

• 新技术新方法 •

基于信号网络的功能细胞设计

鞠见齐^{1,2}, 魏平^{1,2}

1 北京大学 定量前沿交叉学科研究院 定量生物学中心, 北京 100871

2 北京大学 生命科学学院, 北京 100871

鞠见齐, 魏平. 基于信号网络的功能细胞设计. 生物工程学报, 2017, 33(3): 386–392.

Ju JQ, Wei P. Signaling network-based functional cell design. Chin J Biotech, 2017, 33(3): 386–392.

摘要: 细胞信号网络是细胞应对环境变化、调控细胞功能以及决定细胞命运的中央处理器。运用合成生物学方法, 人工设计细胞信号网络对于“细胞机器”的构建具有重要作用。信号网络通过编码定量的动力学信号, 能够在多个维度对细胞工程中的多个子功能单元进行调控。本文介绍了天然信号网络的动力学功能的研究进展, 阐述了基于信号网络的功能蛋白质设计的合成生物学相关的方法和思路, 并展望了信号网络在下一代合成生物学中的战略意义。

关键词: 生物网络, 信号回路, 信号动力学, 合成生物学, 细胞工程

Signaling network-based functional cell design

Jianqi Ju^{1,2}, and Ping Wei^{1,2}

1 Center for Quantitative Biology, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China

2 School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract: Cellular signaling networks act as the central processor to deal with environmental signals and regulate cell function, and determine cell fate. Using synthetic biology approach to engineer cell signaling networks is crucial for ultimately constructing man-made “cell machines”. Cellular signaling networks can encode sophisticated cell information by processing quantitatively signaling dynamics, which enables multi-dimensional regulation of functional sub-circuits. Here, we first review the research progresses on the signaling coding mechanisms; and then elaborate the methodologies and applications of cells signaling engineering; finally, we envision that signaling-based cell engineering are important for the increasingly-complicated next generation synthetic biology.

Keywords: biological networks, signaling circuits, signaling dynamics, synthetic biology, cell engineering

Received: November 16, 2016; **Accepted:** February 13, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31470819, 31622022).

Corresponding author: Ping Wei. Tel/Fax: +86-10-62750092; E-mail: pwei@pku.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31470819, 31622022) 资助。

细胞能够迅速感知复杂、多样的细胞内或环境中的物理、化学、生理等条件变化，并将其转化成细胞内的生物化学信号，精确地调控下游特定基因群的表达或细胞命运，如细胞发育、分化、炎症响应与应激反应等。这些信息接收、处理与传递的过程，如同高等生物的神经系统或者电子计算机，由蛋白质受体（信号输入）、信号转导网络（信息处理）以及基因表达调控（子功能模块）三部分组成。天然细胞中的信号网络还具有处理多样化的输入信号，并做出截然不同的命运决定的能力。信号网络是细胞运行的“中央处理器（CPU）”。信号网络的功能紊乱，将导致细胞功能缺失，是包括癌症在内的很多疾病的成因。因此，理解天然细胞信号网络的组织原理和调控机制，并能够设计构建定制化的人工信号网络，不仅能够促进对与疾病相关的信号网络的理解和干扰，同时将在生物制造、细胞治疗等细胞工程应用领域有战略意义。近几十年的细胞信号网络的研究，极大地促进了对构成这些信号系统的受体蛋白、激酶、配体蛋白等分子组分的结构与生物化学功能的认识。然而天然细胞中信号网络的分子组分多，组分之间相互作用极其复杂，使得天然信号网络的研究存在许多尚待解决的问题。例如，天然信号网络能够处理多样化上游信号的机理；信号网络的拓扑结构与其功能之间的关系；细胞信号网络信息编码与解码的分子机制等。用合成生物学方法研究信号网络，不仅能够通过以建易学（Learning by building）的思路为解决这些难题提供新的契机^[1]；而且功能信号网络的设计，能够满足日趋复杂的合成生物学基因线路设计对于高层次调控的需求^[2-3]。因此，本文将简要阐述目前信号转导网络信息编码和解

码的研究进展，讨论合成生物学改造和设计细胞内的信号网络的理论方法及应用。

1 信号网络动力学研究

环境中化学、物理条件的变化，或配体分子的结合，能够诱导细胞膜或细胞内的受体蛋白质分子发生构象改变，随后触发一系列蛋白质翻译后修饰的生物化学反应，如磷酸化、泛素化等，从而向下游传递信息，并调控代谢调控网络、基因转录网络等下游功能模块。因此，细胞信号网络具有响应时间迅速、开关效应等特性，同时具有特殊的时间依赖的响应特征，即动力学性质^[4]。由于细胞个体之间差异性和非同步化性，细胞信号动力学研究需要建立在单细胞水平上。

1.1 细胞通过随时间变化的动力学信号编码信息

理论上，一个随时间改变的信号，可能呈现为持续、衰减和振荡等基本形式。这些信号的变量，如信号的持续时间、激活速率、振荡信号的振幅和频率等，将随着输入信号的强度或种类的不同而被改变（图 1）。从细菌、酵母等单细胞生物的应激响应，到哺乳动物细胞的细胞因子反应、炎症反应，其正确的响应均需要精确调控的信号动力学^[5-7]。酵母细胞 HOG-MAPK 信号网络在受到环境中高盐渗透压时，其响应为典型的衰减型动力学信号。此外，随着环境中盐浓度的增加，响应初速度变慢，而持续时间却变长^[8-9]。运用微流控系统进行人工外部干扰信号动力学，Mitchell 等发现周期性激活 HOG-MAPK 将导致酵母的适应性降低^[10]。而同样是酵母细胞中的 Msn2、Crz1 等信号分子却能够在外部刺激恒定的情况下，产生自发式的周

期性振荡式信号^[7,11]。Cai 等发现不同浓度的 Ca^{2+} 刺激下, Crz1 通过调控其振荡频率 (FM), 而不是振幅 (AM) 实现下游基因的功能。而调频的功能非常具有独特性, 能够成比例地调控下游与应激相关的基因群^[11]。Lin 等进一步研究发现, 多个信号节点之间能够通过调控振荡峰的相位, 组合式地调控下游基因的表达^[12]。同样, 在高等生物的发育、免疫、增殖分化等过程中扮演重要角色的 NF- κ B 信号网络, 也能在不同刺激条件下表现出不一样的动力学过程。受到肿瘤坏死因子 $\text{TNF}\alpha$ 刺激时, NF- κ B 的响应为衰减式振荡; 细菌抗原 LPS 刺激下, NF- κ B 产生了持续的响应^[13-15]。正是这种动力学过程的差异, 决定了 NF- κ B 作为转录因子选择性激活不同组合的基因^[16]。抑癌因子 p53 信号网络也存在类似的性质: 在紫外射线的刺激下, p53 被持续性激活从而导致细胞衰老; 在伽马射线刺激下, p53 产生周期性振荡的动力学活化过程, 致使细胞能够修复 DNA 损伤^[17]。最近, Paek 等发现细胞接收化疗药物的处理过程中, 其凋亡由 p53 激活的速率决定, 而非活化数量^[18]。不断积累的证据表明, 天然的细胞能以信号动力学为

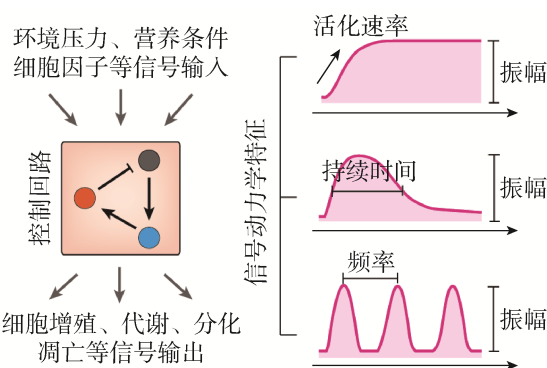


图 1 信号网络结构决定的动力学特性

Fig. 1 Network topology-based signaling dynamics.

载体, 在另一个维度上编码和传递信息, 实现对细胞命运的调控^[4,19]。

1.2 编码动力学信号的网络结构基础

尽管构成细胞内信号转导网络的分子组分及其相互作用非常复杂, 系统生物学研究从理论上揭示了网络在结构上可能存在简单的规律。复杂网络构成存在基本的结构单元, 如负反馈 (Negative feedback)、正反馈 (Positive feedback)、不一致前馈 (Incoherent feedforward) 和一致性前馈 (Coherent feedforward) 等。而且, 特定的功能也潜在地由特殊拓扑结构的网络所决定, 意味着功能性生物网络具有可预测性和可设计性。Santos 等发现对 PC-12 细胞用不同的生长因子刺激 (NGF 或 EGF), 受到不同的反馈回路调控, 分别产生衰减型和持续型 Erk 激活过程, 分别决定细胞的增殖和分化^[20]。Ma 等通过理论计算, 推断出负反馈回路与不一致前馈回路是实现精确的自适应动力学信号 (即衰减型信号) 的基本网络结构^[21]。此外理论与实验结合研究表明, 振荡型信号需要具有时间延迟的负反馈回路来实现^[22-23]。哺乳动物细胞中, NF- κ B 振荡网络中存在由 NF- κ B 诱导的 I κ B 蛋白转录构成的负反馈回路; 同样, p53 振荡式信号是由 p53 活化诱导的 Mdm2 形成的负反馈回路产生的^[15,17]。在此基础上, 额外的正反馈回路会显著提高振荡功能的鲁棒性^[24-25]。信号网络这种由结构决定功能的性质, 为人工改造和设计构建新功能的生物网络提供了理论基础。

2 信号网络人工改造和合成

相对于基因线路的合成生物学设计, 信号网络的人工构建目前仍然存在着巨大挑战^[3]。缺乏有效蛋白质工具是制约信号网络人工设计的

主要瓶颈。如前所述,信号网络由蛋白质节点之间的相互作用、催化反应等方式连接。人工设计的链接严重依赖于可设计的全新蛋白-蛋白相互作用,以及定制式的受体或蛋白质设计等。然而,当前的功能蛋白质设计的能力远远不能满足合成生物学的需要。此外,由于信号网络的动力学功能发生的时间尺度快,目前仍缺乏有效的手段对人工设计的网络进行实时检测以验证设计的合理性。因此,当前的信号网络的合成生物学研究主要着力于对天然信号网络进行干扰和改造。

2.1 信号蛋白质工具的开发

蛋白质是构成信号网络的核心元件。构成信号网络的蛋白质分子包括受体、蛋白质激酶与去磷酸化酶、配体、支架蛋白以及转录因子等。这些信号蛋白往往由多个结构域(Domain)或者功能片段(Motif)融合而成,因此具有高度的模块化性质^[26-27]。Peisajovich等尝试将酵母 Mating 信号网络中的 11 个蛋白质的结构域进行理性重新组合,在得到的 66 个新蛋白中 15% 以上获得了新的信号调控功能^[28]。Dueber 与 Yeh 等通过人工置换信号蛋白中的调控结构域,可以设计出感知新输入信号的蛋白^[29-30]。工程设计能够感知新信号的受体蛋白以及各类信号的开关蛋白,一直是信号网络合成生物学研究的热点。

受体是细胞信号网络感知输入信号的终端。人工受体可以实现直接对下游信号网络的人工控制,如人工改造的 GPCR 可以改变细胞的趋化特异性,控制细胞的运动方向^[31]。受体蛋白也可以通过模块化重组进行新功能设计。受体膜蛋白分子可包含信号接受模块(胞外段)、跨膜结构、信号传递模块(胞内段)及其他调控模块。将胞外段替换成其他配体识别结

构域,即能改变受体的信号特异性。在临床研究中,得到成功应用的肿瘤特异性嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR),正是将肿瘤抗原特异性单链抗体片段作为受体胞外抗原识别模块链接到 T 细胞信号模块上,从而获得高肿瘤抗原特异性的细胞杀伤能力^[32-33]。

光遗传学方法设计的光控分子开关,能够使信号系统接收光信号,使得该类蛋白工具具有独特的应用价值。感光蛋白(如 PhyB/Pif6 系统)在接受特殊波长光刺激的条件下,诱导蛋白质构象的改变,触发感光结构域之间的相互作用,从而激发下游信号网络^[34-35]。光控分子开关不仅使得系统的输入信号具有精确的时间、空间上的可调控性,同时可以实现电脑智能化控制的细胞功能^[36]。

2.2 信号网络的人工改造

运用合成生物学方法,对天然细胞的信号网络进行改造,不仅能够迅速产生新的细胞功能,同时能够通过引入对人工网络结构的扰动,促进对天然信号网络的理解。对于天然网络的人工改造主要包含两种思路。首先,可以通过引入正交的人工分子开关,实现直接控制输入模式来编程信号动力学。Toettcher 等构建了能够通过光控制的 Ras 蛋白激活元件,实现光控动态激活 Erk 信号通路,发现不同动力学过程能够引起蛋白组水平的磷酸化状态的变化^[35]。其次,通过引入新的调控节点,改变动力学性质,如在原信号网络中引入额外的反馈回路。Bashor 等通过在酵母 Mating 信号网络的支架蛋白 Ste5 上连接新的蛋白结合位点,构建正、负反馈回路,系统性地重构了该网络的动力学性质^[37]。运用同样的思路,引入人工负反馈回路重塑了酵母 Osmotic 信号网络的频率响应性质^[10,38]。研究表明,通过一个人工设计的分子开关,能够实时地、定量地

调控免疫 T 细胞的增殖和细胞因子的分泌^[38]。

2.3 细胞信号网络的全新设计

全新信号网络的设计,是满足定制式、智能化功能细胞设计根本目标,也是真正实现合成人工生命的重要部分。局限于有限的蛋白质工具,目前尚无真正意义上从头设计的信号网络。尽管如此,O'Shaughnessy 等通过嫁接的方式,将源自哺乳动物细胞的 MAPK 信号模块在酵母细胞中重构,结合理论计算探讨了这种依赖于蛋白质骨架的信号模块的调控特性^[39]。Chau 等同样在酵母细胞中,运用外源 PI3K 等激酶模块,构建了能够产生自极化效应的信号模块^[40]。尽管当前的工作仍然局限于对天然网络的修饰,或者构建局部网络模块,尚未能实现包括信号输入、处理以及输出的整体网络的设计构建,该类研究仍然为人工信号网络全新设计提供了理论基础。随着新工具的开发,结合精巧的设计思路,从头设计全新的功能信号网络指日可待。

3 信号网络设计的应用

如前文所述,信号网络的动力学性质直接决定多种下游细胞功能与命运。因此,人工设计改造细胞信号网络具有广泛的应用价值。特别是在基于细胞的疾病治疗中,信号网络的合成生物学研究具有重要的意义。首先,人工设计的信号网络将能够实现细胞运动定向控制,比如控制细胞特异性定位到病灶部位,释放药物或分泌细胞因子^[31];其次,运用分子开关对细胞的信号通路进行外部调控,可以理想化地控制细胞的增殖、细胞因子的分泌以及细胞毒性,控制细胞非特异性或过激活产生的毒副作用^[38];最后,直接改造肿瘤抗原特异性受体,实现靶向性细胞杀伤功能。该方法已经在临床实验中得到广泛的应用^[33]。此

外,信号网络的人工设计思路也对其他基于合成生物学的领域具有重要意义。例如在代谢工程领域,运用人工设计的支架蛋白有效提高了目标代谢物的产量^[41],而引入产物负反馈调控的合成途径,能够显著优化产量^[42]。

4 总结与展望

基于细胞信号网络的合成生物学研究还处于起步阶段,尤其是全新从头设计的功能信号网络。首先,缺乏有效的蛋白质工具严重制约了人工信号网络的设计构建能力,尤其是能够执行正交化蛋白质修饰、识别和去修饰(对应于信号的写、读和擦)功能的蛋白质元件。其次,信号网络的结构与功能关系的理论基础的薄弱,使得当前的网络设计缺乏系统性和可预测性。因此,通过对天然细胞中的信号网络的构建原理、调控机制的深入理解,结合系统生物学的指导,进行人工模型系统的系统性设计,以期从根本上揭示普适的网络设计原理^[43]。信号网络的合成生物学研究是下一代合成生物学的重要内容。随着基因线路、合成代谢途径等人工构建功能模块的复杂度的增加,以及未来人工细胞设计调控层次化、功能多样化的发展方向,亟需定制式的信号网络的设计,行使中央控制系统(控制回路)角色,满足对上、下游子功能单元集成化、智能化的调控^[44]。

REFERENCES

- [1] Elowitz M, Lim WA. Build life to understand it. *Nature*, 2010, 468(7326): 889–890.
- [2] Lim WA. Designing customized cell signalling circuits. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(6): 393–403.
- [3] Kiel C, Yus E, Serrano L. Engineering signal transduction pathways. *Cell*, 2010, 140(1): 33–47.
- [4] Behar M Hoffmann A. Understanding the temporal

- codes of intra-cellular signals. *Cur Opin Genet Dev*, 2010, 20(6): 684–693.
- [5] Locke JC, Young JW, Fontes M, et al. Stochastic pulse regulation in bacterial stress response. *Science*, 2011, 334(6054): 366–369.
- [6] Behar M, Barken D, Werner SL, et al. The dynamics of signaling as a pharmacological target. *Cell*, 2013, 155(2): 448–461.
- [7] Hao N, Budnik BA, Gunawardena J, et al. Tunable signal processing through modular control of transcription factor translocation. *Science*, 2013, 339(6118): 460–464.
- [8] Muzzey D, Gómez-Urbe CA, Mettetal JT, et al. A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell*, 2009, 138(1): 160–171.
- [9] Macia J, Regot S, Peeters T, et al. Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Sci Signal*, 2009, 2(63): ra13.
- [10] Mitchell A, Wei P, Lim WA. Oscillatory stress stimulation uncovers an Achilles' heel of the yeast MAPK signaling network. *Science*, 2015, 350(6266): 1379–1383.
- [11] Cai L, Dalal CK, Elowitz MB. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature*, 2008, 455(7212): 485–490.
- [12] Lin YH, Sohn CH, Dalal CK, et al. Combinatorial gene regulation by modulation of relative pulse timing. *Nature*, 2015, 527(7576): 54–58.
- [13] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 2008, 132(2): 344–362.
- [14] Nelson DE, Ihekweba AEC, Elliott M, et al. Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, 2004, 306(5696): 704–708.
- [15] Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, et al. The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, 2002, 298(5596): 1241–1245.
- [16] Ashall L, Horton CA, Nelson DE, et al. Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF- κ B-dependent transcription. *Science*, 2009, 324(5924): 242–246.
- [17] Purvis JE, Karhohs KW, Mock C, et al. p53 dynamics control cell fate. *Science*, 2012, 336(6087): 1440–1444.
- [18] Paek AL, Liu JC, Loewer A, et al. Cell-to-Cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing. *Cell*, 2016, 165(3): 631–642.
- [19] Purvis JE, Lahav G. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell*, 2013, 152(5): 945–956.
- [20] Santos SDM, Verveer PJ, Bastiaens PIH. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(3): 324–330.
- [21] Ma WZ, Trusina A, El-Samad H, et al. Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation. *Cell*, 2009, 138(4): 760–773.
- [22] Elowitz M B, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, 403(6767): 335–338.
- [23] Novák B, Tyson JJ. Design principles of biochemical oscillators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(12): 981–991.
- [24] Chen Y, Kim JK, Hirning AJ, et al. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium. *Science*, 2015, 349(6251): 986–989.
- [25] Tsai TYC, Choi YS, Ma WZ, et al. Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. *Science*, 2008, 321(5885): 126–129.
- [26] Good MC, Zalatan JG, Lim WA. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*, 2011, 332(6030): 680–686.
- [27] Bhattacharyya RP, Reményi A, Yeh BJ, et al. Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75(1): 655–680.
- [28] Peisajovich SG, Garbarino JE, Wei P, et al. Rapid diversification of cell signaling phenotypes by modular domain recombination. *Science*, 2010, 328(5976): 368–372.
- [29] Yeh BJ, Rutigliano RJ, Deb A, et al. Rewiring cellular morphology pathways with synthetic guanine nucleotide exchange factors. *Nature*, 2007, 447(7144): 596–600.

- [30] Dueber JE, Mirsky EA, Lim WA. Engineering synthetic signaling proteins with ultrasensitive input/output control. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(6): 660–662.
- [31] Park JS, Rhau B, Hermann A, et al. Synthetic control of mammalian-cell motility by engineering chemotaxis to an orthogonal bioinert chemical signal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(16): 5896–5901.
- [32] Roybal K T, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell*, 2016, 164(4): 770–779.
- [33] Maude S L, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *New Eng J Med*, 2014, 371(16): 1507–1517.
- [34] Levskaya A, Weiner OD, Lim WA, et al. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature*, 2009, 461(7266): 997–1001.
- [35] Toettcher JE, Weiner OD, Lim WA. Using optogenetics to interrogate the dynamic control of signal transmission by the Ras/Erk module. *Cell*, 2013, 155(5): 1422–1434.
- [36] Toettcher JE, Gong D, Lim WA, et al. Light-based feedback for controlling intracellular signaling dynamics. *Nat Methods*, 2011, 8(10): 837–839.
- [37] Bashor CJ, Helman NC, Yan SD, et al. Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. *Science*, 2008, 319(5869): 1539–1543.
- [38] Wei P, Wong WW, Park WJS, et al. Bacterial virulence proteins as tools to rewire kinase pathways in yeast and immune cells. *Nature*, 2012, 488(7411): 384–388.
- [39] O'Shaughnessy EC, Palani S, Collins JJ, et al. Tunable signal processing in synthetic MAP kinase cascades. *Cell*, 2011, 144(1): 119–131.
- [40] Chau AH, Walter JM, Gerardin J, et al. Designing synthetic regulatory networks capable of self-organizing cell polarization. *Cell*, 2012, 151(2): 320–332.
- [41] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753–759.
- [42] Zhang FZ, Carothers JM, Keasling JD. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(4): 354–359.
- [43] Lim WA, Lee CM, Tang C. Design principles of regulatory networks: searching for the molecular algorithms of the cell. *Mol Cell*, 2013, 49(2): 202–212.
- [44] Kim A K, DeRose R, Ueno T, et al. Toward total synthesis of cell function: reconstituting cell dynamics with synthetic biology. *Sci Signal*, 2016, 9(414): re1.

(本文责编 郝丽芳)



魏平 研究员，2002年本科毕业于南开大学微生物学系，2007年获北京大学物理化学专业博士学位。2008年至2013年期间，加州大学旧金山分校 (UCSF) 与霍华德休斯医学研究所 (HHMI) 从事博士后研究工作，师从著名的合成生物学家 Wendell A. Lim 教授，开展细胞信号转导网络网络的合成生物学研究工作。2013年7月起，加入北京大学定量生物学中心及生命科学学院，北京大学-清华大学生命科学联合中心，任PI研究员，开展独立研究。2014年，入选中组部第5批青年千人计划。主要研究方向为生物网络的人工设计合成，功能细胞的合成生物学设计与改造，并致力于基于肿瘤免疫治疗的T细胞信号网络的工程化设计。