Network modules as novel molecular disease definitions for precision theranostics

Citation for published version (APA):

Nogales Calvo, C. (2021). *Network modules as novel molecular disease definitions for precision theranostics*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Ridderprint.
<https://doi.org/10.26481/dis.20211216cn>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20211216cn](https://doi.org/10.26481/dis.20211216cn)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Current pharmacological interventions are not precise. Reactive oxygen species (ROS), for instance, have been associated with many disease phenotypes yet antioxidant therapy to scavenge ROS remains clinically irrelevant. Instead, **the field has shifted towards pharmacological modulation of the enzymatic ROS sources, targeting the causal disease mechanism** (Chapter 2). This causal disease mechanism is most certainly a signalling network or a disease module better targeted by a network pharmacology therapeutic approach. Indeed, there is a need for mechanism-based disease redefinitions and diagnostic tools to stratify patients according to the causal pathomechanism. Several methods have been described to measure ROS-induced damage, among which, proteins easily measurable in blood or plasma, can accurately act as a rich source of biomarkers and identify different disease pathomechanisms. Starting from an anti-nitrotyrosine antibody panel, **lactate dehydrogenase B was found physiologically nitrated** and, surprisingly, **the identified nitrated amino acid residue was a tryptophan and not a tyrosine** (Chapter 3). This nitrated condition was also found to be exacerbated under cardiac metabolic stress, and thus it could also be considered as a cardiovascular biomarker of ROS causal diseases.

In search of novel disease mechanisms for ROS-related disease states or ROSopathies, **unbiased network approaches** were explored starting from clinically validated seeds (Chapter 4). While eight proteins remained unconnected, **twelve distinct hybrid signalling modules were identified**, containing elements of other canonical pathways and highlighting the need to reconsider how signalling has been addressed thus far. **A hybrid module including elements of ROS formation and cGMP signalling (ROCG)** connected several disease phenotypes into **one joined disease cluster in the human disease network**. This ROCG disease modules was then validated, revealing **an age-dependent NADPH oxidase 5 (NOX5) hypertension endotype** (Chapter 5). Indeed, NOX5 induced the uncoupling state of endothelial nitric oxide synthase through ROS formation, disrupting cGMP signalling and elevating blood pressure in a subset of hypertensive patients with elevated NOX5 levels.

Disease signalling modules are best modulated by multiple drugs, redirect-

ing the signalling pathway to the healthy state by targeting several key components of the network. To validate the therapeutic arm of the approach, **a network pharmacology drug combination was validated** targeting three elements within the ROCG disease module, through **(i) NOX inhibition, (ii) NOS inhibition, and (iii) soluble guanylate cyclase activation, in a comorbid diabetes-stroke in vivo model** (Chapter 6). Additionally, NOX5 was identified as the mechanistic cause of hemorrhagic transformation in diabetic stroked animals. This approach is also beyond the conceptual level. Different fields of medicine such as oncology or immunology have already incorporated some elements with relative success (Chapter 7). Thus, we here describe an emerging trend focused on **(i) new mechanism-based redefinition of diseases** and **(ii) theranostics strategies**, matching the causal disease mechanism; which further aims to increase the precision of pharmacological interventions and ultimately cure patients.

Resumen

Las intervenciones farmacológicas actuales están lejos de ser precisas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), por ejemplo, han sido vinculadas con multitud de enfermedades. Sin embargo, las terapias con antioxidantes, que recogen y limpian ROS, carecen de relevancia clínica alguna. Por el contrario, recientemente, las investigaciones científicas en este campo se han redirigido torno a **la modulación farmacológica de las enzimas causantes de ROS**, actuando sobre **el mecanismo causal de la enfermedad** (Capítulo 2). Este mecanismo es muy probablemente una red o módulo patológico que puede ser modulado con una terapia farmacológica en red. De esta forma, es necesario redefinir lo que llamamos enfermedad, de acuerdo a su causa mecanística. Además, es crucial desarrollar herramientas de diagnóstico para estratificar pacientes conforme al mecanismo patológico causal. Así, varios métodos han sido descritos para medir daño oxidativo, entre ellos, las proteínas son una rica fuente de biomarcadores que pueden reportar el estado patológico de un individuo. Tras testar un panel de anticuerpos contra nitro-tirosina, **la enzima lactato deshidrogenasa B apareció nitrada en condiciones fisiológicas** y, sorprendentemente, **el residuo nitrado encontrado fue un triptófano y no una tirosina** (Capítulo 3). Esta condición nitrada fue encontrada acentuada en condiciones de estrés metabólico cardíaco, y por lo tanto también podría ser considerado un potencial biomarcador de enfermedades originadas por ROS.

En nuestra búsqueda de mecanismos para enfermedades causadas por ROS o ROSopatías, **distintos métodos agnósticos en red fueron explorados**, comenzando con genes validados clínicamente (Capítulo 4). Mientras que ocho proteínas permanecieron desconectadas, **doce módulos híbridos distintos fueron identificados**, con elementos de otras clásicas rutas metabólicas y, destacando la necesidad de reconsiderar como la señalización celular ha sido estudiada hasta el momento. **Un módulo híbrido contiendo enzimas formadoras de ROS y elementos de la vía de señalización cGMP (ROCG)**, conectó distintas enfermedades en **un único grupo en la red de enfermedades humanas**. Este módulo ROCG fue validado, revelando **un endotipo de hipertensión causado por la enzima NADPH oxidasa 5 (NOX5) y dependiente de la edad** (Capítulo 5). Ciertamente, la NOX5 produce ROS que inducen el desacople la oxido nítrico sintasa (NOS) endotelial, rompiendo la señalización de cGMP y, elevando la presión sanguínea en un subgrupo de pacientes hipertensos con niveles de NOX5 elevados.

En cuanto a terapia, los módulos patológicos pueden ser modulados con múltiples fármacos, actuando sobre elementos claves de la red y, redirigiendo el estado de la ruta de señalización a un estado saludable. Para validar la rama farmacológica de este enfoque, **una combinación farmacológica en red fue validada**, actuando sobre tres elementos dentro del módulo patológico ROCG, **(i) inhibición de NOX, (ii) inhibición de NOS, y (iii) activación de guanilato ciclasa soluble, en un modelo in vivo comórbido de infarto cerebral y diabetes** (Capítulo 6). Adicionalmente, la NOX5 fue identificada como causa mecánica de la transformación hemorrágica en modelos animales diabéticos tras un infarto cerebral. Finalmente, el enfoque discutido en esta tesis está más allá del nivel conceptual. **Diferentes campos en medicina como oncología e inmunología ya han incorporado varios elementos con relativo éxito** (Capítulo 7). De esta forma, en estas páginas describimos una tendencia emergente centrada en **(i) redefinición de enfermedades de acuerdo a su mecanismo causal y (ii) estrategias teranósticas** de acorde a dicho mecanismo. Con ello pretendemos acentuar la precisión de las intervenciones farmacológicas y, final y fundamentalmente, curar pacientes.