

Нарушения процессов биосинтеза и дегградации белков при расстройствах аутистического спектра

**Трифонова Екатерина Александровна
Федеральный исследовательский центр ИЦиГ СО РАН**

Расстройства аутистического спектра являются отдельной группой дефектов развития с очень высокой генетической компонентой.

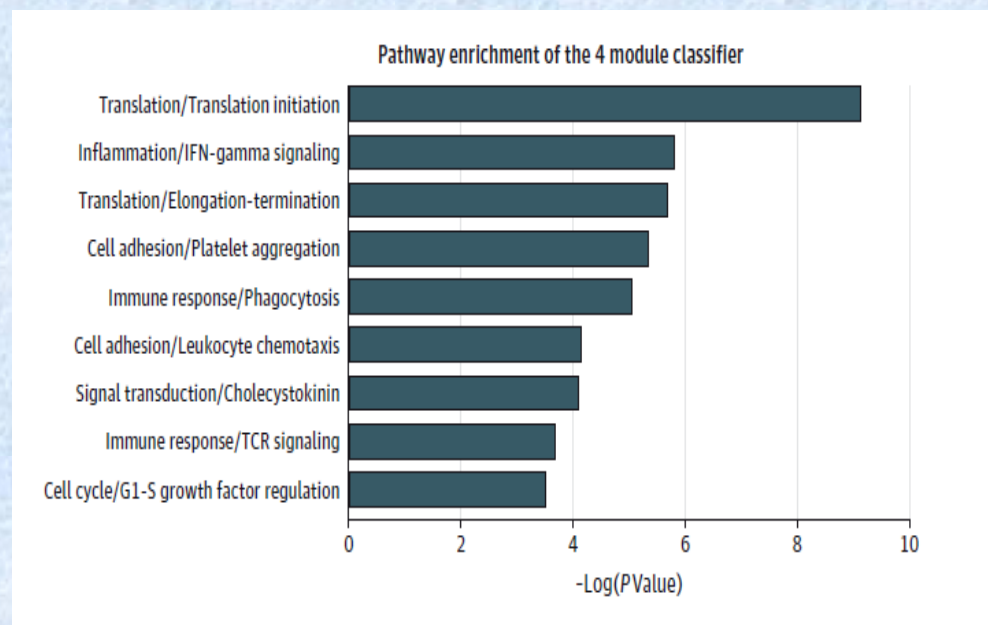
Частота постановки данного диагноза составляет около 1:50, для всех расстройств аутистического спектра. Рост частоты диагноза за последние 40 лет составил не менее 300%.

С развитием полноэкзомного секвенирования и его применения для анализа геномов аутистов стало ясно, что более 25% случаев РАС может быть объяснено моногенными мутациями. Следовательно, около 70% случаев так называемого типичного аутизма имеют другую генетическую природу, возможно связанную с мутациями в некодирующих последовательностях ДНК.

Возможность диагностики аутизма по уровню экспрессии РНК в лейкоцитах

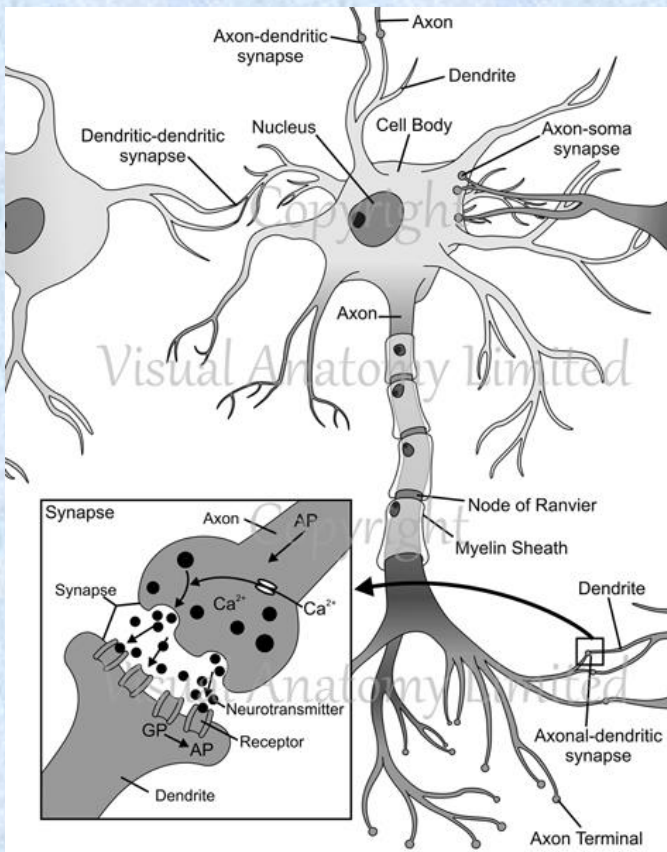
Была показана принципиальная возможность диагностики аутизма по анализу крови. Авторами были обнаружены достоверные различия в уровнях РНК, связанных с регуляцией инициации трансляции и иммунитета. Сравнения проводились как аутистов с нормотипичными детьми, так и аутистов с детьми с задержками развития и речи другого типа. Точность диагностики составила 83%, это так называемое proof-of-principle study.

JAMA Psychiatry. 2015;72(4):386-394.
doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.3008



Синапс

Синапс – это место электрохимической коммуникации между нейронами и необходимая субъединица для обучения и формирования памяти. Межнейронная коммуникативная связь пластична. Это означает, что сила синаптического соединения изменяется с течением времени.

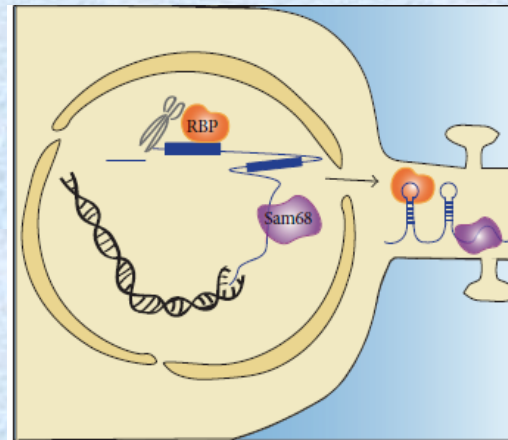
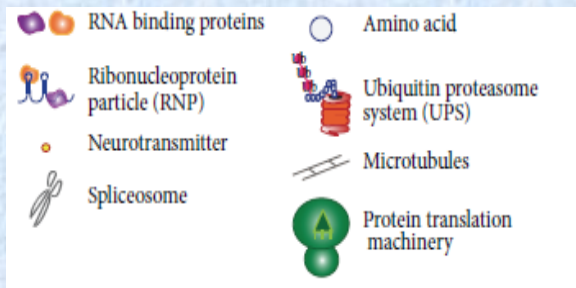


Наиболее стойкие формы синаптической пластичности сопровождаются изменениями в биосинтезе и деградации белка, как в теле нейронов, так и локально в дендритах. Как известно, биосинтез белка или трансляция – это тщательно регулируемый процесс, центральную роль в регуляции инициации трансляции играет механистическая или типичная для млекопитающих мишень для рапамицина mTOR (mammalian or mechanistic target of rapamycin).

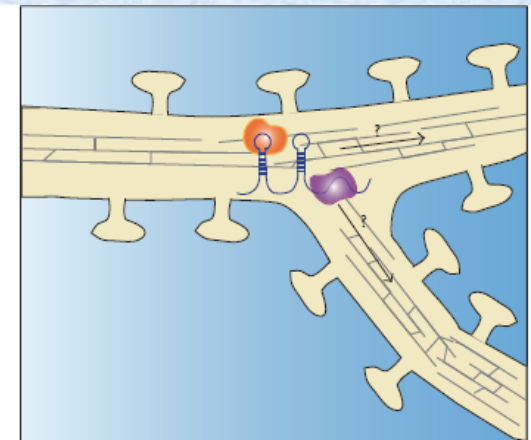
Транспорт мРНК из ядра нейронов в синапсы или дендриты

РНК-связывающие белки присоединяются к целевым РНК в ядрах нейронов. Белки распознают специальные последовательности в мРНК, направляющие их транспорт в дендриты вдоль микротрубочек. После стимуляции синапсов, судьба мРНК решается специфическим связывающим белком (Sam68 или FMRP). мРНК транслируется и быстро деградируется протеосомами

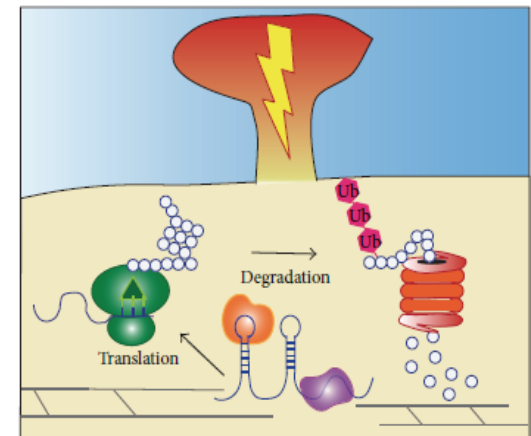
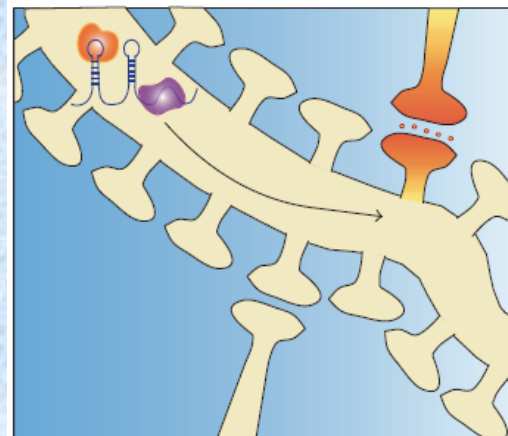
убиквитиновой системы.
Neural Plasticity V. 2016, ID 3857934, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3857934>



(a)



(b)



Приводящие к РАС мутации в генах, связанных с регуляцией трансляции

С нарушениями регуляции локальной трансляции в дендритах связаны следующие моногенные расстройства аутистического спектра: нейрофиброматоз 1-го типа, синдром Нунана, синдром Костелло, синдром Каудена, туберозный склероз, синдром ломкой X-хромосомы и синдром Ретта. Это далеко неполный перечень моногенных мутаций, связанных с регуляцией трансляции, которые приводят к РАС.

Gene	Disorder	Function
FMR1	Fragile X syndrome (ID, ASD)	Translation repressor
CYFIP1	ASD	Translation repressor
SYNGAP1	ID, ASD	Ras-MAPK negative regulator
NF1	Neurofibromatosis type 1 (ID)	Ras-MAPK negative regulator
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex (ID, ASD)	Rheb-mTOR negative regulator
PTEN	Cowden syndrome (ID, ASD)	PI3K-mTOR negative regulator
RPL10	ID, ASD	Ribosomal protein
RPS6KA2	ASD	Ribosomal p90 S6 kinase (MAPK pathway)
RPS6KA3	ID, ASD	Ribosomal p90 S6 kinase (MAPK pathway)
EIF4E	ASD	Initiation factor
EEF1A2	ASD/ID	Elongation factor
RBMS3	ASD	RNA binding protein
HRAS	Costello syndrome (ASD)	Ras GTPase
BRAF	Costello syndrome/Noonan syndrome (ID, ASD)	MAPK activator

Приводящие к РАС мутации в генах, связанных с протеосомами убиквитиновой системы

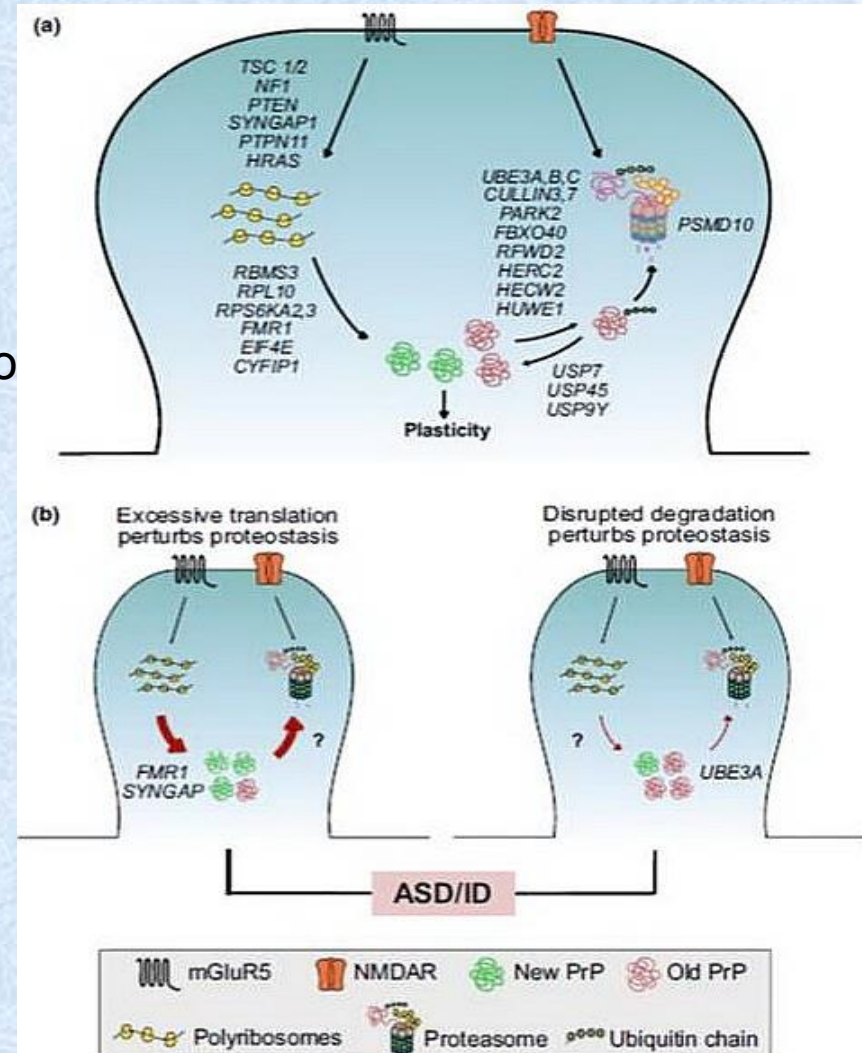
Процесс своевременной деградации белков очень важен для функционирования нейронов. Большинство белков ядра и цитоплазмы деградируется протеосомами убиквитиновой системы. Убиквитиновая система состоит из протеосомы, в которой выделяют регуляторную и каталитическую части, и трех типов убиквитин лигаз, которые метят белки, предназначенные для деградации. Самый известный синдром, связанный с мутацией в гене E3 убиквитин лигазы – это синдром Энгельмана (синдром счастливой куклы). Но мутаций в генах белков убиквитиновой системы, приводящих к РАС, гораздо больше.

J. Neurochem. (2016) 10.1111/jnc.13723

Gene	Disorder	Function
UBE3A	Angelman syndrome (ID, ASD), ASD	E3 ubiquitin ligase
UBE3B	ASD	E3 ubiquitin ligase
UBE3C	ASD	E3 ubiquitin ligase
UBR7	ID	E3 ubiquitin ligase
PARK2	ASD	E3 ubiquitin ligase
FBXO40	ASD	E3 ubiquitin ligase
RFWD2	ASD	E3 ubiquitin ligase
Cullin 3	ASD	E3 ubiquitin ligase
Cullin 7	ASD	E3 ubiquitin ligase
HECW2	ASD	E3 ubiquitin ligase
HERC2	ASD	E3 ubiquitin ligase
HUWE1	ID, ASD	E3 ubiquitin ligase
UBL7	ASD	Ubiquitin binding protein
PSMD10	ASD	Proteasome protein
USP9Y	ASD	De-ubiquitinase
USP45	ASD	De-ubiquitinase
USP7	ASD	De-ubiquitinase

Нарушения регуляции биосинтеза и деградации белков в синапсе при РАС

Для нормального развития и работы синапса необходима высокоточная регуляция как локальной трансляции, так и убиквитиновой системы деградации белков. Например, поздняя фаза долговременной потенциации (L-LTP) для своего правильного протекания требует как локального биосинтеза белка, так и убиквитиновой системы деградации. Известно, что убиквитиновая система деградации регулирует следующие важные для работы синапсов белки: PSD-95, Shank, NMDARs, AMPARs, mGluR1/5 и другие рецепторы.



Нарушения структуры и функций синапсов, связанные с измененным биосинтезом и деградацией белков

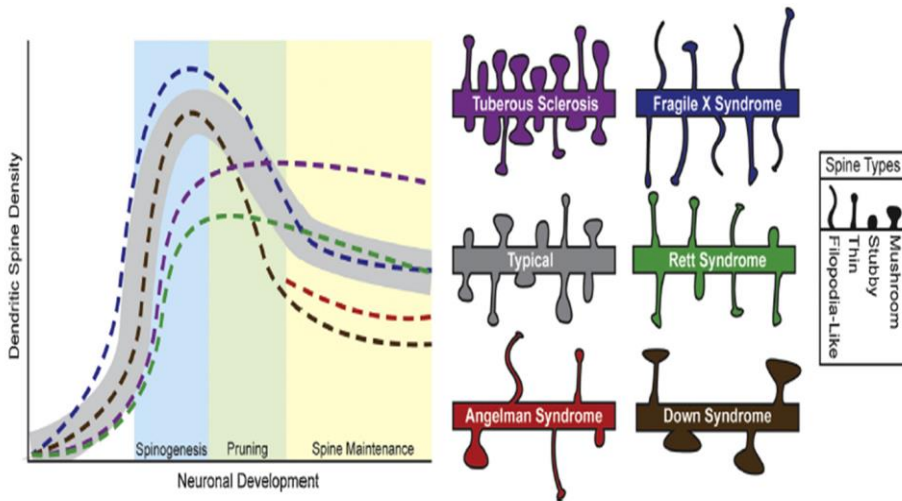
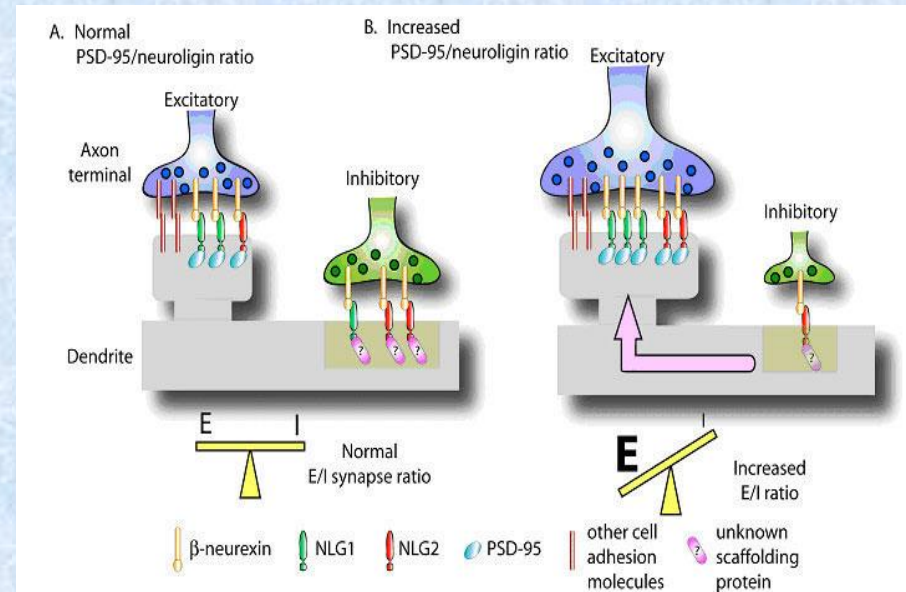


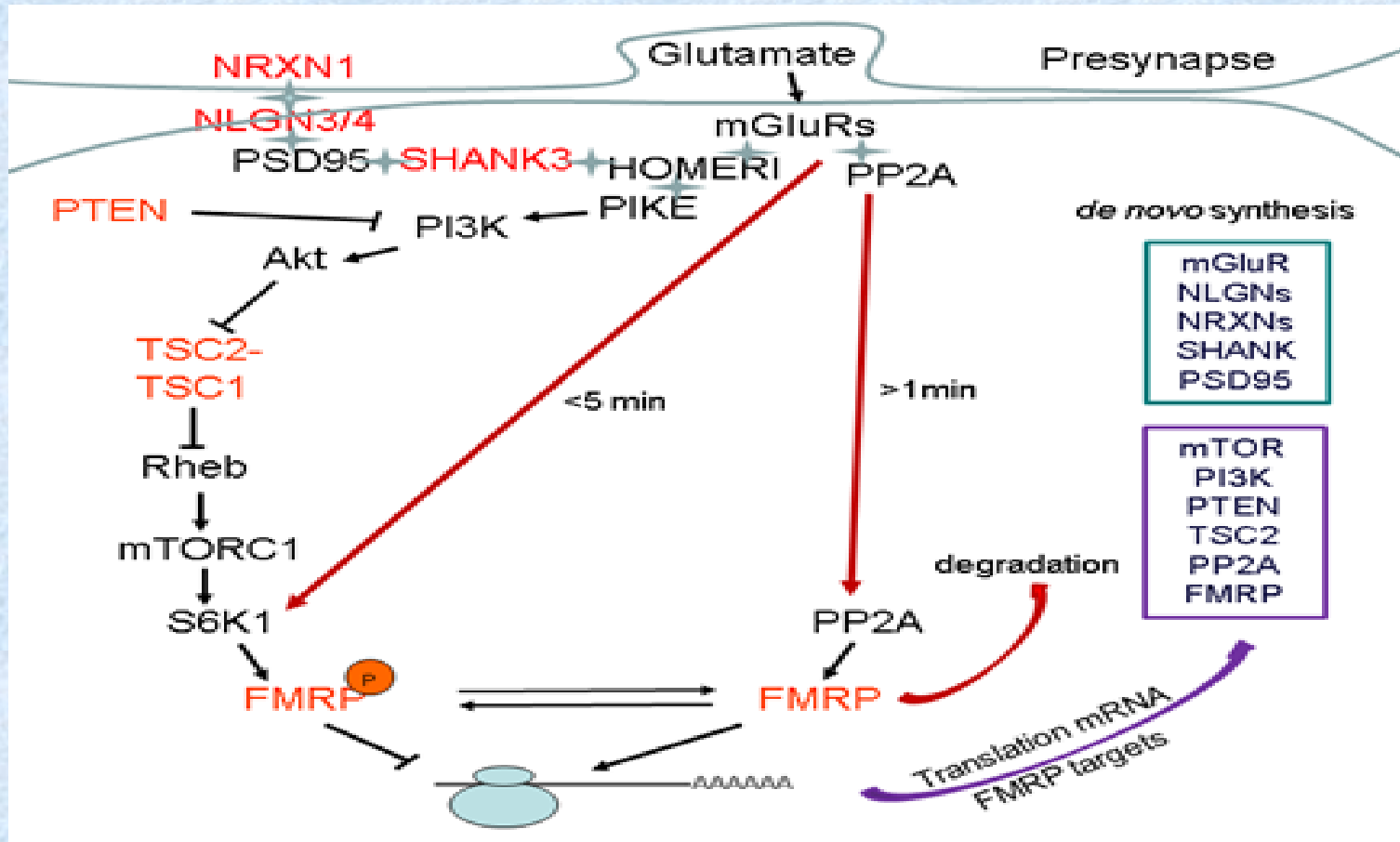
Fig. 1. Characterization of dendritic spines in autism related disorders.



Модификации дендритных шипиков при различных типах синдромного аутизма

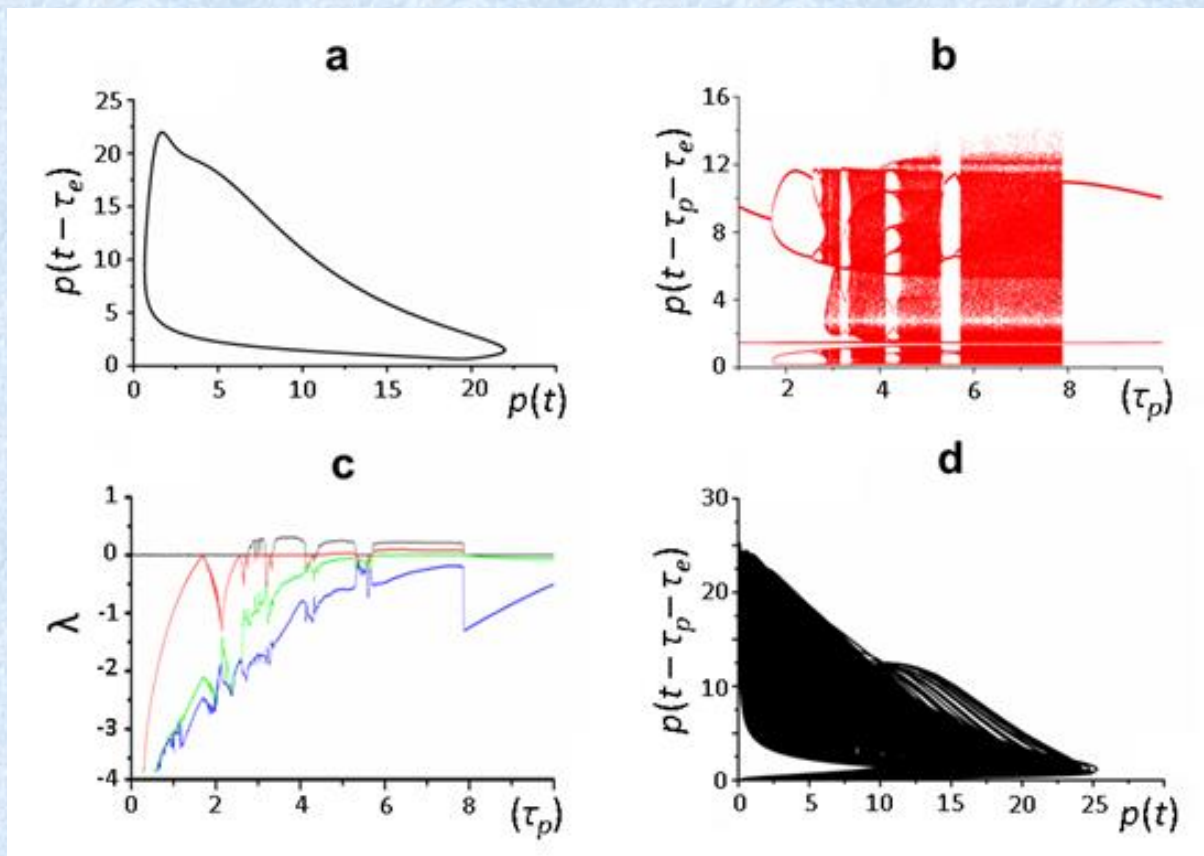
Нарушения соотношения возбуждения и торможения при гиперактивированном mTOR

Сигнальные пути регуляции локальной трансляции в ответ на стимуляцию mGluR рецепторов в глутаматергическом синапсе



Красным отмечены белки, мутации в генах которых ассоциируются с РАС. В бирюзовой рамке список структурных белков синапса, а в сиреневой – белков, компонентов mTOR сигнального пути, мРНК которых являются мишенью FMRP.

Анализ динамических свойств модели в зависимости от параметров передачи сигнала



а) периодическое решение при $\tau_p = \tau_d = 0$; б) бифуркационная диаграмма, построенная при пересечении траектории $(p(t), p(t - \tau_p - \tau_e))$ с плоскостью Пуанкаре $p(t) = 10$; в) значения старших показателей Ляпунова в зависимости от параметра запаздывания τ_p ; г) гиперхаос при $\tau_p = \tau_d = 7$

Что помогли узнать об аутизме эксперименты на модельных животных?

- Туберозный склероз – это моногенное расстройство, связанное с мутацией в одном из аллелей *TSC1* (9q34) или *TSC2* (16p13.3), расстройство часто сопровождается умственной отсталостью, аутизмом и эпилепсией. Для изучения данного заболевания были созданы трансгенные модельные мыши *Tsc2+/-*, которые продемонстрировали дефекты обучаемости и памяти, характерные для аутизма. На этих животных впервые была продемонстрирована обратимость аутизма, то есть поведение мышей значительно улучшалось даже во взрослом состоянии после терапии рапамицином.
- Экспрессия гена *PTEN* была нокаутирована в нейронах аудиокортекса Cre-опосредованной рекомбинацией у мышей. Полученные модельные мыши продемонстрировали гиперконнективность слуховой коры. Было высказано предположение, что гиперконнективность коры головного мозга может быть конечным результатом всех генетических нарушений, приводящих к аутизму. Было показано, что 10 дней терапии рапамицином нормализует проводимость аудиокортекса.



Возможные следствия ключевой роли гиперактивации mTOR в формировании РАС

- Эксперименты показали, что сигнальный путь mTOR также связан с индуцируемыми пищевой аллергией поведенческими и иммунологическими нарушениями. У орально сенсibilизированных модельных мышей была вызвана аллергия на молочную сыворотку, которая приводила к снижению социального взаимодействия и увеличению стереотипного поведения. Активация mTOR была выявлена в кишечнике и в мозгу данных модельных животных и, как и в случае с аутизмом, рапамицин снимал как поведенческие, так и иммунологические проявления аллергии на молочный белок.
- Иммунологи, занимающиеся проблемой Т-лимфоцит-обусловленного иммунитета, продемонстрировали, что в норме слегка ингибированный mTOR поддерживает гомеостаз Т-лимфоцитов. Однако распознавание антигена «необученным» Т-лимфоцитом приводит к немедленной активации mTOR и последующему дифференцированию этих клеток в определенный тип лимфоцитов-эффекторов. Очевидно, что в таком случае вакцинация, как и любая тяжелая инфекция, являются сильными индукторами mTOR.
- Тепловой шок или гипертермия являются хрестоматийными ингибиторами трансляции, в условиях теплового шока вновь синтезированные белки могут принять неправильную форму и нанести вред клетке. Известный феномен повышения адекватности у многих аутистов при высокой температуре получает логичное объяснение стресс-ингибированием mTOR.

Возможные следствия ключевой роли гиперактивации mTOR в формировании РАС

- Нарушение соотношения возбуждения и торможения в определенных отделах мозга пациентов с РАС следует учитывать в ходе лечения. В частности, абсолютно недопустимым является применение клозапина (атипичный нейролептик), из-за очень высокой вероятности появления такого побочного эффекта, как судорожные приступы.
- Нейролептики рисперидон и арипипразол являются рекомендованными препаратами для коррекции поведенческих нарушений при аутизме и назначаются детям с раннего возраста, часто к 18 годам ребенок уже 5 или 10 лет непрерывно принимает эти препараты. Одним из самых тяжелых последствий приема длительных курсов нейролептиков является поздняя дискинезия. Для детей риск получить побочные эффекты в виде гиперкинезов составляет 16,1% для рисперидона и 27,3% для арипипразола. Показано, что по крайней мере L-ДОФА индуцированная дискинезия связана с гиперактивацией mTOR. В настоящее время крайне мало исследований долгосрочного применения нейролептиков пациентами с РАС, и, исходя из молекулярных механизмов поздней дискинезии и РАС, связанных с гиперактивацией mTOR, можно предсказать крайне большой процент осложнений в виде дискинезов у таких пациентов. Назначение нейролептиков должно быть сведено к минимуму.

Можно ли изучать аутизм на модельных мушках-дрозофилах?

- Использование *Drosophila* как модели для изучения функционирования мозга в норме и при патологии сейчас становится все более популярным в связи появлением цифровых технологий для регистрации и анализа нарушений поведения такого мелкого объекта, как плодовая мушка.
- Мозг *Drosophila*, состоящий приблизительно из 100 000 нейронов, относительно мал, но при этом достаточно сложен для создания удовлетворительных моделей. Так, 75% генов человека, ассоциированных с определенными болезнями, имеют гомологичные последовательности у *Drosophila*.
- По сравнению с модельными млекопитающими, создание мутантов *Drosophila* и дешевле, и быстрее, более того, существуют открытые базы данных и стоки мутантов, которые постоянно и быстро пополняются.



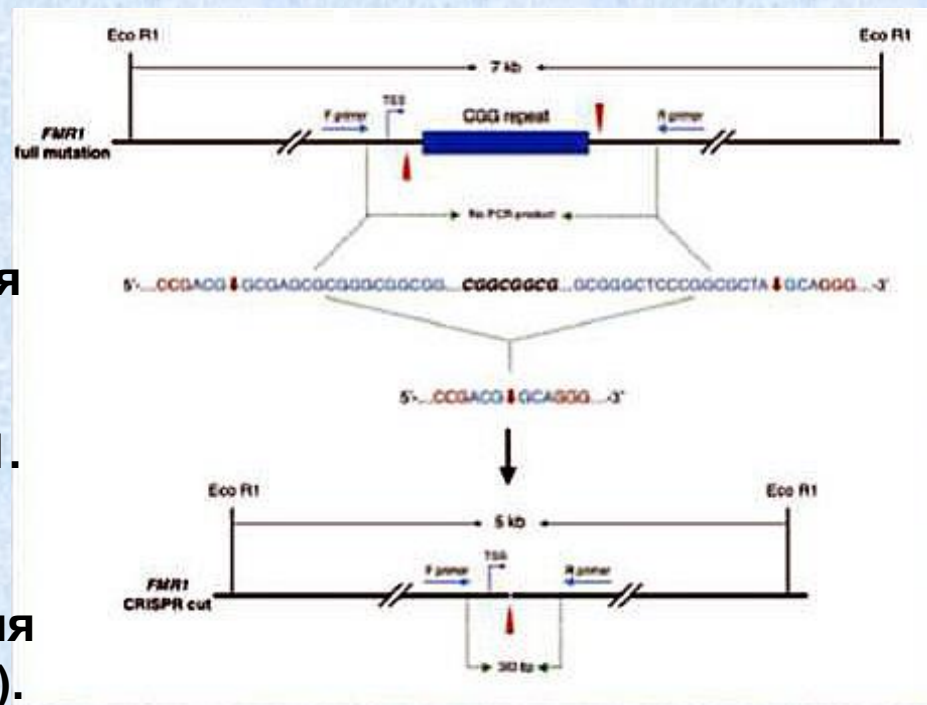
Воспоминания о будущем: как это должно быть

- Каждый ребенок при рождении, а лучше еще до рождения, получает полную расшифровку своего генома.
- При идентификации в геноме мутаций в генах, определяющих предрасположенность к аутизму, родители получают необходимые инструкции о возможности ранней коррекции поведенческих нарушений.
- Перед проведением прививок таким детям проводят тесты на гиперактивацию mTOR и другие возможные нарушения метаболизма.
- При невозможности улучшить состояние и прогнозы на будущее для ребенка совместным применением медикаментозной и АВА-терапии, а также для сложных мутаций типа хрупкой X-хромосомы и синдрома Ретта, рассматривается вариант генной терапии путем редактирования генома. Самой многообещающей системой редактирования генома на сегодня является CRISPR/Cas9, но будущее непредсказуемо.

Реактивация биосинтеза белка FMR1 после удаления расширенной области повтора CGG с помощью системы редактирования генома CRISPR / Cas9 при синдроме ломкой X-хромосомой

Авторы предположили, что иссечение расширенной области CGG-повтора при полной мутации в нетранслируемой области гена FMR1 приведет к постоянной реактивации транскрипции и трансляции этого гена.

Была использована соматическая гибридная клеточная линия (Y75), которая содержала одну человеческую X-хромосому (ломкий вариант) в СНО линии клеток грызунов. После удаления CGG-повтора около половины колоний этой клеточной линии восстановили транскрипцию и трансляцию гена FMR1. Такой же эксперимент был проделан с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками человека, но доля реактивации гена был ниже (около 20%).



**Выражаю свою благодарность сотрудникам
ФИЦ ИЦИГ СО РАН и ИМ СО РАН, которые
принимали участие в работе**

Лихошвай В.А., д.б.н.;

Хлебодарова Т.М., д.б.н.;

Гайнова И.А., к.ф.-м.н.

Спасибо за внимание

