$\begin{cases} \frac{dTF2}{dt} = \alpha_{E1} \cdot mRNA_{TF2} - \beta_{E1} TF2 \end{cases} \quad (4.2)$$

$$\begin{cases} \frac{dmRNA_{DUSP}}{dt} = \alpha_{R2} \cdot G(TF2) - \beta_{R2} \cdot mRNA_{DUSP} \end{cases} \quad (4.3)$$

$$\begin{cases} \frac{dDUSP}{dt} = \alpha_{E2} \cdot mRNA_{DUSP} - \beta_{E2} \cdot DUSP \end{cases} \quad (4.4)$$

где $mRNA_{TF2}$ и $mRNA_{DUSP}$ – концентрации mRNA генов, кодирующих второй транскрипционный фактор TF2 и фосфатазу DUSP; функция $F(ppERK, TF1)$, имеющая вид функции Михаэлиса-Ментен, описывает активацию первого транскрипционного фактора TF1 (TCF) в результате его фосфорилирования активной киназой ppERK; функция $G(TF2)$ описывает активацию второго транскрипционного фактора TF2; константы α_{R1} и α_{R2} – силы промоторов; α_{R1} и α_{R2} – скорости трансляции; β_{R1} и β_{E1} – скорости деградации mRNA и белков, соответственно. Детали модели и набор кинетических параметров приведены в совместной статье (Hu et al., 2013).

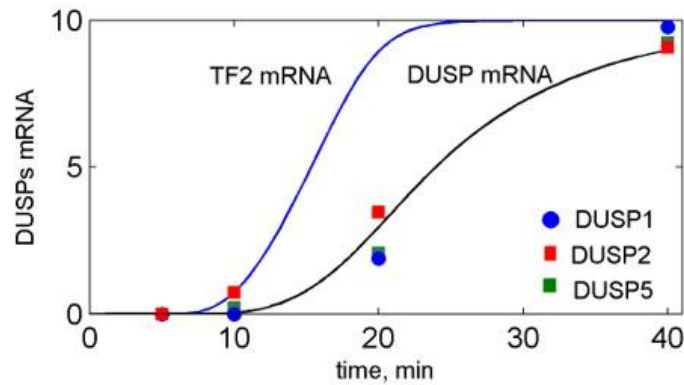


Рис. 4-6. Теоретические зависимости экспрессии mRNA DUSP (черная линия) и mRNA для фактора транскрипции NF2 (синяя линия) в кинетической модели (4-1)-(4-6). Точки-экспериментальные данные, приведенные на Рис. 4-3.

Параметры модели генетической регуляции были выбраны на основе литературных данных и наилучшего описания временной зависимости экспрессии mRNA DUSP1,2,5, полученной в экспериментах (Рис. 4-3 и 4-6). Кинетическая модель генетической регуляции (4.1)-(4.4) была объединена с моделью Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальной системы с целью исследования взаимодействия двух отрицательных обратных связей: ООС в MAP-киназной сигнальной системе, за счет эффективного ингибирования активации Ras выходным сигналом ppERK, ppERK-Ras, и генетической ООС, pERK-DUSP.

4.3. Моделирование осцилляторных режимов как метод исследования обратных связей в сигнальных системах

Разработанная объединённая модель Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнального пути с генетической регуляцией была применена к исследованию двух взаимодействующих регуляторных связей в данной системе: генетической и протеин-киназной ООС. Исследование характера временной зависимости выходного сигнала ppERK в модели показало, что концентрация экспрессируемой фосфатазы DUSP существенно влияет на выходной сигнал Ras/MEK/ERK сигнальной системы, что приводит к модуляции отрицательной обратной связи ppERK-RAS. При выбранных параметрах объединенной модели выходной сигнал сигнальной системы, ppERK, представляет собой сигнал с максимумом при 20 мин и маловыраженными затухающими колебаниями (Рис. 4-7А, тонкая сплошная линия). При частичном ингибировании генетической обратной связи в результате уменьшения уровня экспрессии фосфатазы DUSP в системе наблюдались затухающие колебания высокой амплитуды (Рис. 4-7А, толстая сплошная линия). В этом случае уменьшение силы генетической ООС ведет к возрастанию амплитуды выходного сигнала ppERK в системе. При

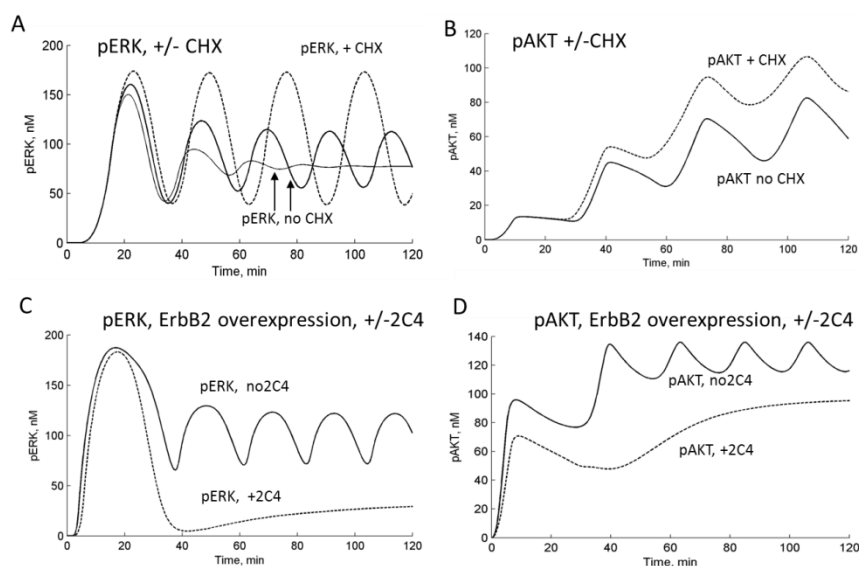


Рис. 4-7. Результаты теоретических расчетов сцилляторных режимов в связанной PI3K/PTEN/AKT, Ras/MEK/ERK сигнальной сети в клетках MCF-7 и MCF-7/HER2. (A) – осцилляции pERK сигнала при различных величинах обратной генетической связи: при включенной генетической связи (тонкая сплошная линия, α_{R1}); при 50% ингибировании генетической связи (толстая сплошная линия, $0.5 \alpha_{R1}$) и при полном ингибировании генетической связи при действии CHX (пунктирная линия, $\alpha_{R1}=0$). В - осцилляции pAKT при включенной генетической связи (сплошная линия) и при полном ее ингибировании при действии CHX (пунктирная линия). С и D – соответственно, осцилляции pERK и pAKT в клетках MCF-7/HER2 с повышенной экспрессией HER2 рецептора (сплошные линии) и подавление pERK и pAKT осцилляций при действии 100 нМ пертузумаба, 2C4, (пунктирные линии).

полном отключении генетической ООС в системе происходит бифуркация режима функционирования с возникновением незатухающих колебаний в Ras/MEK/ERK сети, в частности, колебаний pERK сигнала с периодом 20 мин. (Рис. 4-7А, пунктирная линия).

Также установлено, что дополнительным механизмом возникновения колебаний в модели помимо подавления генетической ООС является нелинейный характер функции ингибирования входного сигнала RasGTP выходным сигналом pERK. В модели функция, описывающая ООС в сигнальной системе, характеризуется параметром Хилла $n = 3$. Предполагается, что нелинейность ООС определяется сложным характером кинетики каскада реакций, который включает фосфорилирование фактора SOS активной киназой pERK с последующей диссоциацией комплекса Grb2-SOS (активирующего RasGDPase), что ведет к ингибированию входного сигнала в Ras/MEK/ERK сигнальном пути.

С целью экспериментального исследования взаимодействия двух ООС и роли генетической регуляции в Ras/MEK/ERK сигнальном пути был проведен эксперимент по блокировке генетической ООС ингибитором транскрипции циклогексимидом (10 μ M CXH) в клеточной линии рака молочной железы MCF-7. Эксперимент был выполнен коллаборатором проекта в Центре Исследования Рака Эдинбургского Университета. В экспериментах были обнаружены осцилляции pERK сигнала с периодом 20 мин при ингибировании транскрипции циклогексимидом (10 μ M CXH) (Рис. 4-8А). Полученные экспериментальные результаты согласуются с теоретическими расчетами по генерации pERK осцилляций в результате уменьшения экспрессии DUSP фосфатазы в модели (Рис. 4-7А).

Также в экспериментах на MCF-7 клетках, обработанных CXH, были обнаружены колебания pAKT сигнала с периодом близким к 20 мин (Рис. 4-8В). Синхронизация между осцилляциями pAKT и pERK указывает на существование связи между Ras/MEK/ERK и PI3K/PTEN/AKT сигнальными путями. Для описания этой взаимосвязи в модели было учтено взаимодействие между RasGTPase и PI3 киназой, которое приводит к дополнительной активации PI3K (Mendoza, Er, & Blenis, 2011) (Рис. 0-1). В результате учета взаимодействия между двумя сигнальными путями модель воспроизводит осцилляции pAKT,

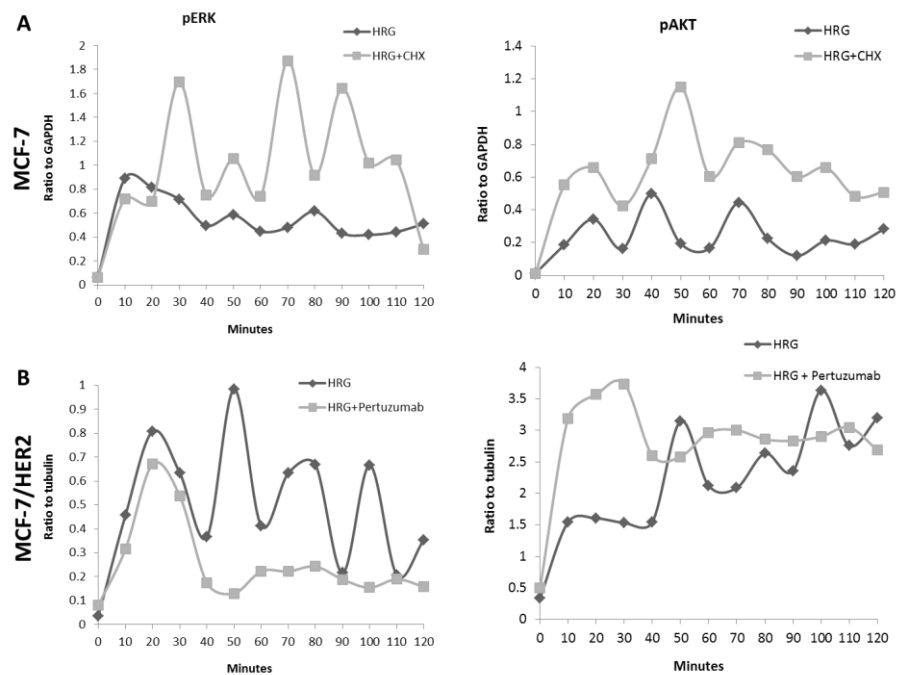


Рис. 4-8. Экспериментальные данные по осцилляторным режимам в связанной PI3K/PTEN/AKT, RAS/MEK/ERK сигнальной сети в клетках MCF-7 и MCF-7/HER2 линиях опухолевых клетках молочной железы. А - экспериментальные данные для pERK1/2(T202/Y204) (слева) и pAKT(S473) (справа) сигналов (черные линии) и осцилляции pERK и pAKT при действии 10 мкМ CXH (серые линии). В и С - соответственно, pERK и pAKT осцилляции в клетках MCF-7/HER2 с повышенной экспрессией HER2 рецепторов в отсутствие (черные линии) и в присутствии 100 нМ пертузумаба, 2C4 (серые линии). Экспериментальные точки получены в результате оцифровки данных Вестерн-блоттинг анализа для pERK (T202/Y204) и pAKT (S473) в MCF-7 и MCF-7/HER2 клетках при их активации 1 нМ HRG после нормализации на GAPDH.

индуцированные колебаниями pERK в исходных клетках (Рис. 4-7В). Исследование роли генетической регуляции в Ras/MEK/ERK системе показало, что уменьшение уровня экспрессии DUSP фосфатазы приводит к усилению pAKT осцилляций (Рис. 4-7В), что согласуется с экспериментальными данными

по усилению колебаний pAKT в клетках, обработанных ингибитором транскрипции, СХН (Рис. 4-8В).

Результаты компьютерных расчетов также показали, что связанные pAKT/pERK осцилляций возникают в системе при повышенном входном рецепторном сигнале (Рис. 4-7С, D, сплошные линии). В модели увеличение рецепторного сигнала pErbB2 было реализовано повышением концентрации ErbB2 рецепторов. Расчеты также показали, что ингибирование рецепторного сигнала пертузумабом (2С4) приводит к подавлению осцилляций в системе (Рис. 4-7С, D, пунктирные линии). С целью экспериментального исследования этого эффекта были проведены эксперименты на MCF-7/HER2 клетках с повышенной экспрессией ErbB2 (HER2) рецепторов (клетки трансфицированные *ErbB2* геном). В экспериментах были обнаружены связанные колебания pERK и pAKT сигналов, а также наблюдалось подавление колебаний при действии ингибитора ErbB2 рецепторов, пертузумаба (Рис. 4-7В, D).

Глава 5. Механизмы репрограммирования сигнальных путей при действии лекарственных препаратов и их комбинаций

В данной главе представлены результаты по исследованию механизмов репрограммирования сигнальных систем в результате действия антираковых лекарственных препаратов. К процессам репрограммирования сигнальных систем в дальнейшем будут отнесены процессы активации дополнительных сигнальных путей клетки, которые приводят к компенсации ингибирующего действия лекарственных препаратов и тем самым вызывают резистентность к их действию. Активация компенсаторных сигнальных путей клетки происходит, главным образом, за счет экспрессии набора генов, находящихся под управлением сигнальной системы, которая является мишенью данного ЛП. В работе показывается, что действие лекарственных препаратов может вызывать как ингибирование экспрессии соответствующих генов, так и активацию генов, кодирующих вторичные сигнальных пути, которые приводят к пролиферации клеток и дальнейшему росту опухоли. Механизм активации компенсаторных сигнальных путей связан со сложностью регуляторных связей между различными сигнальными сетями, что может приводить к активации одних систем при ингибировании других. Предполагается, что наблюдаемые изменения экспрессии генов при лекарственной терапии могут изменять ответ сигнальной системы клетки на действия лекарств в результате активации адаптационного ответа клетки на лекарственную интервенцию. Исследование подобных компенсаторных механизмов является важной задачей при исследовании резистентности к новым ЛП и возникновения побочных эффектов при их использовании в клинике. Полученные результаты исследований могут применяться для разработки лекарственной терапии по подавлению приобретенной резистентности в результате репрограммирования сигнальных путей.

В данном разделе развивается метод исследования активации

компенсаторных механизмов клетки при действии ЛП за счет генетической регуляции между различными сигнальными путями пролиферации клетки. Метод включает в себя биоинформационный анализ экспрессии генов при действии ЛП, в результате которого был определен набор генов с высоким уровне экспрессии и проанализированы сигнальные пути, которые активируются в за счет повышенной экспрессии найденных генов. Далее методами компьютерного моделирования анализируется вклад компенсаторных сигнальных путей в подавление ингибирующего действия ЛП. Данный метод применен к исследованию репрограммирования сигнальной сети ErbB рецепторов при действии трастузумаба и пертузумаба. Результаты исследований использованы для обоснования эффективности комбинационной терапии для преодоления резистентности к лекарственному препарату трастузумабу.

Методами компьютерного моделирования было проведено исследование ингибирующего действия трастузумаба, пертузумаба и их комбинации на линию опухолевых клеток SKOV3 с высоким уровнем экспрессии HER2 рецептора. Разработанная модель действия ингибиторов ErbB2 рецепторов была применена к анализу *in vivo* экспериментальных данных, полученных на опухолях SKOV3 ксенотрансплантатных мышей. Эксперименты были выполнены коллабораторами проекта в Центре Исследований Рака Эдинбургского университета. Результаты экспериментальных исследований эффективности действия данных ЛП на рост трансплантатной опухоли в течении 35 дней показали, что пертузумаб оказывает слабый ингибирующий эффект, трастузумаб существенно замедляет рост опухоли в течении 2 недель, после чего рост возобновляется в то время, как комбинация трастузумаба и пертузумаба вызывает полную регрессию опухоли (Рис. 5-1).

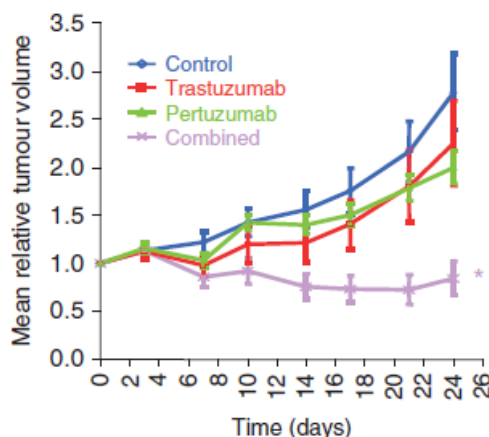


Рис. 5-1. Экспериментальные данные по действию трастузумаба, пертузумаба и их комбинации на рост опухоли SKOV3 ксенотрансплантатной мыши. Инъекции лекарств сделаны на 0, 3, 7 и 10 день после трансплантации SKOV3 опухолевых клеток яичника человека (Sims et al., 2012).

С целью исследования различия в эффективности трех указанных терапий, направленных на ингибирование PI3K/АКТ сигнального пути пролиферации клетки, был проведен биоинформационный анализ изменения экспрессии генов в результате действия пертузумаба, трастузумаба и их комбинации в клетках на срезах SKOV3 опухоли ксенотрансплантатной мыши.

5.1. Биоинформационный анализ экспрессии генов при действии лекарственных препаратов

В данном исследовании предполагалось, что наблюдаемые изменения экспрессии генов при лекарственной терапии могут изменять ответ сигнальной системы клетки на действия лекарств в результате активации адаптационного ответа клетки на лекарственную интервенцию. С целью определения ответа генетической регуляции клетки на лекарственную терапию был проведен статистический анализ экспрессии генов при действии трастузумаба,

пертузумаба и их комбинации в экспериментах на SKOV3 опухоли ксенотрансплантатных мышей. Результаты статистического анализа более 10000 транскрипт представлены на Рис. 5.2, где приведены уровни экспрессии для генов со статистически значимым изменением экспрессии ($p < 0.05$) по сравнению с контролем при действии пертузумаба, трастузумаба и их комбинации. Также результаты статистического анализа представлены в виде диаграмм (Volcano plot) на Рис. 5-3, на которых приведены уровни экспрессии генов по оси ординат ($\log_2$) и p -значения по оси абсцисс.

Из полученных данных видно, что лекарственные препараты и их комбинация по-разному влияют на экспрессию генов. Среди генов со статистически значимым увеличением экспрессии при действии трастузумаба были обнаружены следующие гены *HBEGF*, *FGFR*, *EPOR*, *LAMC3*, *ERBB2*, *ERBB3*, *NRG4*, *VEGFB*, *SYK*, *AKT1*, *PIK3R2*, *FOXO1*, *PDGFR* и *VEGFB*. Как видно, ингибирование ErbB2 рецепторов в SKOV3 клетках трастузумабом приводит к увеличению экспрессии генов, кодирующих рецепторы как принадлежащие к семейству ErbB рецепторов, так и принадлежащие к другим группам клеточных рецепторов (*FGFR*, *PDGFR* и *VEGFB*). В работе предполагается, что повышение уровня данных рецепторов в SKOV3 клетках вызывает дополнительную активацию PI3K/AKT сигнальной системы и приводит к компенсации ингибирующего эффекта трастузумаба. С целью проверки данного компенсаторного механизма в SKOV3 клетках было проведено исследование влияния возрастания уровня экспрессии *ErbB3* гена (в 2 раза), кодирующего ErbB3 рецепторы, на подавление ингибирующего эффекта трастузумаба в SKOV3 клетках. Исследование было выполнено в рамках разработанной модели PI3K/AKT сигнальной системы.

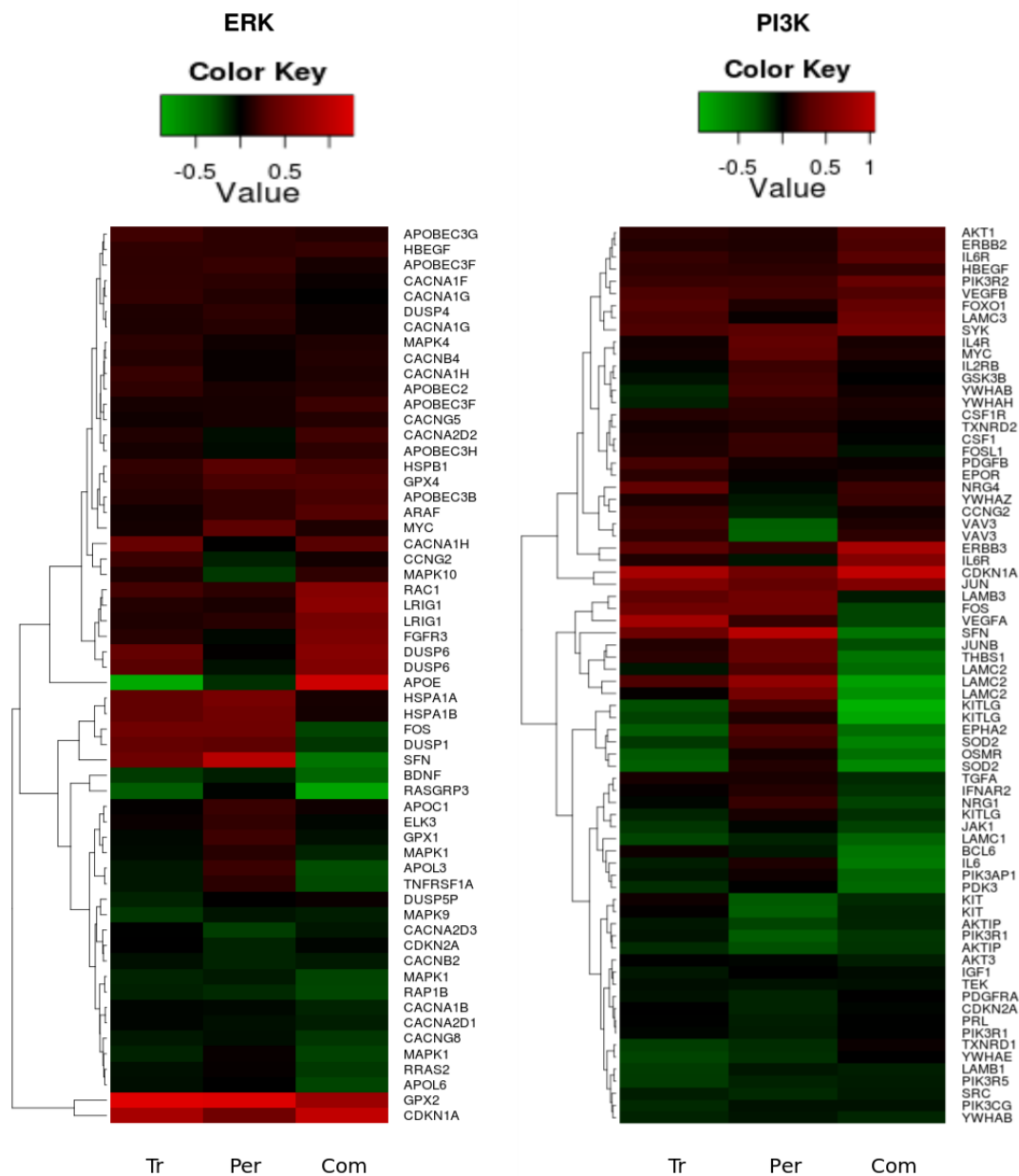


Рис. 5-2. Уровни экспрессии генов при действии трастузумаба (Tr), пертузумаба (Per) и их комбинации (Com) на рост опухоли SKOV3 ксенотрансплантатной мыши. Цветом показаны изменения экспрессии ($\log_2$) по сравнению с контролем для генов со статистически значимым уровнем изменения ($p < 0.05$), полученные в результате статистического анализа ~10000 транскриптов.

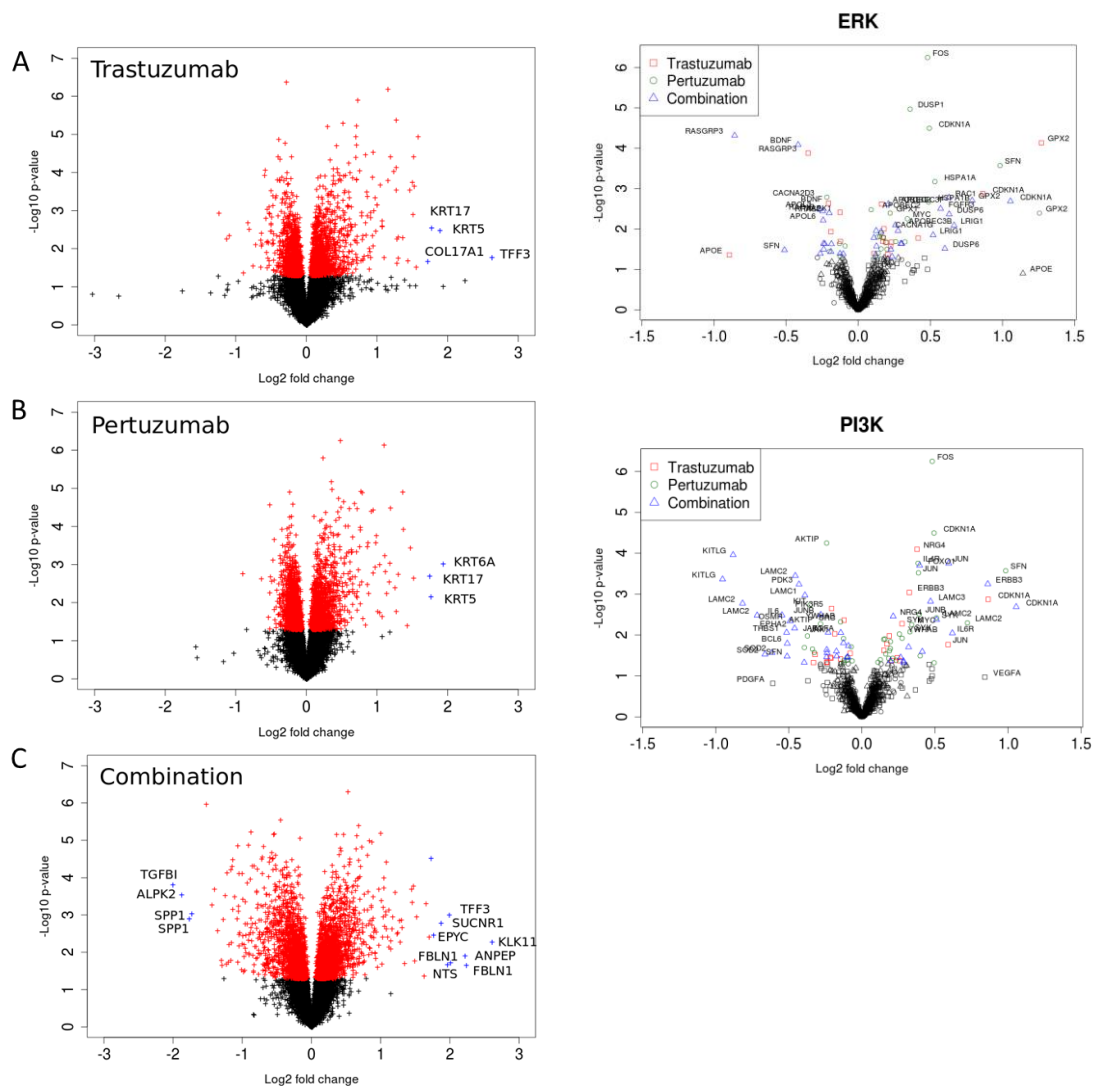


Рис. 5-3. Экспрессия генов в результате действия трастузумаба (A), пертузумаба (B) и их комбинации (C) в образцах опухоли, измеренная на 4 день после трансплантации (Sim et al., British J. Cancer. Res. 2012). (B) и (C) - Экспрессия генов, находящихся под управлением сигнальных путей PI3K/AKT (B) и Ras/RAF/ERK (C) при действии лекарства и их комбинации. Результаты измерений уровней мРНК представлены в виде диаграмм «уровень экспрессии – p-значение».

Для объяснения возрастания экспрессии *ErbB3* гена в результате ингибирования pAKT сигнала при действии трастузумаба предложен следующий механизм, основанный на результатах проведенного биоинформационного анализа и генетической регуляции в PI3K/AKT сигнальной системе. Как показали результаты анализе, при действии трастузумаба происходит возрастание экспрессии *FOXO1* гена, кодирующего фактор транскрипции FOXO. Также было обнаружено возрастание генов, которые находятся под управлением фактор транскрипции FOXO: *CDKN1A*, *CDKN2A*, *MYC*, *TXNRD1*, *GPX*, *CACNA1C*, *APOC1*, *DUSP5*, *PIK3C*, *ErbB2* и *ErbB3*, а также гена *FOXO1*, кодирующего сам фактор транскрипции (Рис. 5-2). Таким образом, в результате ингибирования pAKT сигнала при действии трастузумаба происходит увеличение концентрации фактора транскрипции FOXO, что приводит к возрастанию экспрессии *ErbB3* гена. Механизм активации фактора транскрипции FOXO в результате действия трастузумаба приведен на Рис. 5-4. Согласно данному механизму pAKT фосфорилирует фактор транскрипции FOXO, что приводит к его деградации и уменьшению его концентрации в клеточном ядре (Roy, Srivastava, & Shankar, 2010). При ингибировании pAKT возрастает концентрация нефосфорилированного фактора транскрипции FOXO, что приводит увеличению транскрипции генов, находящихся под его управление, в частности, генов *ERBB2* и *ERBB3*. Также было обнаружено, что pERK также может фосфорилировать FOXO аналогично pAKT ингибирование pERK может индуцировать накопление FOXO в ядре и активацию транскрипции *ERBB3* гена (Roy et al., 2010)(Roy et al., 2010)(Roy et al., 2010)(Roy et al., 2010).

Таким образом, действие ЛП трастузумаба, которое направлено на ингибирование сигнала пролиферации раковых клеток с повышенным уровнем экспрессии *ErbB2* рецепторов, приводит к репрограммированию рецепторной

системы и активации компенсаторного механизма. В результате

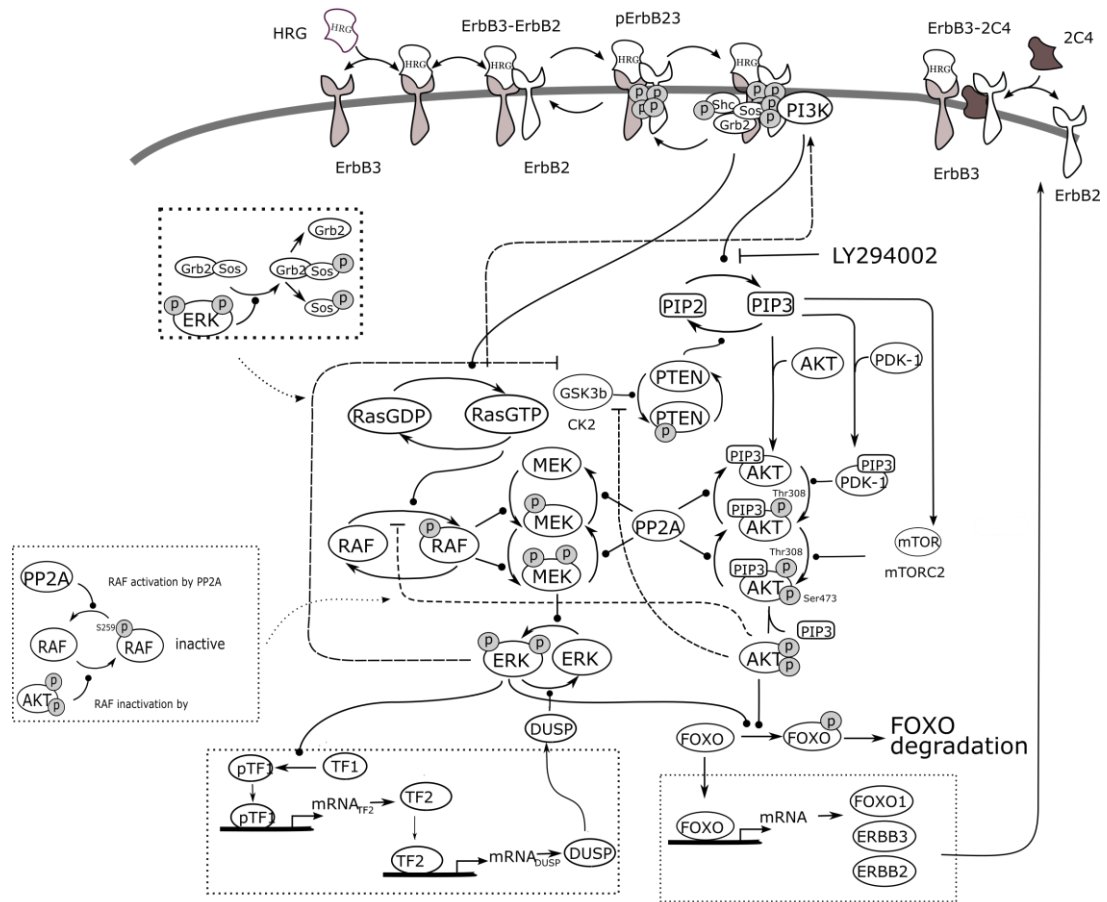


Рис. 5-4. Схема активации фактора транскрипции FOXO при ингибировании pAKT и pERK.

репрограммирования увеличивается экспрессия ErbB3 рецепторов в раковые клетки, изначально экспрессирующих в основном ErbB2 рецепторы. При этом сигнал ErbB3/ErbB2 рецепторов компенсирует сигнал ErbB2/ErbB2 рецепторов, подавленный в результате действия трастузумаба. Отметим, что трастузумаб эффективно ингибирует лиганд-независимую гомодимеризацию рецепторов ErbB2/ErbB2 и не влияет на лиганд-зависимую гетеродимеризацию рецепторов ErbB2/ErbB3. Данный механизм репрограммирования рецепторной системы

является одним из механизмов приобретённой резистентности к лекарствам, ингибирующих клеточные сигнальные пути. Следующая глава посвящена обсуждению результатов моделирования данного механизма возникновения резистентности к действию трастузумаба и разработке методов ее преодоления путем комбинационной терапии.

5.2. Репрограммирование сигнальных сетей при действии лекарственных препаратов и их комбинаций

Разработанная модель RAS/MEK/ERK и PI3K/AKT сигнальных путей была применена для исследования влияния репрограммирования рецепторных сетей на действия трастузумаба, пертузумаба и их комбинаций в клетках рака яичников SKOV3 с высокой экспрессией ErbB2 рецепторов. В модели учтено, что повышенная концентрации ErbB2 рецепторов в клетках приводит к спонтанной гомодимеризации ErbB2 рецепторов и активации Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT сигнальных путей в отсутствии рецепторных лигандов. В модели также учтен низкий уровень экспрессии ErbB3 и ErbB4 (Nagumo et al., 2009) в SKOV3 клетках, что приводит к слабому рецепторному сигналу при гетеродимеризации ErbB3 и ErbB4 рецепторов. В данном расчете не был учтен вклад EGFR рецепторов, т.к. экспериментально было показана их незначительная роль в пролиферации раковых клеток с высоким уровнем экспрессии ErbB2 рецепторов (Lee-Hoeflich et al., 2008).

Полученные результаты моделирования показали, что ингибирующее действия трастузумаба, пертузумаба и их комбинации на активацию pAKT и pERK сигналов существенно зависят от соотношения концентраций ErbB2 и ErbB3 рецепторов в клетке ErbB3/ErbB2 (Рис. 5-5). Как показали расчеты, при низком соотношении ErbB3/ErbB2 (высокий уровень ErbB2 рецепторов)

трастузумаб оказывает существенное ингибирующее действие на pERK сигнал за счет ингибирования лиганд-независимой гомодимеризации ErbB2/ErbB2 рецепторов (Рис. 5-5А). При возрастании экспрессии ErbB3 рецепторов его действие на pERK сигнал ослабевает за счет активации сигнала, формирующегося при ErbB3/ErbB2 гетеродимеризации. Также в расчетах было выявлено отсутствие действия трастузумаба на pАКТ сигнал. Этот эффект связан со слабой активацией PI3K/АКТ сигнального пути по сравнению с активацией RAS/MEK/ERK пути при гомодимеризации ErbB2/ErbB2 рецепторов в SKOV3 клетках, что обусловлено отсутствием фосфо-сайтов ErbB2 рецепторов для прямого связывания и активации p85 сигнальной субъединицы PI3K (Schulze et al., 2005). Активация pАКТ сигнал в модели происходит в основном за счет ErbB3/ErbB2 рецепторов и фосфорилирования ErbB3 фосфо-сайтов, являющиеся местами связывания p85 субъединицу PI3K (Schulze et al., 2005).

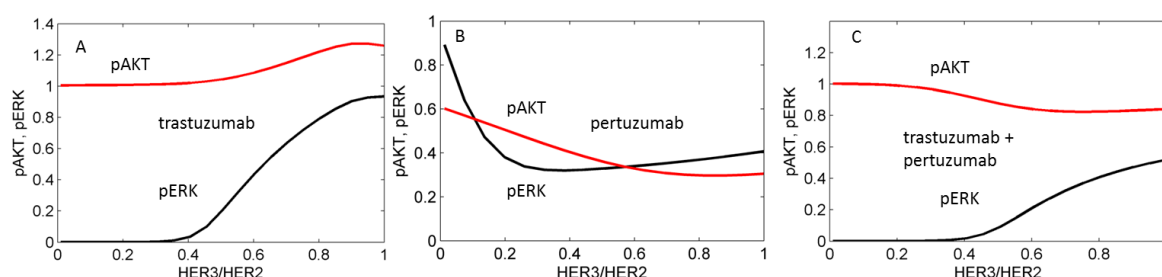


Рис. 5-5. Результаты расчетов действия трастузумаба (А), пертузумаба (В) и их комбинации (С) на уровни pАКТ (красные линии) и pERK (черные линии) сигналов в зависимости от отношения концентраций ErbB3 (HER3) и ErbB3 (HER2) рецепторов в клетке, ErbB3/ ErbB2.

Результаты расчетов показали, что пертузумаб в отличие от трастузумаба оказывает слабое ингибирующее действие на pERK сигнал при низких соотношениях ErbB2/ErbB2 рецепторов и ингибирует до 70% pERK сигнала при увеличении экспрессии ErbB3 рецепторов (Рис. 5-5В). Пертузумаб также эффективно ингибирует pАКТ сигнал в широкой области соотношениях

ErbB2/ErbB2 рецепторов.

С целью проверки полученных зависимостей ингибирующего действия пертузумаба и трастузумаба от соотношения уровней экспрессии ErbB3/ErbB2 рецепторов было проведено сравнение теоретических результатов с экспериментальными данными для концентраций pAKT и pERK, измеренными на клетках в срезах SKOV3 ксенотрансплантатной опухоли (Sims et al., 2012) (Рис. 5-6А,В). Для оценки отношения концентрации рецепторов ErbB3/ErbB2 в расчете были использованы экспериментальные данные по измерению концентраций фосфорилированных рецепторов ErbB3 и ErbB2 в образцах опухоли (Faratian et al., 2011). Результаты сравнения показали удовлетворительное согласие теоретических и экспериментальных данных (Рис. 5-6А,В).

На основе результатов проведенных расчетов и биоинформационного анализа был предложен следующий механизм потери чувствительности SKOV3 ксенотрансплантатной опухоли к действию трастузумаба. На начальной стадии воздействия трастузумаб оказывает эффективное ингибирующее действие на SKOV3 клетки с высоким уровнем экспрессии ErbB2 за счет ингибирования сигнала пролиферации pERK. При этом происходит активация фактора транскрипции FOXO и возрастание экспрессии гена *ErbB3*, что приводит к увеличению концентрации клеточных рецепторов ErbB3. Связывание ErbB3 с ErbB2 рецепторами вызывает дополнительное активирование как ERK, так и AKT, что компенсирует ингибирующее действие трастузумаба.

С целью преодоления приобретенной резистентности SKOV3 клетки к действию трастузумаба в результате репрограммирования рецепторной системы было рассмотрено совместное действие трастузумаба и пертузумаба. Проведенные расчеты действия двух ингибиторов показало, что комбинация двух ЛП проявляет высокую эффективность по отношению к ингибированию pERK как при высокой экспрессии ErbB2 рецепторов (низкое отношение

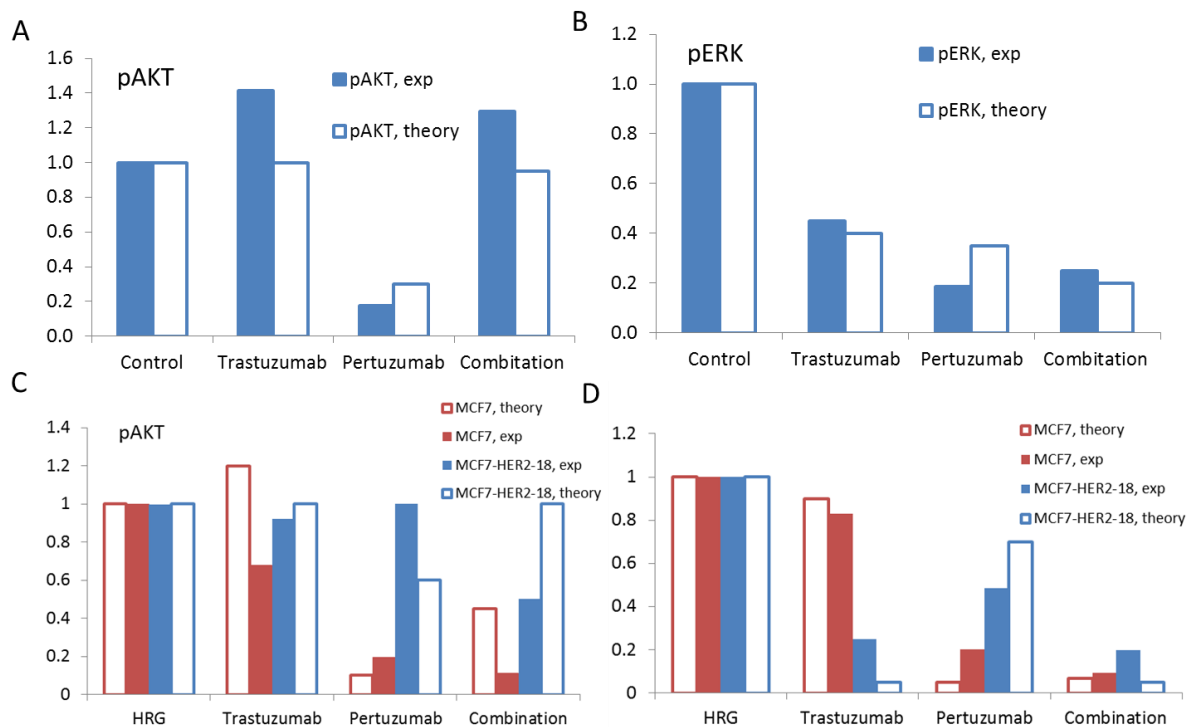


Рис. 5-6. Сравнение результатов расчетов ингибирующего действия трастузумаба, пертузумаба и их комбинации на pAKT и pERK сигналы с экспериментальными данными, полученными в клетках с различным уровнем экспрессии ErbB2 и ErbB3 рецепторов. А, В – Сравнение теоретических данных (белые столбцы) для pAKT и pERK при соотношении HER3/HER2=0.6 с *in vivo* экспериментальными данными (синие столбцы) для измерений, сделанных в образцах опухоли SKOV3 ксенотрансплантатных мышей (Sims et al., 2012). С, D - Сравнение при соотношении ErbB3/ErbB2 =0.1 (столбцы с красной границей) и 1 (столбцы с синей границей) с *in vitro* экспериментальными данными для pAKT (С) and pERK (D) для MCF7 (красные столбцы) клеток и MCF7-HER2-18 клеток с повышенной экспрессией HER2 рецепторов (синие столбцы) (Hu, 2011; Hu et al., 2013).

ErbB3/ErbB2), так и при повышенной экспрессии ErbB3 рецепторов ($ErbB3/ErbB2 \approx 0.6$) (Рис. 5-5C). Это связан с эффективным ингибированием pERK трастузумабом при низких соотношениях ErbB3/ErbB2, когда основной

вклад в активацию дает гомодимеризация ErbB2/ErbB2 рецепторов, и ингибированием pERK пертузумабом при повышенном соотношении ErbB3/ErbB2, когда возрастает вклад гетеродимеризации ErbB3/ErbB2 рецепторов в результате увеличения концентрации ErbB2 рецепторов. Сравнение полученных результатов с экспериментальными данными для концентраций pAKT и pERK, измеренными на срезах SKOV3 ксенотрансплантатной опухоли (Sims et al., 2012), приведено на Рис. 5-6.

С целью подтверждения ингибирующего действия трастузумаб и пертузумаб на разных стадиях роста опухоли было проведено сравнение теоретических расчетов (Рис. 5-5) с *in vitro* экспериментальными данными, измеренными на клеточных популяциях в течении 1 часа, когда в клетках не наблюдается сильного изменения экспрессии рецепторов. Эксперименты были проведены на клетки рака молочной железы MCF7 с соотношением ErbB3/ErbB2 $\cong 1$ и на клетках MCF7-HER2-18 с повышенной экспрессией ErbB2 рецепторов (клетки трансфицированные *ErbB2* геном). Результаты сравнения теоретических и экспериментальных результатов показали, что пертузумаб эффективен в MCF7 клетках и проявляет слабое ингибирующее действие для MCF7-HER2-18 клеток, в то время как трастузумаб проявляет ингибирующую активность в MCF7-HER2-18 клетках и мало эффективен для MCF7 клеток (Рис. 5-6C,D).

На основе проведенных исследований можно сформулировать следующие выводы. Метод компьютерного моделирования применен для исследования эффекта репрограммирования клеточных сигнальных путей в результате действия антираковых ЛП, ингибиторов клеточных рецепторов. В результате биоинформационного анализа экспрессии более 10000 генов было показано, что действие ЛП вызывает активацию дополнительных сигнальных путей, приводящих к компенсации ингибирующего действия лекарства, направленного на подавления сигнальных путей, которые проявляют ингибирующую активность на начальной стадии терапии. Метод применен к исследованию

действия ЛП трастузумаба, эффективного ингибитор клеточной пролиферации в раковых клетках с высоким уровнем экспрессии ErbB2 рецепторов. При анализе клеток SKOV3 опухоли ксенотрансплантатных мышей с повышенным уровнем экспрессии было обнаружено, что трастузумаб вызывает повышение экспрессию ErbB3 рецепторов, что приводит к дополнительной активации АКТ и ERK сигналов пролиферации и подавлению действия ЛП. В результате компьютерного моделирования зависимости эффективности трастузумаба и пертузумаба от соотношения клеточных рецепторов ErbB3/ErbB2 предложен механизм преодоления приобретенной резистентности путем комбинационной терапии. В работе показано, что синергетическое действие трастузумаба и пертузумаба на сигналы пролиферации клеток SKOV3 рака яичников с повышенной экспрессией ErbB2 рецепторов, обусловлено эффективным ингибированием pERK сигнала пролиферации клеток при изменении экспрессии ErbB3 рецептора, индуцированного действием данных лекарственных препаратов. Эффективность данной комбинации определяется высокой эффективностью трастузумаба при повышенной экспрессии ErbB2 рецепторов в начале роста опухоли. Потеря эффективности трастузумаба происходит при возрастании экспрессии ErbB3 рецепторов в результате действия ЛП. В свою очередь, эффективность пертузумаба повышается при возрастании экспрессии ErbB3 рецепторов, вызванной действием ЛП. При этом экспрессия ErbB3 рецепторов является биомаркером эффективного действия пертузумаба. Таким образом, комбинация трастузумаба и пертузумаба проявляет высокую активность как при повышенной экспрессии ErbB2 рецепторов, которая наблюдается в начале роста опухоли, так и при возрастании концентрации ErbB3 рецепторов, вызванной длительным действием ЛП.

Глава 6. Биомаркеры действия ингибиторов протеин-киназ при онкомутациях в PI3K сигнальной системе опухолевых клеток

В данной главе разработанная модель применяется к исследованию эффективности действия одиночных и комбинированных ингибиторов протеин-киназ в PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальном пути (Рис. 1). В модели рассмотрены ответы сигнальной сети на действия следующих ЛП: 1) ингибитора комплекса mTOR1, рапамицина; 2) ингибитора PI3K, LY294002; и 3) ингибитора двойного действия, BEZ-235, ингибирующего комплексы mTOR1,2 и PI3K (Рис. 6-1). Проведено сравнение действий указанных ингибиторов в зависимости от мутаций в PI3K/AKT/ mTOR/S6K1 сигнальном пути для двух линий раковых клеток яичников: в PE04 клетках без обнаруженных мутаций и A2780 клетках, в которой обнаружены точечных мутаций и делеции участка *PTEN* гена (Saito et al Int. J. Cancer: 85, 160, 2000).

Результаты моделирования действия рапамицина, LY294002 и BEZ-235 на активацию основных сигнальных белков Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путей в PE04 и A2780 клетках показаны на Рис. 6-1 – 6-6.

Методами компьютерного моделирования установлено, что действие ингибиторов киназ определяется наличием отрицательных обратных связей в PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальном пути. Одна из ООС реализуется за счет активации S6K1 киназы, которая ингибирует киназу mTOR2, что ведет к подавлению pAKT(Ser437) сигнала (Рис. 1). Другая петля ООС также формируется за счет активации S6K1 киназы, которая фосфорилирует субстрат инсулинового рецептора, IRS1, являющийся белком-адаптером, который связывается с фосфо-сайтом ErbB2,3 рецепторов и активирует p85 субъединицу PI3 киназы. Фосфорилирование IRS1 приводит к его диссоциации от ErbB2/3

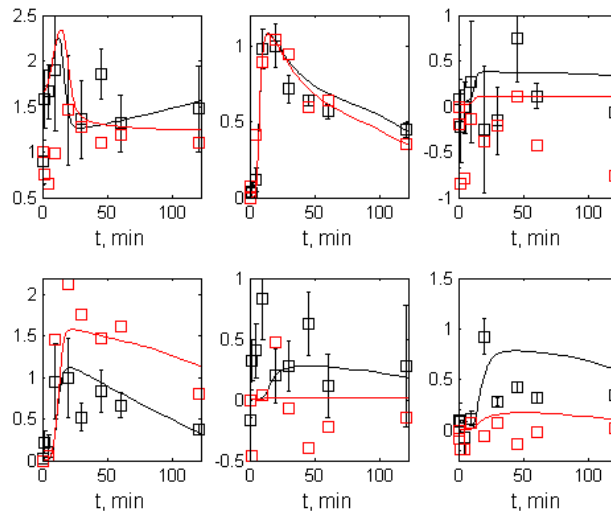


Рис. 6-1. Результаты компьютерных расчетов кинетики фосфорилирования основных белков в Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путях при их активации сигнального пути HRG (черные линии) и при действии рапамицина (красные линии) для PE04 клеток.

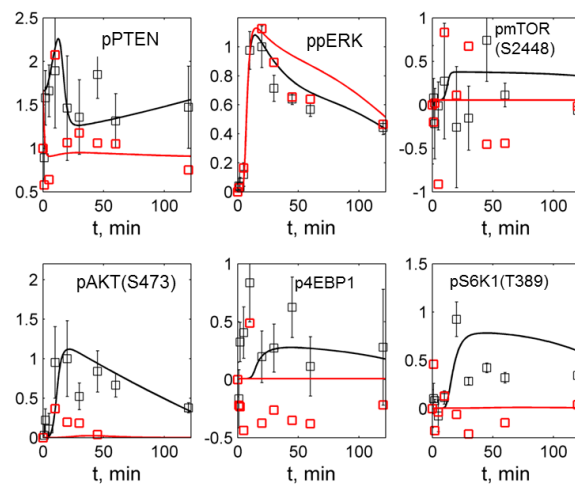


Рис. 6-2. Результаты компьютерных расчетов кинетики фосфорилирования основных белков в Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путях при их активации сигнального пути HRG (черные линии) и при действии ингибитора LY294002 (красные линии) для PE04 клеток.

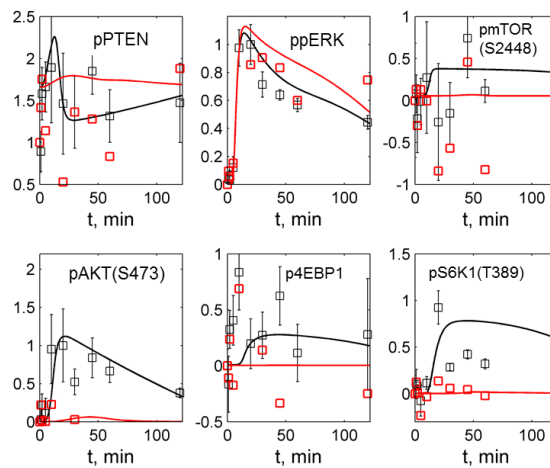


Рис. 6-3. Результаты компьютерных расчетов кинетики фосфорилирования основных белков в Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путях при их активации сигнального пути HRG (черные линии) и при действии ингибитор BEZ235 (красные линии) для PE04 клеток.

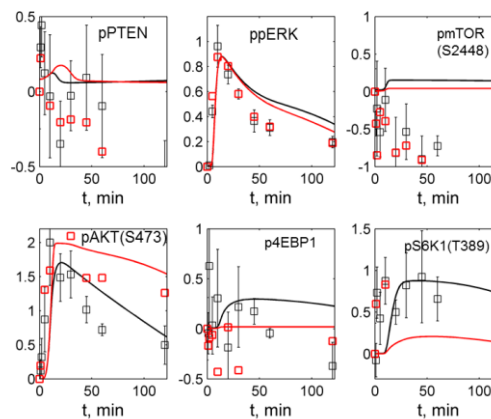


Рис. 6-4. Результаты компьютерных расчетов кинетики фосфорилирования основных белков в Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путях при их активации сигнального пути HRG (черные линии) и при действии рапамицина (красные линии) для A2780 клеток.

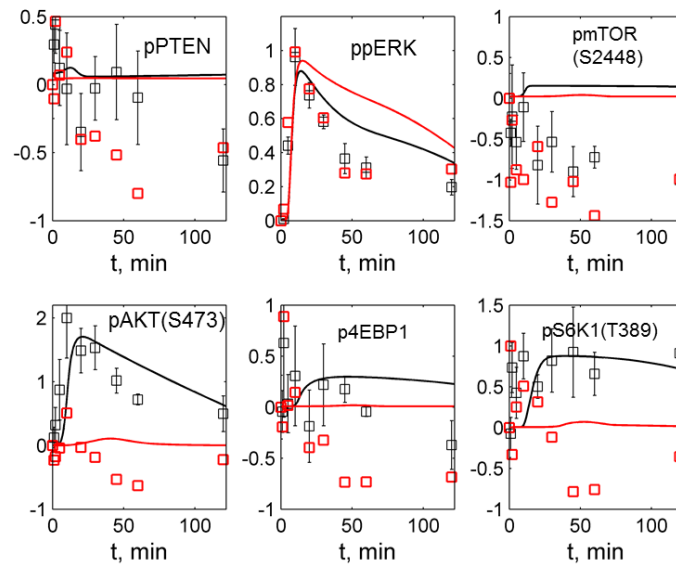


Рис. 6-5. Результаты компьютерных расчетов кинетики фосфорилирования основных белков в Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путях при их активации сигнального пути HRG (черные линии) и при действии LY294002 (красные линии) для A2780 клеток.

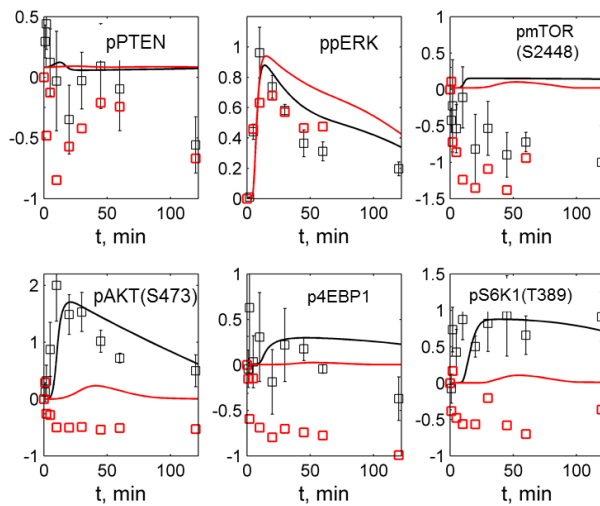


Рис. 6-6. Результаты компьютерных расчетов кинетики фосфорилирования основных белков в Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путях при их активации сигнального пути HRG (черные линии) и при действии BEZ235 (красные линии) для A2780 клеток.

рецепторов и деградации, что вызывает ослабление сигнала в PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальном пути и образование петли OCC pS6K1-IRS1-PI3K (Рис. 1-1).

Результаты расчетов активации Ras/Raf/ERK и PI3K/AKT/mTOR/S6K1 сигнальных путей и действия рапамицина на основные сигнальные белки в PE04 и A2780 клетках показали, что активации pAKT в A2780 клетках более чем в 1.5 раза превышает активность pAKT в клетках PE04. Это связано с частичной потерей активности фосфатазы PTEN при мутации гена *PTEN* в A2780 клетках, что ведет к повышению концентрации pAKT за счет аккумуляции PIP3 в этих клетках.

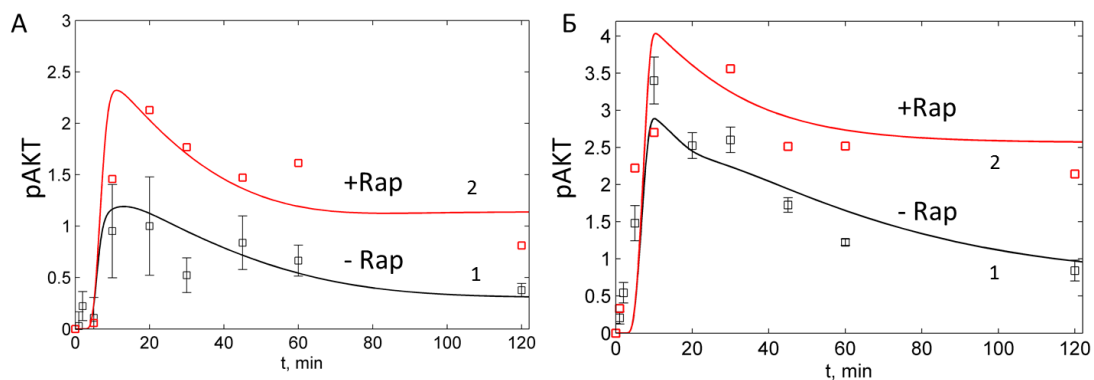


Рис. 6-7. Возрастание pAKT сигнала при действии ингибитора mTOR1 киназы, рапамицина (Rap) в PE04 (А) и A2780 (Б) раковых клетках яичников. Линии 1 и 2 соответствуют расчетам в отсутствии и присутствии рапамицина, соответственно. Точки – экспериментальные данные, полученные при активации PE04 и A2780 клеток 1 нМ HRG и при ингибировании 200 нМ рапамицина.

Анализ результатов расчетов также показал, что ингибирование mTOR1 комплекса рапамицином приводит к существенному ингибированию двух основных его субстратов S6K1 и 4EBP1, приводящему к подавлению трансляции белков в раковых клетках PE04 и A2780. Вместе с тем обнаружено, что

рапамицин оказывает активирующее действие на pAKT сигнал (Рис. 6-7). Этот эффект связан с подавлением отрицательных обратных связей ppS6K1-mTOR2-AKT и ppS6K1-IRS1-PI3K в результате ингибирования pS6K1 сигнала. Подавление ООС ведет к дополнительной активности PI3K за счет уменьшения степени ингибирования mTOR2 комплекса, фосфорилирующего AKT(Ser437) и возросшей активности IRS1. В итоге это вызывает существенное повышение уровня pAKT при действии рапамицина.

Результаты расчетов действия ингибитора PI3K, LY294002 ($K_d=0.6$ мкМ), показали, что ингибирование PI3K приводит к подавлению активности основных сигнальных белков: AKT, mTOR1, S6K1, 4EBP1 и PTEN. В теоретических расчетах также установлено, что LY294002 не оказывает ингибирующего действия на RAS/RAF/ERK сигнальный путь в PE04 и A2780 клетках. Это указывает на отсутствие активационного взаимодействия между PI3K киназой и RAS/RAF/ERK путем, которое наблюдается в ряде опухолевых клеток при ингибировании pERK сигнала в результате действия ингибитора PI3K.

В работе также исследовано действие АТР-конкурентного комбинированного ингибитора PI3K и mTOR1,2 киназ, BEZ-235, в PE04 и A2780 клетках. Как показали расчеты, действие BEZ-235 соединяет в себе основные свойства ингибиторов mTOR1 и PI3K. BEZ-235 оказывает существенное ингибирующее действие на основные субстраты mTOR1 комплекса: S6K1 и 4EBP1. При его действии не происходит дополнительной активации AKT сигнала, механизмы которой обсуждались выше. Ингибирование PI3K ($K_d=1.6$ нМ) и комплекса mTOR2 ($K_d=0.56$ нМ) при действии BEZ-235 предотвращает активацию AKT и приводит к эффективному подавлению pAKT сигнала.

С целью исследования корреляции между ингибирующим действием лекарственных препаратов на сигнальные пути и рост клеточных популяций раковых клеток был проведен анализ экспериментальных данных по ингибированию роста PE04 и A2780 клеток (Рис. 6-8А). Согласно результатам

анализа экспериментальных данных полученных коллабораторами проекта в Центре Исследования Рака Эдинбургского Университета, клетки A2780 обладают более высокой скоростью роста по сравнению с PE04 клетками (0.79 1/сут. и 0.27 1/сут). Это связано с частичной потерей активности *PTEN* гена в A2780 клетках, что приводит к повышенной активности АКТ, S6K1 и 4E-BP1 киназ, которые подавляют апоптоз клеток и активируют трансляции многих белков, повышая тем самым скорость пролиферацию клеток. Для оценки влияния данных лекарств на скорость роста PE04 и A2780 клеток были проведены расчеты относительного изменения скорости роста клеток $\delta = (\mu_0 - \mu_D)/\mu_0$, где μ_0 и μ_D - скорости роста клеток в отсутствии и присутствии ЛП. Расчеты показали, что относительное изменение рост клеток δ при действии данных лекарства на PE04 и A2780 клетки различаются несущественно (Рис. 18Б). Анализ экспериментальных результатов также показал, что ингибитор двойного действия BEZ-235 оказывает наибольший ингибирующий эффект на рост как PE04, так и A2780 клеток по сравнению с другими рассмотренными ингибиторами.

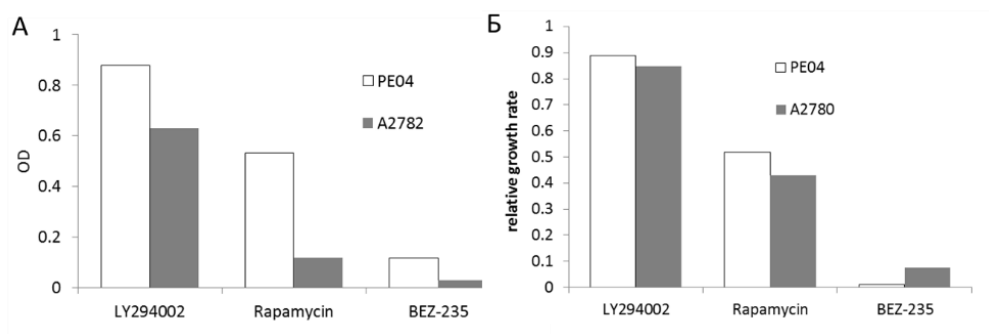


Рис. 6-8. Экспериментальные результаты по ингибированию количества клеток (А) и относительного изменения скорости роста δ (Б) в популяции PE04 и A2780 опухолевых клеток при действии ЛП, рапамицина, LY294002 и BEZ235.

Учитывая высокую степень резистентности многих линий раковых клеток к рапамицину в работе анализируются предложенные в клинических исследованиях биомаркеры чувствительности к рапамицину, такие как дополнительная активация АКТ при его действии и мутации *PTEN* гена. Исходя из полученных экспериментальных данных (Рис. 18) можно заключить, что, хотя A2780 клетки с *PTEN* мутацией проявляют повышенную чувствительность к рапамицину (90% ингибирование роста клеточной популяции) по сравнению с PE04 клетками (30%), относительная степень ингибирования скорости роста, μ , в этих клеточных линиях почти одинакова (50% и 57% для PE04 и A2780 клеток, соответственно). Также показано, что дополнительная активация АКТ при полной делеции *PTEN* гена не может служить биомаркером эффективности рапамицина, т.к. указанная активация исчезает при полной потере активности *PTEN*.

Также в работе проанализировано влияние ингибирования различных сигнальных белков на подавлении роста раковых клеток. Учитывая, что mTOR1 ингибитор, рапамицин, приводит не к ингибированию, а к дополнительной активации pAKT сигнала в PE04 и A2780 клетках, в работе делается вывод, что основным механизмом ингибирования роста популяций PE04 и A2780 опухолевых клеток является подавление активации субстратов mTOR1, S6K1 и 4E-BP1 киназ, которые регулируют процессы трансляции многих белков, обеспечивающих пролиферацию клеток. Ингибитор двойного действия BEZ-235 оказывает наибольший ингибирующий эффект за счет ингибирования S6K1 и 4E-BP1 киназ и подавления дополнительной активации АКТ в результате ослабления обратной связи в сигнальном пути.

Глава 7. Влияние лекарственных препаратов на регуляцию антиокислительной системы в раковых клетках

В данной главе приводятся результаты моделирования клеточной системы регуляции антиокислительного ответа клетки при действии ингибиторов клеточных рецепторов. Цель работы заключалась в исследовании влияния ингибирования выходных сигналов pAKT и pERK на антиокислительную систему (АОС) клетки, которая находится под контролем фактора транскрипции NRF2. В рамках разработанной модели учтено, что в возрастание pERK сигнала приводит к увеличению экспрессии NRF2 за счет фосфорилирования фактора транскрипции киназой pERK (см. описание четвертой главы). Возрастание pAKT сигнала, в свою очередь, приводит к ингибированию деградации NRF2 за счет инактивации киназы GSK3 β при ее фосфорилировании киназой pAKT (см. главу 2). При ингибировании pAKT и pERK сигналов в результате действия ингибиторов рецепторов происходит понижение уровня NRF2 и, как следствие, снижение активности антиокислительной системы клетки, приводящее к возрастанию концентрации активного кислорода и перекиси водорода H₂O₂ в клетке. С целью исследования механизма регуляции АО ответа раковых клеток на действие рецепторных ингибиторов была разработана модель NRF2 сигнальной системы, контролирующей АО ответ в клеточных линиях рака яичников.

Развитая модель включает в себя 3 системы: сенсорную, генетическую и ферментативную антиокислительную системы, которые связаны между собой петлей отрицательной связи регуляции (Рис. 7-1). Сенсорная система включает в формирование комплекса NRF2-KEAP1, окисление KEAP1 в результате действия H₂O₂ и, приводящее к деградации NRF2. Генетическая система регуляции включает диффузию NRF2 в ядро клетки, формирование активационного и репрессорного факторов транскрипции в результате формирования комплексов NRF2-MAF и MAF-MAF, их связывание с ARE

сайтами DNA, активация и репрессия экспрессии NRF2-зависимых ферментов АОС. В модели антиокислительная система клетки включает следующие белки, регулирующие окислительно-восстановительного потенциала клетки: тиоредоксин пероксидазу, тиоредоксин, тиоредоксин редуктаза, глутатион пероксидазу, глутатион и глутатион редуктаза. Отрицательная обратная связь формируется за счет восстановления окисленного белка KEAP1 ферментами

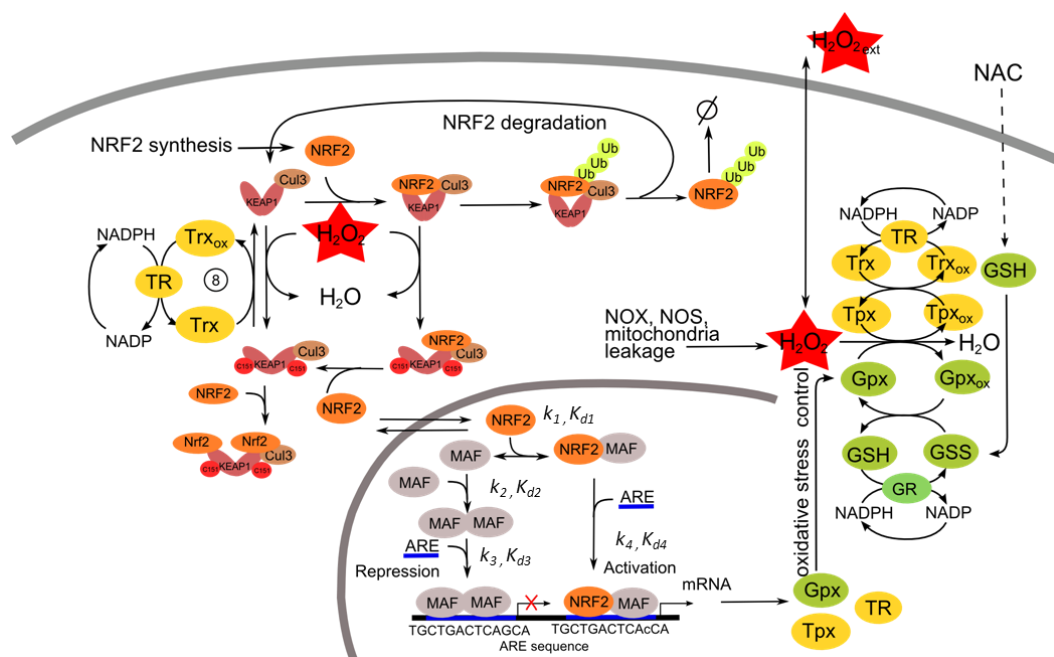


Рис. 7-1. Схема модели NRF2- KEAP-сигнальной системы, контролирующей окислительно-восстановительного баланс клетки.

АОС, приводящего к диссоциации комплекса NRF2-KEAP1 и накоплению NRF2 в цитоплазме. Полная модель NRF2- KEAP-сигнальной системы приведена в Приложении 3.

Развитая модель была применена к описанию функционирования NRF2-зависимой сигнальной системы в следующих раковых клетках яичников OVCAR3, OVCAR4, PEO1, PEO4, PEO6 и SKOV3 с различным уровнем экспрессии NRF2 и KEAP1 белков [5]. Экспериментальные работы по проверке теоретических расчетов были проведены коллаборатором проекта в Абертей

Университете. Результаты моделирования сенсорной NRF2-KEAP1 системы приведены на Рис. 7-2А, где показано деградация NRF2 в результате окисления KEAP1 в 7 клеточных линиях при отсутствии генетической регуляции при действии СНХ. Результаты моделирования антиоксидантной системы клетки приведены на Рис. 7-2Б, где показана кинетика деградации H_2O_2 ферментами АОС. Видно, начальной стадии деградации H_2O_2 сопровождается увеличением экспрессии тиоредоксин пероксидазы (Px_{tot}) и ее окислением (Px_{ox}). Модель антиоксидантной системы раковых клеток была опубликована в работах [3, 8, 9] из списка публикаций по теме диссертации.

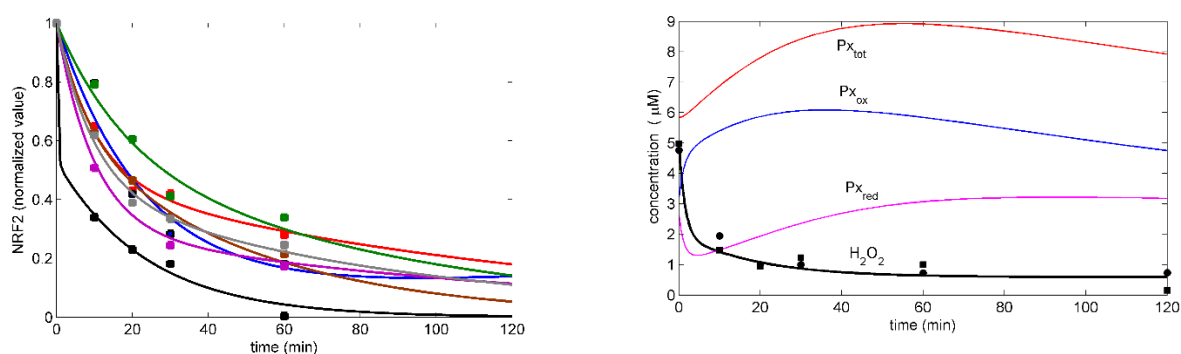


Рис. 7-2. (А) Функционирование сенсорной NRF2-KEAP1 системы: деградация NRF2 в результате окисления комплекса NRF2-KEAP1 при действии эндоклеточной H_2O_2 для клеточных линий с различным соотношением NRF2/KEAP1: HaCaT (—), PEO1 (—), SKOV3 (—), PEO6 (—), OVCA3 (—), PEO4 (—), OVCA4 (—). Точки – соответствующие экспериментальные данные. (Б) Функционирование антиоксидантной системы: кинетика деградация экзоклеточной H_2O_2 (черная линия), восстановленной Px_{red} (фиолетовая линия), окисленного фермента Px_{ox} (синяя линия) пероксидазы при добавлении в систему 5 μM H_2O_2 в нулевой момент времени. Точки – экспериментальные данные для HaCaT (■) и OVCA3 (●) клеток.

Для учета генетической регуляции развита кинетическая модель экспрессию NRF2-зависимых белков АОС. Модель включает следующие ОДУ,

описывающие кинетику формирования активационного NRF2-MAF факторов транскрипции за счет образования комплекса NRF2 с белком MAF и репрессорного факторов транскрипции MAF-MAF, а также их связывание с ARE сайтом DNA, NRF2-MAF-ARE и MAF-MAF-ARE:

$$\frac{dMAF_MAF}{dt} = k_1(MAF \cdot MAF - K_{d1}MAF_MAF)$$

$$\frac{dNRF2_MAF}{dt} = k_2(MAF \cdot NRF2 - K_{d2}NRF2_MAF)$$

$$\frac{dNRF2_MAF_ARE}{dt} = k_3(NRF2_MAF \cdot ARE - K_{d2} \cdot NRF2_MAF_ARE)$$

$$\frac{dMAF_MAF_ARE}{dt} = k_4(MAF_MAF \cdot ARE - K_{d2} \cdot MAF_MAF_ARE)$$

Расчеты были выполнены с экспериментальными значениями констант скоростей реакций k_i и констант диссоциации K_{i2} для активационного и репрессорного комплексов и их связывания с промотерными сайтами (Yamamoto et al., 2006). Расчеты показали, что при возрастании концентрации NRF2 в ядре клетки в результате повышения уровня H_2O_2 нарушается баланс между активационным и репрессорным комплексами факторов транскрипции, что приводит к увеличению экспрессии ферментов антиоксидантной системы клетки (Рис. 7-3).

На основе разработанной модели была рассчитана регуляторная характеристика NRF2-KEAP1 сигнальной системы: зависимость NRF2 от внутриклеточного уровня H_2O_2 . При низких концентрациях H_2O_2 деградации NRF2 в комплексе NRF2-KEAP1 приводит к низкому уровню NRF2. При возрастании внутриклеточного концентрации H_2O_2 регуляторная кривая имеет гистерезисный характер, что соответствует функционированию сенсорной и регуляторной систем. В этой области концентраций H_2O_2 в клетке происходит накопление фактора транскрипции NRF2, формирование в ядре активационного комплекса NRF2-MAF и инициация транскрипции ферментов АОС клетки. Механизм регуляции отключается при достижении максимальной концентрации NRF2, обеспечивающий максимальный синтез ферментов антиоксидантной

системы клетки. Дальнейшее увеличение внутриклеточного уровня H_2O_2 не вызывает АО ответа клетки, что приводит к окислительному стрессу.

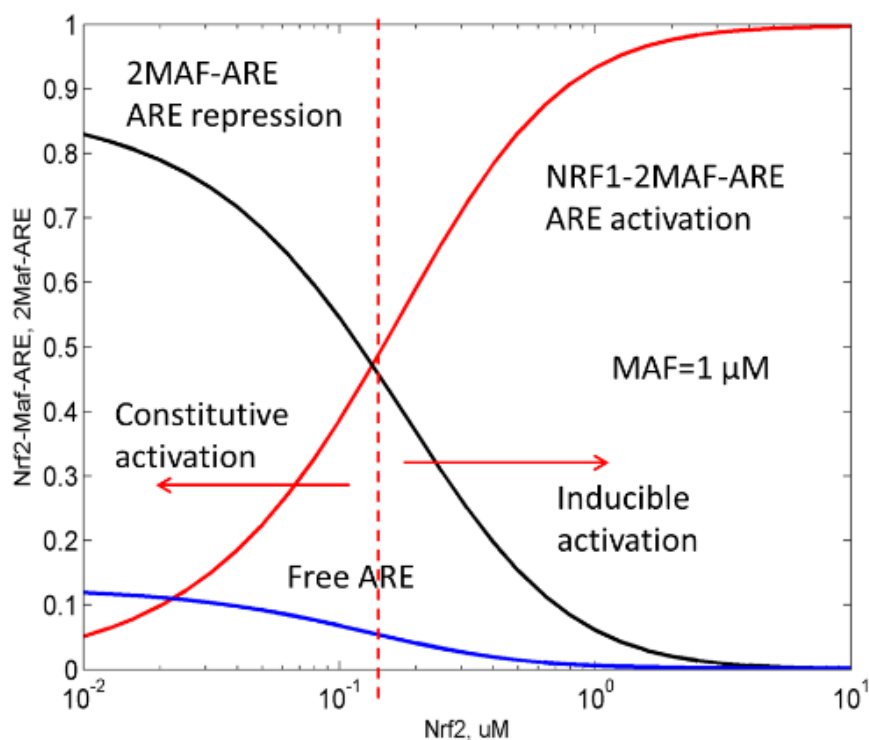


Рис. 7-3. Функционирование генетической подсистемы регуляции NRF2 сигнальной системы: зависимость концентрации активаторного NRF2-MAF (—) и репрессорного MAF-MAF (—) комплексов с ARE сайтами DNA.

Приведенные данные для H_2O_2 концентрации для ряда клеточных линий рака яичников на Рис. 7-4 показывают, что многие раковые клетки находятся вне области регуляции NRF2 АО системы (PE01, PE06 и SKOV3). Это предполагает, что многие раковые клетки находятся под окислительным стрессом. Данные результаты моделирования был проверены в экспериментах по индуцированию окислительного стресса в раковых клетках и результаты опубликованы в работах [3,8,9] из списка публикаций по теме диссертации.

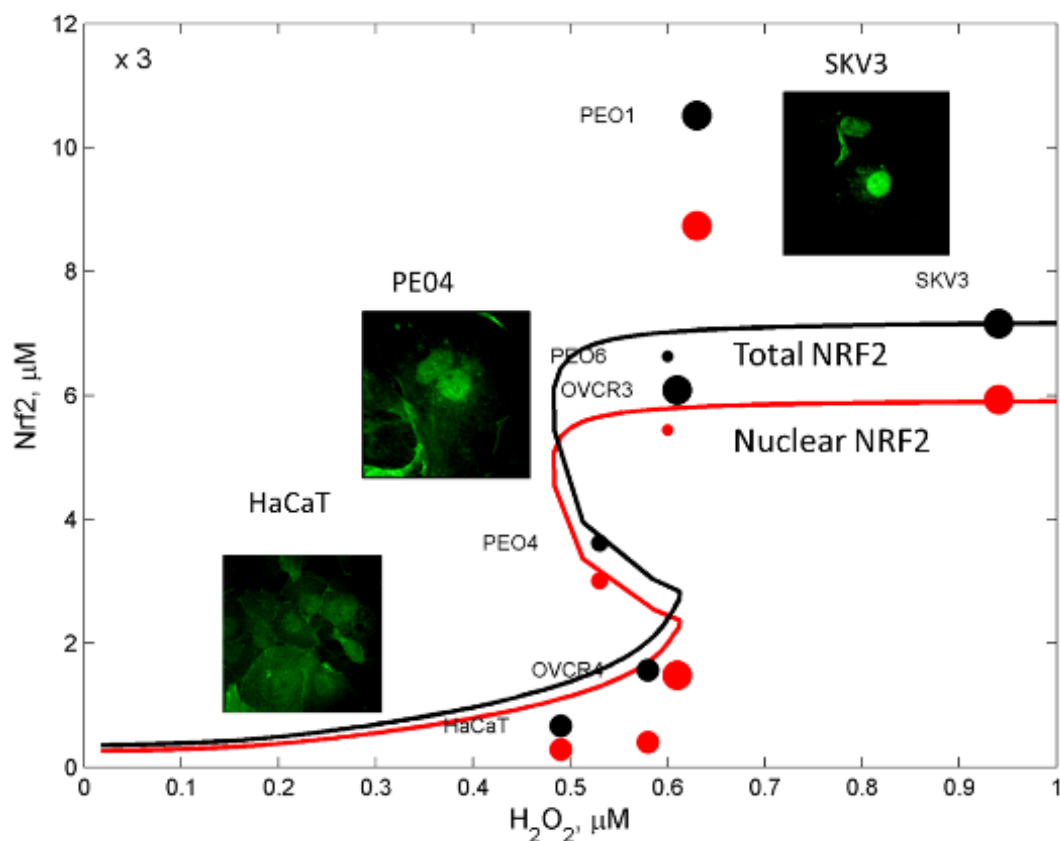


Рис. 7-4. Регуляторная кривая NRF2 сигнальной системы: зависимость концентрации NRF2 в клетке (—) и ядре (—) от внутриклеточного уровня H₂O₂. Точки – экспериментальные данные для 7 клеточных линий рака яичников. Величина экспериментальных точек пропорциональна клеточного скорости роста. На вставках приведены снимки клеток NRF2 иммунофлуоресцентным методом.

Полученные результаты также по были проверены в экспериментах по измерению H₂O₂ концентрации в клеточных линиях рака яичников при действии ингибиторов EgrB2 рецепторов. Результаты работы опубликованы в работе [5] из списка публикаций по теме диссертации. В экспериментах было обнаружено увеличение уровня H₂O₂ при активации клеток HRG, а также при действии пертузумаба, трастузумаба (TR) и их комбинации на клеточные линии рака яичников PEO4, OVCAR4, SKOV3 (Рис. 7-5А,В). Также в экспериментах было

показано уменьшение концентрации фактора транскрипции NRF2 и основных антиокислительных ферментов, экспрессия которых находится под управлением NRF2.

Таким образом, на основе совместного моделирования PI3K сигнальной системы и NRF2-зависимой антиокислительной системы клетки установлено, что действие лекарственных препаратов, ингибиторов ErbB3/ErbB2 рецепторов, приводит к окислительному стрессу, что может являться дополнительным фактором ингибирующего действия указанных лекарственных препаратов.

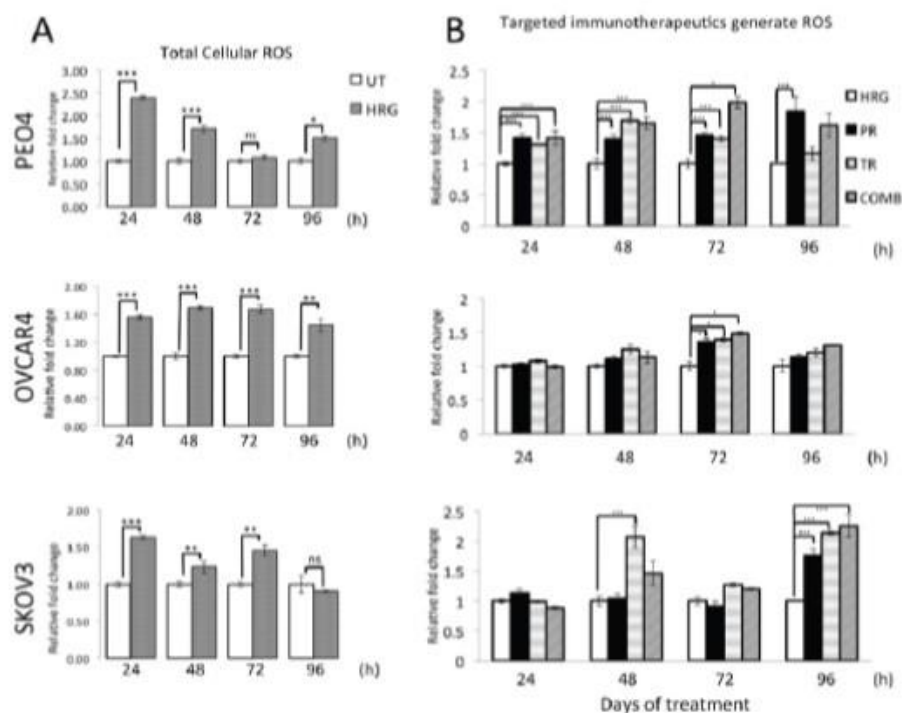


Рис. 7-5. Экспериментальные измерения концентрации H_2O_2 в клеточных линиях рака яичников PEO4, OVCAR4, SKOV3 при активации клеток HRG (A) и действии пертузумаба (PR), трастузумаба (TR) и их комбинации (COMB). Измерения проведены на 1,2,3 и 4 сутки после добавления лекарственных препаратов.

Заключение

На основе развитого метода компьютерного моделирования действия лекарственных препаратов онкотерапии на сигнальные пути клеточной пролиферации в работе получены следующие результаты:

1. Разработаны методы моделирования сложных сигнальных систем клеточной пролиферации, позволяющие анализировать изменения динамических режимов функционирования системы в зависимости от онкомутаций в раковых клетках, а также исследовать эффективность действия лекарственных препаратов, направленных на ингибирование сигналов, управляющих ростом опухолевых тканей.
2. Развита кинетическая модель активации ERK и PI3K сигнальных путей пролиферации в раковых клетках на основе детального описания функционирования отдельных сигнальных белков, учета регуляторных свойств сигнальной системы и большого набора экспериментальных данных, полученных на популяциях раковых клеток. Применение модели для тестирования действия лекарственных препаратов показало эффективность нового лекарственного препарата, ингибитора ErbB2 и ErbB3 рецепторов (пертузумаба) для подавления активации PI3K сигнального пути в линиях опухолевых клеток яичников. В результате моделирования определен молекулярный биомаркер эффективного действия лекарственных препаратов: соотношение экспрессии рецепторов ErbB3/ErbB2.
3. На основе анализа выходных характеристик сигнальной системы определен управляющий параметр системы, характеризующий соотношение активностей трех сигнальных белков $\gamma = PTEN/PI3K/АКТ$. Показано, что введенный параметр управления является биомаркером, определяющим эффективность ингибиторов ErbB3/ErbB2 рецепторов при онкомутациях в PI3K сигнальной системе. Разработанный биомаркер подтвержден в

экспериментах на клеточных линиях опухоли яичников и в клинических исследованиях на группе онкологических пациентах с мутациями *PTEN* гена.

4. На основе анализа динамических режимов функционирования сигнальной системы предложена концепция перехода «чувствительность-резистентность», который имеет место в системе при изменении управляющего параметра γ и ведет к потере чувствительности системы по отношению к входному сигналу и ингибированию рецепторных сигналов. Установлено, что возникающая при этом лекарственная резистентность обусловлена активацией компенсаторных механизмов в сигнальных системах клетки при мутациях генов *PTEN*, *PIK3CA* и *AKT*. Предложен метод подавления резистентности путем реализации обратного перехода «чувствительность-резистентность» в результате комбинации двух лекарственных препаратов, действующих на разные модули сигнальной системы.
5. Разработан метод модификации функции отклика сигнальной системы путем изменения параметра управления системы γ , что позволило разработать метод комбинированного действия двух лекарственных препаратов для подавления резистентности к ингибиторам клеточных рецепторов при различных онкомутациях. Показано, что ингибирование киназы PI3K в комбинации с ингибитором клеточных рецепторов восстанавливает чувствительность PI3K сигнальной системе к действию ингибиторов ErbB3/ErbB2 рецепторов при онкомутациях генов *PTEN*, *PIK3CA* и *AKT*. Эффективность комбинации ингибиторов ErbB3/ErbB2 рецепторов и PI3K киназы подтверждена в экспериментах на клеточных популяциях опухоли яичников.
6. Развита методика, позволяющая учитывать генетическую регуляцию в кинетических моделях сигнальных систем на основе биоинформационного анализа экспериментальных данных по изменению экспрессии генов при активации сигнальных систем и действии лекарственных препаратов.

Установлен механизм возникновения осцилляторного режима в связанной ERK, АКТ сигнальной системе за счет отрицательной обратной связи в ERK системе при нарушении генетической регуляцией. Предсказанный в модели осцилляторный режим подтвержден в экспериментах по наблюдению осцилляций в популяции раковых клеток.

7. Разработан метод тестирования лекарственных препаратов, ингибиторов протеин-киназ в PI3K сигнальном пути: ингибитора mTOR1 комплекса (рапамицин), ингибитора киназы PI3K и ингибитора двойного действия BEZ-235 для линий клеток опухолей яичников с онкомутациями в сигнальных системах. Установлено, что действие рапамицина приводит к эффективному ингибированию выходного сигнала системы (pS6K1), но вызывает активацию промежуточного АКТ сигнала в результате подавления отрицательных обратных связей в PI3K сигнальном пути. Показано, что в исследуемых раковых клетках активации АКТ является биомаркером эффективного действия рапамицина.
8. Установлено, что для анализа длительного действия лекарственных препаратов, ингибиторов клеточных рецепторов, необходимо учитывать модификацию (репрограммирование) сигнальных систем в результате активации компенсаторных сигнальных путей клеточной пролиферации при изменении экспрессии генов, вызванных действием лекарственных препаратов. Предложена комбинированная терапия для подавления резистентности системы, возникающей при активации компенсаторных механизмов клетки в результате репрограммирования сигнальных путей.
9. На основе совместного моделирования PI3K сигнальной системы и NRF2-зависимой антиокислительной системы клетки установлено, что действие лекарственных препаратов, ингибиторов ErbB3/ErbB2 рецепторов, приводит к окислительному стрессу, что является дополнительным фактором ингибирующего действия указанных ЛП.

Приложение 1. Характеристики лекарственных препаратов

Зависимость значения IC_{50} от АТФ концентрации для лекарственного препарата BEZ235

Перепишем уравнение скорости реакции 4EBP1 фосфорилирования mTOR киназой в присутствии АТФ-конкурентного ингибитора BEZ235

$$V_{4EBP1} = \frac{k_{4EBP1} \cdot mTOR1 \cdot 4EBP1 \cdot ATP}{K_{d,4EBP1} \cdot K_{d,ATP} \cdot \Delta_{mTOR}}, \quad (S1)$$

где

$$\Delta_{mTOR} = \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} + \frac{BEZ}{K_{d,BEZ}}\right) \left(1 + \frac{4EBP1}{K_{d,4EBP1}}\right).$$

В соответствии с определением значение IC_{50} может быть найдено из уравнения

$$\frac{V_{4EBP1}(BEZ = IC_{50})}{V_{4EBP1}(BEZ = 0)} = \frac{1}{2}, \quad (S2)$$

где $V_{4EBP1}(BEZ = IC_{50})$ и $V_{4EBP1}(BEZ = 0)$ – скорости реакции V_{4EBP1} в отсутствии ингибитора BEZ235 и при его концентрации равной значению IC_{50} . Подставляя V_{4EBP1} (S1) в уравнение (S2) получаем

$$\frac{\Delta_{mTOR}(BEZ = 0)}{\Delta_{mTOR}(BEZ = IC_{50})} = 2$$

или

$$\frac{\left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} + \frac{IC_{50}}{K_{d,BEZ}}\right)}{\left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}}\right)} = 2.$$

Окончательно получаем уравнение

$$IC_{50} = K_{d,BEZ} \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}}\right).$$

Соотношение между величиной IC_{50} и константой диссоциации для рапамицина.

Для вывода соотношения

$$IC_{50} = K_{d,Rap},$$

используем следующее соотношение для величины IC_{50}

$$V_{4EBP1}(Rap = IC_{50}) = \frac{1}{2}(V_{max,4EBP1} + V_{min,4EBP1}), \quad (S3)$$

где $V_{max,4EBP1}$ и $V_{min,4EBP1}$ – аскорости реакции V_{4EBP1} в отсутствии рапамицина и при его высоких концентрациях ($\gg K_{d,Rap2}$), соответственно.

Подстановка ур. (S1) в ур. (S3) дает

$$\frac{1 + \eta_{4EBP1} \frac{IC_{50}}{K_{d,Rap}}}{1 + \frac{IC_{50}}{K_{d,Rap}}} = \frac{1}{2}(1 + \eta_{4EBP1}), \quad (S4)$$

где константа диссоциации $K_{d,Rap}$ равна либо $K_{d,Rap1}$, либо $K_{d,Rap2}$ в зависимости от присутствия или отсутствия белка FKBP12. Ур. (S4) может быть преобразована к виду

$$\left(1 - \frac{IC_{50}}{K_{d,Rap}}\right)(\eta_{4EBP1} - 1) = 0,$$

что окончательно дает искомое соотношение

$$IC_{50} = K_{d,Rap}.$$

Зависимость величины IC_{50} для АТР-конкурентного ингибитора от АТР концентрации для PI3K киназы.

Вместо решения для кинетики ADP

$$\frac{dADP}{dt} = V_{PI3K}$$

решается уравнение для кинетики АТР

$$\frac{dATP}{dt} = -V_{PI3K}, \quad (S5)$$

где V_{PI3K} – скорость реакции для PI3K

$$V_{PI3K} = \frac{k_{PI3K} \cdot PI3K \cdot PIP2 \cdot ATP}{K_{d,PIP2} \cdot K_{d,ATP} \cdot \Delta_{PI3K}}$$

и

$$\Delta_{PI3K} = \left(1 + \frac{PIP2}{K_{d,PIP2}}\right) \left(1 + \frac{ATP}{K_{d,ATP}} + \frac{LY}{K_{d,LY}} + \frac{BEZ}{K_{d,BEZ}}\right).$$

Перепишем уравнение для скорости реакции V_{PI3K} в следующей форме

$$V_{PI3K} = \frac{A \cdot ATP}{\alpha \cdot ATP + \beta \left(1 + \frac{I}{K_{d,i}}\right)},$$

где I – концентрация ингибитора либо LY293002, либо BEZ235,

$$A = \frac{k_{PI3K} \cdot PI3K \cdot PIP2}{K_{d,PIP2} \cdot K_{d,ATP}},$$

$$\alpha = \frac{\beta}{K_{d,ATP}},$$

$$\beta = \left(1 + \frac{PIP2}{K_{d,PIP2}}\right).$$

Здесь $K_{d,i}$ – константа диссоциации ингибитора либо LY293002, либо BEZ235.

Интегрирование ур. (S5) производится от времени начала реакции $t=0$ до конечного времени $t=t_m$, когда реакция была остановлена в эксперименте и концентрация ADP была измерена $ADP(t_m, I) = ATP_0 - ATP(t_m, I)$. Тогда решение ур. (S5) имеет вид

$$\alpha(ATP - ATP_0) = -\beta \left(1 + \frac{I}{K_{d,i}} \right) \ln \left(\frac{ATP}{ATP_0} \right) - At_m. \quad (S6)$$

Также можно записать решение $ATP_{I0} = ATP(t_m, I = 0)$ в отсутствии ингибитора ($I=0$).

$$\alpha(ATP_{I0} - ATP_0) = -\beta \ln \left(\frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right) - At_m. \quad (S7)$$

При концентрации ингибитора равной величине IC_{50} , $I=IC_{50}$, отношение левых частей уравнений (S6) и (S7) равно

$$\frac{ATP - ATP_0}{ATP_{I0} - ATP_0} = \frac{ADP}{ADP_{I0}} = \frac{1}{2}. \quad (S8)$$

Тогда результат деления ур. (S6) на ур. (S7) можно записать в следующей форме

$$\frac{1}{2} = \frac{\beta \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_{d,i}} \right) \ln \left(\frac{ATP}{ATP_0} \right) + At_m}{\beta \ln \left(\frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right) + At_m}.$$

Это уравнение дает следующее выражение для зависимости величины IC_{50} от начальной концентрации ATP_0

$$IC_{50} = K_{d,i} \left(\frac{\ln \left(\frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right) - B t_m}{2 \ln \left(\frac{ATP}{ATP_0} \right)} - 1 \right), \quad (S9)$$

где $B = \frac{A}{\beta}$, $ATP = ATP(t_m, I = IC_{50})$, and $ATP_{I0} = ATP(t_m, I = 0)$.

Выражая отношение $\frac{ATP}{ATP_0}$ через отношение $\frac{ATP_{I0}}{ATP_0}$, используя ур. (S8) при концентрации ингибитора равной величине его IC_{50} , можно получить

$$\frac{ATP}{ATP_0} = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right).$$

Подставляя полученное выражение в ур. (S9), получаем окончательно зависимость величины IC_{50} от начальной концентрации ATP_0

$$IC_{50} = K_{d,i} \left(\frac{\ln \left(\frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right) - Bt_m}{2 \ln \left(\frac{1}{2} \left(1 + \frac{ATP_{I0}}{ATP_0} \right) \right)} - 1 \right).$$

Это уравнение позволяет рассчитывать значение IC_{50} , используя только измерения концентраций АТР(АДР) в момент времени $t=t_m$ при отсутствии ингибитора ATP_{I0} .

Оценка доверительных интервалов кинетических параметров ферментов методом бутстрепинга

Стандартные ошибки и доверительные интервалы кинетических параметров, полученные при фиттировании экспериментальных данных, были оценены методом бутстрепинга (Draper & Smith, 2014; Efron & Tibshirani, 1994). В методе бутстрепинга использована процедура ресамлинга для n остатков

$$\mathbf{e} = \mathbf{Y}_{exp} - \mathbf{Y}_{mod},$$

где $\mathbf{Y}_{exp}$ и $\mathbf{Y}_{mod}$ – вектора экспериментальных данных и теоретических значений, полученных в результате наилучшего описания экспериментальных данных; $\mathbf{e}$ – вектор остатков размерности N , равной числу экспериментальных точек. Процедура ресамплинга состоит в построении бутстреп-векторов остатков $\mathbf{e}_i^*$, где каждый элемент выбирается из элементов вектора остатков $\mathbf{e}$ с вероятностью $1/n$. На следующем шаге процедуры модель фиттируется по набору точек, полученному при процедуре бутстрепинга:

$$\mathbf{Y}_{exp,i}^* = \mathbf{Y}_{exp} + \mathbf{e}_i^*$$

В результате фиттинга определяются M наборов для оценки кинетических параметров k_i .

В качестве оценки кинетических параметров k_l были использованы медианы M бутстреп-наборов оценок параметра k_l , полученных в процедуре фиттинга. В качестве доверительного интервала были рассчитаны процентильный доверительный интервал ($k_{l,low}$; $k_{l,up}$, где $k_{l,low}$ и $k_{l,up}$ – 2.5 и 97.5 проценты для распределения параметра k_l , полученного в процедуре бутстрепинга (Efron & Tibshirani, 1994). Также были рассчитаны средние значения $\bar{k}_l$ на основе M бутстреп-наборов и 95% доверительный интервал ($\bar{k}_l - 1.96 \cdot SE_l$; $\bar{k}_l + 1.96 \cdot SE_l$), где SE_l – оценка стандартной ошибки среднего значения кинетического параметра $\bar{k}_l$, полученного в процедуре бутстрепинга

$$SE_l = \left(\sum_{i=1}^M (k_{il} - \bar{k}_l)^2 / (M - 1) \right)^{1/2}.$$

Приложение 2. Биоинформационный анализ экспрессии генов

Таблица П2-1. Результаты анализа экспрессии генов при активации клеток HRG. Приведены гены со статистически значимым изменением экспрессии относительно контроля ($p < 0.05$)

ILMN_GENE	PROBE_ID	Fold Change	t-test
CTGF	ILMN_2115125	19.86	1.3E-07
FOS*	ILMN_1669523	18.10	3.8E-05
CTGF	ILMN_1699829	17.68	8.1E-06
RASD1	ILMN_1740426	16.67	0.0001
FOSB	ILMN_1751607	12.84	0.004
EGR2	ILMN_1743199	12.66	2.1E-05
CYR61	ILMN_2188264	11.08	1.2E-05
JUN*	ILMN_1806023	6.62	0.0005
KLF2	ILMN_1735930	5.91	0.0003
EGR1	ILMN_1762899	5.75	0.003
ZFP36	ILMN_1720829	4.48	0.0002
JUNB	ILMN_2086077	3.89	3.9E-05
NR4A3	ILMN_1781812	3.73	0.0009
DUSP1*	ILMN_1781285	3.46	1.3E-05
EGR4	ILMN_1764052	2.81	0.01
HS.543887	ILMN_1819384	2.78	0.002
IER2	ILMN_1700584	2.37	1.6E-06
TAGLN	ILMN_1778668	2.35	0.01
EGR3	ILMN_1722781	2.26	0.001
EDN1	ILMN_1682775	2.23	7.1E-06
KLF6	ILMN_1735014	2.21	0.0009
SNF1LK	ILMN_1717639	2.13	0.006
PPP1R15A	ILMN_1659936	2.07	0.002
AXUD1	ILMN_1703123	2.03	0.0009
DUSP5*	ILMN_1656501	2.01	0.013
MYADM	ILMN_2308849	2.00	0.001
DUSP2*	ILMN_1712959	1.97	0.0004
SERTAD1	ILMN_1794017	1.94	0.0002
HS.446286	ILMN_1822004	1.88	0.0009
ATF3	ILMN_2374865	1.84	0.003
IER3	ILMN_1682717	1.82	4.3E-05
NCOA7	ILMN_1687768	1.82	0.0003
FOXC1	ILMN_1738401	1.82	0.03
KLF6	ILMN_1737406	1.80	0.04
SRF	ILMN_1803398	1.73	0.005
RPPH1	ILMN_1704056	1.69	0.0025
C14ORF28	ILMN_1807031	1.62	0.0003
DDIT3	ILMN_1676984	1.56	0.004
TPM1	ILMN_2278152	1.55	0.002
CBX4	ILMN_1724145	1.54	0.005

RND1	ILMN_1651838	1.51	0.00015
TPM1	ILMN_1685339	1.50	0.01
MYC*	ILMN_1680618	1.49	0.006
HS.570343	ILMN_1902251	1.49	0.02
ZFP36L2	ILMN_2150258	1.48	0.04
SLC25A25	ILMN_1791728	1.48	9.9E-05
GDF15	ILMN_2188862	1.46	0.005
FAM46B	ILMN_1808011	1.45	0.02
MSX1	ILMN_1777397	1.40	0.0001
DNAJB1	ILMN_1775304	1.39	0.0003
ILMN_GENE	PROBE_ID	Fold Change	t-test
DCDC5	ILMN_2209671	1.39	0.04
GLTSCR1	ILMN_1782829	1.38	0.02
PUF60	ILMN_1779404	1.38	0.0
SERTAD3	ILMN_1801934	1.37	0.0007
TSKU	ILMN_1801443	1.36	0.01
ZC3H12A	ILMN_1672295	1.36	0.0005
CKS2	ILMN_1756326	1.36	0.01
CCNL1	ILMN_2094776	1.35	0.00
ADM	ILMN_1708934	1.35	0.03
HNRPDL	ILMN_1653432	1.34	0.008
LOC387763	ILMN_1677402	1.34	0.005
SLCO4A1	ILMN_1727200	1.34	0.03
KIAA1754	ILMN_1805192	1.33	0.02
EIF1	ILMN_1803846	1.33	2.6E-05
TSPYL2	ILMN_1657554	1.32	0.04
NARF	ILMN_2334693	1.32	0.02
KLF10	ILMN_2411897	1.31	0.04
IRS2	ILMN_2083469	1.31	0.04
UBXD5	ILMN_2376416	1.31	0.04
YRDC	ILMN_2061732	1.31	0.0001
SLC25A25	ILMN_2327947	1.30	0.04
MEPCE	ILMN_2180827	1.30	0.03
PSD4	ILMN_2154115	1.30	0.04
LOC651816	ILMN_1729115	1.30	0.002
IRF2BP2	ILMN_1671005	1.30	0.04
NFKBIZ	ILMN_1719695	1.30	0.002
PHLDA2	ILMN_1671557	1.29	0.01
QPRT	ILMN_1700268	1.29	0.01
FRS3	ILMN_1772605	1.29	0.02
NOC4L	ILMN_1733107	1.29	0.01
ANKRD37	ILMN_1756417	1.29	0.04
HIC2	ILMN_1652762	1.29	0.005
ATOX1	ILMN_1670609	1.29	0.03
BAX	ILMN_2321064	1.29	0.05
LOC650826	ILMN_1717690	1.28	0.004
AP3S2	ILMN_1731596	1.28	0.01
PHF15	ILMN_1795285	1.28	0.02
TRAF3IP2	ILMN_1701514	1.28	0.04
CNTD2	ILMN_1807525	1.28	0.03
ZYX	ILMN_1701875	1.27	0.01
NFKBIA	ILMN_1773154	1.27	0.04
TMEM93	ILMN_1794560	1.27	0.02

NR4A2*	ILMN_1782305	1.27	0.003
IRX3	ILMN_1811468	1.27	0.03
LOC651380	ILMN_1797025	1.27	0.03
C14ORF138	ILMN_1781102	1.27	0.002
DECR2	ILMN_1783337	1.26	0.007
RPS4Y2	ILMN_2191331	1.26	0.001
APOL2	ILMN_2325337	1.26	0.02
CXCR7	ILMN_2371458	1.26	0.03

Таблица П2-2. Результаты анализа представленности функциональных групп генов (functional enrichment analysis) на 10 мин после активации клеток ($p < 0.05$). Приведены гены, для которых обнаружено подавление экспрессии.

<i>Функция</i>	<i>Число генов</i>	<i>Гены</i>
Ribonucleoprotein/ translational elongation	11	RPS26, RPL23, RPS28, HNRNPA2B1, RPL31, MRPL32, RPL7, RPS15A, HNRNPUL1, RPL9, RPL36A, PTGES3, PABPC1, SFRS1
RNA processing	8	RPS28, HNRNPA2B1, ROD1, RPL7, HNRNPUL1, PABPC1, SFRS1, RPL36A
Mitochondrion parts	10	PEBP1, IMMT, MRPL32, NDUFAB1, DLD, UQCRH, UQCRHL, CKMT1A, CKMT1B, HSPE1

Таблица П2-3. Результаты анализа представленности функциональных групп генов (functional enrichment analysis) на 20 мин после активации клеток ($p < 0.05$). Приведены гены, для которых обнаружено подавление экспрессии.

<i>Функция</i>	<i>Число генов</i>	<i>Гены</i>
Ribonucleoprotein	41	RPL23, DHX15, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPH1, HNRNPH2, HNRNPUL1, HNRPA1L2, HNRPA1L3, HSPA1A, HSPA1B, MRPL10, MRPL 15, MRPL32, MRPL48, MRPL50, MRPS27, PABPC1, PTGES3, RBM25, RPL10A, RPL14, RPL15, RPL21, RPL23A, RPL31, RPL36A, RPL5, RPL7, RPL7A, RPL9, RPLP1,

		RPS15A, RPS26, RPS27, RPS28, SFRS1, SRP14, STRAP, WAC, XPOL
Structure constituent of ribosome	22	HNRNPH2, MRPL10, MRPL15, MRPL32, MRPL48, RPL10A, RPL14, RPL15, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL31, RPL36A, RPL5, RPL7, RPL7A, RPL9, RPLP1, RPS15A, RPS26, RPS27, RPS28
Translational elongation	18	HNRNPH2, RPL10A, RPL14, RPL15, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL31, RPL36A, RPL5, RPL7, RPL7A, RPL9, RPLP1, RPS15A, RPS26, RPS27, RPS28
translation	27	EIF3M, EIF4G2, ETS1, HNRNPH2, MRPL10, MRPL15, MRPL32, MRPL48, NARS, RPL10A, RPL14, RPL15, RPL21, RPL23, RPL23A, RPL31, RPL36A, RPL5, RPL7, RPL7A, RPL9, RPLP1, RPS15A, RPS26, RPS27, RPS28, TARS
RNA processing	24	DDX17, DHX15, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPH2, HNRNPH2, HNRNPUL1, HNRPA1L2, HNRPA1L3, INTS8, PABPC1, PAPOLA, RBM25, ROD1, RPL10A, RPL14, RPL36A, RPL5, RPL7, RPS28, SFRS1, STRAP, TRA2B, ZRANB2
Negative regulation of transcription	14	LRRFIP1, CDKN1B, HDAC2, NR2F2, HAT1, NCOR2, ID2, TCEAL1, RBBP7, MTDH, PRMT6, SOX2, SMARCA2, SAP30
Transcription repressor activity	9	ID2, NCOR2, SP3, RBBP7, LRRFIP1, HDAC2, SAP30, YY1, NR2F2

Таблица П2-4. Результаты анализа представленности функциональных групп генов (functional enrichment analysis) на 40 мин после активации клеток ($p < 0.05$). Приведены гены, для которых обнаружено подавление экспрессии.

Функция	Число генов	Гены
ribonucleoprotein complex	11	RPS28, HNRNPUL1, MRPL10, PABPC1, RBM25, RPL15, RPL7A, RPL9, RPLP1, SF3A2, SFRS1

translation	11	AIMP2, MRPL10, PELO, RPL15, RPL7A, RPL9, RPLP1, RPS28, STAG3L1, STAG3L2, STAG3L3
Structure constituent of ribosome	6	MRPL10, RPL15, RPL7A, RPL9, RPLP1, RPS28
Translational elongation	5	RPL15, RPL7A, RPL9, RPLP1, RPS28
RNA processing	7	HNRNPUL1, PABPC1, RBM25, RPS28, SF3A2, SFRS1, TRMT12

Таблица П2-5. Результаты анализа представленности функциональных групп генов (functional enrichment analysis) на 10 мин после активации клеток ($p < 0.05$). Приведены гены, для которых обнаружено повышение экспрессии.

Функция	Число генов	Гены
Regulation of transcription	21	GTF2IRD2, EGR2, SIX5, CSRNP1, FOS, FOSB, JUNB, CENPB, ZNF467, EGR1, ELF3, JUN, PRDX2, KHSRP, FOXC1, PUF60, RASD1, MXD4, MED16, PPIE, GTF2IRD2B
mRNA splicing	6	KHSRP, PPIE, PUF60, HNRNPK, SFRS5, HNRNPA3
Ribonucleoprotein complex	6	RPS6KB2, TROVE2, PPIE, PUF60, HNRNPK, HNRNPA3
Cell proliferation	7	CYR61, FOXC1, SBDS, BAX, MATK, PRDX2, ZFP36L2

Таблица П2-6. Результаты анализа представленности функциональных групп генов (functional enrichment analysis) на 20 мин после активации клеток ($p < 0.05$). Приведены гены, для которых обнаружено повышение экспрессии.

Функция	Число генов	Гены
Regulation of transcription	40	KLF6, ID1, SRF, UBE2V1, FOXC1, IRX3, PUF60, DDIT3, CXXC1, RASD1, HNRPDL, NCOA7, MYC, GTF2IRD2, EGR2, SIX5, FOSB, FOS, CSRNP1, NFKBIA, EGR1, CBX4, JUN, SERTAD3, PRDX2, SIK1, KHSRP, ZNF672, EGR3, NFKBIZ, MSX1, CCNL1, KLF2, NR4A3, EGR4, ATF3, JUNB, SMAD6, SERTAD1, NR4A1
Positive regulation of transcription	18	SRF, SERTAD3, FOXC1, DDIT3, KLF2, EGR4, NR4A3, MYC, EGR2, CSRNP1, FOS, NFKBIA, JUNB, EGR1, NR4A1, SERTAD1, JUN, KLF6
Regulation of cell cycle	14	CKS2, FOXC1, MAD2L1BP, MYC, CDT1, SFRS5, EDN1, JUNB, SMAD6, BAX, SERTAD1, CDKN1A, JUN, SIK1
Regulation of apoptosis	19	FOXC1, DDIT3, DUSP1, MSX1, THBS1, MCL1, IER3, MOAP1, MYC, NFKBIA, SMAD6, CBX4, BAX, NR4A1, CDKN1A, JUN, INTS1, PRDX2
Regulation of caspase activity	6	MYC, SMAD6, BAX, NR4A1, INTS1, MOAP1
MAPK signaling	9	SRF, DUSP2, DUSP5, MYC, FOS, DDIT3, DUSP1, NR4A1, JUN
TGF-beta receptor signaling	5	ID1, FOS, GDF15, SMAD6, JUN
ErbB signaling pathway	4	RPS6KB2, MYC, CDKN1A, JUN

Таблица П2-7. Результаты анализа представленности функциональных групп генов (functional enrichment analysis) на 40 мин после активации клеток ($p < 0.05$). Приведены гены, для которых обнаружено повышение экспрессии.

Функция	Число генов	Гены
Regulation of transcription	78	ATF3, BCL10, BHLHE40, CBX4, CCNL1, CEBPB, CGGBP1, CITED2, CSRNP1, DDIT3, DDX5, DNAJB6, EGR1, EGR2, EGR3, EGR4, ELF3, EPC1, ETS2, FHL2, FOS, FOSB, FOSL1, FOXA1, FOXC1, FST, HNRNPAB, HNRPDL, ID3, ING1, ING3, IRX2, IRX3, ISL1, JMJD6, JUN, JUNB, JUND, KDM3A, KLF10, KLF2, KLF6, MAFF, MAFG, MBD1, MED9, MEF2D, MSX1, MYC, NAB2, NCOA7, NFKBIZ, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NRBF2, PER2, PPRC1, PUF60, RARA, RASD1, RBM14, RBM15, RBM4, SERTAD1, SERTAD3, SIK1, SRF, TFAP2C, TRIB1, TSC22D2, TSPYL2, UBC, ZNF24, ZNF274, ZNF593, ZNF672, ZNF787
Negative regulation of transcription	21	BHLHE40, CBX4, CITED2, DNAJB6, EGR1, EPC1, FOSB, FOXA1, FST, HNRNPAB, ID3, JUNB, KLF10, MBD1, MSX1, NAB2, RASD1, RBM15, SIK1, ZNF24, ZNF593
Positive regulation of transcription	34	BCL10, CEBPB, CITED2, CSRNP1, DDIT3, DDX5, EGR1, EGR2, EGR4, EPC1, ETS2, FHL2, FOS, FOSL1, FOXA1, FOXC1, HNRNPAB, ING1, ISL1, JUN, JUNB, KDM3A, KLF2, KLF6, MYC, NR4A1, NR4A2, NR4A 3, RBM14, RBM15, SERTAD1, SERTAD3, SRF, UBC
Regulation of cell death	36	AEN, BARD1, BCL10, BIK, CBX4, CDKN1A, CEBPB, CITED2, CYCS, DCUN1D3, DDIT3, DNAJB6, DUSP1, FOSL1, FOXC1, HERPUD1, ID3, IER3, ING3, IP6K2, JUN, KLF10, MCL1, MOAP1, MSX1, MYC, NR4A1, NR4A2, PHLDA1, PIM3, SLC25A4, THBS1, TIMP3, TNFAIP3, TUBB2C, UBC

Positive regulation of apoptosis	21	AEN, BARD1, BCL10, BIK, CDKN1A, CEBPB, DCUN1D3, DDIT3, DUSP1, FOSL1, ID3, ING3, IP6K2, JUN, KLF10, MYC, NR4A1, PHLDA1, TIMP3, TUBB2C, UBC
Negative regulation of apoptosis	16	BARD1, BCL10, CBX4, CDKN1A, CEBPB, CITED2, FOXC1, IER3, MCL1, MSX1, MYC, NR4A2, PIM3, THBS1, TNFAIP3, UBC
Regulation of caspase activity	6	CYCS, DNAJB6, HERPUD1, MOAP1, MYC, NR4A1
Ubl conjugation	23	ATP2A2, BARD1, BHLHE40, CBX4, CDKN1A, CEBPB, FOS, KLF10, MAFG, MBD1, MCL1, MEF2D, MSX1, RNF103, SLC25A4, SLC3A2, TFAP2C, TPM1, UBC, UBE2S, VPS24, WEE1, ZNF24
Response to extracellular stimuli	11	ADM, CDKN1A, DDIT3, DUSP1, FOS, FOSL1, JUN, NR4A2, RARA, SLC10A3, TIMP3
MAPK signaling pathway	14	DDIT3, DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5, DUSP8, FOS, GADD45A, JUN, JUND, MAP3K14, MYC, NR4A1, SRF
Phosphatase activity	8	DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5, DUSP8, CYCS, PFKFB3, PTP4A1

Приложение 3. Модель NRF2 сигнальной системы

Модель NRF2 сигнальной системы включает следующие ОДУ

$$\frac{d}{dt} NRF2 = V_{Nrf2, syn} - V_{Nrf2, KEAP1} - V_{Nrf2, KEAP1ox} - V_{Nrf2, nucl} - V_{Nrf2, deg} \quad (1)$$

$$\frac{d}{dt} H2O2 = V_{H2O2, prod} - V_{Px, ox} - V_{KEAP1, ox} - V_{Nrf2, KEAP1ox} - V_{H2O2, ext} \quad (2)$$

$$\frac{d}{dt} H2O2_{ext} = V_{H2O2, ext} \quad (3)$$

$$\frac{d}{dt} KEAP1 = -V_{Nrf2,KEAP1} - V_{KEAP1,ox} + V_{KEAP1,red} + V_{KEAP1,Nrf2ub,dis} \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt} NRF2 \circ KEAP1 = V_{Nrf2,KEAP1} - V_{KEAP1,Nrf2ub} - V_{Nrf2,KEAP1ox} \quad (5)$$

$$\frac{d}{dt} NRF2 \circ KEAP1_{ub} = V_{KEAP1,Nrf2ub} - V_{KEAP1,Nrf2ub,dis} \quad (6)$$

$$\frac{d}{dt} KEAP1_{ox} = V_{KEAP1,ox} - V_{KEAP1,red} - V_{KEAP1ox,Nrf2} \quad (7)$$

$$\frac{d}{dt} NRF2 \circ KEAP1_{ox} = V_{KEAP1ox,Nrf2} + V_{Nrf2,KEAP1ox} \quad (8)$$

$$\frac{d}{dt} TRX = V_{TRX,red} - V_{KEAP1,red} \quad (9)$$

$$\frac{d}{dt} Px = V_{Px,syn} - V_{Px,ox} + V_{Px,red} - V_{Px,deg} \quad (10)$$

$$\frac{d}{dt} NRF2_{nucl} = V_{Nrf2,nucl} - V_{Nrf2,Maf} \quad (11)$$

$$\frac{d}{dt} NRF2 \circ MAF = V_{Nrf2,Maf} - V_{Nrf2,ARE} \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt} MAF2 = V_{Maf2} - V_{Maf2,ARE} \quad (13)$$

$$\frac{d}{dt} NRF2 \circ MAF \circ ARE = V_{Nrf2,ARE} \quad (14)$$

$$\frac{d}{dt} MAF2 \circ ARE = V_{Maf2,ARE} \quad (15)$$

Таблица ПЗ-1. Уравнения скоростей реакций

N	Реакция	Уравнения скоростей реакций
1	Null → Nrf2	$V_{Nrf2,syn}$
2	KEAP1 + NRF2 → KEAP1°NRF2	$V_{Nrf,KEAP1} = k_{1,Nrf2} \cdot (KEAP1 \cdot NRF2 - K_{1,Nrf2} \cdot KEAP1^{\circ}NRF2)$
3	KEAP1°NRF2 → KEAP1°NRF2°Ub	$V_{KEAP1,Nrf2ub} = k_2 \cdot KEAP1^{\circ}NRF2$
4	KEAP1°NRF2°Ub → KEAP1 + NRF2 _{Ub}	$V_{KEAP1,Nrf2ub,dis} = k_3 \cdot KEAP1^{\circ}NRF2_{Ub}$
5	NRF2 → Null	$V_{Nrf2,deg} = k_{Nrf2,deg} \cdot NRF2$
6	Null → H2O2	$V_{H2O2,prod}$
7	H2O2 + Px → Px _{ox} + H2O	$V_{Px,ox} = k_{Px,ox} \cdot Px \cdot H2O2$
8	KEAP1 + H2O2 → KEAP1 _{ox}	$V_{KEAP1,ox} = k_{KEAP,ox} \cdot KEAP1 \cdot H2O2$
9	KEAP1 _{ox} + TRX → KEAP1 + TRX _{ox}	$V_{KEAP1,red} = k_{Trx} \cdot KEAP1_{ox} \cdot H2O2$
10	TRX _{ox} → TRX	$V_{TRX,red} = \frac{k_{TR} \cdot TR \cdot TRX_{ox} \cdot NADPH}{K_{TR,TRX} \cdot K_{TR,NADPH} \cdot (1 + TRX_{ox} / K_{TR,TRX} + NADPH / K_{TR,NADPH})}$
11	KEAP1 _{ox} + 2 NRF2 → NRF2°KEAP1 _{ox}	$V_{Nrf2,KEAP1ox} = k_{2,Nrf2} \cdot (2 \cdot KEAP1_{ox} \cdot NRF2 - K_{d2,Nrf2} \cdot NRF2^{\circ}KEAP1_{ox})$
12	NRF2°KEAP1 + H2O2 → NRF2°KEAP1 _{ox}	$V_{KNrf2,KEAP1ox} = k_{KEAP,ox} \cdot KEAP1^{\circ}NRF2$
13	Px _{ox} + PSS → Px + PSH	$V_{Px,red} = k_{Px,red} \cdot Px_{ox} \cdot PSS$
14	PSH → PSS	$V_{PSH,red} = \frac{k_{Red} \cdot Red \cdot PSH \cdot NADPH}{K_{Red,PSH} \cdot K_{Red,NADPH} \cdot (1 + PSH / K_{Red,PSH} + NADPH / K_{Red,NADPH})}$
15	NRF2 → NRF2 _{nucl}	$V_{Nrf2,nucl} = k_{nucl} \cdot (NRF2 - NRF2_{nucl})$

16	$\text{NRF2}_{\text{nucl}} + \text{MAF} \rightarrow \text{NRF2}^\circ\text{MAF}$	$V_{\text{Nrf2},\text{Maf}} = k_{\text{Nrf2},\text{Maf}}(\text{NRF2}_{\text{nucl}} \cdot \text{MAF} - K_{\text{Nrf2},\text{Maf}} \text{NRF2}^\circ\text{MAF})$
17	$\text{NRF2}^\circ\text{MAF} + \text{N}_{\text{ARE}}\text{ARE} \rightarrow \text{NRF2}^\circ\text{MAF}^\circ\text{ARE}$	$V_{\text{Nrf2},\text{ARE}} = k_{\text{Nrf2},\text{ARE}}(\text{N}_{\text{ARE}} \cdot \text{NRF2}^\circ\text{MAF} \cdot \text{ARE} - K_{\text{Nrf2},\text{ARE}} \text{NRF2}^\circ\text{MAF}^\circ\text{ARE})$
18	$\text{MAF} + \text{MAF} \rightarrow \text{MAF}^\circ\text{MAF}$	$V_{2\text{Maf}} = k_{\text{Maf}^2}(2 \cdot \text{MAF} - K_{d,\text{Maf}^2} \text{MAF}^\circ\text{MAF})$
19	$\text{MAF} + \text{N}_{\text{ARE}}\text{ARE} \rightarrow \text{MAF}^\circ\text{ARE}$	$V_{\text{Maf}^2,\text{ARE}} = k_{\text{Maf}^2,\text{ARE}}(\text{N}_{\text{ARE}} \cdot \text{MAF} \cdot \text{ARE} - K_{\text{Maf}^2,\text{ARE}} \text{MAF}^\circ\text{ARE})$
20	$\text{Null} \rightarrow \text{Px}$	$V_{\text{Px},\text{syn}} = F \cdot \text{NRF2}^\circ\text{MAF}^\circ\text{ARE}$
21	$\text{Px} \rightarrow \text{Null}$	$V_{\text{Px},\text{deg}} = k_{\text{Px},\text{deg}} \text{Px}$
22	$\text{H2O2} \rightarrow \text{H2O2}_{\text{ext}}$	$V_{\text{H2O2},\text{out}} = p \cdot A_{\text{cell}} \cdot N_{\text{cell}} \cdot (\text{H2O2}_{\text{ext}} - \text{H2O2})$

Таблица ПЗ-2. Концентрации ферментов и метаболитов в модели

N	Обозначения	Название
1	$\text{NRF2}, \text{NRF2}_{\text{nucl}}$	Cytoplasmic and nuclear NRF2
2	$\text{KEAP1}^\circ\text{NRF2}$	Complex of KEAP1 with NRF2
3	$\text{KEAP1}^\circ\text{NRF2}^\circ\text{Ub}$	Ubiquitinated complex of KEAP1 with NRF2
4	NRF2_{Ub}	Ubiquitinated NRF2
5	$\text{Px}, \text{Px}_{\text{ox}}$	Reduced and oxidised peroxidase
6	PSS, PSH	Reduced and oxidised forms of thiol antioxidant (TRX, GSH)
7	$\text{H2O2}, \text{H2O2}_{\text{ext}}$	Cytoplasmic and external hydrogen peroxide
8	H2O	Water molecule
9	$\text{TRX}, \text{TRX}_{\text{ox}}$	Reduced and oxidised thioredoxin
10	KEAP1_{ox}	Oxidised KEAP1
11	$\text{NRF2}^\circ\text{KEAP1}_{\text{ox}}$	Complex of NRF2 with oxidised KEAP1
12	$\text{NRF2}^\circ\text{MAF}$	Complex of NRF2 with MAF protein
13	$\text{NRF2}^\circ\text{MAF}^\circ\text{ARE}$	Complex of NRF2, MAF, and ARE promoter site
14	$\text{MAF}^\circ\text{MAF}$	MAF homodimer
15	$\text{MAF}^\circ\text{MAF}^\circ\text{ARE}$	Complex of MAF homodimer and ARE promoter site

Таблица ПЗ-3. Параметры в модели (fr – свободные параметры модели, выбранные на основе наилучшего согласия с экспериментальными данными)

Параметр	Описание	Значение в модели	Литературные данные
Редокс система			
$V_{\text{H2O2},\text{prod}}$	Production rate of H_2O_2	0.1 $\mu\text{M}/\text{min}$ in normal cells; 7 $\mu\text{M}/\text{min}$ in cancer cells	0.19-0.45 $\mu\text{M}/\text{min}$ in normal cells; 4.5 – 8.3 $\mu\text{M}/\text{min}$ in cancer cells (Qutub & Popel, 2008)
$k_{\text{Px},\text{ox}}$	Rate constant of peroxidase oxidation	2.4 $10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ (peroxiredoxin rate constant)	(Adimora, Jones, & Kemp, 2010)
$k_{\text{Px},\text{red}}$	Rate constant of peroxidase reduction	120 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	k_{12} (Adimora et al., 2010)
k_{Red}	Turnover number of reductase, Red	1500 min^{-1}	25.78 s^{-1} (www.brenda-enzymes.org)
$K_{\text{Red},\text{PSH}}$	Mechaelis-Menten constant of reductase, Red (substrate PSH)	1.8 μM	1.4-34 μM (www.brenda-enzymes.org)
$K_{\text{Red},\text{NADPH}}$	Mechaelis-Menten constant of reductase, Red (substrate NADPH)	88 μM	88 μM (www.brenda-enzymes.org)
k_{TR}	Turnover number of thioredoxin reductase	1500 min^{-1}	25.78 s^{-1} (www.brenda-enzymes.org)
$K_{\text{TR},\text{TRX}}$	Mechaelis-Menten constant of TR (substrate TRX)	1.8 μM	1.4-34 μM (www.brenda-enzymes.org)

$K_{TR,NADPH}$	Mechaelis-Menten constant of TR (substrate NADPH)	88 μM	88 μM (www.brenda-enzymes.org)
$k_{Px,deg}$	Degradation rate of Px	0.1 min^{-1}	fp
p	Permeability coefficient for H_2O_2 through the cellular membrane	$2 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$	(Bienert, Schjoerring, & Jahn, 2006)
A_{cell}	The surface area of the cell	$1.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$	
N_{cell}	Number of cells in the assay	$10^2 \mu\text{L}^{-1}$	
NRF2-KEAP1 cncrema			
$V_{syn,Nrf2}$	Synthesis rate of NRF2	$2 \cdot 10^{-1} \mu\text{M}/\text{min}$	$k_{28} = 4.2 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}/\text{min}$ (Adimora et al., 2010)
$k_{1,Nrf2}$	Reaction rate of the binding of NRF2 with KEAP1	0.1 $\mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	fp
$K_{1,Nrf2}$	Dissociation constant of NRF2 with ETGE motif of KEAP1	5 nM	(Y. Chen, Inoyama, Kong, Beamer, & Hu, 2011)
$k_{2,Nrf2}$	Reaction rate of the binding of NRF2 with oxidised KEAP1	0.1 $\mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	fp
$K_{2,Nrf2}$	Dissociation constant of the NRF2 binding with DLG motif of KEAP1	1 μM	(Y. Chen et al., 2011)
$k_{KEAP1,ox}$	Reaction rate of KEAP1-SH oxidation	$2.4 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	k_{14} (Adimora et al., 2010)
$k_{KEAP1,red}$	Reaction rate of KEAP-(SS) ₂ reduction	$6 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	k_{19} (Adimora et al., 2010)
$k_{Nrf2,deg}$	Degradation rate of NRF2	0.05 min^{-1}	fp
NRF2-MAF-ARE cncrema			
k_{Maf2}	Reaction rate of the formation of MAF-MAF homodimer	$1 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(Yamamoto et al., 2006)
$K_{d,Maf2}$	Dissociation constant of the formation of MAF-MAF homodimer	20 μM	(Yamamoto et al., 2006)
$k_{Maf2,ARE}$	Reaction rate of the binding of MAF-MAF homodimer with ARE site	$4.2 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(Yamamoto et al., 2006)
$K_{Maf2,ARE}$	Dissociation constant of the binding of MAF-MAF homodimer with ARE site	50 μM	(Yamamoto et al., 2006)
$k_{Nrf2,Maf}$	Reaction rate of the binding of NRF2 with MAF	$1 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(Yamamoto et al., 2006)
$K_{Nrf2,Maf}$	Dissociation constant of the NRF2 binding with MAF	10 μM	(Yamamoto et al., 2006)
$k_{Nrf2,ARE}$	Reaction rate of the binding of NRF2-MAF transcription complex with ARE site	$1.2 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(Yamamoto et al., 2006)
$K_{Nrf2,ARE}$	Dissociation constant of NRF2-MAF transcription complex with ARE site	20 μM	(Yamamoto et al., 2006)
N_{ARE}	Number of ARE sites	10^3	(Chorley et al., 2012)
F	Transcription strength of ARE site	10^4	fp
k_{nucl}	Rate of cytoplasm/nucleus exchange of NRF2	0.1 min^{-1}	fp

Таблица ПЗ-4. Концентрации (μM) ферментов и метаболитов в модели (fp – свободные параметры модели, выбранные на основе наилучшего согласия с экспериментальными данными)

Обозначение	Описание	Значение в модели	Литературные данные
<i>Px</i>	Peroxidase concentration	20 μM (fp)	
<i>PSS</i>	antioxidants containing thiol groups (GSH and TRX)	200 μM (fp)	
<i>Red</i>	Reductase concentration	12 μM (fp)	
<i>NADPH</i>	NADPH concentration	0.3 μM	(Adimora et al., 2010)
<i>TRX</i>	Thioredoxin concentration	0.4 μM (fp)	(Adimora et al., 2010)
<i>TR</i>	Thioredoxin reductase	4 μM (fp)	4.75 μM (Pillay, Hofmeyr, & Rohwer, 2011)
<i>H2O2_o</i>	Basal level of H_2O_2	0.5 μM	<1 (10^{-3} -0.7) μM in normal cells; 0.2 μM in tumour cells (Qutub & Popel, 2008)
<i>NRF2</i>	NRF2 concentration	1.8 μM (fp)	
<i>KEAP1</i>	KEAP1 concentration	2 μM (fp)	
<i>MAF</i>	MAF concentration	4 μM (fp)	

Список цитированной литературы

- Adimora, N. J., Jones, D. P., & Kemp, M. L. (2010). A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(6), 731–43. <http://doi.org/10.1089/ars.2009.2968>
- Agus, D. B., Akita, R. W., Fox, W. D., Lewis, G. D., Higgins, B., Pisacane, P. I., ... Sliwkowski, M. X. (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*, 2(2), 127–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204533>
- Alroy, I., & Yarden, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters*, 410(1), 83–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247128>
- Amit, I., Wides, R., & Yarden, Y. (2007). Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Molecular Systems Biology*, 3, 151. <http://doi.org/10.1038/msb4100195>
- Austin, C. D., De Mazière, A. M., Pisacane, P. I., van Dijk, S. M., Eigenbrot, C., Sliwkowski, M. X., ... Scheller, R. H. (2004). Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5268–82. <http://doi.org/10.1091/mbc.E04-07-0591>
- Banaszynski, L. A., Liu, C. W., & Wandless, T. J. (2005). Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *Journal of the American Chemical Society*, 127(13), 4715–21. <http://doi.org/10.1021/ja043277y>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(8), 994–1003.

- <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Birtwistle, M. R., Hatakeyama, M., Yumoto, N., Ogunnaike, B. A., Hoek, J. B., & Kholodenko, B. N. (2007). Ligand-dependent responses of the ErbB signaling network: experimental and modeling analyses. *Molecular Systems Biology*, 3, 144. <http://doi.org/10.1038/msb4100188>
- Borisov, N., Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., Legewie, S., Berkhout, J., Maiwald, T., ... Kholodenko, B. N. (2009). Systems-level interactions between insulin-EGF networks amplify mitogenic signaling. *Molecular Systems Biology*, 5, 256. <http://doi.org/10.1038/msb.2009.19>
- Bublil, E. M., & Yarden, Y. (2007). The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 124–34. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.008>
- Chen, W. W., Schoeberl, B., Jasper, P. J., Niepel, M., Nielsen, U. B., Lauffenburger, D. A., & Sorger, P. K. (2009). Input-output behavior of ErbB signaling pathways as revealed by a mass action model trained against dynamic data. *Molecular Systems Biology*, 5, 239. <http://doi.org/10.1038/msb.2008.74>
- Chen, Y., Inoyama, D., Kong, A.-N. T., Beamer, L. J., & Hu, L. (2011). Kinetic analyses of Keap1-Nrf2 interaction and determination of the minimal Nrf2 peptide sequence required for Keap1 binding using surface plasmon resonance. *Chemical Biology & Drug Design*, 78(6), 1014–21. <http://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01240.x>
- Cho, H.-S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., & Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421(6924), 756–60. <http://doi.org/10.1038/nature01392>
- Choi, B.-K., Fan, X., Deng, H., Zhang, N., & An, Z. (2012). ERBB3 (HER3) is a key sensor in the regulation of ERBB-mediated signaling in both low and high ERBB2 (HER2) expressing cancer cells. *Cancer Medicine*, 1(1), 28–38.

<http://doi.org/10.1002/cam4.10>

- Choo, A. Y., Yoon, S.-O., Kim, S. G., Roux, P. P., & Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17414–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0809136105>
- Chorley, B. N., Campbell, M. R., Wang, X., Karaca, M., Sambandan, D., Bangura, F., ... Bell, D. A. (2012). Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 7416–29. <http://doi.org/10.1093/nar/gks409>
- Citri, A., & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(7), 505–16. <http://doi.org/10.1038/nrm1962>
- Cooke, S. L., Ng, C. K. Y., Melnyk, N., Garcia, M. J., Hardcastle, T., Temple, J., ... Brenton, J. D. (2010). Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncogene*, 29(35), 4905–13. <http://doi.org/10.1038/onc.2010.245>
- Cornish-Bowden, A. (2004). *Fundamentals of Enzyme Kinetics (3rd Edition)*. Portland Press Ltd. Retrieved from https://www.portlandpress.com/pp/books/prod_det.cfm?product=9781855781580
- Cornish-Bowden, A. (2014). Analysis and interpretation of enzyme kinetic data. *Perspectives in Science*, 1(1–6), 121–125. <http://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.010>
- Draper, N. R., & Smith, H. (2014). *Applied Regression Analysis*, 3rd Edition. Retrieved April 14, 2016, from <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471170828.html>
- Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2010). mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 169–76. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.10.007>

- Efron, B., & Tibshirani, R. (1994). *An introduction to the bootstrap*. Chapman & Hall.
- Faratian, D., Goltsov, A., Lebedeva, G., Sorokin, A., Moodie, S., Mullen, P., ... Harrison, D. J. (2009). Systems Biology Reveals New Strategies for Personalizing Cancer Medicine and Confirms the Role of PTEN in Resistance to Trastuzumab. *Cancer Research*, 69(16), 6713–6720. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0777>
- Faratian, D., Zweemer, A. J. M., Nagumo, Y., Sims, A. H., Muir, M., Dodds, M., ... Langdon, S. P. (2011). Trastuzumab and pertuzumab produce changes in morphology and estrogen receptor signaling in ovarian cancer xenografts revealing new treatment strategies. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(13), 4451–61. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2461>
- Flågåeng, M. H., Knappskog, S., Haynes, B. P., Lønning, P. E., & Mellgren, G. (2013). Inverse regulation of EGFR/HER1 and HER2-4 in normal and malignant human breast tissue. *PloS One*, 8(8), e74618. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074618>
- Franklin, M. C., Carey, K. D., Vajdos, F. F., Leahy, D. J., de Vos, A. M., & Sliwkowski, M. X. (2004). Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*, 5(4), 317–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093539>
- Fuentes, G., Scaltriti, M., Baselga, J., & Verma, C. S. (2011). Synergy between trastuzumab and pertuzumab for human epidermal growth factor 2 (Her2) from colocalization: an in silico based mechanism. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(3), R54. <http://doi.org/10.1186/bcr2888>
- Garrett, J. T., Sutton, C. R., Kuba, M. G., Cook, R. S., & Arteaga, C. L. (2013). Dual blockade of HER2 in HER2-overexpressing tumor cells does not completely eliminate HER3 function. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(3), 610–9.

- <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2024>
- Ghosh, R., Narasanna, A., Wang, S. E., Liu, S., Chakrabarty, A., Balko, J. M., ... Arteaga, C. L. (2011). Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Research*, 71(5), 1871–82. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1872>
- Goltsov, A., Deeni, Y., Khalil, H., Idowu, M., Kyriakidis, S., Goltsov, G., ... Bown, J. (2013). Role of Post-translational Regulation of PTEN Activity in Cancer Cell Addiction to Heterozygous PTEN Mutations. In K. Xu (Ed.), *PTEN: Structure, Mechanisms-of-Action, Role in Cell Signaling and Regulation* (pp. 173–210). Nova Science Publishers. Retrieved from https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=44640
- Goltsov, A., Faratian, D., Langdon, S. P., Bown, J., Goryanin, I., & Harrison, D. J. (2011). Compensatory effects in the PI3K/PTEN/AKT signaling network following receptor tyrosine kinase inhibition. *Cellular Signalling*, 23(2), 407–416. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.011>
- Goltsov, A., Faratian, D., Langdon, S. P., Mullen, P., Harrison, D. J., & Bown, J. (2012). Features of the reversible sensitivity-resistance transition in PI3K/PTEN/AKT signalling network after HER2 inhibition. *Cellular Signalling*, 24(2), 493–504. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.09.030>
- Goltsov, A., Khalil, H., Langdon, S., Harrison, D. J., Bown, J., & Deeni, Y. (2015). Systems biology study of the NRF2-KEAP regulatory mechanism of high level ROS haemostasis... - F1000Research. Retrieved August 30, 2015, from <http://f1000research.com/posters/1097504>
- Goltsov, A., Lebedeva, G., Humphery-Smith, I., Goltsov, G., Demin, O., & Goryanin, I. (2010). In Silico Screening of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Their Combined Action on Prostaglandin H Synthase-1. *Pharmaceuticals*, 3(7), 2059–2081. <http://doi.org/10.3390/ph3072059>
- Goltsov, A., Maryashkin, A., Swat, M., Kosinsky, Y., Humphery-Smith, I., Demin,

- O., ... Lebedeva, G. (2009). Kinetic modelling of NSAID action on COX-1: Focus on in vitro/in vivo aspects and drug combinations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(1), 122–136. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.10.015>
- Goltsov, A., Tashkandi, G., Langdon, S. P., Harrison, D. J., & Bown, J. L. (2017). Kinetic modelling of in vitro data of PI3K, mTOR1, PTEN enzymes and on-target inhibitors Rapamycin, BEZ235, and LY294002. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 170–181. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.008>
- Holbro, T., & Hynes, N. E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 195–217. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440>
- Hu, H. (2011). *HER receptor-mediated dynamic signalling in breast cancer cells*. University of Edinburgh, Edinburgh, UK.
- Hu, H., Goltsov, A., Bown, J. L., Sims, A. H., Langdon, S. P., Harrison, D. J., & Faratian, D. (2013). Feedforward and feedback regulation of the MAPK and PI3K oscillatory circuit in breast cancer. *Cellular Signalling*, 25(1), 26–32. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.014>
- Huang, W., Jiang, D., Wang, X., Wang, K., Sims, C. E., Allbritton, N. L., & Zhang, Q. (2011). Kinetic analysis of PI3K reactions with fluorescent PIP2 derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(6), 1881–8. <http://doi.org/10.1007/s00216-011-5257-z>
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K.-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development*, 17(15), 1829–34. <http://doi.org/10.1101/gad.1110003>
- Joslin, E. J., Shankaran, H., Opresko, L. K., Bollinger, N., Lauffenburger, D. A., & Wiley, H. S. (2010). Structure of the EGF receptor transactivation circuit integrates multiple signals with cell context. *Molecular bioSystems*, 6(7), 1293–306. <http://doi.org/10.1039/c003921g>

- Junttila, T. T., Akita, R. W., Parsons, K., Fields, C., Lewis Phillips, G. D., Friedman, L. S., ... Sliwkowski, M. X. (2009). Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*, 15(5), 429–40. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.020>
- Kholodenko, B. N. (2000). Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *European Journal of Biochemistry*, 267(6), 1583–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712587>
- Kholodenko, B. N., & Birtwistle, M. R. (2009). Four-dimensional dynamics of MAPK information-processing systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(1), 28–44. <http://doi.org/10.1002/wsbm.16>
- Kitano, H. (2004). Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 4(3), 227–35. <http://doi.org/10.1038/nrc1300>
- Landgraf, R. (2007). HER2 therapy. HER2 (ERBB2): functional diversity from structurally conserved building blocks. *Breast Cancer Research : BCR*, 9(1), 202. <http://doi.org/10.1186/bcr1633>
- Lebedeva, G., Sorokin, A., Faratian, D., Mullen, P., Goltsov, A., Langdon, S. P., ... Goryanin, I. (2012). Model-based global sensitivity analysis as applied to identification of anti-cancer drug targets and biomarkers of drug resistance in the ErbB2/3 network. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 46(4), 244–58. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.026>
- Lee-Hoeflich, S. T., Crocker, L., Yao, E., Pham, T., Munroe, X., Hoeflich, K. P., ... Stern, H. M. (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Research*, 68(14), 5878–87. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0380>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine

- Kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Maira, S.-M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., ... García-Echeverría, C. (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), 1851–63. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0017>
- McConnachie, G., Pass, I., Walker, S. M., & Downes, C. P. (2003). Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *The Biochemical Journal*, 371(Pt 3), 947–55. <http://doi.org/10.1042/BJ20021848>
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., & Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 31, 151–75. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.082901.134259>
- Memmott, R. M., & Dennis, P. A. (2009). Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular Signalling*, 21(5), 656–64. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.004>
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 320–328. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., & Baselga, J. (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Research*, 61(12), 4744–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406546>
- Nagashima, T., Shimodaira, H., Ide, K., Nakakuki, T., Tani, Y., Takahashi, K., ... Hatakeyama, M. (2007). Quantitative Transcriptional Control of ErbB Receptor Signaling Undergoes Graded to Biphasic Response for Cell Differentiation.

- Journal of Biological Chemistry*, 282(6), 4045–4056.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M608653200>
- Nagumo, Y., Faratian, D., Mullen, P., Harrison, D. J., Hasmann, M., & Langdon, S. P. (2009). Modulation of HER3 is a marker of dynamic cell signaling in ovarian cancer: implications for pertuzumab sensitivity. *Molecular Cancer Research : MCR*, 7(9), 1563–71. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0101>
- Nakakuki, T., Birtwistle, M. R., Saeki, Y., Yumoto, N., Ide, K., Nagashima, T., ... Kholodenko, B. N. (2010). Ligand-specific c-Fos expression emerges from the spatiotemporal control of ErbB network dynamics. *Cell*, 141(5), 884–96. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.054>
- Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R., & Nishida, E. (2008). FGF induces oscillations of Hes1 expression and Ras/ERK activation. *Current Biology*, 18(8), R332–R334. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.013>
- Nguyen, L. K., Matallanas, D., Croucher, D. R., von Kriegsheim, A., & Kholodenko, B. N. (2013). Signalling by protein phosphatases and drug development: a systems-centred view. *The FEBS Journal*, 280(2), 751–65. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08522.x>
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., ... Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47–54. <http://doi.org/10.1038/nature17676>
- Normanno, N., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., De Luca, A., ... Salomon, D. S. (2005). The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Current Drug Targets*, 6(3), 243–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857286>
- Noske, A., Kaszubiak, A., Weichert, W., Sers, C., Niesporek, S., Koch, I., ... Denkert, C. (2007). Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: Increased expression of AKT in advanced

- ovarian cancer. *Cancer Letters*, 246(1–2), 190–200.
<http://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.02.018>
- Park, J. W., Neve, R. M., Szollosi, J., & Benz, C. C. (2008). Unraveling the Biologic and Clinical Complexities of HER2. *Clinical Breast Cancer*, 8(5), 392–401.
<http://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.047>
- Pillay, C. S., Hofmeyr, J.-H. S., & Rohwer, J. M. (2011). The logic of kinetic regulation in the thioredoxin system. *BMC Systems Biology*, 5, 15.
<http://doi.org/10.1186/1752-0509-5-15>
- Qutub, A. A., & Popel, A. S. (2008). Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1alpha differentially in cancer and ischemia. *Molecular and Cellular Biology*, 28(16), 5106–19. <http://doi.org/10.1128/MCB.00060-08>
- Rodrigues, G. A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S. H., & Schlessinger, J. (2000). A Novel Positive Feedback Loop Mediated by the Docking Protein Gab1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), 1448–1459.
<http://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1448-1459.2000>
- Roy, S. K., Srivastava, R. K., & Shankar, S. (2010). Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *Journal of Molecular Signaling*, 5, 10. <http://doi.org/10.1186/1750-2187-5-10>
- Samaga, R., Saez-Rodriguez, J., Alexopoulos, L. G., Sorger, P. K., Klamt, S., Olayioye, M., ... Gilles, E. (2009). The Logic of EGFR/ErbB Signaling: Theoretical Properties and Analysis of High-Throughput Data. *PLoS Computational Biology*, 5(8), e1000438. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000438>
- Schoeberl, B., Pace, E. A., Fitzgerald, J. B., Harms, B. D., Xu, L., Nie, L., ... Nielsen, U. B. (2009). Therapeutically targeting ErbB3: a key node in ligand-induced activation of the ErbB receptor-PI3K axis. *Science Signaling*, 2(77), ra31.
<http://doi.org/10.1126/scisignal.2000352>

- Schulze, W. X., Deng, L., & Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Molecular Systems Biology*, 1, 2005.0008. <http://doi.org/10.1038/msb4100012>
- Shankaran, H., Ippolito, D. L., Chrisler, W. B., Resat, H., Bollinger, N., Opresko, L. K., & Wiley, H. S. (2009). Rapid and sustained nuclear–cytoplasmic ERK oscillations induced by epidermal growth factor. *Molecular Systems Biology*, 5, 332. <http://doi.org/10.1038/msb.2009.90>
- Shor, B., Zhang, W.-G., Toral-Barza, L., Lucas, J., Abraham, R. T., Gibbons, J. J., & Yu, K. (2008). A new pharmacologic action of CCI-779 involves FKBP12-independent inhibition of mTOR kinase activity and profound repression of global protein synthesis. *Cancer Research*, 68(8), 2934–43. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6487>
- Sims, A. H., Zweemer, A. J. M., Nagumo, Y., Faratian, D., Muir, M., Dodds, M., ... Langdon, S. P. (2012). Defining the molecular response to trastuzumab, pertuzumab and combination therapy in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 106(11), 1779–89. <http://doi.org/10.1038/bjc.2012.176>
- Sokolovski, S. G., Zolotovskaya, S. A., Goltsov, A., Pourreyron, C., South, A. P., & Rafailov, E. U. (2013). Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Scientific Reports*, 3. <http://doi.org/10.1038/srep03484>
- Sturm, O. E., Orton, R., Grindlay, J., Birtwistle, M., Vyshemirsky, V., Gilbert, D., ... Kolch, W. (2010). The mammalian MAPK/ERK pathway exhibits properties of a negative feedback amplifier. *Science Signaling*, 3(153), ra90. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2001212>
- Tao, Z., Barker, J., Shi, S. D.-H., Gehring, M., & Sun, S. (2010). Steady-state kinetic and inhibition studies of the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase domain and mTOR complexes. *Biochemistry*, 49(39), 8488–98. <http://doi.org/10.1021/bi100673c>
- Toral-Barza, L., Zhang, W.-G., Lamison, C., Larocque, J., Gibbons, J., & Yu, K.

- (2005). Characterization of the cloned full-length and a truncated human target of rapamycin: activity, specificity, and enzyme inhibition as studied by a high capacity assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 304–10. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.117>
- Turke, A. B., Song, Y., Costa, C., Cook, R., Arteaga, C. L., Asara, J. M., & Engelman, J. A. (2012). MEK Inhibition Leads to PI3K/AKT Activation by Relieving a Negative Feedback on ERBB Receptors. *Cancer Research*, 72(13), 3228–3237. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3747>
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., & Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of Biological Chemistry*, 269(7), 5241–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106507>
- Walker, E. H., Pacold, M. E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P. T., Wymann, M. P., & Williams, R. L. (2000). Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Molecular Cell*, 6(4), 909–919. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00089-4](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00089-4)
- Wang, C.-C., Cirit, M., & Haugh, J. M. (2009). PI3K-dependent cross-talk interactions converge with Ras as quantifiable inputs integrated by Erk. *Molecular Systems Biology*, 5, 246. <http://doi.org/10.1038/msb.2009.4>
- Wolf, J., Dronov, S., Tobin, F., & Goryanin, I. (2007). The impact of the regulatory design on the response of epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction towards oncogenic mutations. *FEBS Journal*, 274(21), 5505–5517. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06066.x>
- Yamamoto, T., Kyo, M., Kamiya, T., Tanaka, T., Engel, J. D., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2006). Predictive base substitution rules that determine the binding and transcriptional specificity of Maf recognition elements. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 11(6), 575–91.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00965.x>

Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(2), 127–37.

<http://doi.org/10.1038/35052073>

Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510. Retrieved from

<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.245>

Березин, И. В., & Варфоломеев, С. Д. (1979). *Биокинетика*. Москва: Наука.

Волькенштейн, М. В. (1988). *Биофизика*. Москва: Наука.

Иваницкий, Г. Р., Кринский, В. И., & Сельков, Е. Е. (1978). *Математическая биофизика клетки*. Москва: Наука.

Рубин, А., Пытьева, Н., & Ризниченко, Г. (1987). *Кинетика биологических процессов*. Москва: Изд-во МГУ.