

STRESZCZENIE

Choroba Huntingtona (HD) jest chorobą genetyczną spowodowaną przez zbyt dużą liczbę powtórzeń CAG w egzonie 1 genu *HTT*, kodującym huntingtynę. Od wystąpienia pierwszych symptomów choroby średnia długość życia wynosi 15-20 lat, kiedy to postępują objawy wynikające z neurodegeneracji. W związku z tym istnieje duże zapotrzebowanie na skuteczną metodę leczenia tego schorzenia. Opracowywane są strategie wykorzystujące mechanizmy wyciszenia ekspresji genów, w tym techniki edycji DNA. W tej pracy przedstawione są najważniejsze testowane obecnie podejścia, ze szczególnym uwzględnieniem strategii opierających się na wykorzystaniu oligonukleotydów antysensowych (ASO), technologii interferencji RNA (RNAi) i CRISPR-Cas9. Omówione są prowadzone obecnie próby kliniczne leczenia przyczynowego, inne najważniejsze próby terapii, a także obecnie stosowane środki farmakologiczne.

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA HD

Choroba Huntingtona (HD, ang. *Huntington's disease*) należy do grupy chorób poliglutaminowych (poliQ), do których zaliczamy także zanik jądra zębatego, jądra czerwienego, gałki błędej i jądra niskowzgórzowego (DRPLA, ang. *dentatorubral-pallidoluysian atrophy*), rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA, ang. *spino-bulbar muscular atrophy*) oraz niektóre typy ataksji rdzeniowo-mózdkowej (1, 2, 3, 6, 7 i 17) (SCA, ang. *spinocerebellar ataxia*) [1]. Wszystkie z dziewięciu chorób poliQ są powodowane tą samą mutacją, tj. nadmiernym wydłużeniem (ekspansją) ciągu powtórzeń CAG, zlokalizowanego w regionach kodujących określone białka, tj. w otwartych ramkach odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) specyficznych genów. W tych białkach obecny jest normalnie ciąg glutamin, który jest wydłużony w konsekwencji mutacji i prowadzi do zaburzonego funkcjonowania białka. Dla chorób poliQ występują pewne wspólne ścieżki patogenezy, które dotyczą w szczególności neuronów.

BUDOWA I FUNKCJA BIAŁKA HUNTINGTINY

Obecnie coraz więcej wiadomo na temat funkcji huntingtyny. Białko to bierze udział w różnorodnych procesach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, co może mieć kluczowe znaczenie w sytuacji gdy powstaje białko zmutowane. Uwagę zwraca duże zaangażowanie białka w procesy transportu wewnątrz neuronów. Huntingtyna bezpośrednio oddziałuje z białkiem motorycznym dyneiną, jak i z białkiem 1 związanym z huntingtiną (HIP, ang. *huntingtin-associated protein 1*), które z kolei oddziałuje z dyneiną i kinezyną, z których ta druga także należy do grupy białek motorycznych. Wykazano, że huntingtyna uczestniczy w transporcie następujących składników komórkowych: pęcherzyków synaptycznych, autofagosomów, endosomów, lizosomów, białka prekursorowego amyloidu oraz pęcherzyków zawierających receptory GABA, poprzez wzmacnianie efektywności tego transportu oraz wskazywanie jego kierunku [3]. Inne ciekawe obserwacje to między innymi wykazanie roli huntingtyny jako czynnika, który warunkuje prawidłową orientację przestrzenną wrzeciona podziałowego komórki. Białko to bierze także udział w tworzeniu rzęsek, w endocytozie, metabolizmie żelaza, jest zaangażowane w polaryzację komórek oraz działa antyapoptotycznie poprzez blokadę kaspaz 3 i 9 [3,5,6]. Huntingtyna ma także ogromne znaczenie w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN), a myszy pozbawione genu *HTT* obumierają w rozwoju embrionalnym [3,7-9]. Istotną rolą jest także regulacja transkrypcji i zwiększanie produkcji neurotroficznego czynnika wzrostu (BDNF, ang. *brain-derived neurotrophic factor*), który jest niezbędny dla przetrwania neuronów obecnych w prążkowiu i korze mózgowej [5].

inż. Bartosz M. Nowak,

dr hab. Agnieszka Fiszer 

Zakład Biotechnologii Medycznej, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2020_313

 autor korespondujący:
agnieszka.fiszer@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: choroba Huntingtona, gen *HTT*, choroby poliglutaminowe, terapia, oligonukleotydy antysensowe, interferencja RNA, CRISPR

Wykaz skrótów: ASO - oligonukleotydy antysensowe (ang. *antisense oligonucleotides*), CSF - płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *cerebrospinal fluid*), HD - choroba Huntingtona (ang. *Huntington's disease*), poliQ - poliglutamina, RNAi - interferencja RNA (ang. *RNA interference*), siRNA - krótkie interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*), SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej są finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu SONATA (2015/17/D/NZ5/03443). Dziękujemy dr Magdalenie Jazurek-Ciesiolka za uwagi do manuskryptu.

PATOGENEZA HD

Mutacja powodująca powstawanie nieprawidłowej huntingtyny występuje w pierwszym egzonie genu *HTT*, który prawidłowo zawiera od 10 do 34/35 (w zależności od źródła) powtórzeń CAG kodujących glutaminę. Charakterystyczne jest występowanie w tym ciągu zróżnicowanej w populacji, jak i u pacjentów z HD, liczby powtórzeń CAG [10]. W związku z tym faktem istnieją cztery możliwe warianty liczby powtórzeń występujących w tym egzonie:

- prawidłowy zawierający od 10 do 26 powtórzeń CAG, typowo 17-18,
- pośredni zawierający od 27 do 34/35 powtórzeń CAG,
- chorobowy zawierający ponad 36 powtórzeń CAG, typowo w zakresie 40-55,
- juvenilny, którego obecność powoduje wystąpienie objawów przed ukończeniem 21 roku życia i zawierający ponad 60 powtórzeń CAG [11].

Wariant pośredni nie powoduje wystąpienia choroby, jednak zwiększa ryzyko wystąpienia zmian u potomstwa w procesie wydłużania się ciągów powtórzeń CAG, co jest także powiązane z antycypacją, czyli wcześniej występującymi i silniejszymi objawami choroby u potomstwa pacjentów z HD [12]. Mutacje *de novo* w genie *HTT* pojawiają się niezmiernie rzadko [13]. Nie tylko długość ciągu powtórzeń CAG ma wpływ na przebieg choroby, obecnie zidentyfikowano szereg genów, m.in. związanych z naprawą DNA, których poziom ekspresji u poszczególnych pacjentów wpływa na czas wystąpienia objawów HD [14].

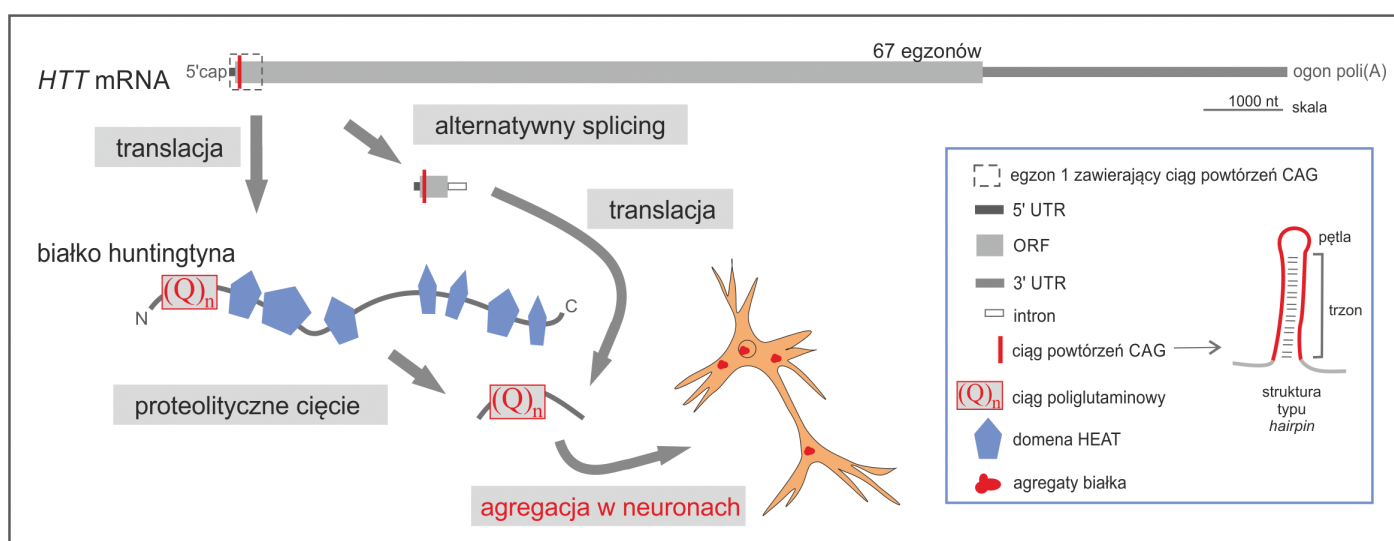
Patogeneza HD wynika z tego, że białko zmutowane nie funkcjonuje w wielu procesach jak białko normalne (tzw. mechanizm utraty funkcji, ang. *loss-of-function*), ale głównie z powodu toksycznych właściwości w związku z obecnością wydłużonego ciągu poliQ (tzw. mechanizm nabycia funkcji, ang. *gain-of-function*). Kluczowe dla patogenezy HD jest także powstawanie krótszych wariantów transkryptu i białka hun-

tingtyny (Ryc. 1). Obecnie przyjęty model rozwoju choroby wg R. Wetzel zakłada że do patologii wewnątrzkomórkowej przyczynia się tworzenie agregatów alfa-helis N-terminalnego fragmentu huntingtyny, które stanowią swoiste „ziarno” do którego dołączają się kolejne fragmenty zawierające sekwencje poliQ [10,15,16]. Złogi te odkładają się preferencyjnie w neuronach prążkowiej oraz kory nowej. Przejawami patologicznej funkcji nieprawidłowego białka są zaburzenia funkcjonowania synaps, nieprawidłowy transport przez pory jądrowe, zwiększony stres oksydacyjny [5]. Opisana jest również dysfunkcja mitochondriów, która prawdopodobnie pojawia się w neuronach na etapie przedobjawowym HD [17]. Postuluje się także udział zmutowanej huntingtyny w patologii procesów immunologicznych, jako że w HD dochodzi do aktywowania komórek mikrogleju oraz zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych [18]. Mechanizm chorobowy obejmuje także powstawanie patologicznych białek o małej masie w procesie nieuprawnionej translacji na powtórzonych sekwencjach bez udziału kodonu AUG (tzw. RAN translacji, ang. *repeat-associated non-ATG translation*). W skutek aktywowania RAN translacji na wydłużonych ciągach powtórzeń w różnych ramkach odczytu mogą powstawać różne peptydy z ciągami monoaminokwasowymi [19]. W przypadku HD znaleziono je w dużych ilościach w istocie białej oraz prążkowiej [5]. Postuluje się tworzenie przez wydłużony ciąg powtórzeń CAG w RNA struktury drugorzędowej typu spinki do włosów (ang. *hairpin*), co może mieć znaczenie dla aktywowania RAN translacji oraz sekwestracji różnych białek komórkowych [20]. Opisano możliwe toksyczne działanie zmutowanego mRNA, zawierającego wydłużone ciągi CAG, w mechanizmie *gain-of-function*. Taki transkrypt może powodować m.in. zaburzenia splicingu i stres jądkowy [21-23].

CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA HD

OBJAWY

HD towarzyszą zróżnicowane zaburzenia neurologiczne. Objawy obejmują występowanie mimowolnych plą-



Rycina 1. Budowa transkryptu i białka huntingtyny. Kolorem czerwonym oznaczono wydłużony ciąg powtórzeń CAG w transkrypcie (w legendzie przedstawiono zwróconą przez niego strukturę drugorzędową) oraz ciąg glutamin (Q) w białku. Schemat uwzględnia kluczowe dla patogenezy powstawanie krótszej formy transkryptu i białka. Agregaty fragmentów huntingtyny są obecne zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie neuronów. Więcej szczegółów w tekście.

sawicznych ruchów, od których nazwę wzięła historyczna nazwa choroby, charakterystyczne grymasy twarzy, warg i języka, bełkotliwą i niezrozumiałą mowę, a także depresję czy apatię [24]. HD powoduje zmiany strukturalne w korze mózgowej co prowadzi do wystąpienia otępienia umysłowego [25]. Objawy tego typu mogą być wykrywane u pacjentów już nawet dekadę przed rozwinięciem się pełnoobjawowej choroby [3]. Średni czas przeżycia od momentu stwierdzenia objawów klinicznych wynosi od 15 do 20 lat [6,26]. Pod względem klinicznym wyróżniamy 5 stadiów zaawansowania schorzenia [6]:

- presymptomatyczny (przedobjawowy),
- prodromalny – kiedy pojawiają się pierwsze subtelne objawy,
- wczesny – kiedy nasilające się objawy powodują trudności z wykonywaniem codziennych czynności,
- postępujący – kiedy następuje znaczna progresja choroby połączona z dramatycznym obniżeniem standardu życia,
- zaawansowany – w pełni rozwinięta choroba z objawami motorycznymi i objawami demencji.

W celu obiektywnego oceny postępu choroby stworzono unormowane skale oceny pacjentów, w tym najnowszą i najbardziej czułą cUHDRS (ang. *composite Unified Huntington's Disease Rating Scale*) [27]. Skala cUHDRS składa się z podtestów, których wyniki są następnie sumowane i obliczany jest końcowy wynik pacjenta [27]. Podtesty obejmują m.in. ocenę sprawności motorycznej, funkcji kognitywnych oraz ogólną ocenę funkcjonowania pacjenta [6,27].

EPIDEMIOLOGIA

HD jest najczęstszą monogeniczną chorobą neurologiczną [6]. Współczynnik występowania HD w populacji wyno-

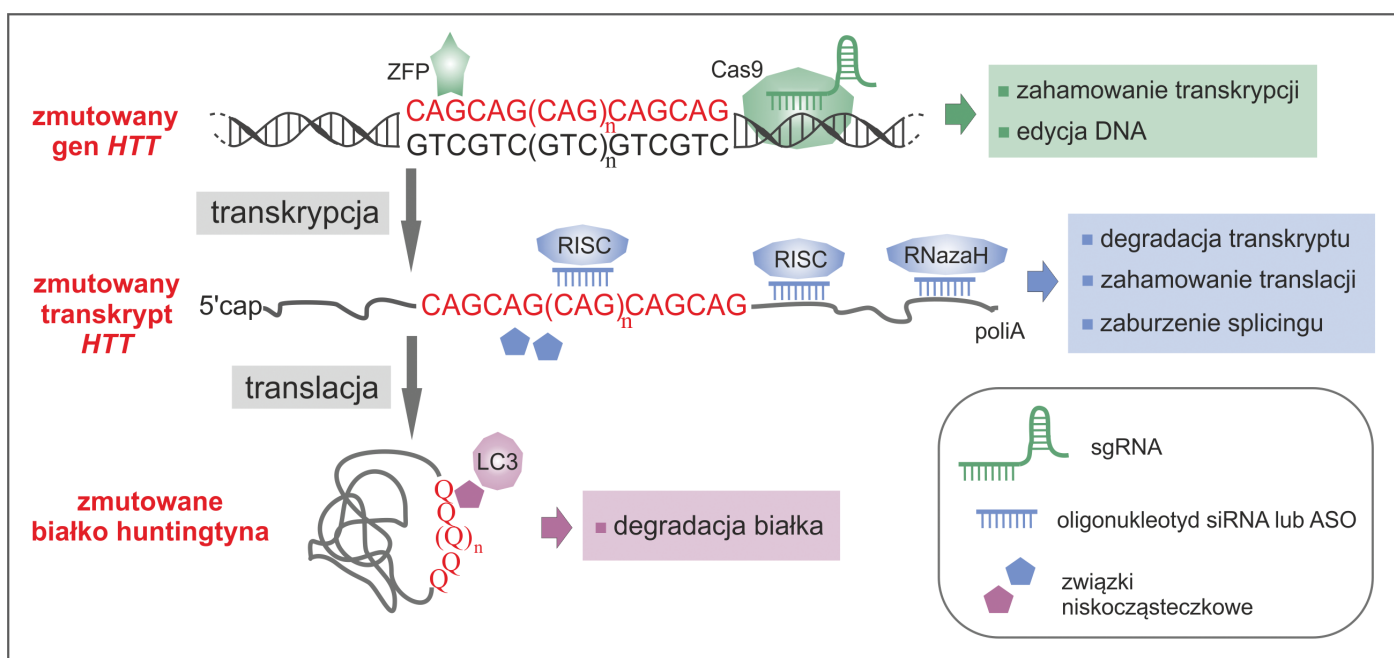
si 1/7,5 tys. [28], ale rozpowszechnienie choroby jest zróżnicowane. Najwięcej przypadków stwierdza się w Europie oraz USA, gdzie szacuje się odpowiednio: około 45 tys. i około 30 tys. chorych, a najmniej w krajach Azji Wschodniej [29]. Wiek pacjentów z objawami HD zawiera się w przedziale od 2 do 92 lat, jednak pierwsze stwierdzenie objawów rzadko następuje przed 10 lub po 70 roku życia [29]. Średnio objawy choroby ukazują się między 33 a 44 rokiem życia i brak jest preferencji do konkretnej płci [6,30].

DOSTĘPNE LECZENIE

Na obecny dzień brak jest możliwości leczenia HD. Działania terapeutyczne ograniczają się do leczenia objawowego. Duże korzyści dla pacjentów przynosi leczenie niefarmakologiczne takie jak intensywna rehabilitacja czy psychoterapia. Pierwszym środkiem farmakologicznym dedykowanym pacjentom z HD była tetrabenazyna, która jednak ogranicza występowanie tylko części objawów choroby i tylko przez pewien czas. Niedawno do użytku komercyjnego została dopuszczona deutetabenazyna, która jest modyfikacją chemiczną tetrabenazyny [25,28,31]. Poprzez dodanie do leku atomu deuteru zwiększono jego okres półtrwania i aktywność farmakologiczną [28]. Próba kliniczna wykazała znaczące zmniejszenie ruchów płaszczykowych przez 12 tygodni [31]. Pomimo znacznego rozwoju farmakologii leki te nie są jednak w stanie zahamować progresji choroby [25].

PRZYCZYNOWE STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

Obecnie na świecie prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem terapii, która pozwoli zatrzymać progresję HD lub znacznie ją ograniczyć. Wydaje się, że terapia nacelowana jedynie na jeden mechanizm indukowanej



Rycina 2. Strategie terapeutyczne specyficznie nakierowane na zahamowanie ekspresji zmutowanego genu poprzez wiązanie określonych cząsteczek do DNA, transkryptu lub białka huntingtyny. W kolorowych ramach wymienione są główne procesy, które mogą być aktywowane przy zastosowaniu poszczególnych podejść. Więcej szczegółów w tekście.

patologii może nie przynieść oczekiwanych skutków terapeutycznych dla pacjentów [5]. Za potencjalnie najskuteczniejsze rozwiązanie uważa się zahamowanie ekspresji zmutowanego genu, co doprowadziłoby do zahamowania lub znaczącego ograniczenia powstawania zmutowanego białka (Ryc. 2). Jest to tzw. leczenie przyczynowe, czyli eliminujące bezpośrednią przyczynę choroby. Testowane strategie terapeutyczne obejmują m.in. zastosowanie cząsteczek nakierowanych na wywołanie zmian na poziomie zmutowanego DNA, tj. białek z motywami palców cynkowych czy sekwencji TALEN i technologii CRISPR-Cas9. Z kolei terapie nakierowane na zmutowany RNA obejmują wykorzystanie interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*), oligonukleotydów antysensowych (ASO) oraz niskocząsteczkowych regulatorów splicingu [1]. Aktywność tych cząsteczek prowadzi do degradacji transkryptu, zaburzenia jego splicingu lub zahamowania przebiegającej na nim translacji (Ryc. 2). Proponowane są także strategie specyficznie nacelowane na zmutowane białko huntingtyny, jak niedawno opisane podejście z użyciem związku, który jednocześnie oddziałuje z wydłużonym ciągiem glutamin i białkiem LC3, będącym elementem autofagosomu, co prowadzi do degradacji zmutowanej huntingtyny [32]. W zależności od użytej cząsteczki i sposobu jej dostarczenia, np. zastosowanego wektora, niektóre strategie mogą działać przy jednorazowym podaniu, a inne wymagać regularnego podawania farmaceutyków pacjentom [5,33].

Wśród przyczynowych strategii terapeutycznych możemy wyróżnić allelo-selektywne oraz nieallelo-selektywne [33]. Terapia nieselektywna zakłada obniżenie ekspresji zarówno prawidłowego jak i nieprawidłowego allelu. Działanie selektywne dotyczy natomiast regulacji ekspresji tylko patologicznego allelu genu. W przypadku HD pozwoliłoby to na zachowanie poziomu prawidłowego allelu *HTT*, co wydaje się ważne z uwagi na dość liczne funkcje huntingtyny. W 2017 roku ukazały się wyniki wskazujące, że całkowite obniżenie poziomu prawidłowej huntingtyny przez 9 miesięcy u myszy prowadzi do wystąpienia objawów neurologicznych [34]. Autorzy wskazują także na pojawiającą się atrofię mózgu, szeroką odpowiedź immunologiczną, zaburzenia gospodarki żelazowej oraz zwiększonego wapnienia wzgórza [34]. Brak jest jednoznacznych danych dla ludzi, ale z dostępnych obecnie publikacji wydaje się że obniżenie poziomu całkowitego białka do 50% powinno być

tolerowane przez pacjentów, choć strategia allelo-selektywna jest uważana za bezpieczniejszą [35,36]. Opracowanie strategii allelo-selektywnej jest jednak trudniejsze i wymaga zaprojektowania cząsteczek na regiony genu lub transkryptu różnicujące dwa allele, tj. regiony zawierające różne warianty polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*) lub bezpośrednio region mutacji, czyli wydłużonych ciągów powtórzeń CAG.

Jednym z głównych wyzwań jakie stoją przed strategiami zmierzającymi do wyciszenia zmutowanego genu *HTT* jest uzyskanie wysokiej specyficzności działania, bez tzw. efektów *off-target*. Ogólna definicja efektów *off-target* to działanie terapeutycznej cząsteczki poprzez wiązanie się w niezamierzonym miejscu w genomie lub transkryptomie, które może prowadzić do zmiany w ekspresji wielu genów. Kolejnym wyzwaniem jest skuteczne dostarczenie cząsteczek do komórek mózgu, w których dochodzi do kluczowych procesów patogennych. W związku z barierą krew-mózg przenikanie cząsteczek jest utrudnione, stąd stosowana jest często w badaniach na modelach gryzoni bezpośrednia iniekcja potencjalnych terapeutyków do mózgu. Opracowywane są także podejścia z wykorzystaniem specjalnych nośników, które są w stanie przekroczyć barierę krew-mózg.

Prowadzone są obecnie próby kliniczne wybranych strategii przyczynowych (Tabela 1) [5]. Testowanie kliniczne odbywa się z reguły w kilku etapach. Faza I i II służy ocenie bezpieczeństwa testowanego środka oraz wyznaczeniu danych farmakokinetycznych. W fazie III udział bierze znacznie więcej pacjentów niż w fazach I i II. Badanie te służą potwierdzeniu stosowanych dawek, a także poznaniu możliwych efektów ubocznych stosowania preparatu.

WYKORZYSTANIE ASO

Terapia z zastosowaniem oligonukleotydów antysensowych (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*) jest obecnie w najbardziej zaawansowanej fazie testowania klinicznego spośród strategii przyczynowych dla HD [5,37]. ASO są to jednoniciowe analogii DNA o długości 16 do 22 par zasad, które są testowane w podejściach terapeutycznych od lat 70-tych ubiegłego wieku. Stąd podlegały przez długi czas optymalizacji i dużo wiadomo o ich farmakologicznych właściwościach. Ich zaletą jest odporność na działanie ego-

Tabela 1. Testowane przez firmy farmaceutyczne strategie terapeutyczne dla HD, z wykorzystaniem cząsteczek nakierowanych na mRNA huntingtyny, będące w fazie testów klinicznych lub blisko rozpoczęcia tej fazy.

Firma	Technologia/Strategia	Nazwa cząsteczki	Faza kliniczna
Ionis Pharmaceuticals / Roche	ASO / Nieallelo-selektywna	RG6042	I/II - ukończono III - planowane zakończenie w 2023
Wave Life Sciences / Takeda	ASO / Allelo-selektywna	WVE-120101 WVE-120102	I/II - planowane zakończenie w 2020
UniQure Biopharma	RNAi / Nieallelo-selektywna	AMT-130 rAAV5-miHTT	I/II - planowane zakończenie w 2022
Voyager / Sanofi-Genzyme	RNAi / Nieallelo-selektywna	VY-HTT01 AAV-shRNA	-
Spark Therapeutics	RNAi / Nieallelo-selektywna	AAV-shRNA	-

nukleaz, w dużej mierze spowodowana obecnością modyfikacji chemicznych, obecnie najnowszej generacji, zapewniających jednocześnie wysoką skuteczność działania, jak i brak efektów ubocznych związanych z ich metabolizmem [38,39]. Dzięki zasadzie komplementarności zasad, ASO łączy się z pre-mRNA w jądrze komórkowym. Po rozpoznaniu kompleksu RNA-DNA transkrypt jest przecinany przez RNazę H1 i następnie degradowany [1,5,33,37]. Istnieją także inne mechanizmy działania ASO takie jak przyłączanie się do miejsca rozpoczęcia translacji i przez to zaburzanie pracy rybosomów, a także oddziaływanie w regionach granic egzon/intron przez co ASO może wpływać na przebieg procesu splicingu [5,39]. Jako potencjalne terapeutyki dla chorób neurodegeneracyjnych ASO bardzo dobrze dystrybuują się w obrębie płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF, ang. *cerebrospinal fluid*) [33,39].

W potencjalnej terapii HD ASO były wykorzystywane zarówno w podejściu allelo-selektywnym, jak i nieallelo-selektywnym wyciszania ekspresji *HTT* [5,33]. Eksperymenty na mysich modelach HD wykazały m.in. że dzięki użyciu ASO możliwe jest zatrzymanie progresji schorzenia, a dodatkowo pojawia się szansa na poprawę funkcjonowania układu nerwowego [38]. Dodatkowo wykazano, że obniżenie całkowitego poziomu huntingtyny jest dobrze tolerowane przez myszy przez cały czas badania, tj. 3 miesiące [38]. Po próbach przedklinicznych terapia ASO przeszła w fazę badań z udziałem pacjentów. Wśród nich najbardziej zaawansowane prace toczą się nad terapią nieselektywną rozwijaną przez firmy IONIS Pharmaceuticals i Roche (Tabela 1). Preparat IONIS-HTT_{rx} jest oligonukleotydem złożonym z 20 par zasad, które poddane są różnym modyfikacjom chemicznym [40]. Jest on dostarczany pacjentom do wnętrza kanału kręgowego. W czerwcu 2019 ukazała się analiza wyników fazy I/II badania klinicznego preparatu HTT_{rx} z udziałem pacjentów. W próbie uczestniczyli pacjenci w stadium pierwszym choroby określonym za pomocą testu UHDRS [40]. Badanie wykazało że najmniejsza oznaczalna dawka terapeutyku wyniosła 30 mg, z kolei największą redukcję zmutowanego białka o 63% zanotowano przy użyciu dawki 120 mg [40]. Każdy z pacjentów otrzymywał preparat co 4 tygodnie, łącznie 4 dawki. Interesujące są także wnioski dotyczące efektów ubocznych terapii, które zostały wykryte u 98 % pacjentów, jednak były one głównie związane z inwazyjną procedurą podania leku (m.in. popuncyjne bóle głowy) [40].

Jak wskazano wcześniej, prowadzone są także prace nad terapią allelo-selektywną z użyciem technologii ASO [33]. Jest ona oparta głównie na selektywności względem konkretnych wariantów SNP. Dla zmutowanego allelu *HTT* istnieją dosyć konserwatywne SNP, przez co szacuje się, że przy nakierowaniu ASO na kilka najczęściej występujących wariantów SNP, możliwe byłoby zastosowanie strategii dla nawet 80% pacjentów [1,28,33,39]. Technologia ta jest obecnie rozwijana przez firmę Wave Biosciences, która rozpoczęła już jej testy kliniczne (Tabela 1) [39]. Kolejną modyfikacją ASO skupiającą się na terapii selektywnej jest wykorzystanie oligomerów PMO (ang. *phosphorodiamidate morpholino oligomers*). Są to specjalnie zmodyfikowane oligonukleotydy charakteryzujące się brakiem ładunku elektrycznego, znakomitą stabilnością i rozpuszczalnością. Ich mechanizm działania nie jest także zależny od aktywności

RNazy H [26]. W badaniach przedklinicznych PMO wykazały skuteczność w obniżaniu poziomu huntingtyny w dwóch liniach mysich modeli HD [26]. Na tą chwilę nie ma informacji na temat dalszego rozwijania tej strategii. Ciekawym wariantem ASO wydaje się być także skoniugowanie oligonukleotydu z peptydem, co mogłoby pozwolić na dostarczenie terapeutyku do mózgu poprzez dożylnie podawanie. W tej technice używa się tzw. białek internalizujących, będących modyfikacjami chemicznymi oryginalnego peptydu R6-Penetratyny pochodzącego z muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) [33,39].

Co istotne, na rynku obecne są już leki w postaci ASO dla innych schorzeń, m.in. Nusinersen przeznaczony do leczenia rdzeniowego zaniku mięśni (SMA, ang. *spinal muscular atrophy*) [5,28]. Inne preparaty z tej grupy obejmują Fomivirsen stosowany przy cytomegalowirusowym zapaleniu siatkówki, Mipomersen do leczenia rodzinnej hipercholesterolemii oraz Eteplirsen stosowany do leczenia dystrofii mięśniowej Duchenne'a [5,28,39]. W toku są także zaawansowane prace nad terapią stwardnienia zanikowego bocznego (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) z wykorzystaniem ASO [5,38].

TECHNOLOGIA RNAI

Technologia RNAi obejmuje użycie krótkich interferujących RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) lub mikroRNA (miRNA). Mechanizm RNAi polega na przyłączeniu się oligonukleotydu RNA do dojrzałego transkryptu mRNA, wraz z białkiem z grupy Argonaute wchodzącego w skład kompleksu wyciszającego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) [1,33]. Inicjowany mechanizm zahamowania ekspresji genu zależy od rodzaju indukującej cząsteczki: siRNA są w pełni komplementarne do mRNA i indukują przecinanie transkryptu przez RNazę AGO2, natomiast sekwencja miRNA nie jest całkowicie komplementarna do sekwencji mRNA i aktywowane są inne mechanizmy prowadzące do zahamowania translacji i degradacji transkryptu [41].

Tak samo jak w przypadku ASO, brak jest możliwości przekroczenia bariery krew-mózg przez terapeutyczne oligonukleotydy siRNA oraz w przeciwieństwie do ASO brak jest wystarczającej ich dystrybucji w obrębie CSF [5,42]. W związku z tym rozwijane są różnorodne podejścia mające na celu bezpieczne i efektywne dostarczenie tych potencjalnych leków do neuronów. W przypadku oligonukleotydów RNA działających w technologii RNAi możliwe jest dostarczenie ich w wektorze ekspresyjnym, co zapewnia stałe „produkowanie” cząsteczki terapeutycznej. Obecnie najbardziej zaawansowane prace toczą się nad wykorzystaniem wektora adenowirusowego (AAV) [42,43]. Przykładowe badania ukazały się w 2014 przeprowadzone na mysim modelu HD YAC 128 charakteryzującym się szybko postępującym fenotypem choroby [37]. W rezultacie przeprowadzonego eksperymentu po iniekcji miRNA-AAV do prądkowia uzyskano transdukcję ponad 80% komórek mózgu przy obniżeniu całkowitej ilości huntingtyny o 40%, co skutkowało znaczną poprawą fenotypu gryzoni [37]. W kolejnych badaniach przedklinicznych przeprowadzonych przez firmę UniQure na transgenicznym mini świni, będącej modelem HD, uzyskano szeroką ekspresję miRNA-AAV w mózgu, a także znaczące obniżenie poziomu patologicznego

transkryptu oraz białka [43]. W tej metodzie konieczne staje się podanie środka bezpośredniego poprzez iniekcję do prądkowia [42,43]. Technologia firmy UniQure jest strategią nieselektywną, co może być problematyczne w przypadku konieczności nagłego zakończenia terapii prowadzącej do wyciszenia również normalnej huntingtyny, kiedy na stałe został dostarczony do komórek mózgu wektor [13,28]. Testy kliniczne z udziałem pacjentów rozpoczęły się w 2019 roku [5]. Oprócz podania leku bezpośrednio do prądkowania, bada się także możliwość dostarczenia cząsteczki poprzez podanie dożylnie lub dordzeniowe [42]. W przypadku podania systemowego planuje się wykorzystanie AAV9, który jako jedyny rodzaj adenowirusa ma możliwość przekroczenia bariery krew-mózg [42]. Innymi rozwijanymi metodami przenoszenia leków opartych na RNAi są m. in. wektory lentiwirusowe (LV). Wirus ten, w przeciwieństwie do AAV, który pozostaje w formie episomu, integruje się z genomem gospodarza, co skutkuje jednak większym ryzykiem wbudowania się konstruktów w niepożądane miejsce [5,42]. Problemem w przypadku terapii z wykorzystaniem wirusów i RNAi staje się możliwa odpowiedź immunologiczna organizmu biorcy na antygeny wirusowe oraz podwójnie niciowe RNA wykorzystywane przy projektowaniu siRNA [5,42].

Testowane są także możliwości użycia siRNA nacelowanego na transkrypt *HTT* w formie skoniugowanej z cholesterolami lub liposomami [5]. Również opracowano wzór modyfikacji chemicznych, który pozwala na użycie siRNA w formie jednej nici i który dystrybuuje się w CSF w takim samym stopniu jak ASO [13,33]. Ciekawą modyfikacją siRNA jest wykorzystanie di-siRNA (ang. *divalent siRNA*). Są to syntetyzowane chemicznie asymetryczne siRNA zbudowane z dwóch dupleksów, które połączone są kowalencyjnie przez końce 3' nici przy pomocy łącznika glikolu etylenowego [44]. W badaniach przedklinicznych przeprowadzonych na myszach i naczelnych uzyskano znaczące nieallelo-selektywne wyciszenie ekspresji *HTT*, utrzymujące się przez 6 miesięcy od podania di-siRNA. Preparat jest także dobrze tolerowany przez zwierzęta laboratoryjne [44].

Jednym z obiecujących podejść allelo-selektywnej terapii dla HD z wykorzystaniem RNAi jest bezpośrednie celowanie z użyciem oligonukleotydów w miejsce mutacji, tj. wydłużonego ciągu powtórzeń CAG. Pierwsze przesłanki do zastosowania takiego podejścia wynikały z badań nad aktywnością rybonukleazy Dicer względem transkryptów tworzących strukturę spinki do włosów w regionach wydłużonych ciągów powtórzeń CAG i CUG [45]. Powstające siRNA, złożone z sekwencji powtórzonych, zidentyfikowano później także w mózgu pacjentów HD [46]. W celu osiągnięcia efektywnego i specyficznego wyciszenia zmutowanego allelu konieczne było jednak zaprojektowanie nietypowych cząsteczek siRNA, w pewnych aspektach podobnych do miRNA [47–49]. Zawierają one specyficzne substytucje nukleotydów, powodujące występowanie niekanonicznych par zasad w oddziaływaniu z ciągiem powtórzeń CAG. Testowanie tych siRNA w modelach komórkowych HD prowadziło do aktywacji mechanizmu wyciszenia preferencyjnie dla allelu zmutowanego, z racji związania wielu kompleksów RISC do wydłużonego ciągu powtórzeń. Dodatkowo ta strategia jest skuteczna także dla innych chorób poliQ [50–52].

TECHNOLOGIA CRISPR-Cas9

Szeroko badaną obecnie terapią nakierowaną na DNA jest wykorzystanie technologii CRISPR-Cas9. Jest to rodzaj pierwotnego systemu immunologicznego spotykanego u niektórych gatunków bakterii do walki z ponownymi zakażeniami powodowanymi przez bakteriofagi. System technologii CRISPR-Cas9 składa się z białka zawierającego domeny nukleazowe zostawiające tzw. tępe końce oraz syntetycznego sgRNA (ang. *single guide RNA*), które naprowadza białko Cas9 na odpowiednią sekwencję w DNA. Rozpoznanie sekwencji przez sgRNA jest zależne od obecności elementu PAM (ang. *protospacer adjacent motif*), który stanowi ciąg 3 kolejnych nukleotydów. Badania przedkliniczne sugerują zwiększoną efektywność wprowadzenia zmian w DNA, w skutek jego przecięcia przez system CRISPR-Cas9, poprzez mechanizm niehomologicznego łączenia końców (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*) [53]. Przy pomocy tej technologii można wpłynąć na transkrypcję *HTT* na wiele sposobów począwszy od wycięcia powtórzeń CAG czy poprzez przesunięcie ramki odczytu i wystąpienie w ten sposób przedwczesnych kodonów stop [33,54,55]. W badaniach *in vitro* na liniach komórkowych wykazano obniżenie poziomu zmutowanej huntingtyny [53], co następnie potwierdzono na modelu mysim HD, w którym wyłączenie ekspresji zmutowanego białka skutkowało polepszeniem się fenotypu gryzoni [56]. Kompleksy sgRNA/Cas9 ze względu na swoją wielkość wymagają transportu do komórek przy pomocy wektorów. Obecnie najczęściej wykorzystuje się wektor wirusowy AAV, którego ekspresja wraz z odpowiednim konstruktą prowadziła do obniżenia poziomu huntingtyny o 40% [56,57]. Wykazano także możliwość allelo-selektywnego wyłączenia ekspresji huntingtyny poprzez wykorzystanie specyficznych wariantów SNP znajdujących się w elementach PAM połączonego z nakierowaniem na intron 1 genu *HTT* [57].

Oprócz standardowego systemu Cas9 istnieją także jego różne modyfikacje, w tym system dCas9 (ang. *deactivated Cas9*), w którym białko zostaje pozbawione swoich dwóch domen nukleazowych i może pełnić funkcję np. wzmacniacza ekspresji poprzez dostarczanie reszt acetylowych do danego fragmentu DNA [54]. Inną ciekawą modyfikacją jest system Cas9n, w którym jedną z domen nukleazowych zastąpiono domeną nikazową co powoduje powstanie pojedynczego cięcia w DNA i naprawę uszkodzonej nici poprzez rekombinację homologiczną. Skutkuje to znaczenie większą specyficnością oraz mniejszym ryzykiem efektów ubocznych w porównaniu do zwykłego Cas9. W badaniach z użyciem linii fibroblastów pochodzących od pacjentów z HD wykazano efektywne i selektywne wycięcie fragmentu powtórzeń CAG z egzonu 1, co spowodowało zmniejszenie poziomu huntingtyny o 70% [55].

Wykorzystanie tej technologii wydaje się mieć dużą przyszłość w leczeniu HD. Pomimo swoich niewątpliwych zalet, pojawiają się jednak także obawy związane z użyciem CRISPR-Cas9. Obecnie nie ma jeszcze wystarczająco danych, żeby stwierdzić że technologia ta nie wywoła znaczącego efektu *off-target*. W przypadku systemu CRISPR-Cas9 efekty te mogą być związane z przyłączaniem się sgRNA do motywów PAM znajdujących się w innych miejscach w genomie niż na celowanym genie *HTT*. Istotnym zagrożeniem wydaje się też być możliwe wywołanie odpowiedzi immunologicznej prze-

ciwko ulegającemu stałej ekspresji bakteryjnemu białku Cas9 [5].

INNE MOŻLIWOŚCI TERAPII

Interesującym tematem prac naukowców stało się wykorzystanie w terapii białek zawierających motywy palców cynkowych i połączonych z domeną represyjną transkrypcji KRAB (ZFP-TF, ang. *zinc finger protein transcription factors*), które wiążą się do wydłużonego ciągu CAG w DNA [58]. Eksperymenty na modelach mysich wykazały niezwykle skuteczne, prawie całkowite, wyciszenie ekspresji wadliwego allelu *HTT*, przy niemal pełnym zachowaniu poziomu prawidłowej huntingtyny [58]. Dodatkowo wskazuje się na możliwe działanie neuroprotektoryjne tego preparatu [58].

Proponowane jest także wykorzystanie nadekspresji białka NUB1, które oddziałuje z huntingtiną. Wykazano, że duże ilości tego białka znacząco obniżają poziom zmutowanego białka i zapobiegają tworzeniu agregatów wewnątrzkomórkowych. NUB1 wzmacnia usuwanie zmutowanej huntingtyny poprzez ułatwianie jej poliubikwitynacji, co pozwala z większą efektywnością usuwać ją poprzez proteasomy [59].

Obecnie toczą się prace nad wieloma innymi strategiami terapeutycznymi, niezwiązanymi *stricto* z obniżeniem poziomu patologicznego białka. Badane są także możliwości użycia leków immunomodulujących takich jak Laquinimod, który pierwotnie został stworzony dla pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Badania przedkliniczne na gryzoniach wykazały złagodzenie objawów, a także polepszenie stanu istoty białej mózgu [31,60,61]. W próbie klinicznej z udziałem chorych związek ten wykazał korzystne działanie terapeutyczne, które wymaga jednak dalszych pogłębionych analiz [28]. Inną możliwością staje się wykorzystanie Mematyny oddziałującej na receptory NMDA, których silne pobudzenie jak się wskazuje przyczynia się do postępowania neurodegeneracji [35]. Preparat ten selektywnie moduluje ich działanie, co z kolei przyczynia się do polepszenia fenotypu pacjenta. Obecnie toczą się próby kliniczne z jej wykorzystaniem [28]. Możliwe jest także wykorzystanie naturalnych izoflawonoidów, takich jak genisteina, której mechanizm działania polega na stymulowaniu autofagocytozy. Opisano skuteczne działanie genisteiny w modelach HD, a potencjalnie także dla innych chorób neurodegeneracyjnych [62–65].

W związku z prawdopodobną dużą rolą huntingtyny w procesie uwalniania cytokin prozapalnych z makrofagów, które mają możliwość przekraczania bariery krew-mózg i zaognienia objawów, proponuje się wykonywanie u pacjentów przeszczepów szpiku [66,67]. Wykorzystanie tej metody w modelu mysim spowodowało unormowanie się zawartości cytokin oraz zwiększenie gęstości neuronów w prążkowie zwierząt [66].

BIOMARKERY W TERAPII HD

Dla testowanych strategii kluczowe jest także opracowanie metod monitorowania skuteczności terapii u pacjentów, m.in. efektywności obniżania ekspresji zmutowanego genu oraz pożądanego zahamowania zmian patologicznych. W tym celu opracowywane są tzw. biomarkery, tj. proponowa-

ne są miarodajne, możliwie nieinwazyjne, testy molekularne oraz analizy związane z obrazowaniem mózgu. Najwięcej danych wskazuje obecnie na możliwość zastosowania testów opartych na pomiarach huntingtyny w CSF [68]. Proponuje się także badanie poziomu lekkiego białka neurofilamentu (NFL, ang. *neurofilament light protein*). Jego poziom koreluje z postępowaniem atrofii mózgu oraz nabywaniem kolejnych dysfunkcji neurologicznych. Poziom NFL w krwi prawdopodobnie jest zbliżony do stężenia NFL w CSF [69]. Test ten wymaga dalszych prac nad potwierdzeniem jego skuteczności.

Ciekawym rozwiązaniem wydają się także zastosowanie nowoczesnych metod obrazowania takich jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET, ang. *positron emission tomography*) czy rezonans magnetyczny (MRI, ang. *magnetic resonance imaging*). Szczególnie użyteczne jest badanie PET, które wykazało zmiany w gęstości receptorów dopaminergicznych D1 i D2 u pacjentów z HD [70,71]. Dowiedziono że aż u 55% osób posiadających wariant pośredni liczby powtórzeń, jest obecny spadek ilości receptorów D2 w płacie czołowej i skroniowym, co ma także miejsce u osób chorych [72].

PODSUMOWANIE

Gen odpowiedzialny za HD zidentyfikowano w 1993 roku, a od 2005 roku intensywnie były prowadzone badania dla testowania przedklinicznego strategii leczenia przyczynowego. Początkowo do hamowania ekspresji genu *HTT* stosowano głównie, nowo wtedy opracowane, cząsteczki działające na drodze RNAi, a po pewnym czasie powrócono także do wykorzystywania nieco zapomnianych ASO. Prace naukowców doprowadziły do dużego sukcesu w 2018 roku, czyli 25 lat od zidentyfikowania genu *HTT*, kiedy to uzyskano po raz pierwszy obniżenie poziomu huntingtyny u pacjentów z HD. W ostatnim czasie natomiast dużym zainteresowaniem cieszy się nowa technologia CRISPR-Cas9, dla której jednak musi być zgromadzone więcej danych w kontekście terapeutycznego wykorzystania.

Pomimo ogromnego postępu w badaniach podstawowych i rozpoczęciu badań klinicznych, pojawia się także coraz więcej zagadnień wymagających wyjaśnienia. Jedną z tych kwestii jest definitywne określenie znaczenia normalnej huntingtyny w funkcjonowaniu CUN i, co za tym idzie, stwierdzenie czy jej poziom może być także obniżany i do jakiego stopnia w terapii HD.

Terapia prócz nakierowania na kluczową patologię zlokalizowaną w OUN, najprawdopodobniej powinna także obejmować leczenie objawów choroby zlokalizowanych poza nim. Objawy obwodowe obejmują m.in. zmniejszoną siłę mięśniową, zaburzoną liczbę krążących we krwi cytokin prozapalnych, zaburzenia funkcjonowania wątrobowych mitochondriów czy nieprawidłowości w procesie metabolizmu tryptofanu [66]. Leczenie tych objawów nie tylko poprawi komfort pacjenta lecz także zapobiegnie zaostrzeniu się objawów w OUN [66].

Ostatnie lata pokazały niespotykaną wcześniej skalę rozwoju możliwości terapeutycznych. Z każdym miesiącem publikowane są prace pokazujące nowe podejścia do leczenia, zakończone próby kliniczne, badania przedkliniczne.

Na szczególną uwagę wśród strategii wyciszania ekspresji *HTT* zasługują opisane dwa programy z wykorzystaniem ASO, znajdujące się w fazie badań klinicznych. Wydaje się, że w związku z tym stworzenie skutecznego leczenia HD jest tylko kwestią czasu.

PIŚMIENNICTWO

1. Fiszer A, Krzyzosiak WJ (2014) Oligonucleotide-based strategies to combat polyglutamine diseases. *Nucleic Acids Res* 42: 6787–810
2. MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, et al. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971–83
3. Frederic S, Sandrine H (2016) The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89: 910–26
4. Guo Q, Huang B, Cheng J, Seefelder M, Engler T, Pfeifer G, et al. (2018) The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature* 555: 117–20
5. Tabrizi SJ, Ghosh R, Leavitt BR (2019) Huntingtin Lowering Strategies for Disease Modification in Huntington's Disease. *Neuron* 101: 801–19
6. Bates GP, Dorsey ER, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, et al. (2015) Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* 1: 1–21
7. Wiatr K, Szlachcic WJ, Trzeciak M, Figlerowicz M, Figiel M (2018) Huntington's Disease as a Neurodevelopmental Disorder and Early Signs of the Disease in Stem Cells. *Mol Neurobiol* 55: 3351–71
8. Nasir J, Floresco SB, Kusky JRO, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, et al. (1995) Targeted Disruption of the Huntington's Disease Gene Results in Embryonic Lethality and Behavioral and Morphological Changes in Heterozygotes. *Cell* 81: 811–23
9. Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26: 300–6
10. Caterino M, Squillaro T, Montesarchio D, Giordano A, Giancola C, Melone MAB (2018) Huntingtin protein: A new option for fixing the Huntington's disease countdown clock. *Neuropharmacology* 135: 126–38
11. Quigley J (2017) Juvenile Huntington's Disease: Diagnostic and Treatment Considerations for the Psychiatrist. *Curr Psychiatry Rep* 19: 17–20
12. Kumar V, Abbas AK, Aster JC (2014) *Patologia Robbins*. Edra Urban & Partner
13. Aronin N, DiFiglia M (2014) Huntingtin-lowering strategies in Huntington's disease: Antisense oligonucleotides, small RNAs, and gene editing. *Mov Disord* 29: 1455–61
14. Lee JM, Wheeler VC, Chao MJ, Vonsattel JPG, Pinto RM, Lucente D, et al. (2015) Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell* 162: 516–26
15. Wetzel R (2012) Physical chemistry of polyglutamine: Intriguing tales of a monotonous sequence. *J Mol Biol* 421: 466–90
16. Jayaraman M, Mishra R, Kodali R, Thakur AK, Koharudin LMI, Gronenborn AM, et al. (2012) Kinetically competing huntingtin aggregation pathways control amyloid polymorphism and properties. *Biochemistry* 51: 2706–16
17. Karachitos A, Galgańska H, Kmita H (2010) The role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *Postepy Biochem* 56: 174–81
18. Ross CA, Tabrizi SJ (2011) Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10: 83–98
19. Wojciechowska M, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Jazurek M, Krzyzosiak WJ (2014) RAN translation and frameshifting as translational challenges at simple repeats of human neurodegenerative disorders. *Nucleic Acids Res* 42: 11849–64
20. Krzyzosiak WJ, Sobczak K, Wojciechowska M, Fiszer A, Mykowska A, Kozłowski P (2012) Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target. *Nucleic Acids Res* 40: 11–26
21. Martí E (2016) RNA toxicity induced by expanded CAG repeats in Huntington's disease. *Brain Pathol* 26: 779–786
22. Neueder A, Landles C, Ghosh R, Howland D, Myers RH, Faull RLM, et al. (2017) The pathogenic exon 1 HTT protein is produced by incomplete splicing in Huntington's disease patients. *Sci Rep* 7: 1–10
23. Neueder A, Bates GP (2018) RNA related pathology in Huntington's disease. *Adv Exp Med Biol* 1049: 85–101
24. Joung PH, Young PA, Tolbert DL (2016) *Neuroanatomia Kliniczna*. Edra Urban & Partners
25. Krobitch S, Kazantsev AG (2011) Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 20–4
26. Sun X, Marque LO, Cordner Z, Pruitt JL, Bhat M, Li PP, et al. (2014) Phosphorodiamidate morpholino oligomers suppress mutant huntingtin expression and attenuate neurotoxicity. *Neuron* 82: 6302–17
27. Schobel SA, Palermo G, Auinger P, Long JD, Ma S, Khwaja OS, et al. (2017) Motor, cognitive, and functional declines contribute to a single progressive factor in early HD. *Neurology* 89: 2495–502
28. Caron NS, Dorsey ER, Hayden MR (2018) Therapeutic approaches to huntington disease: From the bench to the clinic. *Nat Rev Drug Discov* 17: 729–50
29. Sławek J, Sołtan W, Sitek EJ (2013) Choroba Huntingtona – w 20. rocznicę odkrycia genu IT15; patogeneza, diagnostyka i leczenie. *Pol Przegląd Neurol* 9: 85–95
30. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJW, et al. (2016) The prevalence of Huntington's disease. *Neuroepidemiology* 46: 144–53
31. Frank S, Testa CM, Stamler D, Kayson E, Davis C, Edmondson MC, et al. (2016) Effect of deutetrabenazine on chorea among patients with huntington disease: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 316: 40–50
32. Li Z, Wang C, Wang Z, Zhu C, Li J, Sha T, et al. (2019) Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds. *Nature* 575: 203–9
33. Wild EJ, Tabrizi SJ (2017) Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 16: 837–47
34. Dietrich P, Johnson IM, Alli S, Dragatsis I (2017) Elimination of huntingtin in the adult mouse leads to progressive behavioral deficits, bilateral thalamic calcification, and altered brain iron homeostasis. *PLoS Genet* 13: 1–29
35. Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD, et al. (2010) Early Increase in Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling and Expression Contributes to Phenotype Onset in Huntington's Disease Mice. *Neuron* 65: 178–90
36. Grondin R, Kaytor MD, Ai Y, Nelson PT, Thakker DR, Heisel J, et al. (2012) Six-month partial suppression of Huntingtin is well tolerated in the adult rhesus striatum. *J Neurosci* 32: 1197–209
37. Stanek LM, Sardi SP, Mastis B, Richards AR, Treleaven CM, Taksir T, et al. (2014) Silencing mutant huntingtin by adeno-associated virus-mediated RNA interference ameliorates disease manifestations in the YAC128 mouse model of Huntington's Disease. *Hum Gene Ther* 25: 461–74
38. Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz E V., Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, et al. (2012) Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* 74: 1031–44
39. Rinaldi C, Wood MJA (2017) Antisense oligonucleotides: the next disorders. *Nat Publ Gr*.
40. Tabrizi SJ, Leavitt BR, Landwehrmeyer GB, Wild EJ, Saft C, Barker RA, et al. (2019) Targeting huntingtin expression in patients with Huntington's disease. *N Engl J Med* 380: 2307–16
41. Stroynowska-Czerwinska A, Fiszer A, Krzyzosiak WJ (2014) The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 71: 2253–70
42. Krol J, Fiszer A, Mykowska A, Sobczak K, de Mezer M, Krzyzosiak WJ (2007) Ribonuclease Dicer Cleaves Triplet Repeat Hairpins into Shorter Repeats that Silence Specific Targets. *Mol Cell* 25: 575–86

43. Miniarikova J, Evers MM, Konstantinova P (2018) Translation of MicroRNA-Based Huntingtin-Lowering Therapies from Preclinical Studies to the Clinic. *Mol Ther* 26: 947–62
44. Evers MM, Miniarikova J, Juhas S, Vallès A, Bohuslavova B, Juhasova J, et al. (2018) AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model. *Mol Ther* 26: 2163–77
45. Alterman JF, Godinho BMDC, Hassler MR, Ferguson CM, Echeverria D, Sapp E, et al. (2019) A divalent siRNA chemical scaffold for potent and sustained modulation of gene expression throughout the central nervous system. *Nat Biotechnol* 37: 884–94
46. Bañez-Coronel M, Porta S, Kagerbauer B, Mateu-Huertas E, Pantano L, Ferrer I, et al. (2012) A pathogenic mechanism in Huntington's disease involves small CAG-repeated RNAs with neurotoxic activity. *PLoS Genet* 8: e1002481
47. Hu J, Liu J, Corey DR (2010) Allele-selective inhibition of huntingtin expression by switching to an miRNA-like RNAi mechanism. *Chem Biol* 17: 1183–8
48. Fiszer A, Mykowska A, Krzyzosiak WJ (2011) Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats. *Nucleic Acids Res* 39: 5578–85
49. Fiszer A, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Mykowska A, Krzyzosiak WJ (2013) Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Nucleic Acids Res* 41: 10426–37
50. Fiszer A, Ellison-Klimontowicz ME, Krzyzosiak WJ (2016) Silencing of genes responsible for polyQ diseases using chemically modified single-stranded siRNAs. *Acta Biochim Pol* 63: 759–64
51. Fiszer A, Wroblewska JP, Nowak BM, Krzyzosiak WJ (2016) Mutant CAG repeats effectively targeted by RNA interference in SCA7 cells. *Genes (Basel)* 7: E132
52. Kotowska-Zimmer A, Ostrowska Y, Olejniczak M (2020) Universal RNAi Triggers for the Specific Inhibition of Mutant Huntingtin, Atrophin-1, Ataxin-3, and Ataxin-7 Expression. *Mol Ther - Nucleic Acids* 19: 562–71
53. Kolli N, Lu M, Maiti P, Rossignol J, Dunbar GL (2017) CRISPR-Cas9 mediated gene-silencing of the mutant huntingtin gene in an in vitro model of Huntington's disease. *Int J Mol Sci* 18: 1–14
54. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS (2016) Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 5–15
55. Dabrowska M, Juzwa W, Krzyzosiak WJ, Olejniczak M. (2018) Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by Cas9 Nickases. *Front Neurosci* 12: 1–8
56. Yang S, Li S, Li X, Yang S, Chang R, Yang H, et al. (2017) CRISPR / Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest* 127: 2719–24
57. Monteys AM, Ebanks SA, Keiser MS, Davidson BL (2017) CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Mol Ther* 25: 12–23
58. Zeitler B, Froelich S, Marlen K, Shivak DA, Yu Q, Li D, et al. (2019) Allele-selective transcriptional repression of mutant HTT for the treatment of Huntington's disease. *Nat Med* 25: 1131–42
59. Lu B, Al-Ramahi I, Valencia A, Wang Q, Berenshteyn F, Yang H, et al. (2013) Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntingtin toxicity via enhanced protein clearance. *Nat Neurosci* 16: 562–70
60. Garcia-Miralles M, Hong X, Tan LJ, Caron NS, Huang Y, To XV, et al. (2016) Laquinimod rescues striatal, cortical and white matter pathology and results in modest behavioural improvements in the YAC128 model of Huntington's disease. *Sci Rep* 6: 1–13
61. Garcia-Miralles M, Yusof NABM, Tan JY, Radulescu CI, Sidik H, Tan LJ, et al. (2019) Laquinimod Treatment Improves Myelination Deficits at the Transcriptional and Ultrastructural Levels in the YAC128 Mouse Model of Huntington Disease. *Mol Neurobiol* 56: 4464–78
62. Menze ET, Esmat A, Tadros MG, Khalifa AE, Abdel-Naim AB (2016) Genistein improves sensorimotor gating: Mechanisms related to its neuroprotective effects on the striatum. *Neuropharmacology* 105: 35–46
63. Węgrzyn G, Pierzynowska K, Podlacha M, Brokowska J, Gaffke L, Mantej J, et al. (2018) Molecular mechanisms of genistein action in the light of therapies for genetic and immunological diseases. *Postepy Biochem* 64: 262–76
64. Pierzynowska K, Gaffke L, Cyske Z, Puchalski M, Rintz E, Bartkowski M, et al. (2018) Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metab Brain Dis* 33: 989–1008
65. Pierzynowska K, Gaffke L, Cyske Z, Węgrzyn G (2019) Genistein induces degradation of mutant huntingtin in fibroblasts from Huntington's disease patients. *Metab Brain Dis* 34: 715–20
66. Carroll JB, Bates GP, Steffan J, Saft C, Tabrizi SJ (2015) Treating the whole body in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 14: 1135–42
67. Rocha NP, Ribeiro FM, Furr-Stimming E, Teixeira AL (2016) Neuroimmunology of Huntington's Disease: Revisiting Evidence from Human Studies. *Mediators Inflamm*. 2016: 8653132
68. Southwell AL, Smith SEP, Davis TR, Caron NS, Villanueva EB, Xie Y, et al. (2015) Ultrasensitive measurement of huntingtin protein in cerebrospinal fluid demonstrates increase with Huntington's disease stage and decrease following brain huntingtin suppression. *Sci Rep* 5: 1–11
69. McColgan P, Tabrizi SJ (2018) Huntington's disease: a clinical review. *Eur J Neurol* 25: 24–34
70. Niccolini F, Politis M (2014) Neuroimaging in Huntington's disease. *World J Radiol* 6: 301–13
71. Bohnen NI, Koeppe RA, Meyer P, Ficano E, Wernette K, Kilbourn MR, et al. (2000) Decreased striatal monoaminergic terminals in Huntington's disease. *Neurology* 54: 1753–60
72. Pavese N, Politis M, Tai YF, Barker RA, Tabrizi SJ, Mason SL, et al. (2010) Cortical dopamine dysfunction in symptomatic and premanifest Huntington's disease gene carriers. *Neurobiol Dis* 37: 356–61

Strategies for mutant gene expression silencing in Huntington's disease therapy

Bartosz M. Nowak, Agnieszka Fiszer✉

Department of Medical Biotechnology, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznan

✉ e-mail: agnieszka.fiszer@ibch.poznan.pl

Key words: Huntington's disease, *HTT* gene, polyglutamine diseases, therapy, antisense oligonucleotides, RNA interference, CRISPR

SUMMARY

Huntington's disease (HD) is a genetic disease caused by expanded CAG repeat tract in exon 1 of the *HTT* gene that codes for huntingtin. Since the first symptoms of the disease the average life expectancy is 15–20 years, when the symptoms resulting from neurodegeneration are progressing, there is a great demand for an effective HD treatment method. Various therapeutic strategies are being developed based on mechanisms of gene expression silencing, including DNA editing techniques. Here, we present the most important currently tested approaches, with particular emphasis on strategies based on the use of antisense oligonucleotides (ASO), RNA interference (RNAi) technology and CRISPR-Cas9. Currently ongoing clinical trials as well as different pharmacological agents are discussed.