

特约综述



鲁伯坝博士, 2012年10月起, 任复旦大学研究员、博士生导师、研究组长。该实验室专注于神经退行性疾病, 特别是亨廷顿病研究。代表性论文发表于 *Nature Neuroscience*、*Nature Chemical Biology*、*Nature*、*Cell*、*Neuron*、*Brain*、*Cell Research*、*eLife*等学术期刊上。

<http://www.escience.cn/people/BoxunLu/research.html>

亨廷顿舞蹈症研究现状

安平 鲁伯坝*

(医学神经生物学国家重点实验室, 华山医院, 复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘要 亨廷顿舞蹈症是神经退行性疾病中最重要的单基因遗传病之一, 其清晰的遗传学背景为该疾病的研究提供了独特优势。近年来, 亨廷顿舞蹈症的机制及潜在治疗方法的研究取得了突破性进展, 并且为类似疾病(例如阿尔兹海默氏症、帕金森氏症及共济失调等)的研究提供了思路。该文主要对上述进展作一简单综述。

关键词 亨廷顿舞蹈症; 神经退行性疾病; HTT; polyQ; 蛋白质降解; 遗传学筛选; 基因治疗

Current Research Status of Huntington's Disease

An Ping, Lu Boxun*

(State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Huashan Hospital, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract Huntington's disease is an important neurodegenerative disorder, and its monogenetic nature provides unique advantages for its research. In recent years, major advances have been made in field revealing its mechanisms and promising therapeutic strategies, which provide novel insights into similar diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and ataxias. Here, we briefly review the key recent advances in Huntington's disease research.

Keywords Huntington's disease; neurodegenerative disorders; HTT; polyQ; protein degradation; genetic screening; gene therapy

1 亨廷顿病简介

神经退行性疾病(neurodegenerative disorders)是一类引起中枢神经元进行性死亡丧失进而逐渐导致

神经系统功能障碍直至崩溃的严重疾病。其多见于中老年人, 造成巨大的社会负担。随着中国老龄化加剧, 神经退行性疾病研究的重要性也与日俱增, 然

国家自然科学基金(批准号: 81870990、91649105)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-31240654, E-mail: luboxun@fudan.edu.cn

This work is supported by the National Natural Science Foundation (Grant No.81870990, 91649105)

*Corresponding author. Tel: +86-21-31240654, E-mail: luboxun@fudan.edu.cn

而迄今为止,国内外都没有发现治本的治疗方法。

目前研究最多的神经退行性疾病主要有阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)、肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)和亨廷顿病(Huntington's disease, HD),并称四大神经退行性疾病。HD是其中最主要的单基因遗传病,由基因*HTT*的突变引起,其清晰的遗传图景带来了两个优势:首先,HD可以用过对*HTT*基因的测序早期诊断,从而为早期治疗提供了可能性,因为治疗时机太晚难以挽救已经死亡萎缩的神经元,导致治疗效果不佳;第二,清晰的遗传图景使得科学家容易建立较好的遗传学模型,从基因型到表型模拟疾病,为揭示疾病根本机制提供了便利。因此,尽管HD发病率相比AD及PD较低,但对其机制及治疗的研究更有可能取得突破。另一方面,HD的临床表现及分子信号通路异常与AD、PD等非常接近,并且都与蛋白质错误折叠及积累有关。因此,HD的研究也将为AD、PD等神经退行性疾病发病机制的研究提供重要信息。

HD的临床症状主要表现为舞蹈样不自主动作(晚期则运动能力逐渐丧失)、精神障碍和进行性认知障碍^[1]。HD多发生于中年人,平均发病年龄40~50岁,但也偶见于儿童和青少年,称为青少年亨廷顿病。世界范围内的HD发病率约为万分之一,男女及各人种均可患病,主要引起纹状体神经元进行性萎缩,疾病症状缓慢进行性加重,患者平均生存期为10~20年^[1]。HD于1872年首次由医生乔治·亨廷顿(George Huntington)系统性描述并命名^[2]。亨廷顿医生通过对一个亨廷顿病家系几代人的医疗记录的研究,准确而细致地阐述了亨廷顿病符合常染色体显性遗传规律的表现^[2],而这甚至早于孟德尔遗传定律被“重新发现”。之后近百年,科学家试图揭示HD的遗传学原因,并最终于1993年发现了其致病基因*HTT*(也被称为*IT15*)^[3]。*HTT*基因位于四号染色体,在其一号外显子(exon 1)区域有一段CAG重复序列。正常人群中这一重复序列的长度为6~35个重复,如果扩增超过40个重复序列,则会导致发病,出现运动症状。如果在36~39,一部分患者会发病,一些患者会继续保持无症状状态^[1]。

自1993年致病基因*HTT*被发现以来的25年间,科学家在HD研究领域产生了一系列重要突破。下面从HD的疾病模型、核心机制以及治疗手段这三

个角度,对25年以来的进展作一简单综述。

2 亨廷顿病的疾病模型

HD尚无任何根本性治疗手段,疾病发生及发展机制也不清楚。目前仅有个别症状改善型药物,而且一定时间后会因为产生抵抗性而失去效果。由于疾病治疗手段及药物必须首先在动物模型上进行筛选和验证,建立能准确模拟疾病表型及病理的细胞及动物模型对开发有效的疾病治疗手段至关重要。

2.1 HD小鼠模型

HD的小鼠模型主要分为两类。第一类主要通过转基因过表达mHTT的N-端片段,包括表达变异*HTT* exon 1对应蛋白片段的R6/2及R6/1模型^[4]以及表达更长片段的N171-82Q模型等^[5]。这些N-端片段均包含mHTT中的polyQ序列,而亨廷顿蛋白片段化(fragmentation)可能是疾病发生的关键性步骤^[6],其产生的N-端片段被发现具有高毒性,并且易聚集^[7]。然而,此类模型由于只具有变异*HTT*基因的5'端序列,且往往有多个拷贝,在遗传学方面与HD病人不一致。此外,此类模型的表型往往出现早(几周至十几周),这与大多数HD病人也不一致。第二类HD小鼠模型表达全长的mHTT。一种方式是通过人工染色体(artificial chromosome)的方法表达转基因的人源mHTT,主要包括YAC128(利用酵母人工染色体)及BACHD(利用细菌人工染色体)两种模型^[8-9]。这种方式的优点在于其表达人源基因,并且包含了*HTT*基因在人类基因组中所有相关元件(包括启动子、内含子等基因组序列);缺点在于依然属于转基因模型,多了若干变异*HTT*基因的拷贝而并未减少野生型*HTT*拷贝数,与病人基因型不吻合。另一种表达全长mHTT的方式是把小鼠基因组的*Htt*基因中exon 1替换成包含长CAG重复的病人*HTT*基因的exon 1,以此表达mHTT。这种方式属于基因敲入(knockin, KI),利用小鼠内源性*Htt*启动子表达mHTT蛋白,而且替换了小鼠原有的野生型,这在遗传学上最接近HD病人。KI模型按照不同的CAG重复数常用的有Q140、Q150、Q175等几种^[10-15]。如上所述,这类模型从遗传学角度与病人最接近,但是也有缺陷。最主要的缺陷是其表达的变异*HTT*基因除exon 1及部分intron 1以外,完全是小鼠的*HTT*同源基因*Htt*,这种物种差异性对机制及治疗研究可能会造成潜在问题。

小鼠模型用于HD研究的优势在于其研究工具全面, 遗传型及表型与病人高度吻合。如后文即将提到的, HD小鼠模型为HD机制及治疗研究提供了关键信息。例如, HD的反义寡聚核苷酸(ASO)治疗就是基于在小鼠模型上获得的关键数据, 进一步在临床上取得了初步成功。

2.2 HD大动物模型

小鼠模型尽管有各种优势, 但也存在严重缺陷。HD小鼠模型并不能明显表现出纹状体神经元选择性死亡这一重要病理特征。此外, 小鼠大脑没有沟回等更高等动物大脑才具有的特征, 用于模拟大脑疾病存在先天不足。而且小鼠的体型与人相差很远, 无法进行有效的药物动力学及代谢实验。

为了弥补缺陷, 科学家建立了一系列大动物HD模型。利用慢病毒注射卵细胞的方法表达携带84个CAG重复的HTT基因exon 1的方法, 李晓江教授及李世华教授曾与Yerkes国家灵长类动物研究中心的Anthony Chan合作在2008年报道建立了HD的恒河猴模型^[16]。成功存活的恒河猴表现出肌张力障碍和舞蹈症等HD表型, 但由于表型太过严重, 只存活了6个月, 且无法传代以获得稳定模型^[16]。利用显微注射受精卵转入携带73个CAG重复的HTT全长cDNA的方法所构建的HD羊模型出现了一些分子水平的HD病理变化及代谢表型, 但未观察到明显的神经体系功能方面的疾病表型^[17-20]。

另一类极具前景的模型是HD的猪模型。猪的体型大小、各系统发育以及代谢等都与人的情况极其相似; 猪的大脑具有沟回, 大小与人较为接近。因此, 猪的脑疾病模型具有独特优势, 更容易转化为临床应用。最早的HD猪模型通过转基因过表达mHTT的N-端片段构建^[21], 但同样由于表达外源性治病基因片段毒性过强, 动物出生后存活时间很短, 无法将致病基因传代, 获得稳定模型。为了建立能更准确地模拟神经退行性疾病的动物模型, 研究人员利用CRISPR/Cas9基因编辑技术将人的突变HTT基因插入到猪的内源性基因中, 并利用体细胞核移植技术, 建立了HD的基因敲入猪模型(KI)。这样没有引入外源转基因, 而是直接把内源性的野生型基因变成了疾病型, 使得疾病动物的HD基因型与HD病人完全吻合^[22]。针对该模型的进一步研究发现, 该模型能够很好地模拟HD患者在大脑中纹状体中间多棘神经元选择性死亡的典型病理特征^[22], 这是小鼠模型

所不具备的。此外, 该模型也能表现出类似HD的体重下降及行为异常, 例如步态异常等表型。更重要的是, 这些病理特征及行为异常都可以稳定地遗传给后代^[22]。这不仅模拟了HD病人的真实情况, 也为疾病药物研发提供了稳定的疾病大动物模型来源。

2.3 HD的其他动物模型及细胞模型

除了上述的HD小鼠模型与大动物模型, 其他HD动物模型, 例如HD酵母模型^[23]、HD线虫模型^[24]、HD果蝇模型^[12]、HD斑马鱼模型^[25]等, 也都被建立并用于HD的机制及治疗研究。这些模型也具有特定的优势, 例如表型检测实验通量高、周期短、易于进行高通量筛选等。

除了动物模型, HD细胞模型也非常重要。尽管细胞模型无法模拟体内的情况, 导致其对疾病机制及表型的模型受限, 但细胞模型也有其不可替代的优势。一方面, 细胞模型易于实验, 并且观察细胞死亡等表型更为直接; 另一方面, 动物与人类之间存在物种差异。因此, 人类细胞模型从物种角度可以更好地模拟疾病。由于HD是神经疾病, 因此病人来源的神经元模型是模拟疾病的最好模型。由于病人神经元无法获得, 因此, 主要的HD人类神经元模型来自于人类胚胎干细胞(ESC)或者诱导干细胞(iPSC)分化的中间多棘神经元^[26-27]。近期发展的成纤维细胞直接转分化技术则被发现可以更好地模拟疾病状态^[28], 因为这种方法没有经过诱导干细胞这一步, 保留了成纤维细胞获得时的衰老状态, 这对模拟HD这类衰老相关的神经疾病非常重要。

综上所述, HD有各物种的动物模型(主要模型总结如表1)及细胞模型, 从遗传学到表型方面对HD病人都有较好的模拟。这些模型各具优势, 为HD的发病机制及治疗研究提供了有力工具。

3 亨廷顿病发病机制

3.1 HD是一种功能获得型基因突变引起的遗传病

HD是一种常染色体单基因显性遗传病, 由HTT基因序列的突变引起。单基因突变引起疾病的根本原因可能是突变基因产物功能丧失(loss of function, 功能丧失型), 或者突变基因产物获得新的功能(gain of function, 功能获得型)。区别两者是进一步研究疾病机制及可能治疗策略的前提。

在小鼠遗传学模型中获得的实验证据表明, HD主要是一种功能获得型疾病, 主要证据体现在两个

表1 HD主要小鼠及大动物疾病模型汇总

Table 1 Summary of major mice and large animal models of HD

模型 Model	启动子和基因 Promotor and gene	拷贝 Copy	CAGs CAGs	疾病表型 Disease phenotype	参考文献 Reference
Mice knock-in model (N-terminal fragment)					
R6/1	<i>HTT</i> promotor; <i>HTT</i> exon 1 fragment	1	116	Late onset, slight tremor and intermittent involuntary movements, seizures	[4]
R6/2	<i>HTT</i> promotor; <i>HTT</i> exon 1 fragment	3	144	Static tremor, chorea, rigid-involuntary movement	[4]
N171	<i>Prp</i> promotor; N-terminal <i>HTT</i> fragment	1	82	Early onset of tremor, decreased motor function, abnormal gait, early death	[5]
Mice knock-in model (full length)					
HdhQ111	<i>HTT</i> exon 1: mHtt chimera	1 or 2	111	Abnormal gait	[16]
CAG140	<i>HTT</i> exon 1: mHtt chimera	1 or 2	140	Less activity, abnormal gait	[14]
HdhQ150	<i>HTT</i> exon 1: mHtt chimera	1 or 2	150	Motive defect, abnormal gait	[15]
zQ175	Derived from CAG140 mice	1 or 2	~188	Motor and grip defects, cognitive defect, weight loss	[11]
Mice transgene model (full length)					
YAC128	<i>HTT</i> promotor; full-length <i>HTT</i>	Several	128	Hyperkinesia, progressive motor deficits, hypokinesia, striatum and cortex atrophy	[8]
BACHD	<i>HTT</i> promotor; full-length <i>HTT</i>	5	97	Progressive motor deficits, synaptic dysfunction; striatum and cortex atrophy, neuronal degeneration	[9]
Large animal model					
Rhesus	Ubiquitin promotor; <i>HTT</i> exon 1	One to several	84	Dystonia, chorea	[17]
Sheep (OVT73)	<i>HTT</i> promotor; full-length <i>HTT</i> cDNA	One to several	73	No obvious phenotype	[18-21]
Tibet mini-pig	β -actin promotor; N-terminal mHtt fragment	One to several	105	Low survival rate; no obvious phenotype in surviving individuals	[22]
Pig	CMV promotor; CAG repeats knock-in pig <i>HTT</i> gene	1	150	Low weight, cutis laxa, early death, walking abnormality, abnormal breathing patterns and behaviors, striatal atrophy	[23]

小鼠及大动物模型的主要基因型及表型信息。部分模型的变异*HTT*基因拷贝数是1或2, 分别对应其杂合子及纯合子模型。转基因模型一般使用杂合子, 因此拷贝数按杂合子计算。

Genotype and phenotype information of major mouse and large animal HD models. Copy number of *HTT* gene is "1 or 2" in some models, corresponding to heterozygotes or homozygotes, respectively. For transgene model, copy number is calculated based on heterozygotes, because they are normally used for experiments.

方面。首先, *Htt*基因的缺失(敲除)并不能引起HD的类似表型。*Htt*的完全敲除在小鼠中尽管胚胎致死, 但没有引起神经特异的死亡, 与HD细胞表型不一致^[29-31]。杂合敲除小鼠基因*Htt*或者利用基因编辑技术敲除四月龄以上的成年小鼠的*Htt*并未引起HD相关表型^[29,32-33]。另一方面, 表达变异*HTT*基

因的转基因小鼠, 例如BACHD及YAC128模型, 在保留原有野生型*HTT*基因表达的情况下, 仍然导致HD相关表型^[8-9]。近年来针对野生型*HTT*(wt*HTT*)的条件敲除的研究则表明, wt*HTT*的丧失也可能会通过影响选择性自噬等引起细胞毒性, 参与疾病发生^[34-35], 但绝大部分证据依然指向HD是功能获得型疾病。

3.2 可溶性mHTT蛋白是导致HD的主要源头

变异HTT基因表达的变异HTT蛋白(mHTT)具有神经毒性,从而导致HD^[36]。而近期研究发现,变异HTT基因表达的RNA可能通过重复序列非ATG起始的翻译(RAN-translation)产生除了变异HTT蛋白之外的其他带氨基酸重复的蛋白(包括带polyAla、polySer、polyLeu和polyCys的蛋白),而这些蛋白的表达可能也会引起细胞毒性,参与疾病的发生^[37]。除了蛋白之外,变异HTT基因表达的RNA,由于具有对应的GUC重复序列,也可能通过相变(phase-transition)等机制引起毒性,参与疾病的发生^[23,38]。但这一假说目前还缺乏可靠的功能性证据。尽管近年来发现了以上这些可能参与HD产生及发展的新的源头分子,但绝大部分证据依然指向mHTT是HD产生的主要源头。例如,BACHD小鼠模型中表达的变异HTT基因用CAA置换了CAG重复序列中近一半的CAG序列,这从原理上阻止了RAN-translation产物以及包含过长GUC重复序列的RNA产物的生成。该模型依然表现出明显的HD相关表型,并且发病的相对时间与HD病人类似,证明mHTT蛋白可能才是导致疾病的主要原因^[9]。

因此,mHTT为何产生神经毒性最终导致HD是疾病机制研究的核心问题。mHTT与wtHTT的氨基酸序列几乎完全一样,只是其在靠近N-端的一段多聚谷氨酰胺重复(polyQ)比野生型长。因此,mHTT引起神经毒的关键可能是其过长的polyQ,但机制不明。

过长polyQ引起神经毒性的原因最早被归咎于蛋白可溶性的变化。HTT被发现在体外和细胞内均可形成寡聚体和不可溶的蛋白聚集^[39],而过长的polyQ会显著增加不可溶蛋白形式聚集的速度^[40]。这种生物物理性质的改变,可能造成mHTT的神经毒性。但是,近年来的证据表明,可溶性的mHTT蛋白才是导致疾病的主要种类。首先,可溶性mHTT会引起内质网应激、线粒体自噬、氧化应激等毒性细胞反应^[41-43]。与此一致,可溶性mHTT而非mHTT聚集体,与多个转录因子存在相互作用^[44]。更加直接的证据来自于针对细胞死亡的研究。HD大鼠神经元在没有不可溶mHTT聚集体形成时已发生死亡,并且死亡时间与可溶性mHTT的水平显著相关^[45]。我们在HD人类干细胞分化神经元模型的研究中也有类似的发现^[27]。综上所述,可溶性mHTT

可能是产生细胞毒性导致HD的主要蛋白。因此,可溶性mHTT中过长的polyQ导致细胞毒性的结构基础,是回答HD源头分子机制的关键问题。

3.3 mHTT蛋白中polyQ构象的“多态性”可能是其导致细胞毒性的构象基础

科学家对于上述问题提出了两种可能的模型加以解释。第一个模型被称为“线性格栅模型(linear lattice model)”: polyQ长链由相同的结构单元组成,而polyQ的结构单元可能本身就自带毒性(intrinsic toxicity), polyQ越长,蛋白的细胞毒性越强,达到一定程度就会造成疾病。简单来说,即polyQ中具有线性排列的含有内在毒性的结构单元^[46]。第二种可能的模型是“毒性构象浮现模型(emergent conformation)”,即变异蛋白的polyQ长度达到一定阈值之后,会出现与“线性排列的结构单元”不同的新的构象单元,而这种新的构象单元的出现是导致神经毒性的主要原因。这种解释并没有否定线性格栅模型,只是推测除了线性格栅构象之外, polyQ长链上还出现了真正具有毒性的“浮现构象”,因此是多种构象的混合^[47]。

两种模型最大的争议在于变异蛋白中过长的polyQ是否存在多种不同的构象,也就是构象是否存在多态性。两种模型均有一些间接证据证明^[48],但缺少直接的结构生物学证据。由于可溶性差以及polyQ构象的不稳定,mHTT蛋白的结构非常难于被解析。2016年,韩国结构生物学家利用冷冻电镜针对HTT蛋白的结构解析只获得了~30 Å的空间分辨率^[49]。而今年mHTT的结构解析获得了重大突破,得到了总体~4 Å的全长mHTT蛋白结构^[50]。然而,包含polyQ序列在内的N-端结构依然无法解析,而且已解析的结构基于mHTT与其结合蛋白HAP40的复合物,很可能并未捕获mHTT可能的各种构象。因此,过长的polyQ导致细胞毒性的构象基础依然缺少直接的结构生物学数据予以阐述。

针对以上困难,我们最近的一项研究从一个崭新的角度研究了上述问题:蛋白质降解。一方面,如果相同细胞的同一蛋白有着不同的降解速率,意味着该蛋白存在不同的构象;另一方面,HD神经元中,mHTT的降解速率与其神经毒性呈非常显著的负相关,即mHTT降解越慢,其毒性越大^[51]。因此,降解速率较慢的构象可能具有更高的毒性(图1A和图1B)。通过一种新建立的基于点击化学和均相时间

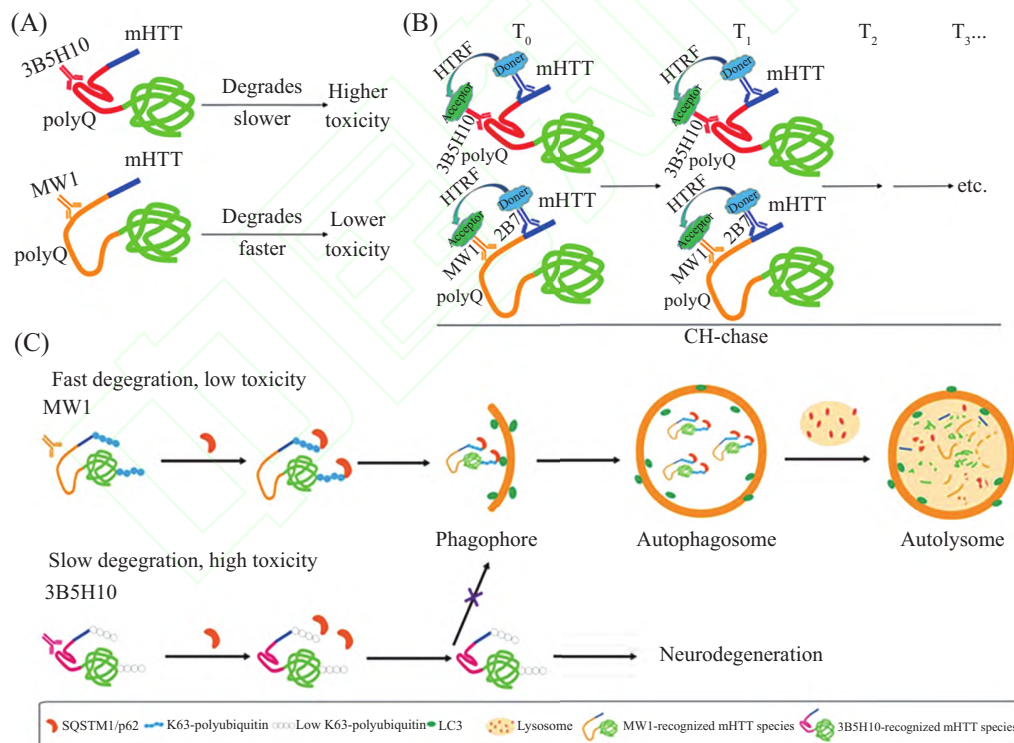
分辨荧光的蛋白降解速率测量方法CH-chase^[52]我们发现, polyQ抗体3B5H10所识别的mHTT构象的降解速率明显低于其他polyQ抗体所识别的构象的降解速率, 从而直接证明了不同polyQ类型的存在。进一步的机制研究发现, HD患者大脑组织和细胞中, 该构象的赖氨酸63型泛素化几乎缺失, 因此无法被选择性自噬接头蛋白p62识别, 从而无法被选择性自噬降解, 从而降解速率减缓, 导致较高毒性(图1C)。因此, mHTT中过长的polyQ构象存在多态性, 导致构象依赖的不同的降解速率, 浮现了降解较慢的“毒性构象”, 进而可能产生细胞毒性, 导致疾病。

3.4 mHTT产生毒性的下游分子机制

mHTT通过其下游分子信号通路导致细胞毒性, 从而诱发疾病。按照polyQ长度为25Q的野生型蛋白计算, HTT是一个拥有3 144个氨基酸的巨大蛋

白, 但并没有已知明确功能的结构域^[53]。HTT有5个富集HEAT重复基序的区域, 提示HTT可能通过与很多其他蛋白相互作用发挥功能, 类似于支架蛋白(scaffold proteins)^[53]。mHTT可能由于结合了新的蛋白, 或者失去了部分应有的结合蛋白, 间接影响细胞内重要过程, 从而导致疾病。目前已有证据表明, mHTT至少通过脑源性神经生长因子(BDNF)的产生和转运、线粒体功能、钙信号、氧化应激、蛋白运输、氨基酸代谢、凋亡信号通路、半胱氨酸合成等多种复杂机制引起神经功能异常或退化^[54]。而蛋白组学和RNA组学研究则表明, 造成这些影响的因素很可能是HD中HTT蛋白互作组(interactome)的改变^[55]以及由此带来的转录表达谱(transcriptome)的改变(图2)^[12]。

临床上HD的一些表现可能与mHTT产生毒性



A: mHTT的polyQ构象引起的假说。过长的polyQ构象的“多态性”导致部分构象降解异常, 从而具有较高毒性。3B5H10与MW1为识别polyQ的不同抗体。B: 利用基于均相时间分辨荧光以及点击化学的CH-chase方法可以在同一组样品中利用不同抗体识别不同构象的mHTT蛋白种类的降解速率。C: 被polyQ抗体3B5H10识别的mHTT蛋白由于不被K63泛素化修饰, 导致其不被选择性自噬SQSTM1/p62识别, 从而无法被选择性自噬降解, 最终导致高细胞毒性。

A: a proposed hypothesis of toxicity is induced by polymorphism of polyQ conformation in mHTT. Conformation polymorphism of expanded polyQ causes degradation deficits in some of the conformation species, which have higher toxicity. 3B5H10 and MW1 are different polyQ antibodies. B: the HTRF and click chemistry based CH-chase assay is able to measure degradation rates of different mHTT protein conformation species by different antibodies in the same set of samples. C: the 3B5H10-recognized mHTT species is not K63 ubiquitinated, and thus is not recognized by SQSTM1/p62 to be degraded by selective autophagy pathway, leading to higher cytotoxicity.

图1 mHTT中polyQ的构象多态性引起的降解异常可能是导致HD的源头

Fig.1 Degradation defects caused by polyQ conformational polymorphism in mHTT may be the fundamental cause of HD

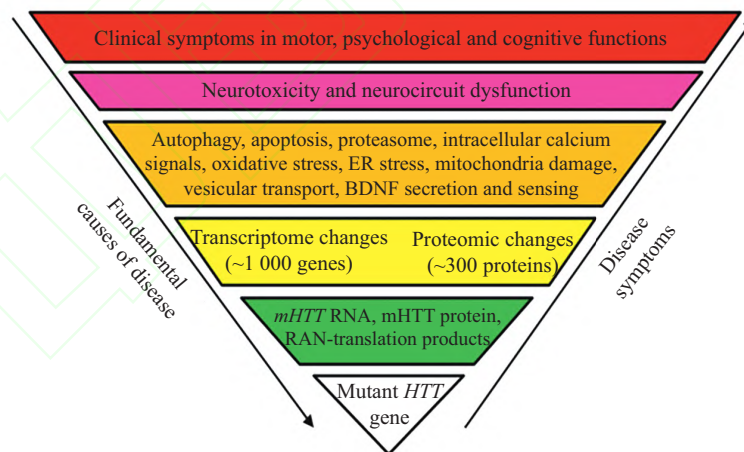
下游分子机制密切相关。例如, HD的起病年龄(age of onset)被发现与mHTT的polyQ长度(即变异 HTT 基因的CAG重复数)呈显著的负相关, 但其中的机制不明。William Yang课题组及合作者在一系列表达含有不同CAG重复数的 HTT 基因的小鼠模型中通过转录组研究发现, 特定转录组的“模块(module)”在HD纹状体及皮层中与野生型有差异, 且这种差异随年龄而加剧。更有趣的是, 其中部分模块(例如纹状体中的13个功能模块)的差异随年龄而加剧的速度与CAG重复数呈正相关^[12]。因此, CAG重复数越大, 引起转录组功能模块变化的速度越快, 因此起病越早, 从而解释了上述临床表现。

HD以及其他神经退行性疾病的另一个临床表现, 是其疾病蛋白水平以及症状严重程度随着时间不断增加。我们最近的研究揭示了mHTT可以通过增加下游激酶HIPK3的表达以及激酶MAPK11的活性, 正向调控其本身的水平, 从而对自身水平形成正反馈调控, 解释了mHTT随时间积累的可能分子机制^[56]。这可能为mHTT随时间积累聚集以及HD疾病症状的进行性发展提供了可能的解释。

3.5 HD的脑区特异性

HD主要由 HTT 基因突变产生的mHTT蛋白的细胞毒性引起。mHTT在各种细胞中广泛表达, 但HD中神经退行主要发生在大脑纹状体, 而纹状体中表达多巴胺二型受体(D2)的中间多棘神经元(medium spiny neuron)在HD病人中最早死亡^[57-58]。为何HD存在这种脑区特异性也是领域关注的重要问题, 而阐明这种脑区特异性的本质有助于在细胞及神经环路层面理解疾病机制。

HD脑区特异性的产生主要有两类可能的机制。一类是细胞自主性机制(cell autonomous), 即纹状体神经元高表达某些特异基因, 放大了mHTT的毒性或者使得此类神经元对mHTT毒性更加敏感, 最终使得这些神经元在疾病中更容易退行死亡。例如, 纹状体富集表达的小G蛋白Rhes, 可能通过增加mHTT的苏木素化(SUMOylation)增加其毒性导致纹状体神经元死亡^[59]。我们在以往的工作中则发现, 纹状体富集的孤儿G蛋白偶联受体GPR52可以特异性增加纹状体mHTT的水平, 导致纹状体神经元的特异性死亡^[26]。另一类可能的机制是非细胞自主性



HD的疾病根源是 HTT 基因的突变, 其产生的mHTT RNA、mHTT蛋白及RAN-translation的其他蛋白产物均有可能导致细胞毒性最终导致疾病, 但主要毒性来自于mHTT蛋白。mHTT的表达影响近千个基因的表达, 并且其与几百个蛋白存在相互作用, 并且与wtHTT的蛋白互作有较大差异。这些分子水平的变化引起了细胞内多个信号通路变化, 导致神经细胞毒性和环路功能障碍, 最终导致疾病临床症状。以上过程在逻辑上形成倒三角结构: 越接近倒三角底部越接近疾病根源, 相应治疗方法也越根本, 但建立这些针对根源的治疗方法也越困难。越接近倒三角顶部越接近疾病表型, 相应治疗方法越表面, 建立这些缓解临床症状的治标方法则相对容易。

The fundamental cause of HD is the mutant HTT ($mHTT$). The mRNA, protein and RAN-translation products may cause cytotoxicity and eventually lead to disease, in which mHTT protein is the major cause of toxicity. mHTT influences the expression of nearly a thousand genes and interacts with several hundred proteins. These molecular changes result in deficits in multiple signaling pathways in the cell, leading to neurotoxicity and circuit dysfunction, and ultimately clinical symptoms. The above process forms logic structure in an upside-down triangle: the closer to the bottom, the closer to the fundamental cause of the disease. The corresponding treatment strategy is more difficult and yet more fundamental. The closer to the top, the closer to the disease symptoms, the corresponding treatment is easier, and yet more superficial.

图2 HD的分子机制概括模式图

Fig.2 Schematic summary of HD molecular mechanisms

机制(non-cell autonomous), 即纹状体神经元接收了其他类型细胞传递的信号而特异性死亡。其主要证据来自于遗传学: 在BACHD小鼠模型中, 特异性关闭mHTT在纹状体的表达, HD相关表型依然存在并只有很微弱的改善, 而特异性关闭mHTT在皮层的表达, 则几乎完全拯救了该模型中各种HD的相关表型^[60]。此外, 近年来一些研究也表明, 皮层到纹状体的神经环路投射及BDNF分泌可能对HD的脑区特异性有重要贡献^[61-62]。由于小鼠模型的主要表型体现在神经功能方面, 神经退行表型非常微弱, 因此上述结论需要更好的模型和测试加以验证, 而脑区特异性产生的真实机制是细胞自主性机制和非细胞自主性机制的协同作用。

综上所述, 自HD致病基因HTT发现以来, HD产生的遗传学机制、生化机制、下游分子机制以及脑区特异性机制的研究均有重要突破。其中, HD的下游分子以及细胞/脑区层面发病的机制更接近疾病的临床表现, 针对性治疗可能相对容易, 但不易治本。mHTT本身则更接近疾病产生的根源, 针对性治疗更难, 但更可能获得治本的治疗法(图2)。

4 亨廷顿病的治疗策略

4.1 针对HD症状及mHTT下游机制的治疗

在护理方面, 理疗和营养补充对改善HD病人的生活质量非常重要, 但目前HD没有任何可以改善疾病进程的治疗方法。少数抑制症状的药物已在临床上使用: 丁苯那嗪(tetrabenazine)对HD引起的舞蹈样不自主动作有暂时的抑制效果。其氘代药物(deutetrabenazine, 商品名Austedo)具有更好的药代药动性质(https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208082s000lbl.pdf), 但本质上与丁苯那嗪一样, 只能暂时抑制舞蹈样动作症状。一些抗抑郁药物如米氮平等在临床上也被用于改善HD引起的抑郁症状。

随着对突变的亨廷顿蛋白如何导致神经元功能障碍和死亡的理解日益增多, 可开发的合理治疗靶点也变得丰富。例如, 靶向抑制组蛋白去乙酰化酶(HDAC)阻断剂可能可以通过预防突变亨廷顿蛋白诱导的转录障碍, 从而改善疾病的各种症状; 靶向抑制磷酸二酯酶PDE10A的阻断剂可能可以通过调节纹状体突触功能以减少HD的运动障碍和纹状体萎缩; 针对HD神经营养因子BDNF缺乏而进行直接

或间接补充, 则可能对HD神经元起保护作用^[63]。以上这些方法目前都还在研发或临床试验的过程中。

4.2 针对mHTT水平的治疗

上述治疗方法虽然极具前景, 但是对HD的根本病因——mHTT没有直接作用, 因而只能暂时缓解症状, 无法改善疾病进程。因此, 直接降低mHTT蛋白水平, 可能是更有效更根本的HD治疗方法。

这一治疗思路在疾病模型上得到了大量验证^[64]。在小鼠模型中诱导表达mHTT的N-端片段可以诱导HD相关表型的产生, 而在此之后停止表达可使HD相关表型逐渐减弱直至消失^[65]。在多个HD哺乳动物模型中, 使用shRNA或siRNA敲低HTT可以有效拯救HD相关表型, 而利用ASO抑制HTT mRNA的翻译, 也可以有效并持久地改善疾病表型^[66]。我们之前的遗传学筛选研究揭示了多个可以有效降低HTT水平的药靶基因, 我们后续的研究则进一步证实, 利用遗传学手段操控这些基因或者利用小分子药物靶向这些基因可以有效拯救HD相关表型^[126-27,48,52,56,64,67-73]。

值得注意的是, 由于mHTT与wtHTT蛋白序列高度相似, 大多数降低HTT的方法都无法区分两者, 从而会造成wtHTT水平的下降。因此, 降低wtHTT水平是否安全, 或者降低多少安全, 是一个需要明确的问题。HTT基因是胚胎发育的必需基因, 其完全敲除会导致胚胎致死, 而杂合敲除表型较弱^[29,32], 提示HTT在发育期非常关键, 但降低50%相对可以承受。另一方面, 小鼠模型及猴模型中的数据表明, 在成年动物中降低近70%的HTT蛋白没有引起可检测到的有害作用^[74-76]。近期的基因编辑研究则表明, 在年轻小鼠(两月龄)中完全敲除HTT会引起胰腺炎, 但是在较成熟的小鼠(四月龄或以上)中完全敲除HTT则未引起明显的有害作用^[33]。更有说服力的是IONIS公司近年来进行的临床试验, 其对46个病人进行了同时靶向mHTT和wtHTT的ASO的给药。目前已完成的第I期及第IIa期临床试验表明, 所给予的ASO的最高浓度依然是安全的, 并且绝大多数病人中, ASO有效降低了mHTT及wtHTT。初步结果表明, 降低程度根据脑脊液的测量数据估计高达30%~50%, 而HTT的总体降低程度与运动能力的改善呈统计学显著的相关性(<https://huntingtonsdiseasenews.com/tag/ionis-htrx/>)。以上这些结果表明, 降低HTT水平, 即使是同时降低mHTT与wtHTT水平, 也可以对HD产生根本性的治

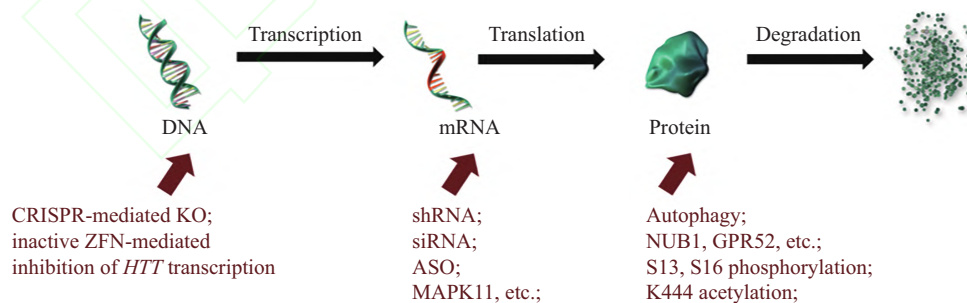
疗作用。

目前针对mHTT水平的各种治疗手段尚未被正式批准。处于研发阶段的策略主要分为三类: 靶向HTT DNA、靶向HTT mRNA及靶向HTT蛋白(图3)。近年来发展了基因编辑技术, 特别是CRISPR技术, 可以用于敲除HTT基因, 达到降低mHTT蛋白治疗疾病的效果。这一思路已在小鼠模型中被检验并获得成功^[77]。当然, CRISPR潜在的脱靶效应、安全性、临床可行性等都需要进一步检验。最近发展的另一种靶向HTT DNA的技术则使用了点突变失活的锌指核酸剪切酶(ZFN)结合至HTT启动子区域, 达到抑制HTT基因表达的效果^[78]。

靶向RNA的方法主要有两种: 利用siRNA和shRNA通过RNA干扰敲低HTT mRNA以及利用ASO降低HTT mRNA水平并抑制其翻译^[66]。目前siRNA和shRNA主要还在动物模型中进行实验, 而如前文所述, ASO已在临床试验中取得了初步成功, 被证明可以有效降低mHTT水平, 但HD相关表型是否改善有待进一步检验。目前ASO的主要局限在于给药困难。由于属于RNA类大分子, ASO需要用硬膜外泵给药, 给病人带来不便与痛苦。此外, ASO价格昂贵, 每年费用约100万欧元, 绝大多数HD病人无法负担。因此, 降低HTT mRNA水平的小分子化合物可能更具应用前景。我们最近的工作发现, 激酶MAPK11正向调控HTT mRNA稳定性, 因此利用小分子阻断

剂靶向阻断MAPK11有可能成为降低HTT mRNA水平的新手段^[56]。

靶向HTT蛋白以降低其水平是另一种极具前景的治疗手段。其最大的优势是相比降低HTT mRNA更有可能通过小分子药物实现, 从而解决靶向RNA的给药问题及成本问题。mHTT可以通过自噬降解, 因此增加自噬功能的小分子药物可以有效降低mHTT并拯救HD相关表型^[5,79-81]。然而, 由于自噬作用介导了多种生物分子及细胞器的降解, 其整体增强对除了mHTT水平之外的非特异性影响很大, 例如自噬的直接增强可能协助癌细胞的存活和增长^[82], 因此安全性存在顾虑, 目前尚未进入临床试验阶段。针对HTT蛋白翻译后修饰的研究则揭示, 增加其13及16位丝氨酸的磷酸化或者第444位(按25Q的野生型HTT计算)赖氨酸的乙酰化, 可以显著增加mHTT的降解从而降低其水平^[83-84], 为更特异性地靶向HTT并降低其水平提供了可能。最后, 为了得到可以更特异性地降低mHTT水平的药靶及小分子药物, 我们进行了多个遗传学筛选及反筛选, 得到了一系列可能特异性调控mHTT水平的潜在药靶基因, 如NUB1、GPR52等^[26,56,72-73]。这些基因通过各种不同的分子机制调控mHTT水平, 而靶向这些基因所表达蛋白的小分子药物, 则有可能成为HD根本性治疗的候选药物。例如, 其中的GPR52基因表达的一个G蛋白偶联受体, 具有较高的制药潜力。通过



靶向HTT基因的DNA主要可以通过CRISPR进行基因敲除, 或者利用失活的ZFN结合至HTT转录起始区域阻止其转录。靶向HTT的mRNA主要可以通过shRNA或siRNA进行RNA干扰, 降低其水平; 可以通过ASO降低其水平并抑制其翻译; 可以通过HTT mRNA稳定性的调控基因MAPK11等进行靶向药物研发。靶向HTT蛋白主要可以通过激活自噬增强其降解; 筛选得到的HTT特异性调控基因NUB1、GPR52等也可以用于靶向HTT蛋白, 通过降低其水平治疗疾病; 靶向调控HTT特定的翻译后修饰, 如S13、S16位磷酸化及K444乙酰化等, 也可以增强HTT降解治疗疾病。

Targeting *HTT* DNA: DNA can be targeted by CRISPR, or by an inactive ZFN binding to the *HTT* transcription initiation region to prevent its transcription. Targeting *HTT* mRNA: its level could be reduced by shRNA or siRNA; it could also be targeted by ASOs, which lower its level and suppress its translation; it may also be lowered by drugs targeting genetic modifiers of its stability, such as *MAPK11* that we discovered. Targeting *HTT* protein: its level could be lowered by enhancing autophagy or by modulating its genetic modifiers such as NUB1, GPR52, etc.; its level could also be modulated by post-translational modifications, such as S13, S16 phosphorylation and K444 acetylation, which enhance mHTT degradation.

图3 降低mHTT水平治疗HD的主要策略

Fig.3 The major strategies of reducing mHTT levels in HD treatment

针对GPR52活性的化合物筛选得到的小分子拮抗剂被发现可以有效降低mHTT水平并且拯救HD相关表型, 从而为疾病治疗打开了新窗口^[73]。

5 亨廷顿病研究的展望

综上所述, 神经退行性疾病是严重影响当代社会而缺少任何根本性治疗手段的一类疾病, 而亨廷顿病作为其中主要的单基因遗传病, 在机制及治疗研究方面具有独特优势。近年来HD的研究取得了重要突破, 建立了从病人细胞分化神经元到小鼠及大动物等HD疾病模型, 揭示了mHTT引起HD的源头机制及可能的下游机制, 并且在临床上初步验证了降低mHTT水平治疗疾病的可行性。未来的工作将着重于完成利用ASO降低mHTT水平的临床试验并证实其临床效果以及探索各种降低mHTT的小分子药物并进行临床试验, 以期获得可以根本性治疗HD的小分子药物。

参考文献 (References)

- Walker FO. Huntington's disease. *Lancet* 2007; 369(9557): 218-28.
- Bates G, Harper P, Jones L. Huntington's disease: a historical background. 3rd ed, United Kingdom, Oxford University Press, 2002.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72(6): 971-83.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, *et al.* Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996; 87(3): 493-506.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004; 36(6): 585-95.
- Miller JP, Holcomb J, Al-Ramahi I, de Haro M, Gafni J, Zhang N, *et al.* Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 2010; 67(2): 199-212.
- Tarlac V, Storey E. Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res* 2003; 74(3): 406-16.
- Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, *et al.* Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12(13): 1555-67.
- Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu XH, *et al.* Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* 2008; 28(24): 6182-95.
- Menalled LB, Kudwa AE, Miller S, Fitzpatrick J, Watson-Johnson J, Keating N, *et al.* Comprehensive behavioral and molecular characterization of a new knock-in mouse model of Huntington's disease: zQ175. *PLoS One* 2012; 7(12): e49838.
- Alexandrov V, Brunner D, Menalled LB, Kudwa A, Watson-Johnson J, Mazzella M, *et al.* Large-scale phenome analysis defines a behavioral signature for Huntington's disease genotype in mice. *Nat Biotechnol* 2016; 34(8): 838-44.
- Langfelder P, Cantle JP, Chatzopoulou D, Wang N, Gao F, Al-Ramahi I, *et al.* Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat Neurosci* 2016; 19(4): 623-33.
- Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 2003; 465(1): 11-26.
- Lin CH, Tallaksen-Greene S, Chien WM, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, *et al.* Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2001; 10(2): 137-44.
- Wheeler VC, White JK, Gutekunst CA, Vrbanc V, Weaver M, Li XJ, *et al.* Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 2000; 9(4): 503-13.
- Yang SH, Cheng PH, Banta H, Piotrowska-Nitsche K, Yang JJ, Cheng EC, *et al.* Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 2008; 453(7197): 921-4.
- Huntington's Disease Sheep Collaborative Research Group, Reid SJ, Patassini S, Handley RR, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Osmand A, *et al.* Further molecular characterisation of the OVT73 transgenic sheep model of Huntington's disease identifies cortical aggregates. *J Huntingtons Dis* 2013; 2(3): 279-95.
- Handley RR, Reid SJ, Brauning R, Maclean P, Mears ER, Fourie I, *et al.* Brain urea increase is an early Huntington's disease pathogenic event observed in a prodromal transgenic sheep model and HD cases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(52): E11293-E302.
- Handley RR, Reid SJ, Patassini S, Rudiger SR, Obolonkin V, McLaughlan CJ, *et al.* Metabolic disruption identified in the Huntington's disease transgenic sheep model. *Sci Rep* 2016; 6: 20681.
- Jacobsen JC, Bawden CS, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Reid SJ, Waldvogel HJ, *et al.* An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet* 2010; 19(10): 1873-82.
- Yang D, Wang CE, Zhao B, Li W, Ouyang Z, Liu Z, *et al.* Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Mol Genet* 2010; 19(20): 3983-94.
- Yan S, Tu Z, Liu Z, Fan N, Yang H, Yang S, *et al.* A Huntington knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell* 2018; 173(4): 989-1002 e13.
- Peskett TR, Rau F, O'Driscoll J, Patani R, Lowe AR, Saibil HR. A liquid to solid phase transition underlying pathological huntingtin Exon1 aggregation. *Mol Cell* 2018; 70(4): 588-601.

- 24 Brehme M, Voisine C, Rolland T, Wachi S, Soper JH, Zhu Y, *et al.* A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease. *Cell Rep* 2014; 9(3): 1135-50.
- 25 Jimenez-Sanchez M, Lam W, Hannus M, Sonnichsen B, Imarisio S, Fleming A, *et al.* siRNA screen identifies QPCT as a druggable target for Huntington's disease. *Nat Chem Biol* 2015; 11(5): 347-54.
- 26 Yao Y, Cui X, Al-Ramahi I, Sun X, Li B, Hou J, *et al.* A striatal-enriched intronic GPCR modulates huntingtin levels and toxicity. *Elife* 2015; 4: 4.
- 27 Lu B, Palacino J. A novel human embryonic stem cell-derived Huntington's disease neuronal model exhibits mutant huntingtin (mHTT) aggregates and soluble mHTT-dependent neurodegeneration. *FASEB J* 2013; 27(5): 1820-9.
- 28 Victor MB, Richner M, Olsen HE, Lee SW, Monteys AM, Ma C, *et al.* Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes. *Nat Neurosci* 2018; 21(3): 341-52.
- 29 Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, *et al.* Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 1995; 269(5222): 407-10.
- 30 Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, *et al.* Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 1995; 81(5): 811-23.
- 31 Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 1995; 11(2): 155-63.
- 32 MacDonald ME, Duyao M, Calzonetti T, Auerbach A, Ryan A, Barnes G, *et al.* Targeted inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1996; 61: 627-38.
- 33 Wang G, Liu X, Gaertig MA, Li S, Li XJ. Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(12): 3359-64.
- 34 Ochaba J, Lukacovich T, Csikos G, Zheng S, Margulis J, Salazar L, *et al.* Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(47): 16889-94.
- 35 Rui YN, Xu Z, Patel B, Chen Z, Chen D, Tito A, *et al.* Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2015; 17(3): 262-75.
- 36 Rubinsztein DC, Carmichael J. Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Med* 2003; 5(20): 1-21.
- 37 Banez-Coronel M, Ayhan F, Tarabochia AD, Zu T, Perez BA, Tusi SK, *et al.* RAN translation in Huntington disease. *Neuron* 2015; 88(4): 667-77.
- 38 Jain A, Vale RD. RNA phase transitions in repeat expansion disorders. *Nature* 2017; 546(7657): 243-7.
- 39 Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, *et al.* Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 1999; 19(7): 2522-34.
- 40 Behrends C, Langer CA, Boteva R, Bottcher UM, Stemp MJ, Schaffar G, *et al.* Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. *Mol Cell* 2006; 23(6): 887-97.
- 41 Leitman J, Ulrich Hartl F, Lederkremer GZ. Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun* 2013; 4: 2753.
- 42 Li X, Valencia A, Sapp E, Masso N, Alexander J, Reeves P, *et al.* Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci* 2010; 30(13): 4552-61.
- 43 Guo X, Sun X, Hu D, Wang YJ, Fujioka H, Vyas R, *et al.* VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease. *Nat Commun* 2016; 7: 12646.
- 44 Schaffar G, Breuer P, Boteva R, Behrends C, Tzvetkov N, Strippel N, *et al.* Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell* 2004; 15(1): 95-105.
- 45 Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004; 431(7010): 805-10.
- 46 Li P, Huey-Tubman KE, Gao T, Li X, West AP, Bennett MJ, *et al.* The structure of a polyQ-anti-polyQ complex reveals binding according to a linear lattice model. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(5): 381-7.
- 47 Miller J, Arrasate M, Brooks E, Libeu CP, Legleiter J, Hatters D, *et al.* Identifying polyglutamine protein species *in situ* that best predict neurodegeneration. *Nat Chem Biol* 2011; 7(12): 925-34.
- 48 Feng X, Luo S, Lu B. Conformation polymorphism of polyglutamine proteins. *Trends Biochem Sci* 2018; 43(6): 424-435.
- 49 Vijayvargia R, Epan R, Leitner A, Jung TY, Shin B, Jung R, *et al.* Huntingtin's spherical solenoid structure enables polyglutamine tract-dependent modulation of its structure and function. *Elife* 2016; 5: e11184.
- 50 Guo Q, Bin H, Cheng J, Seefelder M, Engler T, Pfeifer G, *et al.* The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature* 2018; 555(7694): 117-20.
- 51 Tsvetkov AS, Arrasate M, Barmada S, Ando DM, Sharma P, Shaby BA, *et al.* Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nat Chem Biol* 2013; 9(9): 586-92.
- 52 Wu P, Lu MX, Cui XT, Yang HQ, Yu SL, Zhu JB, *et al.* A high-throughput-compatible assay to measure the degradation of endogenous Huntingtin proteins. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37(10): 1307-14.
- 53 Saudou F, Humbert S. The biology of Huntingtin. *Neuron* 2016; 89(5): 910-26.
- 54 Labbadia J, Morimoto RI. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(8): 378-85.
- 55 Shirasaki DI, Greiner ER, Al-Ramahi I, Gray M, Boontheung P, Geschwind DH, *et al.* Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* 2012; 75(1): 41-57.
- 56 Yu M, Fu Y, Liang Y, Song H, Yao Y, Wu P, *et al.* Suppression of MAPK11 or HIPK3 reduces mutant Huntingtin levels in

- Huntington's disease models. *Cell Res* 2017; 27(12): 1441-65.
- 57 Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Bird ED, Martin JB. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 1985; 230(4725): 561-3.
- 58 Cowan CM, Raymond LA. Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr Top Dev Biol* 2006; 75: 25-71.
- 59 Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH. Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* 2009; 324(5932): 1327-30.
- 60 Wang N, Gray M, Lu XH, Cantle JP, Holley SM, Greiner E, *et al.* Neuronal targets for reducing mutant huntingtin expression to ameliorate disease in a mouse model of Huntington's disease. *Nat Med* 2014; 20(5): 536-41.
- 61 Parievsky A, Moore C, Kamdjou T, Cepeda C, Meshul CK, Levine MS. Differential electrophysiological and morphological alterations of thalamostriatal and corticostriatal projections in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2017; 108: 29-44.
- 62 Plotkin JL, Day M, Peterson JD, Xie Z, Kress GJ, Rafalovich I, *et al.* Impaired TrkB receptor signaling underlies corticostriatal dysfunction in Huntington's disease. *Neuron* 2014; 83(1): 178-88.
- 63 Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, *et al.* Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 15005.
- 64 Yu S, Liang Y, Palacino J, Difiglia M, Lu B. Drugging unconventional targets: insights from Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35(2): 53-62.
- 65 Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 2000; 101(1): 57-66.
- 66 Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, *et al.* Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron* 2012; 74(6): 1031-44.
- 67 Sun X, Fu Y, Pan Y, Lu B. Conformation-dependent recognition of mutant HTT (huntingtin) proteins by selective autophagy. *Autophagy* 2017; 13(12): 2111-2.
- 68 Fu Y, Wu P, Pan Y, Sun X, Yang H, Difiglia M, *et al.* A toxic mutant huntingtin species is resistant to selective autophagy. *Nat Chem Biol* 2017; 13(11): 1152-4.
- 69 Liang Y, Yao Y, Lu M, Hou J, Yu S, Lu B. TR-FRET assays for endogenous huntingtin protein level in mouse cells. *J Huntingtons Dis* 2014; 3(3): 253-9.
- 70 Cui X, Liang Q, Liang Y, Lu M, Ding Y, Lu B. TR-FRET assays of Huntingtin protein fragments reveal temperature and PolyQ length-dependent conformational changes. *Sci Rep* 2014; 4: 5601.
- 71 Lu B, Yao Y, Sun X, Cui X. High-throughput high-content detection of genetic modifiers of neurodegeneration in human stem cell derived neurons. *Prot Ex* 2013; doi: 10.1038/protex.2013.085.
- 72 Lu B, Al-Ramahi I, Valencia A, Wang Q, Berenshteyn F, Yang H, *et al.* Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntington toxicity via enhanced protein clearance. *Nat Neurosci* 2013; 16(5): 562-70.
- 73 Song H, Li H, Guo S, Pan Y, Fu Y, Zhou Z, *et al.* Targeting Gpr52 lowers mutant HTT levels and rescues Huntington's disease-associated phenotypes. *Brain* 2018; 141(6):1782-1798.
- 74 Boudreau RL, McBride JL, Martins I, Shen S, Xing Y, Carter BJ, *et al.* Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 2009; 17(6): 1053-63.
- 75 Drouet V, Perrin V, Hassig R, Dufour N, Auregan G, Alves S, *et al.* Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann Neurol* 2009; 65(3): 276-85.
- 76 Grondin R, Kaytor MD, Ai Y, Nelson PT, Thakker DR, Heisel J, *et al.* Six-month partial suppression of Huntingtin is well tolerated in the adult rhesus striatum. *Brain* 2012; 135(4): 1197-209.
- 77 Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong HE, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest* 2017; 127(7): 2719-24.
- 78 Malankhanova TB, Malakhova AA, Medvedev SP, Zakian SM. Modern genome editing technologies in Huntington's disease research. *J Huntingtons Dis* 2017; 6(1): 19-31.
- 79 Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Tfofi EK, Saiki S, Siddiqi FH, *et al.* Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol* 2008; 4(5): 295-305.
- 80 Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2007; 282(8): 5641-52.
- 81 Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, *et al.* Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 2005; 170(7): 1101-11.
- 82 Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2011; 25(19): 1999-2010.
- 83 Thompson LM, Aiken CT, Kaltenbach LS, Agrawal N, Illes K, Khoshnan A, *et al.* IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J Cell Biol* 2009; 187(7): 1083-99.
- 84 Jeong H, Then F, Melia TJ, Mazzulli JR, Cui L, Savas JN, *et al.* Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* 2009; 137(1): 60-72.