

# Роль дизрегуляции нейрональных протеинкиназных сигнальных путей при психических расстройствах

**Федоренко Ольга Юрьевна**

*Д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и биохимии ФГБУ «НИИПЗ» СО РАМН*

Исследования последних лет позволили расширить наше представление о патогенезе основных психических расстройств, вводя понятия нейробиологических механизмов развития патологии, что делает возможным определение дополнительных мишеней в ряду психофармакологических воздействий. Изучение киназных сигнальных путей представляет собой новое и быстро развивающееся направление в области нейрональной сигнальной трансдукции, которое связано с нарушением нейробиологических процессов при психических расстройствах (Федоренко О. Ю., Иванова С. А., 2012; Lang U. E., 2007; Lang F., 2010 и др.; Giese K. P., Mizuno K., 2013).

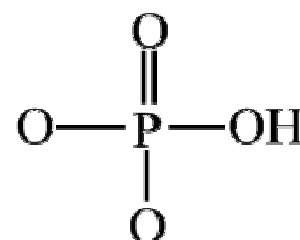
## ЧАСТЬ 1

### ПРОТЕИНКИНАЗЫ И ЗНАЧЕНИЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

#### Почему фосфорилирование белков так важно?

Протеинкиназы – это ферменты, которые модифицируют другие белки путем фосфорилирования.

Фосфорилирование – один из наиболее распространенных видов посттрансляционной модификации белка.



**Фосфатная группа**

Фосфорилирование, как правило, изменяет ферментативную активность, положение белка в клетке или взаимодействие с другими белками.

Впервые принципиально важное значение фосфорилирования в функциональной регуляции белков продемонстрировали американские биохимики Эдвин Кребс и Эдмонд Фишер в 1950-е годы. Они изучали фермент гликогенфосфорилазу, катализирующий распад гликогена.

Ученые обнаружили, что активация-инактивация фермента вызывалась его обратимым фосфорилированием. Когда фермент фосфорилирован, его конформация изменяется, и он становится каталитически активным, а когда фермент дефосфорилирован, то он возвращается в изначальную неактивную форму.



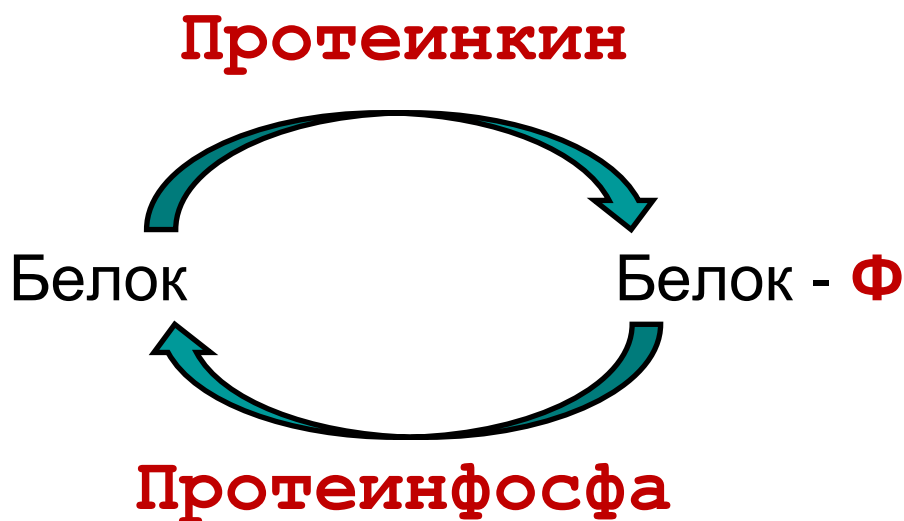
Эдвин Кребс и Эдмонд Фишер

В 1992 году за открытие обратимого белкового фосфорилирования Эдвин Кребс и Эдмонд Фишер получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины (Torres N. H., 1993).

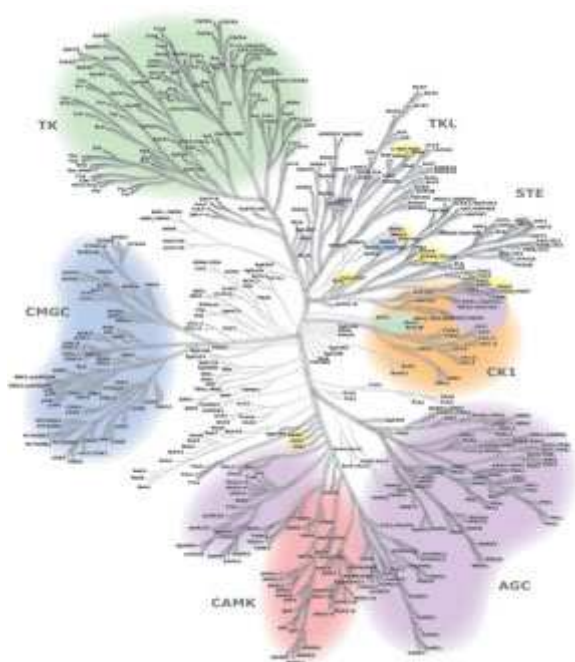
Протеинфосфатазы – ферменты, которые отщепляют фосфатную группу от белка. Фосфатная группа добавляется к белку с помощью протеинкиназы.

Более половины белков в организме человека находятся в фосфорилированном или дефосфорилированном состояниях. Таким образом, они могут быть «включены» или «выключены». Эта

фундаментальная концепция представляет собой суть и значение фосфорилирования в регуляции функции белков.



Протеинкиназы – это молекулярные переключатели, которые регулируют функцию белков. Такие переключения происходят в наших клетках все время. Таким образом, всего одна маленькая фосфатная группа может колоссально изменить функциональное состояние большого белка.



Со времени открытия Кребса и Фишера стало ясно, что существует много других протеинкиназных сигнальных путей, играющих важную роль как в физиологических процессах, так и в патофизиологии многих заболеваний. Историю их открытия можно описать экспоненциальной кривой.

Кином – полный набор киназ и их продуктов, находящийся внутри клеток данного организма.

В мозге взрослого человека экспрессировано более чем 250 протеинкиназ. Они влияют на различные функции мозга (процессы обучения, памяти, внимания и т.д.), действуя на возбудимость нейронов и синаптическую трансмиссию, изменяя свойства или плотность ионных каналов. Кроме того, они регулируют экспрессию генов или синтез белков, вызывая структурные изменения имеющихся синапсов или модулируя синаптогенез (Giese K. P., Mizuno K., 2013).

## **ЧАСТЬ 2**

### **НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫЕ ГИПОТЕЗЫ ШИЗОФРЕНИИ**

#### **Актуальные нейротрансмиттерные гипотезы шизофрении**

Шизофрения - тяжёлое психическое заболевание, склонное к хроническому течению, которым страдает 1% населения. Колоссальные усилия уже затрачены на выяснение этиопатогенеза шизофрении, но фундаментальные нейробиологические процессы, ведущие к этому заболеванию, до сих пор остаются невыясненными.

Наиболее актуальными нейротрансмиттерными гипотезами шизофрении являются дофаминовая и глутаматная.

#### **Эффекты дофамина**

**Дофамин – нейромедиатор** (нейромедиаторы – биологически активные химические вещества, посредством которых осуществляется передача электрического импульса между нейронами через синаптическое пространство), служит важной частью «системы поощрения» мозга, поскольку вызывает чувство удовольствия (или удовлетворения).

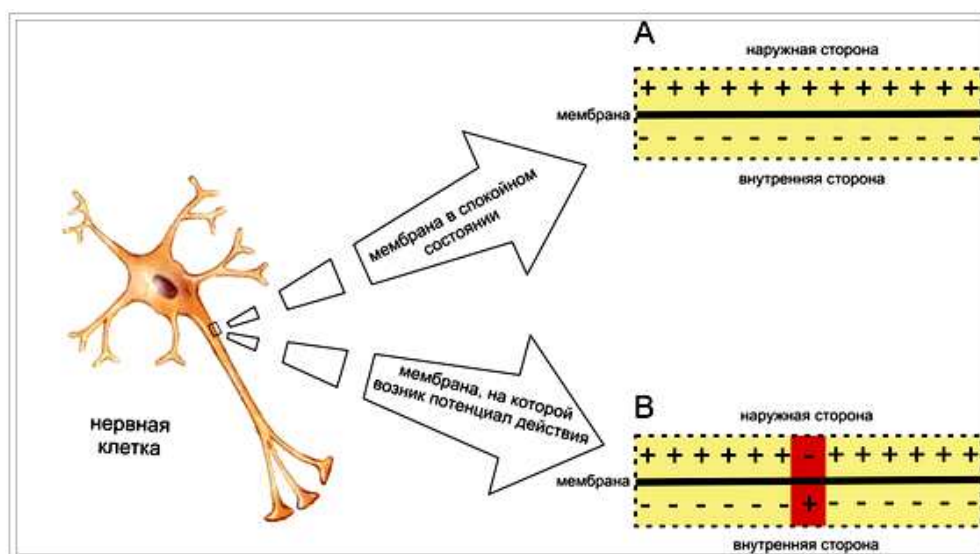
Дофамин естественным образом вырабатывается в больших количествах во время позитивного, по субъективному представлению человека опыта – к примеру, секса, приема вкусной пищи, приятных телесных ощущений, а также стимуляторов, ассоциированных с ними.

Нейробиологические эксперименты показали, что даже воспоминания о позитивном поощрении могут увеличить уровень дофамина, поэтому данный нейромедиатор используется мозгом для оценки и мотивации, закрепляя важные для выживания и продолжения рода действия.

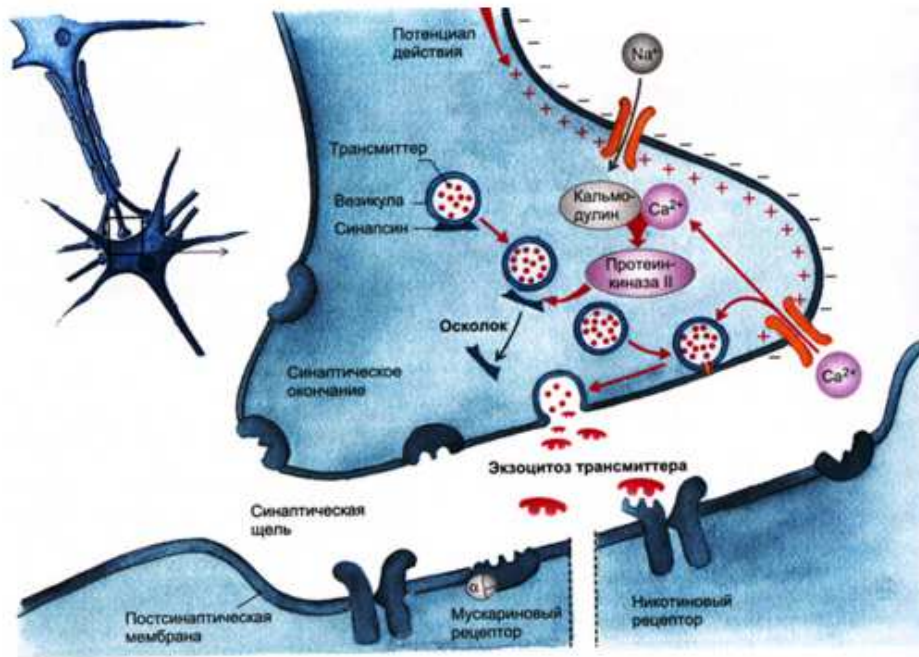
Физической основой нервного импульса является **потенциал действия**.

**Потенциал действия** – волна возбуждения, перемещающаяся по мембране клетки в процессе передачи нервного сигнала.

По сути своей представляет электрический разряд – быстрое кратковременное изменение потенциала на небольшом участке мембраны нейрона, в результате которого наружная поверхность этого участка становится отрицательно заряженной по отношению к соседним участкам мембраны.



## Как импульс проходит через синапс?



В пресинаптическом нервном окончании в синаптических везикулах аккумулируются нейротрансмиттеры.

Потенциал действия, достигая нервного окончания, **деполяризует его мембрану**. При этом открываются кальциевые каналы и возникает входящий ток ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  вызывают процесс слияния везикул с пресинаптической мембраной. Везикулы открываются и выбрасывают свое содержимое в синаптическую щель.

С другой стороны при помощи активации **протеинкиназы II** фиксированные на цитоскелете везикулы отделяются и собираются на пресинаптической мембране клетки.

Далее нейротрансмиттеры связываются со своими рецепторами на постсинаптической мембране. При этом открываются натриевые ионные каналы и ионы  $\text{Na}^+$  начинают входить внутрь клетки, вызывая **деполяризацию мембраны**.

Деполяризация мембраны вызывает потенциал действия, а оставшиеся нейротрансмиттеры подвергаются гидролизу ферментами в синаптической щели. Продукты гидролиза захватываются обратно для повторного использования

## **Действие дофамина**

Дофамин действует через дофаминовые рецепторы: D1, D2, D3 и D4. Мы все наследуем какое-то количество дофаминовых рецепторов. При болезни Паркинсона происходит утрата дофаминергических нейронов. При избыточном количестве D2 в мезолимбической области развивается шизофрения, а избыток дофамина приводит к развитию галлюцинаций.

Для аддиктивных состояний характерен дефицит D2 дофаминовых рецепторов, обуславливающий снижение способности испытывать удовольствие от естественных радостей нормальной жизни. При употреблении наркотиков стимулируются D2 дофаминовые рецепторы, что приводит к развитию галлюцинаций.

Избыток D4 характерен для синдрома гиперактивности.

## **Дофаминовая теория шизофрении**



Арвид Карлсон – основоположник дофаминовой теории шизофрении, получил в 2000 году Нобелевскую премию в области медицины.

Дофаминовая теория шизофрении постулирует дисфункцию дофаминергической нейротрансмиссивной системы. Она основана на психодислептических эффектах дофаминовых агонистов, а также на способности типичных антипсихотических препаратов, являющихся антагонистами дофаминовых рецепторов 2 (D2) лечить позитивные симптомы (бред, галлюцинации) шизофрении.

## **Глутаматная теория шизофрении**

Тот клинический факт, что D2 блокада значительно менее эффективна при лечении негативных симптомов (таких как социальный аутизм, отсутствие мотивации) или когнитивные изменения, включая дефицит внимания и рабочей памяти) указывает на вовлечение других, отличных от дофаминовых, механизмов.

Глутаматергическая гипотеза в изначальной форме постулирует, что гипоглутаматергические состояния и гипофункция NMDA рецепторов представляют основные элементы патофизиологии заболевания.

В последнее время общий интерес к исследованиям глутаматергической системы при шизофрении многократно возрос в связи с успешными клиническими испытаниями антипсихотического вещества, действующего на метаботрофные глутаматные рецепторы.

Несмотря на противопоставление дофаминергических и глутаматергических механизмов в историческом аспекте, ни одна унитарная нейротрансмиттерная гипотеза не может полностью объяснить это комплексное гетерогенное заболевание.

## **Взаимодействие дофаминовой и глутаматной теорий шизофрении**

Фактически, глутаматная и дофаминовая системы тесно взаимодействуют как в регуляции нормальной кортикальной активности, относящейся к познанию, во взаимодействиях между префронтальной корой, средним мозгом и стриатумом, имеющим отношение к шизофрении, так и в контексте генетического риска заболевания.

Поэтому сейчас эти теории существуют не отдельно, а во взаимодействии, постулируя сбалансированность между дофаминергическими и глутаматергическими нейронами. Дефицит



глутаматной трансмиссии может приводить к дофаминовой дисфункции, ассоциированной с шизофренией. Дофаминовые изменения, в свою очередь, могут усиливать дефицит глутаматной трансмиссии.

### **ЧАСТЬ 3**

## **ДОФАМИНОВАЯ НЕЙРОТРАНСМИССИЯ, KCNQ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ, EAAT3 ГЛУТАМАТНЫЕ ТРАНСПОРТЕРЫ И PIP5K2A ПРОТЕИНКИНАЗА**

### **Дофаминергическая нейротрансмиссия и KCNQ каналы**

Недавно получены доказательства тесной связи между дофаминергической нейротрансмиссией и функционированием KCNQ калиевых каналов.

Эти данные можно трансформировать в современные парадигмы психических расстройств, характеризующихся повышенной дофаминергической активностью. Например, при шизофрении наблюдается снижение активности KCNQ калиевых каналов и повышение дофаминергической нейротрансмиссии.

### **KCNQ калиевые каналы**

Калиевые каналы играют ключевую роль в регуляции возбудимости нейронов. Потенциал-зависимые калиевые KCNQ каналы начинают открываться при  $-60$  мВ, поэтому функционально активны при потенциале покоя мембраны в отличие от большинства потенциал-зависимых  $K^+$  каналов.

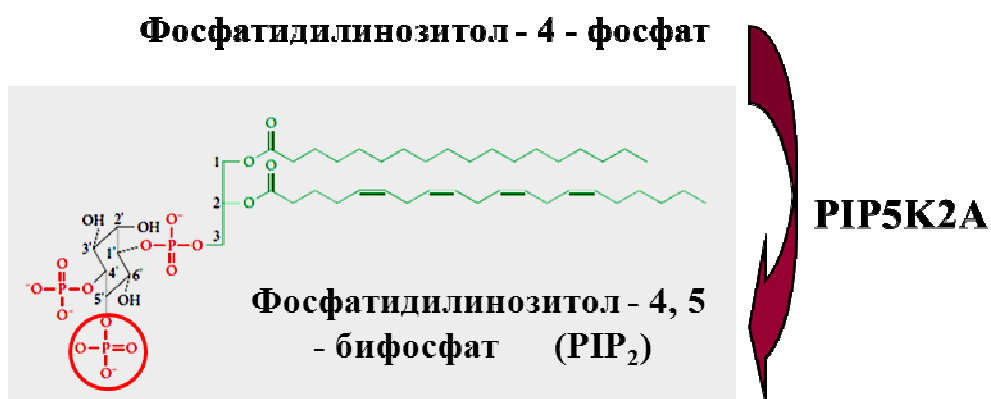
KCNQ каналы медленно активируются при деполяризации и медленно инактивируются при реполяризации. KCNQ каналы — неинактивирующие ("протекающие")  $K^+$  каналы при физиологических потенциалах покоя.

В отсутствие внешних модулирующих влияний KCNQ каналы стабилизируют потенциал покоя мембраны нейронов и притормаживают разряд потенциала действия при прохождении возбуждающего стимула.

Для открытия KCNQ-каналов требуется фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат ( $\text{PIP}_2$ ).



$\text{PIP}_2$  образуется при фосфорилировании фосфатидилинозитол-4-фосфата в 5 положении инозитольного кольца фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназой тип 2 альфа ( $\text{PIP5K2A}$ ).



Ген  $\text{PIP5K2A}$  выдвинут в качестве перспективного гена-кандидата предрасположенности к шизофрении на позиционном основании (Harrison P.J., Weinberger D.R., 2005).

Ген расположен на хромосоме 10p (10p12) в районе, сцепленном с шизофренией (Rice J.P. et al., 1997; Faraone S.V. et al., 1998; Schwab

S.G. et al., 1998; Straub et al., 1998; Foroud et al., 2000; Levinson et al., 2000; De Lisi et al., 2002; Holliday et al., 2005).

Доказательства ассоциации между полиморфизмами PIP5K2A и шизофренией получены в нескольких независимых исследованиях на немецкой, голландской, китайской и других популяциях (Stopkova P. et al., 2003, 2005; Schwab S.G. et al., 2006; Bakker S.C. et al., 2007; Carter C.J., 2007; He Z. et al., 2007; Lang U. et al., 2007; Saggars-Gray L. et al., 2008).

Работы генетиков заканчивались словами о необходимости проведения функциональных исследований полиморфизма N251S-PIP5K2A.



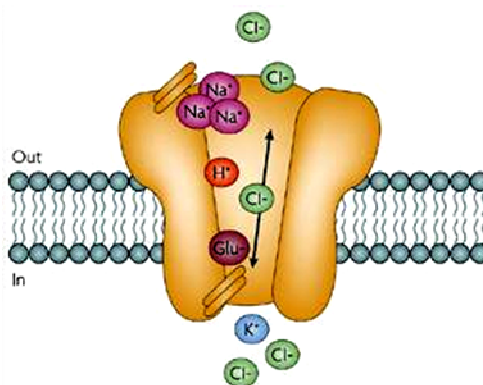
activation of AKT (protein kinase B). There is additional evidence for involvement of AKT-mediated signalling pathways in development of schizophrenia. Impaired phosphorylation and expression of AKT<sup>72</sup> as well as association of SNPs in the AKT gene with schizophrenia have been reported.<sup>72,73</sup> Additional support for a role of AKT pathways in schizophrenia comes from the use of lithium, valproic acid and carbamazepine as mood stabilizers in major psychoses. These drugs have been found to interfere with AKT-mediated pathways.<sup>62</sup>

participating in development of schizophrenia. The here reported association of DNA sequence variants in the PIP5K2A gene has been replicated in an additional, independent sample. However, before a role in ethiology of schizophrenia can be postulated, impact of the N251S amino-acid exchange variant on PIP5K2A activity has to be shown in future functional studies.

#### Acknowledgments

## EAAT3 глутаматные транспортеры

Основная функция EAAT3 — быстрое удаление избыточного глутамата из синапса. Таким образом предотвращается цитотоксический эффект глутамата на нейроны и ограничивается рецепторная десенситизация.



EAAT3 самый первый экспрессируется в мозге плода и поэтому играет значительную роль в поддержании низкого уровня внеклеточного глутамата на самых ранних стадиях развития, когда остальные транспортёры ещё неэффективны.

Выявлено снижение экспрессии EAAT3 белка в префронтальной коре у больных шизофренией, что предполагает уменьшение обратного захвата глутамата, вовлеченное в патофизиологию данного заболевания.

В свете полученных доказательств ассоциации между мутацией (N251S)-PIP5K2A и шизофренией нами проведены комплексные исследования функциональной регуляции нейрональной PIP5K2A киназой и её мутантной формой (N251S)-PIP5K2A, ассоциированной с шизофренией, нейрональных KCNQ калиевых каналов, отвечающих за стабильность потенциала покоя нейронов, и глутаматных EAAT3 транспортёров, предотвращающих нейротоксический эффект (Fedorenko O. et al., 2008; Fedorenko O. et al., 2009).

Оценено влияние нейрональной PIP5K2A киназы и мутантной формы (N251S)-PIP5K2A на активность нейрональных KCNQ калиевых каналов с учётом их гетерогенности. Обнаружено значительное увеличение амплитуды токов гетеромерных нейрональных KCNQ2/KCNQ3 и KCNQ3/KCNQ5 калиевых каналов при коэкспрессии с PIP5K2A, не сопровождаемое заметными изменениями в кинетике работы каналов (без сдвига потенциальной зависимости и изменения временного цикла активации – дезактивации). Нами впервые в мире обнаружено, что мутантная форма (N251S)-PIP5K2A киназы не оказывает стимулирующего эффекта на работу нейрональных гетеромерных KCNQ2/KCNQ3 и KCNQ3/KCNQ5 калиевых каналов. Обнаружено угнетающее действие мутантной киназы на KCNQ2 и KCNQ2/KCNQ3 токи.

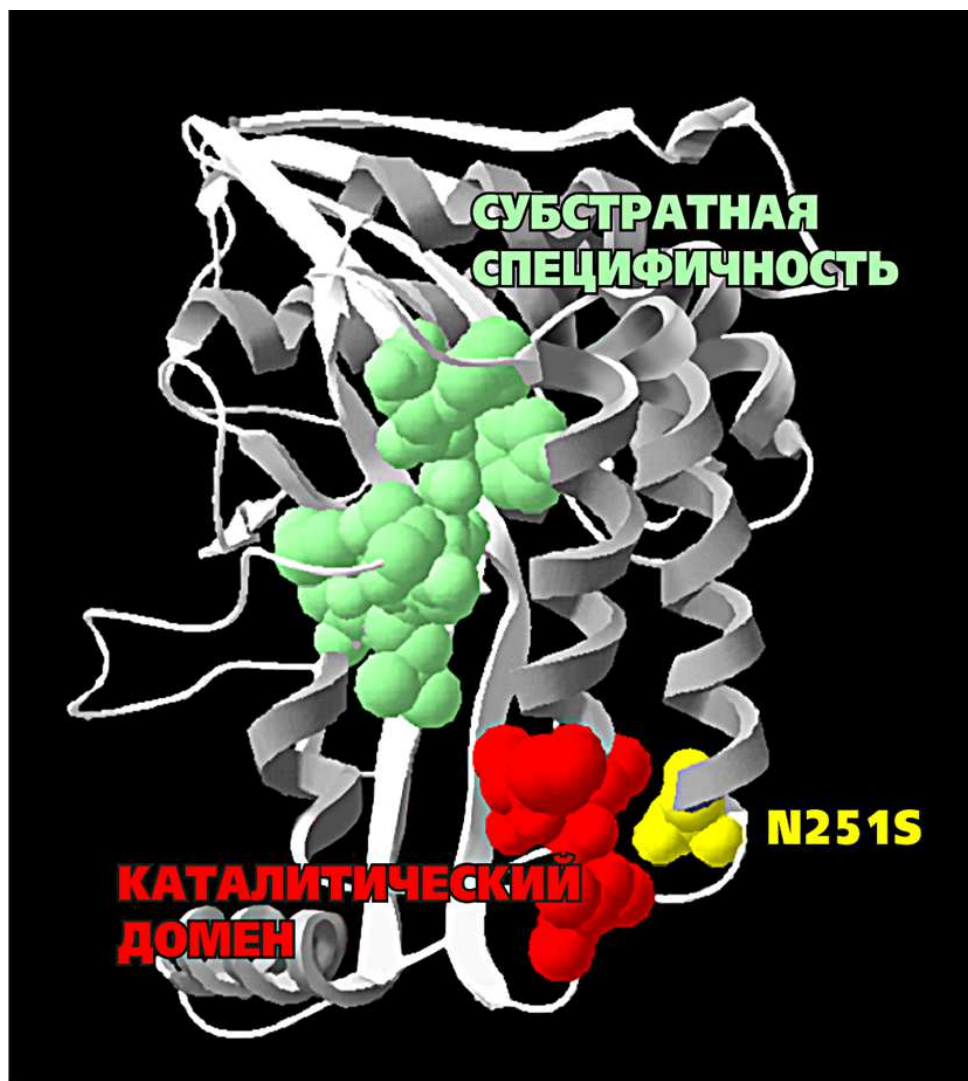
Выявленное снижение активности нейрональных KCNQ калиевых каналов способствует повышению возбудимости дофаминергических нейронов и увеличению дофаминергической нейротрансмиссии.

Получены принципиально новые фундаментальные данные о том, что PIP5K2A служит сигнальным элементом в регуляции активности нейрональных глутаматных EAAT3 транспортёров. Сравнительное изучение функциональной регуляции PIP5K2A и её мутантной формой (N251S)-PIP5K2A, ассоциированной с шизофренией, позволило выявить стимулирующий эффект PIP5K2A киназы на работу нейрональных глутаматных EAAT3 транспортёров и нарушение этой функции у мутантной формы (N251S)-PIP5K2A. Мутантная форма проявляет доминантный ингибирующий эффект по отношению к дикому типу PIP5K2A киназы (Fedorenko O. et al., 2009).

Выявленное снижение активности нейрональных EAAT3 глутаматных транспортёров способствует нарушению захвата внеклеточного глутамата, что приводит к развитию нейротоксичности и десенситизации рецепторов (уже на самых ранних стадиях развития мозга плода).

Выраженные функциональные нарушения регуляции нейрональных KCNQ калиевых каналов и глутаматных EAAT3 транспортёров мутантной, ассоциированной с шизофренией (N251S)-PIP5K2A киназой, в значительной мере объясняют повышение мезенцефалического дофаминавого потенциала действия у больных шизофренией (носителей этой мутации), а также нарушение метаболизма глутамата в мозге у больных, которое и ведёт к развитию психотических симптомов.

Впервые построена трёхмерная модель мутантной формы (N251S)-PIP5K2A, демонстрирующая нарушение структурно-функциональной интегрированности каталитического домена киназы.



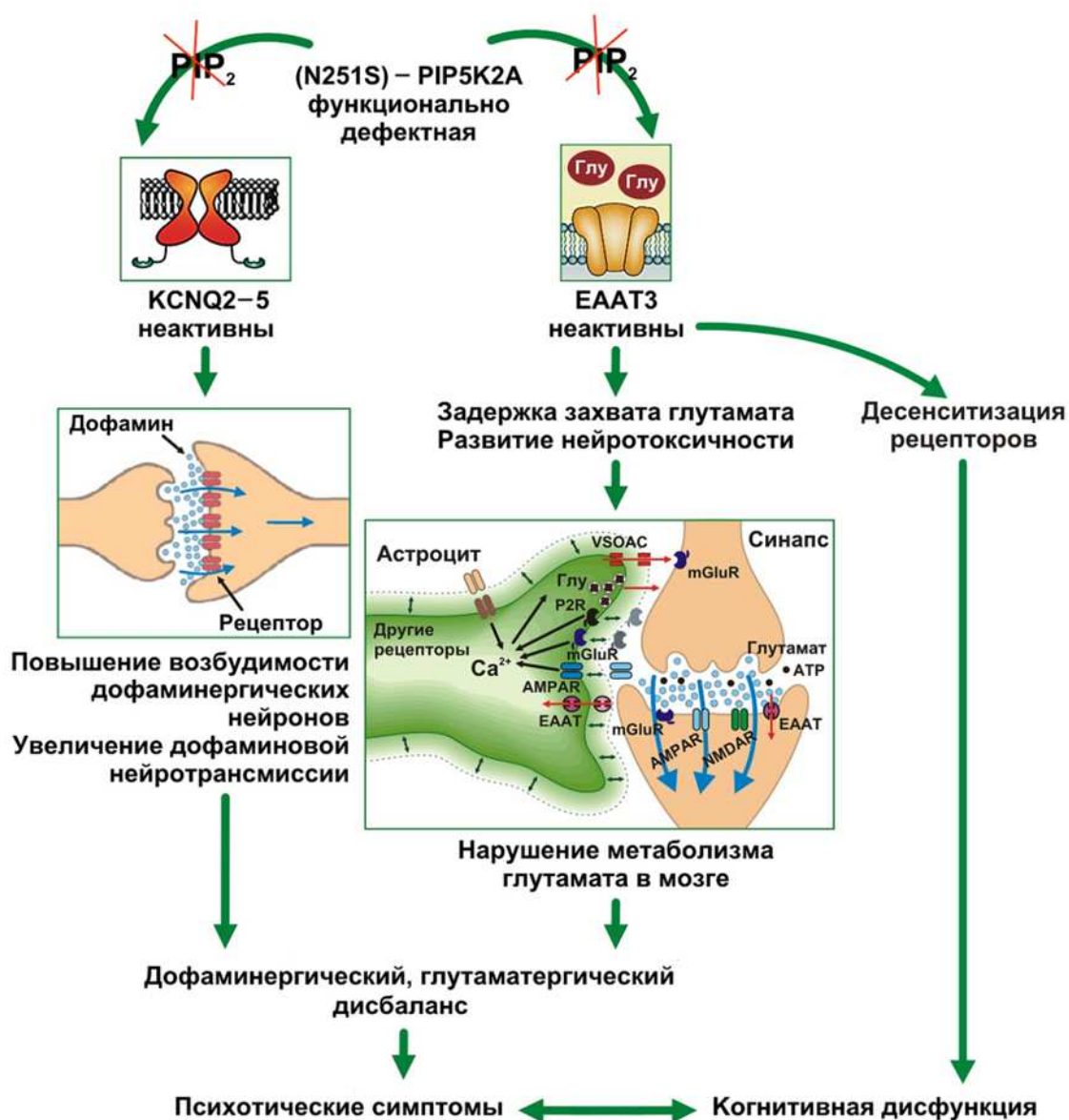
PIP5K2A модель, созданная с использованием системы координат разрешённой кристаллической структуры близкородственной фосфатидилинозитол фосфат киназы тип II бета PIP5P2B (1BO1). Цифрами обозначены ключевые аминокислотные остатки в субстратно специфическом домене (1), каталитическом домене (2) и остатке Ser 251 (3).

В трехмерной модели мутантной формы киназы (N251S)-PIP5K2A Asn251 (аспарагин в 251 положении) расположен близко к Ile-Ile-Asp фрагменту (Ile-изолейцин, Asp-аспарта́тная кислота) каталитического домена. Можно ожидать, что Asn251 мутация снизит взаимодействия двух антипараллельных спиралей, в которых локализованы Ile-Ile-Asp фрагмент и аминокислотный остаток Asn251.

Трёхмерная модель мутантной формы (N251S)-PIP5K2A предполагает, что взаимодействия двух спиралей могут быть нарушены. В самом деле, расстояния боковых цепей аминокислотных

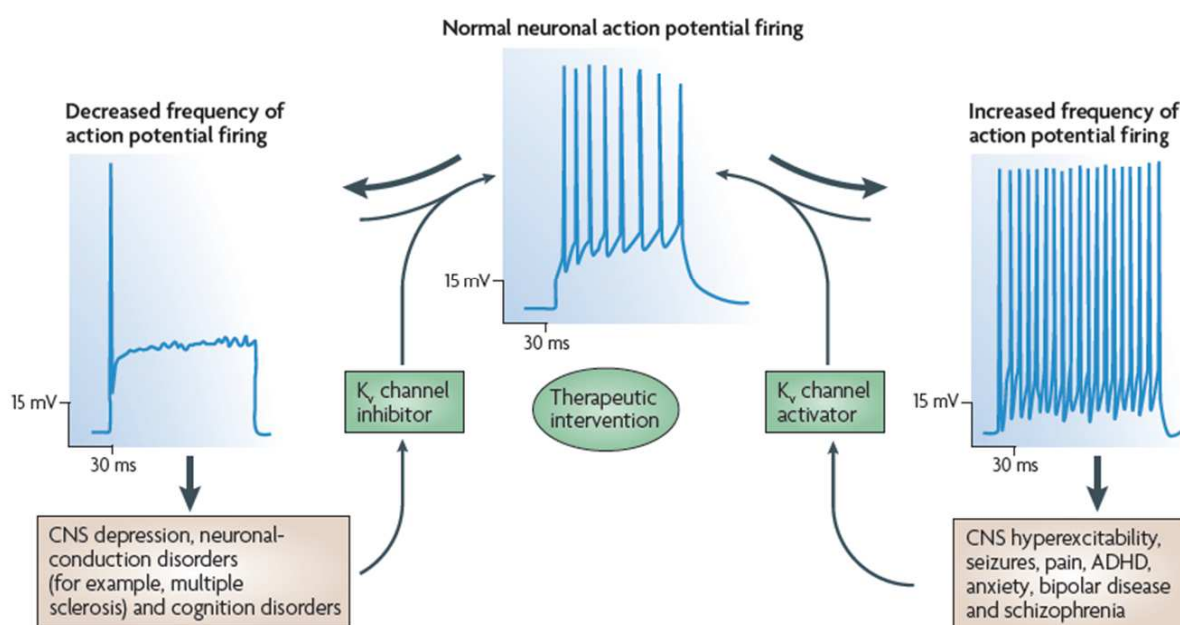
остатков N251 и Ile357 каталитического домена увеличены с 3Å до 6Å, снижая вероятность прямых взаимодействий. Структурно-функциональная интегрированность каталитического домена нуждается во взаимодействии двух антипараллельных цепей, а мутация N251S может разрушать каталитический цикл.

На основании полученных нами данных, а также данных литературы нами построена гипотетическая схема участия протеинкиназных сигнальных путей в патофизиологических процессах при шизофрении.





В свете вышесказанного представляются чрезвычайно важными новые данные о вовлечении KCNQ каналов в патологически изменённую нейрональную активность. Измененный разряд потенциала действия нейронов наблюдается при таких состояниях, как гипервозбудимость ЦНС, эпилепсия, тревожность, боль, биполярное расстройство и шизофрения, депрессия, нарушение нейрональной проводимости (например, при множественном склерозе) и когнитивных расстройствах (Wulff et al., 2009).



Активаторы нейрональных KCNQ каналов, эффективно купирующие психотические симптомы на модели животных, называют потенциально новым классом антипсихотических препаратов (Sotty F. et al., 2009).

Учитывая значение KCNQ каналов в широком диапазоне нейрональных процессов, неудивительно, что существенные усилия были приложены к получению терапевтических препаратов, мишенью которых являются KCNQ каналы. Получено более 20 патентов на новые модуляторы KCNQ каналов и более 100 патентов в Америке в



настоящее время находятся на различных стадиях апробации (Wulff H. et al., 2009).

Протеинкиназные сигнальные молекулы вовлечены в механизм действия антипсихотических препаратов, действующих на дофаминовую, серотониновую и глутаматную нейротрансмиссию. Вместе взятые, эти белки находятся на пересечении глутамат-дофамин-серотониновых сигнальных путей и могут быть рассмотрены как важные молекулярные мишени для современных и новых поколений антипсихотических фармацевтических препаратов (de Bartolomeis A. et al., 2013).

Выявленное нами снижение активности нейрональных KCNQ калиевых каналов мутантной (N251S)-PIP5K2A киназой способствует повышению возбудимости дофаминергических нейронов и увеличению дофаминергической нейротрансмиссии, а угнетение активности нейрональных EAAT3 глутаматных транспортёров мутантной (N251S)-PIP5K2A киназой приводит к нарушению захвата внеклеточного глутамата и развитию нейротоксичности. Кроме того, за счет снижения работы нейрональных EAAT3 глутаматных транспортёров, эффективно участвующих в доставке цистеина к нейронам (Shanker et al., 2001), нарушается синтез глутатиона, главного антиоксидантного агента (Dringen 2000).

Аналогичные патогенетические механизмы могут быть ассоциированы с нарушением дофаминергической и глутаматергической нейротрансмиссии при других психических заболеваниях и поведенческих расстройствах, связанных с измененной нейрональной активностью.

По нашему мнению, при других психических и поведенческих расстройствах, в основе которых лежат нарушения дофаминовой и глутаматной нейротрансмиссии, могут выявляться нарушения работы нейрональных каналов и транспортеров, связанные с полиморфными

вариантами различных нейрональных киназ. В связи с этим нами проводятся генетические исследования по выявлению ассоциаций между полиморфными вариантами киназ PIP5K2A, SGK1, GSK3B и AKT1 с шизофренией и депрессией в русской популяции Сибирского региона.

В результате проведенных исследований получены данные по ассоциации полиморфного варианта (N251S)-PIP5K2A (rs10828317) с шизофренией, которые подтверждают результаты зарубежных исследований, полученных ранее в нескольких независимых исследованиях. Вместе с тем, эти результаты получены в русской популяции Сибирского региона впервые. Ассоциация генотипа AA полиморфного варианта rs1057293 гена SGK1 с шизофренией обнаружена нами впервые в мире. Кроме того, установлены принципиально новые приоритетные фундаментальные данные об ассоциации полиморфного варианта (N251S)-PIP5K2A (rs10828317) с двигательными расстройствами у больных шизофренией на фоне нейролептической терапии.

В совокупности, полученные результаты сопоставимы с уровнем мировых исследований, а по ряду позиций, опережают аналогичные исследования.

Таким образом, дальнейшее изучение молекулярно-генетических механизмов дизрегуляции нейрональных протеинкиназных сигнальных путей позволит в перспективе выявить комплекс маркеров основных социально значимых психических расстройств и предоставит возможности использования киназ в качестве молекулярной мишени для разработки терапевтических стратегий.