

УДК 577.25;577.151;616.89-008.48

## СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ БЕЛКОВОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ПРИ АУТИЗМЕ (С АКЦЕНТОМ НА ПУТЬ mTOR)

### Обзор

© 2021 И.С. Бокша<sup>1,2\*</sup>, Т.А. Прохорова<sup>1</sup>, Е.Б. Терешкина<sup>1</sup>,  
О.К. Савушкина<sup>1</sup>, Г.Ш. Бурбаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», 115522 Москва, Россия; электронная почта: boksha\_irina@mail.ru

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи  
Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: boksha\_irina@gamaleya.org

Поступила в редакцию 18.12.2020

После доработки 18.03.2021

Принята к публикации 22.03.2021

Сигнальный каскад протеинкиназы mTOR является центральным регулятором клеточного метаболизма, роста и выживания клеток в ответ на гормоны, факторы роста, питательные вещества и сигналы, вызванные стрессом. Цель обзора: на основе анализа современной литературы продемонстрировать, как часто встречаются молекулярные аномалии сигнального пути mTOR и сопряжённых с ним сигнальных путей при расстройствах аутистического спектра (РАС), а также наметить возможные перспективы патогенетически-ориентированного фармакотерапевтического воздействия, особенно при синдромных РАС. На основе анализа экспериментальных и клинических данных предполагается, что наиболее раннему выявлению молекулярных аномалий в группе риска РАС могут способствовать исследования тромбоцитов периферической крови. Поиск в этой группе временного «окна», в котором происходят критические нарушения регуляции активности описанных путей, может привести к более эффективной превентивной фармакотерапии аутизма.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** mTOR, сигнальные каскады, фосфорилирование белков, расстройства аутистического спектра.

DOI: 10.31857/S0320972521050031

### ВВЕДЕНИЕ

Аутизм, или расстройство аутистического спектра (РАС) – это нейроонтогенетическое

расстройство, в общем случае характеризующееся такими ключевыми симптомами, как качественное нарушение социального взаимодействия, коммуникации и ограниченное стерео-

Принятые сокращения: AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; APP – белок-предшественник бета-амиоида; KTC – комплекс туберозного склероза; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (синоним ERK); MeCP2 – метил-СrG-связывающий белок 2; MEK – киназа митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК/ERK); НФ1 – нейрофиброматоз первого типа; ППСК – плюрипотентные перепрограммированные стволовые клетки; РАС – расстройство аутистического спектра; И-РАС – идиопатические РАС; НС-РАС – несиндромные РАС; С-РАС – синдромные формы РАС; СА – синдром Ангельмана; СР – синдром Ретта; ФМС – синдром Фелан–МакДермид; Х-ФРА – синдром ломкой («фрагильной») X-хромосомы; Akt – RAS-alpha серин-треониновая протеинкиназа; Arg – ассоциированный с цитоскелетом белок; BDNF – нейротрофический фактор мозга; CDKL5 – киназа, подобная циклинзависимой киназе 5; eIF4 – эукариотический фактор инициации трансляции 4; E/I – соотношение возбуждения/торможения; ERK – активируемая внеклеточными сигналами киназа (синоним MAPK); 4E-BP1 – eIF4E-связывающий белок 1; FMRP – белок, ассоциируемый с синдромом ломкой X-хромосомы; IGF-1 и IGF-2 – инсулиноподобные факторы роста; LTP – долговременная (длительная) потенциация; mGluR, mGluR1 и mGluR5 – метаботропный глутаматный рецептор и его подтипы 1 и 5; mLST8 – ассоциированный с mTOR белковый гомолог LST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8); MNK – взаимодействующая с MAPK киназа; mTOR – протеинкиназа, механистическая мишень рапамицина у млекопитающих; NF1 – белок нейрофибромин; NGF – фактор роста нервов; NMDA – N-метил-D-аспартат; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PTEN-РАС – синдром, связанный с мутацией гомолога фосфатазы и тензина; pAkt<sup>Ser473</sup> – Akt, фосфорилированная по Ser473; p70S6K1 – киназа 1 рибосомного белка S6; Ras – семейство малых ГТФаз, участвующих в передаче сигнала в животных клетках (от Rat sarcoma); Rheb – гомолог Ras в мозге; SGK1 – индуцируемая сывороткой и глюкокортикоидами киназа 1; SHANK3 – содержащий SH3-домен и множественные анкириновые повторы белок 3; TSC1 и TSC2 – белки комплекса туберозного склероза (гамартин и туберин); UBE3A – убиквитин-протеиновая лигаза E3A; Wnt – группа путей передачи сигналов, начинающихся от белков, передающих сигналы в клетку от рецепторов на её поверхности.

\* Адресат для корреспонденции.

типное поведение. РАС чрезвычайно гетерогенны с точки зрения их генетической основы и, соответственно, этиологии и патогенеза. Во всём мире диагностика и классификация РАС в настоящее время основана на клинических наблюдениях (оценке тяжести симптомов психиатрами), в случае синдромных форм РАС выявить и идентифицировать их причину помогают медико-генетические анализы. Недавно в Российской Федерации благодаря иммунологическим и электрофизиологическим исследованиям особенностей пациентов с разными формами РАС появились возможности практического применения выявленных «биомаркёров» в поддержку клиническим диагностическим критериям РАС [1, 2]. Достижения в области генетики аутизма только вступают в фазу перехода к практическому клиническому применению [3, 4].

За исключением синдромных форм РАС (С-РАС), когда аутистическое поведение связано с определенным медицинским синдромом, обусловленным известной генетической (хромосомной) аномалией, в большинстве случаев генетические и иные причины, обуславливающие фенотипическое проявление аутистических симптомов, остаются неясными и требуют дорогостоящего анализа генома, а для разработки «биомаркёров» требуются дополнительные биохимические исследования.

Ввиду отсутствия как ясного понимания этиологии, патогенеза, так и классификации РАС (особенно расстройств, не относящихся к С-РАС) с биохимической точки зрения, фармакологическое воздействие сводится в большинстве случаев к поддержке ноотропами, а в случае психотических форм — к симптоматическому лечению антипсихотиками [1, 2], хотя, безусловно, необходима разработка препаратов, воздействующих на уже намеченные, открытые патогенетические пути.

Написание данного обзора вызвано необходимостью обобщения современных результатов исследования регуляторных сигнальных каскадов белкового фосфорилирования при РАС, поскольку в этом направлении достигнут определенный прогресс в изучении вклада этих путей в развитие аутистических симптомов при С-РАС и ведется поиск фармакологических препаратов.

Обзор сфокусирован на каскаде mTOR, поскольку из всех систем белкового фосфорилирования этот путь наиболее исследован при РАС, его можно считать центральным, и к нему «сходятся» данные, полученные при изучении С-РАС и свидетельствующие о том, что при РАС изменена как активность его регуляторов, т.е.

компонентов «выше по течению», так и его мишеней («ниже по течению» — факторы белковой трансляции) [5]. В обзоре оценены результаты исследований сигнального каскада mTOR и сопряженных с ним биохимических путей — как с точки зрения понимания патогенеза РАС, так и с точки зрения поиска препаратов, действующих на компоненты этого каскада и сопряженные с ним пути (его мишени), а также намечены пути исследований, которые авторы считают перспективными.

### **СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ mTOR — КОНВЕРГЕНЦИЯ СИНДРОМНЫХ РАС И НЕ АССОЦИИРОВАННЫХ С СИНДРОМАМИ ФОРМ РАС**

Известно, что сигнальный каскад mTOR функционирует как интегратор молекулярных систем по поддержанию взаимодействия организма и клеток с окружающей средой. Путь mTOR регулирует гомеостаз, влияя на синтез белка, транскрипцию, метаболизм, процессы аутофагии, биогенеза органелл, участвует в процессах, поддерживающих иерархическую целостность функционирования мозга, включая дифференцировку и пролиферацию клеток нервной системы, организацию и поддержание проводящих путей, обеспечивающих пластичность, связанную с обучением, и регуляцию сложного поведения [6]. Поэтому дисфункцию mTOR можно рассматривать как основополагающую причину ряда моногенных расстройств и как важный патогенетический фактор различных неврологических, нейродегенеративных и психических расстройств [7]. Далее будет оценено состояние исследований mTOR при РАС.

### **СИНДРОМНЫЕ, НЕСИНДРОМНЫЕ И ИДИОПАТИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА**

Фенотипические (клинические) проявления патологии нервной системы, выражающиеся как аутизм, или аутистические симптомы, сильно варьируют по выраженности и степени тяжести. Такая варибельность определяется различным вкладом в развитие патологии как генетических нарушений, так и факторов воздействия внешней среды [8].

В настоящее время принято деление по этиологии РАС на синдромные РАС (С-РАС), которые связаны с описанными клиническими синдромами и обусловлены открытыми генетическими аномалиями (так называемые генети-

ческие заболевания), несиндромные РАС (НС-РАС), не связанные с этими синдромами, но обусловленные также выявленными генетическими причинами, и идиопатические РАС (И-РАС), генетические и другие причины которых не установлены [9]. В качестве возможных причин развития И-РАС рассматриваются пренатальные воздействия (например, влияние на развитие плода токсинов, некоторых лекарственных препаратов, инфекции) и постнатальные факторы риска нарушения развития нервной системы (например, социальная и/или сенсорная депривация), а также пока не выявленные генетические и/или эпигенетические факторы [8].

С генетической и биохимической точек зрения С-РАС изучены лучше, чем НС-РАС, и значительно лучше, чем И-РАС [4].

К С-РАС относят заболевания с генетически установленными причинами (генетические болезни), при которых наблюдаются симптомы аутизма: редкое моногенное заболевание — комплекс туберозного склероза (КТС) и КТС-ассоциированная мегалэнцефалия и симптоматический эпилептический синдром, синдром ломкой («фрагильной») X-хромосомы (X-ФРА), синдром Ретта (СР), синдром Ангельмана (СА), синдром, связанный с аномалией гомолога фосфатазы и тензина (PTEN-РАС), нейрофиброматоз первого типа (НФ1), синдром Тимоти, Ульриха—Нунан, синдром делеции 22q13.3 и ряд других относительно редких расстройств нейронотогенеза, покрываемых спектром РАС.

Хотя С-РАС охватывают лишь 5–10% всех случаев РАС, их изучение внесло большой вклад в понимание молекулярных основ возникновения аутистических симптомов. С другой стороны, в случаях РАС, не связанных с перечисленными С-РАС, разнообразные (в частности, биохимические) причины развития аутизма остаются неясными, и за прошедшие 15 лет с момента публикации обзора на эту тему прогресс наметился лишь в недавнее время [10, 11].

Оценки вклада генетического компонента в развитие НС-РАС и И-РАС варьируют от 40 до 90%, в зависимости от принимаемых во внимание параметров [3, 12–14].

Геномные технологии вкупе с обследованием больших когорт пациентов позволили выявить обилие редких вариантов, имеющих отношение к развитию РАС, причём связанными с НС-РАС оказались и несколько относительно редких мутаций *de novo*. На интернет-ресурсах рабочей группы по аутизму Психиатрического Геномного Консорциума (<https://www.med.unc.edu/pgc/pgc-workgroups/autism-spectrum-disorder/>) и Инициативы по исследованию ау-

тизма фонда Simons (Simons Foundation Autism Research Initiative — <https://gene.sfari.org>) обобщён и опубликован список генов, ассоциированных с риском РАС, ранжированный по четырём категориям — S (С-РАС) и 1–3: в категории S — гены, ассоциированные с С-РАС, в категории 1 — гены с подтверждённой ассоциацией с РАС, в категории 2 — «сильные кандидаты», в категории 3 — «предположительно гены-кандидаты». Список составлен на основе частоты встречаемости сообщений об исследованиях в литературе и воспроизводимости/подтвержденности данных. Но ни одна мутация в этих генах не обуславливает более чем 1–2% случаев НС-РАС, а все вместе формы НС-РАС, обусловленные мутациями в высоко пенетрантных генах, представляют около 10–20% всех случаев, что свидетельствует о крайне высокой степени генетической гетерогенности НС-РАС.

Несмотря на высокую степень клинической и генетической гетерогенности, описаны некоторые механизмы, общие для С-РАС и НС-РАС, и наблюдается конвергенция в нескольких генетических мутациях, сходящихся к ключевым биохимическим путям. Так, по данным широкомасштабных геномных и транскриптомных исследований, с риском РАС связаны сигнальные каскады белкового фосфорилирования с участием фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), RAC- $\alpha$  серин-треониновой протеинкиназы (Akt) и протеинкиназы mTOR, т.е. пути PI3K/Akt/mTOR, а также сигнальный каскад фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора мозга (BDNF), MAPK/ERK, сигнальный путь Wnt (группа путей передачи сигналов, начинающихся от белков, передающих сигналы в клетку от рецепторов на ее поверхности), а также Ca<sup>2+</sup>-кальмодулина [15].

Сигнальный путь Wnt вносит вклад в клеточную дифференцировку, полярность, пролиферацию клеток, и нарушение его регуляции ведёт к развитию определенных типов РАС. Сигнальные каскады MAPK/ERK связаны более чем с 20 функциональными путями и 22 генами, ассоциированными с РАС [16]. Активация NGF-индуцируемого сигнального пути ведёт к существенному снижению концентрации белка 4E-BP1 и фактора инициации трансляции eIF4E и связана с развитием окислительного стресса у пациентов с РАС. Со степенью окислительного стресса при РАС также связана активность сигнального каскада белкового фосфорилирования mTOR, которому в данном обзоре уделено особое внимание.

Сигнальный каскад mTOR — один из центральных биохимических путей конвергенции при разных РАС, он служит критическим регу-

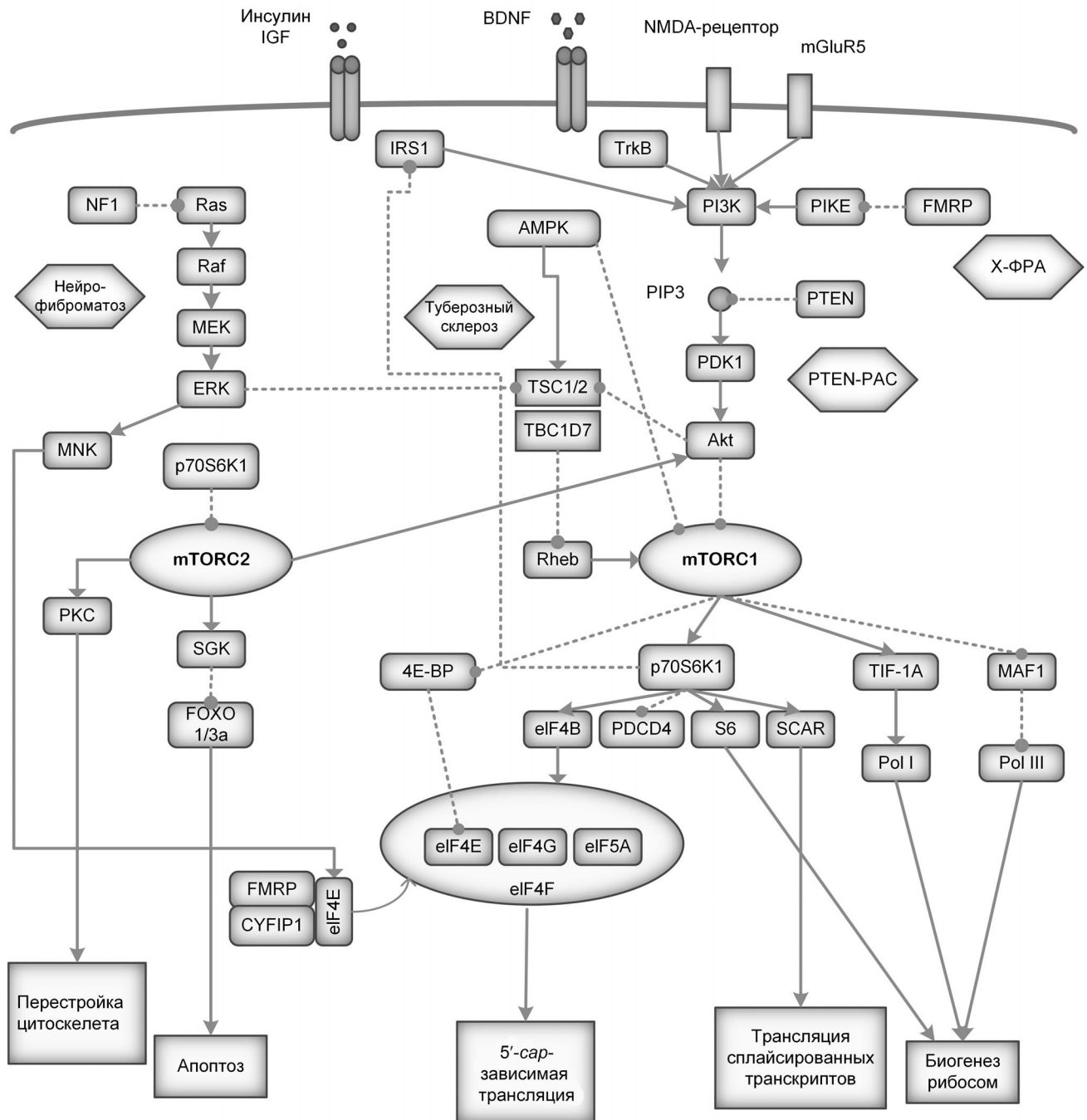


Схема сигнального каскада mTOR и сопряженных с ним путей. Схема составлена на основании вышедших недавно публикаций [17–20]

лятором белковой трансляции и влияет на множество функций в развивающемся и зрелом организме [12]. Сигнальные каскады митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и Wnt также конвергируют на сигнальном каскаде mTOR [17] (рисунок). Приведенная на рисунке схема составлена на основании вышедших недавно публикаций [17–20].

Ключевой фермент в каскаде mTOR – киназа mTOR. Это белок, гомологичный дрожжевому белку TOR, серин-треониновая (Ser/Thr) протеинкиназа (~ 289 кДа), член семейства РІКК млекопитающих. mTOR входит в состав двух функционально различающихся комплексов: mTORC1 и mTORC2, подробно освещённых в обзорах ранее [17, 19, 20].

Активность комплекса mTORC1 подавляется рапамицином (фунгицидом микробиологического происхождения), поэтому белок mTOR получил название «мишень рапамицина у млекопитающих» [17]. Механизм действия рапамицина подробно рассмотрен в обзоре Pupyshv et al. [21] и других цитированных публикациях.

### СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ mTOR И СОПРЯЖЁННЫЕ С НИМ КАСКАДЫ

Комплекс mTORC1 содержит, кроме фермента mTOR, регуляторные белки Raptor (связывающий рапамицин), mLST8 (ассоциированный с mTOR белковый гомолог LST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8)), PRAS40 (40 кДа, обогащённый пролином субстрат Akt), Deptor (содержащий DEP-домен белок, взаимодействующий с mTOR) и ещё несколько белков [19]. Raptor необходим для внутриклеточной локализации mTORC1, он также рекрутирует субстраты mTORC1, связываясь с сигнальной последовательностью mTOR, которая представлена на канонических субстратах mTOR, таких как белки, регулирующие трансляцию (например, pS70S6K и 4EBP-1) и аутофагию (Ulk1). Рапамицин в присутствии FKBP12 (FK506-связывающего белка 12) подавляет связывание Raptor с mTOR и подавляет катализируемое mTOR фосфорилирование Raptor-зависимых субстратов, но не влияет на каталитическую активность mTOR. mLST8 предположительно стабилизирует киназный домен mTOR, а PRAS40 и Deptor являются ингибиторами активности mTORC1 [19].

Комплекс mTORC2 содержит, кроме mTOR, белки mLST8, Deptor (те же, что и mTORC1), а также mSIN1 (индуцируемый стрессом взаимодействующий с протеинкиназой белок млекопитающих), Rictor (нечувствительный к рапамицину компонент) и Protor-1/2 (белок, наблюдаемый в ассоциации с Rictor-1/2). В отличие от mTORC1, активность mTORC2 не ингибируется рапамицином, но при хроническом воздействии рапамицина активность mTORC2 подавляется, что вызвано, как предполагают, истощением пула mTOR [22]. О комплексе mTORC2 известно значительно меньше, чем о mTORC1, но он (посредством мишеней Akt, SGK1, PKC) регулирует анаболические процессы, процессы организации и поддержания целостности цитоскелета, апоптоза и ионного транспорта (рисунок) [17, 23]. Стимуляция mTORC2 ведёт к перестройке организации цитоскелета (при посредстве активации PKC), а механизмы выживания

клеток реализуются посредством индуцируемой сывороткой и глюкокортикоидами киназы 1 (SGK1) (рисунок) [23]. Кроме того, mTORC2 фосфорилирует Akt, активируя её и контролируя тем самым активность mTORC1 (рисунок).

Большинство известных неврологических и психических расстройств, в которых задействован mTOR, связывают с нарушением регуляции активности mTORC1 [24].

Рассмотрим ключевые моменты каскада, лежащие «выше» mTORC1. Активация mTORC1 инициируется различными факторами (в т.ч. NGF, PDGF, NF1 при посредстве ГТФазы Ras, BDNF и глутаматом при посредстве NMDA- и метаботропных глутаматных mGluR5-рецепторов), активирующими PI3K и образование ею фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3) (рисунок). Накопление PIP3 в цитоплазматической мембране стимулирует рекрутинг Akt, её фосфорилирование и активацию 3-фосфоинозитид-зависимой протеинкиназой 1 (PK1), а также фосфорилирование и активацию mTORC2. Будучи активированной, Akt фосфорилирует и ингибирует TSC2, который вместе с TSC1 и TBC1D7 (член 7 семейства белков, содержащих TBC-домен) образует белковый комплекс туберозного склероза (TSC). Комплекс TSC функционирует как ГТФаза (GAP) по отношению к белку Rheb (гомологу Ras в мозге), стимулируя превращение Rheb-GTP в Rheb-GDP и инактивируя этот белок. Следовательно, если ингибируется комплекс TSC1/2 под действием Akt, то активируется Rheb, который далее активирует mTORC1 [25]. Активность комплекса TSC1/2 может регулироваться несколькими сигнальными путями. Кроме пути PI3K/PDK1/Akt, TSC2 фосфорилируется и ингибируется киназами ERK и AMP-активируемой протеинкиназой (AMPK) (рисунок); Wnt также подавляет фосфорилирование TSC2 киназой гликогенсинтазы 3 альфа (GSK3 $\alpha$ ), что ведёт к стимуляции пути mTOR [26].

Один из главных сигнальных компонентов, находящихся непосредственно выше mTORC1 и активирующих его, — это Rheb. В норме белки TSC1/2 ингибируют Rheb и его мишень — mTORC1. Когда этот процесс, происходящий «выше по течению», подавлен (см. раздел Комплекс туберозного склероза), происходит гиперактивация mTORC1.

Ряд регуляторов действуют на активность mTORC1 при посредстве сигнального пути Akt. Так, активацию Akt, происходящую при посредстве PI3K, может подавлять NF1 при посредстве Ras (рисунок). Ещё один механизм активации mTORC1 — инактивация PRAS40 либо вслед-

ствии фосфорилирования протеинкиназой А, либо вследствие прямого фосфорилирования Akt по Thr246 и mTOR – по Ser183 [6].

Другая регуляторная молекула – PTEN – участвует в управлении активностью Akt и липидном сигналинге посредством регуляции уровня PIP3, синтезируемого PI3K. PTEN катализирует реакцию дефосфорилирования PIP3 до PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата), отщепляя фосфатные группы от PIP3, образованного PI3K. Дефосфорилирование PIP3 ингибирует сигнальный путь, опосредуемый Akt, и способствует апоптозу. Активация и фосфорилирование киназой PDK1 протеинкиназы Akt играет основную роль в инициации пути mTOR, т.к. Akt имеет мишенью белки комплекса TSC1/2 и тем самым регулирует активность mTORC1 [27].

Кроме киназ, есть и другие модуляторы активности mTORC1 и mTORC2, которые рассмотреть в данном обзоре не представляется возможным. Отметим лишь, что активность mTOR, как и всех протеинкиназ, конечно, зависит от уровня энергетического субстрата – АТФ (точнее, комплекса АТФ с ионами  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ ). То, что активность каскада mTORC1 контролируется MAPK/ERK и AMPK, еще раз подтверждает справедливость признания mTOR в качестве «сенсора» внутренних и внешних стимулов, который поддерживает клеточный гомеостаз, модулируя анаболические и катаболические процессы [19].

Что касается мишеней mTORC1, то в числе прочих процессов, mTORC1 стимулирует белковую трансляцию, активируя киназу 1 рибосомного белка S6 (p70S6K1) и ингибируя активность белков 4E-BP. В дефосфорилированном состоянии 4E-BP1 подавляет трансляцию, связывая эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E). При фосфорилировании киназой mTORC1 белки 4E-BP1 диссоциируют от фактора eIF4E, позволяя тому взаимодействовать и связываться с eIF4G и eIF4A с образованием комплекса инициации трансляции eIF4F, что является критическим этапом в *cap*-зависимой трансляции. Фосфорилирование p70S6K1 стимулирует киназную активность и усиливает фосфорилирование ею субстрата – рибосомного белка S6. Предполагают, что фосфорилирование S6 может стимулировать транскрипцию генов, вовлечённых в биогенез рибосом [5].

В нейронах сигнальный каскад PI3K/Akt/mTORC1 регулирует множество процессов (рост, выживание клеток, синтез белка, синаптическую пластичность, зависимость от глутаматных рецепторов NMDA-типа, рост и ветвление

дендритов) благодаря активации этого каскада факторами роста, включая BDNF, а также его стимуляции глутаматными рецепторами NMDA-типа и mGluR5 [28] (рисунок). Этот каскад и системы, с которыми он взаимодействует, особенно пути Wnt, MAPK/ERK, играют центральную роль в нейроонтогенезе и нейрональных функциях.

В литературе имеется много данных, указывающих на нарушение регуляции активности пути PI3K/Akt/mTOR при PAC. Наиболее убедительные прямые данные получены при исследовании моногенных C-PAC, обусловленных потерей или снижением функции генов *FMRP*, *PTEN*, *NF1*, *TSC1*, *TSC2* и *EIF4E*, продукты которых являются либо регуляторами самого каскада mTOR, либо его мишенями, либо компонентами путей, на которые он влияет. Hoeffler и Klann [29] отмечали, что вызванные одиночными генами нарушения ответственны за 8–15% всех случаев PAC, причём более половины этих генов участвует либо в регуляции сигнального каскада mTOR, либо в контроле трансляции.

Изменения в активности PI3K/Akt/mTOR по сравнению с контролем отмечены не только при C-PAC, но и при некоторых HC-PAC [30]. Повышение активности каскада кажется логичным для объяснения таких фенотипических признаков аутизма, как увеличенный размер мозга [31, 32], эпилепсия и преобладание процессов возбуждения над процессами торможения (E/I) [33], усиленный рост дендритов и их аномальное ветвление [34]. Но не всё так однозначно в вопросе активности каскада mTOR при различных формах даже C-PAC, не говоря уже о И-PAC: как будет отмечено далее, имеются также данные и о нарушении равновесия активностей комплексов mTORC1 и mTORC2, или снижении активности каскада mTOR, например, при CA [35], синдроме Фелан–МакДермид (ФМС) и CP. В целом отклонения (повышение или понижение) активности сигналинга mTORC1 описаны при нескольких моногенных C-PAC: KTC, PTEN-ассоциированном PAC, NF1, X-ФРА, CP и CA, рассмотренных далее.

Кроме C-PAC, нарушение регуляции активности mTORC1-зависимого сигнального каскада (как лежащих выше путей, регулирующих этот каскад, так и фосфорилируемых им мишеней) наблюдалось у пациентов с HC-PAC и у животных, моделирующих HC-PAC [36–39].

Тем не менее до полного понимания механизмов, посредством которых дисбаланс пути mTORC1 приводит к развитию аутистических симптомов, ещё далеко, и остается ряд нерешенных вопросов: насколько закономерности, выясненные при изучении C-PAC, можно рас-

пространить на HC-PAC; достаточно ли свидетельств того, что сигнальный путь mTORC1 вносит вклад в патогенез HC-PAC для разработки фармакологических препаратов; насколько велика доля случаев с измененной активностью сигнального пути mTORC1 среди всех HC-PAC и И-PAC; будет ли терапия, направленная на mTORC1 и эффективная в лечении проявлений некоторых С-PAC, также эффективна хотя бы для некоторых подгрупп пациентов с HC-PAC и И-PAC; в каких случаях при PAC активность сигнального пути mTOR повышена, в каких – понижена и каковы пределы и временные рамки этих отклонений в онтогенетическом развитии.

Далее в настоящем обзоре обсуждаются механизмы и терапевтические подходы, разработанные при изучении С-PAC с доказанным вкладом в патогенез аномалий регуляции пути mTORC1, а также обсуждаются недавние находки, потенциально свидетельствующие о вкладе дисфункции сигналинга mTORC1 в HC-PAC и И-PAC.

### СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ (ВКЛЮЧАЯ mTORC1) ПРИ С-PAC

**Комплекс туберозного склероза (КТС).** При КТС наблюдается снижение интеллекта, аутизм, тревожные расстройства и расстройства настроения, эпилепсия, множественные опухоли и многочисленные другие расстройства. PAC при КТС встречаются в 20–60% случаев, причём эпилепсия, PAC и снижение интеллекта тесно сцеплены [20]. Структурные аномалии мозга при КТС [40] приведены в таблице. Примечательно, что когнитивные нарушения и отклонения от нормы в поведении детей с КТС и с И-PAC очень сходны, что может свидетельствовать о сходных молекулярных и структурных аномалиях при аутистических симптомах, сопровождающих КТС, и при И-PAC. Предполагается, что КТС может служить моделью PAC, и когда молекулярные механизмы, лежащие в его основе, будут полностью расшифрованы, эти находки, вероятно, помогут также при изучении механизмов, лежащих в основе И-PAC.

КТС – это классическая форма «mTOR-патии», он вызывается мутациями генов, кодирующих белки TSC1 или TSC2, с потерей функций. TSC1 и TSC2 вместе с TBC1D7 образуют комплекс, осуществляющий негативную регуляцию mTORC1 при посредстве Rheb (рисунок). Основная функция комплекса TSC1/2 – это интеграция множественных сигналов от лежащих «выше» сигнальных путей и ингибирование активности Rheb и mTORC1, таким образом, при

отсутствии ингибирования конститутивная активация mTORC1 представляет молекулярную основу КТС [63]. Однако, не слишком упрощая ситуацию, отметим, что TSC1 и TSC2 имеют и другие молекулярные функции: взаимодействие с актин-связывающими белками и независимая от Rheb модуляция активности mTORC2, механизм которой может включать прямое связывание комплекса TSC1/2 с компонентами mTORC2. Активированный mTORC2 фосфорилирует и активирует Akt (рисунок), что приводит к фосфорилированию ее субстратов, включая TSC2. Взаимодействие между mTORC1 и mTORC2 происходит ещё и при посредстве p70S6K1, фосфорилирующей и ингибирующей Rictor. Утрата либо TSC1, либо TSC2 приводит к тому, что mTORC1 активируется, а mTORC2 подавляется. Поскольку такие наблюдения были сделаны не на нейрональных клетках, предстоит важная задача: изучить, как происходит взаимная регуляция mTORC1 и mTORC2 в нервной ткани. Второе важное следствие из таких наблюдений – это то, что при поиске лекарственных препаратов, воздействующих на mTOR, следует учитывать активность обоих комплексов – mTORC1 и mTORC2 – и их взаимодействие [26]. Отметим также, что сам Rheb имеет и не зависящие от mTORC1 функции – регулирует сигналинг B-Raf (серин-треониновой киназы) и MAPK/ERK, опосредует апоптоз и митофагию, а также выполняет другие функции [64]. Следовательно, в фенотип КТС могут вносить дополнительный вклад и нарушения регуляции других сигнальных путей, хотя большая часть исследований указывает на то, что в основном фенотип обусловлен гиперактивацией mTORC1.

На животных, лабораторных моделях КТС, показано, что мутации с инактивацией TSC1 и TSC2 и обусловленная этим гиперактивность сигнального пути mTOR могут приводить к аномалиям мозга, отмеченным у пациентов с PAC при КТС.

Сведения о молекулярной природе нейрокогнитивных аномалий почерпнуты также из исследований моделей – нокаутных мышей с инактивированными генами TSC [65]. В экспериментах на мышях Tsc2<sup>+/-</sup>, моделирующих поведенческие аномалии при КТС, показано, что нарушения обратимы под действием рапамицина – ингибитора mTORC1 [41]. Производное рапамицина, эверолимус (Everolimus) или афинитор, был одобрен Food and Drug Administration в 1999 г. для лечения субэпендимальных гигантоклеточных астроцитом, развивающихся при КТС (при невозможности выполнения хирургической резекции опухоли). Рапамицин и эверолимус также проявляли противоэпилептические

Известные генетические основы, активность mTORC1 и белков сопряженных с ним сигнальных путей, морфологические и функциональные аномалии мозга и моделирование на животных расстройств аутистического спектра\*

Формы РАС	Генетические основы	Активность mTORC1 и белков сопряженных с ним сигнальных путей	Морфологические и функциональные аномалии мозга	Животные модели
КТС	мутация <i>TSC1</i> или <i>TSC2</i>	отсутствуют функционально активные белки TSC1 или TSC2; конститутивная активация mTORC1	мегалэнцефалия; нарушение синаптического прунинга; гипомиелинизация; сверхвозбудимость синапсов астроглиоз; дисплазии нейронов; множественные аномально длинные аксоны; аномальные межнейрональные связи	мыши с условным нокаутом гена <i>Tsc1</i> ( <i>Tsc1<sup>+/-</sup></i> -мыши); мыши с условным нокаутом гена <i>Tsc2</i> ( <i>Tsc2<sup>+/-</sup></i> -мыши)
X-ФРА	экспансия повтора CGG 5'-UTR гена <i>FMR1</i>	повышение активности mTORC1 при посредстве PI3K; снижение концентрации белка FMRP	обилие незрелых форм шипиков; высокая плотность дендритных шипиков; избыток синапсов; повышенная частота патологии нейронов; увеличение объема гиппокампа	<i>Fmr1</i> KO
PTEN	мутация с потерей функции гена протеинфосфатазы PTEN	конститутивно высокая активность mTORC1 при посредстве PI3K	макроцефалия; мегалэнцефалия; аномалии миелинизации; гипертрофия тела нейронов; высокая плотность дендритных шипиков; увеличение длины дендритов; повышенная плотность нейронных связей	мыши <i>Pten</i> KO или нокдаун
НФ1	мутации гена <i>NF1</i>	повышенная активность RAS/MAPK (ERK); повышенная активность PI3K; повышенная активность mTORC1; ингибирование TSC2; снижение содержания нейрофибромина	макроцефалия; увеличение объемов белого и серого вещества; нарушение целостности белого вещества; аномалии миграции нейронов; астроглиоз	мыши <i>NF1</i> KO
СА	делеция в 15q11–13 или мутация с потерей функции гена <i>UBE3A</i> , локализованного на 15q11–13	повышенная активность mTORC1; пониженная активность mTORC2; нарушение экспрессии убиквитин-протеинлигазы E3A; изменение количества Arg	микроцефалия; увеличение объема мозжечка и гиппокампа; нарушение миелинизации; аномалии морфологии дендритных шипиков; снижение плотности шипиков; снижение ветвления и длины дендритов	мыши с делецией <i>UBE3A</i>
CP	мутация с потерей функции гена <i>MECP2</i> ; мутация <i>CDKL5</i>	пониженная активность mTORC1; снижение содержания BDNF; снижение содержания MECP2	уменьшение размеров нейронов; повышенная плотность нейронов; астроглиоз; снижение ветвления дендритов; пониженная плотность шипиков; аномалии созревания в коре и гиппокампе; сниженное число глутаматергических синапсов	мыши <i>Mecp2<sup>+/-</sup></i> , <i>Mecp2<sup>-/-</sup></i>
Фелан–МакДермид 22q13	микрделеция 22q13, затрагивающая локус гена <i>SHANK3</i>	пониженная активность mTORC1	аномалии нейронов и синаптической проводимости в кортикальных слоях и в полусатом теле; снижение плотности шипиков; снижение плотности нейронных связей	нокдаун <i>SHANK3</i> ; дупликация <i>SHANK3</i>
Dup15q11–13	дупликация 15q11–13; увеличение дозы гена <i>CYFIP1</i> ; увеличение дозы гена <i>UBE3A</i>	повышенная активность mTORC1	аномалии морфологии нейронов и нейромедиаторных систем	дупликация BP2–BP3 ( <i>patDp/+</i> ); сверхэкспрессия гена <i>CYFIP1</i>
eIF4E HC-РАС	мутации в области промотора гена <i>EIF4E</i>	повышение активности промотора гена <i>EIF4E</i>	увеличение плотности дендритных шипиков; нарушение синаптической пластичности; снижение возбудимости; нарушение LTP в префронтальной коре и гиппокампе	мыши со сверхсинтезом белка eIF4E
И-РАС	неизвестны	повышенная или пониженная активность mTORC1; снижение синтеза PI3K, Akt, mTOR, p-mTOR, p70S6K и eIF4B	макроцефалия; повышение плотности нейронов в некоторых областях мозга; снижение численности клеток Пуркинье; астроглиоз и активация микроглии; аномалии миелинизации; изменение плотности дендритных шипиков	мыши с индуцированными вальпроатом аномалиями развития; мыши BTBR <i>T<sup>+</sup>Itr3<sup>fl</sup>/J</i>

\* Таблица составлена на основании публикаций: [11, 37, 40–62].



кую активность у животных, лабораторных моделей КТС с делецией *TSC1* в нейронах или астроцитах, и в экспериментах на таких животных, демонстрирующих аномальное поведение и когнитивные нарушения, рапамицин уменьшал степень выраженности этих аномалий [66].

В фазе III клинических испытаний эверолимус достоверно позволял контролировать эпилептические припадки у больных с КТС с рефрактерным эпилептическим статусом [67]. В настоящее время ингибиторы mTOR используются для лечения связанных с КТС неврологических проявлений у детей и взрослых, но применение рапамицина и его производных ограничено из-за осложнений и побочного действия. В отдельных клинических исследованиях рапамицина и его производных сообщалось о положительной динамике аутистических симптомов и улучшении когнитивного функционирования при КТС, однако в других исследованиях говорилось либо об отсутствии положительного влияния этих препаратов на когнитивные способности детей с КТС, либо эти способности не оценивались [68]. Можно предположить, что препараты, одобренные для применения у детей с 3-летнего возраста и опробованные в клинике, применялись слишком поздно и не были способны «обратить» патологию развития ЦНС, тогда как, возможно, при более раннем применении они могли бы её предотвратить. Тем более ценными кажутся единичные обследования детей в возрасте до 2 лет [69]. Этот вопрос будет затронут далее в разделе PTEN-RAC (экспериментальные данные по моделированию патологии на мышах).

Ограниченность применения рапамицина и его производных в терапии (в т.ч. неврологических проявлений) объясняется также существованием обратной связи — опосредуемой p70S6K1 петли регуляции сигналинга PI3K. p70S6K1 — субстрат mTORC1 — фосфорилирует субстрат рецептора инсулина (IRS-1), блокируя инсулин-опосредованную активацию сигнального пути PI3K/Akt (рисунок). Кроме того, рапамицин подавляет не все функции mTORC1: он блокирует фосфорилирование mTORC1 киназы p70S6K1, но практически не ингибирует фосфорилирование белка 4E-BP1, что может приводить к стимуляции других частей каскада mTOR (например, 4E-BP1) [21].

Сигнальный путь mTOR играет критическую роль для нормального клеточного роста и выживания, и все последствия, которые может оказать его ингибирование и/или активация на развивающийся мозг, ещё до конца не изучены.

Проводятся исследования с использованием плюрипотентных перепрограммированных ство-

ловых клеток (ППСК), полученных от больных КТС, и клеток-онтогенетических предшественников нейронов, в которых изучается роль ранних событий, происходящих в сигнальных каскадах, в онтогенезе и развитии PAC [70]. Так, например, ППСК от пациента с КТС, несущие мутацию гена *TSC1*, были подвергнуты дифференцировке в клетки-предшественники нейронов. В гетерозиготном и нулевом вариантах клеток наблюдались активация mTORC1 и MEK/ERK и усиление пролиферации и роста нейритов. Активация mTORC1 приводила к фосфорилированию и высвобождению ингибиторного 4E-BP1 из комплекса с eIF4E, что позволяло сформироваться активному комплексу eIF4F. Рапамицин подавлял активацию mTORC1, но не оказывал влияния на повышенную пролиферацию и образование отростков у клеток-предшественников. Кроме того, оказалось, что под действием рапамицина усиливалась повышенная базовая активность MEK/ERK и активировался альтернативный механизм опосредованного MNK (киназой, взаимодействующей с MAPK) фосфорилирования и активации eIF4F (рисунок) [71]. Полностью заблокировать эффекты, вызванные отсутствием *TSC1*, удавалось лишь совместной обработкой рапамицином и eFT508 — ингибитором MNK.

Полученные данные указывают на то, что ранние события, вызванные отсутствием *TSC1*, зависят не только от активации mTORC1. Регуляция трансляции в нейронах, опосредованная MEK/ERK и MNK-eIF4E, тоже может играть роль в аспектах КТС, связанных с нарушениями в центральной нервной системе. И, возможно, что при разработке фармакологических подходов совместное применение ингибиторов mTOR и MNK будет более эффективно, чем применение одного рапамицина и его производных. Для этого необходимы дальнейшие исследования протеома и транскриптома (мРНК) как до, так и после обработки ингибиторами mTOR и MNK клеток-предшественников нейронов, выделенных от пациентов с КТС [70].

**Синдром ломкой X-хромосомы (X-ФРА, синдром Мартина—Белл).** X-ФРА — это наиболее известный синдром, ассоциированный с задержкой психического развития и PAC, причём диагноз PAC имеют 30–50% больных с X-ФРА [72].

Чаще всего синдром обусловлен экспансией повтора CGG в 5'-UTR гена *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*), что приводит к гиперметилированию и снижению экспрессии гена. При полностью мутантном гене (>200 повторов) отсутствует продукт гена — белок, ассоциированный с синдромом ломкой X-хромосомы (FMRP). FMRP — это РНК-связывающий белок, участву-

ющий в регуляции трансляции, зависимой от BDNF и метаболитных глутаматных рецепторов 1 (mGluR1) – процесса, лежащего в основе синаптической пластичности. Поэтому изменение интенсивности синтеза белка играет важную роль в неврологических проявлениях Х-ФРА [73] (рисунок). FMRP служит репрессором трансляции, специфически (селективно) связываясь с последовательностями ряда мРНК и полирибосомами. Многие мРНК, являющиеся его мишенями, кодируют важнейшие белки, необходимые для созревания, стабилизации и элиминации при перестройке синапсов, причем известно, что гены, которые кодируют эти белки, ассоциированы с риском PAC: *SHANK3*, *PTEN*, *TSC2*, *NF1*, *CYFIP1*, *NLGN3* и *NRXN1* [73, 74]. При Х-ФРА часто развивается эпилепсия, наблюдаются множественные аномалии структур мозга (таблица), что влияет на его функции и синаптическую пластичность, а *in vitro* в клеточных линиях нейронов, полученных из ППСК больных с Х-ФРА, наблюдаются структурные аномалии (уменьшение размеров тела и длины отростков) [42].

У нокаутных мышей *Fmr1* KO развиваются аномалии нервной системы, сходные с проявлениями патологии у пациентов с Х-ФРА [43].

В постмортальном мозге больных с Х-ФРА обнаружены аномалии каскадов белкового фосфорилирования, включая сигнальный путь mTOR [44]. Роль каскада mTOR в Х-ФРА остается до конца не выясненной, но исследования позволили идентифицировать механизмы, посредством которых FMRP может регулировать mTOR, и наоборот. Так, FMRP может подавлять трансляцию многих мРНК, например, глутаматного рецептора mGluR5 и белков пути PI3K/Akt/mTOR [73]. Участие этих каскадов в регуляции социального поведения, обучения, памяти обусловлено тем, что они необходимы для регуляции белкового синтеза, индуцируемого mGluR группы 1 (Gp1), обеспечения синаптической проводимости и формирования шипиков [44, 45].

При биохимических исследованиях нокаутных мышей *Fmr1* KO были получены несколько различающиеся результаты, что, возможно, объясняется различными экспериментальными условиями. Но есть свидетельства того, что у этих мышей усилена активность сигнального каскада mTORC1 и повышено образование комплекса инициации трансляции в мозге. Это обусловлено, как минимум частично, усиленной трансляцией мРНК, кодирующих субъединицу p110 $\delta$  киназы PI3K и (PIKE)-S – энхансера-активатора PI3K, позитивно регулирующих активность mTORC1 и активность всего связанного с ним

каскада [75]. Все эти находки свидетельствуют о том, что помимо мРНК-связывающей активности, FMRP также играет роль регулятора инициации трансляции, опосредуемой PI3K/mTORC1, так как FMRP участвует в регуляции PI3K (рисунок) [75].

Поскольку у мышей *Fmr1* KO, лабораторных моделей Х-ФРА, при стимуляции активности каскада PI3K/Akt/mTOR симптомы, связанные с PAC, вероятно, обусловлены усиленной трансляцией белка в синапсах и спровоцированным высоким отношением Е/І в ключевых нервных путях, на этих мышках было опробовано фармакологическое ингибирование пути PI3K [76]. При этом наблюдалось ослабление дефицита, связываемого с симптомами PAC. Важно, что ингибирование PI3K или mTORC1 нормализовало избыточный синтез синаптических белков в нейронах мышей [76]. Кроме того, у мышей *Fmr1* KO делеция в гене, кодирующем p70S6K1, и фармакологическое или генетическое подавление фосфорилирования eIF4E (т.е. мишеней обоих путей – ERK и mTORC1) (рисунок) предотвращали формирование дефектов дендритных шипиков, изменение синаптической пластичности, усиленный синтез белка и развитие связанного с PAC поведенческого фенотипа [77]. Это указывает на то, что усиление сигналинга mTORC1 и *cap*-зависимой трансляции играет роль в патофизиологии Х-ФРА.

Вместе с тем известно исследование, показавшее, что гиперактивация mTOR вследствие утраты функции TSC2 парадоксальным образом привела к снижению синтеза белка в гиппокампе, и этим проявлениям (а также поведенческим и электрофизиологическим аномалиям) противодействовали как фармакологическая активация mGluR5, так и делеция *Fmr1* [78]. Следовательно, сигнальные взаимодействия FMRP и mTOR сложные и разветвленные, и их нарушение потенциально может привести к PAC.

Так, открыт ещё и такой механизм связи FMRP с mTOR, как регуляция трансляции на стадии инициации посредством связывания комплекса CYFIP1/FMRP с eIF4E (рисунок). Сигнальные каскады фосфорилирования, иницируемые BDNF и mGluR, активируют путь MNK, что, в свою очередь, приводит к усилению фосфорилирования eIF4E, ослаблению связей в комплексе CYFIP1/FMRP/eIF4E и усилению высвобождения eIF4E из комплекса с CYFIP1/FMRP, что позволяет взаимодействовать eIF4E с eIF4G, и при этом осуществляется трансляция связанной мРНК (рисунок) [71].

На сложность взаимодействий различных систем белкового фосфорилирования указывает возможное вовлечение киназы 2: стало

известно, что она конститутивно фосфорилирует FMRP по остатку S499, и это стимулирует дальнейшее фосфорилирование FMRP по другим сайтам [79]. Более того, FMRP является мишенью киназы p70S6K1 – члена семейства сигнального каскада mTOR, таким образом, трансляция, регулируемая репрессором FMRP, зависит от активности пути mTOR (рисунок).

**Синдромная форма PTEN-PAC, ассоциированная с мутацией гена PTEN.** PTEN-ассоциированная «моногенная» форма PAC связана с гетерозиготным вариантом мутации с потерей функции *PTEN*. Морфологические аномалии головного мозга при PTEN-PAC приведены в таблице. Хотя умственная отсталость наблюдается примерно у 20% пациентов с мутацией *PTEN*, распространенность PAC среди этих пациентов не оценивалась. Наоборот, частота встречаемости мутации *PTEN* среди пациентов с PAC с макроцефалией оценена: она варьирует в пределах 7–27% [46].

Ген *PTEN* кодирует липид- и протеинфосфатазу PTEN (гомолог фосфатазы и тензина), ключевой фермент в росте клеток, пролиферации, выживании. PTEN противодействует функции киназы PI3K (путём дефосфорилирования PIP3) [80] и, подобно TSC1/2, осуществляет негативный контроль активности каскада mTORC1 [81] (рисунок). Отсутствие контроля со стороны PTEN способствует неконтролируемому образованию PIP3 под действием PI3K, что приводит к усилению активности Akt и гиперактивации mTORC1 [81]. Таким образом, дефицит активности PTEN влечет за собой конститутивную активацию управляемых ею каскадов Akt/mTORC1.

Опубликованных результатов обследований пациентов с PTEN-PAC немного, тем не менее в них отмечались патология структур мозга и наличие эпилептических приступов [47].

В более многочисленных исследованиях на мышинных моделях (генетический нокаут или нокадаун), моделирующих дефицит PTEN, были получены ключевые данные о роли PTEN в центральной нервной системе и связи между повышенной активностью каскада mTORC1 и неврологическими и поведенческими аномалиями мутантных мышей. Патологические изменения в центральной нервной системе животных включали эпилептиформные припадки, макроцефалию, гипертрофию нейронов и астроцитов во всех структурах мозга и другие аномалии [48].

Применение рапамицина или ингибиторов киназы p70S6K1 в раннем периоде развития мышей, моделирующих PTEN-PAC, предотвращало развитие нарушений нервной системы и

PAC-подобных поведенческих аномалий [48], благодаря чему, во-первых, было достигнуто понимание связи между усиленной активностью сигнального каскада mTORC1 и неврологическими и поведенческими аномалиями мутантных мышей. Во-вторых, оказалось, что эффект от применения ингибиторов наблюдается лишь при наиболее раннем применении, т.е. достигается при предотвращении развития аномалий мозга, но не обращает их вспять. Однако оказалось, что рапамицин лишь частично компенсирует фенотип, обусловленный потерей функции *PTEN*, тогда как полный эффект достигается лишь при действии ингибитора Akt [82], следовательно, в развитие неврологических фенотипов, связанных с утратой функции *PTEN*, вносят вклад Akt-зависимые пути.

Хотя изменения роста, пролиферации, миграции глиальных клеток и образования миеллина, наблюдаемые у животных моделей, могут иметь отношение к патогенезу PAC, необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы понять, в какой мере эти аномалии связаны именно с избыточной активацией mTORC1, и как они влияют на поведение при PAC.

Несмотря на то, что в мозге мышей, моделирующих PTEN-PAC, наблюдаются невропатологические особенности, сходные с теми, что описаны у пациентов с PTEN-PAC [48], и они могут быть связаны отчасти с усилением сигнальной активности mTORC1, окончательного понимания связи не достигнуто, и вопрос требует углубленного изучения.

Также интересна связь пути mTOR с еще одним регуляторным фактором, влияющим на манифестацию аутизма – белком-предшественником бета-амилоида (APP) [83]. В синапсах при аутизме обнаружена повышенная концентрация APP, что ведёт к ещё большим нарушениям сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR, которые обусловлены мутацией *PTEN* [84].

**Нейрофиброматоз типа 1 (НФ1).** НФ1 относят к «RAS-патиям», т.е. генетическим заболеваниям, обусловленным мутациями в генах, кодирующих белки каскадов Ras/MAPK [20, 85]. У большой доли пациентов с мутациями, относящимися к пути Ras/MAPK, включая довольно редкие синдром Ульриха–Нунан, кардио-фацио-кутанеальный синдром (КФКС) и синдром Костелло, проявляются симптомы PAC. Это подтверждает предположение о том, что в этих случаях PAC – общий результат усиленной активности Ras/MAPK [86]. Действительно, MAPK/ERK фосфорилирует и ингибирует TSC2, что приводит к сверхактивации mTORC1 (рисунок).

При НФ1 приблизительно в 15–18% случаев наблюдаются когнитивные нарушения и может

выставляться диагноз РАС, а в целом аутистические симптомы наблюдаются значительно чаще. НФ1 также характеризуется предрасположенностью к развитию опухолей (нейрофибром) [86]. НФ1 обусловлен мутациями с потерей функции гена *NF1*, кодирующего нейрофибромин. Ген *NF1* экспрессируется в нейронах и глиальных клетках. Нейрофибромин – негативный регулятор Ras, активирующий Ras ГТФазу (рисунок), поэтому дефект *NF1* запускает активацию сигнального каскада Ras. Первые свидетельства участия mTORC1 в патологии НФ1 были получены, когда было обнаружено, что Ras может индуцировать активацию PI3K и последующее ингибирование TSC2 киназой Akt, с усилением активности mTORC1 в эмбриональных фибробластах и астроцитах *NF1*-нокаутных мышей и в клетках, выделенных из опухолей от больных с НФ1. Однако позже было показано, что *NF1* регулирует пролиферацию глиальных клеток и рост глиом посредством Akt/mTORC1-зависимого, но TSC/Rheb-независимого механизма [87] (рисунок). У пациентов с НФ1 наблюдаются общие невропатологические признаки [49], и у ~10% больных с НФ1 развиваются эпилептиформные приступы. Эти аномалии воспроизводятся при моделировании НФ1 на мышах [50].

Как в экспериментальных, так и в клинических работах показано, что применение ингибиторов mTORC1 благоприятно сказывается, соответственно, как на состоянии животных, моделирующих НФ1, так и на состоянии больных НФ1: снижается рост нейрофибром и опухолей глиом. Это указывает на регуляцию функций различных типов клеток нервной системы посредством пути mTOR [88]. Однако действие ингибиторов mTORC1 на нейрокогнитивные или поведенческие функции при РАС, ассоциированных с НФ1, не изучалось.

Заметим, что утрата функции *NF1* не только в астроцитах, но и в нейронах приводит к астроглиозу, что свидетельствует о включении в мозг автономного внеклеточного механизма [87]. Однако необходимы дальнейшие исследования связи глиальных и нейрональных нарушений и пролиферации именно с РАС-ассоциированным поведением. Особенно важным было бы проведение исследований, в которых оценивалось бы влияние ингибиторов mTORC1 на проявление аутистических симптомов при НФ1.

Другие невропатологические особенности НФ1 пока не связывают с нарушением активности mTORC1, так, нарушение миграции нейронов и долговременной потенциации (LTP) зависят от сигнального каскада регулируемой внеклеточными сигналами киназы ERK [51].

**Синдром Ангельмана (СА).** Пациенты с СА характеризуются существенным недоразвитием речи, нарушением моторных функций, и большая доля пациентов с СА соответствует диагностическим критериям РАС, распространённость которых при СА оценивается в ~34–50% [89]. Большинство случаев СА обусловлены мутацией аллеля на материнской хромосоме с потерей функции гена *UBE3A* в нейронах. Ген *UBE3A* кодирует белок убиквитин-протеинлигазу E3A, которая убиквитинилирует другие белки, помечая и определяя их в качестве мишеней деградации. Ген *UBE3A* локализован в кластере генов на хромосомном локусе 15q11–13 [52].

Аномалии мозга при СА приведены в таблице [35, 53]. Нарушения развития нервной системы при СА воспроизводятся на мышинных моделях с материнской мутацией в *Ube3a* [35]. В основе патологии и неврологических аспектов СА лежит дефицит развития синапсов. Более того, в целом происходит более выраженное снижение активности ингибиторных, чем возбуждающих путей, что, возможно, объясняет подверженность эпилептическим припадкам больных СА. У мышей, моделирующих СА посредством делеции гена *UBE3A*, наблюдается гиперактивация сигнального пути mTORC1 и снижение активности mTORC2 [35]. Интересно, что активация mTORC2 восстанавливает до нормальных уровней LTP на переживающих срезах мозга, что, вероятно, указывает на важную роль, которую играет взаимное регулирование комплексов mTORC2 и mTORC1 (рисунок) [35].

Аномалии в центральной нервной системе при СА возникают в результате повышенного уровня белков-мишеней UBE3A в постсинаптическом пространстве, одним из которых является ассоциированный с цитоскелетом белок Arc. Функции белка Arc связаны с интернализацией  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), рецепторов глутамата в возбуждающих синапсах. У мышей, моделирующих СА и мутантных по *UBE3A*, нарушение LTP обусловлено главным образом повышением уровня Arc вследствие снижения его убиквитинилирования UBE3A и, как следствие, сниженной деградацией. Поскольку трансляция Arc регулируется FMRP – белком, ответственным за формирование синдрома Х-ФРА, предполагалось, что гиперэкспрессия Arc является точкой пересечения патофизиологии СА и Х-ФРА, а ингибирование mGluR5 сможет скорректировать аномалии фенотипа СА так же, как и при синдроме Х-ФРА [90]. Возможно, повышенные уровни Arc являются результатом усиленной активности mTORC1 и активации его мишени p70S6K1 в

мозге моделирующих СА мышей, запущенных усиленным ингибированием фосфорилирования TSC2 и снижением убиквитинилирования в отсутствие UBE3A [35, 91], хотя данные недостаточны, и точный механизм ещё неизвестен. Воздействие рапамицином или ингибитором киназы p70S6K1 снижало уровень Arg и нормализовало плотность дендритных шипиков, морфологию клеток Пуркиньи и пирамидальных клеток, а также LTP и, как следствие, устраняло моторную дисфункцию и дефицит обучения у мышей, моделей СА [35, 91]. Это свидетельствует о возможности влияния на синаптическую пластичность у больных с СА и общее функционирование нервной системы таких пациентов посредством нормализации активности mTOR. Однако, учитывая факт, что связь между mTORC1, mTORC2 и дефицитом UBE3A изучена недостаточно, необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение вопроса о том, как связаны аномалии мозга пациентов с СА с нарушением равновесия активностей mTORC1 и mTORC2, и можно ли возлагать надежды на mTORC1/mTORC2-направленную терапию СА.

**Синдром Ретта (СР).** Хотя при СР и ФМС каскад mTOR затрагивается лишь косвенно (молекулярные «отклонения от нормы» лежат «вне» каскада mTOR), эти синдромы можно считать «вторичными» проявлениями нарушения активности каскада mTOR, которые могут вносить вклад в развивающиеся при этих синдромах аутистические симптомы.

СР носит характер прогрессирующего нейроонтогенетического расстройства, наступающего после начального периода нормального перинатального развития. Хотя этот синдром исключен из списка РАС в пятой редакции Диагностического и Статистического Руководства по Психическим Расстройствам (DSM-5), у детей с СР часто наблюдается аутистическое поведение, и встречаемость симптомов РАС при СР у девочек оценивается в ~61% [89].

СР обусловлен мутацией в гене *MECP2* на X-хромосоме с утратой его функции, ген кодирует метил-СpG-связывающий белок 2, контролирующий экспрессию генов и ремоделирование хроматина. Структурно-функциональные аномалии мозга при СР представлены в таблице. Аномалии структуры нейронов воспроизводятся в моделях СР на грызунах [54] и моделях *in vitro* с использованием *MECP2*-дефицитных нейронов, полученных из ППСК [92].

Хотя механизм, лежащий в основе наблюдаемых явлений, пока не совсем ясен, в моделях с мутацией *MECP2*, вызывающей фенотипические проявления СР, обнаружено снижение белкового синтеза и активности mTORC1 [20].

Кроме мутации гена *MECP2* у детей с СР, выявлены мутации других генов, в частности гена *CDKL5*, кодирующего киназу, подобную циклинзависимой киназе 5. Интересно, что активность mTORC1 также снижена и у мышей, несущих мутацию *CDKL5*, что свидетельствует об общей причине «типичного» и «атипичного» СР [93].

В отличие от большинства РАС-ассоциированных mTOR-патий, нейроны мышей-моделей *Mecp2<sup>+/-</sup>* и *Mecp2<sup>-/-</sup>* [55], а также нейроны, производные от *MeCP2*-дефицитных человеческих ППСК [94], демонстрируют пониженные сигнальную активность mTORC1, транскрипционную активность и скорость синтеза белка.

Хотя механизм, посредством которого *MeCP2* регулирует сигналинг mTORC1, еще до конца не выяснен, обнаружено, что у мышей, моделирующих СР, снижены уровни BDNF, что, возможно, и приводит к снижению активности путей PI3K/mTORC1 (рисунок) [55].

Воздействие на нейроны, производные из *MeCP2*-дефицитных ППСК, экзогенными факторами роста (IGF-1 или BDNF) или генетическое «выбивание» PTEN интенсифицирует синтез белка посредством усиления сигнальной активности PI3K/mTORC1 и нормализует размер сомы и образование и ветвление отростков [94]. Хотя необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы понять, как дисфункция белка *MeCP2* приводит к развитию СР, уже сейчас можно сказать, что все находки свидетельствуют о связи дефектов глобального контроля транскрипции и опосредованной PI3K/mTORC1 трансляции с патогенетическими механизмами СР и, возможно, аутистическими симптомами.

**Синдром Фелан–МакДермид (ФМС).** ФМС – нейроонтогенетическое расстройство, обусловленное микроделецией 22q13, затрагивающей локус гена *SHANK3*. Ген *SHANK3* кодирует содержащий SH3-домен и множественные анкириновые повторы белок 3 (SHANK3). SHANK3 – структурный белок постсинаптической плотности, ответственный за ассоциацию и поддержание структуры комплексов глутаматных рецепторов в синапсах, который, как полагают, отвечает за развитие клинической картины заболевания [95]. Около 80% пациентов с ФМС получают диагноз РАС. У мышей, моделирующих генетическую аномалию – делецию *SHANK3* (как глобально, так и только в глутаматергических нейронах), обнаружены аномалии нейронов и синаптической проводимости [56].

Фосфопротеомные исследования нейронов грызунов, лабораторных моделей ФМС с нокдауном гена *SHANK3*, выявили снижение фосфо-

рилирования Akt и mTORC1, и закономерности воспроизводились на полученных из ППСК нейронах от пациентов с ФМС [57]. Это снижение было обусловлено накоплением CDC-подобной киназы 2 (CLK2) – негативного регулятора Akt, вследствие отсутствия SHANK3, а ингибитор CLK2 улучшал социальные взаимодействия животных с делецией SHANK3 [57]. Важно отметить, что у мышей с дупликацией SHANK3 обнаруживалось сниженное фосфорилирование mTOR в мозге при нормальном уровне фосфорилирования Akt, что является отличительной чертой молекулярного механизма этой модели [58]. В опытах *in vitro* введение гена SHANK3 дикого типа в нейроны, выращенные из индуцированных ППСК пациентов с ФМС, восстанавливало нормальный фенотип [96]. SHANK3, вероятно, вовлечён в путь, модулирующий активность mTOR, но подробности взаимодействий предстоит изучить в будущем.

Поскольку, в отличие от остальных С-РАС, рассмотренных выше, при СР и ФМС сигнальная активность mTORC1 не повышена, а, наоборот, снижена, непонятно, связана ли aberrанная работа каскада mTOR с поведенческим фенотипом или же это не прямой результат нейрональной дисфункции, обусловленной мутацией. Воздействие на животных, моделирующих СР, IGF-1 приводило к увеличению продолжительности жизни, изменениям в морфологии и физиологии нейронов, восстанавливало работу возбуждающих нейромедиаторных систем [96]. IGF-1 в настоящее время проходит клинические испытания при СР и ФМС, и известно, что сигналинг IGF-1 реализуется посредством пути PI3K и повышает активность mTORC1 [97], хотя функция mTORC1 в этих исследованиях напрямую не изучалась.

**Синдром Аспергера.** Ещё одно расстройство, отнесённое к спектру РАС по современной международной классификации болезней МКБ-10, – это синдром Аспергера. Известны две публикации [98, 99] с описанием двух отдельных случаев, когда постановку такого диагноза удалось связать с генетическими аномалиями, причём в одном случае – с мутацией гена, кодирующего SHANK3, а в другом – с дупликацией 22q13. В большинстве же случаев это расстройство, по-видимому, следует отнести к И-РАС, поскольку причины его неизвестны, и, к сожалению, неизвестны работы, в которых бы изучались каскады белкового фосфорилирования при данной патологии.

Все перечисленные сведения позволяют высказать предположение о том, что может существовать некий диапазон активности сигнального каскада mTOR, сохранение внутри ко-

торого необходимо для правильного функционирования мозга, а выход за диапазон приводит к поведенческим аномалиям. Детально данная ситуация была смоделирована математически [100].

### СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ, ВКЛЮЧАЯ mTORC1, ПРИ НЕСИНДРОМНЫХ (НС-РАС) НЕ МОНОГЕННЫХ ФОРМАХ РАС

**Дупликация 15q11–13 (Dup15q).** Унаследованные по материнской линии дупликации 15q11–13 – один из наиболее часто встречающихся вариантов НС-РАС, он обнаруживается у ~1–2% пациентов с РАС и свидетельствует о том, что гены, находящиеся в этой области, будучи представленными в нескольких копиях, могут приводить к развитию РАС. Делеции в этой же области приводят к синдрому Прадера–Вилли или СА в зависимости от того, унаследована ли делеция по отцовской или материнской линии соответственно, а, как обсуждалось выше, аутистические симптомы обычны для пациентов с СА. Нестабильность генома в этой области опосредована наличием пяти тандемных повторов с низким числом копий, обозначаемых BP1–BP5 (Breakpoints). Заметим, что хотя дупликации по отцовской линии не характеризуются высокой пенетрантностью, на мышинной модели с унаследованной по отцовской линии дупликацией района BP2–BP3 (мыши *patDp/+*) обнаружено расстройство поведения, напоминающее симптомы, наблюдаемые при РАС, а также нарушения развития мозга [59].

Кроме того, есть указания на то, что область между BP1 и BP2 (15q11.2) также является «горячей точкой», критичной для проявления РАС, и что гены, локализованные в этой области, важны для нормального функционирования нервной системы и поведенческих функций [101]. Из четырёх генов-кандидатов, локализованных между BP1 и BP2, ген *CYFIP1* является наиболее важным кандидатом на роль, обуславливающую РАС [37]: его продукт напрямую взаимодействует с FMRP и eIF4E и служит посредником в репрессии трансляции посредством FMRP в мозге (рисунок), а также регулирует полимеризацию актина при ремоделировании цитоскелета посредством взаимодействия с ГТФазой Rac1 (из семейства малых G-белков). Показано, что уровни белка CYFIP1 повышены в клетках лимфобластомы и постмортальной ткани мозга пациентов с РАС, имеющих дупликацию Dup15q [37], и сверхэкспрессия кодирующего его гена в культивируемых нейронах человека и мыши приводит к аномалиям структу-

ры нейронов. Сходные аномалии проявляются и у мышиных моделей с избыточным синтезом белка CYFIP1 [37].

Заметим, что сверхактивация mTORC1 связана с увеличением размеров нейронов и усиленным ветвлением нейритов в культуре нейронных клеток со сверхэкспрессией *CYFIP1* в локусе 15q11.2, ассоциированной с риском РАС [37]. С другой стороны, в моделях СР сниженная активность mTORC1 связана со снижением размеров нейронов и аномалиями ветвления нейритов [94]. Это свидетельствует о том, что для поддержания должного размера нейронов и мозга и нормального паттерна ветвления нейритов нужен оптимальный уровень активности сигналинга mTORC1, а вызываемые нарушением регуляции активности mTORC1 аномалии развития нервной системы могут вносить вклад в развитие симптомов РАС.

Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы ответить на вопрос о том, проявляют ли трансгенные *CYFIP1*-мыши аутистические черты, характерные для поведения при РАС.

Важно, что при изучении постмортального мозга носителей дупликации Dup15q больных РАС, а также эмбрионов трансгенных мышей *CYFIP1* и культивируемых нейронов с повышенным содержанием белка CYFIP1 были получены свидетельства аномального усиления сигналинга mTORC1. Воздействие рапамицином на культивируемые нейроны приводило к исчезновению наблюдаемых аномалий в размерах клеток, ветвлении и длине отростков [37]. Свидетельство гиперфункции сигналинга mTORC1 также наблюдалось в культивируемых индуцированных ППСК пациентов с НС-РАС с дупликацией Dup15q [102]. Все вместе эти факты свидетельствуют о том, что опосредованная CYFIP1 сверхактивация пути mTORC1 может вносить вклад в патогенез РАС при дупликации Dup15q. Учитывая данные о том, что у пациентов с Dup15q обнаружена аберрантная активность mTORC1 [102], представляют интерес клинические испытания, в которых была бы оценена способность лекарств, действующих на каскад mTORC1, облегчать поведенческие аномалии при Dup15q.

**НС-РАС, ассоциированные с eIF4E (eIF4E-НС-РАС).** mTOR в составе комплекса mTORC1 фосфорилирует связывающие eIF4E белки (4E-BP), что приводит к высвобождению их из комплекса с eIF4E, в результате чего eIF4E приобретает способность взаимодействовать с eIF4G и eIF4A с образованием комплекса eIF4F – критический этап в *cap*-зависимой трансляции (рисунок). У некоторых пациентов с НС-РАС обнаружены редкие мутации в про-

торной области гена *EIF4E*, которые, как предполагается, приводят к усилению активности промотора [103]. У трансгенных мышей с повышенным уровнем белка eIF4E и у мышей, у которых отсутствует 4E-BP2, наблюдаются аномалии мозга, подобные тем, что наблюдаются у других моделей РАС, включая аномально усиленную *cap*-зависимую трансляцию в мозге. Воздействие на мышей, у которых отсутствует 4E-BP (нокаут *EIF4EBP2*) ингибитором, подавляющим взаимодействие eIF4E и eIF4G, восстанавливает синтез белка и устраняет аномалии синаптической пластичности, а также нормализует поведение, до воздействия напомиравшее РАС. Эти факты дают основание установить причинно-следственные связи между eIF4E-НС-РАС и избыточной *cap*-зависимой трансляцией, а также свидетельствуют о том, что это одна из мишеней, посредством которой ингибиторы mTORC1 могут восстановить синаптическую пластичность и устранить симптомы, характерные для РАС.

**Идиопатический аутизм (И-РАС).** В качестве возможных причин развития идиопатических РАС рассматриваются воздействие факторов окружающей среды (токсины, пестициды, инфекции), нарушение внутриутробного развития под действием различных факторов, включая вальпроовую кислоту (вальпроат) и случайные мутации *de novo*.

Основные используемые экспериментальные модели исследования И-РАС – это животные (мыши и крысы), аномалии развития которых индуцированы вальпроатом [11], инбредные мыши с фенотипическими поведенческими проявлениями, характерными для аутизма (например, мыши BTBR  $T^+Ipr3^{fl}/J$  [60]), лабораторные модели материнской иммунной активации (МИА) на животных [104] и индуцированные ППСК от пациентов [10].

Интересно, что в индуцированной вальпроатом мышинной модели И-РАС обнаружено нарушение регуляции 4E-BP1 [11].

Подобно нокаутным мышинным моделям мюногенных С-РАС, инбредные мыши BTBR  $T^+Ipr3^{fl}/J$  [60] с нарушениями в когнитивной сфере и социальном поведении могут служить моделью для исследования И-РАС. При подробном исследовании модели BTBR  $T^+Ipr3^{fl}/J$  была обнаружена конвергенция многих сигнальных путей и проявления определенных нейроанатомических характеристик. Также обнаружено, что рапамицин ослабляет нарушения социального поведения этих животных. Исследования мозга (гиппокампа) мышей показало значительное повышение уровня mTOR и фосфо-mTOR, p70S6K1 и фосфо-p70S6K, AMPK и фосфо-

АМПК, Ulk1 и фосфо-Ulk1 [105]. Нарушения регуляции сигнального пути mTOR и социального поведения этих мышей исчезали при системном введении IGF-2.

Известны лишь единичные работы, посвященные исследованиям mTOR у пациентов с И-РАС. Так, компоненты сигнального пути mTOR и MAPK при И-РАС анализировались в клетках периферической крови (лимфоцитах) детей 3–11 лет. Уровни экспрессии mTOR, 4E-BP1, p70S6K1, FMRP, TSC1, TSC2 и Rheb не различались между И-РАС и контролем, но было повышено содержание рибосомной субъединицы 40S (rpS6) и фосфорилированной формы eIF4E. Интересно, что уровни экспрессии компонентов этих сигнальных путей, а именно rpS6, p-eIF4E, TSC1 и p-MNK1, различались в зависимости от клинического диагноза (степени выраженности аутистических симптомов) [106].

Как было установлено при изучении С-РАС, изменения активности mTOR влияют на множество нейроонтогенетических процессов, включая дифференцировку нервной ткани, рост аксонов, миграцию клеток, формирование паттерна структур мозга, а при И-РАС отмечается нарушение всех этих процессов. В современных работах выдвигаются гипотезы, предполагающие, что нарушение регуляции именно каскада mTOR – центральное событие и вероятная причина И-РАС [107].

В попытках связать сведения, полученные при исследовании И-РАС (а при И-РАС обнаружен сниженный уровень синтеза таких белков, как различные изоформы PI3K, Akt, mTOR, p-mTOR, p70S6K1, eIF4B [38]), была выдвинута гипотеза о «разветвлении» молекулярных событий-причин С-РАС и И-РАС на уровне факторов инициации и элонгации белковой трансляции (посредством киназы p70S6K1 – мишени mTOR и eIF4B – мишени p70S6K1), причём если в большинстве случаев С-РАС синтез белка стимулируется, то при И-РАС – подавляется [38, 107].

Поскольку предполагается, что в патогенезе И-РАС задействован не сам mTOR, а его мишени, необходимо отдельно рассмотреть роль mTOR в регуляции *cap*-зависимой трансляции.

Инициация белковой трансляции регулируется в мозге рядом белковых факторов инициации трансляции (eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G и *cap*-связывающим eIF4E). Механизм, посредством которого mTOR регулирует трансляцию, реализуется через мишени – 4E-BP или p70S6K1. 4E-BP связывается с eIF4E и ингибирует инициацию трансляции. Когда mTORC1 фосфорилирует 4E-BP1, сродство 4E-BP1 к eIF4E снижается, что позволяет эффективно

сформироваться комплексу eIF4F, при этом повышается общая интенсивность белкового синтеза (рисунок).

Субстратами активированной киназы p70S6K1 служат рибосомный белок S6 на субъединице 40S, несколько факторов трансляции, включая eIF4B (стимулятор геликазной активности фактора eIF4A) и eEF2K (так же, как и самого mTORC1, на рисунке не показано). Таким образом, p70S6K1 фосфорилирует и инактивирует фактор репрессии трансляции eEF2K, который фосфорилирует и инактивирует фактор элонгации трансляции eEF2, стимулирующий включение аминокислот в растущую полипептидную цепь. Фосфорилирование eEF2K фактора eEF2 предотвращает его ассоциацию с рибосомой, таким образом снижая скорость элонгации, и предполагается, что данный механизм реализуется при И-РАС [107]. Таким образом, при И-РАС важна не только и не столько активность самого mTOR, сколько сбалансированность активностей его мишеней. При этом предполагается, что в снижении интенсивности синтеза белка при посредстве p70S6K1 и eIF4B задействован также путь NGF, который здесь играет роль дополнительного регулятора, но насколько весом его вклад – пока неизвестно. Тем не менее предполагается, что сами белки-мишени регуляции mTOR – p70S6K1, eIF4B – могут послужить новыми терапевтическими мишенями фармакологического действия препаратов при РАС [107].

Кроме того, по сравнению с нормальным развитием, при И-РАС обнаружены различия в уровнях киназы рецептора тропомиозина TrkB, а TrkB регулирует путь Akt/mTOR (рисунок) [10, 11]. Заметим, что роль различных изоформ Trk при РАС пока не изучена, хотя роль, которую TrkA играет в пути NGF, известна: TrkA является рецептором NGF, и этот путь имеет значение в патогенезе болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

В таблице суммированы наиболее часто встречающиеся аномалии мозга при И-РАС.

Рассматривая данные относительно молекулярной основы патологии дендритных шипиков при РАС, можно отметить исследования Nicolini et al. [38], показавшие, что путь Akt/mTOR, регулирующий трансляцию белка в дендритных шипиках, является потенциальным молекулярным субстратом этой патологии, что, возможно, играет роль при И-РАС. Их исследования на постмортальном мозге 11 больных с И-РАС показали снижение активности сигналинга mTORC1 [38]. Авторы подчеркивают, что сниженная активность каскада mTOR может неблагоприятно влиять на формирование шипиков,



нарушая регуляцию кортикальных путей, задействованных в высших нервных функциях и поведении, что обуславливает аутистический фенотип. Hutsler и Zhang [61] также выдвинули гипотезу о том, что нарушение пути mTOR лежит в основе аномалий формирования шипиков (их повышенной плотности) и вносит вклад в развитие И-РАС.

Однако разнородной в данных об активности mTOR и других систем фосфорилирования при И-РАС пока не позволяет сложить четкую картину данных. Так, в отличие от Nicolini et al. [38], в работе Onore et al. [30] при И-РАС обнаружено повышение общей концентрации IRS-1 и повышение уровней фосфорилирования PTEN, TSC2 и mTOR у больных с аутизмом по сравнению с нормой; наблюдалась повышенная активность пути Akt/mTOR, внеклеточной рецепторной киназы и p70S6K и сниженная активность киназы гликогенсинтазы 3 $\alpha$  (GSK3 $\alpha$ ) и туберина (TSC2).

Хотя описанные аномалии могут быть вызваны различными причинами в результате конвергенции событий в ходе развития нервной системы, исследования показывают, что в обширном ряду И-РАС имеются по меньшей мере подгруппы с отклонением сигнальной активности mTORC1 от нормы, причем, возможно, как в сторону снижения, так и повышения.

Так, в постмортальном мозге пациентов с И-РАС наблюдалась сверхактивация каскада mTORC1, а также исследования показали нарушения аутофагии и синаптического прунинга в детском и юношеском возрасте, приводящие к увеличению плотности дендритных шипиков и, следовательно, усилению возбуждающей активности [62]. С этим согласуется тот факт, что в культивированных нейронах, производных от индуцированных ППСК, выделенных от пациентов с И-РАС, обнаружено нарушение равновесия Е/І синапсов [108].

Сходные наблюдения описаны и при исследовании мышинной модели КТС (С-РАС). Это подтверждает, что для постнатального прунинга нейронов спинного мозга необходимо своевременное снижение активности mTORC1 [62].

Повышенный уровень фосфорилирования белков (уровень фосфорилированного mTOR (p-mTOR<sup>S2448</sup>) и его мишеней) и повышенная активность mTORC1 наблюдались и в не нейронных клетках, производных индуцированных ППСК, выделенных от троих из 13 обследованных пациентов с И-РАС, хотя наблюдаемые изменения сильно зависели от экспериментальных условий выделения и индукции ППСК [39, 102]. Интересно, что в клетках лимфобластомы пациента с усиленной активностью mTORC1

также наблюдалось усиление экспрессии субъединицы p110 $\delta$  киназы PI3K и синтеза белка, который можно было подавить ингибитором, специфичным к p110 $\delta$  [39].

Высокая гетерогенность И-РАС может объяснить расхождение сведений относительно активации либо снижения активности сигналинга mTORC1, поэтому необходимы дополнительные исследования для того, чтобы понять причинную связь между каскадом mTORC1 и дисфункциями при И-РАС. Следовательно, хотя в ряде исследований обнаружен дефект сигналинга mTORC1 у субкогорт пациентов с И-РАС [38, 39, 102], нужны дальнейшие функциональные исследования для получения доказательств связи между аномалиями mTORC1 и развитием аутизма в такой гетерогенной группе, как И-РАС.

Исследования с выделенными от пациентов не нейрональными клетками [39, 102], в том числе тромбоцитами и лимфоцитами, предоставляют возможность широкомасштабного скрининга сигнальных дефектов mTORC1 с использованием наиболее легко доступных биологических материалов от пациентов. Это поможет ответить на вопрос, какова доля пациентов с нарушениями mTORC1 среди всех пациентов с РАС неизвестной этиологии, и будет способствовать выявлению тех пациентов, которым, возможно, принесут пользу лекарственные средства с действием, направленным на каскад mTORC1 либо его мишени.

### СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ БЕЛКОВОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ КРОВИ

В качестве объектов исследования сигнальных каскадов белкового фосфорилирования в клетках периферической крови при РАС использовались лимфоциты и тромбоциты. В основном клетки крови применялись при моделировании синдрома Х-ФРА. Сравнение тромбоцитов с лимфоцитами в общем говорит в пользу первых: их легче выделить в большем количестве, их протеом более стабилен при выделении и в течение времени в организме, они устроены проще, и их сигнальные пути менее вариабельны под влиянием физиологических изменений, что позволяет провести на них биохимические исследования, в том числе и при РАС. Период продолжительности жизни тромбоцитов короче (~10 дней), чем лимфоцитов (от нескольких недель до лет), поэтому изменения, происходящие в экспрессии генов в мегакариocyтах, сравнительно быстро отражаются на протеоме тромбоцитов. В неактивированных тромбоцитах не задействованы сигнальные пути, они не реаги-

руют на стимулы, иные, чем стимулы тромбообразования. В отличие от тромбоцитов, лимфоциты реагируют на значительное число внешних стимулов и сравнительно более метаболически активны. Их центральные киназы, например ERK, активно участвуют во многих сигнальных путях, и наблюдать не слишком выраженные изменения, связанные, например, с патологией PAC, в них трудно. Хотя сигнальные пути в тромбоцитах существенно упрощены по сравнению с нейронами, они происходят от различных клеток-предшественников в эмбриональном развитии, и молекулярный интерактом тромбоцитов не такой обширный, как нейронов, тем не менее тромбоциты признаны удачной периферической моделью исследования нейронов и используются при изучении компонентов нейромедиаторных систем [109]. Интерактом тромбоцитов содержит важнейшие сигнальные каскады белкового фосфорилирования, вторичные мессенджеры и сигнальные киназы, рассматриваемые как «хабы» биохимических путей [110]. Благодаря биохимической «гомологии» тромбоцитов с нейронами тромбоциты могут служить адекватной клеточной биохимической «суррогатной» моделью X-ФРА [72], их относительно легко получать малоинвазивным способом забора периферической крови, выделять, а в изолированном виде в них сохраняется активность тромбоцитарных ферментов.

Тромбоциты при нарушениях нейроонтогенеза исследованы мало, и, хотя описаны некоторые общие биохимические аномалии в тромбоцитах при PAC, трудно понять, насколько они имеют отношение к патогенезу аутизма из-за слабой изученности патологии мозга при PAC, особенно И-PAC, и пока неизвестно, коррелируют ли эти периферические аномалии в тромбоцитах с процессами, происходящими в мозге. Биохимические исследования тромбоцитов при PAC показали ряд отклонений от контроля, например, в концентрации тромбоцитарного серотонина и серотонинового метаболита N-ацетилсеротонина, плотности серотонинового переносчика, концентрации гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), секреции гранул с АТР, но ни один из перечисленных показателей не был валидирован как биомаркер для использования в клинике при диагностике PAC.

Хотя упомянутая модель X-ФРА *Fmr1* KO на мышцах позволила открыть биохимические закономерности, наблюдающиеся при утрате FMRP (повышенная активность Gp1 mGluR-зависимого сигналинга, сниженный уровень образования цАМФ, снижение активности ингибиторной ГАМК-ергической нейромедиаторной системы, усиление трансляции матриксной ме-

таллопротеиназы MMP9), однако данные, полученные на этой модели, оказались бесполезными при клинических исследованиях в предикции эффективности разрабатываемых лекарственных препаратов при их апробации в контролируемых исследованиях на пациентах. Таким образом, потребность в модели PAC (в том числе, X-ФРА и И-PAC), основанной на клетках периферических тканей человека, очевидна, и известны примеры таких разработок на лимфоцитах, тромбоцитах [72] и фибробластах пациентов [111].

Однако, по сравнению с лимфоцитами и фибробластами, а также по сравнению C-PAC с другими формами PAC (HC-PAC и И-PAC в целом), наиболее веские основания получены в пользу применения тромбоцитов как модели исследования X-ФРА [72]. Основой адекватности модели является наличие FMRP в тромбоцитах и их предшественниках — мегакариоцитах. Отметим, что как в мегакариоцитах, так и в активированных глутаматом mGluR-содержащих нейронах, кроме FMRP, обнаружены и другие РНК-связывающие белки: STAU1, STAU2, CASC3 [112]. Функциональная роль FMRP (стабилизация и транспорт мРНК) в мегакариоцитах вполне отражает его роль в нейронах [112]. Поскольку тромбоциты происходят из мегакариоцитов, образуясь путём выпячивания и отпочковывания цитоплазмы, содержащей все компоненты тромбоцитов, для доставки мРНК в отпочковывающиеся тромбоциты с помощью микротрубочек используются РНК-связывающие белки, в том числе FMRP.

В настоящее время диагностика синдрома X-ФРА основана на ПЦР и Саузерн-блот-анализе, но также предложены тесты, основанные на определении концентрации FMRP в лимфоцитах или волосяных фолликулах иммунохимическим методом с антителами к FMRP. И хотя с применением этих методов была обнаружена связь концентрации FMRP с уровнем интеллекта, в случае мозаицизма чувствительность методов оказалась ограниченной: чувствительность и специфичность метода, доходившие до 100% у мужчин, у женщин оказались значительно ниже и составили всего 41–43%. Результаты же измерения уровня тромбоцитарного FMRP в контрольной группе и у больных с подтвержденным X-ФРА показали, что больных можно уверенно отделить от здоровых (площадь под ROC-кривой 0,948). Содержание FMRP в тромбоцитах также оказалось связанным с уровнем интеллекта в тесте Векслера. Что касается исследований белков, компонентов каскадов белкового фосфорилирования при X-ФРА с использованием тромбоцитов, проведены лишь первые

эксперименты на ограниченном числе больных [113], при этом авторы отметили влияние условий выделения и обработки биопроб на оценки степени фосфорилирования белков.

Ряд ключевых молекулярных нарушений регуляции, обнаруженных в нейронах человека при Х-ФРА и у моделирующих Х-ФРА мышшей *Fmr1* KO, воспроизводятся в тромбоцитах, что также подтверждает возможность их использования для моделирования Х-ФРА, например гиперактивность путей MAPK/ERK и PI3K/Akt/mTOR. Так, показано, что при синдроме Х-ФРА в тромбоцитах усилено фосфорилирование ERK и Akt по сравнению с нормой примерно в 1,6 раз, и это свидетельствует о том, что в норме FMRP регулирует эти сигнальные пути [113]. Также были обнаружены отрицательные корреляции между уровнями фосфорилированных pERK и фосфорилированной по Ser473 Akt (pAkt<sup>Ser473</sup>) и когнитивными функциями по тесту Векслера.

Кроме того, удалось оценить уровень вариабельности (повышения) фосфорилирования ERK и Akt в зависимости от уровня FMRP в тромбоцитах. Оказалось, что в подгруппе с уровнем тромбоцитарного FMRP, не поддающимся обнаружению, достоверно усилено фосфорилирование ERK (отношение pERK/ERK повышено в 2,27 раз) и Akt (pAkt<sup>Ser473</sup>/Akt повышено в 2 раза). А у индивидуумов-мозаиков, сохраняющих некоторый уровень экспрессии FMRP, превышение над контролем уровней фосфорилирования этих киназ было незначительным и недостоверным [113]. Более того, лечение ловастатином в течение трех месяцев корректировало гиперактивацию ERK в тромбоцитах Х-ФРА пациентов [72], однако ловастатин не снижал достоверно уровень фосфорилирования Akt (pAkt<sup>Ser473</sup>/Akt) по сравнению с базовым уровнем. Есть косвенные указания на то, что на активность ERK могут влиять психостимуляторы, антидепрессанты, антипсихотики и лекарства, снижающие артериальное давление, хотя прямых данных пока не получено.

Для сравнения, в исследованиях белкового фосфорилирования лимфоцитов при Х-ФРА обнаружено превышение над контролем фосфорилирования Akt [29, 76], но не ERK, что сильно ставит под удар адекватность лимфоцитарной модели как модели патологии Х-ФРА. Следовательно, тромбоциты — более адекватная модель, которая полнее отражает события, происходящие в нейронах, по меньшей мере при Х-ФРА.

Важно, что в тромбоцитах обнаружены рецепторы нейромедиаторных систем (глутаматной, серотониновой, дофаминовой), нарушения со стороны которых были зарегистрирова-

ны в мозге при Х-ФРА. Некоторые лекарственные вещества, влияющие на метаболизм и синаптическое высвобождение моноаминовых нейромедиаторов в нейронах (серотонин, дофамин, норадреналин) сходным образом действуют и на тромбоциты. Примечательно, что ингибиторы ацетилхолинэстеразы, используемые для лечения симптомов болезни Альцгеймера, нормализуют нарушенную регуляцию метаболизма тромбоцитарного APP параллельно со стабилизацией снижения когнитивных функций: эти факты важны и для исследований в области аутизма, поскольку, как отмечалось выше, APP является одним из регуляторов синаптической пластичности, связанным с сигнальным каскадом mTOR [84].

В будущем, для того чтобы расширить возможности использования тромбоцитарной модели, резонно исследовать, изменен ли уровень синтеза белка в тромбоцитах пациентов с Х-ФРА и других С-РАС, поскольку повышенный уровень синтеза белка обнаружен в лимфоцитах и фибробластах пациентов с Х-ФРА.

Эти находки свидетельствуют о том, что изучение множества биохимических параметров тромбоцитов окажется полезным в предикции когнитивного фенотипа индивидуумов с РАС (по меньшей мере при Х-ФРА), что, в свою очередь, может способствовать улучшению клинического сопровождения пациентов. А пока известны лишь отдельные попытки применения параметров белкового фосфорилирования в качестве биомаркера при испытании действия препаратов в целях предикции терапевтического ответа на лекарства: это степень активации ERK в лимфоцитах в клинических исследованиях лития, рилузола, и статус базового фосфорилирования ERK в тромбоцитах в исследовании ловастатина при Х-ФРА [72].

Тромбоциты не только воспроизводят биохимические нарушения, обнаруженные в нейронах при Х-ФРА, но также и «реагируют» на лекарства, направленные на центральную нервную систему и на молекулярные механизмы, лежащие в основе патологии. В связи с этим такой биомаркер, как тромбоцитарный уровень фосфорилирования ERK, применялся в исследовании ловастатина [72]. Примечательно, что под действием лечения повышенный уровень основного фосфорилирования ERK поддавался коррекции у большинства обследованных [72]. Кроме того, изменения фосфорилирования ERK коррелировали с клиническим ответом, судя по оценке Шкалы адаптивного поведения Вайнленд (VABS) [72]. Значит, параметры тромбоцитов могут помочь и в оценках эффективности лечения препаратами, нацеленными на

путь MAPK/ERK, хотя ограничения в оценках улучшения состояния и исходов лечения пациентов с РАС вносят трудности в применение биомаркёров в целом. Тем не менее «коррекция» уровней периферических биомаркёров свидетельствует о том, что наблюдаемые улучшения в клинических испытаниях можно отнести к благоприятному действию лекарства на центральную патофизиологию X-ФРА.

Гипотетически другие сигнальные пути тромбоцитов и белки сигнального каскада mTOR могут послужить биомаркёрами в клинических испытаниях эффективности лекарств, действие которых направлено на сигнальные регуляторные пути.

То, что компоненты сигнального каскада mTOR и сопряженных с ним путей обнаружены в тромбоцитах, дает возможность опробовать эти белки в качестве претендентов на роль биохимических биомаркёров с целью выделения из клинических групп больных РАС тех подгрупп, в которых будут обнаружены отклонения активности сигнального каскада mTOR от контрольных диапазонов, для возможных целенаправленных клинических испытаний действия специфических препаратов. Учитывая современный уровень разработки проблемы, это направление исследований авторам обзора представляется наиболее перспективным и реальным по выполнимости в ближайшее время.

Так как эксперименты с моделями C-РАС показали, что ингибиторы mTOR и сопряженных с ним путей способны предотвратить, но не обратить развитие структурных аномалий и аутистического фенотипа, можно предположить, что эффективным окажется как можно более

раннее применение разрабатываемых лекарственных препаратов.

Поскольку не всегда при РАС нарушения сигнальных каскадов фосфорилирования затрагивают именно путь mTOR, но также и расположенные выше него эффекторы, и его мишени, и, кроме того, сопряженные с ним пути, перспективна разработка комплексных, сочетанных препаратов, воздействующих (ингибирующих) не только mTOR, но и эти, затронутые патологическими изменениями, звенья.

Применение тромбоцитов в качестве модели биохимических исследований аномалий белкового фосфорилирования при РАС позволило бы проверить гипотезы и о наличии «подгрупп» пациентов с РАС, у которых повышена либо снижена активность mTOR и сопряженных с ним сигнальных каскадов фосфорилирования, и о необходимости регуляции активности сигнального каскада mTOR в определенных границах (диапазоне), и об актуальности временного «окна» в регуляции активности mTOR в процессе онтогенетического развития детей как можно в более раннем возрасте, т.е. ответить на вопросы, поднятые в начале обзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Авторы признательны д-ру Ричарду Лозиеру за помощь в подготовке версии рукописи на английском языке.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simashkova, N. V., Boksha, I. S., Klyushnik, T. P., Iakupova, L. P., Ivanov, M. V., and Mukaetova-Ladinska, E. B. (2019) Diagnosis and management of autism spectrum disorders in Russia: clinical-biological approaches, *J. Autism Dev. Disord.*, **49**, 3906-3914.
2. Mukaetova-Ladinska, E. B., Simashkova, N. V., Mukaetova, M. S., Ivanov, M. V., and Boksha, I. S. (2018) Autism spectrum disorders in children and adults: the experience of researches from different countries, *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im S. S. Korsakova*, **118**, 92-99.
3. Trifonova, E. A., Khlebodarova, T. M., and Gruntenko, N. E. (2017) Molecular mechanisms of autism as a form of synaptic dysfunction, *Russ. J. Genet. Appl. Res.*, **7**, 869-877.
4. Vorstman, J. A. S., Parr, J. R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R. J. L., Nurnberger, J. I., Jr., and Hallmayer, J. F. (2017) Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 362-376.
5. Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., et al. (2014) Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program, *Oncogene*, **33**, 474-483.
6. Bockaert, J., and Marin, P. (2015) mTOR in brain physiology and pathologies, *Physiol. Rev.*, **95**, 1157-1187.
7. Lipton, J. O., and Sahin, M. (2014) The neurology of mTOR, *Neuron*, **84**, 275-291.
8. Mandy, W., and Lai, M. C. (2016) Annual research review: the role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition, *J. Child Psychol. Psychiatry*, **57**, 271-292, doi: 10.1111/jcpp.12501.
9. Miles, J. H., Takahashi, T. N., Bagby, S., Sahota, P. K., Vaslow, D. F., et al. (2005) Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes, *Am. J. Med. Genet. A*, **135**, 171-180, doi: 10.1002/ajmg.a.30590.
10. Liu, X., Campanac, E., Cheung, H. H., Ziats, M. N., Canterel-Thouennon, L., et al. (2017) Idiopathic autism: cellular and molecular phenotypes in pluripotent stem cell-derived neurons, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 4507-4523.
11. Nicolini, C., and Fahnstock, M. (2018) The valproic acid-induced rodent model of autism, *Exp. Neurol.*, **299**, 217-227.
12. Trifonova, E. A., Klimenko, A. I., Mustafin, Z. S., Lashin, S. A., and Kochetov, A. V. (2019) The mTOR signaling

- pathway activity and vitamin d availability control the expression of most autism predisposition genes, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6332.
13. Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., and Reichenberg, A. (2014) The familial risk of autism, *JAMA*, **311**, 1770-1777.
  14. Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., et al. (2014) Most genetic risk for autism resides with common variation, *Nat. Genet.*, **46**, 881-885.
  15. DeRosa, B. A., El Hokayem, J., Artimovich, E., Garcia-Serje, C., Phillips, A. W., et al. (2018) Convergent pathways in idiopathic autism revealed by time course transcriptomic analysis of patient-derived neurons, *Sci. Rep.*, **8**, 8423.
  16. Wen, Y., Alshikho, M. J., and Herbert, M. R. (2016) Pathway network analyses for autism reveal multisystem involvement, major overlaps with other diseases and convergence upon MAPK and calcium signaling, *PLoS One*, **11**, e0153329.
  17. Liu, G. Y., and Sabatini, D. M. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 183-203.
  18. Madigan, J. P., Hou, F., Ye, L., Hu, J., Dong, A., et al. (2018) The tuberous sclerosis complex subunit TBC1D7 is stabilized by Akt phosphorylation-mediated 14-3-3 binding, *J. Biol. Chem.*, **293**, 16142-16159.
  19. Parkhitko, A. A., Favorova, O. O., Khabibullin, D. I., Anisimov, V. N., and Henske, E. P. (2014) Kinase mTOR: regulation and role in maintenance of cellular homeostasis, tumor development, and aging, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 88-101.
  20. Winden, K. D., Ebrahimi-Fakhari, D., and Sahin, M. (2018) Abnormal mTOR activation in autism, *Annu. Rev. Neurosci.*, **41**, 1-23.
  21. Pupyshev, A. B., Korolenko, T. A., and Tikhonova, M. A. (2018) Effects and mechanisms of rapamycin action on experimental neurodegeneration, *Neurochem. J.*, **12**, 347-358.
  22. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., et al. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB, *Mol. Cell*, **22**, 159-168.
  23. Gleason, C. E., Oses-Prieto, J. A., Li, K. H., Saha, B., Situ, G., et al. (2019) Phosphorylation at distinct subcellular locations underlies specificity in mTORC2-mediated activation of SGK1 and Akt, *J. Cell Sci.*, **132**, jcs224931, doi: 10.1242/jcs.224931.
  24. Costa-Mattioli, M., and Monteggia, L. M. (2013) mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders, *Nat. Neurosci.*, **16**, 1537-1543.
  25. Menon, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., et al. (2014) Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome, *Cell*, **156**, 771-785.
  26. Han, J. M., and Sahin, M. (2011) TSC1/TSC2 signaling in the CNS, *FEBS Lett.*, **585**, 973-980.
  27. Dan, H. C., Ebbs, A., Pasparakis, M., Van Dyke, T., Basseres, D. S., and Baldwin, A. S. (2014) Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by IκB kinase α (IKKα), *J. Biol. Chem.*, **289**, 25227-25240.
  28. Crespi, B. J. (2019) Comparative psychopharmacology of autism and psychotic-affective disorders suggests new targets for treatment, *Evol. Med. Public Health*, **2019**, 149-168.
  29. Hoeffler, C. A., and Klann, E. (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease, *Trends Neurosci.*, **33**, 67-75.
  30. Onore, C., Yang, H., Van de Water, J., and Ashwood, P. (2017) Dynamic Akt/mTOR signaling in children with autism spectrum disorder, *Front. Pediatr.*, **5**, 43.
  31. Hevner, R. F. (2015) Brain overgrowth in disorders of RTK-PI3K-AKT signaling: a mosaic of malformations, *Semin. Perinatol.*, **39**, 36-43.
  32. Yeung, K. S., Tso, W. W. Y., Ip, J. J. K., Mak, C. C. Y., Leung, G. K. C., et al. (2017) Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism, *Mol. Autism*, **8**, 66.
  33. Berdichevsky, Y., Dryer, A. M., Saponjian, Y., Mahoney, M. M., Pimentel, C. A., et al. (2013) PI3K-Akt signaling activates mTOR-mediated epileptogenesis in organotypic hippocampal culture model of post-traumatic epilepsy, *J. Neurosci.*, **33**, 9056-9067.
  34. Gilbert, J., and Man, H. Y. (2017) Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity, *Front Cell Neurosci.*, **11**, 359.
  35. Sun, J., Liu, Y., Moreno, S., Baudry, M., and Bi, X. (2015) Imbalanced mechanistic target of rapamycin C1 and C2 activity in the cerebellum of Angelman syndrome mice impairs motor function, *J. Neurosci.*, **35**, 4706-4718.
  36. Huber, K. M., Klann, E., Costa-Mattioli, M., and Zukin, R. S. (2015) Dysregulation of mammalian target of rapamycin signaling in mouse models of autism, *J. Neurosci.*, **35**, 13836-13842.
  37. Oguro-Ando, A., Rosensweig, C., Herman, E., Nishimura, Y., Werling, D., et al. (2015) Increased CYFIP1 dosage alters cellular and dendritic morphology and dysregulates mTOR, *Mol. Psychiatry*, **20**, 1069-1078.
  38. Nicolini, C., Ahn, Y., Michalski, B., Rho, J. M., and Fahnstoc, M. (2015) Decreased mTOR signaling pathway in human idiopathic autism and in rats exposed to valproic acid, *Acta Neuropathol. Commun.*, **3**, 3.
  39. Poopal, A. C., Schroeder, L. M., Horn, P. S., Bassell, G. J., and Gross, C. (2016) Increased expression of the PI3K catalytic subunit p110δ underlies elevated S6 phosphorylation and protein synthesis in an individual with autism from a multiplex family, *Mol. Autism*, **7**, 3.
  40. Ruppe, V., Dilsiz, P., Reiss, C. S., Carlson, C., Devinsky, O., Zagzag, D., et al. (2014) Developmental brain abnormalities in tuberous sclerosis complex: a comparative tissue analysis of cortical tubers and perituberal cortex, *Epilepsia*, **55**, 539-550.
  41. Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., Takamatsu, Y., Hino, O., et al. (2012) Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex, *Nat. Commun*, **3**, 1292.
  42. Teliás, M., Kuznitsov-Yanovsky, L., Segal, M., and Ben-Yosef, D. (2015) Functional deficiencies in fragile X neurons derived from human embryonic stem cells, *J. Neurosci.*, **35**, 15295-15306.
  43. Pacey, L. K., Guan, S., Tharmalingam, S., Thomsen, C., and Hampson, D. R. (2015) Persistent astrocyte activation in the fragile X mouse cerebellum, *Brain Behav.*, **5**, e00400.
  44. Wang, X., Snape, M., Klann, E., Stone, J. G., Singh, A., et al. (2012) Activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the behavioral deficit of fragile x-syndrome, *J. Neurochem.*, **121**, 672-679.
  45. Lugo, J. N., Smith, G. D., Arbuckle, E. P., White, J., Holley, A. J., et al. (2014) Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins, *Front. Mol. Neurosci.*, **7**, 27.
  46. Hobert, J. A., Embacher, R., Mester, J. L., Frazier, T. W., 2nd, and Eng, C. (2014) Biochemical screening and PTEN mutation analysis in individuals with autism spectrum disorders and macrocephaly, *Eur. J. Hum. Genet.*, **22**, 273-276.
  47. Vanderver, A., Tonduti, D., Kahn, I., Schmidt, J., Medne, L., et al. (2014) Characteristic brain magnetic res-

- onance imaging pattern in patients with macrocephaly and PTEN mutations, *Am. J. Med. Genet. A*, **164a**, 627-633.
48. Huang, W. C., Chen, Y., and Page, D. T. (2016) Hyperconnectivity of prefrontal cortex to amygdala projections in a mouse model of macrocephaly/autism syndrome, *Nat. Commun.*, **7**, 13421.
  49. Karlsgodt, K. H., Rosser, T., Lutkenhoff, E. S., Cannon, T. D., Silva, A., and Bearden, C. E. (2012) Alterations in white matter microstructure in neurofibromatosis-1, *PLoS One*, **7**, e47854.
  50. Petrella, L. I., Cai, Y., Sereno, J. V., Gonçalves, S. I., Silva, A. J., and Castelo-Branco, M. (2016) Brain and behaviour phenotyping of a mouse model of neurofibromatosis type-1: an MRI/DTI study on social cognition, *Genes Brain Behav.*, **15**, 637-646.
  51. Kim, E., Wang, Y., Kim, S. J., Bornhorst, M., Jecrois, E. S., et al. (2014) Transient inhibition of the ERK pathway prevents cerebellar developmental defects and improves long-term motor functions in murine models of neurofibromatosis type 1, *Elife*, **3**, e05151, doi: 10.7554/eLife.05151.
  52. Buiting, K., Williams, C., and Horsthemke, B. (2016) Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder, *Nat. Rev. Neurol.*, **12**, 584-593.
  53. Maranga, C., Fernandes, T. G., Bekman, E., and da Rocha, S. T. (2020) Angelman syndrome: a journey through the brain, *FEBS J*, **287**, 2154-2175.
  54. Castro, J., Garcia, R. I., Kwok, S., Banerjee, A., Petravic, J., et al. (2014) Functional recovery with recombinant human IGF1 treatment in a mouse model of Rett Syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9941-9946.
  55. Ricciardi, S., Boggio, E. M., Grosso, S., Lonetti, G., Forlani, G., et al. (2011) Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1182-1196.
  56. Yoo, T., Cho, H., Park, H., Lee, J., and Kim, E. (2019) Shank3 Exons 14-16 Deletion in glutamatergic neurons leads to social and repetitive behavioral deficits associated with increased cortical layer 2/3 neuronal excitability, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 458.
  57. Bidinosti, M., Botta, P., Krüttner, S., Proenca, C. C., Stoehr, N., et al. (2016) CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency, *Science*, **351**, 1199-1203.
  58. Lee, Y., Kim, S. G., Lee, B., Zhang, Y., Kim, Y., et al. (2017) Striatal Transcriptome and interactome analysis of Shank3-overexpressing mice reveals the connectivity between Shank3 and mTORC1 signaling, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 201.
  59. Piochon, C., Kloth, A. D., Grasselli, G., Titley, H. K., Nakayama, H., et al. (2014) Cerebellar plasticity and motor learning deficits in a copy-number variation mouse model of autism, *Nat. Commun.*, **5**, 5586.
  60. Meyza, K. Z., and Blanchard, D. C. (2017) The BTBR mouse model of idiopathic autism – current view on mechanisms, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **76**, 99-110.
  61. Hutsler, J. J., and Zhang, H. (2010) Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders, *Brain Res.*, **1309**, 83-94.
  62. Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., et al. (2014) Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits, *Neuron*, **83**, 1131-1143.
  63. Overwater, I. E., Rietman, A. B., Mous, S. E., Bindels-de Heus, K., Rizopoulos, D., et al. (2019) A randomized controlled trial with everolimus for IQ and autism in tuberous sclerosis complex, *Neurology*, **93**, e200-e209.
  64. Tyagi, R., Shahani, N., Gorgen, L., Ferretti, M., Pryor, W., et al. (2015) Rheb Inhibits protein synthesis by activating the PERK-eIF2 $\alpha$  signaling cascade, *Cell Rep.*, **10**, 684-693.
  65. Zeng, L. H., Rensing, N. R., Zhang, B., Gutmann, D. H., Gambello, M. J., and Wong, M. (2011) Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of tuberous sclerosis complex, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 445-454.
  66. Meikle, L., Pollizzi, K., Egnor, A., Kramvis, I., Lane, H., et al. (2008) Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function, *J. Neurosci.*, **28**, 5422-5432.
  67. French, J. A., Lawson, J. A., Yapici, Z., Ikeda, H., Polster, T., et al. (2016) Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study, *Lancet*, **388**, 2153-2163.
  68. Mizuguchi, M., Ikeda, H., Kagitani-Shimono, K., Yoshinaga, H., Suzuki, Y., et al. (2019) Everolimus for epilepsy and autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: EXIST-3 substudy in Japan, *Brain Dev.*, **41**, 1-10.
  69. Saffari, A., Brösse, I., Wiemer-Kruel, A., Wilken, B., Kreuzaler, P., et al. (2019) Safety and efficacy of mTOR inhibitor treatment in patients with tuberous sclerosis complex under 2 years of age – a multicenter retrospective study, *Orphanet J. Rare Dis.*, **14**, 96.
  70. Martin, P., Wagh, V., Reis, S. A., Erdin, S., Beauchamp, R. L., et al. (2020) TSC patient-derived isogenic neural progenitor cells reveal altered early neurodevelopmental phenotypes and rapamycin-induced MNK-eIF4E signaling, *Mol. Autism*, **11**, 2.
  71. Bramham, C. R., Jensen, K. B., and Proud, C. G. (2016) Tuning specific translation in cancer metastasis and synaptic memory: control at the MNK-eIF4E axis, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 847-858.
  72. Pellerin, D., Çaku, A., Fradet, M., Bouvier, P., Dubé, J., and Corbin, F. (2016) Lovastatin corrects ERK pathway hyperactivation in fragile X syndrome: potential of platelet's signaling cascades as new outcome measures in clinical trials, *Biomarkers*, **21**, 497-508.
  73. Darnell, J. C., and Klann, E. (2013) The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS, *Nat. Neurosci.*, **16**, 1530-1536.
  74. Sledziowska, M., Galloway, J., and Baudouin, S. J. (2020) Evidence for a contribution of the Nlgn3/Cyflp1/Fmrl pathway in the pathophysiology of autism spectrum disorders, *Neuroscience*, **445**, 31-41.
  75. Sharma, A., Hoeffler, C. A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S. M., et al. (2010) Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome, *J. Neurosci.*, **30**, 694-702.
  76. Gross, C., Banerjee, A., Tiwari, D., Longo, F., White, A. R., et al. (2019) Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibition ameliorates a broad range of fragile X syndrome-associated deficits in a mouse model, *Neuropsychopharmacology*, **44**, 324-333.
  77. Bhattacharya, A., Mamcarz, M., Mullins, C., Choudhury, A., Boyle, R. G., et al. (2016) Targeting translation control with p70 S6 kinase 1 inhibitors to reverse phenotypes in fragile X syndrome mice, *Neuropsychopharmacology*, **41**, 1991-2000.
  78. Auerbach, B. D., Osterweil, E. K., and Bear, M. F. (2011) Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology, *Nature*, **480**, 63-68.
  79. Bartley, C. M., O'Keefe, R. A., Blice-Baum, A., Mihailescu, M. R., Gong, X., et al. (2016) Mammalian FMRP S499 is phosphorylated by CK2 and promotes secondary phosphorylation of FMRP, *eNeuro*, **3**, ENEURO0092-16.2016, doi: 10.1523/ENEURO.0092-16.2016.
  80. Papa, A., and Pandolfi, P. P. (2019) The PTEN-PI3K axis in cancer, *Biomolecules*, **9**, 153.

81. Song, M. S., Salmena, L., and Pandolfi, P. P. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 283-296.
82. Nikolaeva, I., Kazdoba, T. M., Crowell, B., and D'Arcangelo, G. (2017) Differential roles for Akt and mTORC1 in the hypertrophy of Pten mutant neurons, a cellular model of brain overgrowth disorders, *Neuroscience*, **354**, 196-207.
83. Sokol, D. K., Maloney, B., Westmark, C. J., and Lahiri, D. K. (2019) Novel contribution of secreted amyloid- $\beta$  precursor protein to white matter brain enlargement in autism spectrum disorder, *Front. Psychiatry*, **10**, 165.
84. Lahiri, D. K., Sokol, D. K., Erickson, C., Ray, B., Ho, C. Y., and Maloney, B. (2013) Autism as early neurodevelopmental disorder: evidence for an sAPP $\alpha$ -mediated anabolic pathway, *Front. Cell Neurosci.*, **7**, 94.
85. Kaczorowski, J. A., Smith, T. F., Shrewsbury, A. M., Thomas, L. R., Knopik, V. S., and Acosta, M. T. (2020) Neurofibromatosis type 1 implicates Ras pathways in the genetic architecture of neurodevelopmental disorders, *Behav. Genet.*, **50**, 191-202.
86. Garg, S., Brooks, A., Burns, A., Burkitt-Wright, E., Kerr, B., et al. (2017) Autism spectrum disorder and other neurobehavioural comorbidities in rare disorders of the Ras/MAPK pathway, *Dev. Med. Child Neurol.*, **59**, 544-549.
87. Banerjee, S., Crouse, N. R., Emnett, R. J., Gianino, S. M., and Gutmann, D. H. (2011) Neurofibromatosis-1 regulates mTOR-mediated astrocyte growth and glioma formation in a TSC/Rheb-independent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15996-16001.
88. Weiss, B., Widemann, B. C., Wolters, P., Dombi, E., Vinks, A., et al. (2015) Sirolimus for progressive neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas: a neurofibromatosis Clinical Trials Consortium phase II study, *Neuro Oncol.*, **17**, 596-603.
89. Richards, C., Jones, C., Groves, L., Moss, J., and Oliver, C. (2015) Prevalence of autism spectrum disorder phenomenology in genetic disorders: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Psychiatry*, **2**, 909-916.
90. Zoghbi, H. Y., and Bear, M. F. (2012) Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a009886.
91. Sun, J., Liu, Y., Tran, J., O'Neal, P., Baudry, M., and Bi, X. (2016) mTORC1-S6K1 inhibition or mTORC2 activation improves hippocampal synaptic plasticity and learning in Angelman syndrome mice, *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 4303-4314.
92. Zhang, Z. N., Freitas, B. C., Qian, H., Lux, J., Acab, A., et al. (2016) Layered hydrogels accelerate iPSC-derived neuronal maturation and reveal migration defects caused by MeCP2 dysfunction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3185-3190.
93. Wang, H., Xu, H., Wang, X., Zhou, A., Wu, M., et al. (2016) Amyloid precursor protein associates with autism spectrum disorder: a potential candidate biomarker for early screening, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **9**, 22259-22266.
94. Li, Y., Wang, H., Muffat, J., Cheng, A. W., Orlando, D. A., et al. (2013) Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons, *Cell Stem Cell*, **13**, 446-458.
95. Monteiro, P., and Feng, G. (2017) SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder, *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 147-157.
96. Shcheglovitov, A., Shcheglovitova, O., Yazawa, M., Portmann, T., Shu, R., et al. (2013) SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients, *Nature*, **503**, 267-271.
97. Vahdatpour, C., Dyer, A. H., and Tropea, D. (2016) Insulin-like growth factor 1 and related compounds in the treatment of childhood-onset neurodevelopmental disorders, *Front. Neurosci.*, **10**, 450.
98. Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M., Bockmann, J., Chaste, P., et al. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders, *Nat. Genet.*, **39**, 25-27.
99. Okamoto, N., Kubota, T., Nakamura, Y., Murakami, R., Nishikubo, T., et al. (2007) 22q13 Microduplication in two patients with common clinical manifestations: a recognizable syndrome? *Am. J. Med. Genet. A*, **143a**, 2804-2809.
100. Khlebodarova, T. M., Kogai, V. V., Trifonova, E. A., and Likhoshvai, V. A. (2018) Dynamic landscape of the local translation at activated synapses, *Mol Psychiatry*, **23**, 107-114. doi: 10.1038/mp.2017.245.
101. Burnside, R. D., Pasion, R., Mikhail, F. M., Carroll, A. J., Robin, N. H., et al. (2011) Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay, *Hum. Genet.*, **130**, 517-528.
102. Suzuki, A. M., Griesi-Oliveira, K., de Oliveira Freitas Machado, C., Vadasz, E., Zachi, E. C., et al. (2015) Altered mTORC1 signaling in multipotent stem cells from nearly 25% of patients with nonsyndromic autism spectrum disorders, *Mol. Psychiatry*, **20**, 551-552.
103. Neves-Pereira, M., Müller, B., Massie, D., Williams, J. H., O'Brien, P. C., et al. (2009) Deregulation of EIF4E: a novel mechanism for autism, *J. Med. Genet.*, **46**, 759-765.
104. Meyer, U. (2013) Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems, *Biol. Psychiatry*, **75**, 307-315, doi: 10.1016/j.biopsych.2013.07.011.
105. Steinmetz, A. B., Stern, S. A., Kohtz, A. S., Descalzi, G., and Alberini, C. M. (2018) Insulin-like growth factor II targets the mtor pathway to reverse autism-like phenotypes in mice, *J. Neurosci.*, **38**, 1015-1029.
106. Rosina, E., Battan, B., Siracusanò, M., Di Criscio, L., Hollis, F., et al. (2019) Disruption of mTOR and MAPK pathways correlates with severity in idiopathic autism, *Transl. Psychiatry*, **9**, 50.
107. Ganesan, H., Balasubramanian, V., Iyer, M., Venugopal, A., Subramaniam, M. D., et al. (2019) mTOR signalling pathway - A root cause for idiopathic autism? *BMB Rep.*, **52**, 424-433.
108. Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., et al. (2015) FOXP1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders, *Cell*, **162**, 375-390.
109. Baier, P. C., Koch, J. M., Seeck-Hirschner, M., Ohlmeyer, K., Wilms, S., et al. (2009) A flow-cytometric method to investigate glutamate-receptor-sensitivity in whole blood platelets - results from healthy controls and patients with schizophrenia, *J. Psychiatr. Res.*, **43**, 585-591.
110. Boyanova, D., Nilla, S., Birschmann, I., Dandekar, T., and Dittrich, M. (2012) PlateletWeb: a systems biologic analysis of signaling networks in human platelets, *Blood*, **119**, e22-34.
111. Kumari, D., Bhattacharya, A., Nadel, J., Moulton, K., Zeak, N. M., et al. (2014) Identification of fragile X syndrome specific molecular markers in human fibroblasts: a useful model to test the efficacy of therapeutic drugs, *Hum. Mutat.*, **35**, 1485-1494.
112. McCoy, M., Poliquin-Duchesneau, D., and Corbin, F. (2016) Molecular dynamics of FMRP and other RNA-binding proteins in MEG-01 differentiation: the role of mRNP complexes in non-neuronal development, *Biochem. Cell Biol.*, **94**, 597-608.
113. Pellerin, D., Lortie, A., and Corbin, F. (2018) Platelets as a surrogate disease model of neurodevelopmental disorders: insights from fragile X syndrome, *Platelets*, **29**, 113-124.

## PROTEIN PHOSPHORYLATION SIGNALING CASCADES IN AUTISM WITH EMPHASIS ON THE mTOR PATHWAY

### Review

**I. S. Boksha<sup>1,2\*</sup>, T. A. Prokhorova<sup>1</sup>, E. B. Tereshkina<sup>1</sup>,  
O. K. Savushkina<sup>1</sup>, and G. Sh. Burbaeva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Mental Health Research Center, 115522 Moscow, Russia; E-mail: boksha\_irina@mail.ru*

<sup>2</sup> *Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; E-mail: boksha\_irina@gamaleya.org*

The mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway is a central regulator of cell metabolism, growth, and survival in response to hormones, growth factors, nutrients, and stress-induced signals. For this review, we analyzed the available literature that describes how molecular abnormalities of signaling cascades associated with mTOR are encountered in autism spectrum disorders (ASDs), and we outline prospects for pathogenetically-targeted pharmacotherapeutic approaches to ASDs, especially in syndromic ASDs. Considering the available experimental and clinical data, we suggest that very early detection of molecular abnormalities in ASD risk groups can be facilitated from studies of peripheral blood platelets. Also, the determination of a time window in which critical dysregulations in the activity of the described pathways in risk groups might suggest promising directions for further studies that could lead to more effective pharmacotherapeutic interventions in ASDs.

*Keywords:* mTOR, signaling cascades, protein phosphorylation, autism spectrum disorders