

哺乳动物合成生物学中生物医 药相关的回路设计策略

魏伟

2013308120032

渔业

大纲

- 合成生物学简介（a simple introduction to Synthetic Biology）
- 背景及摘要（backgrounds and abstract）
- 基于细胞信号通路的合成回路（Synthetic circuits based on rewired cell-signaling pathways）
- 复杂的两个或多输入回路（Sophisticated two-/multi-input design）
- 光敏合成回路（Light-responsive synthetic circuits）
- 细胞间通讯工程（Engineering intercellular communication）
- 修复网络（Prosthetic networks）
- 总结（Conclusion）

合成生物学简介（a simple introduction to Synthetic Biology）

合成生物学是生物科学在二十一世纪刚刚出现的一个分支学科，近年来合成生物物质的研究进展很快。与传统生物学通过解剖生命体以研究其内在构造的办法不同，合成生物学的研究方向完全是相反的，它是从最基本的要素开始一步步建立零部件。与基因工程把一个物种的基因延续、改变并转移至另一物种的作法不同，**合成生物学的目的在于建立人工生物系统（artificial biosystem）**，让它们像电路一样运行。

背景及摘要（backgrounds and abstract）

哺乳动物合成生物学以作为转录基因开关提供调控因子简单作用开始发展，已经成为一个不断扩大的具有高度复杂功能的基因编码回路设计工具箱。这样的哺乳动物回路设计激增，现在可以用于DNA、RNA或蛋白质水平或某些组合的调控。回路设计已构建了包括遗传调控开关、带通滤波器、延时回路、存储设备、振荡器和生物计算机等设备。回路已经被设计为不同的用途，包括执行逻辑运算、分离抗结核化合物、控制T细胞增殖、杀死癌细胞、治疗代谢紊乱。

尽管回路设计的复杂性不断增加以及具有高度的创新性，合成生物学的当前状态仍然是“概念验证”。

哺乳动物合成生物学的成功，一方面是由于它能够不断改善和创造更多先进和强大的遗传回路。另一方面是因为它能够与其他新兴的生物学科互动，最明显的例如光遗传学。

背景及摘要（backgrounds and abstract）

随着以合成生物学为基础的回路日益复杂化和多层化，单一设计的细胞将不能应付编程功能的复杂性。要克服这个限制，需要在设计的不同细胞交流间分配一定的工程活动和代谢工作量将它们的活动合作起来来提供协调一致的行动。

合成相互交流的多细胞组织群体，将促进组织工程、装配复杂功能新颖的细胞模式、合成内分泌系统的进步，使越来越复杂的基因网络的设计成为可能。

在这篇综述中，提到哺乳动物合成回路设计的新颖特点。讨论了**调节回路**、回路设计上已取得的**进步**、**光遗传学结合回路**、**合成细胞间沟通**和**修复网络**等。

基于细胞信号通路的合成回路（Synthetic circuits based on rewired cell-signaling pathways）

为了集成内源性信号通路与合成回路，细胞被改造成响应内源性信号转导通路的表达跨膜受体。以这种方式，这些回路使用细胞的自然信号机制来调节细胞间功能。该系统可以设计为使用不同受体来响应内源性或外源性刺激。

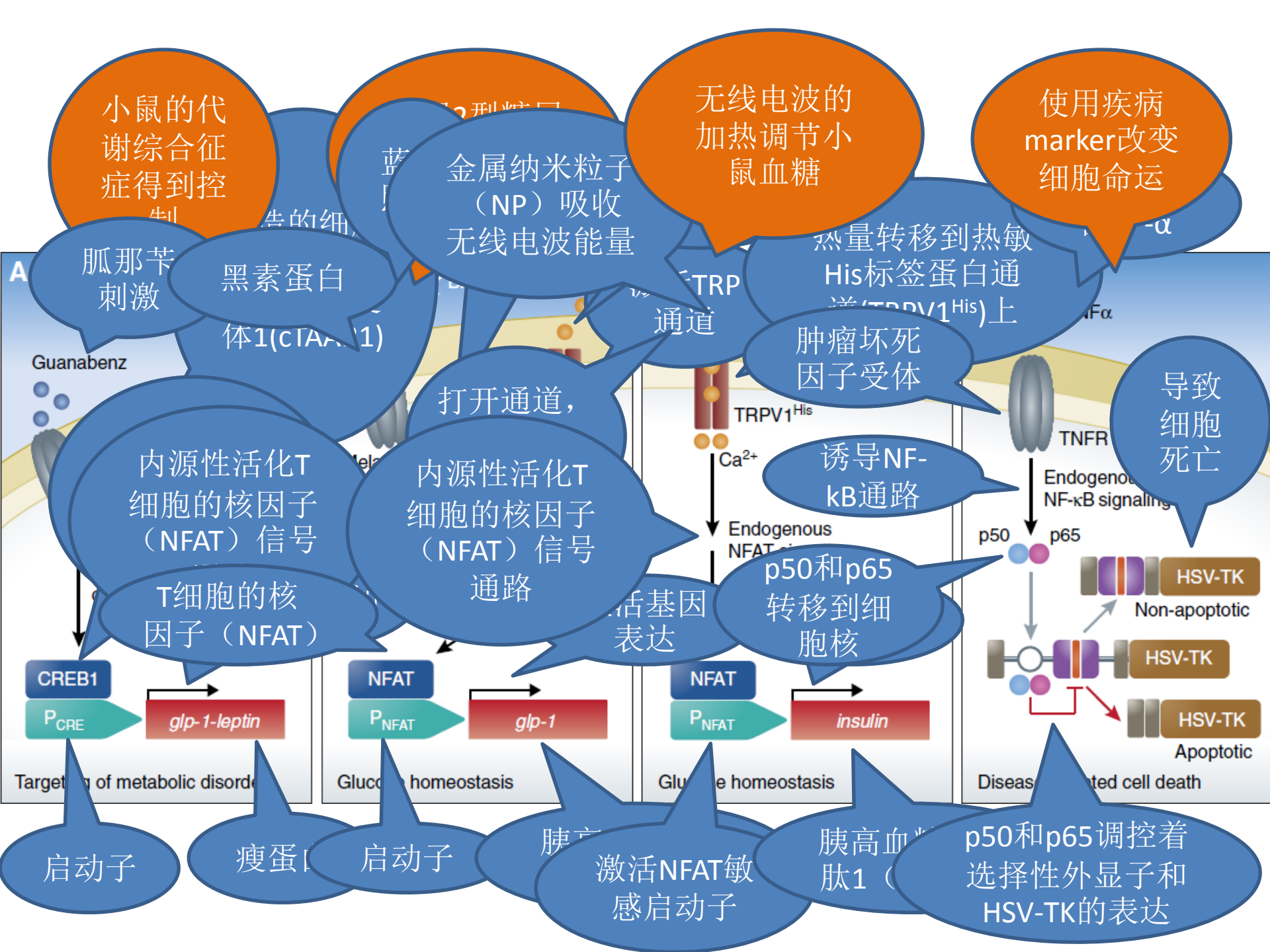
采用这一策略构建了一个用于治疗代谢综合征的合成回路，将这个回路移植到具有代谢综合征症状的小鼠（ob/ob小鼠）体内，可以使所有相关病症（图1A）同时得到调整。

在视网膜神经节细胞中，蓝光对黑素蛋白的刺激通过一种G-蛋白信号级联反应激活瞬时受体电位通道（TRP通道），导致钙离子内流。通过连接黑素蛋白的信号转导与内源性活化T细胞的核因子（NFAT）信号通路，导致钙离子浓度升高，GLP-1在NFAT-敏感启动子的控制下表达，导致2型糖尿病小鼠血液中葡萄糖的平衡由蓝光控制（图1B）。

基于细胞信号通路的合成回路（Synthetic circuits based on rewired cell-signaling pathways）

以类似的方式，Stanley et al（2012）使用合成生物学与纳米技术相结合的方法，利用内源性的NFAT信号通路通过控制TRP通道的激活来直接调控基因的表达。在氧化铁纳米粒子上涂上针对热敏感TRP通道的His抗体进行修饰，可以表达细胞外的His标签蛋白（TRPV1His）。金属纳米粒子吸收无线电波能量，将热量转移到热敏His标签蛋白（TRPV1His）上，打开通道，触发钙离子内流，这些钙浓度的升高导致一种对NFAT敏感的启动子的转基因表达。在小鼠中使用时，无线电波的加热使一种修饰后的人胰岛素基因能够调节动物血糖水平（图1C）。

Culler et al（2010）报道了一个使用疾病标签的识别来改写细胞命运的高度复杂策略。他们构建了一个基于RNA的由特定寡核苷酸适配体组成的装置，这些核酸适配体被设计成可以识别如NF- κ B转录因子的p50和p65亚基这样的内源性信号伴侣。这些核酸适配体被放在一种含有终止密码子的选择性剪接外显子邻近的关键内含子区域。选择性外显子是一种含有三个外显子、两个内含子的与自杀基因（HSV-TK）融合的微基因的一部分，选择性外显子的排除依赖于p50和p65亚基与核酸适配体的结合。在肿瘤坏死因子- α 的存在下，NF- κ B通路被诱导，从而导致p50和p65转移到细胞核中。随后，它们存在于细胞核中调控着选择性外显子的排除和HSV-TK的表达，最终导致细胞死亡（图1D）。



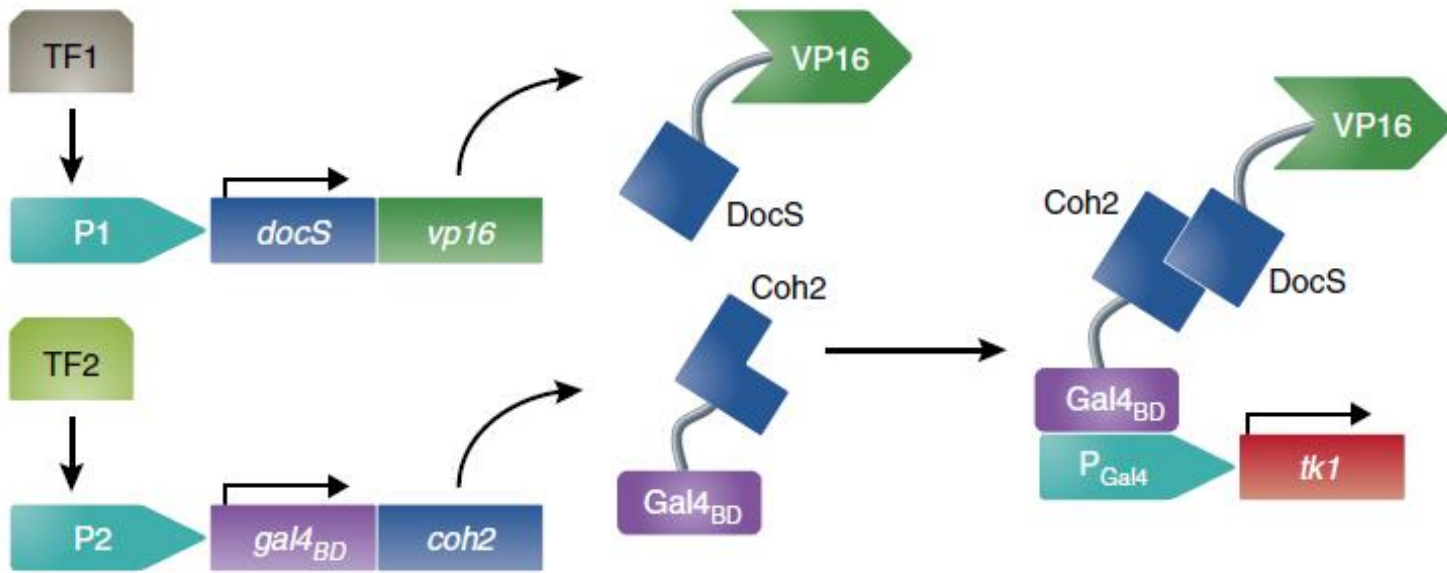
复杂的两个或多输入回路（Sophisticated two-/multi-input design）

合成基因回路的顺利发展，主要依赖基因调控系统的构建，在基因调控系统中，一个特定的输入被回路转换成一个特定的遗传输出。因为典型疾病状态具有复杂的生物学特点，这些回路可能在临床治疗上有其局限性。因此，最近在合成生物学上的工作集中在构建两输入或多输入的回路，这些输入信号的组合确定最终的遗传效应。

Nissim and Bar-Ziv（2010）设计了双输入的能够响应逻辑与门的回路，提供了一个设计双输入回路的简单而有效的策略。他们使用了合成启动子CXCL1、SSX1和H2A1在不同肿瘤细胞系中的激活优势。每个启动子调控着分裂转录因子的两个元件之一的表达，只有当使用的启动子充分活跃时，功能性基因才会被激活。分裂转录因子包括两个融合蛋白，其中之一是细菌DocS与病毒VP16反式激活域融合蛋白，另一个是细菌Coh2与酵母Gal4的DNA结合域融合蛋白。DocS-Coh2结构及Gal4合成启动子被相关转录因子的激活依赖于CXCL1，SSX1和H2A1这三个启动子的联合活动。随着内源性转录因子水平轮流反馈调控它们的启动子活性，这个系统可以用于癌细胞特异性识别和随后的癌细胞命运的响应修饰（图2A）

复杂的两个或多输入回路 (Sophisticated two-/multi-input design)

A

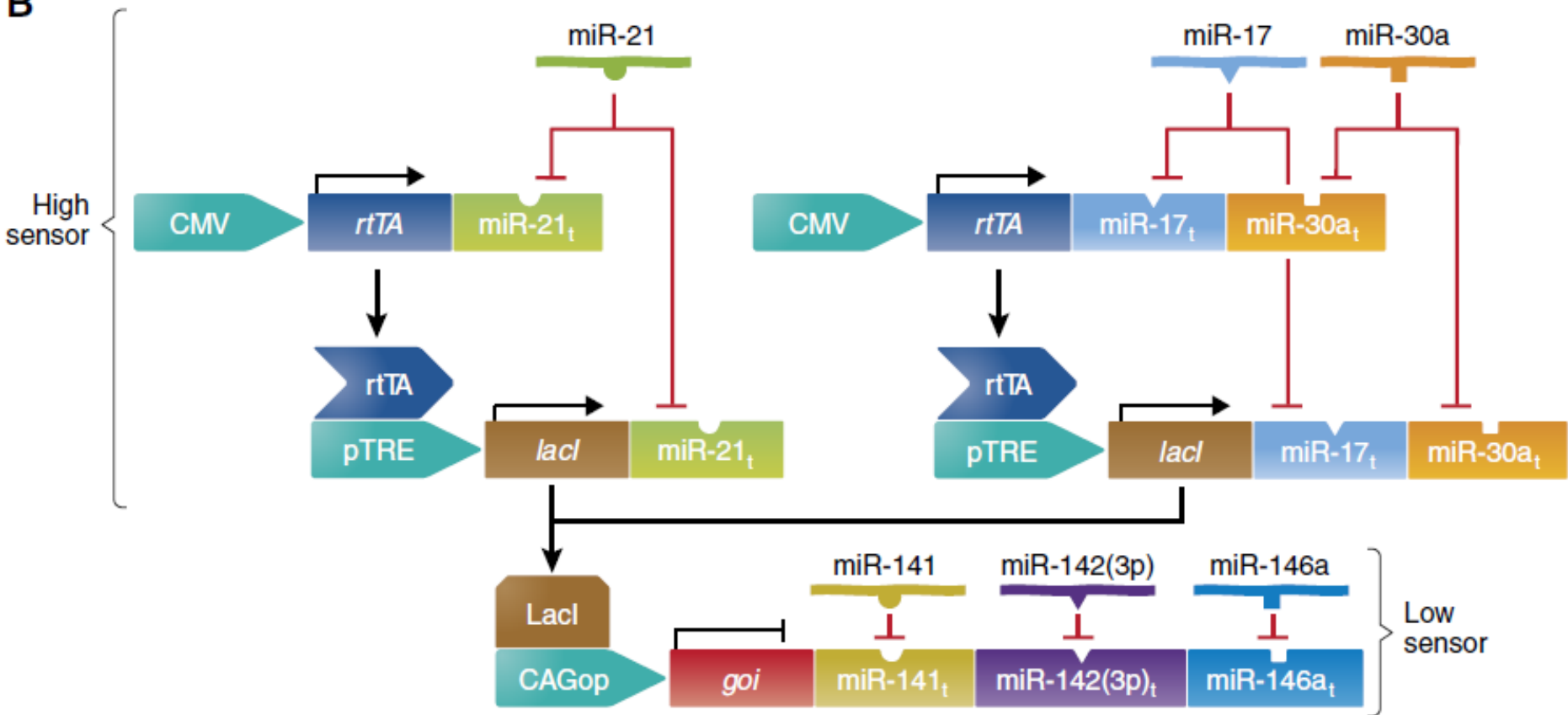


复杂的两个或多输入回路（Sophisticated two-/multi-input design）

Xie et al (2011)报道了一个高度复杂的多输入设计回路，允许特定肿瘤细胞的识别和破坏。他们构建了一个细胞类型分类器，可以对癌细胞特定microRNA表达水平进行打分，当与预先决定的资料匹配时，执行已识别癌细胞的程序性死亡。高表达的microRNA标记中，miR-21、miR-17和miR-30a是反式激活因子rtTA和反式抑制剂LacI的靶mRNA。rtTA设计为激活LacI的表达，而反过来LacI设计为通过绑定到CAGop启动子上来抑制细胞凋亡诱导因子hBax的表达。高表达的三个的microRNA标记是hBax表达所必需的，低表达的microRNA标记中，miR-141和miR-142（3P）和mi-146a，被设置为作用于hBax的翻译。这使得只有那三个低表达的microRNA标记表达水平确实很低时，细胞凋亡诱导基因才会翻译。当细胞分类器锁定到特定的高和低表达水平的microRNA属性上，它开始执行特定匹配的癌细胞的破坏（图2B）。

复杂的两个或多输入回路 (Sophisticated two-/multi-input design)

B

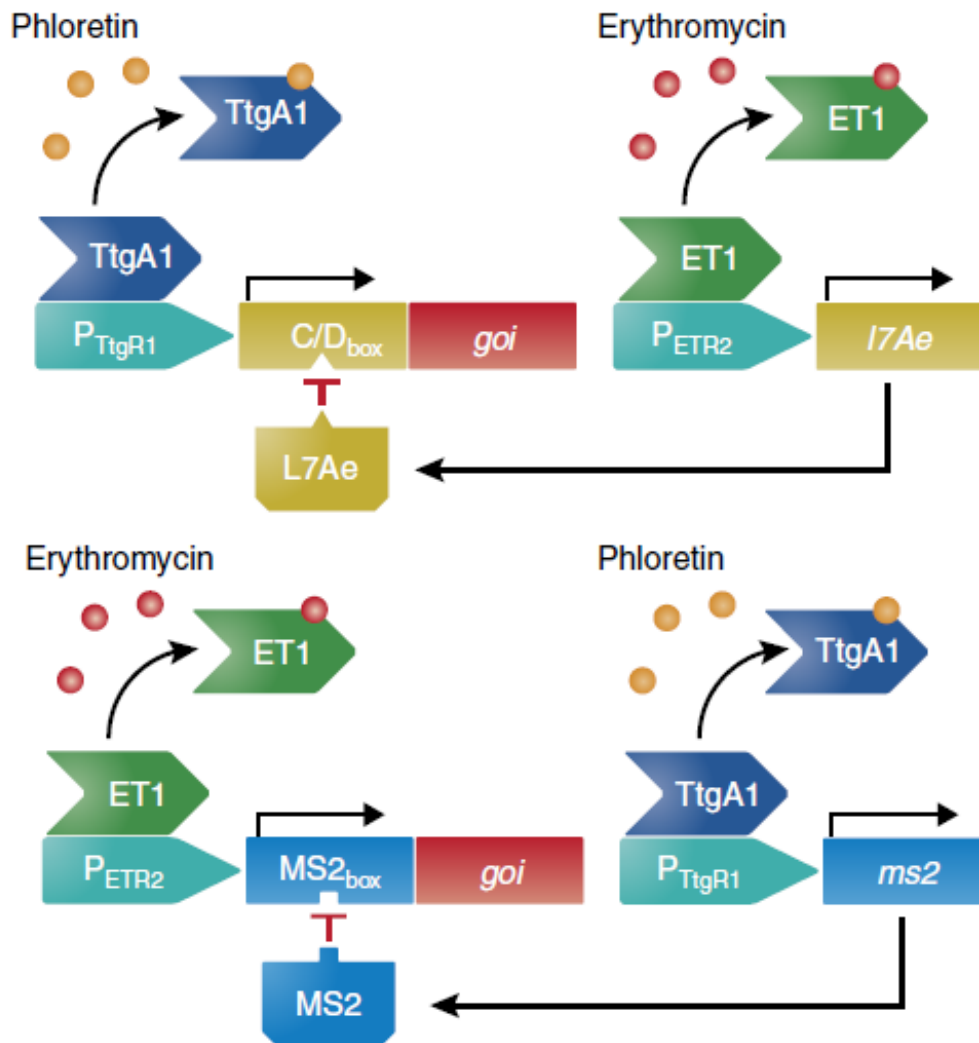


复杂的两个或多输入回路（Sophisticated two-/multi-input design）

Auslander等（2012A）最近的工作提出了细胞工程的组合回路，使用集成的双分子输入，能够执行复杂的逻辑运算。为了构建出这样的回路，他们使用了与红霉素和根皮素相关的转录因子ET1和TtgA₁，以及含有特定的RNA靶结构域MS2_{box}和C/D_{BOX}，可以抑制转录产物翻译的RNA结合蛋白MS2和L7Ae。实现这些简单的转录、翻译控制元件，触发具有即插即用特点，能够执行非、与、非与和N-IMPLY逻辑计算的可编程回路的构建。异或运算可以由两个N-IMPLY门组合或三个逻辑门组合来实现，这三个逻辑门，需要使细胞执行像加法（一个“与”门和两个N-IMPLY门）和减法（三个N-IMPLY门）这样复杂的计算（图2C）。

复杂的两个或多输入回路 (Sophisticated two-/multi-input design)

C

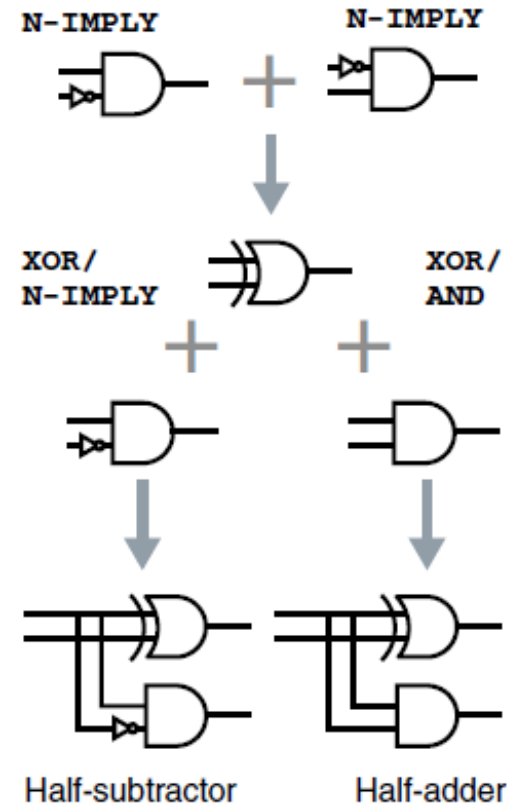


E	P	goi
0	0	0
1	0	1
0	1	0
1	1	0

N-IMPLY:
E ANDNOT P

E	P	goi
0	0	0
1	0	0
0	1	1
1	1	0

N-IMPLY:
P ANDNOT E



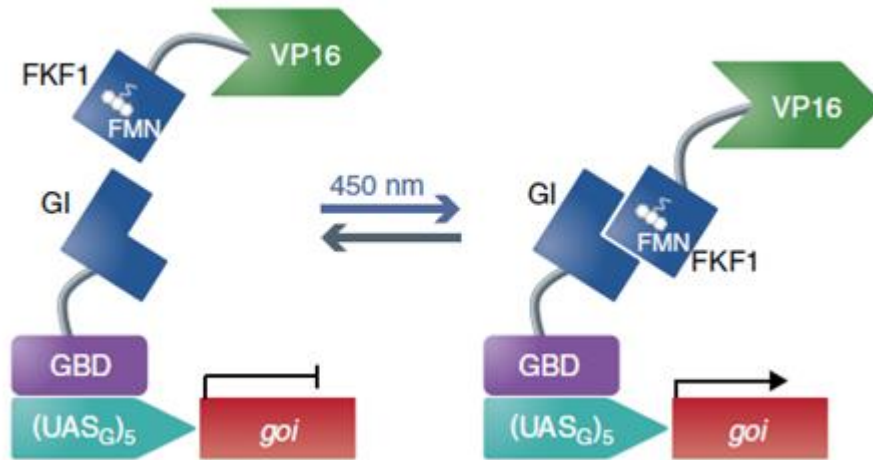
光敏合成回路（Light-responsive synthetic circuits）

光敏蛋白在自然界分布广泛，他们允许光能转成特定的细胞反应。包括微生物中被称为视蛋白的光敏离子通道，遇到光时可以让离子流通过。在最近几年，视蛋白到哺乳动物细胞的引入已经成为一个强大的称为光遗传学的生物学工具，它允许对细胞功能进行时空控制。设计表达光敏视蛋白后，只需应用光，就可以调节单神经元细胞的激活状态、控制心脏功能和恢复视力。

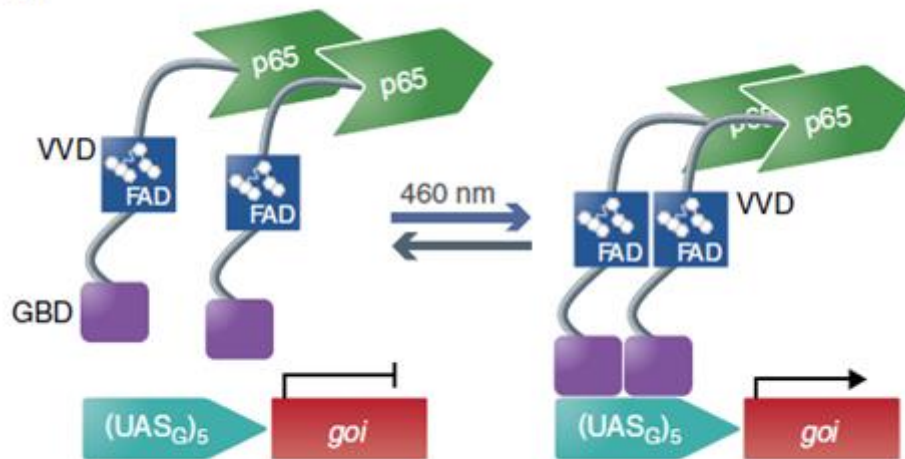
实现蓝光依赖蛋白互作的拟南芥衍生黄素结合蛋白FKF1，包含LOV结构域，而GIGANTEA蛋白（GI）第一次实现了哺乳动物细胞中的光控转基因的表达系统。Yazawa等人将GI蛋白与Gal4-DNA蛋白以及FKF1与VP16的反式激活蛋白进行融合。在蓝光照射下，FKF1-VP16融合蛋白被吸收到GI-GAL4-DNA-binding蛋白上，从而激活基因从包含的Gal4特定操纵位点的同源启动子开始表达（图3A）。

蓝光光控回路

A



B



蓝光光控回路

最小的含有LOV结构域的蛋白VIVID (VVD)，来源于粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)，包含辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)。Wang et al (2012)利用VVD改造蓝光诱导调控网络。改造的VVD融合到GAL4-DNA-binding结构域和p65反式激活域的一个单体变种中。在蓝光照射下，VVD能够二聚化，从而使重组的GAL4-DNA-binding结构域二聚体与其同源启动子结合，并激活基因表达。这种设计能够对小鼠基因表达进行空间控制 (图3B)。

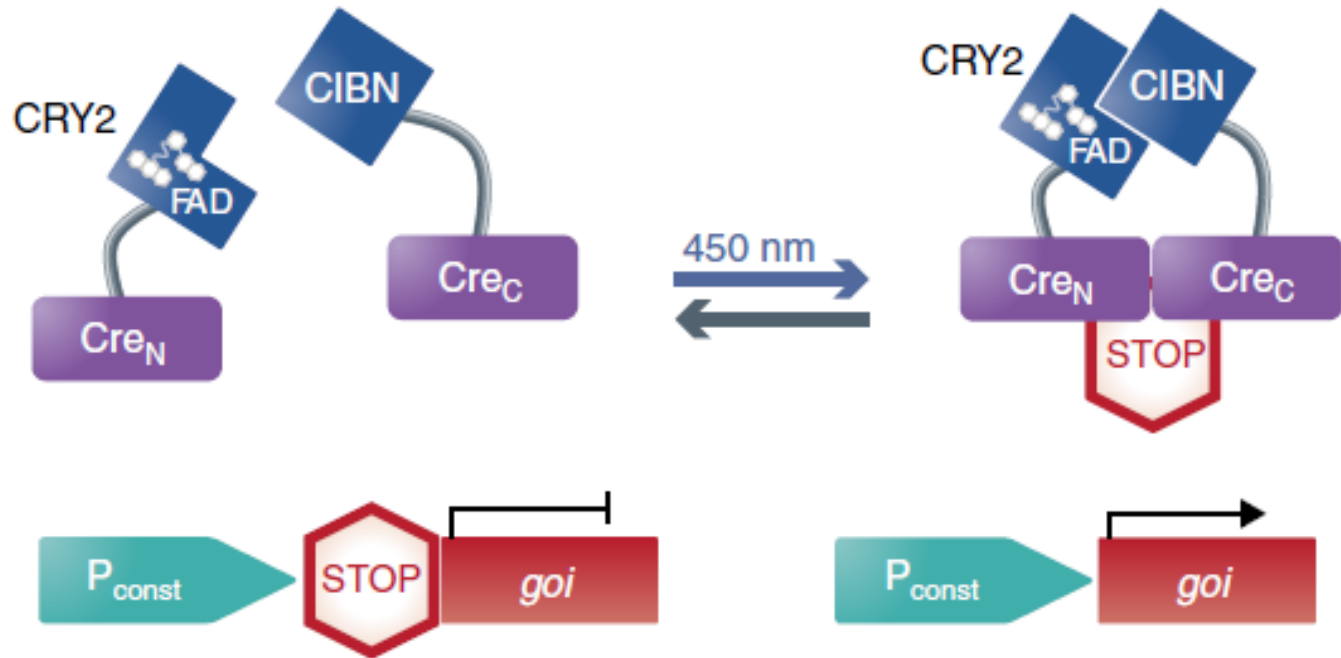
蓝光光控回路

拟南芥中发现的蓝光诱导蛋白的互作，存在于需要FAD作为共同因子的隐花色素2蛋白（CRY2）和隐花色素互作基本螺圈蛋白（CIB1）之间，通过将二聚体与人为分割的Cre重组酶融合实现转基因表达的调控。蓝光使这些部件相结合，从而产生了激活了Cre重组酶。这消除了终止序列两侧的两个loxP位点，从而使基因能够表达（图3C）。

。

蓝光光控回路

C



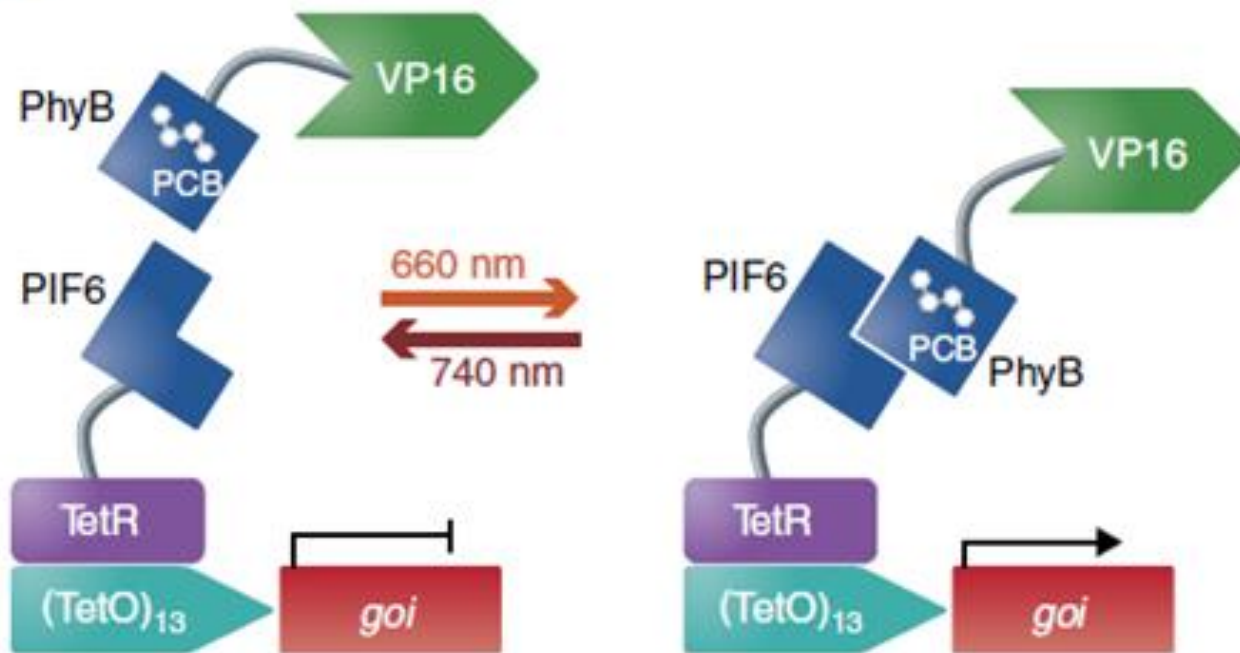
红光光控回路

不仅蓝光敏感光遗传学工具被引入哺乳动物细胞合成生物学中。与第一个蓝光系统同时出现的是红光光敏系统，比如使用植物光敏色素B(phyB)与光敏色素相作因子6(PIF6)在红光照射下互相作用，进而对细胞形态进行精准时空控制。

有效利用phyB的PIF6的互动机制，构建了第一个哺乳动物红光光敏基因调控系统。Muller等人在抗四环素蛋白TetR与PIF6的融合蛋白以及phyB与VP16反式激活域的融合蛋白基础上设计了一个分裂相关转录因子。红光使分裂转录因子重组，从而激活一个具有TetR-specific（四环素抗性）目标启动子的基因表达。远红光照射使phyB与PIF6解离并沉默基因的表达（图3D）。

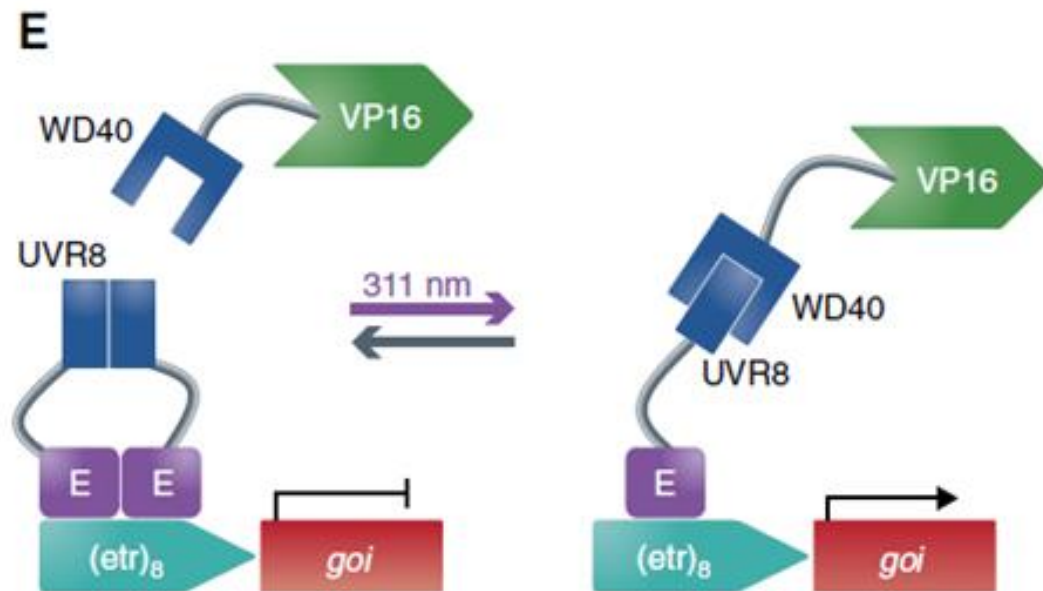
红光光控回路

D



中波紫外线光控回路

响应中波紫外线（UVB）的遗传回路近日有报道。作者使用了在没有中波紫外光时发生同源二聚化的拟南芥感光蛋白抗紫外线位点8（UVR8）和互作伴侣COP1的WD40域。将UVR8与大环内酯类抑制剂E以及WD40与VP16反式激活域融合，构建了一个分裂转录因子，该转录因子在中波紫外光照射下被激活，并释放UVR8同源二聚体，使WD40-VP16融合蛋白自由化。重组的转录因子激活具有含etr8 motif嵌合启动子的基因表达（图3E）。

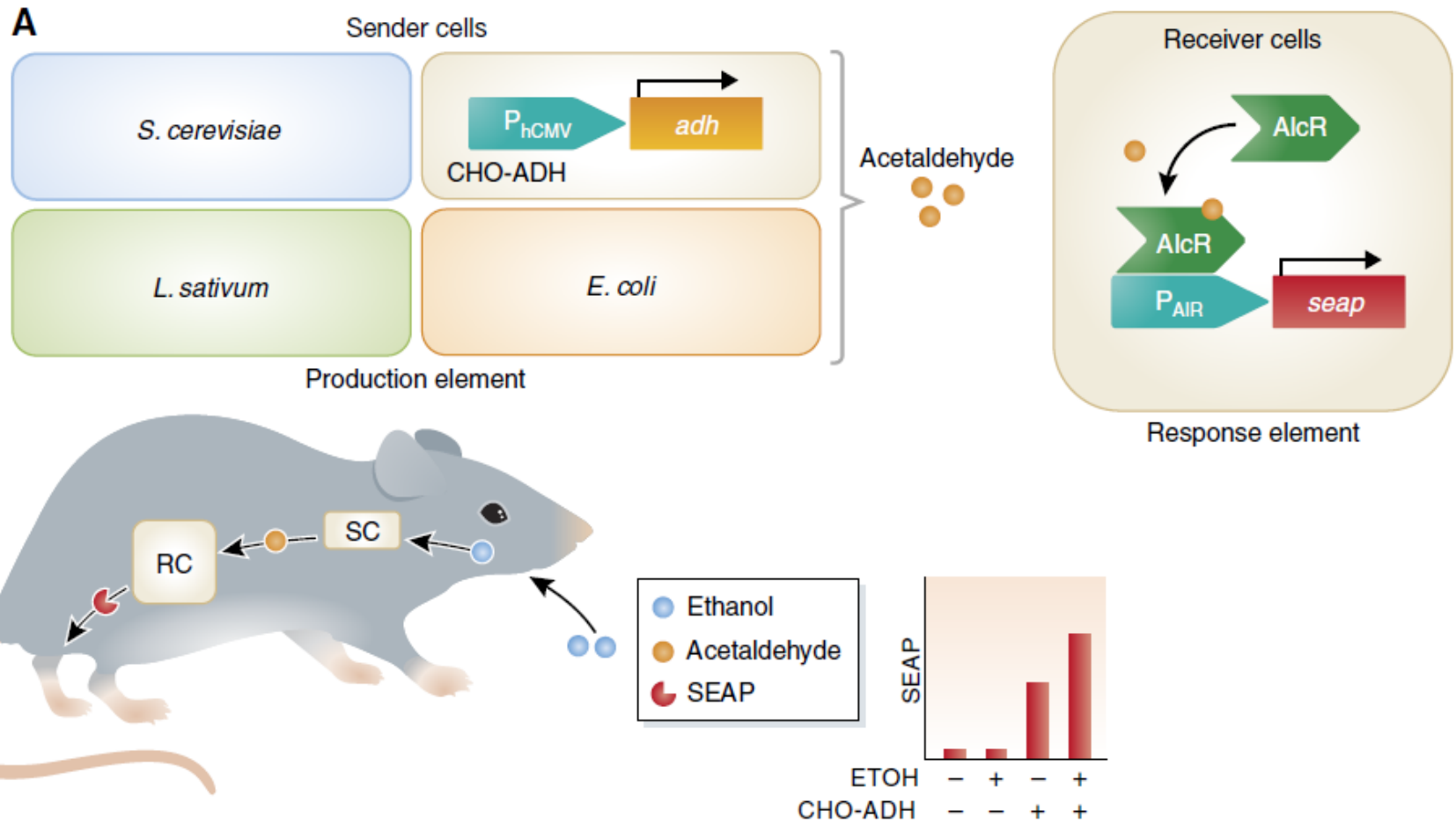


细胞间通讯工程（Engineering intercellular communication）

人类通过语言沟通，但简单的生物如细菌通过直接交换分子方式来监测和适应他们的环境。合成细胞间通信网络不仅给合成生物学家提供了一种建立并理解自然界已有系统的途径，而且可以用来设计日益增长的复杂性和新的控制力度的基因网络拓扑结构。细胞间通信的遗传回路可以使基因在整个细胞群体上稳定及时地表达、使程序化模式的构建成为可能，以及互联多细胞组件得以构建，并且与在自然界中发现的非常类似。

Weber等人（2007年）构建了哺乳动物中第一个合成细胞间通信系统，允许发送细胞以细胞密度依赖行为产生一个代谢信号，而接收细胞以一个不同的遗传反应回应。发送细胞用于表达小鼠的乙醇脱氢酶(ADH)，使补充的乙醇转化成挥发性代谢产物乙醛。接收细胞被设计为具有基于构巢曲霉遗传元件的乙醛诱导调控系统，构造曲霉遗传元件在接触乙醛时可以表达对应的基因。以大肠杆菌（*E. coli*）、酿酒酵母（*S. cerevisiae*）和家山黧豆（*L. sativum*）替代哺乳动物的发送细胞，有机体自然表达出ADH，所产生的乙醛与哺乳动物接受细胞一样，使得生物体可以进行跨界通信。把设计的转基因细胞微胶囊化回路植入到小鼠体内，哺乳动物发送和接收细胞对激素影响以类似的方式发挥作用。发送细胞将乙醇转化为水和乙醛，并广播给接受细胞，从而引发了转基因的表达（图4A）。

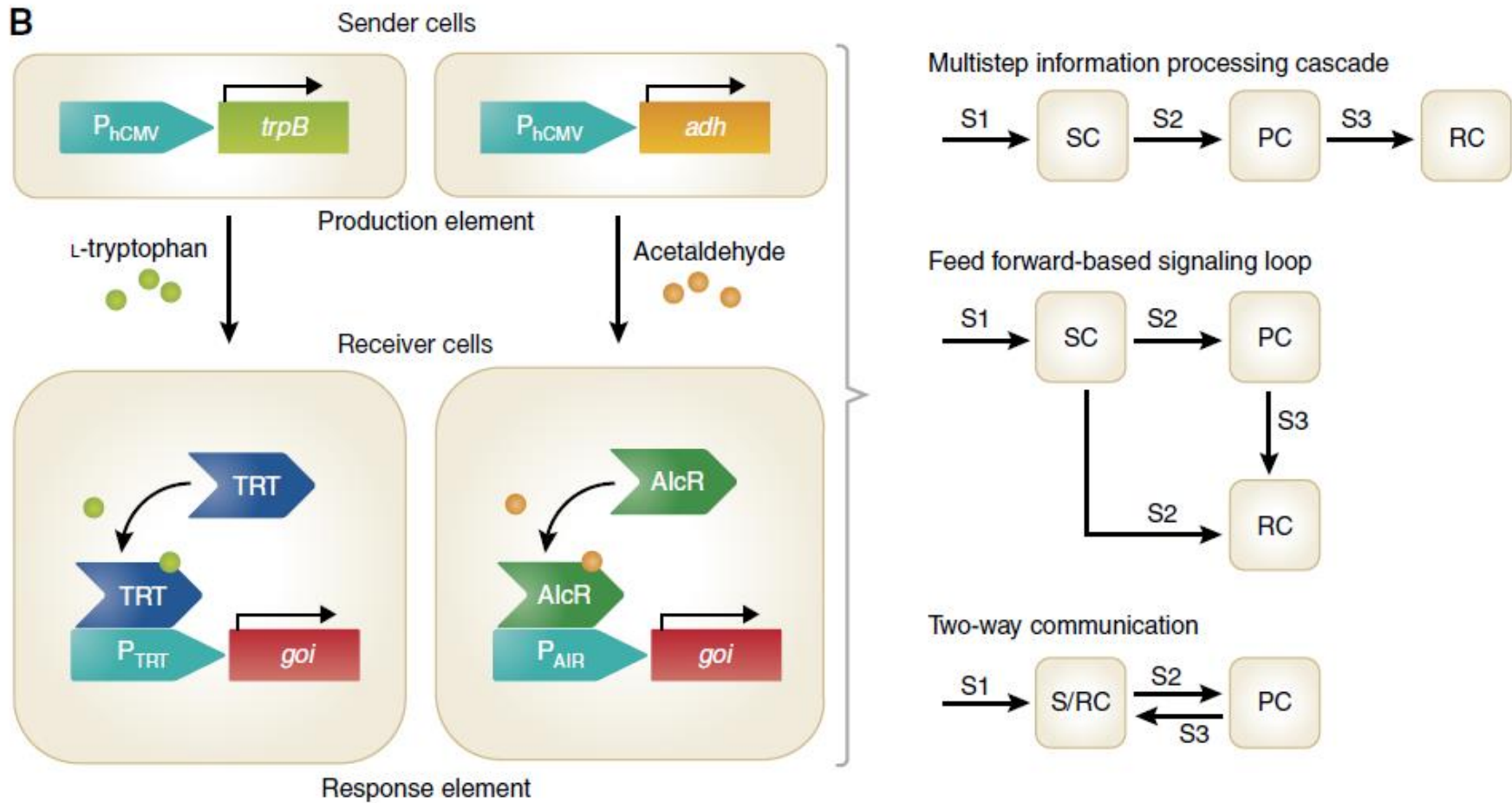
细胞间通讯工程 (Engineering intercellular communication)



细胞间通讯工程（Engineering intercellular communication）

通过实现不同的发送和接收细胞群体构建哺乳动物细胞间通信的遗传设计已经适用于创建响应L-精氨酸、生物素、一氧化氮和L-色氨酸的细胞间通信系统。后一系统由表达细菌色氨酸合酶（TRPB）基因的发送细胞组成，可以将添加的吡啶转化为L-色氨酸。接收细胞通过一个以沙眼衣原体遗传元件为基础构造的L-色氨酸诱导调节系统来表达靶基因。细胞间通信生物反应器的设置在制造药品或生物燃料中非常重要，它的潜力可以通过依赖于接种细胞浓度的编程基因表达谱来说明。将乙醛和L-色氨酸细胞间通信系统结合可以构建复杂的多细胞组件。自然信号系统的多细胞组件，如多级信息级联过程、前馈信号回路和双向通信被实现于不同细胞结构中的相同遗传模块简单地模仿（图4B）。

细胞间通讯工程 (Engineering intercellular communication)



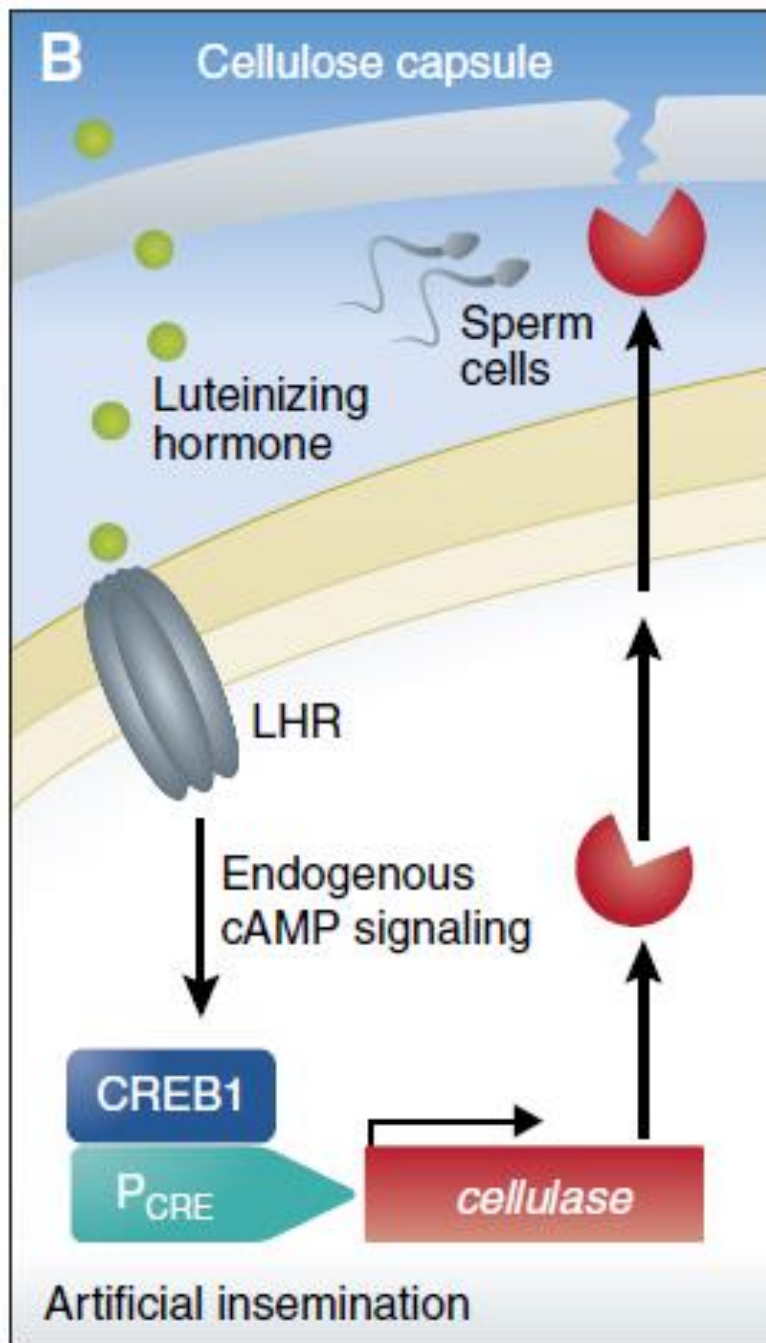
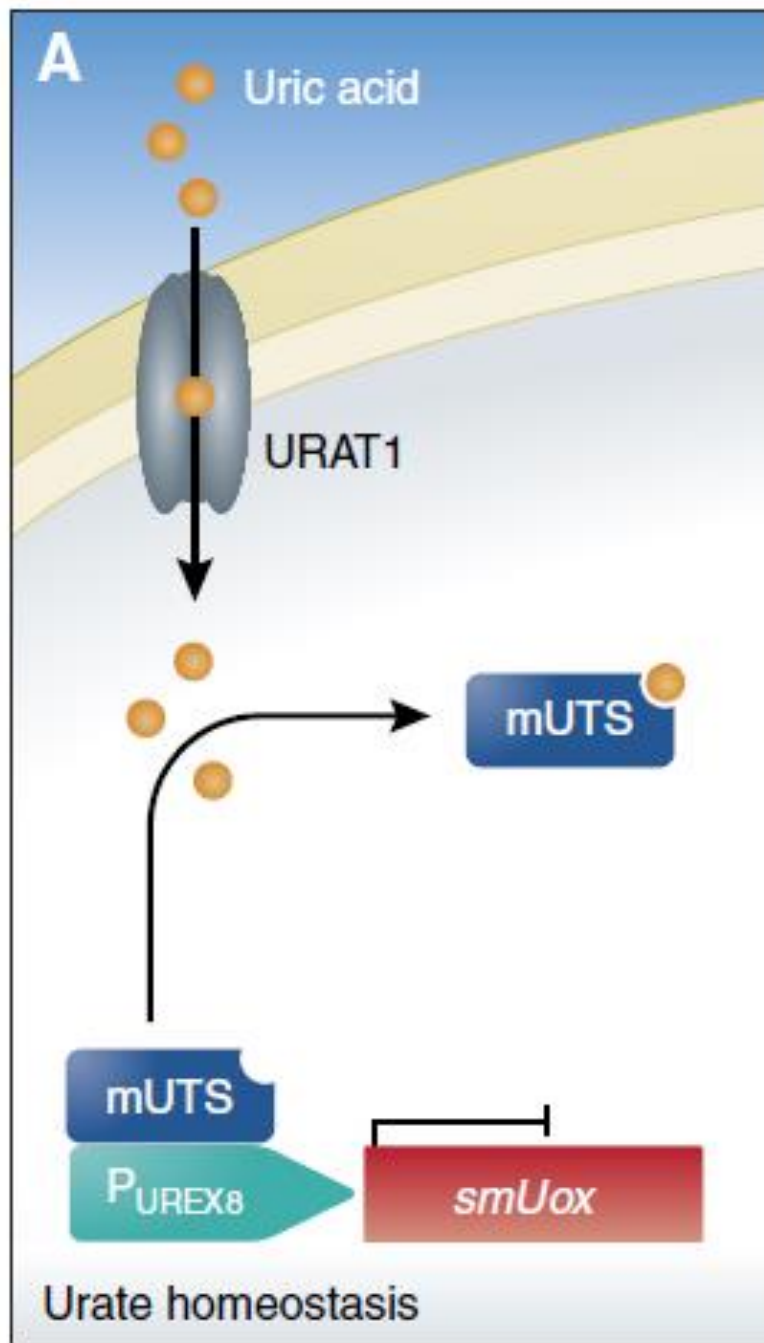
修复网络（Prosthetic networks）

修复网络是许多合成设备，这些设备作为修复分子，是检测、监控和诊断（疾病）有关的代谢物，以一个无缝、自动、自给自足的方式处理掉级的浓度、整合调整的诊断（**process off-level concentrations and coordinate adjusted diagnostic**），预防或治疗的反应。与上述转基因控制装置相反，修复网络直接与宿主新陈代谢联系，由疾病代谢产物触发。

尿酸水平升高与许多病理条件相关，如肿瘤溶解综合征和痛风，Kemmer等（2010）构建了一个用于控制小鼠体内尿酸稳态的遗传回路。回路由改进的耐辐射奇球菌衍生蛋白（mUTS）组成，能解除尿酸水平升高时其同源启动子（ P_{UREX8} ）的抑制作用。在免疫保护作用微容器和移植到尿酸氧化酶缺陷的小鼠中导致痛风的转基因细胞回路绝缘后，回路自动连接到外周循环，感觉动物血液中的病理性高水平尿酸，激活黄曲霉分泌由 P_{UREX8} 驱动的临床批准尿酸氧化酶（拉布立酶）的表达（smUox），从而降低尿酸到病理学水平一下（图5A）。

修复网络（Prosthetic networks）

修复网络也被开发作为一种工具，作为人工授精工具(Kemmer et al, 2011)。通过促黄体生成素受体（LHR）激活CREB1(cAMP敏感蛋白)，使促黄体生成素受体(LHR)受到刺激时发生基因表达。LHR的刺激触发一个典型的G蛋白偶联型受体的反应，增加了细胞内cAMP水平，触发与CREB1结合的合成启动子（PCRE）控制分泌纤维素酶表达。使用纤维素胶囊将含有这种回路的精子和细胞封装，并植入在奶牛的子宫内。在排卵时，促黄体生成激素的水平升高，导致植入物的破裂，分泌的纤维素酶降解纤维素胶囊，并最终导致成功受精（图5B）（Kemmer et al, 2011）。



总结（Conclusion）

从构建基本的基因转录调控系统开始，到使用原生细菌的抗生素敏感基因开关，合成生物学回路已包括以转录、翻译和翻译后的调控为基础的新型回路。这些复杂的回路已经在疾病治疗中设计并使用。

光遗传学在合成生物学已具有显著重要性，然而，光控回路的临床应用受限于自身的发色团，并且光控装置更倾向于消除免疫反应的危险和其它非期望的附属效应。多色控制回路的发展将进一步拓宽光控回路在生物学中的应用，更精准地实现回路设计。

多细胞通信系统回路设计可以满足越来越复杂的回路设计需求。

总结（Conclusion）

复杂性、可靠性和准确性不断增加的遗传回路设备结合最新开发的技术将保证合成生物学在21世纪的生物工程领域中的地位。本世纪很可能标志着哺乳动物合成生物学从“概念”定义到作为临床医疗实践中常用工具的发展。

谢谢~