

神经退行性疾病制药新思路: 致病变异蛋白的降解

付玉华*, 鲁伯坝*

复旦大学生命科学学院, 脑科学国家重点实验室, 脑科学协同创新中心, 上海 200438

* 联系人, E-mail: fuyuhua2011@163.com; luboxun@fudan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-11; 接受日期: 2016-02-02

国家自然科学基金(批准号: 31371421, 31422024)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2014AA02502)和上海浦江人才计划(批准号: 13PJ1400600)资助

摘要 神经退行性疾病引起中枢神经元不正常死亡、丧失, 导致神经系统功能障碍, 从而导致严重的临床症状, 严重影响生活并引起提前死亡, 是一类重大疾病。目前, 此类疾病尚未有任何治疗方法。多种神经退行性疾病被发现与异常蛋白聚集有关, 其中, 由变异 HTT(mHTT)蛋白积累引起的亨廷顿病是一种具代表性的神经退行性疾病。亨廷顿由单基因突变引起, 遗传背景清晰, 因此被作为神经退行性疾病的代表性模式疾病。由于 mHTT 引起疾病机制未知, 通过降低其水平抑制其下游毒性可能是极具前景的药物研发思路。本文重点阐述 mHTT 蛋白降解研究的新进展, 并展望 mHTT 蛋白清除的新策略。

关键词 亨廷顿病, 自噬途径, 蛋白酶体途径, mHTT 蛋白

神经退行性疾病(neurodegenerative disorders)是指中枢神经元不正常死亡丧失引起神经系统功能障碍, 从而导致的疾病。多见于中老年人, 严重影响人类健康及生活质量, 并造成巨大的社会负担。随着中国老龄化的趋势, 神经退行性疾病研究的重要性也与日俱增。然而迄今为止, 国内外都没有根治的方法。

神经退行性疾病的治疗目前有两大难点。(i) 此类疾病症状复杂, 绝大多数病人确诊时已经错过了最佳治疗干预的时间窗口。例如, 此类疾病中发病率最高的阿尔茨海默病(俗称“老年痴呆”, Alzheimer's disease, AD)和帕金森氏症(Parkinson's disease, PD), 确诊时绝大多数病人对应脑区(AD 病

人的海马, PD 病人的黑质)往往已经死亡了 60% 以上的神经元, 而使得此类疾病难以治疗。(ii) 此类疾病发病率最高的 AD 和 PD 病人中绝大多数(约 95%)是随发的(sporadic)^[1,2], 即没有明确的基因遗传因素, 因此缺乏好的遗传学模型研究疾病机制或验证疾病的治疗方法。这可能是为什么很多在 AD, PD 动物模型中成功的药物在临床试验中都以失败告终。因此, 要寻求此类疾病的治疗方法, 选择相对简单的模式疾病进行研究是一个可行的思路。

神经退行性疾病主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD)和肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)

引用格式: 付玉华, 鲁伯坝. 神经退行性疾病制药新思路: 致病变异蛋白的降解. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 397-405
Fu Y H, Lu B X. New strategies for drug discoveries of neurodegenerative disease: degradation of pathogenic mutant proteins. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 397-405, doi: 10.1360/N052016-00106

等. 神经退行性疾病都伴随致病变异蛋白的聚集, 如 amyloid B 在 AD 中的聚集^[3], α -synuclein 在 PD 中的聚集^[4], TDP-43 在 ALS 中的聚集^[5], HTT 在 HD 中的聚集^[6]. 尽管这些神经退行性疾病的致病蛋白已经清楚, 但如何清除其毒性及其相关机制仍有待研究.

由于 HD 是单基因疾病, 由单个基因(huntingtin, *HTT*, 曾用名 *IT15* 等)突变引起, 遗传图景清晰. 而其在退行性疾病中相对发病率也较高^[7]. 因此, 神经退行性疾病中发病率也相对较高的亨廷顿病(全球发病率约万分之一)是此类疾病中的一种重要的模式疾病.

HD 由基因 *HTT* 的 exon1 外显子的 CAG 重复区域的变异引起, 变异基因 CAG 重复数目增多(大于 36), 导致合成的变异蛋白的谷氨酰胺重复区域(polyQ)扩增^[6], 翻译产生突变 HTT(mHTT)蛋白. mHTT 蛋白被剪断、聚集、产生毒性, 导致主要集中在脑纹状体(striatum)的神经元死亡, 并引起肢体不受控运动为特征的一系列神经功能、心理、以及代谢相关症状而致死^[8]. 研究证实降低致病蛋白 mHTT 的水平可以抑制其毒性, 并在疾病模型中证实降低突变蛋白水平可缓解疾病症状^[9]. 目前, 已有研究在 mRNA 水平的靶向(如 siRNA, shRNA 和 ssRNA 等介导的 RNAi, 以及反义寡聚体(antisense oligonucleotide, ASO)介导的 mRNA 翻译抑制等)^[10-13]和蛋白水平的靶向(调控 mHTT 蛋白降解等)(图 1). 其中前一种靶向策略在动物模型中取得了很好的效果, 但是由于涉及 RNA 类大分子, 在病人中给药十分困难. 后一种则为小分子靶向制药提供了可能. 由于之前技术所限, 对 mHTT 蛋白的降解调控知之甚少. 而近年来随着对蛋白降解通路研究的进步和对 mHTT 蛋白水平全基因筛选的实现, 对 mHTT 蛋白降解调控的了解有了巨大进步. 本文结合 mHTT 蛋白降解研究方面取得的进展, 对 HD 疾病中 mHTT 蛋白降解进行综述. 相关信息对 HD 及其他神经退行性疾病的治疗有着重要意义.

1 mHTT 蛋白与降解途径

在疾病研究和治疗中, 除通过抑制变异蛋白的合成外, 增强其降解也是清除变异蛋白的重要途径. 野生型的 HTT 主要存在于胞浆中, 早期研究表明其对神经有保护性作用^[14], 且在胚胎阶段敲除 HTT 可以产生胚胎致死^[15,16], 然而成年动物对野生型 HTT

水平的降低是耐受的^[10,17]. 本课题组^[18]先前的研究表明, 基于人胚胎干细胞来源的神经元 HD 模型中, 野生型的 HTT 下调约 20%时, mHTT 蛋白的毒性可显著降低, 而野生型的 HTT 降低约 90%也不会对细胞产生致命影响. HD 中 mHTT 蛋白以单体、寡聚体和聚集体 3 种形式存在, 对于何种形式的 mHTT 蛋白产生毒性的研究存在不同报道. Leitman 等人^[19]研究证实 mHTT 蛋白的聚集体具高毒性, 而另有研究报道 mHTT 蛋白聚集体和胞涵体的细胞反而具相对轻的疾病症状^[20], 因此认为毒性高的是寡聚体, 此外, 研究认为 mHTT 蛋白聚集体乃至包涵体的形成具有清除毒性纤维前体的作用^[21]. 在 HD 小鼠 (*Mus musculus*)模型中证实 mHTT 蛋白全长单体导致神经细胞死亡^[22,23], 且进一步发现变异单体和寡聚体存在构型的变化, 且这种变化与 mHTT 蛋白毒性变化直接关联, 因此, mHTT 蛋白构型变化能够预测神经退行性疾病^[24]. 综上所述, mHTT 蛋白(单体和/或寡聚体)是高毒性的, 其是导致神经元死亡和疾病产生的关键, 因此也是需特异清除的目标蛋白. 相对聚集体和包涵体而言, 高毒性 mHTT 蛋白以可溶形式存在, 其可通过泛素蛋白酶体途径和自噬途径降解^[25]. 如何协调并增强泛素蛋白酶体途径和自噬途径降解对 mHTT 蛋白的靶向清除有待研究, 2 和 3 节将分别对两途径机制及其对 mHTT 蛋白的清除进行论述.

2 蛋白酶体途径

蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)在细胞质中选择性降解各种受损害蛋白质, 是重要的蛋白质质量控制系统^[26]. 蛋白酶体是由 10~20 个亚基组成的蛋白复合物, 存在于细胞核和细胞质. 真核细胞细胞内 80%~90%蛋白质通过 UPS 识别并降解. UPS 除参与细胞内正常蛋白的降解, 也参与某些异常蛋白质的清除, 如错误折叠或突变蛋白质等. 26S 蛋白酶体是细胞最常见的蛋白酶体形式, 它由一个核心的桶状 20S 蛋白酶体(700 kD)和两个位于两侧的具有调节作用帽状 19S 蛋白酶体(900 kD)构成, 具有蛋白酶活性是 20S 蛋白酶体. 蛋白酶体降解途径的主要步骤是先将多聚泛素与靶向蛋白质共价连接, 然后 26S 蛋白酶体将标记泛素的蛋白质降解(图 1), 释放的游离泛素可重新被利用^[27]. 研究表明, 蛋白酶

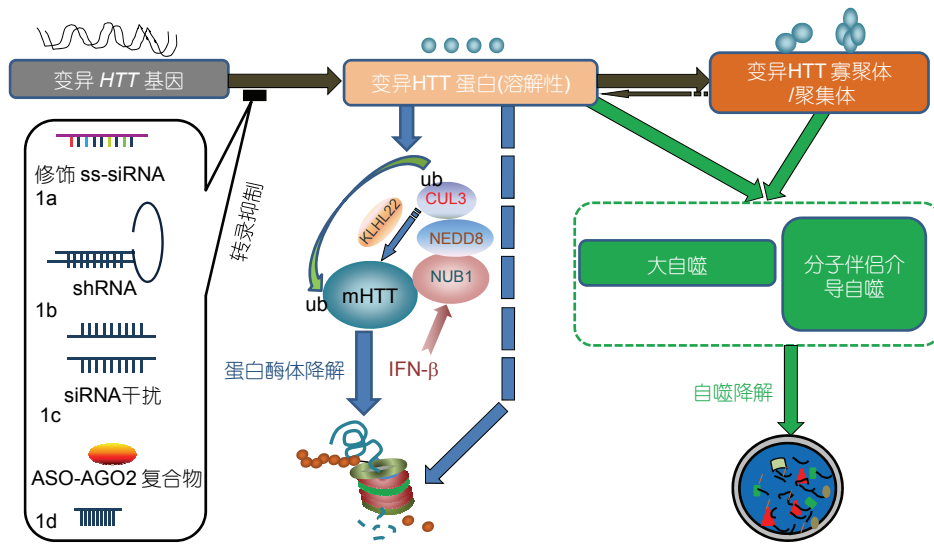


图 1 降低 mHTT 蛋白水平的途径

体途径的完成受到诸多泛素作用蛋白 S5a, Dsk2, Rad23 和 P62 等调控^[28], 同时也可被小分子或化合物进行调控(如蛋白酶体降解途径抑制剂 bortezomib^[29,30]), 该途径也会因异常蛋白的聚集而受损^[31].

在 HD 疾病及其他神经退性病中, 致病蛋白的聚集体和包涵体比较大, 因其难以穿过蛋白酶体孔径导致 UPS 途径被忽略. 研究证实 HD 细胞系模型和患者脑组织中的蛋白酶体途径是被损伤的^[32-34], 且导致具有毒性的 mHTT 蛋白 N 端片段的累积^[35], 目前, mHTT 蛋白是否直接导致 UPS 途径的损伤并不清楚. 然而, 在 HD 小鼠和患者的脑组织上研究发现, 泛素 Ub 和蛋白酶体与 mHTT 聚集体是共定位的^[36,37], 不少研究表明被泛素修饰的 mHTT 蛋白可通过蛋白酶体途径降解^[27,38-40]. Juenemann 等人^[41]研究认为, mHTT 的清除可通过蛋白酶体途径进行, 蛋白酶体途径可清除泛素化 mHTT 蛋白, 基于蛋白酶体的孔径, 可以推断蛋白酶体清除的主要是胞内可溶性的泛素化修饰 mHTT 蛋白(单体或部分寡聚体形式)^[42]. Tsvetkov 等人^[43]研究证实 mHTT 蛋白在病变神经元中周转效率比野生型的快, 认为其更便于被蛋白酶体途径所降解. 总之, 可溶性的 mHTT 可通过蛋白酶体途径降解, 蛋白酶体途径在 HD 的发病中起着关键作用.

在蛋白酶体途径降解 mHTT 蛋白方面, 本课题组^[44]在 *Nature Neuroscience* 报道 NUB1 蛋白水平的

上升可有效降低细胞和果蝇(*Drosophila melanogaster*)体内的 mHTT 蛋白毒性. NUB1 蛋白是基于基因组水平 RNAi 高通量筛选和在果蝇、哺乳动物细胞模型上验证发现的, NUB1 蛋白以分子伴侣的形式参与到蛋白酶体途径系统. 分析机制发现, NUB1 过表达可增强干扰素-NUB1-CUL3-蛋白酶体途径完成 mHTT 蛋白降解. 前期研究发现, NUB1 可与蛋白酶体亚基、样泛素化蛋白 NEDD8 相互作用^[45,46]并作用于 HTT 蛋白^[47], NUB1 招募泛素化酶 CUL3 到 mHTT 蛋白增强 mHTT 蛋白泛素化, 同时由 NEDD8 参与激活泛素化酶 CUL3^[48], 详细机制如图 1. 此外, KLHL22 也是本课题组筛选到可调控 mHTT 蛋白水平重要蛋白, KLHL22 可与 CUL3 相互作用, 推断 KLHL22 在 mHTT 蛋白和泛素化酶 CUL3 的结合中扮演配体的角色. NUB1-CUL3-蛋白酶体途径中, 干扰素 β 可提高 NUB1 的表达水平而拯救 HTT-神经元的表型^[44]. 最近研究证实干扰素 β 的敲除会导致自噬的阻断^[49], 干扰素 β 的表达对自噬的正常进行是必需的, 因此, 干扰素 β 对蛋白酶体途径和自噬途径是否存在协同调控有待研究. 本课题组在另一项研究发现^[50], 降低细胞膜蛋白受体 Gpr52 蛋白水平可增强 mHTT 蛋白通过蛋白酶体途径降解, Gpr52 可改变 cAMP 信号通路作用到蛋白酶体途径, 从而阻断 mHTT 的降解. 有趣的是, Gpr52 富集表达于纹状体, 因此特异性地造成纹状体神经元 mHTT 蛋白的降解

变慢^[50]。根据 Tsvekov 等人^[43]的研究, 这种纹状体特异性的 mHTT 蛋白降解阻断, 可能是造成纹状体神经元在 HD 中特异性死亡的关键原因。综上所述, 泛素蛋白酶体途径可有效地降解 mHTT 蛋白。

3 自噬途径

3.1 自噬的概述

自噬是指一些需降解的蛋白质和细胞器等胞浆成分被包裹, 并最终运送至溶酶体降解的过程。根据底物进入溶酶体的途径不同, 自噬大致分为以下 3 种类型: 微自噬(microautophagy)、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)和大自噬(macroautophagy)。自噬过程是一系列自噬性结构逐渐演变的过程, 被诱导后, 细胞内形成一种称为隔离膜(isolation membrane)或吞噬泡(phagopore)小囊泡样结构, 并与需降解的胞浆成分集结, 然后隔离膜延伸并包裹封闭胞浆成分形成一个双层膜的结构, 即自噬体(autophosome), 自噬体与溶酶体直接融合形成自噬溶酶体(autopholysome), 或先与内涵体融合形成自噬内涵体(amphisome)后再与溶酶体融合, 内容物被不同种类的溶酶体酶降解。细胞自噬在细胞废物

清除、结构重建、生长发育中起重要作用, 而自噬功能紊乱则会导致神经退行性疾病等问题^[51]。自噬是个很复杂的过程, 细胞自噬需要多种自噬相关基因(atophagy associated gene, ATG)和信号通路的调节, 已经阐明的自噬相关基因 ATG 有 30 多种, 其中 18 个基因是自噬体形成所必需的。自噬发生的过程描述见图 2。

3.2 自噬途径降解 mHTT 蛋白

HD 的 mHTT 蛋白降解可通过大自噬进行^[52-54], 自噬关键基因如 LC3 和 P62 等可调控 mHTT 蛋白的自噬。LC3 是微管相关蛋白轻链 3(LC3)^[55], 它是酵母 ATG8 蛋白在哺乳动物对应的同源蛋白, 分为 LC3A 和 LC3B 及 LC3C 3 种类型, LC3B 在 ATG4B 的作用下可由 LC3B-I 转变为 LC3B-II, 这是自噬体脂膜融合和自噬体体积扩大关键步骤, 因此 LC3B-II 是衡量自噬水平的重要标记, 研究表明其可以调节 HTT 的降解^[56]。P62 是多功能泛素结合蛋白, 参与蛋白酶体和自噬两种途径的蛋白降解过程。在自噬方面, P62 通过 LIR 结构域与 LC3 直接结合, 二者的泛素化结合区可识别变异蛋白。研究表明, 在神经退行性疾病中细胞自噬活性降低且均与 P62 有关, P62 存在于

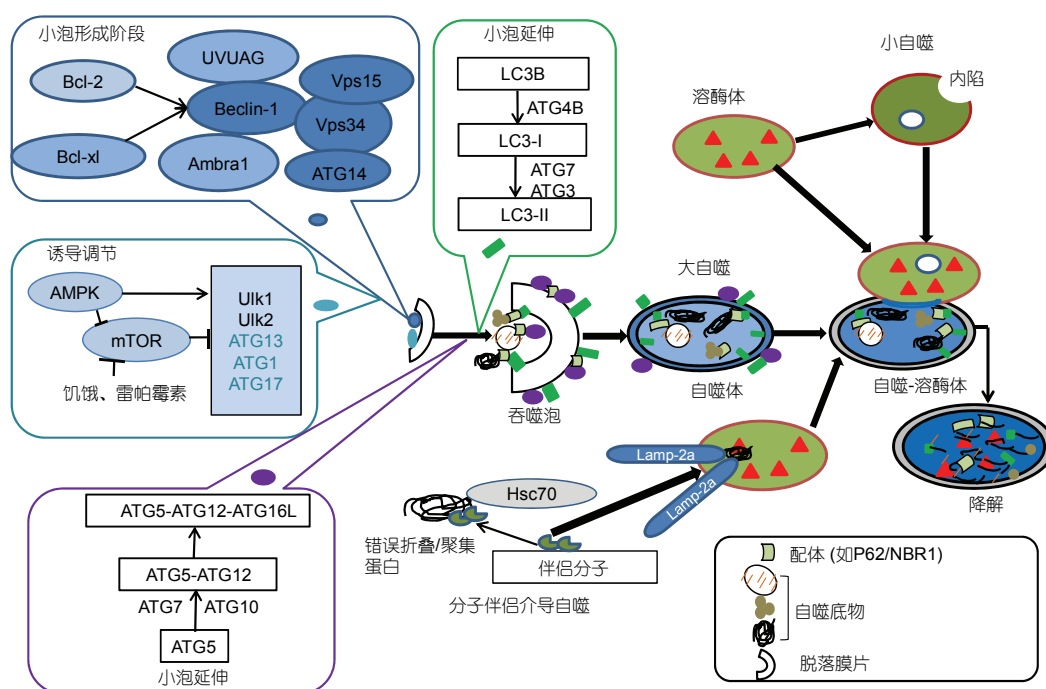


图 2 真核细胞自噬过程

异常蛋白聚集体中^[57]. 研究发现, P62 与 mHTT 蛋白聚集体共定位并促成 mHTT 蛋白清除^[58]. P62 作为自噬的调节子, 证实通过自噬途径清除泛素化修饰的 mHTT 蛋白而缓解神经细胞的死亡^[59]. 进一步研究发现, LC3 和 P62 及聚集体相互作用可由 ALFY 蛋白促成并参与自噬体形成, 最后完成自噬降解. 除自噬关键基因参与调控 mHTT 蛋白的自噬外, 转录因子调控自噬关键基因的表达也可影响 mHTT 蛋白的自噬降解, 研究表明, PGC-1 α 被诱导时, 可以有效阻止神经元细胞中 mHTT 蛋白的形成^[60].

除大自噬参与完成 mHTT 蛋白的降解外, mHTT 蛋白降解也可由分子伴侣介导的选择性自噬进行, 即 CMA 途径^[61]. 研究证实很多伴侣蛋白参与 CMA 介导的自噬过程中, 如伴侣蛋白 Hsc70 能够保护多聚谷氨酰胺疾病的神经元^[44,46]. 进一步分析机制发现, 蛋白 Hsc70 偶联在 mHTT 蛋白 C 端过表达时, 能够增强 mHTT 蛋白泛素化, 最终导致 mHTT 蛋白自噬途径降解^[27]. 此外, 在细胞和疾病模型中引入 mHTT 蛋白结合蛋白 HP1 和 Hsc70 基序的融合表达, 可以选择性地靶向变异 mHTT 蛋白并通过 CMA 途径降解 mHTT 蛋白^[39]. 综上所述, 分子伴侣介导的选择性自噬能够让 mHTT 蛋白进行选择性的自噬, 这一特征或可被更好地用来靶向高效清除 mHTT 蛋白.

3.3 自噬途径的调控

目前, 除转录水平调控自噬之外, 调控自噬途径的研究有很多报道, 例如, 抑制 mTOR 信号通路, mTOR 是自噬的负调控因子, 研究证实 mTOR 特异抑制剂雷帕霉素可以促进 mHTT 蛋白自噬降解, 进而减少 mHTT 的毒性^[62,63]. 自噬也受能量代谢的调控, 研究表明, 提高糖量可以诱导自噬, 导致 mHTT 蛋白降低, 其机制是通过抑制 6-磷酸葡萄糖进而抑制 mTOR 信号通路^[64]. 目前, mTOR 可以被多种抑制剂所抑制, 如 PI103^[65], PEITC^[66]和能减少 ROS 的维生素 E^[67,68], 寻找特异抑制 mTOR 的化合物对提高 mTOR 依赖的自噬极为重要.

然而, 并非所有的自噬途径都是 mTOR 依赖的. 研究表明, 降低细胞间的 Inositol 和 IP3 药物也能够增强自噬, 并可缓解疾病的表型^[69,70], 如锂、丙戊酸钠和卡巴咪嗪. 此外, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的临床药物氯压定和利美尼定可以抑制非依赖 mTOR 的

cAMP-PLC 信号通路而增强自噬^[71,72]. 研究证实细胞间的 Ca^{2+} 浓度也对自噬产生重要影响, 已经证实 L 型钙离子通道拮抗剂 (如维拉帕米和洛派丁胺等) 可以减少细胞间 Ca^{2+} 的水平, 抑制 Calpain 的活性加速 mHTT 蛋白自噬的降解^[71,73]. 此外, 其他小分子 (如海藻糖和三氟拉嗪) 也能够通过不依赖 mTOR 的方式而增强自噬^[74,75]. 综上所述, 联合增强 mTOR 依赖的和非依赖的自噬途径是否更有助于 mHTT 蛋白的彻底清除有待研究, 然而自噬作为细胞内部蛋白质控制的重要工具, 过度的自噬会导致细胞死亡^[76]. 因此, 如何增强和调控自噬的强度也是亟待解决的问题.

4 展望

基于第 2 和 3 节所述, 蛋白酶体途径和自噬途径在 HD 疾病 mHTT 蛋白的清除中扮演重要角色. 基于药物处理的方式已经用于高通量筛选自噬的调节因子^[77], 用于增强 mHTT 蛋白的清除. 然而, 总体性地提高蛋白酶体降解或自噬途径的降解, 缺乏特异性, 造成除了 mHTT 之外的其他蛋白降解加速, 可能导致细胞毒性或其他蛋白功能丧失等副作用. 因此, 尽管某些增加整体大自噬途径的药物似乎在一定程度上对 HD 模型有治疗作用, 但由于毒性等因素, 目前还未进入临床试验. 因此, 基于 mHTT 降解的 HD 治疗思路的关键在于找到特异性提高 mHTT 降解的途径. 将来可能通过两种思路实现:

(i) 通过小分子或多肽促进 mHTT 与蛋白酶体降解或自噬降解途径的关键配体蛋白 (adaptor) 结合. 例如, 目前已经有靶向结合 mHTT 的蛋白^[78], 利用靶向蛋白 (或多肽) 和 mHTT 蛋白的特异结合特点, 偶联靶向蛋白和药物或多肽而增强自噬或蛋白酶体降解途径. 今后可以根据 mHTT 结构设计小分子与其结合, 从而利用小分子达到类似效果.

(ii) 通过遗传学筛选, 寻找促进 mHTT 蛋白降解的潜在药靶基因. 本课题组^[79,80]建立了基于 TR-FRET 技术的高通量观察 mHTT 蛋白的降解系统, 该系统结合 Pulse-Chase 技术能有效观察细胞内源 mHTT 蛋白的降解 (尚未发表), 这对高通量筛选 mHTT 蛋白降解的调控基因提供了重要工具. 针对 mHTT 蛋白调控所筛选的靶向药物将极具临床治疗的前景.

随着研究的深入, HD 等退行性疾病的致病机制

将会研究得更清楚, 如寻找到降低 mHTT 蛋白水平的关键基因及相关信号通路, 针对 mHTT 蛋白清除必将有更好的方法. 而在可预见的将来, 有一系列重要的科学问题亟待解决: 两种途径如何协同完成 mHTT 蛋白的清除? 每种途径在生理及疾病情况下如何被调控? 如何利用这两种途径来预防或治疗神

经退行性疾病? 如何基于两个降解途径开发和设计化合物和小分子?

综上所述, 蛋白酶体和自噬作为真核细胞中重要的物质质控和降解系统, 二者降解 mHTT 蛋白分子机制是重要的生物学问题, 也对 HD 及类似疾病的药物研发有重要意义.

参考文献

- 1 Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2006, 368: 387-403
- 2 Papapetropoulos S, Adi N, Mash D C, et al. Expression of alpha-synuclein mRNA in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2007, 22: 1057-1059
- 3 Kidd M, Allsop D, Landon M. Senile plaque amyloid, paired helical filaments, and cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease are all deposits of the same protein. *Lancet*, 1985, 1: 278
- 4 Spillantini M G, Schmidt M L, Lee V M, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997, 388: 839-840
- 5 Sreedharan J, Blair I P, Tripathi V B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2008, 319: 1668-1672
- 6 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: 971-983
- 7 Walker F O. Huntington's disease. *Lancet*, 2007, 369: 218-228
- 8 Harjes P, Wanker E E. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 425-433
- 9 Yu S, Liang Y, Palacino J, et al. Drugging unconventional targets: insights from Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35: 53-62
- 10 Boudreau R L, McBride J L, Martins I, et al. Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther*, 2009, 17: 1053-1063
- 11 Harper S Q, Staber P D, He X, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 5820-5825
- 12 Rodriguez-Lebron E, Denovan-Wright E M, Nash K, et al. Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther*, 2005, 12: 618-633
- 13 Gagnon K T, Pendergraft H M, Deleavey G F, et al. Allele-selective inhibition of mutant huntingtin expression with antisense oligonucleotides targeting the expanded CAG repeat. *Biochemistry*, 2010, 49: 10166-10178
- 14 Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6: 919-930
- 15 Zeitlin S, Liu J P, Chapman D L, et al. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet*, 1995, 11: 155-163
- 16 Duyao M P, Auerbach A B, Ryan A, et al. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*, 1995, 269: 407-410
- 17 Grondin R, Kaytor M D, Ai Y, et al. Six-month partial suppression of Huntingtin is well tolerated in the adult rhesus striatum. *Brain*, 2012, 135: 1197-1209
- 18 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: 1820-1829
- 19 Leitman J, Ulrich Hartl F, Lederkremer G Z. Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun*, 2013, 4: 2753
- 20 Gutekunst C A, Li S H, Yi H, et al. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci*, 1999, 19: 2522-2534
- 21 Arrasate M, Mitra S, Schweitzer E S, et al. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 2004, 431: 805-810

- 22 Li X, Valencia A, Sapp E, 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: 4552–4561
- 23 Sapp E, Valencia A, Li X, et al. Native mutant huntingtin in human brain: evidence for prevalence of full-length monomer. *J Biol Chem*, 2012, 287: 13487–13499
- 24 Miller J, Arrasate M, Brooks E, et al. Identifying polyglutamine protein species *in situ* that best predict neurodegeneration. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 925–934
- 25 Goldberg A L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 2003, 426: 895–899
- 26 Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med*, 2009, 30: 191–296
- 27 Jana N R, Dikshit P, Goswami A, et al. Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem*, 2005, 280: 11635–11640
- 28 Ortega Z, Lucas J J. Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7: 77
- 29 Papandreou C N, Logothetis C J. Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, 64: 5036–5043
- 30 Richardson P G, Mitsiades C. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Future Oncol*, 2005, 1: 161–171
- 31 Winkler L L, Hwang J, Kalejta R F. Ubiquitin-independent proteasomal degradation of tumor suppressors by human cytomegalovirus pp71 requires the 19S regulatory particle. *J Virol*, 2013, 87: 4665–4671
- 32 Seo H, Sonntag K C, Isacson O. Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann Neurol*, 2004, 56: 319–328
- 33 Hunter J M, Lesort M, Johnson G V. Ubiquitin-proteasome system alterations in a striatal cell model of Huntington's disease. *J Neurosci Res*, 2007, 85: 1774–1788
- 34 Shaid S, Brandts C H, Serve H, et al. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*, 2013, 20: 21–30
- 35 Li X, Wang C E, Huang S, et al. Inhibiting the ubiquitin-proteasome system leads to preferential accumulation of toxic N-terminal mutant huntingtin fragments. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 2445–2455
- 36 Davies S W, Turmaine M, Cozens B A, et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 1997, 90: 537–548
- 37 DiFiglia M, Sapp E, Chase K O, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 1997, 277: 1990–1993
- 38 Tsunemi T, Ashe T D, Morrison B E, et al. PGC-1alpha rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 142ra97
- 39 Bauer P O, Goswami A, Wong H K, et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 256–263
- 40 Thompson L M, Aiken C T, Kaltenbach L S, et al. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J Cell Biol*, 2009, 187: 1083–1099
- 41 Juenemann K, Schipper-Krom S, Wiemhoefer A, et al. Expanded polyglutamine-containing N-terminal huntingtin fragments are entirely degraded by mammalian proteasomes. *J Biol Chem*, 2013, 288: 27068–27084
- 42 Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 477–513
- 43 Tsvetkov A S, Arrasate M, Barmada S, et al. Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nat Chem Biol*, 2013, 9: 586–592
- 44 Lu B, Al-Ramahi I, Valencia A, et al. Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntingtin toxicity via enhanced protein clearance. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 562–570
- 45 Kamitani T, Kito K, Fukuda-Kamitani T, et al. Targeting of NEDD8 and its conjugates for proteasomal degradation by NUB1. *J Biol Chem*, 2001, 276: 46655–46660
- 46 Kito K, Yeh E T, Kamitani T. NUB1, a NEDD8-interacting protein, is induced by interferon and down-regulates the NEDD8 expression. *J Biol Chem*, 2001, 276: 20603–20609
- 47 Kaltenbach L S, Romero E, Becklin R R, et al. Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet*, 2007, 3: e82
- 48 Aron R, Tsvetkov A, Finkbeiner S. NUB1 snubs huntingtin toxicity. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 523–525
- 49 Ejlerskov P, Hultberg J G, Wang J, et al. Lack of neuronal IFN-beta-IFNAR causes lewy body- and Parkinson's disease-like dementia. *Cell*, 2015, 163: 324–339
- 50 Yao Y, Cui X, Al-Ramahi I, et al. A striatal-enriched intronic GPCR modulates huntingtin levels and toxicity. *Elife*, 2015, doi:

- 10.7554/eLife.05449
- 51 Chen Y, Klionsky D J. The regulation of autophagy-unanswered questions. *J Cell Sci*, 2011, 124: 161–170
- 52 Sarkar S, Rubinsztein D C. Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy. *FEBS J*, 2008, 275: 4263–4270
- 53 Lu K, Psakhye I, Jentsch S. Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. *Cell*, 2014, 158: 549–563
- 54 Zhang Z, Miah M, Culbreth M, et al. Autophagy in neurodegenerative diseases and metal neurotoxicity. *Neurochem Res*, 2016, doi: 10.1007/s11064-016-1844-x
- 55 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132: 27–42
- 56 Filimonenko M, Isakson P, Finley K D, et al. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol Cell*, 2010, 38: 265–279
- 57 Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, et al. p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*, 2002, 160: 255–263
- 58 Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 2007, 131: 1149–1163
- 59 Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 2005, 171: 603–614
- 60 Mukherjee S, Duttaroy A. Spargel/dPGC-1 is a new downstream effector in the insulin-TOR signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195: 433–441
- 61 Gelman A, Rawet-Slobodkin M, Elazar Z. Huntingtin facilitates selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 214–215
- 62 Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, 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: 585–595
- 63 Sarkar S, Ravikumar B, Floto R A, et al. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ*, 2009, 16: 46–56
- 64 Ravikumar B, Stewart A, Kita H, et al. Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum Mol Genet*, 2003, 12: 985–994
- 65 Degtyarev M, De Maziere A, Orr C, et al. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J Cell Biol*, 2008, 183: 101–116
- 66 Bommareddy A, Hahm E R, Xiao D, et al. Atg5 regulates phenethyl isothiocyanate-induced autophagic and apoptotic cell death in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2009, 69: 3704–3712
- 67 Kamat C D, Gadal S, Mhatre M, et al. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis*, 2008, 15: 473–493
- 68 Underwood B R, Imarisio S, Fleming A, et al. Antioxidants can inhibit basal autophagy and enhance neurodegeneration in models of polyglutamine disease. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 3413–3429
- 69 Sarkar S, Floto R A, Berger Z, et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol*, 2005, 170: 1101–1111
- 70 Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, et al. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet*, 2008, 17: 170–178
- 71 Williams A, Sarkar S, Cuddon P, et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 295–305
- 72 Rose C, Menzies F M, Renna M, et al. Rilmenidine attenuates toxicity of polyglutamine expansions in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 2144–2153
- 73 Gordon P B, Holen I, Fosse M, et al. Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J Biol Chem*, 1993, 268: 26107–26112
- 74 Sarkar S, Davies J E, Huang Z, et al. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2007, 282: 5641–5652
- 75 Zhang L, Yu J, Pan H, et al. Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19023–19028
- 76 Rui Y N, Xu Z, Patel B, et al. HTT/Huntingtin in selective autophagy and Huntington disease: a foe or a friend within? *Autophagy*, 2015, 11: 858–860

- 77 Joachim J, Jiang M, McKnight N C, et al. High-throughput screening approaches to identify regulators of mammalian autophagy. *Methods*, 2015, 75: 96–104
- 78 Popiel H A, Burke J R, Strittmatter W J, et al. The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases. *J Amino Acids*, 2011, 2011: 265084
- 79 Liang Y, Yao Y, Lu M, et al. TR-FRET assays for endogenous huntingtin protein level in mouse cells. *J Huntingtons Dis*, 2014, 3: 253–259
- 80 Cui X, Liang Q, Liang Y, et al. TR-FRET assays of Huntingtin protein fragments reveal temperature and polyQ length-dependent conformational changes. *Sci Rep*, 2014, 4: 5601

New Strategies for Drug Discoveries of Neurodegenerative Disease: Degradation of Pathogenic Mutant Proteins

FU YuHua & LU BoXun

School of life science, State Key laboratory of Brain Sciences, Collaborative Innovation center for Brain Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

Neurodegenerative diseases are characterized by aberrant neuronal loss in the central nervous system, resulting in nervous system dysfunction and leading to serious clinical symptoms. The common hallmark for most neurodegenerative diseases is the aberrant accumulation of aggregation-prone proteins, which may contribute to the pathogenic mechanism of the disease. As an example, Huntington disease (HD) is a monogenetic disease caused by mutation of a single gene known as huntingtin (*HTT*). Genetic data have shown that the major cause of HD is the cytotoxicity of the mutant huntingtin protein (mHTT). Because of its clear genetics, HD is an important model for neurodegenerative diseases. Classical targeted-drug discovery approaches show some difficulties for treating HD because the pathogenic mechanism of mHTT remains elusive. Thus, lowering the toxic mHTT protein levels may reduce the downstream toxicity and represent a promising strategy for HD drug discovery. One potential method for lowering mHTT is to increase its degradation; thus, the regulation of mHTT is of great interest in both basic and translational research. Here, we review recent progress in studies of mHTT protein degradation as well as strategies for targeting HD via mHTT clearance.

Huntington's disease, autophagy pathway, proteasome pathway, mHTT protein

doi: 10.1360/N052016-00106