

项目编号：16939

“ 筹政基金 ”

大学生进习研修计划结题报告

课题名称 _____ 与亨廷顿疾病致病蛋白结合的小分子化合物药用功能探究 _____

申 请 人 _____ 杨惠雅 _____

院 系 _____ 生命科学学院 _____

导 师 _____ 鲁伯坝 _____

填表日期 _____ 2017 年 6 月 19 日 _____

复旦大学教务处制表

与亨廷顿疾病致病蛋白结合的小分子化合物药用功能探究

杨惠雅¹

指导教师：鲁伯坝²

(1. 生命科学学院，复旦大学；2. 生理学和生物物理学系，生命科学学院，复旦大学)

摘要：单基因显性遗传的亨廷顿舞蹈症（Huntington's disease）由于其明确的遗传背景，成为研究神经退行性疾病的经典模型。尽管已知变异亨廷顿蛋白（mHtt）含有的多聚谷氨酰胺是其致病的根本原因，但是其具体功能机制尚不清楚，为直接降低变异蛋白从而治疗疾病造成了巨大的困难。同时，研究发现，mHtt 的错误构象不仅会损害自身降解，同时还会改变其与胞内很多其他蛋白的相互作用。因此我们假设通过小分子化合物阻断 mHtt 与某些蛋白的异常相互作用，可以实现逆转细胞毒性，从而治疗疾病。合作者高通量筛选出一批与变异蛋白直接结合的小分子化合物。这里，我们得到在细胞层面、果蝇个体上具有拯救疾病表型效果的化合物 6I1（由于未发表，使用代号），进一步测量了 6I1 与 mHtt 的结合常数，并利用长时间动态细胞成像分析技术研究了 6I1 对 mHtt 蛋白 N17 区域不同位点突变的突变体细胞的拯救作用，证明 N17 区域的若干特定氨基酸位点对 6I1-mHtt 相互作用十分重要；最后，我们发现 6I1 处理直接阻断了 mHtt 蛋白与一分子量为 400kDa 的蛋白的结合。上述发现不仅为治疗亨廷顿疾病提供了潜在药物 6I1，也验证了我们的假说，6I1 通过改变 mHtt 相互作用组达到拯救作用，这为进一步揭示 mHtt 的致病机制提供了新的思路和证据，也为揭示其他神经退行性疾病的机制提供新的想法。

关键词：亨廷顿舞蹈症；变异亨廷顿蛋白；N17；结合化合物

Study the function of Huntingtin-interacting compounds

Huiya Yang¹

Advisor: Boxun Lu²

(1. School of Life Sciences, Fudan University; 2. Department of Physiology and Biophysics, School of Life Sciences, Fudan University)

Abstract: Most neurodegenerative diseases are related to pathogenic protein accumulations, which lead to neuronal death. Among them, Huntington's disease (HD), which is an autosomal dominant inherited disease, is a perfect model of neurodegenerative disorders. Although mutant Huntingtin (mHtt) protein with poly glutamine (polyQ) ultimately leads to neurodegeneration, the pathogenic mechanism remains unclear. Thus, it is tough to treat HD through lowering mHtt. However, at the core of HD pathogenesis is the fact that mHtt adopts misfolded aberrant conformations, which impair its degradation, and also alter its interaction dynamics with other proteins. The main goal of my scientific project has focused on identifying compounds that could physically bind to mHtt protein, thus neutralizing the pathogenic effects derived from its abnormal physical interactions. Here, we assess the ability of hit compounds to suppress neurodegeneration in HD cell models and a *Drosophila* model in the previous study. We also determine the K_d value for mHtt-6I1 interaction by MST technique. In addition, we discover several amino acid sites in N-terminal region are critical to mHtt-6I1 interactions. Finally, one of the mHtt-interacting proteins, which is around 400kDa, has been shown to be reduced, or even be disappeared after 6I1 treatment. These results combined give a possible mechanism for 6I1 treatment. Furthermore, it is shown that the interactome altered after drug treatment, which is correlated with the reversion of neurodegeneration. Hence, our drug candidate, 6I1, can be subsequently used to reveal the functions of the mHtt protein and expand our knowledge of other complicated neurodegenerative diseases.

Key words: Huntington's disease; mHtt; N17; mHtt-interacting compounds

1 引言

神经退行性疾病因蛋白在大脑中不正常折叠、聚集和积累引发神经元死亡^[1]，影响患者思维、运动、情感、认知和其他能力^[2]，是最重要的一类神经系统疾病。但是，由于缺少能够早期发现的生物标志物，疾病致病机制尚不明确，很难及时诊断治疗。其中，亨廷顿疾病（Huntington's disease, HD）和脊髓小脑性共济失调（SCA1）^{[3][4]}等是一类遗传性的神经退行性疾病，由于具备清晰的遗传学背景，成为研究神经退行性疾病的模型。

亨廷顿疾病全球患病率约为 5-10 例/10 万人。患者一般 40-50 岁发病^{[5][6]}，主要临床表现为不受控运动、精神障碍和进行性痴呆^[7]，发病后 5-15 年死亡。亨廷顿病是单基因显性遗传病，由第 4 号染色体亨廷顿（HTT）基因 1 号外显子的 CAG 重复数变异增多(>36CAG)引起的。正常人的这段 CAG 重复序列扩增 9-35 次，超过 36 次则会引起亨廷顿病，并且患者的发病时间与所含 CAG 重复呈负相关^[8]。HTT 基因编码的亨廷顿蛋白（Huntingtin）是一个相对分子质量为 347603 Da 的蛋白质^[9]，突变基因编码变异亨廷顿蛋白（mHtt），含过长多聚谷氨酰胺（polyQ），导致大脑纹状体区域中间多棘神经元(MSN)和皮层深层锥形神经元的死亡^[10]；并在皮层和纹状体区域聚集 mHtt N 段区域 polyQ 片段^[11]。但是，mHtt 在生物体内如何发挥生物学功能，以及如何引起大脑中进行性神经元功能障碍和神经退行的具体机制尚不可知^[12]，因此，很难利用经典靶向制药的手段筛选阻断致病蛋白毒性功能的小分子。

长期以来，亨廷顿疾病没有有效的特异性治疗。尽管一些治疗方法和药物能够改善病人运动过多和精神症状，但是没有足够的证据支持这些方法可以长期对症治疗。美国食品药品监督管理局（FDA）2008 年批准了首个获准治疗亨廷顿疾病的治疗药 Xenazine（丁苯那嗪）^[13]，丁苯那嗪通过选择性耗尽大脑中的多巴胺发挥作用，控制运动功能障碍，多巴胺、谷氨酸、GABA 等神经递质及其受体被推测在亨廷顿病致病机理中起到作用。但是，服用丁苯那嗪只能改善病人的舞蹈症症状，神经元死亡缺失的现象没有得到有效控制，长时间服用甚至会导致抑郁、头晕、帕金森症等不良反应，不能从根本上特异性治疗亨廷顿疾病。另有一些研究表明降低 mHtt 可以使病情好转，如 IONIS-HttRx 利用反义寡核苷酸，催化 RNase H 介导的变异亨廷顿蛋白 mRNA 降解，延缓疾病的发展^{[14][15]}。

虽然致病的分子机制复杂^[16-25]，但是我们明确知道变异亨廷顿蛋白（mHtt）是致病的根本原因，因此，如果我们能把 mHtt 本身作为药靶，改变其结构或者影响其在细胞内的生物学功能，很有可能达到治疗疾病的作用。目前已知，Htt 蛋白有许多相互作用蛋白，如伴侣分子(Tcp1, Hsp90s)与 Htt 直接作用并且修饰 mHtt 毒性^[26]；参与很多神经退行性疾病的 14-3-3 途径中的 4 个蛋白与 Htt 的 N 端结合^[27]；Htt 通过与 Dynactin, Ran 等结合参与依赖于微管的细胞运输^[28]。除上述之外，Htt 蛋白还参与胚胎发育^[29]、膜泡运输^[30]、信号传导、翻译等蛋白-蛋白相互作用^{[31][32]}，在自噬中作为自噬小体生成和运输的支架蛋白调控自噬^[33]。

基于 Htt 蛋白复杂的相互作用关系，我们提出假设：如果能得到一组直接与变异亨廷顿蛋白结合的小分子，其中很可能有些能通过改变变异蛋白的相互作用关系组而降低变异蛋白

的毒性。这不仅提供了新的治疗亨廷顿疾病的方法，还将从根本上解决 mHtt 致病机制。本课题将着重寻找具有拯救 mHtt 毒性的 mHtt-结合化合物，并对化合物的作用机制进行深入探索。

在进行筛选时，我们所用的化合物均来自合作实验室体外筛选的结果。他们构建了一个与 mHtt 结合，且不与正常亨廷顿蛋白（wtHtt）结合的小分子化合物库（成果未发表），此筛选库基于 FDA-approved Drug Library（美国食品药品监督管理局批准药物化合物库），分子种类涉及皮质类固醇激素、哌啶类、咪唑类、吡啶类、酯类、酚类等，其中一些化合物的生物学功能包括但不限于受体阻断剂、受体激动剂、酶抑制剂、激素类似物等。尽管如此，受目前科学技术手段所限，判断化合物与蛋白质结合只能依靠一些物理参数间接反映。合作实验室通过光学效应高通量筛选结合化合物，不能排除假阳性情况，明确结合及测定结合常数还需要通过其他物理参数体外验证。相对于其他传统的检测方法，如 ITC（等温滴定量热法），SPR（表面等离子体共振）等，MST（微量热泳动）通过监测生物分子热泳动的变化可以判断分子间是否具有相互作用以及分子间的结合亲和力，可以在较短时间内利用极少量样品获得数据^[34]，成为我们进行筛选实验的重要技术。

和 wtHtt 相比，mHtt 更多的聚集在核内^[35]，体内体外实验均证明，核内存在的含有过长 polyQ 的蛋白是不利的^{[36][37]}。尽管 Htt 基因编码超过 3,500 个氨基酸，但是在细胞和动物模型中表达 exon1 区域足够产生 HD 的病理学特征^[38]，另有证据表明蛋白水解产生的 exon1 是产生 mHtt 毒性所必需的^[39]。Exon1 区域包括 N 端的 17 个氨基酸区域（N17），polyQ 和 P-rich（多聚脯氨酸）。由于过长 polyQ 使蛋白不正常聚集，mHtt 蛋白的高级结构不稳定，很难得到高分辨率的蛋白结构。但 N17 部分（M-A-T-L-E-K-L-M-K-A-F-E-S-L-K-S-F）已经被解出为 α -螺旋结构^[40]，生化分析表明 N17 的 α -螺旋结构可以促进寡聚体形成，在体外加快 Htt-polyQ 部分的聚集^{[41][42]}。mHtt 的 Q 的增多，使蛋白松散、柔性增强，从而影响 N17 结构与 P-rich 结构相互作用，使其两端距离增加，促进了蛋白的聚集^[43]。

另外，N17 在进化上高度保守，N17 通过 Crm-1 出核途经介导 Htt N 端出核^{[44][45]}调节蛋白质定位和稳定性^[46]，还可以调节 Htt 结合到外周膜结构^{[44][45]}。此外，缺失 N17 部分的细菌人工染色体（BAC）的 HD 小鼠表现出更强烈的运动受损，神经元死亡和核内 mHtt 聚集^[47]。N17 拥有超过 10 个翻译后修饰，似乎是 Htt 的调节中心^[48]。其中，13，16 位丝氨酸的磷酸化被证明可以减少 mHtt 的寡聚化和聚集^[49]，在细胞和 BAC HD 小鼠中丝氨酸的磷酸化突变可以抑制 mHtt 的细胞毒性^[50]，而 mHtt 中过长的 polyQ 可能会减少磷酸化的效率，从而带来细胞毒性；6，9，15 位赖氨酸被泛素化和 SUMO 化后呈现出和 mHtt 片段毒性相反的效果^[46]，另有乙酰化^[50]，氧化^[49-52]等修饰。结构生物学和体内实验的结果引发了我们对 Htt-exon1-N17 的兴趣，N17 区域可能存在对化合物与 mHtt 结合起关键作用的氨基酸位点。因此，除了上述提到的被修饰的 S13，S16，K6，K9，K15 外，我们还将构建 E5，E12，M8^[44]的突变体，这些位点被证明对 N17 的 α -螺旋的稳定起关键作用。通过化合物作用于这

些突变体，来寻找对化合物—mHtt 结合有影响的氨基酸位点。

于是，本课题将着重研究筛选得到的化合物的作用机制。定量测量化合物与 mHtt 的结合，并且尝试在分子层面上解释化合物与 mHtt 的结合位点，更进一步解释我们之前提出的假设：小分子化合物通过改变变异蛋白的相互作用关系组而降低变异蛋白的毒性。研究成果将为未来进一步证明有效的化合物可以通过化学修饰改造，进入临床试验，实现治疗亨廷顿疾病奠定重要基础。

2 MST（微量热泳动）实验筛选出和 mHtt 结合的化合物

我们通过合作者得到了一批来自高通量筛选的结合变异 Htt 的小分子化合物；为了排除高通量筛选带来的假阳性结果，我们利用纯化蛋白体外与化合物进行微量热泳动实验的筛选，进一步确认化合物—蛋白的结合，并测量其结合常数。

2.1 野生型和变异蛋白的体表达纯化

首先在大肠杆菌菌株 BL21 诱导表达 GST-His 标签的蛋白，经小量诱导表达鉴定后，发现菌株几乎不表达蛋白，大量低温慢速诱导仍然无法解决表达问题。于是我们更换表达质粒，在大肠杆菌菌株 BL21 诱导表达 His-MBP-His 标签的蛋白，小量诱导表达很好，扩大培养后，经过 Ni 柱亲和层析和分子筛凝胶排阻层析，纯化得到较为纯净的 MBP-Htt-exon1-Q25 和 MBP-Htt-exon1-Q72 蛋白（图 1）。经 Western Blot 验证，确为目标蛋白（图 2）。

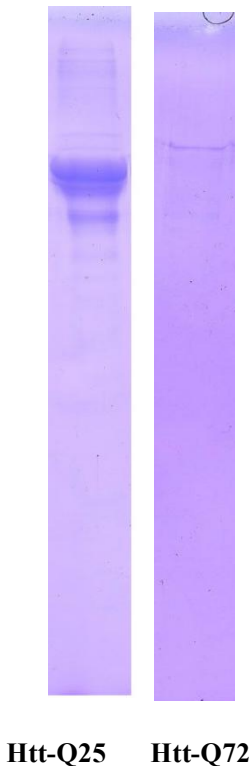


图 1. MBP-Htt-exon1-Q25 和 MBP-Htt-exon1-Q72 蛋白经 Ni 柱、分子筛纯化后考马斯亮蓝染色

胶图显示纯化后可以得到纯度较高的蛋白，左侧为野生型蛋白（MBP-Htt-exon1-Q25），右侧为突变蛋白（MBP-Htt-exon1-Q72）。突变蛋白因会自发聚集，形成沉淀，故产率较低

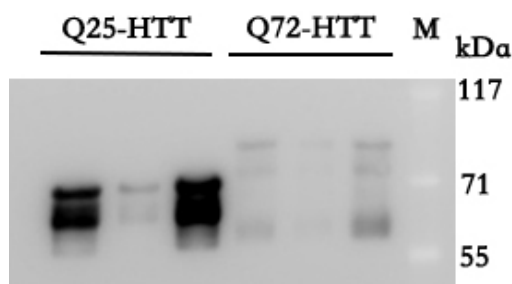


图 2. Western Blot 验证纯化蛋白

使用 Htt 特异抗体 2B7 对纯化蛋白进行验证。第 1-3 泳道：MBP-Htt-exon1-Q25；第 4-6 泳道：MBP-Htt-exon1-Q72，目的蛋白略有降解

在纯化中，我们得到了纯度较高的蛋白，由于 mHtt 具有自发聚集的性质，因而得到的纯化 mHtt 蛋白浓度较低。Western Blot 结果除验证目标蛋白之外，还显示出纯化蛋白经冻融后有降解。考虑到后续实验目的是验证化合物—蛋白结合，蛋白略微降解对实验的影响可以接受，因而后续实验将继续用此纯化蛋白。

2.2 MST 实验筛选体外与 mHtt 特异结合的化合物

获得纯化蛋白后，我们利用 NanoTemper 公司提供的蛋白染料标记试剂盒和 MST 测量仪器，筛选体外与 mHtt 特异结合的化合物。在对蛋白进行标记后，我们将所测化合物从最大溶解度开始，逐渐等比稀释 16 倍，通过监测化合物—蛋白溶液中分子热泳动的变化，来测量分子间的相互作用。同时，我们采用 MBP-Htt-exon1-Q25 作为阴性对照，进行筛选。

根据合作者的筛选结果，我们利用 MST 测量了大量化合物（部分结果见表 1），其中，化合物 6I1，可以特异性结合致病蛋白 MBP-Htt-exon1-Q72（图 3），不结合正常蛋白 MBP-Htt-exon1-Q25（图 4），7D4、5F2 等也表现出相似性质。综合亨廷顿疾病细胞模型和果蝇模型的拯救效果，我们最终决定对 6I1 进行深入研究，明确其治疗 mHtt 引发的细胞毒性中的机制。

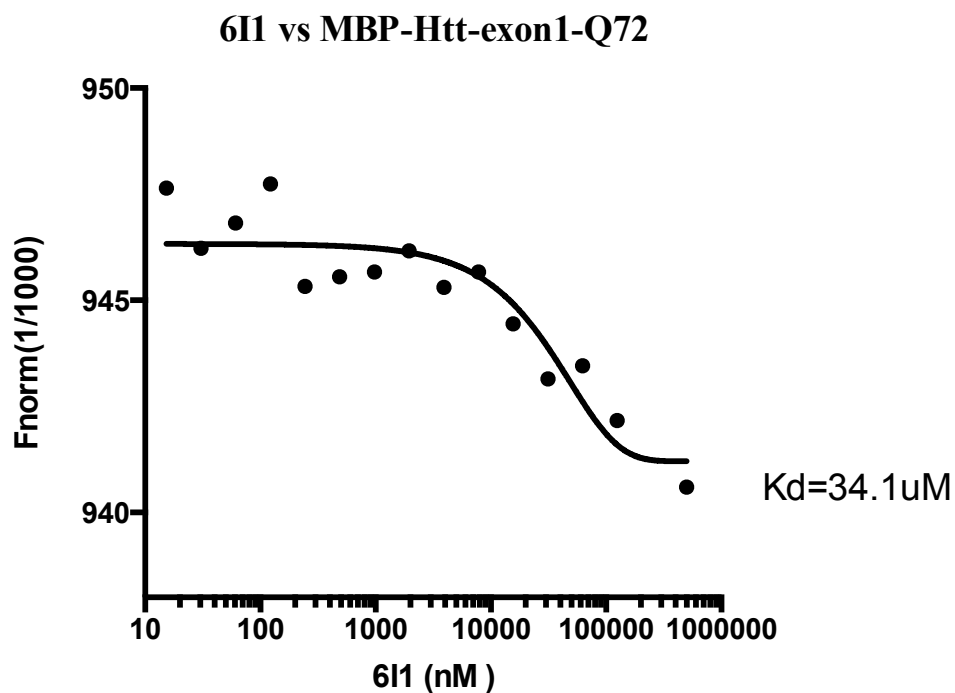


图 3. MST 实验测定化合物 6I1 与 MBP-Htt-exon1-Q72 蛋白结合
 蛋白首先被红色荧光燃料 NT-647-NHS 标记，化合物 6I1 浓度由 500uM 等比稀释，测量于室温下进行。可见，6I1 与变异蛋白的结合常数为 34.1uM

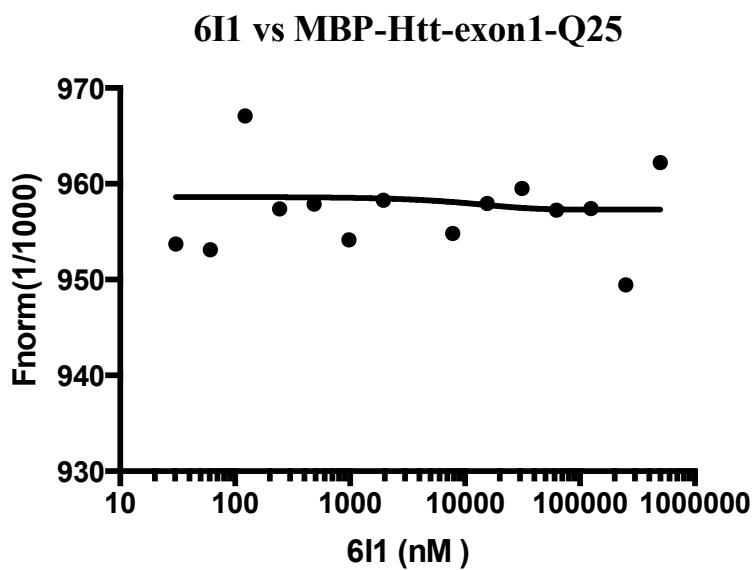


图 4. MST 实验测定化合物 6I1 与 MBP-Htt-exon1-Q25 蛋白结合
 蛋白首先被红色荧光燃料 NT-647-NHS 标记，化合物 6I1 浓度由 500uM 等比稀释，测量于室温下进行。可见，6I1 与正常蛋白没有结合

	结合常数 Kd (uM)			
化合物	MBP-Htt-exon1-Q72			MBP-Htt-exon1-Q25
6I1	34.1	51.3	69.3	N.C.
7D4	204	172.7		N.C.
5F2	0.54			N.C.

5L8	0.296			N.C.
1P22	33.7			N.C.
8D5	24.6			N.C.
10H17	N.C.			
3A9	N.C.			
3C13	N.C.			
3J19	N.C.			
6I12	N.C.			
7F19	N.C.			
7O12	N.C.			
8C16	N.C.			
8F20	N.C.			
9M4	N.C.			
7F20	N.C.			

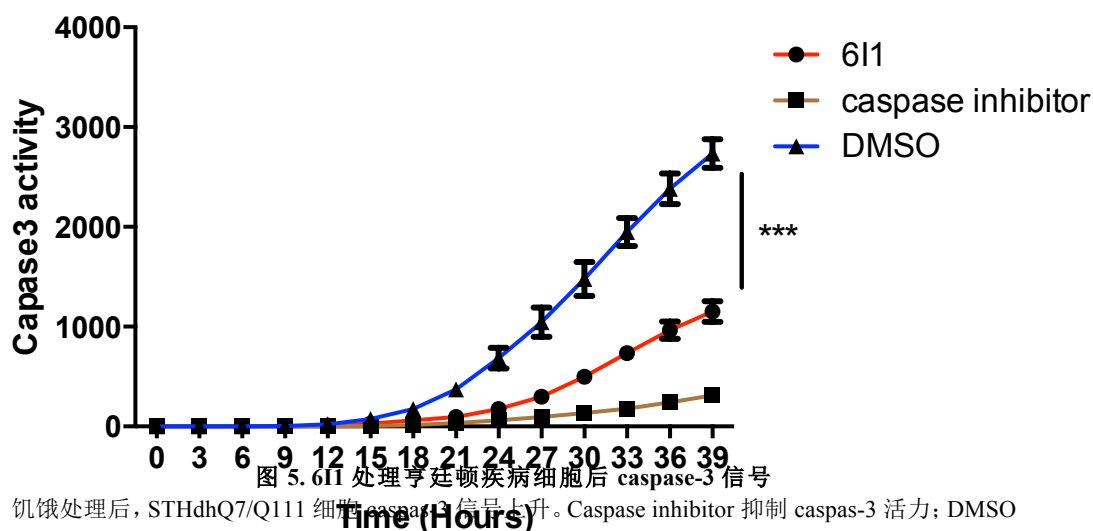
表 1. MST 测量各化合物与 MBP-Htt-exon1-Q72, MBP-Htt-exon1-Q25 结合结果

在 MST 测量环境下,可见合作者所提供的高通量筛选结果出现部分假阳性结果。实验中与变异蛋白无结合的化合物,不再对其进行正常蛋白的结合测量实验

3 亨廷顿疾病模型筛选出拯救变异蛋白毒性的化合物

首先,我们希望能在确认有特异性结合的若干个小分子化合物中,筛选出能够改善疾病表型的化合物。正如前文所述,在过表达的细胞中,mHtt 带来细胞毒性,引起细胞凋亡。在细胞凋亡早期阶段,caspase3 活性上升,因而我们通过测量信号分子 caspase3 活性,反应细胞凋亡情况。若 caspase3 活性升高,表明细胞凋亡信号上升,此时 mHtt 引发的细胞毒性高。在小鼠纹状体来源的突变细胞系 STHdh Q7/Q111 和正常细胞系 STHdh Q7/Q7 中,我们发现 6I1 (图 5),5F2,7D4 和 5L84 个化合物可以降低 mHtt 带来的细胞毒性。

化合物6I1在亨廷顿疾病细胞中降低细胞毒性



对 caspase-3 活力没有影响。可以发现 6I1 明显降低 caspase-3 信号

化合物6I1在正常细胞中不改变细胞毒性

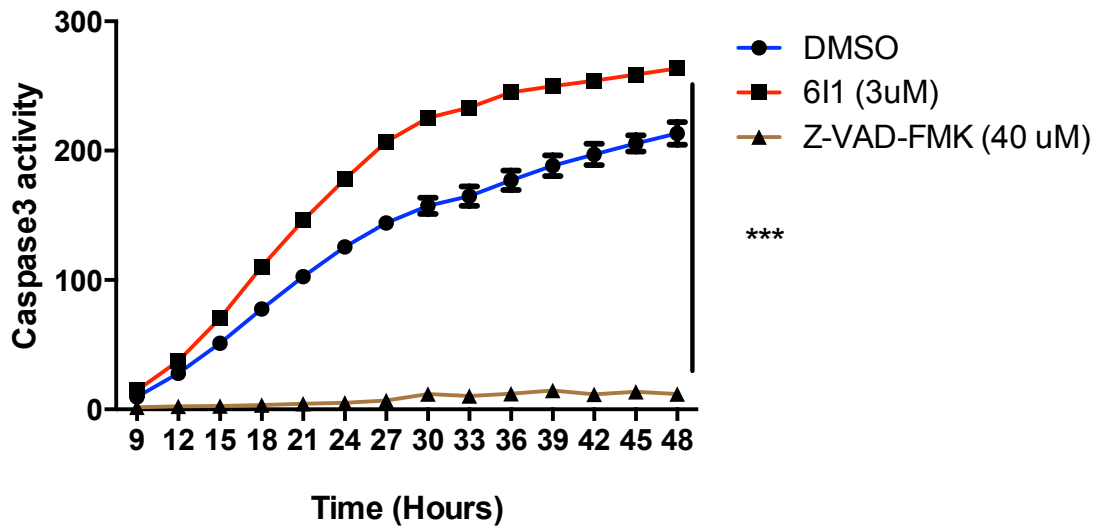
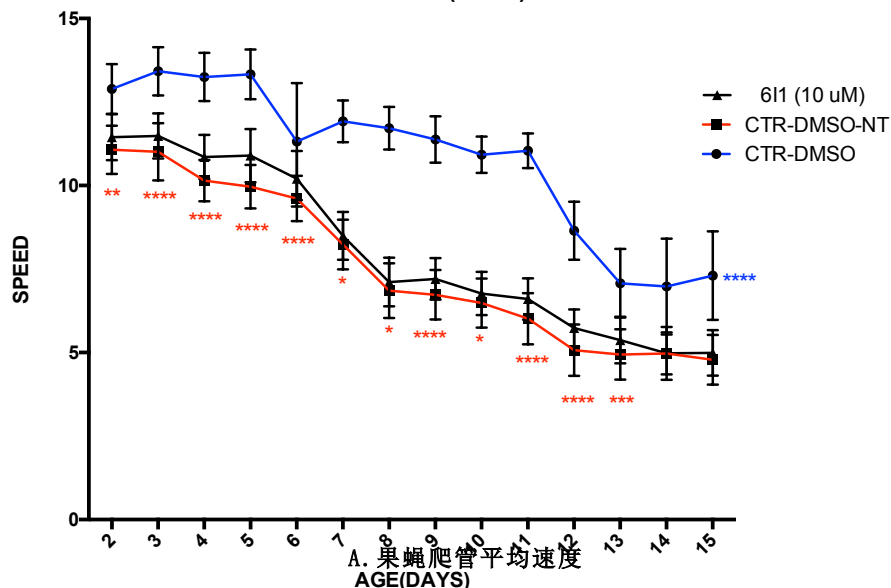


图 6. 6I1 处理正常细胞后 caspase-3 信号

Etoposide 阻断细胞周期, STHdhQ7/Q7 细胞 caspase-3 信号上升。Z-VAD-FMK 抑制 caspase-3 活力; DMSO 对 caspase-3 活力没有影响。可以发现 6I1 在正常细胞中不通过其它途径降低 caspase-3 信号

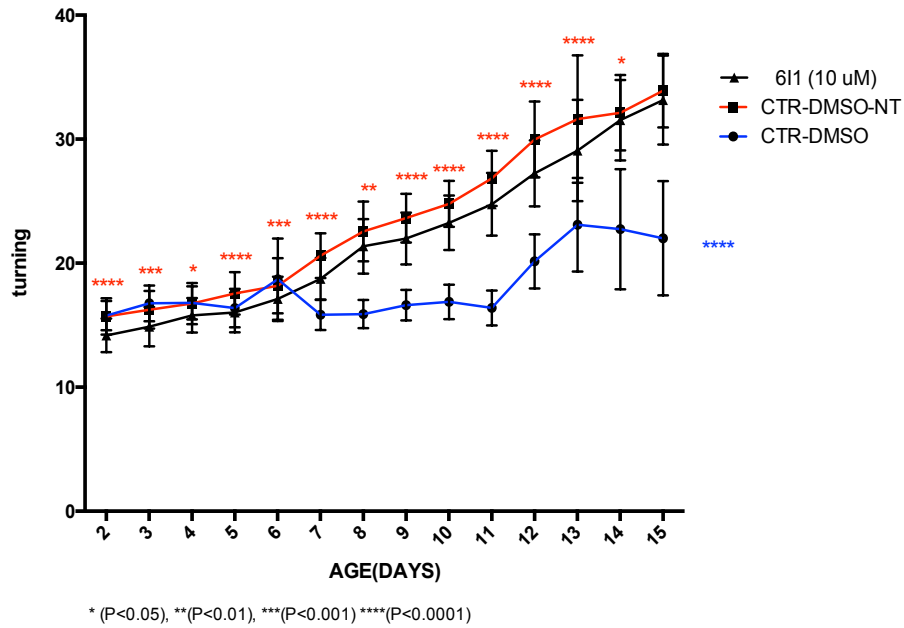
接着,我们希望能够在具有神经系统的动物体内看到化合物的拯救作用,因此借助于实验室大型果蝇爬管实验仪器,利用疾病果蝇模型 W118/elav-GAL4; UAS:NT-HTT-128Q, 我们发现化合物 6I1 可以明显改善疾病果蝇运动能力(图 7),具体表现在爬管运动中平均速度的提高、爬管旋转角度的减少等参数。同时,我们还发现 6I1 具有剂量效应,增加浓度至 50uM 后,对果蝇具有致死作用(图 8)。

The average of all the speeds before 7.5 seconds of NT HTT flies with 6I1 (10uM)



* (P<0.05), ** (P<0.01), *** (P<0.001) **** (P<0.0001)

The average of all turning angles of all detected regions before 7.5 seconds of NT HTT flies with 6I1 (10uM)



B. 果蝇爬管平均旋转角度

图 7. 6I1 (10uM) 改善亨廷顿疾病果蝇运动能力 (A, B)

对疾病果蝇喂食化合物 6I1, 以喂食 DMSO 的疾病果蝇 (蓝色) 为阴性对照; 正常果蝇 (红色) 为阳性对照, 发现果蝇爬管 7.5 秒内的平均速度升高 (A); 果蝇 7.5 秒内的转角降低 (B), 反应运动平衡能力增强

The average of all the speeds before 7.5 seconds of NT HTT flies with 6I1 (50uM)

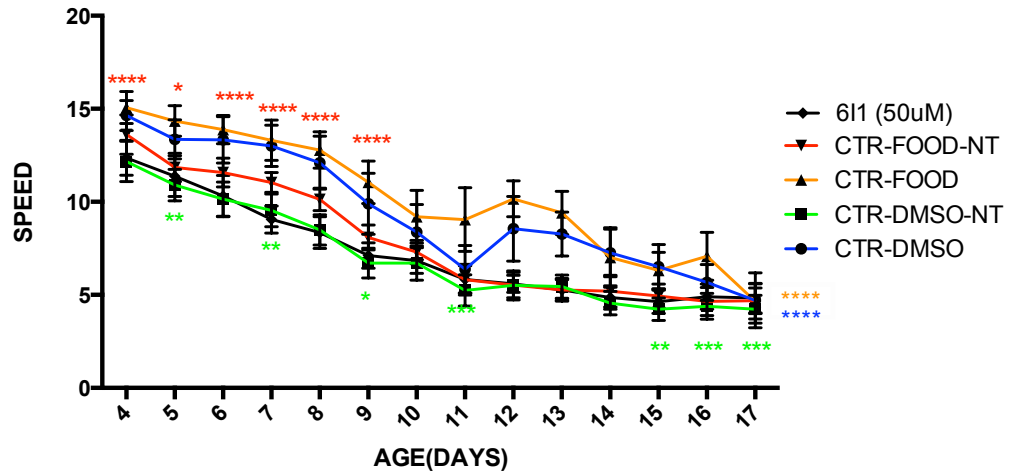


图 8. 6I1 (50uM) 不改善亨廷顿疾病果蝇运动能力

对疾病果蝇喂食化合物 6I1, 以喂食 DMSO 的疾病果蝇 (绿色) 为阴性对照; 正常果蝇 (蓝色) 为阳性对照, 发现果蝇爬管 7.5 秒内的平均速度只在后期略为升高, 表明 6I1 具有剂量效应

4 寻找 6I1 与 mHtt 的结合位点

4.1 构建 mHtt 蛋白 N17 区域突变质粒

结果发生变化，而不改变 4C9/MW1，事实上我们也能观察到这点（图 11）。以上均表明构建的这些 mHtt 蛋白突变体在细胞中表达是没有问题的。

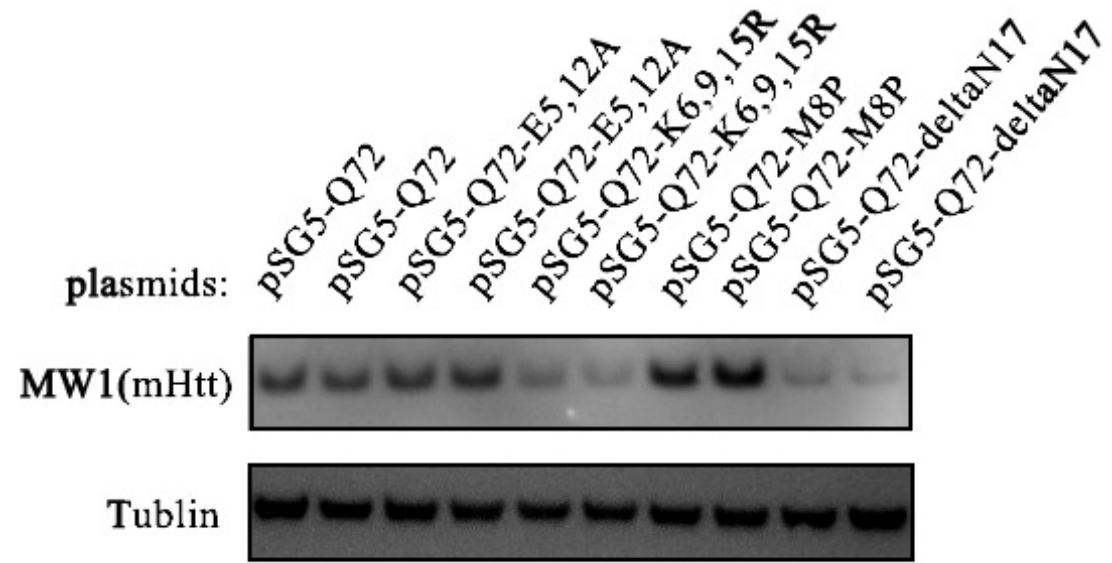
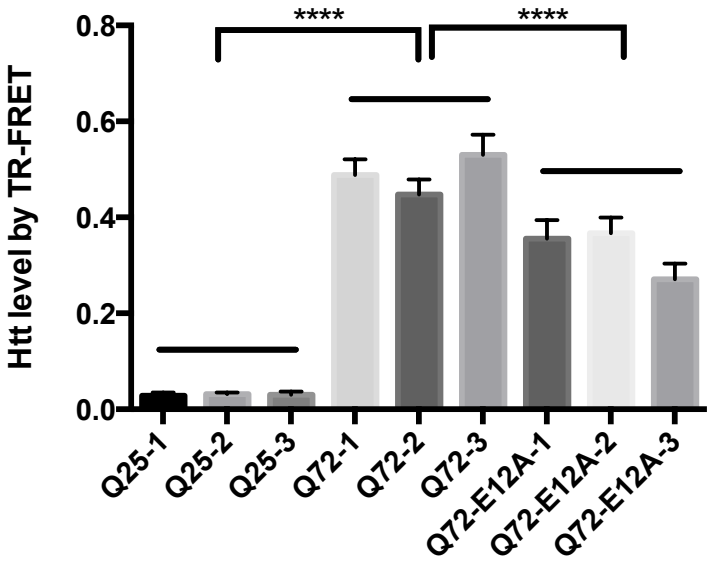


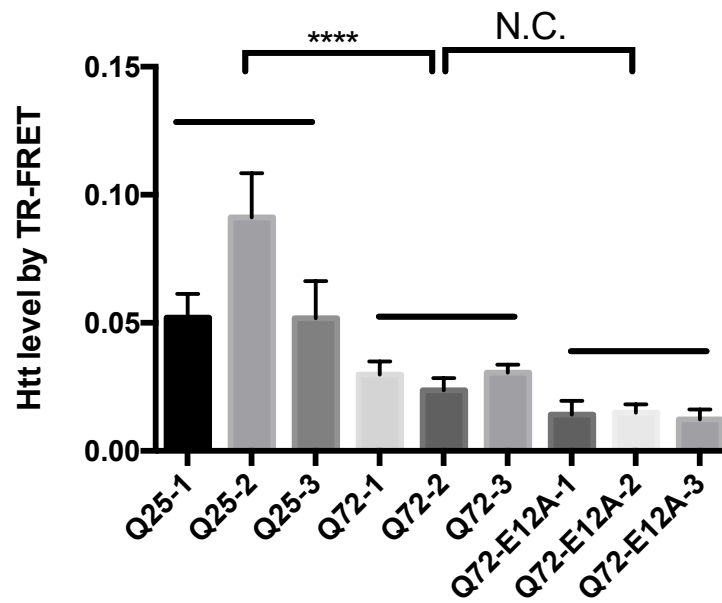
图 10. Western Blot 检测突变质粒在 293T 细胞的过表达水平
使用 MW1 抗体特异性识别 mHtt 的 polyQ 区域检测突变质粒表达情况，每个质粒各转染两孔细胞，Western Blot 结果表明质粒表达正常

2E6/MW1 抗体对检测Htt水平



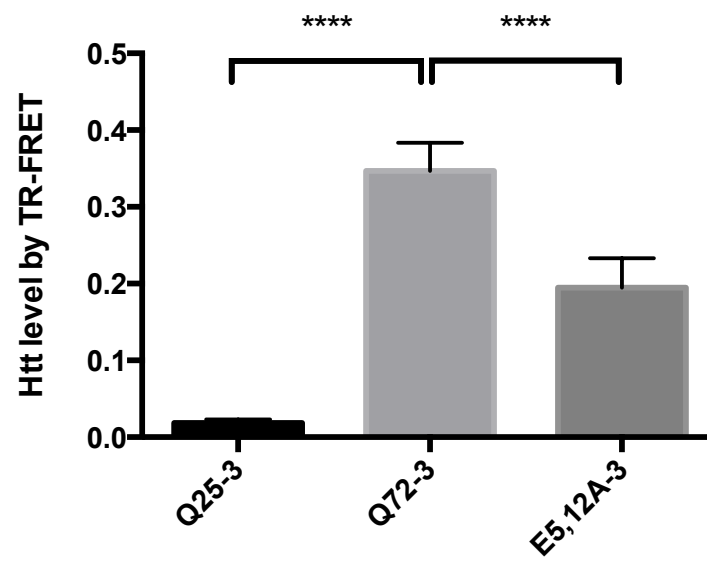
A

4C9/MW1抗体对检测Htt水平



B

2E6/MW1 抗体对检测Htt水平



C

4C9/MW1抗体对检测Htt水平

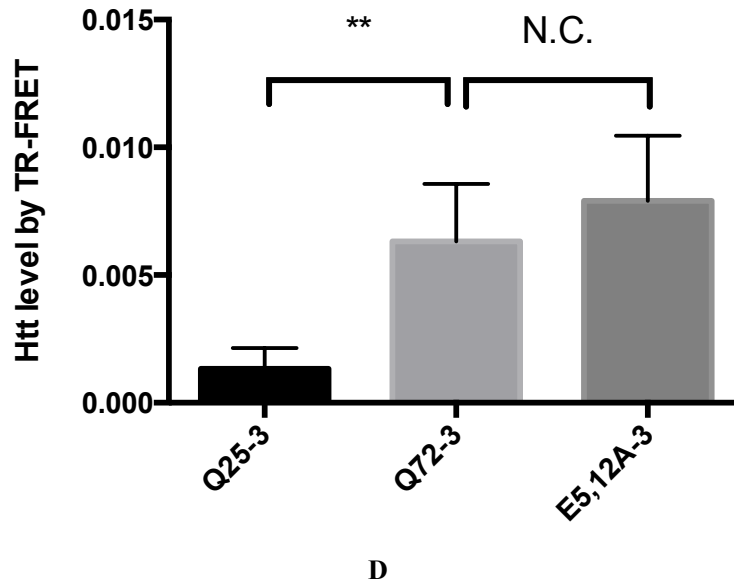


图 11. 利用 TR-FRET 技术检测 Htt 蛋白水平

以上所测蛋白含量均在抗体对识别过表达蛋白的线性范围内。A. 2E6/MW1 抗体对识别 N17-poly Q(室温)，发现 Q72 和 Q72-E12A 信号差异很大 B. 4C9/MW1 抗体对识别 polyQ-polyP(4 摄氏度)，作为对照发现 Q72 和 Q72-E12A 没有明显差异 C. 2E6/MW1 抗体对识别 N17-poly Q(室温)，发现 Q72 和 Q72-E5, 12A 信号差异很大 D. 4C9/MW1 抗体对识别 polyQ-polyP(室温)，作为对照发现 Q72 和 Q72-E5, 12A 没有明显差异 以上每个质粒各转染 3 孔细胞，在 TR-FRET 检测时各 6 个复孔

4.2 利用含有突变氨基酸位点的 mHtt 蛋白在细胞模型中寻找与 6I1 结合的氨基酸位点

紧接着，我们将上述质粒转染到细胞中，试图观察 mHtt 的突变体是否会对 mHtt 的细胞毒性产生改变。在实验中，我们发现转染不同氨基酸突变位点的质粒后，细胞凋亡没有显著性差异（图 12）。尽管如此，我们仍然可以发现与 Htt-exon1-Q72 相比，Htt-exon1-Q72-S13,16D 的毒性较小，这一现象与前文所述丝氨酸的磷酸化对 mHtt 的毒性具有减缓作用相一致（因为 D 所带负电荷可以模拟磷酸化后的负电状态）；Htt-exon1-Q72-deltaN17 和 Htt-exon1-Q72-K6,9,15R 的毒性增强也与前文所述原因一致。

在细胞凋亡信号没有显著性差异的基础上，我们对各个蛋白突变体进行 6I1 处理，试图寻找对 6I1 与 mHtt 蛋白结合有作用的关键氨基酸位点。我们发现，丝氨酸的突变蛋白（Q72-S13,16D）经 6I1 处理后，对 mHtt 细胞毒性引发的细胞凋亡没有得到改善（图 13）。而其他 mHtt 突变体则没有发现这样的逆转。这一结果揭示了，mHtt-exon1 的 13,16 位丝氨酸很有可能对 6I1 与 mHtt 的结合起关键作用，后续实验将继续丝氨酸突变体的研究。

亨廷顿蛋白突变质粒在亨廷顿疾病细胞中不改变细胞毒性

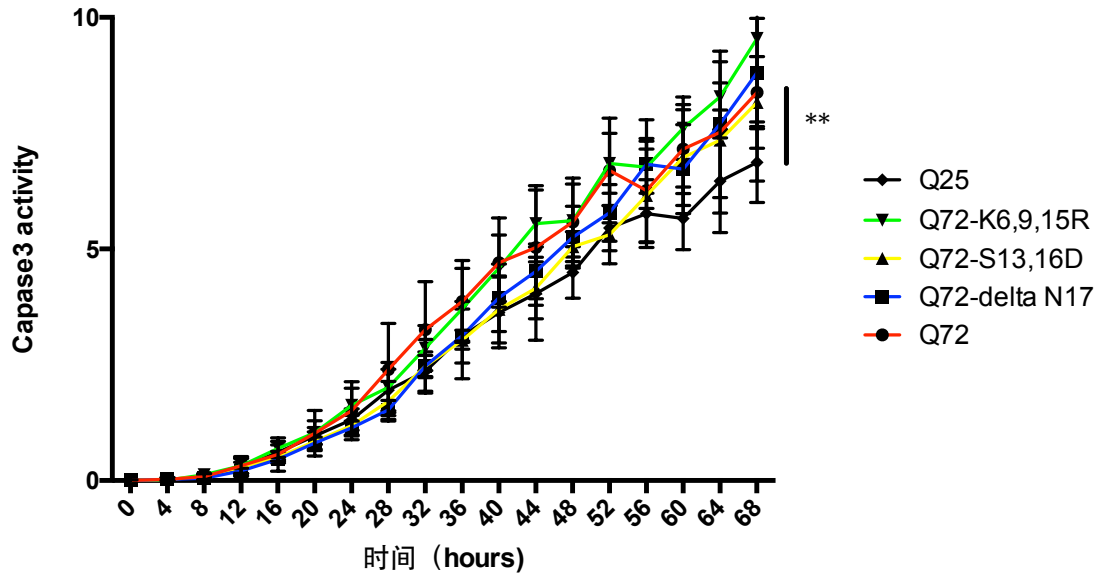


图 12. 细胞表达 Htt-exon1-Q72 突变质粒后 caspase-3 信号

细胞转染 24 小时后，进行 opti-MEM 血清饥饿处理，同时加入染料观察。由图可见，野生型蛋白 Q25 与突变蛋白 Q72 间 caspase-3 活性具有显著性差异；不同突变质粒与 Q72 间没有显著性差异。其中，每个质粒各转染 3 个复孔，每个复孔选择两个视野进行拍摄统计

丝氨酸突变逆转6I1降低mHTT-exon1细胞毒性的效果

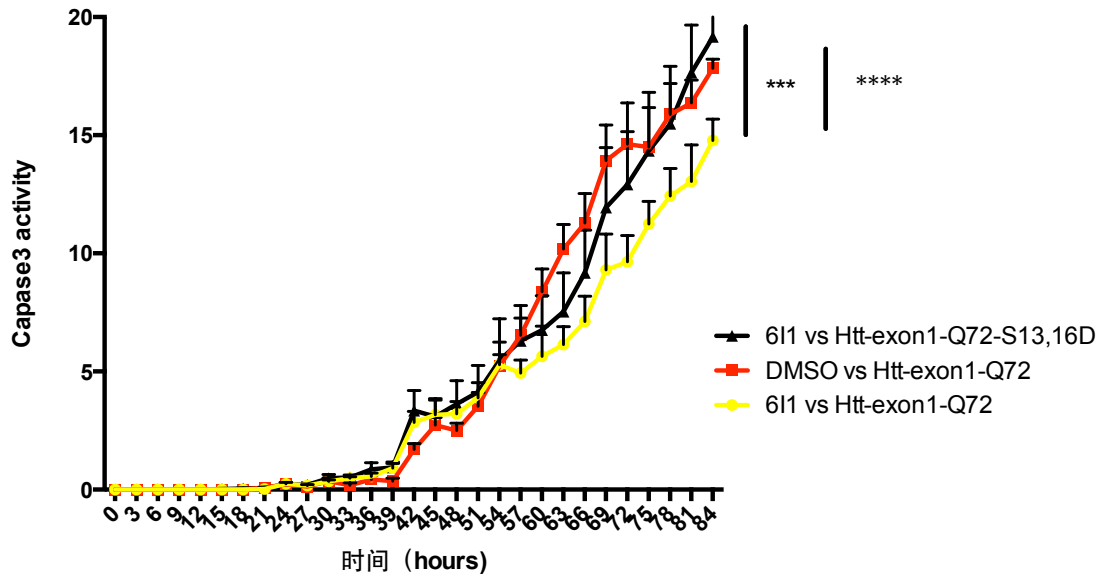


图 13. 6I1 处理表达 Htt-exon1-Q72-S13,16D 的细胞后 caspase-3 信号

细胞转染 24 小时后，进行化合物 6I1opti-MEM 血清饥饿处理，以 DMSO 作为阴性对照，同时加入染料观察。由图可见，6I1 处理 mHTT-Q72-S13,16D(黑)后，其 caspase-3 活性较 mHTT-Q72(黄)具有显著升高，表明 6I1 降低 mHTT 带来的细胞毒性的效果消失。其中，每个质粒与药物处理各 3 个复孔，每个复孔选择两个视野进行拍摄统计

5 免疫共沉淀分析 6I1 处理后 mHtt 相互作用蛋白变化

在寻找 6I1 与 mHtt 的结合位点中，我们已经有所收获。另外一个令人非常感兴趣的问题是 6I1 是否改变了 mHtt 相互作用蛋白，是否存在让我们之前的假设成立的证据。于是，我们尝试分析经 6I1 处理后的 mHtt 相互作用蛋白组。我们首先尝试利用识别 mHtt 的抗体进行 IP 实验，但总会出现目标蛋白不能被完全拉下的情况，换用带有 GFP 标签的 mHtt-GFP 融合蛋白也会出现相似的情况，有时甚至因为背景噪声过大而掩盖目标蛋白(图 14)。最后，我们发现利用带有 HA 标签的 mHtt 蛋白，可以较好的完成银染，分析蛋白相互作用组(图 15)。在所得结果中，我们惊喜地发现，经过 6I1 处理的细胞，在 400kDa 处明显少了一条带。通过查阅已发表的 Htt 相互作用组的文章，此大小处的确对应与 mHtt 存在相互作用的蛋白 X (因未发表，采用代号)，这表明 6I1 直接阻断了 mHtt 与此蛋白的结合。而考虑到前述实验证实 6I1 与 N17 区域特定位点相互作用，我们可以猜想 mHtt 致病的关键机制可能是 N17 与蛋白 X 的异常相互作用，而我们的分子 6I1 恰好阻断了这一相互作用，进而阻止了病变的恶化。这一发现可能为解释 6I1 治病机制，和 mHtt 的致病机理提供新的证据。后续实验仍将以此为重点深入研究。

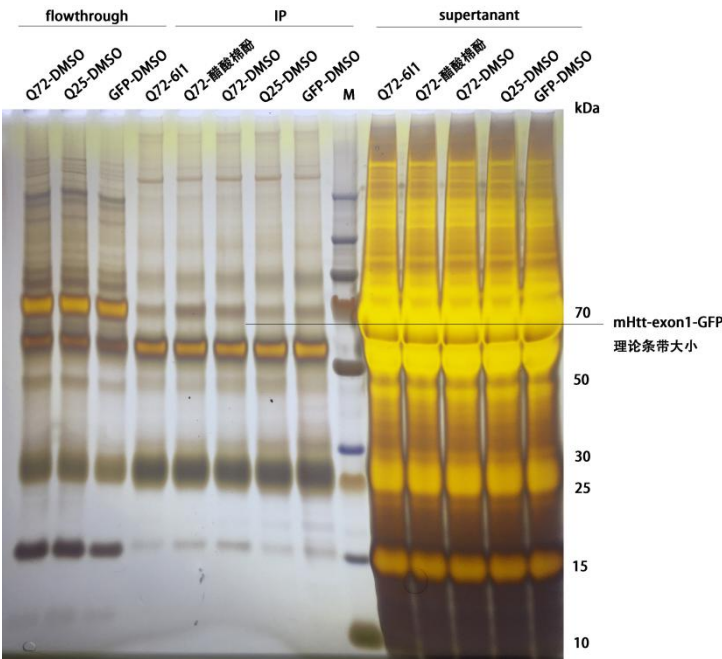
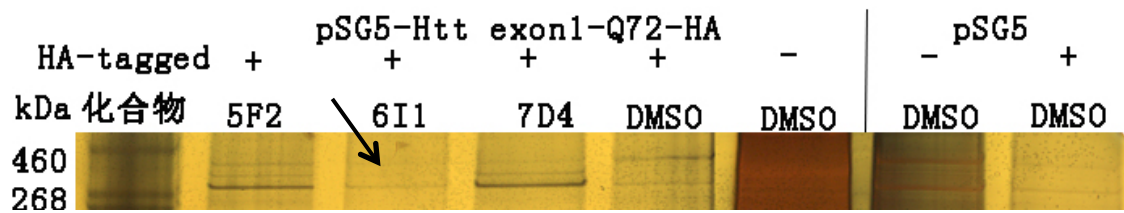


图 14. 银染分析 Htt-exon1-GFP 融合蛋白 co-IP 结果

使用 GFP 抗体对 Htt-exon1-GFP 融合蛋白进行 IP，银染前已经通过 Western Blot 验证过目标蛋白被 beads 拉下，但 Q25 和 Q72 蛋白均未在银染胶图中显示目的条带，无法用来分析 mHtt 的相互作用蛋白



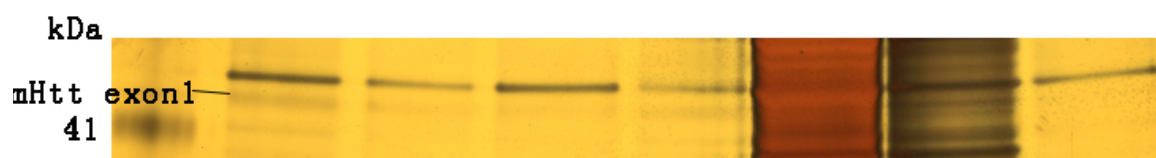


图 15. 银染分析 Htt-exon1-HA 蛋白 co-IP 结果

使用 HA 抗体对 Htt-exon1-HA 蛋白进行 IP。可以观察到与对照空载体 pSG5 相比，Htt-exon1-HA 蛋白明显表达。与对照 DMSO 处理相比，经 6I1 处理的细胞中，缺少了一条约 400kDa 的条带

6 结果与讨论

神经退行性疾病的致病机理和治疗手段的研究一直是此类疾病研究的热点和难点。亨廷顿病作为神经退行性疾病良好的模式疾病，给我们认识此类疾病提供了极大的便利。然而，虽然经过近 20 年的研究，我们仍然对这一疾病的致病机理知之甚少。更重要的是，由于对致病机理了解的匮乏，相关治疗手段始终停留在针对疾病症状的“治标”水平。而本课题的研究独辟蹊径，通过高通量筛选，体外生化，和体内细胞生物学研究，鉴定出了能够在果蝇个体水平拯救亨廷顿疾病表型的小分子化合物，为亨廷顿疾病药物研发开辟了方向。更重要的是，我们的化合物为进一步解释疾病的致病机理提供的可能；通过对化合物与 Htt 蛋白相互作用的体内外研究，我们首次揭示了 Htt 蛋白 N17 区段通过与蛋白 X 的相互作用，进而导致变异 Htt 致病的分子机理（假设）。由于通过化合物 6I1 阻断相互作用后，可以明显在完整的中枢神经系统水平（果蝇）观测到疾病表型的改善（行为学拯救效果），故这一新发现的致病机理在 mHtt 导致整个神经系统退行性病变的过程中起到了关键的作用。我们的发现对了解，治疗亨廷顿疾病有着突破性意义，同时我们揭示的神经退行性病变的分子机理，对于了解和治疗其他神经退行性疾病也有着重要的导向作用。

截至目前，我们已经完成了小分子 6I1 与 mHtt 结合常数初步测量，确认了小分子 6I1 的拯救作用是其直接与 mHtt 相互作用而导致的。进一步的，我们在细胞模型和果蝇模型上证实了这一化合物具有明显的疾病拯救效果，确定了其可以在完整神经系统层面拯救神经元的退行性病变。同时，我们已经初步通过构建突变体和细胞实验将 6I1 的拯救效果与 mHtt 的 N17 区域关联起来，并得到了可能有效的互作氨基酸位点——13, 16 位丝氨酸。最后，我们在分子层面上发现了 N17 可能通过与内源性蛋白 X 相互作用，进而导致神经退行性病变。但本课题还有许多方向需要完善，现陈述如下：

第一，精细测量化合物 6I1 与 mHtt 相互作用的结合常数。在前述实验中，我们通过 MST 技术初步测量了 6I1 与 mHtt 的结合常数。但由于纯化得到的蛋白在冻融后出现明显降解，蛋白聚集状态未知等原因，我们认为这一结合常数可能较真实值偏高。另一方面，由于小分子最可能通过竞争性结合改变 mHtt 与蛋白 X 的相互作用，因此该小分子与 mHtt 的结合强度应十分可观。考虑到我们初步测量值为 50 μ M 左右，我们猜测这一数值可能由于技术原因而偏高。因此，将来的研究还将优化蛋白表达纯化的条件，使用更好的蛋白样品精准测量这一结合常数。

第二，通过体外结合实验进一步证明 6I1 与 N17 的相互作用位点。在之前的研究中，我们通过构建并表达不同位点的 N17 突变体，在细胞水平研究了 6I1 与 mHtt 的作用位点。但由于细胞水平无法表征小分子和 mHtt 的直接相互作用，我们不能完全证实这些位点就是 6I1 真正的结合位点，为了进一步说明小分子特异性结合 mHtt 的机理，我们今后还需要选取细胞层面具有影响显著的作用位点，构建和纯化突变的 mHtt-exon1，通过体外结合实验直接证实 mHtt 和 6I1 的结合位点。

第三，进一步证实蛋白质 X 在神经退行性病变中的作用。虽然我们用银染的方法鉴定了 IP 得到的蛋白质 X 的含量在小分子处理前后有明显变化。但上述结果是基于 SDS-PAGE 以及染色得到的结果，仅仅依靠分子量对目的蛋白进行了粗分离；因此我们不能确定化合物处理前后相互作用组改变的蛋白的具体组分。为了确认蛋白质 X 在 6I1 拯救疾病表型以及亨廷顿疾病致病过程中的重要作用，将来我们将对 SDS-PAGE 分离出的蛋白条带进行质谱分析，确认蛋白组分。同时，进一步的进行细胞水平的直接验证，如利用 siRNA 敲低蛋白质 X 的表达量，观察对细胞毒性的拯救效果等。

虽然本课题还有许多地方有待将来的研究完善，但我们通过高通量筛选和体内外研究的手段，首次鉴定了与 mHtt 蛋白直接相互作用同时可以拯救疾病表型的小分子化合物；并初步揭示了一个全新，而且具有主导性地位的神经退行性病变的致病分子机理。对这一致病机理的深入研究将成为之后亨廷顿疾病研究的一个全新方向。更重要的是，我们鉴定的小分子化合物 6I1 不仅可以成为将来药物研发的前体分子，更可以作为研究亨廷顿疾病致病机理的独特工具，极大的促进我们神经退行性疾病的研究发展。

参考文献

- [1] Soto, C. "Unfolding the Role of Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases." *Nature Reviews Neuroscience* 4.1(2003):49.
- [2] "Correction: Molecular Basis of the Neurodegenerative Disorders." *New England Journal of Medicine* 341.18(1999):1407.
- [3] Gusella, J. F., and M. E. Macdonald. "Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease." *Nature Review Neuroscience* 1.2(2000):109.
- [4] Klement, I. A., et al. "Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. " *Cell* 95.1(1998):41.
- [5] Fisher, E. R., and M. R. Hayden. "Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. " *Movement Disorders* 29.1(2014):105-14.
- [6] Morrison, P. J., S. Harding-Lester, and A. Bradley. "Uptake of Huntington disease predictive testing in a complete population." *Clinical Genetics* 80.3(2011):281-286.
- [7] Harper, P. S. "New genes for old diseases: the molecular basis of myotonic dystrophy and Huntington's disease. The Lumleian Lecture 1995. " *Journal of the Royal College of Physicians of London* 30.3(1996):221.
- [8] Tabrizi, S. J., et al. "Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. " *Lancet Neurology* 12.7(2013):637.
- [9] Sequence, Amino Acid. "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group." *Cell* 72.6(1993):971-83.
- [10] Vonsattel, J. P., and M. Difiglia. "Huntington disease. " *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 57.5(1998):369.
- [11] Difiglia, M., et al. "Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain." *Science* 277.5334(1997):1990-3.
- [12] Orr, Harry T, and H. Y. Zoghbi. "Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders." *Annual Review of Neuroscience* 30(2007):575-621.
- [13] Frank, Samuel. "Tetrabenazine: the first approved drug for the treatment of chorea in US patients with Huntington disease." *Neuropsychiatric Disease & Treatment* 6.6(2010):657.
- [14] Yu, D., et al. "Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntingtin expression." *Cell* 150.5(2012):895.
- [15] Kordasiewicz, H. B., et al. "Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. " *Neuron* 74.6(2012):1031-44.
- [16] Schwab, L. C., et al. "Dopamine and Huntington's disease. " *Expert Review of Neurotherapeutics* 15(2015):1-14.
- [17] Wade, A, P. Jacobs, and A. J. Morton. "Atrophy and degeneration in sciatic nerve of presymptomatic mice carrying the Huntington's disease mutation." *Brain Research* 1188.1(2008):61.
- [18] Gauthier, Laurent R., et al. "Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules." *Cell* 118.1 (2004): 127-138.
- [19] Zuccato, Chiara, et al. "Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease.." *Science* 293.5529 (2001): 493-498.
- [20] Martinezvicente, Marta, et al. "CARGO RECOGNITION FAILURE IS RESPONSIBLE FOR INEFFICIENT AUTOPHAGY IN HUNTINGTON'S DISEASE." *Nature Neuroscience* 13.5 (2010): 567-576.
- [21] Bjorkqvist, Maria, et al. "A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease." *Journal of Experimental Medicine* 205.8 (2008): 1869-1877.
- [22] Tang, Tieshan, et al. "Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.7 (2005): 2602-2607.
- [23] Johri, Ashu, Abhishek Chandra, and M. Flint Beal. "PGC-1 α , Mitochondrial Dysfunction and Huntington's Disease." *Free Radical Biology and Medicine* (2013): 37-46.

- [24] Ayalapena, Sylvette. "Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis.." *Free Radical Biology and Medicine* (2013): 102-110.
- [25] Ghavami, Saeid, et al. "Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders." *Progress in Neurobiology* (2014): 24-49.
- [26] Shirasaki, Dyna, et al. "Network Organization of the Huntingtin Proteomic Interactome in Mammalian Brain." *Neuron* 75.1 (2012): 41-57.
- [27] Chen, Hungkai, et al. "Interaction of Akt-Phosphorylated Ataxin-1 with 14-3-3 Mediates Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 1." *Cell* 113.4 (2003): 457-468.
- [28] Caviston, Juliane P., and Erika L F Holzbaur. "Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking.." *Trends in Cell Biology* 19.4 (2009): 147-155.
- [29] Nasir, Jamal, et al. "targeted disruption of the huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes." *Cell* 81.5 (1995): 811-823.
- [30] Caviston, Juliane P., and Erika L F Holzbaur. "Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking.." *Trends in Cell Biology* 19.4 (2009): 147-155.
- [31] Li, Shihua, and Xiaojiang Li. "Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease." *Molecular Neurodegeneration* 1.1 (2006): 19-19.
- [32] Macdonald, Marcy E.. "Huntingtin: Alive and Well and Working in Middle Management." *Science Signaling* 2003.207 (2003).
- [33] Martin, Dale D O, et al. "Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy." *Trends in Neurosciences* 38.1 (2015): 26-35.
- [34] Seidel, Susanne A I, et al. "Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions." *Methods* 59.3 (2013): 301-315.
- [35] Kegel, Kimberly B., et al. "Huntingtin Is Present in the Nucleus, Interacts with the Transcriptional Corepressor C-terminal Binding Protein, and Represses Transcription." *Journal of Biological Chemistry* 277.9 (2002): 7466-7476.
- [36] Klement, Ivan A., et al. "Ataxin-1 Nuclear Localization and Aggregation: Role in Polyglutamine-Induced Disease in SCA1 Transgenic Mice." *Cell* 95.1 (1998): 41-53.
- [37] Benn, Caroline L., et al. "Contribution of Nuclear and Extranuclear Poly Q to Neurological Phenotypes in Mouse Models of Huntington's Disease." *Human Molecular Genetics* 14.20 (2005): 3065-3078.
- [38] Bates GP, Harper PS, Jones L, editors. Huntington's Disease. *Oxford University Press*; Oxford, U.K.: (2002). pp. 429–472.
- [39] Graham, Rona K., et al. "Cleavage at the Caspase-6 Site Is Required for Neuronal Dysfunction and Degeneration Due to Mutant Huntingtin." *Cell* 125.6 (2006): 1179-1191.
- [40] Kim, Mee Whi, et al. "Secondary Structure of Huntingtin Amino-Terminal Region." *Structure* 17.9 (2009): 1205-1212.
- [41] Thakur, Ashwani K., et al. "Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism.." *Nature Structural & Molecular Biology* 16.4 (2009): 380-389.
- [42] Tam, Stephen, et al. "The Chaperonin TRiC Blocks a Huntingtin Sequence Element that promotes the Conformational Switch to Aggregation." *Nature Structural & Molecular Biology* 16.12 (2009): 1279-1285.
- [43] Caron, Nicholas S., et al. "Polyglutamine domain flexibility mediates the proximity between flanking sequences in huntingtin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.36 (2013): 14610-14615.
- [44] Atwal, Randy Singh, et al. "Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity." *Human Molecular Genetics* 16.21 (2007): 2600-2615.
- [45] Rockabrand, Erica, et al. "The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis." *Human Molecular Genetics* 16.1 (2007): 61-77.
- [46] Steffan, Joan S., et al. "SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology.." *Science* 304.5667 (2004): 100-104.
- [47] Gu, Xiaofeng, et al. "N17 Modifies Mutant Huntingtin Nuclear Pathogenesis and Severity of Disease in HD BAC Transgenic Mice." *Neuron* 85.4 (2015): 726-741.
- [48] Lee, C.Y.D., Cantle, J.P., and Yang, X.W. Genetic manipulations of mutant huntingtin in mice: new insights into Huntington's disease pathogenesis. *FEBS J.* (2013) 280, 4382–4394.

- [49] Thompson, Leslie M., et al. "IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome." *Journal of Cell Biology* 187.7 (2009): 1083-1099.
- [50] Gu, Xiaofeng, et al. "Serines 13 and 16 Are Critical Determinants of Full-length Human Mutant Huntingtin-Induced Disease Pathogenesis in HD Mice." *Neuron* 64.6 (2009): 828-840.
- [51] Atwal, Randy Singh, et al. "Kinase inhibitors modulate huntingtin cell localization and toxicity.." *Nature Chemical Biology* 7.7 (2011): 453-460.
- [52] Mitomi, Yasushi, et al. "Post-aggregation oxidation of mutant huntingtin controls the interactions between aggregates." *Journal of Biological Chemistry* 287.41 (2012): 34764-34775.
- [53] Liang, Y., et al. "TR-FRET Assays for Endogenous Huntingtin Protein Level in Mouse Cells." *Journal of Huntingtons Disease* 3.3(2014):253-259.

后记（致谢）：经过一年多的努力，本课题终于结题。值此之际，首先必须感谢我的导师鲁伯坝教授，鼓励我申请本科生科研项目，在课题实施期间，我们会经常讨论实验进程，交流近期领域内相关进展，让我最激动的是每一次在讨论中我们都会萌发新的想法。在鲁老师的带领下，实验室中也弥漫着浓郁的科研学习氛围；其次是实验室的所有同学以及其他提供过帮助的课题组老师同学，感谢你们无偿的热心帮助和答疑解惑；同时必须感谢父母和朋友的理解，对于我选择这条道路的无限帮助和鼓励；最后，感谢荏苒基金大学生研修计划给予的经费支持和系统的科研训练，申请和答辩过程中每一位评审老师提出的宝贵意见都是我收获的财富，相信这对我以后的科研生涯都是很有帮助的。