

综述

新型基因表达调控元件——人工核糖开关的构建及筛选

杨会勇^{1,2}, 刁勇^{1,2}, 林俊生^{1,2}, 许瑞安^{1,2}

1 华侨大学分子药理学研究所, 福建 泉州 362021

2 分子药物教育部工程研究中心, 福建 泉州 362021

杨会勇, 刁勇, 林俊生, 等. 新型基因表达调控元件——人工核糖开关的构建及筛选. 生物工程学报, 2012, 28(2): 134-143.

Yang HY, Diao Y, Lin JS, et al. Engineering and screening of artificial riboswitch as a novel gene control element. Chin J Biotech, 2012, 28(2): 134-143.

摘要: 核糖开关作为一种新发现的 RNA 元件, 可以高效、准确、快速地执行基因调控任务, 且免疫原性低, 有可能在将来以顺式模块的方式应用于未来的基因治疗。近年来已经成功构建了多种人造核糖开关, 构建方法主要是利用人工适体元件与基因表达调控元件组装, 或者是在天然核糖开关基础上进行改造。文中全面综述了涉及人工核糖开关设计及筛选的技术, 讨论了可以用于哺乳细胞、响应非天然配体信号、调控特征为热力学和动力学控制的核糖开关的设计新策略, 并对核糖开关的筛选构建策略及其在基因治疗及新型药物开发领域的应用前景进行了展望。尽管目前将核糖开关设计成为功能强大的新型基因调控系统还面临很大的困难, 但通过构效关系的研究、计算机辅助设计、体外筛选及细胞内筛选技术、高通量优化筛选等技术的综合应用, 核糖开关一定可以成为有力的基因调控工具, 如能成功应用则可大大促进基因治疗临床化的进程。

关键词: 核糖开关, 基因表达调控, 基因治疗

Received: July 13, 2011; **Accepted:** October 20, 2011

Supported by: Program for International S&T Cooperation Projects of China (No. 2012GR0181), Key Program of International Cooperation and Exchanges of the Fujian Province (No. 2009I0017), Natural Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2011J05080), Scientific Research Starting Foundation for the High-level Talents of the Huaqiao University (No. 09BS624), Special Fund from the Central Collegiate Basic Scientific Research Bursary of the Huaqiao University (No. JB-JD1003).

Corresponding author: Yong Diao. Tel: +86-595-22690592; Fax: +86-595-22690516; E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

国际科技合作项目 (No. 2012GR0181), 福建省对外合作重点项目 (No. 2009I0017), 福建省自然科学基金项目 (No. 2011J05080), 华侨大学高层次人才科研启动费项目 (No. 09BS624), 华侨大学“中央高校基本科研业务费”科研基地专项基金项目 (No. JB-JD1003) 资助。

Engineering and screening of artificial riboswitch as a novel gene control element

Huiyong Yang^{1,2}, Yong Diao^{1,2}, Junsheng Lin^{1,2}, and Rui'an Xu^{1,2}

¹ Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China

² Molecular Medicine Engineering Research Center of the Ministry of Education, Quanzhou 362021, Fujian, China

Abstract: Various artificial riboswitches have been constructed by utilization of designed aptamers or by modification of natural riboswitch systems, because they can regulate gene expression in a highly efficient, precise and fast way, and promise to supply simple cis-acting, modular, and non-immunogenic system for use in future gene therapy applications. In this review, we present an overview of currently available technologies to design and select engineered riboswitches, and discuss some possible technologies that would allow them highly responsive to non-natural ligands, and dynamic control of gene expression in mammalian cells. Though how to bring custom-designed riboswitches as a novel and versatile tool box to gene control system is still a great challenge, the combination of structure-activity relationship information, computer based molecular design, *in vitro* selection, and high-through screening will serve as powerful tools for further development of riboswitch based gene regulatory systems.

Keywords: riboswitch, gene control, gene therapy

近年来基因治疗在人体临床试验中取得重大成功,标志该技术的有效性和安全性已获得重大突破^[1],但如何按照病情需要实时调节转基因表达水平,仍然是困扰该领域研究人员的难题^[2]。以肾性贫血的基因治疗为例^[3],促红细胞生成素(EPO)表达水平的过高表达会引起红细胞过度增生,从而引起心肌梗塞脑血栓等严重不良反应,其危害可能等同甚至大于EPO基因治疗本身带来的益处。糖尿病的基因治疗,则对胰岛素表达的时间节点和水平均有很高要求^[2]。本课题组曾采用转录调控元件调节以重组腺相关病毒为载体的基因药物(rAAV-Ins)的表达^[4]。小鼠口服rAAV-Ins后,胰岛素表达可以在1年的时间内随血糖水平而调整。但遗憾的是,胰岛素表达的高低与血糖水平变化之间有数小时的时滞,无法真正应用于临床。

长期以来,生物体内基因表达的调控一直被

认为是蛋白的“专利”。蛋白类转录因子的表达调控系统在基因治疗临床前及部分临床研究中取得了一定的成功^[2,5],但蛋白调控系统必须将编码蛋白因子的基因与治疗基因一起转染细胞,外源蛋白的免疫原性成为临床应用面临的首要问题。另外系统元件体积大、调节响应时间长等也是限制其临床应用的主要缺点。多种具有基因表达调控功能的RNA元件的发现再一次挑战了传统分子生物学中心法则中关于RNA功能的定义^[6],其中一类是首先在细菌mRNA的5'端非编码区(5'UTR)中发现的核糖开关(Riboswitch)。目前发现的天然核糖开关均仅由一段35~200 bp的核苷酸序列组成,其结构与蛋白比较如此简单,以至于在发现之初被认为其行使基因调控的能力非常有限。但深入的研究表明,核糖开关在基因表达调控方面所具有的功能与蛋白相比毫不逊色^[7]。核糖开关对基因表达的调控不需要蛋

白因子参与, 免疫原性小; 元件大小在数百碱基之内, 构成非常简单; 响应配体时间一般在数分钟之内, 反应迅速; 核糖开关位于 mRNA 之上, 发挥顺式调节作用, 可实现紧密调节^[8]。与蛋白调控系统相比较所表现出的诸多优点, 使得核糖开关自发现之日起就引起了广泛关注, 日益深入的研究结果显示其可以在代谢物检测、新药研制、基因表达调控等多个方面发挥重要作用^[9]。

1 重组核糖开关的构建

1.1 简化核糖开关

天然核糖开关在结构上可分为适体域与表达平台域两部分, 但部分核糖开关的适体域与表达平台域在结构上合二为一, 即简化核糖开关。早在正式提出核糖开关概念的 4 年前, Werstuck 等就成功组建了一种简化核糖开关^[10]。他们将配体为毒性小、可穿透细胞膜的染料 H33258 的 2 种适体 H10 和 H19 串联插入 *Lac Z* 基因的 5'UTR, 得到可在哺乳细胞内发挥作用的核糖开关。当在细胞培养基中加入配体后, 插入 H10 和 H19 适体序列与配体结合, 阻碍了 mRNA 翻译启动, *Lac Z* 基因表达水平可降低 90%。该研究不仅证明采用基因重组技术创建核糖开关的可行性, 还首次证明主要存在于原核生物的核糖开关在真核细胞内也可以发挥作用。

之后不同研究小组陆续报道了数种简化核糖开关的构建, 但所有的简化核糖开关均表现为抑制型基因调节作用。研究表明, 简化核糖开关插入 mRNA 的位置, 决定了其作用机制是阻断核糖体 43S 亚单位与 mRNA 帽子结构的结合, 还是干扰核糖体对 mRNA 扫描^[11], 多个适体结构串联应用有助于调节配体的量效动力学

范围^[12]。

1.2 复杂核糖开关

与简化核糖开关不同, 一个复杂核糖开关中含有相对独立的适体域和表达平台域, 两区域则由接头序列相连接。据研究, 复杂核糖开关中适体区域相对保守, 而基因表达平台域则有很大变化, 甚至同一个配体小分子有多个作用机制不同的核糖开关对应^[13]。因此, 构建这类核糖开关时, 一般是首先获得高度特异和高亲和力结合配体小分子的适体区域, 然后根据需求选择合适的表达调控机理, 最后通过连接元件组装成完整的核糖开关。

根据作用机理, 复杂核糖开关可分为转录终止、翻译启动和 mRNA 剪切等类型。当适体域与特定配体结合后, 核糖开关的构象随之发生改变, 从而影响 mRNA 的转录、翻译起始或前体剪接过程^[14-16]。

1.2.1 转录终止型复杂核糖开关

转录终止子是一种末端含有 polyU 尾巴的 RNA 茎环结构, 其中 polyU 尾巴对终止子的功能至关重要, 但不影响其茎环折叠。当 RNA 聚合酶进行 mRNA 的转录时, 如遭遇转录终止子的茎环结构便从转录模板脱落, 下游序列的转录随之终止。转录终止是天然核糖开关的常用机制, 数个转录终止型核糖开关串联可实现基因表达的严密调节^[17]。Fowler 等^[18]选用茶碱适体 TCT8-4 组成适体域, 以来源于枯草杆菌的 *MetI* 基因转录终止子为表达平台, 从含有抗终止子序列的文库中筛选产生接头序列, 尝试构建一种转录终止型核糖开关。很遗憾的是, 该核糖开关的最终作用机制并不是转录终止, 因为将终止子的

polyU 尾序列突变甚至敲除终止子后, 其基因调控作用仍然保留。

1.2.2 翻译启动型复杂核糖开关

核糖体结合位点 (RBS) 是位于 mRNA 上游的特异序列, 核糖体通过识别并结合 RBS 启动翻译过程。在原核生物中该序列称为 SD 序列, 在真核生物中则称为 Kozak 序列。Desai 等^[19]将茶碱适体插入 *LacZ* 报告基因 RBS 上游, 适体序列与表达平台形成的茎环结构将 RBS 屏蔽在内, 阻断了翻译启动过程。当加入茶碱后, 适体与茶碱结合形成新的构象, 将表达平台域中的 RBS 暴露在外, 有利于核糖体参与的翻译启动。与大部分天然核糖开关不同, 该核糖开关表现为激活型基因调控作用, 基因表达水平呈配体剂量依赖性增加, 最大激活指数 (激活后与激活前基因表达水平的比值) 可达 8 倍。因适体域和表达平台间接头序列的长度和碱基类别对激活指数以及配体的量效动力学范围均有显著的影响, 采用细胞内筛选法对接头序列进一步优化, 可提高激活指数至 36 倍^[20]。继续对 RBS 序列同步优化, 又可以提高激活指数至 96 倍^[21]。

1.2.3 mRNA 剪切调控型复杂核糖开关

在真核生物细胞内, mRNA 前体的可变剪切既可产生功能不同的蛋白, 又可以作为基因表达的有效调控手段^[22]。近年来相继在真菌及植物细胞 mRNA 的 5'端和 3'端 UTR 以及编码区内发现核糖开关的存在, 表明 mRNA 选择剪切型核糖开关能够在真核细胞内有效发挥基因表达调节的作用^[23-26]。一般 mRNA 前体的一个有效的剪切部位形成需要包含 3 个识别位点: 5'端识别位点、分支序列和 3'端识别位点。研究表明^[27]: 当剪切识别位点处于 mRNA 前体的发夹结构的茎

结构内时, 即被屏蔽而无法被剪切复合体识别, 对 mRNA 前体内含子的剪切过程也不再启动。mRNA 剪切调控型复杂核糖开关利用了这个特点: 通过结合配体小分子, 使剪切识别位点所处的茎环结构环境发生改变, 从而启动或阻碍剪切过程。这也是目前所发现的真核生物中核糖开关唯一的调控机制。

mRNA 前体的剪切过程分为 2 个阶段。在第一阶段, mRNA 前体在 5'剪接位点被剪切, 内含子在分支序列处形成套索结构, 但仍然与第二外显子连接在一起; 在第二阶段, 第一外显子最后一个核苷酸的 3'-羟基亲核攻击内含子-第二外显子套索结构间 3'剪接位点的磷酸二酯键, 从而使两个外显子相互连接, 内含子以套索结构形式被释放。Kim 等^[28]将茶碱核糖开关插入到前体 mRNA 的 3'剪接位点, 这种结构可以在剪切过程的第二个阶段抑制前体 mRNA 的剪接。考虑到在剪切过程的早期进行调控可能效率更高, Kim 等^[29]又尝试将核糖开关插入到编码区的内含子中, 并将内含子的分支序列位于适体域的茎结构内, 结果配体引起的核糖开关构象改变形成新的发夹结构将分支序列屏蔽, 从而在第一阶段抑制了 mRNA 的剪接。适体形成的茎环结构中, 茎结构的大小及分支序列在适体内的位置, 对剪切调控效率有明显的影响。更有意思的是, 该核糖开关还可以控制前体 mRNA 的选择性剪接。第一内含子的分支序列被屏蔽, 导致第二内含子的分支序列在第一和第二内含子 2 个 5'剪接位点间进行选择。第二内含子的分支序列如选择第一内含子的 5'剪接位点, 则有利于形成不含第二外显子的 mRNA。如果将第一内含子的分支序列以及第二内含子的 5'剪接位点同时屏蔽, 则有可能进

一步提高不含第二外显子的 mRNA 的形成比例。由于绝大多数人类基因都会采用选择性剪接方式进行调节,所以选择性剪接核糖开关可能对基因治疗更为重要。

2 重组核糖开关的筛选

2.1 适体的体外筛选

核糖开关的设计,首先要确定欲采用的配体。理想的配体应该具有可以透过细胞膜、细胞毒性小、胞内背景水平低等条件。如要应用于基因治疗,最好是选择诸如病情相关的指标性因子等为配体。理论上运用配体指数富集系统进化技术 (Systematic evolution of ligand by exponential enrichment, SELEX) 可筛选得到任何指定配体的适体^[30-33]。SELEX 体外筛选 RNA 适体的基本过程为:首先运用化学合成技术建立一个含有核苷酸随机序列的单链 DNA (ssDNA) 文库,经过体外转录得到包含 10^{15} 条左右不同序列的 RNA 文库。采用物理方法(如柱层析)筛选与特定配体结合的 RNA 序列。结合反转录和 PCR 方法扩增所选择的 RNA 序列得到新的 dsDNA 文库。经过 10~15 轮的建库、筛选与扩增,最后得到 RNA 序列即为候选适体。对其中的序列逐一进行亲和力和特异性的鉴定,符合要求的即确定为适体序列。对于一个配体一般可筛选得到数种序列各异的适体。为了获得适体核心区域序列和构象,我们开发了一种基于适体核心区域保护的聚合酶链式扩增反应 (ARP-PCR) 方法,以便对 SELEX 得到的候选适体进行精确筛选^[32]。将与靶分子结合的候选适体分子采用 Dnase I 酶进行酶切,处于单链状态的未结合序列被降解,剩余的与靶分

子结合的序列即为适体区域核心序列。之后对适体核心序列进行茎环结构分析,可实现对适体核心区域的精确定位及序列构象确认。在核糖开关构建过程中,ARP-PCR 方法还可用于检测核糖开关结合配体小分子前后构象变化,提高核糖开关体外筛选的效率。而目前核糖开关高级结构分析多是应用操作复杂的 X-衍射方法^[34]。

采用 SELEX 方法体外筛选的适体,并不一定能保证可作为核糖开关的有效部件,因体外筛选环境不能准确反映细胞内的折叠条件。另外其文库序列一般在 10^{15} 条以下,最优的适体序列或许未被包含在内;多轮筛选过程也比较耗时。

2.2 功能性核糖开关的细胞内选择

尽管基于 SELEX 体外筛选的适体可以成功构建简单的核糖开关,但其有效性在一定程度上具有偶然性。经 SELEX 体外筛选得到适体,仅极少部分可以构建成在体内发挥作用的功能性核糖开关^[35-36]。Weigand 等^[37]将 50 000 种候选适体序列进行细胞内功能筛选,最终得到的最佳序列与 SELEX 体外筛选所得到的序列大相径庭,说明对配体的亲和力和专属性仅仅是适体成为核糖开关的必要条件。

2.2.1 传统遗传筛选

遗传筛选是检测细胞中生物分子功能的最优方法,因细胞的存活与其表现型密切相关,筛选得到的细胞一定带有所需的特质。为了保证构建的核糖开关在细胞内仍然具有调控功能,Desai 等率先提出进行遗传筛选的思路^[19]。该方法的第一步是建立核糖开关文库,然后转染大肠杆菌进行遗传特质筛选。所采用的适体是经体外筛选得到的茶碱适体,基因为氯霉素乙酰转移酶。当核

糖开关被茶碱激活后,氯霉素乙酰转移酶得以大量表达,培养基内的氯霉素被降解,大肠杆菌可存活,而不含有活性核糖开关的大肠杆菌均不能生长。将筛选出来的活性核糖开关与突变体以1:1 000 000的比例混合,重新转染大肠杆菌后,按照此方法仍然可以成功地将活性核糖开关挑选出来,证明了遗传筛选方法的有效性。

Nomura等则利用双重遗传筛选方法对核糖开关进行优化^[38],其采用的核糖开关为TPP依赖型,调控的基因为*tet A*。有效表达*tet A*的大肠杆菌对四环素有抗药性,但对氯化镍敏感,而不表达*tet A*的大肠杆菌对四环素敏感,但耐受氯化镍。通过这种方法,他们从75 000株克隆中成功选择出优化的功能性TPP核糖开关,激活指数达11倍。将目的基因更换为绿色荧光蛋白等其他基因时,核糖开关的表达调控作用仍正常发挥,说明该开关可应用于多种基因的表达调控。

传统遗传筛选方法虽然可以实现活性核糖开关的选择,但这些开关的背景表达水平仍较高,核糖开关的激活指数也不够理想。其原因可能是由于文库的序列组成仍不够多样化,筛选标准是定性而不是定量指标,因此需要更新的筛选方法进行核糖开关的优化。

2.2.2 高通量遗传筛选

Lynch等将机器人辅助筛选技术应用于核糖开关胞内筛选,极大地提高了工作效率^[20]。基于接头序列对核糖开关功能有显著影响的认识,他们建立了由65 000种4~8个随机碱基组成的接头序列文库。将含有接头序列文库的核糖开关转化大肠杆菌后,首先在含X-gal但缺乏配体茶碱的选择性培养基内培养,把不表达报告基因*LacZ*的白色单菌落挑出,然后分别接种于含或不含茶

碱的选择性培养基内培养,比较同一菌落的激活指数。第一步在无茶碱的条件下选择白色单菌落是为了降低背景表达水平,防止泄露效应强的核糖开关被选择。第二步是选择激活指数高的核糖开关。在第一步筛选过程中,虽然99%的菌落是不需要的蓝色菌落,但剩余1%的白色菌落数量就达到4 000株之多,所以必须采用机器人辅助系统才能进行有效选择。

以细胞运动能力为选择标准的筛选方法^[39],较上述机器人辅助系统操作简便,可以很容易地在百万级文库内进行筛选。该方法使用的基因为*cheZ*基因,其表达与否可使大肠杆菌的表现型在原地翻滚和平稳泳动之间转变。在*cheZ*基因不表达的情况下,大肠杆菌在原地翻滚,在半固体琼脂培养基内不发生迁移。当*cheZ*基因表达时,大肠杆菌获得平稳泳动能力,可在培养基内迁移。将大肠杆菌接种于半固体培养基中,选择在无配体条件下保持在原地,但有加入配体后向周围迁移的菌落,即可得到含有所需要的核糖开关的菌落。所筛选得到的核糖开关可以指导大肠杆菌沿着配体标记的T型线路迁移,进一步证明了该方法的有效性^[40]。该方法仅需要一把标尺即可实现机器人辅助系统所具有的高通量筛选功能,值得推广。但其缺点是,*cheZ*基因的过度表达会导致细胞陷于培养基内部而失去活动能力,影响筛选效果。

流式细胞仪可以很容易地分辨信号强度微小的差异,越来越成为一个高通量、低成本、操作快速、功能强大的筛选工具。先前研究使用的文库大小一般在百万级以内,文库序列仅包含核糖开关的接头区域,而流式细胞仪则可以很容易

地在亿级文库内进行筛选。Lynch 等建立的一个由 12 个随机碱基组成的新文库^[21], 文库序列扩大到核糖开关的表达平台域。在无配体时核糖开关的适体域与表达平台域的 RBS 序列互补配对, 阻止了翻译启动。当配体与适体结合后, 核糖体与被释放出来 RBS 序列结合, 启动翻译过程。核糖体与 RBS 序列结合能力的强弱对翻译效率具有重要的作用, 对大肠杆菌而言, 能与核糖体 16S 亚基互补的 SD 序列翻译效率最高。采用流式细胞仪对新文库的筛选, 最终获得的最佳核糖开关的激活指数高达 96 倍。构效研究表明, 该最佳核糖开关不仅具有较长的核糖体 16S 亚基互补序列, 还可以与 16S 亚基形成最佳的空间结构, 其启动密码子距 16S 亚基反 SD 序列的 5' 端碱基 A 为 6 个碱基, 正好符合 4~6 个碱基的最佳距离标准。

3 存在问题与解决策略

3.1 配体与核糖开关结构

天然核糖开关一般采用代谢产物作为调节其功能的配体。如果将重组核糖开关应用于基因治疗领域, 天然代谢产物则不是配体的最佳选择, 因人体内背景浓度的存在会干扰目的基因的紧密调控。生物利用度高、药理学活性低、体内毒性小的非天然小分子配体应当成为重组核糖开关的首选。虽然基于 SELEX 技术从理论上可以获得任何配体的适体, 但迄今为止, 所获得的能在生物体内发挥调控作用的适体序列屈指可数, 所用的配体几乎均局限于茶碱、焦磷酸硫胺素 (TPP) 和新霉素等配体, 不符合上述首选配体的条件。

在天然核糖开关结构的基础上进行改造, 结合化学筛选和遗传筛选的手段, 正交选择非天然

小分子配体的重组核糖开关, 不失为解决上述问题的可选途径。腺嘌呤是 add A 核糖开关的天然配体, 通过与该核糖开关内 4 个特定的尿嘧啶结合发挥基因调控作用^[41]。将 add A 核糖开关的尿嘧啶定点突变, 采用遗传筛选技术考察 80 种非天然腺嘌呤类似物的调控作用, 发现突变体 M6 与三聚氰酸二酰胺呈现剂量依赖性调控关系, 但原配体腺嘌呤则失去了对 M6 的调控能力。与 add A 核糖开关相比, M6 的基础基因表达水平有所降低, 推测是由于突变引起了转录子的错误折叠。对位于 M6 的 P2 茎结构继续定点突变, 所得到的 2 种突变体 M6' 和 M6'' 的基因表达水平明显提高, 但激活指数仍维持在 M6 的同等水平。

3.2 热力学与动力学

配体对核糖开关的调控特征常用热力学指标来评价。配体结合前后核糖开关热力学稳定性的差异可能是决定其基因调控能力的关键因素, 因配体结合前后融点差异 (ΔT_m) 的大小与其基因调控能力成正比^[36]。游离的核糖开关处于构象可变的灵活状态, 可保证配体与其功能团发生交互作用。当配体被包裹在核糖开关结合口袋之内后, 则形成稳定的有序结构^[42-44]。如果热力学性质是核糖开关性能的决定因素, 则可以通过比较配体结合前后热力学常数, 有效预测核糖开关的调控能力, 并进一步实施定向改造。

除热力学因素外, 动力学也是影响核糖开关功能的重要因素。对于有足够的时间与它们所处的环境保持平衡的核糖开关来说, 解离常数 (K_d) 值是决定其是否因配体浓度做出反应的唯一因素^[41]。然而, 对于部分转录终止型核糖开关, 配体结合与 RNA 聚合酶反应的速度竞赛结果, 决

定了其发挥基因调控能力的高低^[45-46]。在形成核糖开关的适体域后,如果配体结合速度不够快,在终止子或反终止子构象还未形成之时,聚合酶就已经越过该段序列继续完成 mRNA 的合成,调控即宣告失败。要成功实现调控可能需要胞内的配体浓度足够高,即满足动力学调控的条件。这也可能是转录终止型重组核糖开关激活指数低于其他类型的原因之一。

3.3 原核生物与真核生物

核糖开关能否在哺乳细胞内同样发挥基因调控作用,是探索其在基因治疗应用前必须要回答的根本问题。迄今为止,几乎所有的核糖开关均来自细菌等原核生物,TPP 核糖开关是唯一在真菌和植物等真核生物内发现的核糖开关,在哺乳细胞内尚未发现天然核糖开关的存在。在生物从低等向高等的进化过程中,蛋白质在基因调控方面似乎占据了上风,低等生物中尚存的核糖开关被认为是基因调控的活化石。核糖开关功能发挥无需蛋白的参与,对于复杂的哺乳细胞来说,可能因核糖开关的作用机制过于简单而将其淘汰。最近 Kim 等^[28]设计的 mRNA 选择性剪接核糖开关在 HeLa 细胞内可以调节 mRNA 的选择性剪接,预示了其在哺乳细胞内发挥基因表达转录后调节的可能性。Endoh 等^[47]的研究则表明,转录调控型核糖开关与特定蛋白相互配合,也可以在哺乳细胞内发挥基因调控作用,提示我们研究思路的适当调整也许会产生出人意料的结果。

4 展望

构建核糖开关的关键是建立高效的配体特异性的适体筛选平台,获得适体序列的核心区

域;然后可根据表达调控区域的非保守性,结合不同的物种采用相应的基因表达调控机制以实现靶基因的快速、高效和特异的调控,如原核生物多采用转录终止型和翻译启动型复杂核糖开关;真核生物则多采用 mRNA 剪切调控型复杂核糖开关等。组合数学建模设计在优化核糖开关序列,探索核糖开关结构和功能的关系方面也可以发挥重要作用^[48]。在明确核糖开关作用机制的基础上,依据生物信息学和构效分析,可进一步设计通用型的核糖开关,用于不同组织和细胞内靶基因表达调控;同时也可以设计组织特异性核糖开关,用于肿瘤等疾病的靶向治疗。

核糖开关的发现再一次改变了人们对 RNA 的固有观念,近 10 年的研究初步揭示了其作用机制的新颖性、多样性及复杂性。通过适体域和表达平台的拼接构建可以在细胞内发挥基因表达调控作用的重组核糖开关的研究思路,现在看来虽然可行,但距离成功应用尚为时过早。天然核糖开关经历了数十亿年的进化演变才得以实现,在对其机理的认识仍嫌浅薄的今天,试图在实验室内用几周时间就制备出性能卓越的核糖开关太过乐观。但是随着对其构效关系及作用机理的深入了解,高通量自动化体内筛选技术的建立和日益成熟,借助计算机辅助设计等新型手段,及时调整研究思路与方法,核糖开关这一“化石”级调控元件一定可以在基因治疗的崭新领域发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] Alberts B. The breakthroughs of 2009. *Science*, 2009, 326(5960): 1589.

- [2] Xu RA, Chen L, Xiao WD. *Molecular Gene Medicine*. Beijing: Peking University Press and Peking University Medical Press, 2008: 42–90.
- [3] Diao Y, Xu RA, Wang GJ, et al. Adeno-associated virus mediated expression of human erythropoietin *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(1): 55–58.
- [4] Xu RA, Ma X. Orally taken carrier to transduce liver and intestine cell: CN 200310102910. 2005-04-27.
- [5] Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, et al. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther*, 2005, 12(2): 189–211.
- [6] Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 2002, 419(6910): 952–956.
- [7] Breaker RR. Complex riboswitches. *Science*, 2008, 319(5871): 1795–1797.
- [8] Dambach MD, Winkler WC. Expanding roles for metabolite-sensing regulatory RNAs. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(2): 161–169.
- [9] Blouin S, Mulhbach J, Penedo JC, et al. Riboswitches: ancient and promising genetic regulators. *ChemBioChem*, 2009, 10(3): 400–416.
- [10] Werstuck G, Green MR. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science*, 1998, 282(5387): 296–298.
- [11] Hanson S, Berthelot K, Fink B, et al. Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol Microbiol*, 2003, 49(6): 1627–1637.
- [12] Hanson S, Bauer G, Fink B, et al. Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA*, 2005, 11(4): 503–511.
- [13] Tomšič J, McDaniel BA, Grundy FJ, et al. Natural variability in S-adenosylmethionine (SAM)-dependent riboswitches: S-box elements in *Bacillus subtilis* exhibit differential sensitivity to SAM *in vivo* and *in vitro*. *J Bacteriol*, 2008, 190(3): 823–833.
- [14] Sues B, Weigand JE. Engineered riboswitches: overview, problems and trends. *RNA Biol*, 2008, 5(1): 24–29.
- [15] Weigand JE, Sues B. Aptamers and riboswitches: perspectives in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85(2): 229–236.
- [16] Weigand JE, Sues B. Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(12): 4179–4185.
- [17] Sudarsan N, Hammond MC, Block KF, et al. Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science*, 2006, 314(5797): 300–304.
- [18] Fowler CC, Brown ED, Li YF. A FACS-based approach to engineering artificial riboswitches. *ChemBioChem*, 2008, 9(12): 1906–1911.
- [19] Desai SK, Gallivan JP. Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(41): 13247–13254.
- [20] Lynch SA, Desai SK, Sajja HK, et al. A high-throughput screen for synthetic riboswitches reveals mechanistic insights into their function. *Chem Biol*, 2007, 14(2): 173–184.
- [21] Lynch SA, Gallivan JP. A flow cytometry-based screen for synthetic riboswitches. *Acids Res*, 2009, 37(1): 184–192.
- [22] Han J, Xiong J, Wang D, et al. Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trend Cell Biol*, 2011, 21(6): 336–343.
- [23] Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N, et al. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature*, 2007, 447(7143): 497–500.
- [24] Wachter A, Tunc-Ozdemir M, Grove BC, et al. Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3437–3450.
- [25] Bocobza S, Adato A, Mandel T, et al. Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom. *Genes Dev*, 2007, 21(22): 2874–2879.

- [26] Croft MT, Moulin M, Webb ME, et al. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(52): 20770–20775.
- [27] Buratti E, Baralle FE. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(24): 10505–10514.
- [28] Kim DS, Gusti V, Pillai SG, et al. An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA*, 2005, 11(11): 1667–1677.
- [29] Kim DS, Gusti V, Dery KJ, et al. Ligand-induced sequestering of branchpoint sequence allows conditional control of splicing. *BMC Mol Biol*, 2008, 9(1): 23.
- [30] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*, 2007, 24(4): 381–403.
- [31] Sinha J, Reyes SJ, Gallivan JP. Reprogramming bacteria to seek and destroy an herbicide. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(6): 464–470.
- [32] Lin JS, McNatty PK. Aptamer-based regionally protected PCR for protein detection. *Clin Chem*, 2009, 55(9): 1686–1693.
- [33] Saito H, Inoue T. Synthetic biology with RNA motifs. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(2): 398–404.
- [34] Gilbert SD, Rambo RP, Van Tyne D, et al. Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(2): 177–182.
- [35] Suess B, Hanson S, Berens C, et al. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(7): 1853–1858.
- [36] Weigand JE, Schmidtke SR, Will TJ, et al. Mechanistic insights into an engineered riboswitch: a switching element which confers riboswitch activity. *Nucl Acids Res*, 2011, 39(8): 3363–3372.
- [37] Weigand JE, Sanchez M, Gunnesch EB, et al. Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA*, 2008, 14(1): 89–97.
- [38] Nomura Y, Yokobayashi Y. Reengineering a natural riboswitch by dual genetic selection. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(45): 13814–13815.
- [39] Topp S, Gallivan JP. Random walks to synthetic riboswitches—a high-throughput selection based on cell motility. *Chem Bio Chem*, 2008, 9(2): 210–213.
- [40] Topp S, Gallivan JP. Emerging applications of riboswitches in chemical biology. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(1): 139–148.
- [41] Rieder R, Lang K, Graber D, et al. Ligand-induced folding of the adenosine deaminase a-riboswitch and implications on riboswitch translational control. *Chem Bio Chem*, 2007, 8(8): 896–902.
- [42] Montange RK, Batey RT. Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 117–133.
- [43] Schwalbe H, Buck J, Fürtig B, et al. Structures of RNA switches: insight into molecular recognition and tertiary structure. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46(8): 1212–1219.
- [44] Krstic I, Frolow O, Sezer D, et al. PELDOR spectroscopy reveals preorganization of the neomycin-responsive riboswitch tertiary structure. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(5): 1454–1455.
- [45] Wickiser JK, Winkler WC, Breaker RR, et al. The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol Cell*, 2005, 18(1): 49–60.
- [46] Greenleaf WJ, Frieda KL, Foster DAN, et al. Direct observation of hierarchical folding in single riboswitch aptamers. *Science*, 2008, 319(5863): 630–633.
- [47] Endoh T, Sugimoto N. Gene regulation system with an artificial RNA switch operating in human cells. *ChemBioChem*, 2011, 12(8): 1174–1178.
- [48] Chase LB, Christina DS. Design principles for riboswitch function. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(4): e1000363.