





研究信

基于 dna - rna -三联体的转录调控整合到分子逻辑门中

Graziano Rilievo¹,  idro Ceconello¹, Nim  oladi Ghareshiran¹,
Massimiliano Magr  edrich C. Simmel² and  io Vianello¹

¹ 帕多瓦大学比较生物医学与食品科学系, 意大利莱纳罗

² Mu chen 工业大学物理系, 德国 Mu chen Garching

对应

A. Ceconello, 帕多瓦大学比较生物医学与食品科学系, viale dell' universita 16,35020 Legnaro (PD), 意大利

电话:+39 (0)49 8272916

电子邮件:alessandro.ceconello@unipd.it

(2023 年 6 月 28 日收到, 2023 年 8 月 7 日修订, 2023 年 8 月 8 日接受)

doi: 10.1002 / 1873 - 3468.14721

编辑:Michael Brunner

近年来, 越来越多的非编码 RNA 分子被鉴定为参与基因调控的内源性 DNA-RNA 杂交三联体的可能组成部分。三从结构可能参与复杂的分子信号网络, 如果了解这些信号网络, 将使生物计算组件的工程成为可能。在这里, 通过利用这种三联体的增强和抑制作用, 我们在体外证明了基于三联体的分子门的构建: “专有或” (XOR), “专有或非” (XNOR), 以及一个阈值门, 通过荧光 RNA 适体的转录。生物分子集成系统在广泛的转录输出间隔(从剧烈抑制到显著增强)中显示出精确的调制。目前的贡献是利用 DNA-RNA 三重纳米结构开发分子门的第一个例子。

关键词:适体;大肠杆菌;荧光;启动子;合成生物学;r70

在合成生物学的工具箱中, 形成替代的非双链核酸结构代表了控制生化过程的一种有价值的方法[1-3]。这是由于许多原因, 包括它们与基因启动子和内切酶限制性位点等生物靶标的参与[4,5], 它们使用特定稳定剂[6]的可调性, 以及它们与其他天然或人工单链和双链核酸结构的兼容性[7,8]。此外, 非规范核酸结构似乎通过调控基因表达[9], 在细胞分化和癌症发展中发挥作用。这些生物学机制通常可以被表示为门控机制, 其中在许多刺激中, 分子信号,

与“操作员”交互, 将信号解释为输入, 产生类似于门[10]的输出, 从而实现分子计算。在许多核酸超分子结构中, 混合三重结构包括一个双工 DNA 和一个单链 RNA, 它以平行或反平行的几何形状与双工的同嘌呤序列(a, G)相互作用。图 1A 显示了两种主要的嘧啶(C-G?C, T-A?U)和嘌呤基序(C-G?G, T-A?A)的杂交 DNA-DNA-RNA 三联体。这些结构被称为 Hoogsteen 相互作用[11]的氢键稳定, 并且它们被提出通过与 dna 结合蛋白[12]竞争在基因调控中发挥作用。

缩写

DFHBI-1T, ((Z)-4-(3,5-二氟-4-羟基苄基)-2-甲基-1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-咪唑-5(4H)-one);EMSA, 电泳迁移率转移测定法;lncRNA, 长链非编码 RNA;RNAP, RNA 聚合酶;rNTP, 三磷酸核糖核苷;TFO, 三聚体形成寡核苷酸;TTS, 三联体靶位;TU, 转录单位;XNOR, 排他性 NOT-OR;XOR, 排他或。

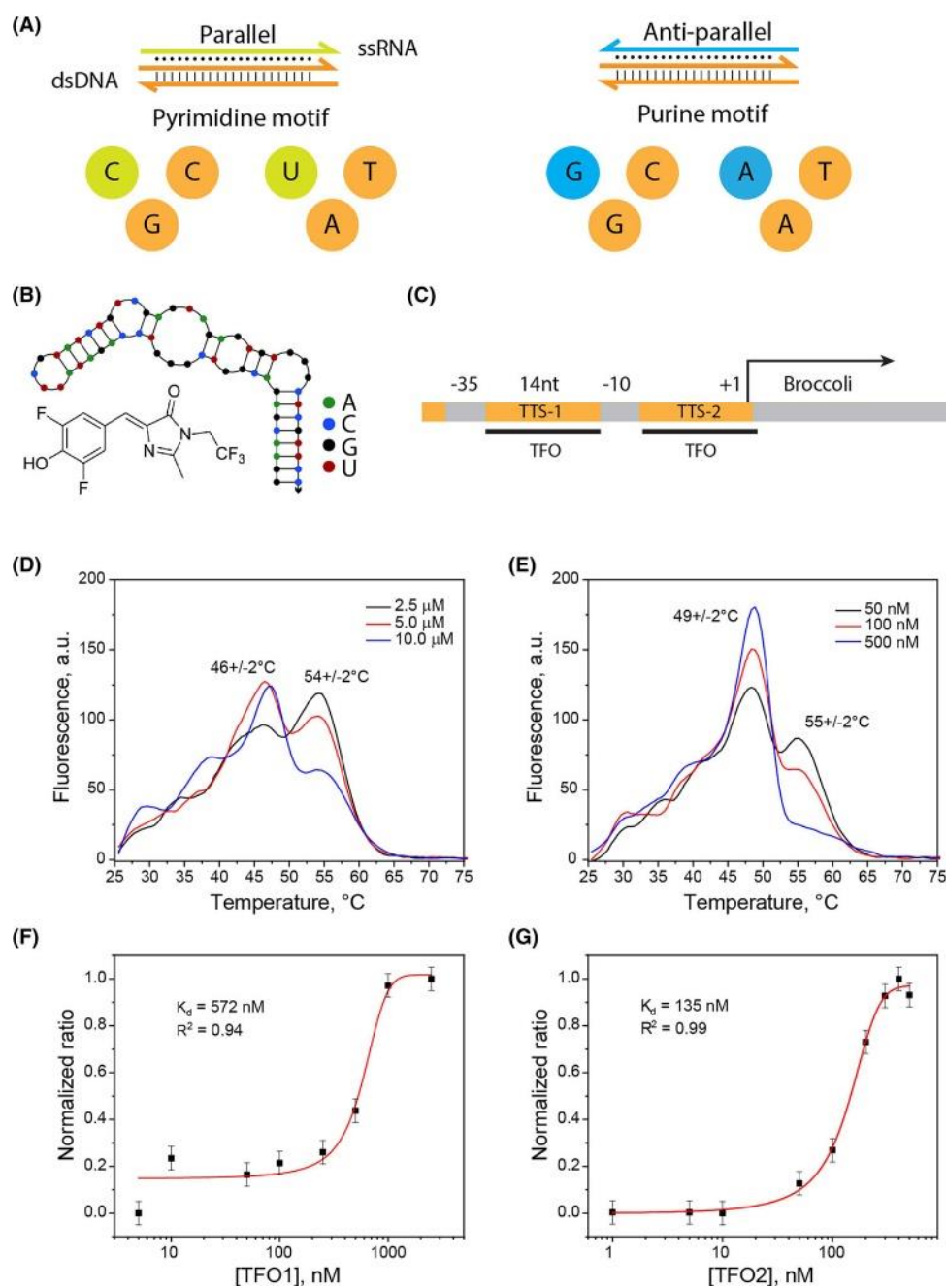


图 1 所示。(A) DNA-RNA 三重结构的嘧啶(左)和嘌呤(右)基序示意图。橙色表示 DNA，而绿色或蓝色分别表示嘧啶或嘌呤丰富的 RNA。(B)西兰花适体的预测结构和荧光配体 DFHBI-1T 的分子结构。(C) r^{70} bacterial 启动子结构。三重靶点 TTS-1 和 TTS-2 用橙色部分表示，而各自的 RNA TFOs 用黑线标记。- 35、14 nt、- 10 和 +1 分别表示:以转录起始核苷酸上游 35 个核苷酸为中心的保守序列、以转录起始核苷酸上游 10 个核苷酸为中心的非保守区、以转录起始核苷酸上游 10 个核苷酸为中心的保守序列和转录起始核苷酸。(D, E)在含有 100M 个双链 TTS 的溶液中，用 TFO1 (D)或 TFO2 (E)培养，在 520 nm 处显示噻唑绿辐射的熔化曲线。与熔化温度相关的误差是通过至少 8 个独立的熔化实验估计的。(F, G)分别分析 TFO1-TTS 或 TFO2-TTS 的三重熔化曲线，其中 D 和 E 所示的三重/双峰的比例与各自的 TFO 浓度对应。误差条表示三个独立实验的标准差。TTS 和 TFOs 个体曲线见图 S1 和 S2。

最近，一个被称为长链非编码 RNA (lncRNAs)的 RNA 家族被认为与真核生物的基因调控有关，其中 RNA - DNA 三联体的参与被认为[13,14]。DNA/RNA 纳米结构在生物体中发挥着比以前认为的更重要的作用，这一发现模糊了纳米材料和生物科学应用之间的界限[1,15,16]。最近引入的荧光 RNA 适配体，以及可负担得起的定制序列寡核苷酸的商业可用性，为该领域研究此类核酸结构提供了强大的工具[14,17 - 20]。具体来说，荧光 RNA 适体的体外聚合可以通过荧光发射变化来检测转录活性，这与 RNA-配体复合物浓度的增加有关[21 - 24]。该方法允许直接测量转录率以及转录物可视化和显微定位，避免了额外的染色，从而防止了外部偏差的引入。

RNA 三聚体形成寡核苷酸(TFOs)作为上调或下调转录的分子工具的潜力在我们小组最近的一篇论文中首次得到强调。简而言之，三联体复合物的形成影响转录速率取决于(a)三联体靶位点(TTS)与位置+1(即转录物的起始点)的距离，(b) TTS 在意义链或模板链中的位置，以及(c)三联体基序。本文描述和讨论了影响三联体产率的不同参数的优化，聚合速率的微调，以及先前发现的 TFOs 和转录单元(TUs)的分子细节。最重要的是，我们证明了使用三聚体作为逻辑门机制的生物分子换能器的可行性，因此它们可能在未来应用于构建细胞中的生物计算网络[10,26]。具体而言，我们展示了具有代表性的基于三路复用的设计，展示了逻辑门输出行为(XOR 和 XNOR)和阈值门的分子实现[27,28]。总的来说，目前的贡献证明了增强和抑制三重效应子的集成，导致转录调制范围的扩展，远远超过以前的报道，并为其在转录-翻译系统中的使用铺平了道路。

材料和方法

试剂

所有核酸序列列于表 S1，购自 IDT (Integrated DNA 技术公司)。

USA 爱荷华州珊瑚城)。原液在水中配制，保存在 - 20° C。核糖核苷酸混合物(rNTPs)和大肠杆菌 RNA 聚合酶(RNAP)全酶购自新英格兰生物实验室公司(Ipswich, MA, USA)，保存于 - 20° C。实验部分使用的缓冲液为 Tris-HCl (J.T. Baker, Avantor-VWR, PA, USA)、MES (Sigma-Aldrich- Merck, 达姆施塔特, 德国)和 TBE 缓冲液(Millipore, Millipore-Merck, 达姆施塔特, 德国)。浓缩 HCl 购自 Sigma-Aldrich, 氢氧化钠购自 J.T. Baker。KCl、MgCl₂、二硫苏糖醇(DTT)、Triton X-100、丙烯酰胺/双丙烯酰胺 19:1 溶液、过硫酸铵(APS)、N、N、N₀、N₀-四亚甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(SDS)和溴酚蓝购自 Sigma-Aldrich。核酸染色恶唑金和噻唑绿购自 USACA 弗里蒙特 Biotium 公司。DFHBI-1T ((Z)-4-(3,5-二氟-4-羟基苄基)- 2-甲基-1-(2,2,2-三氟乙基)- 1h -咪唑-5(4 H)- 1)购自 Lucerna 公司。所有溶液均使用 Genie 直接纯水装置(RephiLe Bioscience 有限公司，上海，中国)的超纯水制备，电阻率至少为 18.0 MΩ ?cm。

仪表

采用 Mastercycler Nexus-GX (Eppendorf 公司， Hamburg, Germany)进行双链退火。时间相关荧光测量使用 Clariostar (BMG LABTECH, Ortenberg, Baden-Wurttemberg, Germany)和 384 孔康宁公司(New York, NY, USA)板进行，除了阈值门的时间相关荧光测量外，使用 VICTOR X4 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)和 Lumox 384 多孔板(Sarstedt, N E umbrecht, Germany)使用 485/535 nm 激发/发射滤波器。熔化温度实验使用 Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)，样品放置在带有光学透明帽的管中(thermofisher Scientific 公司， Waltham, MA, USA)。电泳在 Mini-PROTEAN Tetra System 电泳室(BIO-RAD, Hercules, California, USA)中进行，连接到 PowerEase Touch 350 W 电源(Invitrogen-Thermo Fisher, Waltham, MA USA)。电泳凝胶荧光图像使用 iBright1500 成像系统(Invitrogen-Thermo Fisher Scientific168 Third Avenue Waltham, MA, USA)获取。

用于生成所有统计和图形分析的数据分析软件为 ORIGINPRO 2018B(OriginLab Corp.， Northampton, MA， USA)。

样品制备

所有双链 DNA 在 Mastercycler 中通过退火 10 l_m of 互补链得到

50 mM NaCl，温度范围为 95 ~ 25℃。原液保存在 -20℃。

rna 聚合实验、温度依赖性变性实验和电泳迁移率转移实验(EMSA)的样品是在新英格兰生物实验室推荐的改良版 rna 聚合缓冲液中制备的。本研究的缓冲液组成为:40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, pH 6.9。pH 优化时，用 MES 40 mM 代替 Tris-HCl 缓冲液，用小体积的浓氢氧化钠或 HCl 获得不同的 pH 值。EMSA 实验在 12% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺 19:1 凝胶中进行，在 1X TBE 缓冲液中制备，pH 6.9，含有 10 mM MgCl₂, 1.25 mg/mL APS 和 0.05% TEMED。电泳运行在 75 V 冰下，持续 2 小时。然后将凝胶在新配制的含有恶唑啉 1X 的染色溶液中轻轻搅拌染色 10 分钟。之后，使用 UV 激发获得凝胶带发射。

三组分变性分析

在改性的 RNAP 反应缓冲液中，使用 100 nM TTS 在不同 TFO1 或 TFO2 浓度下进行温度依赖性变性。在 4℃ 下孵育 30 分钟后，将 10 μL 的混合物转移到含有 8 μL 水和 2 μL 噻唑绿溶液的管中。分析在 Stratagene Mx3000P 中进行，该仪器测量温度斜坡下的荧光发射。单个 RNA 链和仅 dsDNA 的变性曲线见图 S1 和图 S2。

rna 聚合速率分析

聚合速率用 16 μM RNAP1, 160 μM DFHBI-1T，在没有 TFO(优化实验)，存在一个或两个 TFO(异或门和异或门)，存在两个 TFO(阈值门)，或原位产生 TFO(分子连接系统)。首先，对 200 nM 双链 DNA 转录单元 TU1 在 pH 5.5 ~ 7.5 范围内不同样品的聚合速率进行了评价。同样，双链 DNA 模板浓度在 30-600 nM 范围内用于确定其对转录的影响。最后，评估 rNTP 浓度。在这种情况下，rNTP 浓度范围为 0.5 至 4.0 mM，在 40 nM 的双链模板存在下用于 rna 聚合反应。在此优化步骤完成后，在 pH 6.9, 200 nM 模板和 4 mM 核糖核苷酸混合物的条件下进行所有后续实验。

当需要 RNA 双链形成时，将两条链在等摩尔浓度下孵育并退火 30 分钟。对于阈值门，在双链模板存在的情况下，测试 TFO1(输入, I)和 TFO2(阈值, Th)浓度的不同比例。样品的 TFO1: TFO2 比例为 0.01:1 ~ 100:1(单个寡核苷酸浓度为 1 nM ~ 10 μM)，TU8 的恒定浓度为 100 nM。在 pH 为 6.9 的改性 RNAP 反应缓冲液中，4℃ 孵育 30 min。孵育后，加入 16 μM RNAP 和 4 μM rNTP。利用 Victor X4 平板阅读器收集新形成的 RNA 适体上荧光基团结合产生的荧光发射。测量在 29℃ 下进行 5 小时，荧光数据在 120 分钟的时间段内线性拟合，一旦达到稳定(通常在聚合开始后 1 小时)。用 OriginPro 软件计算并绘制荧光率(估计为发射强度随时间的变化)。

结果

基于大肠杆菌 ⁷⁰ 的工程 TUs 包括西兰花荧光核酸适配体转录模板上游的启动子，对其进行序列修饰，以包含与 RNA 寡核苷酸形成三螺旋复合物的靶标(tts)(所有 DNA 和 RNA 序列见表 S1)。图 1A 简要描述了代表全嘌呤或全嘧啶基序的最稳定杂交三联体的核碱基[29,30]。这些短 RNA 序列被命名为三聚体形成寡核苷酸(TFOs)，研究了它们对工程 TUs 转录率的影响。在体外 RNA 聚合过程中，利用西兰花适体-dfhbi - 1t 复合物形成的荧光发射变化及其伴随的量子产率增加来估计转录率。图 1B 显示了西兰花配体 DFHBI-1T，适配体预测了二级结构(nupack.org, Caltech)，其中末端茎被延长以增加适配体的稳定性。三种不同的 TTS 设计可以放置在 r⁷⁰ promoter 的非保守区域内(图 1C，关于序列设计的详细信息见表 S1)。具体而言，这些 TUs 基于大肠杆菌一般启动子结构，包括一致序列 - 35 和 - 10 以及在这两个序列之间(TTS-1)或在 - 10 和转录起始核苷酸+1 之间(TTS-2)引入的人工 tts。第三种设计在同一启动子中包含两个 tts，称为 TTS-3。

使用熔化曲线分析评估三相形成(图 1D,E)。在这些实验中,我们的目标是改进当前的三聚体分析方法,这些方法受到基于经典高显色性实验或荧光团修饰寡核苷酸的熔化温度测定的一般问题的影响。我们使用核酸荧光染色噻唑绿(520 nm 发射)作为三聚体和双聚体变性的报告蛋白。曲线清楚地显示了两个峰,这是由于 TFO1-或 TFO2-TTS 三相体和双相 DNA 在相应的熔融温度下发生的变性事件。 2°C 或 $49\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $55^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 分别(图 1D,E 分别)。结果表明,相对于双链,三链分离发生在较低的温度下,这与三链配合物的较低稳定性相一致。值得注意的是,目前使用普通核酸荧光染色测定熔融温度的方法可以成功地区分 TFO-TTS 对[25]的双链和三链的变性峰。此外,熔解曲线分析表明,标准化三重熔解温度在 TFO 浓度区间(图 1F,G)的 s 型拟合导致与嘧啶和嘌呤基序相关的解离常数分别为 572 和 135 nM,与先前报道的值一致。

在此基础上, 我们设计了一个增强和抑制 TTS-TFO 组合图谱, 将它们的作用整合到更复杂的 TUs 中(图 2A)。左图显示了 TU 内 TTSs 的几何形状, 右图显示了三聚体形成对西兰花聚合速率的影响(红条表示抑制的百分比, 绿条表示增强的百分比)。抑制作用最强的(两个嘌呤基序 TTSs 显示了 90%), 而两个嘧啶基序 TTSs 显示了最强的增强(+200%)位于同一启动子上。作者认为, 这种 TTS-TFO 相互作用可以理想地扩展到一个开/关数字系统的构建之外, 并用于获得例如基于分子机制[31]的连续值计算。

下一步，我们将重点放在优化聚合条件上，因此，我们进行了一组实验来测试该系统。首先，使用转录单元 TU1，在 pH 值 5.5 到 7.5 之间的范围内进行 pH 依赖活性评估，结果表明，在我们的实验条件下，大肠杆菌 RNAP 用于西兰花生产的 pH 值最优是在基本 pH 值[32]，尽管在微酸性条件下仍显示出活性(图 2B)。因为，在

一方面, 酸性 pH 会抑制 RNAP 酶催化作用, 但另一方面, 碱性 pH 会破坏噬嘧基序三联体的稳定, 因此选择接近中性的 pH 用于三联体的形成, 作为酶的最佳 pH 和促进三联体形成的 pH 之间的折衷。

图 2C 显示了 40 nM 双工 DNA 模板在不同浓度的核糖核苷酸混合物(来自

0.5 ~ 4 mM), 呈线性关系。对于 *ma* 聚合方案, 我们选择了测试的最高浓度(即 4 mM), 以确保即使长时间实验也能连续存在核糖核苷酸。这是特别相关的, 因为聚合速率不应受到核糖核苷酸不可用性的限制。

最后，对合适的双链模板浓度进行了评估。测试了模板浓度从 30 到 600 nM 的间隔，显示活性在 200 nM 处最大(图 2D)。这种最佳可能归因于 sigma 因子稀释效应，即在高模板浓度下，rfactor⁷⁰ 分子与过量模板相关，减少了活性全酶复合物(RNAP + sigma 因子)的总数，从而导致转录率降低。我们认为这些优化步骤对于使商业全酶适应三重分析是必要的。这将允许其他人更轻松地重复实验，并根据特定的测试调整不同的参数。

由于 TFO 结构强烈影响杂交三联体的形成, 我们研究了由一条 RNA 链组成的 TFO 结构域的 1、2 或 3 个串联重复序列的存在如何影响转录。TFOs 是在原位产生的, 并通过称为“分子布线”的过程设计为在相同的溶液中靶向启动子(TU2)。图 3A-C 图显示了转录单元 TU3、TU4 和 TU5 的分子布线方案, 其中 TU2 包含两个 TTSs(橙色条), 与 TFOs(蓝色条)形成抑制性三联体。在第一种情况下, 面板 A, TU3 产生含有一个 TFO 结构域的 RNA,

1XTFO, 而在以下两种情况下, TU4 和 TU5 分别编码两个和三个 TFO 结构域, 2XTFO 或 3XTFO, 在相同的丝(由细黑线表示的间隔)中被四个核苷酸分开, 图 B 和 c。我们假设, 一旦在串联重复序列中形成三联体, 就会产生局部浓度的 TFO, 从而稳定该复合物。假设三种 TFOs 的体积增加可以忽略不计, 则相对于 1XTFO, 2XTFO 形成三联体的 RNA 序列的局部浓度为两倍, 3XTFO 为三倍

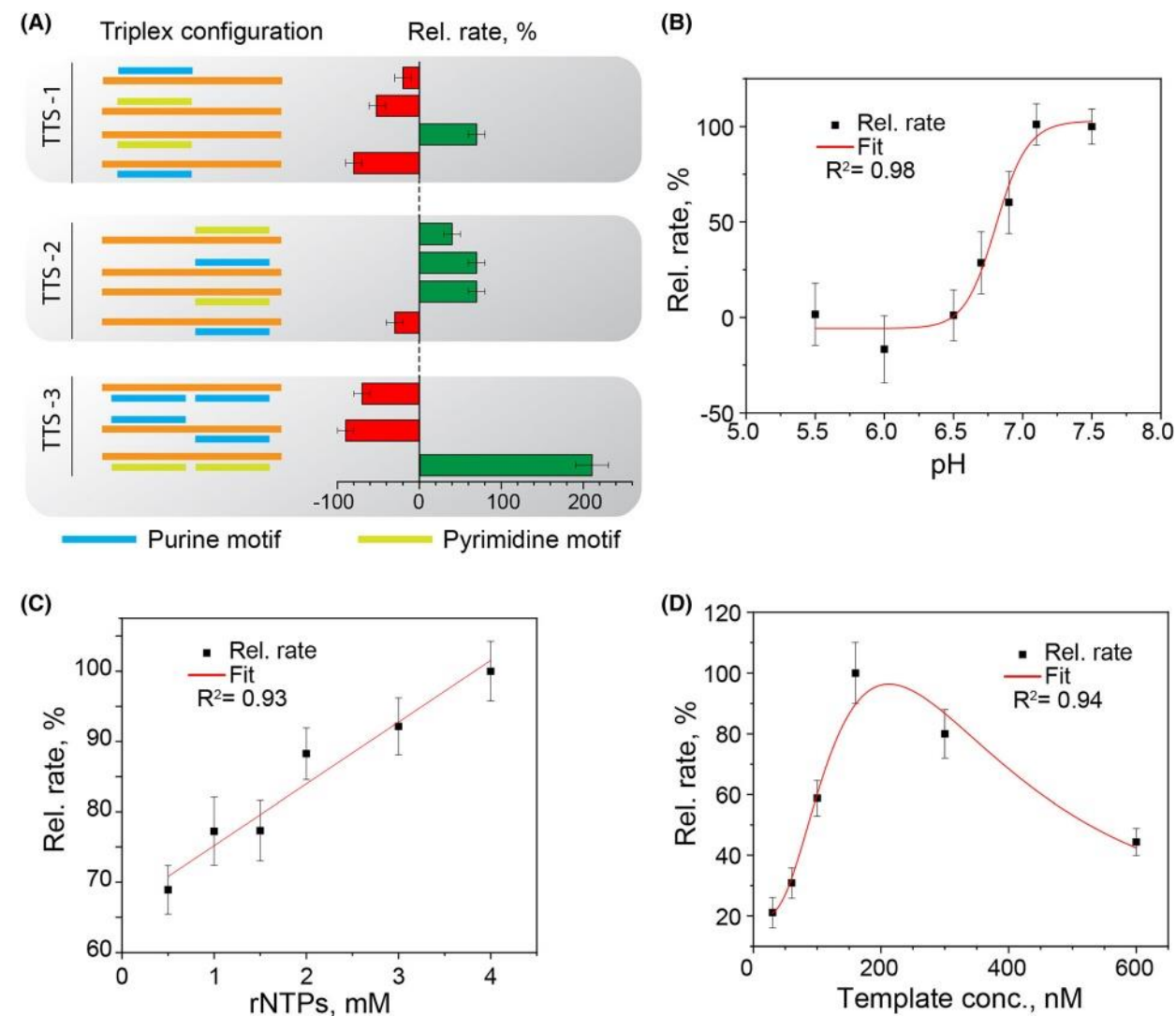


图 2 所示。(A)工程人工启动子的方案(橙线)显示不同的嘧啶(绿线)或嘌呤(蓝线)三联体几何形状,以及对转录率的相关影响,以抑制(红色)或增强(绿色)的百分比表示。设计分为包含一个上游为-10 的 TTS (TTS-1),包含一个上游为+1 的 TTS (TTS-2),或包含两个 TTS 的组合(TTS-3)。左图:转录单元内 TTSs 的几何形状;右部分:三联体形成对西兰花聚合速率的影响(红条表示抑制的百分比,绿条表示增强的百分比)。抑制作用最强的(两个嘌呤基序 TTSs 的扩增率为90%,而两个嘧啶基序 TTSs 的扩增率为+200%)位于同一启动子上。(B)不同 pH 值下 ma 聚合的相对速率。(C)不同三磷酸核糖核苷(rNTP)浓度下的 RNA 聚合相对速率。(D)不同西兰花模板浓度下的 ma 聚合相对速率。误差条表示三个独立实验的标准差。

串联重复。换句话说,对于 1XTFO,局部浓度等于它的体浓度,而对于 2XTFO 和 3XTFO,局部浓度必须高于体浓度,并且取决于重复次数。每个分子接线方案右侧的面板显示了各自的西兰花合成速率与接线 TUs 的增加比例的关系。s 型拟合清楚地显示曲线向左移动,趋向于较低的比例($2.1 > 0.7 > 0.3$)

tfo 编码相对于 TU2 的 TU,从而支持与较高局部浓度相关的三联体的更强效应(其他实验细节在方法部分报告)。

为了进一步证明增强/抑制杂化三丛的适用性,我们制作了逻辑门 XOR 和 XNOR。这样的门可以很容易地解释为,当两者结合时,给出正信号(输出=1,高转录率)的运算符

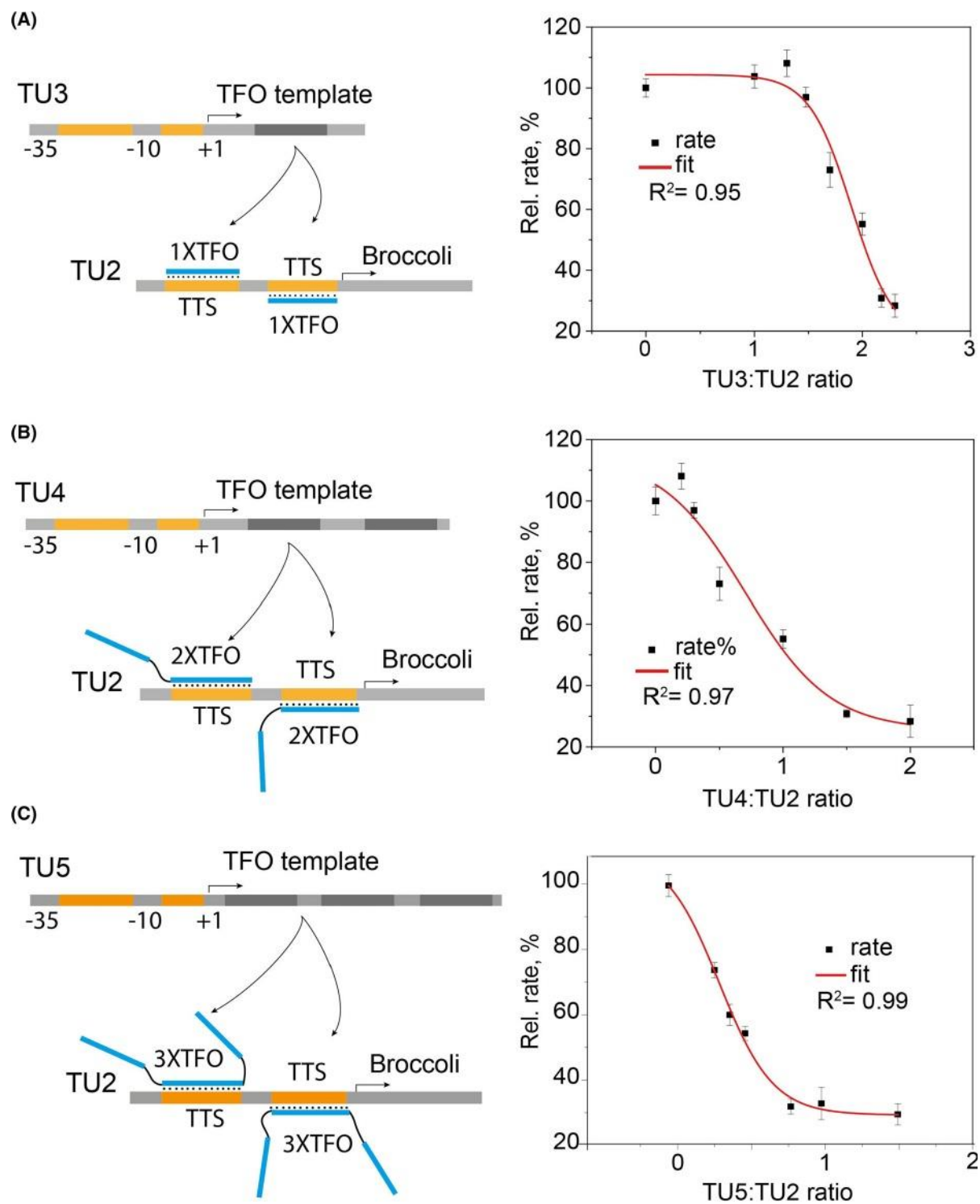


图 3 所示。左边的方案以图形方式描述了转录单元 TU2、TU3、TU4 和 TU5 的分子布线，其中 TU2 包含体外聚合 TFOs(蓝条)的靶位点 (TTS，橙色部分)，该靶位点仅包含一个双相相互作用部分，1XTFO，图 A (TU3/TU2 比为 2.1 时抑制 50%)，包含两个 TFO 串联重复序列，2XTFO，图 B (TU4/TU2 比为 0.7 时抑制 50%)，或包含三个 TFO 串联重复序列，3XTFO，C 组(50%抑制，TU4/TU2 比值= 0.3)。右侧的图显示了不同比例或 tfo 生成/报告 TUs 的代表性聚合速率。误差条描述聚合率线性拟合的标准偏差。50%的抑制率是从三个独立的实验中获得的。

输入具有不同的值(一个 TFO 存在,但不是两个, XOR 门)或两个输入(TFO)具有相同的值(两个 TFO 存在或两个 TFO 不存在, XNOR 门)。它们的分子实现如下:序列互补 TFO1 和 TFO2 作为输入(i 分别为 I_1 和 I_2), 转录单元(分别为 TU6 或 TU7, 分别为 XOR 或 XNOR)代表逻辑算子, 转录率作为输出, 西兰花荧光作为读出。对于 XOR 门, 使用两个增强三联体, 当只有一个输入存在时(ssRNA TFO 可形成三联体)产生增强效果, 而当没有或两个输入都存在时(双工 RNA 不可形成三联体)转录不受干扰。图 4A 显示了西兰花在四种条件下的聚合动力学:两种 TFOs 均不存在时, 两种 TFOs 中仅存在一种时, 两种 TFOs 均存在时, 反应输入组合为 0-0、0-1、1-0 和 1-1。线性速率值和真值表报告在各自动力学图的右侧, 其中任意阈值设置为最高转录速率的 80%, 从而分别为较低或较高的速率设置 0 或 1 的输出值。每个真值表输入组合的右侧显示了分子双工(橙色条)和 TFOs(绿色条和蓝色条)生成三重结构的方案。同样, 图 4B 显示了使用互补序列抑制性 TFOs 的逻辑门 XNOR 的分子实现。两种 TFOs 的存在或不存在导致转录率高于设定为最高率 60% 的任意阈值(输出值=1), 而任何一种抑制性 TFOs 的存在导致转录率低于阈值(输出值=0)。各自的条形图和真值表报告在动力学图的右侧。对于前面的门, 在真值表的右侧显示了 DNA-RNA 复合物示意图, 遵循相同的配色方案。

按照用于分子逻辑门的方法, 构建了一个三重介导的阈值门。阈值门操作类似于神经元的信号转导, 其中输入首先用于生成和, 然后使用该值产生正输出(高于阈值的和)或零输出(低于阈值的和)。在这种情况下, 使用两个互补序列的 TFOs 构建具有相反作用(抑制或增强)的三联体, 以调节转录单元 TU8 的聚合速率输出。增强 TFO 代表输入, 抑制 TFO 代表阈值。这允许抑制/

增强极化效应取决于浓度较高的 TFO。阈值门控效应导致输入浓度高于阈值时 TU 发生正调制, 输入浓度高于阈值时 TU 发生负调制。图 4, 面板 C, 显示了在不同输入/阈值比下记录的速率的集合, 在低于 1 的比率下显示为零输出, 在较高的输入/阈值比下显示为正输出。在面板的右侧, 显示了增加输入/阈值比率时 DNA-RNA 相互作用的方案(从下到上)。图 4, 图 D, 显示了阈值门的额外 EMSA 表征, 其中绿色箭头表示的三重相关带在输入/阈值浓度比远离 1 时变得更加强烈, 而当两种 ma 以等摩尔浓度存在时, 该带消失。这意味着, 在任何一条 RNA 链过量的情况下, 三联体是稳定的(最左和最右的通道), 而两条链的等摩尔浓度会破坏三联体的稳定, 使平衡向更稳定的双链 RNA 转移。因此, 本文报道的例子证明了使用三联体操作的转录系统开发分子门的可行性。

讨论

基于蛋白质的转录因子在合成生物学中被广泛用于调节转录过程和生成合成基因调控网络[10,26]。相反, 尽管目前由于其可能参与 lncRNAs 的生物活性而成为活跃的研究对象[13,33], 但 RNA - DNA 三联体的转录调节作用还远未完全了解。事实上, 目前对 lncRNAs 的研究产生了大量的计算工具和数据库[34,35], 并且随着新的实验数据的流入不断更新。大肠 70 杆菌 r 启动子代表了研究这些杂交三联体对 dna 相互作用蛋白(如 RNAP[7])影响的理想结构。通过改造其非保守结构域, 促进了与外部 RNA 链形成序列依赖的三从结构。此外, 我们发现这种改变并没有阻止转录, 事实上, 转录是针对核糖核苷酸浓度、双工模板浓度和 pH 进行了优化的(图 2)。相反, 当 TFO 串联重复序列在分子连接系统中被放置在相同的 RNA 中时, 由于 TFO 局部浓度的增加, 三联体的形成及其对转录的相关影响得到了加强(图 3)。

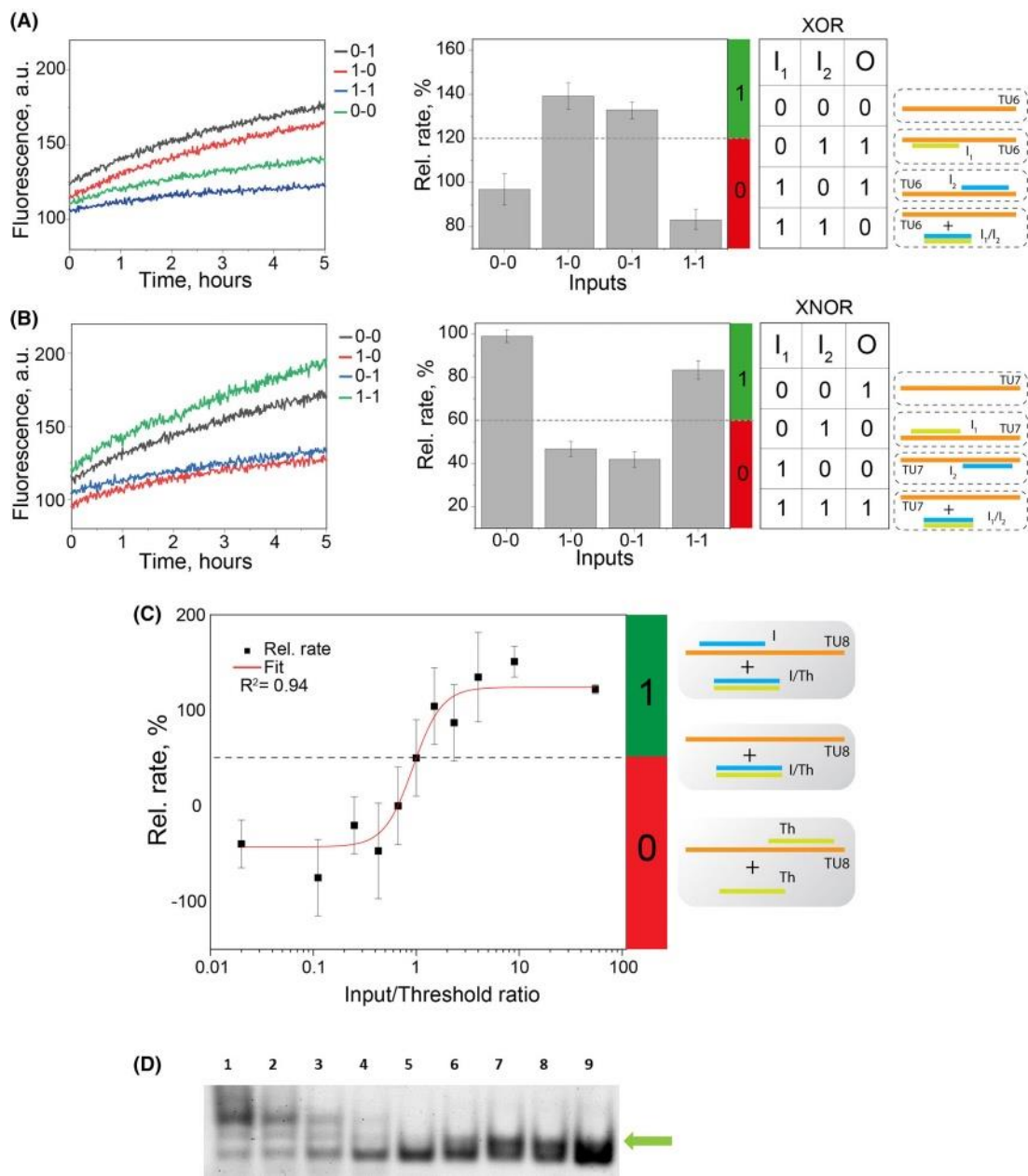


图 4 所示。基于三路复用的分子逻辑门和阈值门。(A, B)由转录单位 TU6 或 TU7 与 TFOs₁ 和 i 组合作为输入孵育的西兰花体外₂合成的荧光信号。线性荧光估计聚合率在右边的条形图中描述, 输出遵循 XOR 门或 XNOR 门, 这取决于启动子的设计。每个条形图都附有相应的逻辑门真值表, 其中为每个输入组合简要描述了输入/门状态的方案。TFO 用绿色和蓝色条表示(分别为嘧啶和嘌呤 TFO), 作为门控单元的双工 DNA 启动子用橙色条表示。(C)实验结果显示分别使用两个 TFOs 作为输入(I)和阈值(Th)以及转录单元 TU8 实现阈值门。估计的线性聚合速率被用作输出, 并根据输入/阈值浓度比绘制。在右边, DNA - ma 相互作用的方案显示了低 I/Th 比率(底部, 输出= 0), 比率= 1(中间, 阈值)和高比率(顶部, 输出= 1)的情况限制。(D)输入, 阈值和双工 DNA 相互作用的电泳分析显示了与绿色箭头所示的带相关的转录增强/抑制三重结构的形成(通道 1 至 9): 输入浓度为 1nM 至 10lM, 阈值浓度为 10lM 至 1nM)。在输入/阈值比接近 1 时(车道 5), 波段消失。误差条表示三个独立实验的标准差。

从 DNA 计算的先驱工作[36]中获得灵感, 构建了 XOR 门、XNOR 门和阈值门, 如图 4 所示。事实上, 当使用增强(XOR)或抑制输入(XNOR)时, 输出根据各自的真值表表现, 而阈值门同时使用增强和抑制输入。在低输入浓度下, 输出为零(低, 抑制西兰花转录), 而当输入浓度高于阈值(即, 输入/阈值, 比率 >1)时, 输出等于 1(即, 高, 增强西兰花转录), 图 4C。值得注意的是, 这些效应是由两个 TFOs 的序列互补性决定的, 如 EMSA 表征所示, 图 4D, 并且原则上可以在分子有线系统中实现, 如这里和其他地方所示[25], 从而允许更复杂的网络(例如, 分子振荡器, 脉冲发生器或双稳电路)。

本贡献中提出的门将为使用不同荧光 RNA 适配体(例如玉米、菠菜或芒果)实现多门控制的转录活性奠定基础, 以开发更复杂的计算[27,28]。还预见了对此类系统的体内监测;通过这种方式, 可切换的三层结构可以设计成根据 TTS 位置和所使用的 TFO 来打开或关闭不同的 tu。最后, 虽然抑制作用的机制之前已经被研究过, 并归因于竞争现象[7,12], 但增强只是最近才被发现, 其机制尚未阐明。因此, 作者认为, 三体介导的转录调控与多细胞生物的生物过程(如细胞分化、代谢和昼夜节律)的潜在参与[37,38]证明了促进其进一步研究的必要性。此外, 我们认为三联体稳定分子(如多胺、核酸插入物和带正电肽)与 ssRNA 之间的相互作用可能提供了一种通用的基因调控方式, 这也可能与一些由异常转录引起的难以捉摸的疾病的根源具有机制相关性[39,40], 以及在人工生物组分[41]中的应用。

致谢

AC 由 EMBO 长期奖学金支持 [ALTF 433-2018];REACT EU-PON “Ricerca e Innovazione 2014-2020”;MM 由比较生物医学系资助的 “Giovani Ricercatori - Third call” 基金支持

帕多瓦大学食品科学;意大利教育、大学和研究部 (MIUR) “Centro di Eccellenza per la Salute degli Animali Acquatici - ECCE AQUA”。

作者的贡献

GR、AC 和 NFG 分别进行实验。AC 设计了系统。所有作者对实验结果进行了分析、解释和评论。所有作者撰写、修改、编辑稿件。

同行评审

本文的同行评议历史可在 <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1002/1873-3468.14721> 查看。

数据的可访问性

支持信息文件包含本研究中使用的所有核酸序列(表 S1)和额外的熔化曲线(图 S1 和 S2)。

参考文献

- [1]胡颖, Cecconello A, Idili A, Ricci F, Willner I, (2017)三链 DNA 纳米结构:从基本性质到应用 *angewChem Int Ed Engl* 56, 15210-15233。
- 2 Frank-Kamenetskii MD 和 Mirkin SM(1995)三链 DNA 结构。 *Annu Rev Biochem* 64, 65-95。
- 3 Sun JS, Garestier T, H?el?ene C (1996)寡核苷酸定向三螺旋形成。 *生物化学学报* 6,327-333。
- [4]李春华, 李春华, 李春华, 等。DNA 三螺旋结构对 EcoRI 酶切修饰酶的抑制作用。 *核酸学报*, 18,157-161。
- 5 Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ 和 Hogan ME(1991)三体形成的证据寡脱氧核糖核苷酸与 HeLa 细胞中的 c-myc 启动子结合, 从而降低 c-myc mRNA 水平。《中华医学科学进展》88,8227-8231。
- 6 Escud?e C, france Bois JC, Sun JS, Ott G, Sprinzl M, Garestier T, H?el?含有 RNA 和 DNA 链的三螺旋结构的稳定性:实验和分子模型研究。 *核酸研究* 21,5547-5553。
- 7 Bervoets I 和 Charlier D(2019)细菌基因调控机制的多样性、多功能性和复杂性:合成生物学应用的机遇和缺点。 *FEMS Microbiol Rev* 43, 304-339。

- [8]吴春华, 李建军. Adv Mater(材料)e2302497. doi: 10.1002/adma.202302497
- [9]赵洪生, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, 陈文杰, (2018)肿瘤基因组图谱研究网络中 lncRNA 调控的泛肿瘤分析, 支持肿瘤基因的靶向性。《细胞通报》23,297-312.e12。
- [10]沈奥 SS, Milo R, Mangan S, Alon U(2002)大肠杆菌转录调控网络中的网络基序。Nat Genet 31, 64-68。
- [11] Cetin NS, 郭成, Ribarska T, Li R R, Costa IG, Grummt I(2019)细胞 DNA 的分离和全基因组鉴定:RNA 三联体结构。核酸研究 47,2306-2321。
- 12 Maher LJ, Dervan PB 和 Wold B(1992)真核细胞无细胞转录系统中三螺旋 DNA 复合物启动子特异性抑制的分析。《生物化学》31,70-81。
- 13 Mondal T, Subhash S, Vaid R, Enroth S, Uday S, Reinus B, Mitra S, Mohammed A, James AR, Hoberg E 等。(2015)MEG3 长链非编码 RNA 通过形成 RNA- DNA 三重结构调控 TGF- β 通路基因。Nat common 6, 1-17。
- [14]郭成, H€anzelmann S, Sent€urk Cetin N, Frank S, Zajzon B, Derks JP, Akhade v, Ahuja G, Kanduri C, Grummt I 等。(2019)长链非编码 rna 的 RNA-DNA 结合位点检测。核酸研究 47,e32。
- [15]陈建军, 陈建军, 陈建军, 陈建军, 陈建军, 陈建军, 陈建军, 陈建军, 陈建军, 陈建军。(2017)罗丹明异源二聚体- DNA 超分子复合物的核动力学研究。物理化学, 19,23043-23051 .(ei)
- 16 Seeman NC 和 Sleiman HF (2017) DNA 纳米技术。Nat Rev Mater 3,1 - 23。
- 17 Kaufmann B, Willinger O, Kikuchi N, Navon N, Kermas L, Goldberg S 和 Amit R(2021)基于寡核苷酸文库的体外 DNA-DNA 三复体相互作用定位方法。ACS Synth Biol 10, 1808 - 1820。
- [18]张建军, 张建军, 张建军, 张建军, 张建军, 张建军, 张建军, 张建军(2015)人类基因组基因与调控元件相关的三联体靶 DNA 位点目录。《核酸研究》43,D110-D116。
- 19 Pasquier C, Agnel S 和 Robichon A(2017)果蝇基因组中预测的三联体 DNA:RNA 的定位揭示了发育和形态发生相关基因的突出位置。G3 (Bethesda) 7, 2295-2304。
- 20 Buske FA, Bauer DC, Mattick JS and Bailey TL (2012) Triplexator:检测基因组和转录组学数据中的核酸三螺旋。Genome Res 22, 1372-1381。
- 21 Filonov GS, Moon JD, Svensen N 和 Jaffrey SR(2014)西兰花:基于荧光选择和定向进化的绿色荧光蛋白 RNA 模拟物快速选择。[J]中国生物医学工程学报, 36,16299-16308。
- 22 Ouellet J (2016) RNA 荧光与发光适体。Front Chem 4, 29。
- [23]王晓明, 王晓明, 王晓明, 等(2018)荧光 RNA 适体及其同源氟化物的研究进展。国际生物医学杂志 19,44。
- 24 Trachman RJ, Truong L, Ferr'e-D 'Amar'e AR(2017) 荧光 RNA 适体的结构原理。趋势药物科学 38,928-939。
- 25 Cecconello A, Magro M, Vianello F, Simmel FC (2022) DNA-RNA 杂交结构在体外转录活性调控中的应用。核酸学报 1,13-14。
- 26 Milo R, Shen-Orr S, Itzkovitz S, Kashtan N, Chklovskii D and Alon U(2002)网络基元:复杂网络的简单构建块。《科学》298,824-827。
- [27]王晓明, 王晓明, 王晓明, Remacle, Levine RD 和 Willner I(2010)基于 DNAzyme 亚基库的 DNA 计算电路。高分子学报, 5,417-422。
- 28 Seelig G, Soloveichik D, Zhang DY 和 Winfree E(2006)无酶核酸逻辑电路。Science 314, 1585-1588。
- [29]王晓明, 王晓明, 王晓明, 王晓明(2019)RNA•DNA-DNA 三螺旋结构中碱基三联体组成和 RNA 第三链长度对 dna 稳定性的影响。核酸学报, 47,7213-7222。
- [30] Kotkowiak W, Kotkowiak M, Kierzek R, Pasternak A(2014)解锁核酸:增加 RNA/DNA 三联体构象灵活性的意义。生物化学杂志, 464,203-211。
- [31]李立强, 李立强, 李立强, Willner I, Remacle F 和 Levine RD(2017)基于 DNAzyme 级联反馈的连续变量逻辑。化学科学 8,2161-2168。
- [32]陈建军, 陈建军, 陈建军, 等。T7 RNA 聚合酶的研究进展。科学通报 7,1-12。
- 33 Rinn JL 和 Chang HY(2012)长链非编码 rna 的基因组调控。Annu Rev Biochem 81, 145-166。
- [34]包志, 杨志, 黄志, 周勇, 崔强, 董丹 (2019)LncRNADisease 2.0:一个更新的长链非编码 rna 相关疾病数据库。核酸学报 47,D1034-D1037 .(ei)

[35]陈晓明, 陈晓明, 陈晓明(2011)非编码 RNA 在真核细胞端粒中的应用。Prog Mol Subcell Biol 51, 65-94。

36 Adleman LM(1994)组合问题解的分子计算。Science 266, 1021-1024。

37 sanar G, Brunner M(2014)生物钟与能量代谢。细胞 Mol 生命科学 71,2667-2680。

38 Brunner M 和 Schafmeier T(2006)蓝藻和神经孢子虫生物钟的转录和转录后调控。基因发展 20,1061-1074。

[39]张军, 张建军, 张建军, 张建军。(2020)DNA 三联体和 RNA/DNA 杂合体在 friedrich 共济失调中的作用。《核酸学报》48,9899 - 9917。

40 Crook N, Ferreira A, Condiotte Z and Dantas G(2020)转录物条形码照亮了

哺乳动物肠道内大肠杆菌鼻突中合成构建体的表达水平。ACS Synth Biol 9, 1010-1021。

41 Brophy JAN and Voigt CA(2014)《遗传原理》电路设计。Nat Methods 115, 508-520。

支持信息

额外的支持信息可以在文章末尾的支持信息部分找到。

图 S1。TTS 的 100 nM 融化曲线。

图 S2。1 IM TFO1(黑色)和 10 IM TFO2(红色)的融化曲线。

表 S1。核酸序列。DNA 是黑色的，而 RNA 是蓝色的。