教育部直属国家211工程重点大学
华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

A synthetic mammalian gene circuit reveals antituberculosis compounds

哺乳动物基因回路合成抗结核药物

学生姓名：刘小翠

专　　业：微生物

提纲

1. 研究背景介绍
2. 抗结核药物的发现
3. 抗结核药物的验证
4. 结果及讨论

1、背景介绍-合成生物学

- 合成生物学是指人们将“基因”连接成网络，让细胞来完成设计人员设想的各种任务。从零开始建立微生物基因组，从而分解、改变并扩展自然界在35亿年前建立的基因密码

- 目前，研究人员正在试图控制细胞的行为，研制不同的基因线路———即特别设计的、相互影响的基因。

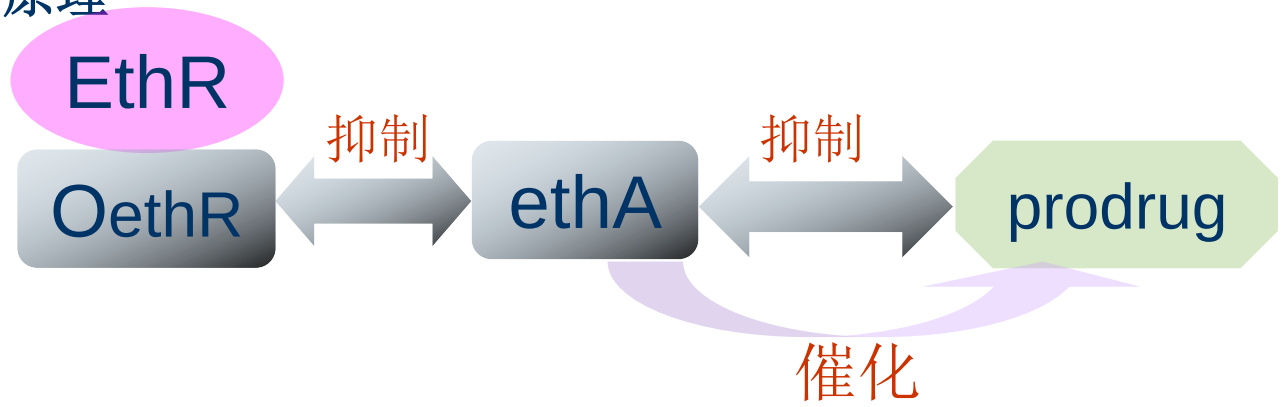
2010年，在美国文特研究所他们将*Mycoplasma capricolum*(细菌A)的细胞核消除；将*M. mycoides*(细菌B)的DNA序列解码并拷贝到电脑中。然后通过人工合成的方法（形象地说，就是用基因打印机把这个DNA序列打印出来），将细菌B的DNA重新制作出来并添加到细菌A的细胞中并激活它。世界上第一个由纯人工合成创造的细菌物种诞生了。

背景介绍-抗结核药物

- **First-line药物--异烟肼、利福平**（每年900万人感染结核病，5000万感染结核病的人对该药物有抗性）
- **Last-line药物—乙硫异烟胺**（异烟肼的类似物，但不与其产生交叉抗性）
- 疑问：有了这种前体药物，为什么还要开发抗结核药物呢？

背景介绍-抗结核药物

- 原理



•乙硫异烟胺被Baeyer–Villiger单氧酶EthA激活，转变为烟碱腺嘌呤二核苷酸，在**高剂量**下仍不能有效发挥作用。

设想

若能找到一种化合物结合到EthR上，就可以抑制它与ethA启动子的结合，从而增加多抗药性结核分枝杆菌对乙硫异烟肼的敏感性，提高治疗效果

背景介绍-抗结核药物

- 晶体结构分析: **hexadecyloctanoate** 可以抑制**EthR's operator-binding**的能力

- **EthR**抑制子的筛选原则：特异性、生物体可利用性、无细胞毒性

- 用一种新的合成生物学的方法来实现：

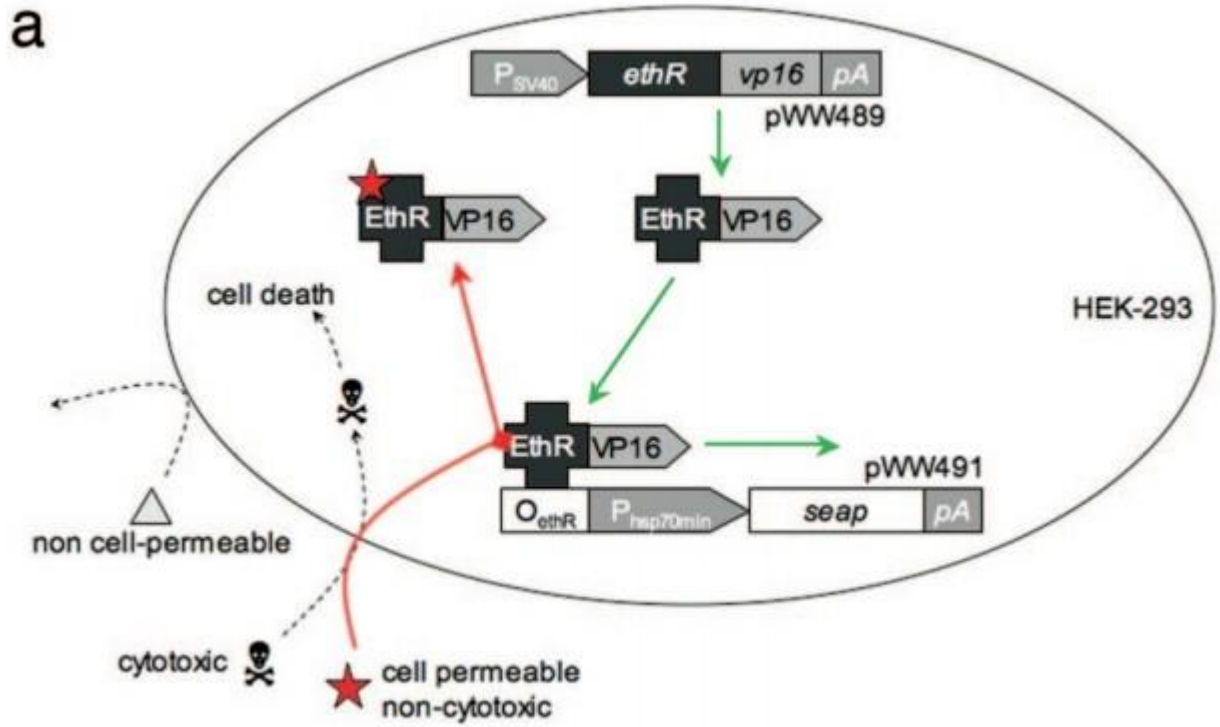
  合成哺乳动物基因回路来监测**EthR–OethR**在人细胞中的互作，并用报告基因来显示结果。

提纲

1. 研究背景介绍
2. 抗结核药物的发现
3. 抗结核药物的验证
4. 结果及讨论

2、抗结核药物的发现

- 设计以**EthR**为基础的基因回路



抗结核药物的发现

- **Hexadecyloctanoate不能成为有效的抗结核药物：高度的亲脂结构**

ErhR结合物筛选原则：
1、亲水性（强亲水性使其在血液和感染细胞中达到很好的治疗水平）
2、亲脂性（足够的亲脂性使其融入EthR的疏水通道，即结合位点）

抗结核药物的发现

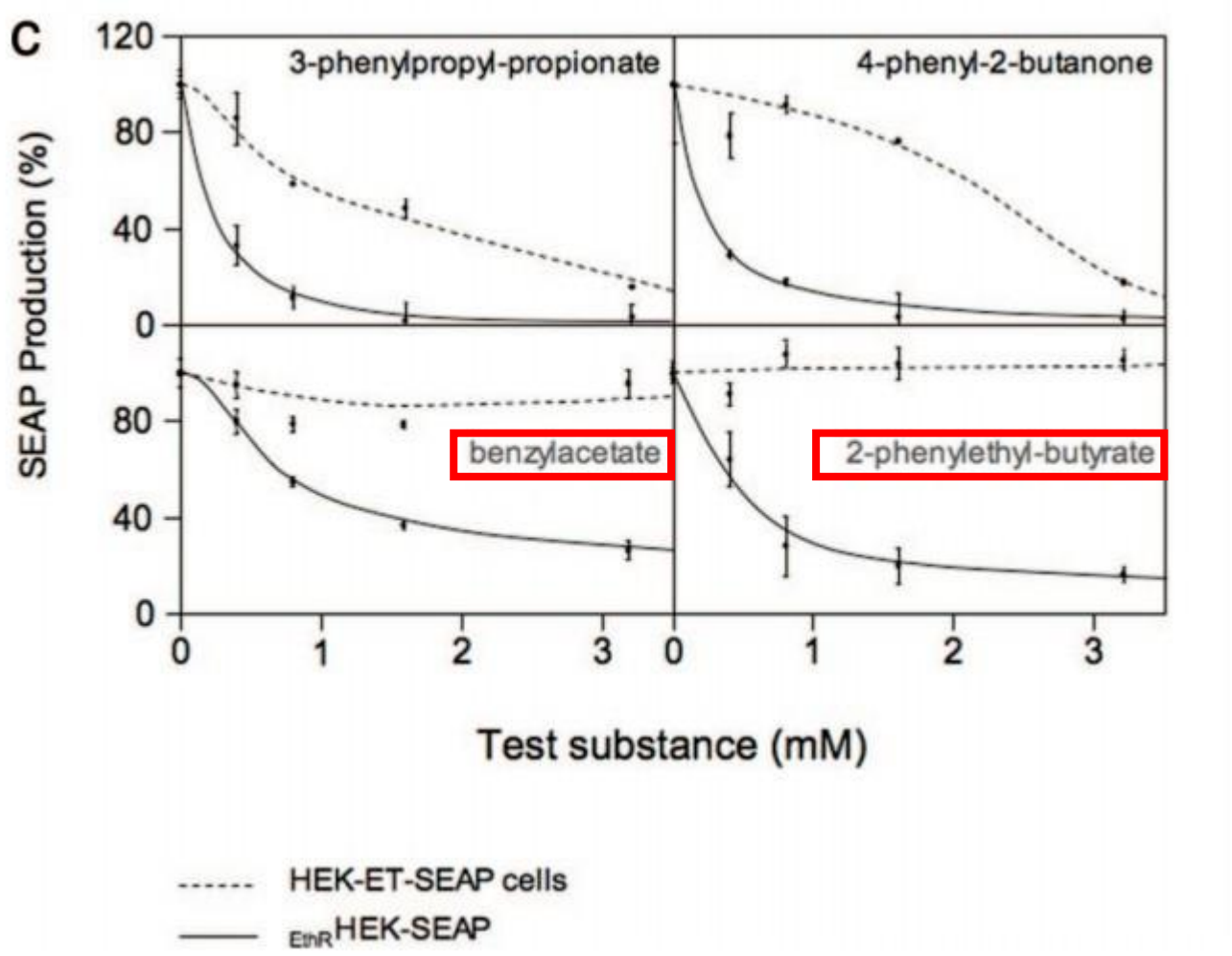
- 发现影响EthR DNA结合的物质

b

Compound	Structure	Formula	M_w	ClogP
Methyl-hexanoate		$C_7H_{14}O_2$	130.18	2.298
1-Butyl-propionate		$C_7H_{14}O_2$	130.18	2.298
1-pentyl-acetate		$C_7H_{14}O_2$	130.18	2.298
4-phenyl-2-butanone		$C_{10}H_{12}O$	148.20	1.889
Methylphenyl-acetate		$C_9H_{10}O_2$	150.17	1.820
Benzyl-acetate		$C_9H_{10}O_2$	150.17	1.960
2-phenylethyl-acetate		$C_{10}H_{12}O_2$	164.20	2.279
2-phenylethyl-propionate		$C_{11}H_{14}O_2$	178.23	2.808
2-phenylethyl-butyrate		$C_{12}H_{16}O_2$	192.25	3.337
3-phenylpropyl-propionate		$C_{12}H_{16}O_2$	192.25	3.187
2-phenylethyl-isopentanoate		$C_{13}H_{18}O_2$	206.28	3.736
Hexadecyl-octanoate		$C_{24}H_{48}O_2$	368.64	11.29

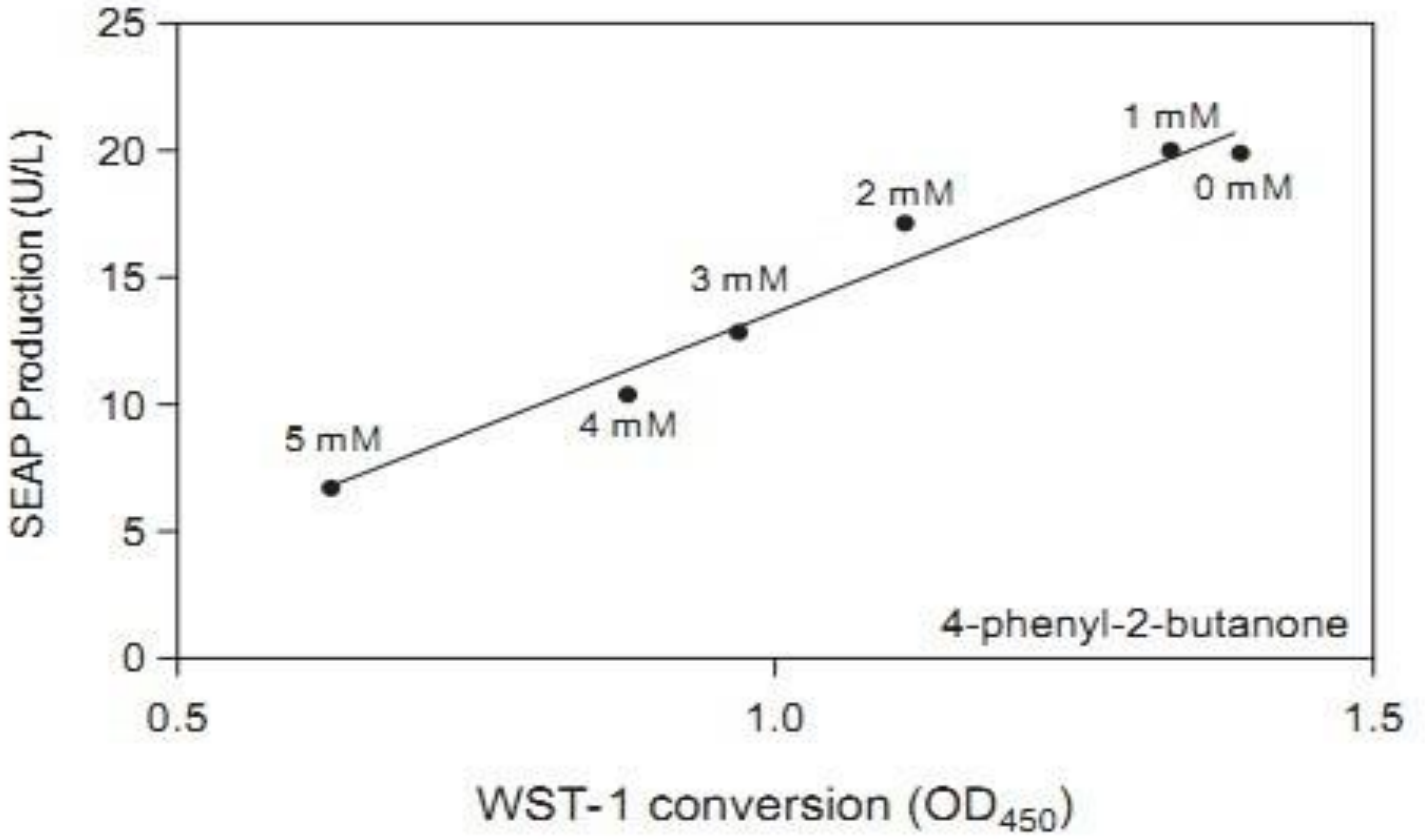
ClogP<4

抗结核药物的发现


C
120
80
40
0
3-phenylpropyl-propionate
4-phenyl-2-butanone
SEAP Production (%)
benzylacetate
2-phenylethyl-butyrate
0
1
2
3
Test substance (mM)
HEK-ET-SEAP cells
EthR HEK-SEAP

抗结核药物的发现

SEAP 产量和细胞生存能力的关系



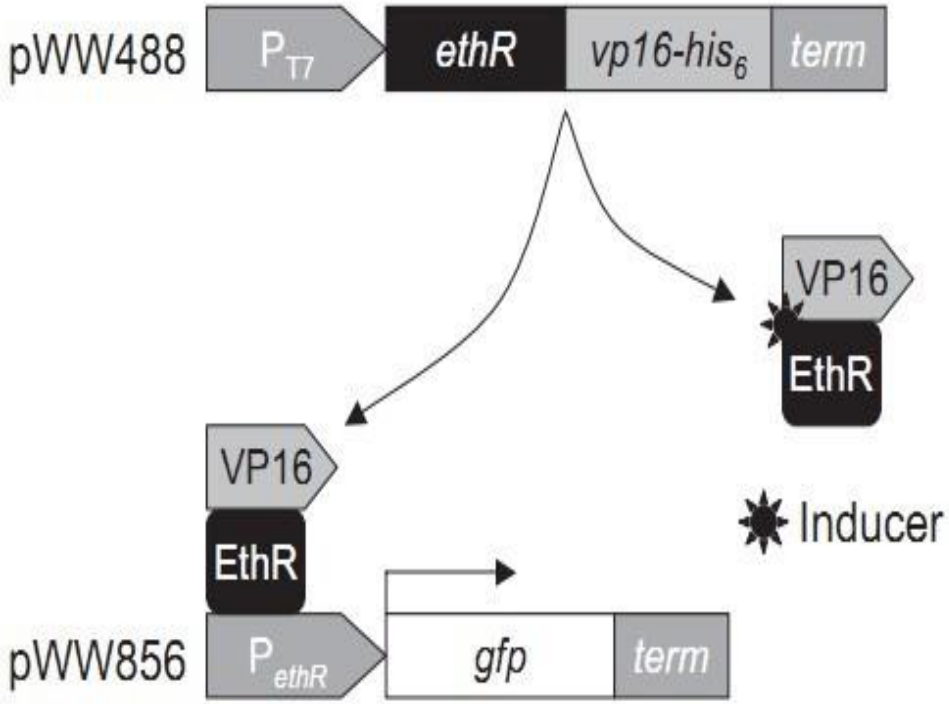
HEK-ET-SEAP cells [HEK-293 engineered with pWW35 (PSV40-E-vp16-pA) and pWW37 (ETR-PhCMVmin-seap-pA)] for constitutive SEAP expression

提纲

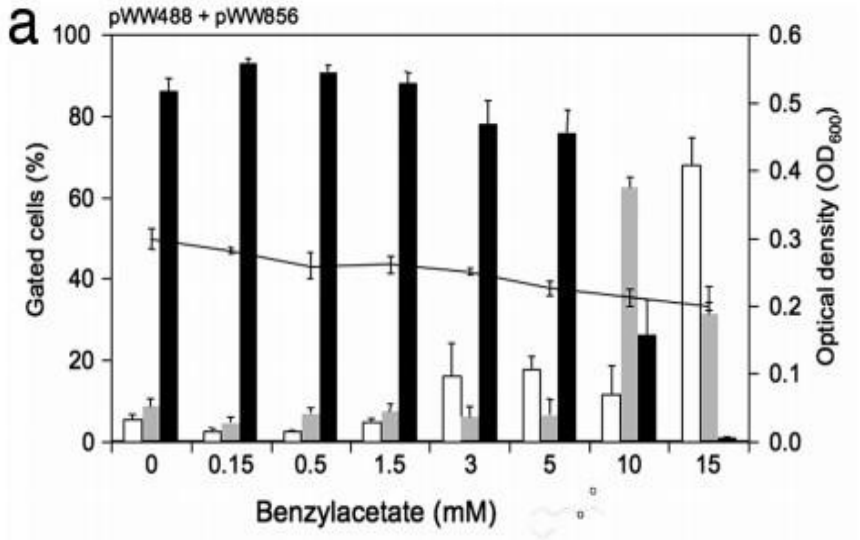
1. 研究背景介绍
2. 抗结核药物的发现
3. 抗结核药物的验证
4. 结果及讨论

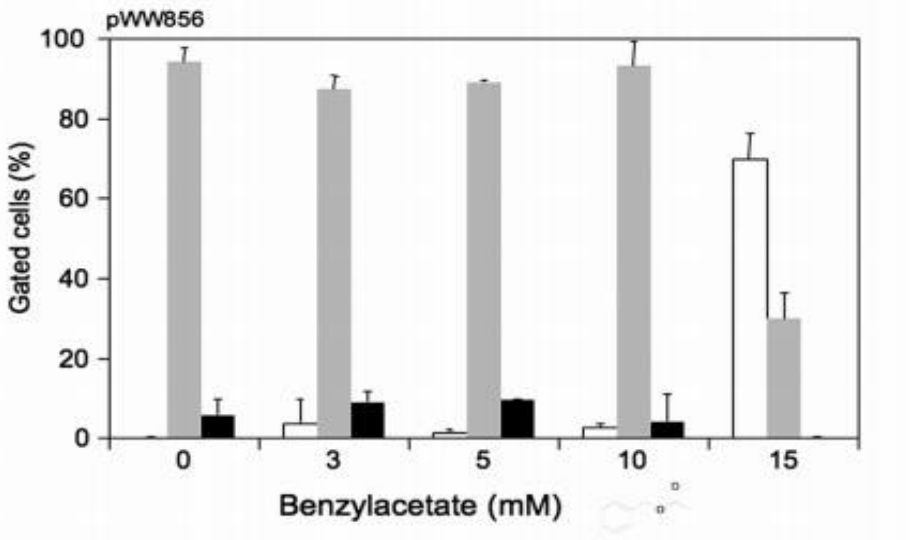
3、抗结核药物的验证

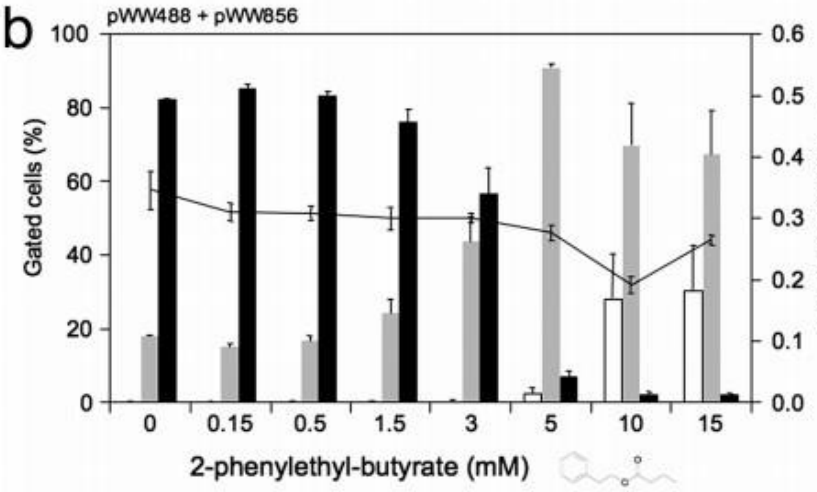
- 细菌中验证**EthR**的结合物

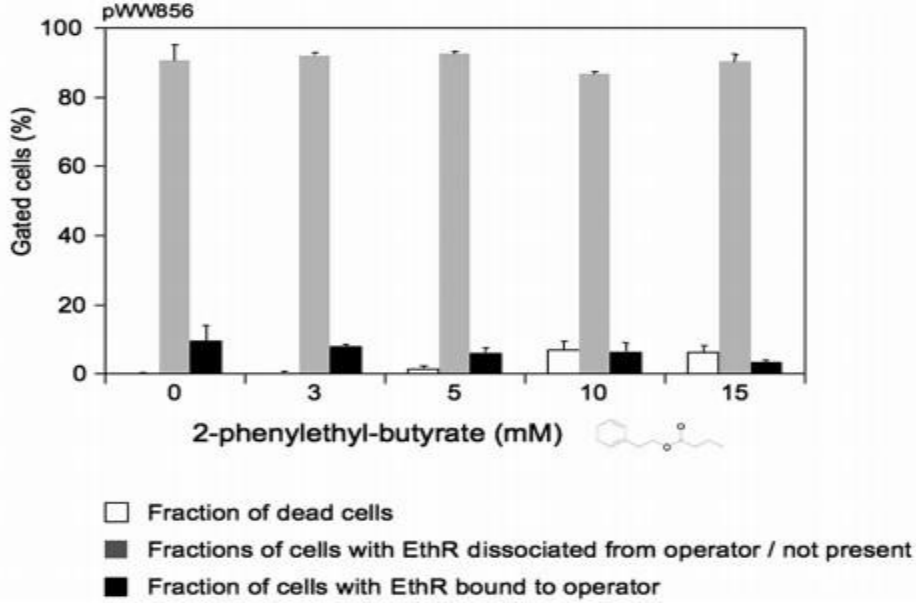


抗结核药物的验证


a
pWW488 + pWW856
Gated cells (%)
Optical density (OD600)
Benzylacetate (mM)
0
0.15
0.5
1.5
3
5
10
15

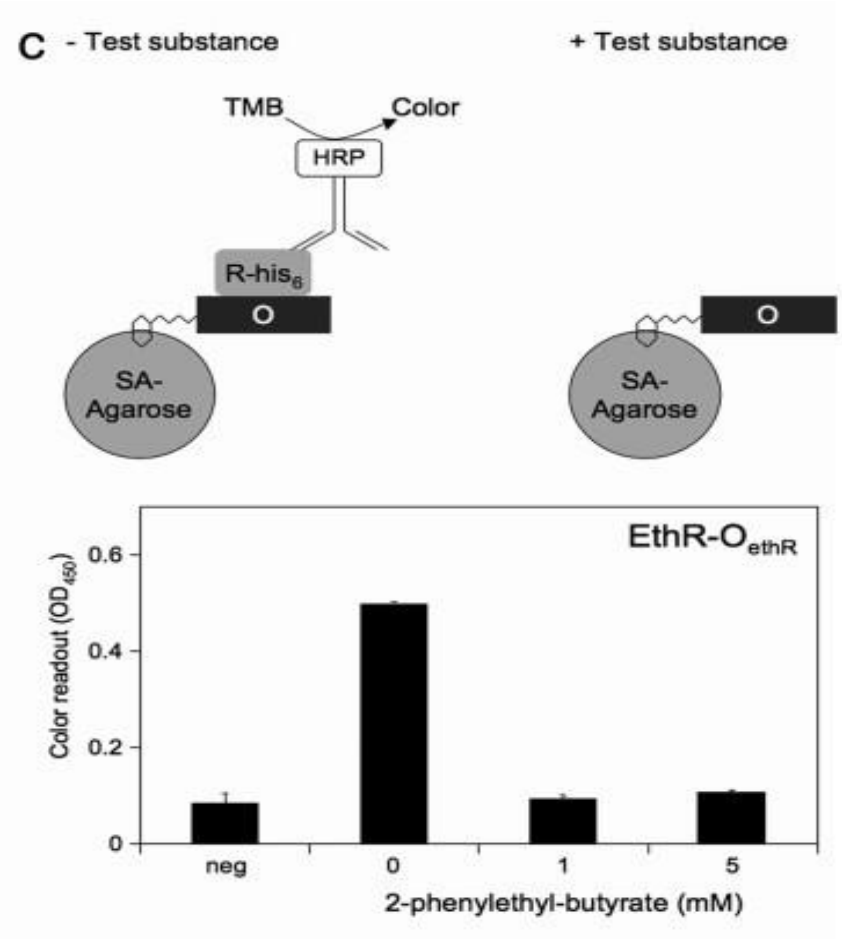

pWW856
Gated cells (%)
Benzylacetate (mM)
0
3
5
10
15

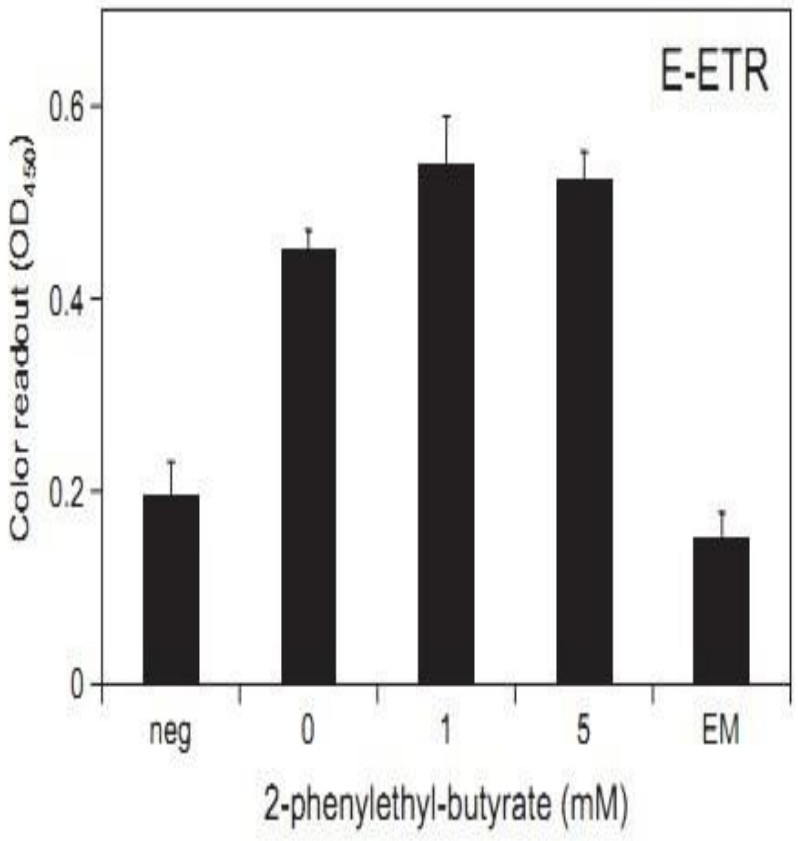

b
pWW488 + pWW856
Gated cells (%)
2-phenylethyl-butyrate (mM)
0
0.15
0.5
1.5
3
5
10
15


pWW856
Gated cells (%)
2-phenylethyl-butyrate (mM)
0
3
5
10
15
Fraction of dead cells
Fractions of cells with EthR dissociated from operator / not present
Fraction of cells with EthR bound to operator

抗结核药物的验证

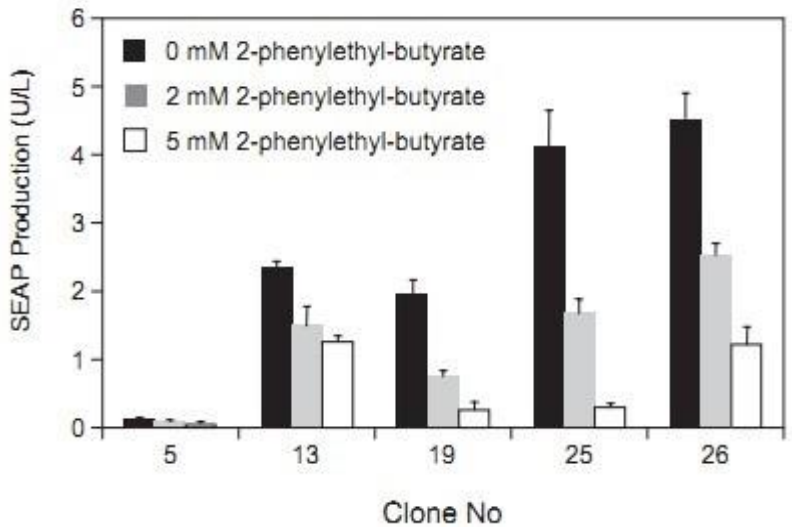
❖体外实验验证

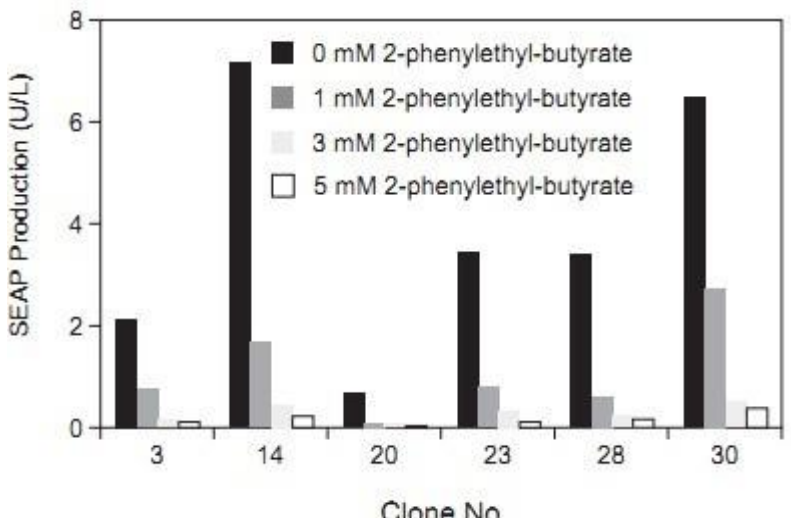


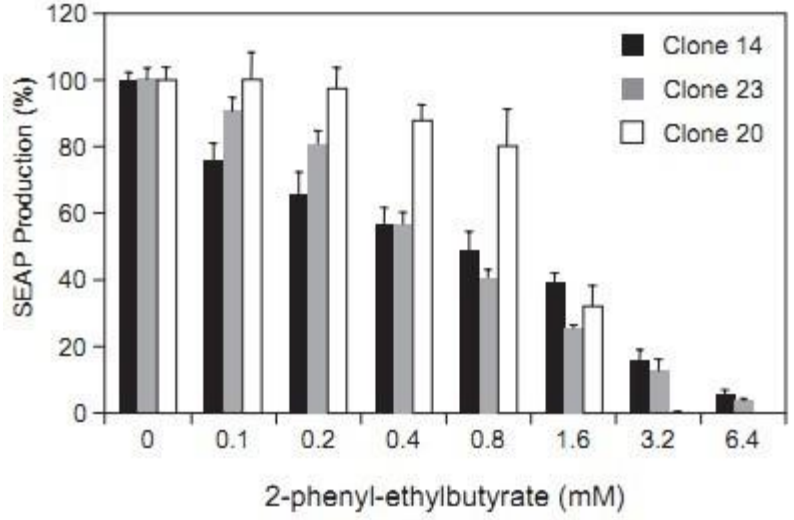


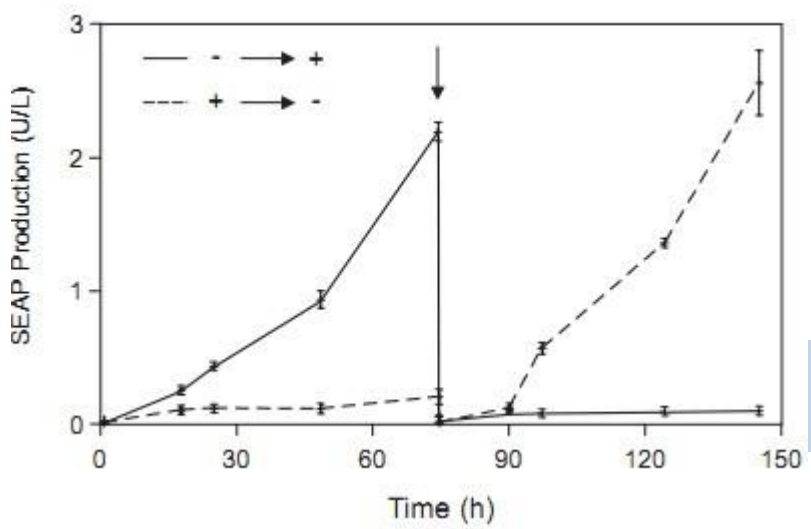
抗结核药物的验证

- 体内实验验证：小鼠中**2-**苯丁酸调节**EthR**活性



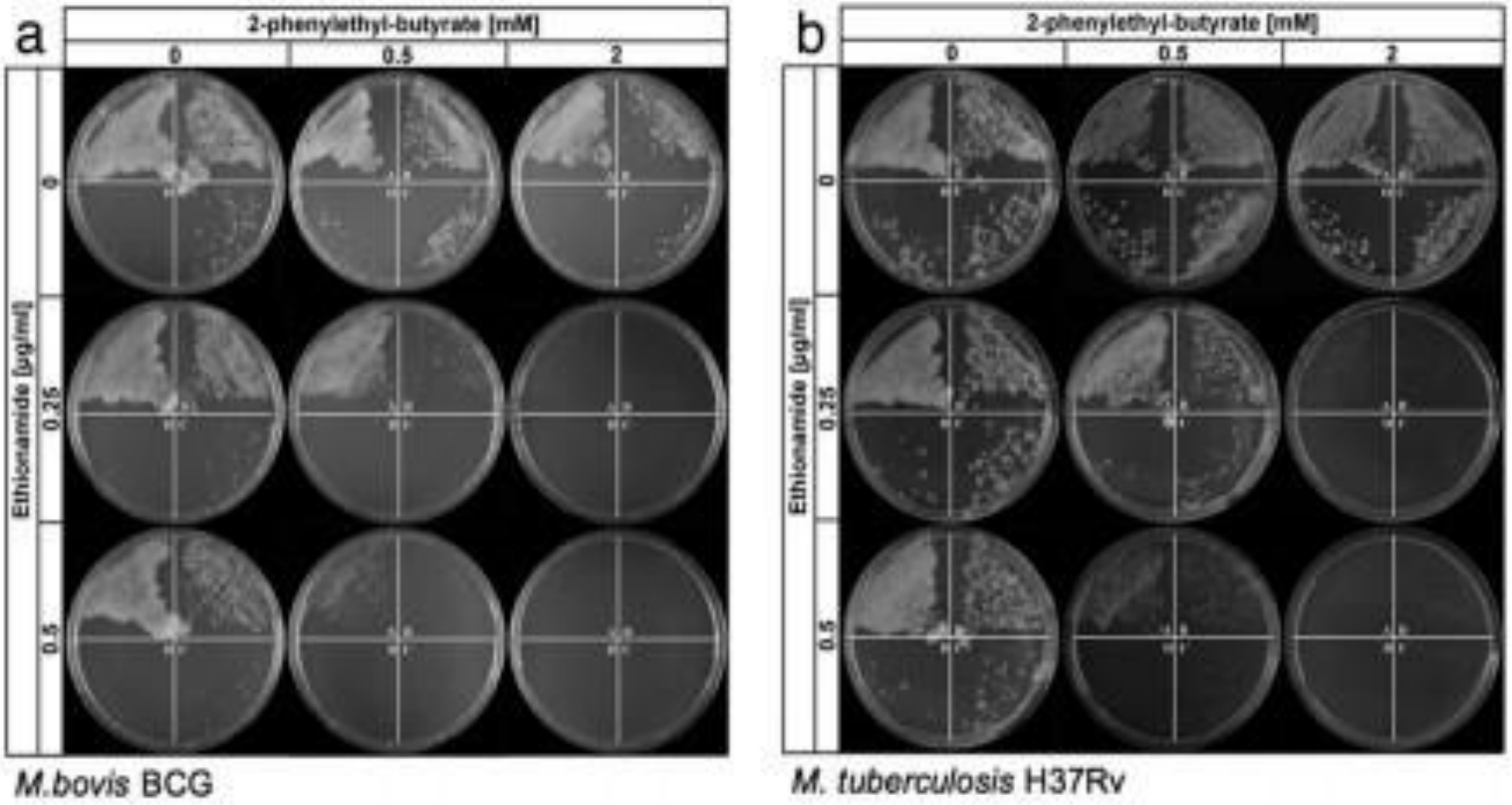


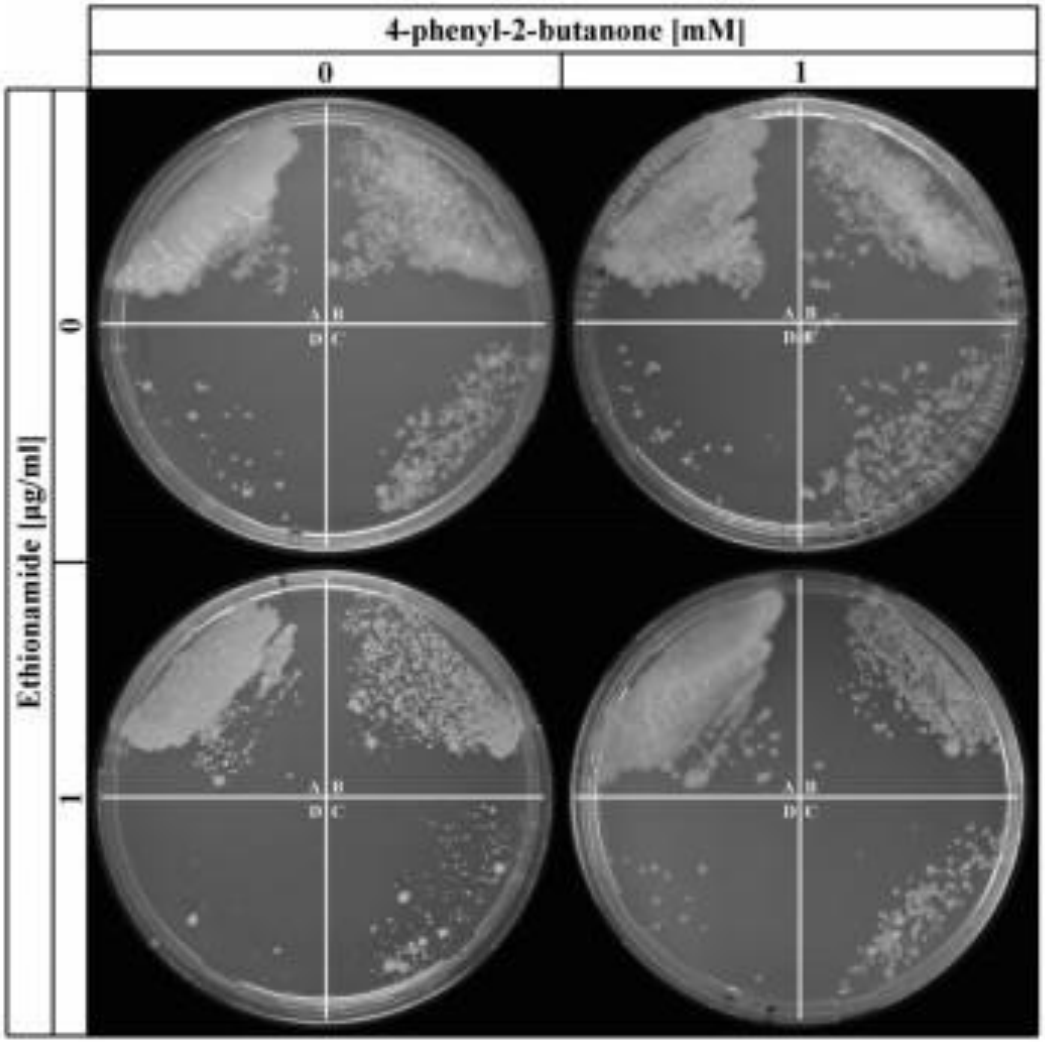




抗结核药物的验证

- 2-苯丁酸增加牛分支杆菌和结核分支杆菌对乙硫异烟胺的敏感性




4-phenyl-2-butanone [mM]
0
1
Ethionamide [µg/ml]
0
1
A
B
D
C

提纲

1. 研究背景介绍
2. 抗结核药物的发现
3. 抗结核药物的验证
4. 结果及讨论

3、结果与讨论

- 合成基因回路推动了后基因组时代基因功能研究的进程，也为合成生物学提供了破译天然的基因网络动力学提供了有力的帮助。
- 我们在人的细胞中合成了基因回路，并且遵从了靶标特异性、无毒性、可进入细胞溶质杀死胞内病原体的原则。
- 发现并验证了在结核分枝杆菌及体内中**2-**苯丁酸 **EthR** 的有效的抑制子，建立起一道对抗多药抗性的结核分枝杆菌的安全有效的防线。

教育部直属国家211工程重点大学
华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

谢谢各位老师！

请多提宝贵意见！