

人工转录因子研究进展

Artificial Transcription Factors as Tools for Gene Expression Manipulation

赵兴卉*, 朱旭东, 黄培堂

ZHAO Xing-Hui*, ZHU Xu-Dong and HUANG Pei-Tang

北京生物工程研究所, 北京 100071

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

摘 要 转录因子是真核表达调控中非常重要的一类反式作用因子,通常由 DNA 结合结构域与效应结构域两部分组成,研究发现这两个结构域可以各自独立发生作用。基于转录因子的这种结构特点,可以人为地选择针对特定序列的 DNA 结合结构域与具有特定作用的效应结构域构建人工转录因子。目前人工转录因子的 DNA 结合结构域多为 C_2H_2 型锌指结构,每一个锌指单元由大约 30 个氨基酸组成,识别 DNA 双螺旋大沟中相连的 3bp 序列,并可通过氢键作用与相应的碱基结合;多个锌指可以串联成簇,从而识别并结合较长的 DNA 序列区域。常见的人工转录因子的效应结构域有激活结构域以及抑制结构域,不同的效应结构域赋予人工转录因子不同的功能。目前人工转录因子已经在基础研究、药物设计以及基因治疗等领域得到了广泛的应用。

关键词 人工转录因子, 锌指, 噬菌体展示, 基因治疗

中图分类号 Q756 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0341-07

Abstract In this new era of the genome, the complete sequences of various organisms (from the simplest to the most complex such as human) are now available, which provides new opportunities to study biology and to develop therapeutic strategies. But the paucity of research tools that manipulate specific genes *in vivo* represents a major limitation of functional genomic studies. In nature, the expression of genes is regulated at the transcriptional level primarily by proteins that bind to nucleic acids. Many of these proteins, which are termed transcription factors, are typically consist of two essential yet separable modules: DNA-binding domain (DBD) and effector domain (ED). Attempts to control the gene expression by artificial transcription factors are based on the application of this rule. Among the many naturally occurring DNA-binding domains, the Cys2-His2 zinc-finger domain has demonstrated the greatest potential for the design of novel sequence-specific DNA-binding proteins. Each zinc finger domain, which comprises about 30 amino acids that adopt a compact structure by chelating a zinc ion, typically functions by binding 3 base pairs of DNA sequence. Several zinc fingers linked together would bind proportionally longer DNA sequences. Ideally, these artificial DNA binding proteins could be designed to specifically target and regulate one single gene within a genome as complex as that found in human. Such proteins would be powerful tools in basic and applied research.

Key words artificial transcription factor, zinc finger, phage display, gene therapy

Received: December 28, 2004; Accepted: March 4, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948831; E-mail: zhaoxh78@yahoo.com

通常在真核生物个体中,几乎所有的细胞都含有相同的基因组,但是最终却分化成为不同的组织,具有千差万别的形态与功能;这一切主要是通过生物体内精细的基因表达调控机制来实现的,其中转录因子起着至关重要的作用^[1]。

真核转录因子(Transcription factors)分为两大类:通用转录因子(General transcription factor, GTF)与序列特异的转录因子。前者因参与了几乎所有真核基因的转录而得名,包括 TFIIA、TFIIB、TFIID、TFIIE 以及 TFIIF 等成员,它们以特定的次序结合在转录起始位点附近的核启动子上,与 RNA 聚合酶 II 组装形成前起始复合体(Preinitiation Complex, PIC),从而启动真核基因的转录。后者则通过特异地结合不同基因调节区中的 DNA 顺式元件对个别基因的转录起到激活、抑制等作用^[2]。

天然的序列特异转录因子通常由 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DBD)与效应结构域(Effector domain, ED)两部分构成。DNA 结合结构域能够特异地识别并且结合其对应的 DNA 序列,使该转录因子能够定位到靶基因;效应结构域通常是一个激活因子(Activator)或者抑制因子(Repressor),能够激活或者抑制靶基因的表达^[3]。研究发现,这两个结构域是各自独立起作用的^[4,5],于是我们就可以将不同的 DNA 结合结构域与效应结构域组合在一起,人为地构建具有新的序列特异性与作用效果的转录因子,即人工转录因子(Artificial Transcription Factor, ATF)^[6,7]。

1 人工转录因子的结构

如前所述,人工转录因子主要是由 DNA 结合结构域与效应结构域两部分组成的。早期的人工转录因子只是简单地将某种已知转录因子的 DNA 结合结构域与另一种已知转录因子的效应结构域组合在一起所得到的融合蛋白。例如,1985 年, Brent 等将酵母转录因子 Gal4 的转录激活结构域与细菌 LexA 蛋白的 DNA 结合结构域融合在一起,得到的新型转录因子可以作用于含有 LexA 操纵子序列的启动子并激活其下游基因的表达。当时人们将这种实验称为“domain swap experiments”^[8]。如今,种类繁多的 DNA 结合结构域以及效应结构域都被应用于人工转录因子的构建。

1.1 DNA 结合结构域

目前在人工转录因子的设计中使用的 DNA 结合结构域根据其构成分为非蛋白结构模块与蛋白结构模块两大类。非蛋白结构的 DNA 结合结构域包括三链形成寡核苷酸(triplex-forming oligonucleotides, TFOs),肽核酸(PNAs)以及聚酰胺胺(polyamides)等^[9]。TFOs 与 PNAs 都是通过与靶序列形成三链而识别特异序列的;而聚酰胺胺则是通过与 DNA 的小沟结合来进行序列识别的, Dervan 等已经设计出了可以特异识别 4bp 序列的聚酰胺胺分子^[10]。蛋白结构的 DNA 结合结构域包括螺旋-转角-螺旋结构、类固醇受体以及锌指结构等,这些结构是天然的转录因子中经常出现的组成部分^[11],其中锌指结构以其小巧灵活,结构独特而备受关注。

C₂H₂ 锌指结构是 Miller 等在 1985 年最先在非洲爪蟾的

转录因子 TFIIIA 中发现的^[12],是真核细胞中最常见的 DNA 结合模体(motif)。在人类基因组中,大约有 2% 的基因编码 C₂H₂ 锌指结构。每一个 C₂H₂ 锌指单元由大约 30 个氨基酸组成,形成反平行的 β 折叠片与一个 α 螺旋,通过疏水作用以及其中的 2 个 Cys 残基和 2 个 His 残基与一个 Zn²⁺ 离子的作用来稳定其结构(图 1a)^[13],形状类似于“一根手指”,“锌指”因此而得名。多个锌指单元可以串联成簇,识别更长的 DNA 序列^[13]。

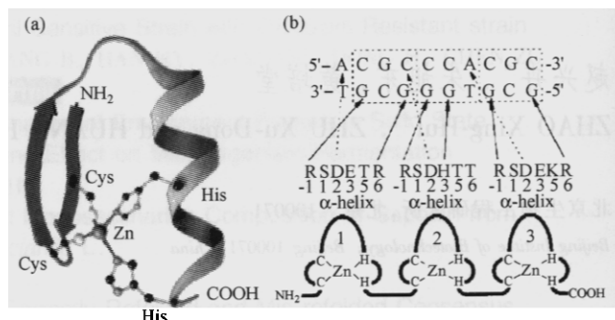


图 1 锌指单元的结构以及 C₂H₂ 型锌指 Zif268 与 DNA 的识别作用模式

Fig. 1 Zinc finger structure and DNA recognition mode of C₂H₂ type zinc finger protein Zif268

锌指蛋白 Zif268 包含 3 个锌指单元,通俗地讲,就是 3 根手指。对于 Zif268 与其靶 DNA 序列相互作用所形成复合物的 X 射线衍射分析揭示了 C₂H₂ 锌指与 DNA 作用的特点^[10]:每一个锌指单元(即每个手指)的 α 螺旋伸入 DNA 的大沟中,通过 α 螺旋外侧的氨基酸来识别 DNA 双螺旋大沟中的相邻的 3~4bp 序列,并可通过氢键作用与相应的碱基结合(图 1b)。进一步的研究发现,与锌指单元的序列特异性相关的主要是其 α 螺旋的第 -1、1、2、3、6 位氨基酸。不改变锌指的基本骨架,仅仅用其他氨基酸来替换这些位点的氨基酸,就可以得到具有新的序列特异性的锌指单元。此外, C₂H₂ 锌指结构还能识别修饰过的 DNA 碱基,如 5-甲基胞嘧啶^[14]。

相对于其他的 DNA 结合结构域, C₂H₂ 锌指有很多的优点。例如,许多 DNA 结合结构域由于自身是对称或者二聚化的结构而只能识别对称序列,而 C₂H₂ 锌指则可以识别非回文序列;并且由于可以多个锌指单元串联, C₂H₂ 锌指对于其识别序列的长度和结构没有太多的限制,仅仅需要改变几个关键位点的氨基酸,就可以赋予锌指新的识别特性。从理论上讲,对于任意的 DNA 序列,都能找到能够与之特异地结合的 C₂H₂ 锌指。C₂H₂ 锌指的这些特点使它迅速成为人工转录因子模块化设计中首选的 DNA 结合结构域。而近年人们又发现一些锌指结构(除了 C₂H₂ 型锌指结构以外还有 CCHC 型锌指结构)还能特异地识别 RNA 序列,这无疑又拓展了锌指的应用空间^[13,15]。基于锌指结构相对与其他 DNA 结合结构域的优势,目前大多数人工转录因子都是以锌指结构作为 DNA 结合结构域的,自从应用了锌指结构之后,人工

转录因子才真正地实现了模块化设计^[6]。稍后本文将进一步介绍序列特异的锌指蛋白的获得途径。

1.2 效应结构域

在早期的实验中,人们发现仅仅是 DNA 结合结构域对于基因的转录以及表达可能会产生一定的抑制作用,其原因可能是诸如锌指蛋白这样的 DNA 结合结构域过量表达,并结合在基因的编码区从而阻碍了基因转录的进行^[16],也有可能是结合在基因的启动子区域占据了某些转录必需的转录因子的结合位点(如果是占据抑制因子的作用位点,则有可能有一定的上调作用)^[17]。不过这些作用的强度是很有限的,而且情况因研究体系的不同而差别很大^[18]。因此,目前的人工转录因子的设计中通常都要加上不同的效应结构域,以赋予人工转录因子不同的功能。

1.2.1 激活结构域:常用的激活结构域有来自 NF- κ B 的 p65 亚基^[19](288-548aa^[20])以及来源于单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus)的 VP16^[5]等等。利用 VP16 的 413-490 位氨基酸部分,就可以很有效地激活(上调)基因的转录^[20];有文献表明 VP16 的 437-447 位氨基酸 DALDDFDLML 也可以产生明显的激活作用^[21];再缩小至 7~8 个氨基酸,或者 DDFDL 5 个氨基酸,仍然有很强的激活作用^[21]。此外 VP16 还经常被串联起来使用,Reza Yaghamai 等在研究中使用过 VP16 的 2 个、3 个以及 4 个串联体,发现这些串联体对于其目的基因的转录都有很好的激活效果^[22]。

另外,许多被称为 AH(amphipathic helix)的模拟天然激活区域的 15aa 人工肽也被用在人工转录因子的构建中^[23]。近年来还有人发现形成发卡的 RNA 分子对于基因的转录也能产生一定的激活作用^[24]。

1.2.2 抑制结构域:常用的抑制结构域有转录因子 KOX1 的 KRAB (Krüppel-associated box) 结构域^[25]和 SID (Sin3a interaction domain)结构域^[26]。KOX1 是一种重要的转录抑制因子,是 *kox1* 基因的产物。KOX1 的第 1~75 氨基酸就具有全部的转录抑制活性,这 75 个氨基酸在不同的物种之间是具有高度同源性的序列,称为 KRAB 域。KRAB 或者 SID 与锌指融合以后能够以一种不依赖距离和方向的方式来调控哺乳动物的启动子。但是目前仅发现 KRAB 结构域在哺乳动物细胞中能发挥抑制作用,而在果蝇、线虫、酵母和拟南芥中没有。而 SID 结构域直接与高度保守的 Sin3A 或者其同族蛋白作用,因此在植物中也有抑制作用^[27]。

另外,小的肽段诸如 WRPW^[28]和 CCVC^[29]也能起到类似的抑制基因转录的作用,其中 WRPW 通过招募高度保守的抑制因子 Groucho(在人类蛋白中被称为 TLE)而达到抑制基因转录的效果。

1.2.3 效应结构域的拓展:后来,人们借鉴人工转录因子的构建思路,利用更为多样的功能结构域,构建了许多能够特异地作用于靶序列的新型蛋白,用于对 DNA 进行某种定点的操作。例如,将限制酶的切割亚基与序列特异的锌指相连,构建人工核酸酶^[30],从而能够任意地切割目的序列,并提高重组的效率。把 DNA 甲基化酶与锌指相连,构建人工

甲基化酶^[34,31],可以在目的启动子上引入甲基化修饰,使得目的基因表达沉默。此外,Bushman 等将 HIV-1 的整合酶结构域与锌指相连构建了嵌合的整合酶^[32];Beretta 等利用相似的方法构建了序列特异的拓扑异构酶^[33]。有时候人工甲基化酶等也被统称为人工转录因子,但人们更习惯将它们称为嵌合酶。

2 获得特异识别 DNA 序列的锌指蛋白

对于一个理想的人工转录因子而言,确保其对于靶序列识别的特异性是相当重要的。因为细胞中存在大量的基因调控位点,如果人工转录因子的特异性不好,就有可能作用于非目的基因,影响它们的转录。如前所述,人工转录因子的序列特异性是靠其 DNA 结合结构域(最常用的是锌指结构)来实现的,因此,获得特异识别 DNA 序列的锌指蛋白是构建人工转录因子时最重要的工作。

2.1 文库筛选

最初,人们通过分析已知锌指蛋白中 α 螺旋的关键氨基酸位点,以及这些氨基酸位点所识别的碱基而得到一个对应的表格。这种表格有一点类似于密码表,利用这个表格可以得知当 DNA 序列中出现某个碱基的时候,相应锌指的关键氨基酸位点通常应该是哪些氨基酸。于是,根据这种表格可以人工设计(rational design)针对某个特定序列的锌指^[34]。可是,后来人们发现这种方法在某种程度上并不是非常可靠的。目前直接设计所得到的特异性最好三锌指蛋白也只是可以特异地识别 9bp 靶序列中的 7 个碱基位点^[35],远未达到实际应用的要求。于是,人们更加倾向于使用从文库中筛选的方法来得到能够特异识别自己感兴趣的 DNA 序列的锌指结构。这样的锌指文库目前有噬菌体展示系统、酵母单杂交系统、细菌双杂交系统以及哺乳动物细胞筛选系统等多种。

2.1.1 噬菌体展示策略:噬菌体展示系统在许多蛋白与多肽的研究中都已经成为一种强有力的手段;在锌指的筛选方面,由于筛选中是利用 DNA 片段来富集文库中能够特异结合该 DNA 片段的锌指,因此与常见的抗体筛选略有不同。最初,B.A.Christy 等为了探讨噬菌体展示技术应用在 DNA 与锌指作用的研究领域的可行性,将 Zi268 的三锌指结构表达在丝状噬菌体的表面,从而构建了最早的可以在表面展示锌指结构的噬菌体展示载体^[36]。目前常见的噬菌体展示锌指文库都是以 Zi268 的三锌指结构做为基本骨架而构建的,由于转化效率所造成的库容的限制,在一个文库中最多只能把一个锌指单元中的 α 螺旋的几个关键氨基酸位点完全随机化^[37,38]。因此,每次只能筛选到识别 3~4bpDNA 的一个锌指单元,然后再把这些锌指单元串联组合成可以识别比较长的 DNA 片段的多指串联体。

利用噬菌体展示技术筛选具有新的 DNA 特异性的锌指的策略最常见的有以下三种:“平行筛选”(Parallel selection,如图 2a)、“顺序筛选”(Sequential selection,如图 2b)以及“两部分筛选”(Bipartite selection,如图 2c)^[7,11,18]。

三种策略都是以 Zi268 中的三锌指结构(在下文中将其

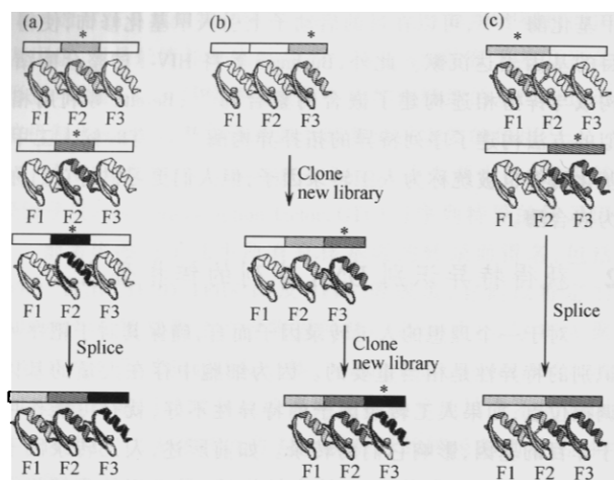


图2 序列特异的锌指蛋白的筛选策略

Fig.2 Strategies for selecting zinc finger polymers with novel DNA-binding specificities

三个锌指单元简称为 F1、F2 与 F3)作为骨架,区别在于在文库构建中选取了不同的随机化部位,并在筛选中采用了不同的策略。图2假设已知一段我们感兴趣的 9bp DNA 序列,分别展示利用三种策略筛选到与这个 9bp 靶序列特异结合的三锌指结构的过程,图中长方形表示筛选所采用的 DNA 片段。

“平行筛选”策略(图2a)是将 Zi268 第二指(F2)的 α 螺旋关键氨基酸位点随机化,第一指(F1)与第三指(F3)沿用 Zi268 的序列,构建噬菌体展示文库。在筛选的时候, F1 与 F3 起锚定作用,筛选的靶序列设计在 F2 对应的位置(图2a 中星号部分)。因此,每一次筛选都可以得到特异识别图2a 星号部分所示 3bp 序列的锌指单元。三次筛选以后,将每次筛选所得的锌指单元串联起来,就得到了能够特异识别 9bp 靶序列的锌指结构。“平行筛选”策略的前提是,每个锌指单元都独立识别靶序列,彼此之间互不干扰,因此其最大的优点就是操作简便。但是实际上在锌指结构识别 DNA 序列的时候,相邻的锌指单元之间存在协同作用(见图1b)。实际上,该策略构建的文库的 F2 只能识别 5'-GNN-3' 或者 5'-ANN-3'。这大大地限制了这种策略的应用范围^[36-38]。

“顺序筛选”策略(图2b)是针对平行筛选的这种缺陷而提出的。该策略首先将 Zi268 第三指(F3)的 α 螺旋关键氨基酸位点随机化,第一指(F1)与第二指(F2)沿用 Zi268 的序列,构建噬菌体展示文库。利用该文库筛选到与特定 DNA 序列(图2b 中星号部分)相作用的锌指后,再构建新的噬菌体展示文库,用上一轮筛选中的 F2 作为新的 F1,筛选到的锌指作为新的 F2,在其端部加入新的随机化锌指 F3,再进行筛选。这样,第一步筛选随机化端部的一个锌指,然后每进行一步筛选都要把上一轮筛选得到的锌指作为骨架构建新的文库。显然这种策略充分考虑到了相邻的锌指之间的协同作用,但是在筛选的过程中需要不断地构建新的文库,比较耗时耗力^[39]。

“两部分筛选”(图2c)结合了前边两种筛选方法的优点:在 Zi268 的第二指(F2)中引入一个 DdeI 酶切位点,将

Zi268 分成两部分,分别随机化前后各一个半锌指构建文库。两个文库分别针对 5bp 靶序列进行筛选(图2c 中星号部分),然后通过一些简单的重组与筛选步骤,最终得到特异地结合 9bp 目的靶序列的锌指结构^[40]。这是目前用于锌指筛选的最好的噬菌体展示策略,它不仅考虑了锌指靶序列的重叠以及锌指之间的协同作用,与“顺序筛选”策略相比也大大缩短了文库构建与筛选的时间,结合 96 孔或 384 孔板以及机械手可以实现高通量的筛选^[41]。

2.1.2 其他策略:不过,即使是“两部分筛选”策略,也还是需要经过好几轮的筛选才能得到序列特异的锌指;于是后来又发展出其他的锌指筛选策略,例如酵母单杂交系统^[42],细菌双杂交系统^[43],以及哺乳动物细胞筛选系统^[44]。这些系统的最大优点是它们都是在活的细胞中筛选锌指,因此筛选条件更加接近于正常的生理环境(如染色质结构、DNA 修饰、其他的细胞或组织特异性因子的存在等),并且特异作用于靶 DNA 的锌指蛋白经过一轮筛选就可以得到。随着各种筛选技术的不断完善,筛选到能够特异识别较短序列的锌指结构已经是比较轻松的事情了。这些方法都在发展与完善之中,目前的主流技术依然是噬菌体展示技术。

2.2 识别更长序列的锌指的串联

前面提到,为了保证特异性,人工转录因子在调控基因表达的时候应当仅针对特定的靶序列起作用。由于人的基因组大约含有 3×10^9 bp,因此通常 17bp (4^{17} 种可能的组合方式)或者更长的序列才可能保证其在人类基因组中只有单个拷贝。由于每个锌指单元通常识别 3bp 的序列,所以人工转录因子的 DNA 结合结构域应该有六个或者更多的锌指单元组成。由于目前通过文库筛选得到的大多是三锌指结构,于是常常需要把多个锌指单元通过接头串联起来。实现这个目的的方法有两种,一是利用在天然的多锌指蛋白中常见的连接肽(linker)或者人工设计的更长的连接区把多个锌指串联起来(如图3-c)^[45];二是将两个三锌指结构分别与二聚化区域融合,令其发生二聚化而形成六指结构^[46]。常用的二聚化结构域包括 Gal4 的二聚化结构域(如图3a)^[18],以及亮氨酸拉链(如图3b)^[18]。

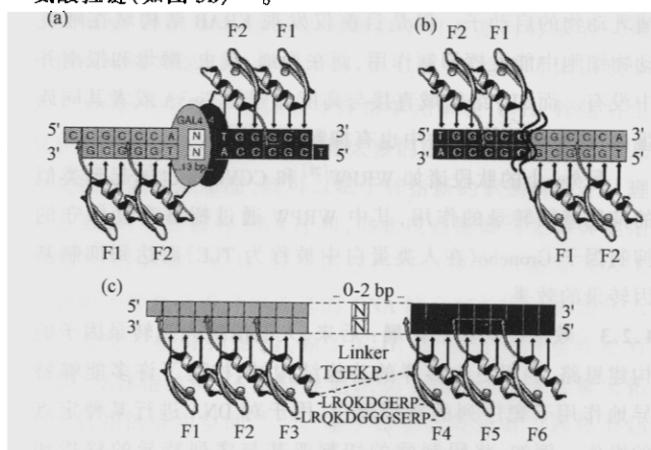


图3 多锌指串联以识别更长的 DNA 序列

Fig.3 Construction of zinc fingers recognizing longer DNA sequences

3 人工转录因子的应用

对于内源性基因的表达进行人工干预的方法有很多种^[42],例如反义技术、核酶、基因敲除与敲入,以及近期发展起来的 RNA 干涉技术等等。其中基因敲除与敲入技术虽然具有相当突出的优点,但步骤烦琐,并且对仪器与操作人员的要求比较高,并非一般实验室都很容易开展;其他如反义技术等大多是在基因转录以后的 mRNA 水平上进行调控,需要针对大量的靶标来作用,并且其作用仅限于抑制基因的表达。人工转录因子则是通过识别 DNA 上的位点,对于基因的转录进行调控,因此利用少量的人工转录因子往往就能起到很好的调控效果。另外,由于人工转录因子可以进行模块化设计,通过改变 DNA 结合结构域可以灵活选择其作用靶位,改变其效应结构域则可以对于目的基因进行激活、抑制、甲基化等不同的调控,应用十分灵活方便。有研究表明合理设计的人工转录因子能够针对抑癌基因、原癌基因以及病毒基因的转录表达都起到相应的调控作用^[6,7,11,40,41],一个合适的人工转录因子甚至可以调节某个基因家族或是整条代谢通路中的一系列相关产物^[7],因此人工转录因子在基础研究、肿瘤等疾病的基因治疗与抗病毒治疗等领域都具有广泛的应用前景^[7,40,41]。

目前估计大约有半数人体蛋白都存在选择性剪切产物(alternative splice forms),有些基因甚至存在多个选择性剪切产物;因此一些疾病的基因治疗中,给予全部的选择性剪切产物是不现实的。VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A)能够特异地促进内皮细胞的有丝分裂,从而促使血管的生长。该基因存在 3 种选择性剪切产物,只有当他们保持天然的含量比率时才能最好地发挥作用。Liu 等利用人工转录因子成功地上调了 HEK293 细胞中内源 VEGF-A 的表达,并且发现其 3 种选择性剪切产物的含量比率与天然水平相同^[30]。由此可见,在涉及此类基因的基因治疗中,人工转录因子相对于直接引入目的基因 cDNA 的方法具有很大的优势。

PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor- γ) 的基因产物为一种脂肪形成中重要的核内激素受体(nuclear hormone receptor),是 II 型糖尿病治疗药物的重要靶标。同一基因由于从不同的启动子启动转录而形成两种异构体形式,其中 PPAR γ 1 只存在于脂肪细胞中,而 PPAR γ 2 在许多细胞中都有发现;因为两种异构体结构非常相似,很难区分其功能有何差别。Ren 等利用人工转录因子同时抑制了 PPAR γ 1 和 PPAR γ 2 的表达,发现前脂肪细胞的分化完全停滞。然后再向细胞中分别导入 PPAR γ 1 和 PPAR γ 2 的 cDNA,发现当含有 PPAR γ 2 的 cDNA 在细胞中表达的时候细胞又开始分化,而含有 PPAR γ 1 的 cDNA 在细胞中表达的时则不然。由此可见,人工转录因子在药物设计中可以成为很好的工具^[48]。

在抗病毒方面,Reynolds 等发现人工转录因子可以识别 HIV 的 5' LTR(long terminal repeat),并抑制 HIV 复制;最近 David J Segal 等也利用人工转录因子减弱了 HIV-1 在人原代

细胞(primary human cells)中的复制。因此人们设想可以将人工转录因子导入病人的前 T 细胞(progenitor T cells)来治疗艾滋病^[49,50]。此外,Papworth 等也发现人工转录因子通过抑制一个在病毒复制周期的早期通常被激活的基因的转录抑制了 HSV(herpes simplex virus)的复制^[51]。

此外,Bartsevich 等利用五锌指蛋白与两个 KRAB-A 的抑制域构成的人工转录因子成功地抑制了 K562 细胞中多耐药基因(MDR1)的表达^[52]。Beerli 等利用 4 个 VP16 激活域以及 KRAB 抑制域连接六锌指识别域分别激活和抑制了乳腺癌细胞系中原癌基因 *erbB-2* 与 *erbB-3* 的表达;而将作用于 *erbB-2* 的人工转录因子作用于同样含有其结合位点的小鼠、猴子以及其他人类细胞株,也能起到同样的基因表达调控作用^[53,54]。Zhang 等利用人工转录因子激活了 *EPO* 基因在 HEK293 细胞中的表达;而通常 *EPO* (erythropoietin) 基因在这种细胞株中是不表达的,甚至即使低氧诱导,该基因也不表达^[55]。Rebar 等在小鼠的耳上引入人工转录因子,成功上调 VEGF-A 的表达从而促进血管生成,证实人工转录因子不仅在细胞模型中作用显著,在动物模型中也能起到很好的作用^[56,57]。人工转录因子还在植物领域中有很多应用^[27],在这里就不一一赘述了。

目前人工转录因子的设计与应用研究在国内开展的还不是很多。我们曾经利用噬菌体展示锌指文库筛选到与 SV40 启动子特异结合的三锌指结构,并连接 KOX1 的 KRAB 域构建了一种人工转录因子,转染实验表明它对 SV40 下游的报告基因的表达有很显著的抑制作用^[58];此外我们还利用人工转录因子进行了病毒方面的研究(文章待发表)。另外,有实验室将 λ 噬菌体 cI 蛋白识别序列插入到报告基因的启动子上游,利用定点整合系统将报告基因和启动子一起整合入 CHO 细胞;然后将转录激活域 AH 和 VP2 连接到 λ 噬菌体 cI 蛋白的 C 端,构建人工转录因子;转染实验表明使用人工转录因子可以使报告基因表达提高 2.7 倍^[59]。

4 展望

人工转录因子已经在基础研究、药物设计以及基因治疗等许多领域得到了很好的应用;为了能对基因转录进行更精细的调控,将来的人工转录因子可能会含有某些天然转录调控因子的特性,诸如只与细胞特异的元件相互作用等等^[9,57]。更为理想的目标是,构建一种普通情况下在细胞中处于静息状态的人工转录因子,只有当细胞接受外界刺激,启动了其自身某种的信号转导通路以后,才能激活人工转录因子,使其发生作用^[9]。随着技术的进一步发展,人工转录因子的设计将会更加精细,它们可能成为研究基因表达调控网络以及功能基因组学的强有力工具,并在基因治疗等领域得到更广泛的应用。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Warren AJ. Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12(1): 107-114

- [2] Muller CW. Transcription factors: global and detailed views. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11**(1): 26 – 32
- [3] Ptashne M. Albert Lasker Award for Basic Medical Research. Control of gene transcription: an outline. *Nat Med*, 1997, **3**(10): 1069 – 1072
- [4] Margolin JF, Friedman JR, Meyer WK *et al*. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(10): 4509 – 4513
- [5] Sadowski I, Ma J, Triezenberg S *et al*. GAL4-VP16 is an unusually potent transcription activator. *Nature*, 1988, **335**(6190): 563 – 564
- [6] Klug A. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J Mol Biol*, 1999, **293**(2): 215 – 218
- [7] Beerli RR, Barbas CF III. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(2): 135 – 141
- [8] Brent R, Ptashne M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 1985, **43**(3 Pt 2): 729 – 736
- [9] Ansari AZ, Mapp AK. Modular design of artificial transcription factors. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, **6**(6): 765 – 772
- [10] Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem*, 2001, **9**(9): 2215 – 2235
- [11] Segal DJ, Barbas CF III. Design of novel sequence-specific DNA-binding proteins. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, **4**(1): 34 – 39
- [12] Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J*, 1985, **4**(6): 1609 – 1614
- [13] Nagaoka M, Sugiura Y. Artificial zinc finger peptides: creation, DNA recognition, and gene regulation. *J Inorg Biochem*, 2000, **82**(1 – 4): 57 – 63
- [14] Isalan M, Choo Y. Engineered zinc finger proteins that recognize DNA modification by HaeIII and HhaI methyltransferase enzymes. *J Mol Biol*, 2000, **295**(3): 471 – 477
- [15] Friesen WJ, Darby MK. Specific RNA binding by a single C₂H₂ zinc finger. *J Biol Chem*, 2001, **276**(3): 1968 – 1973
- [16] Choo Y, Sanchez-Garcia I, Klug A. *In vivo* repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature*, 1994, **372**(6507): 642 – 645
- [17] Kim JS, Pabo CO. Transcriptional repression by zinc finger peptides. *J Biol Chem*, 1997, **272**(47): 29795 – 29800
- [18] Choo Y, Isalan M. Advances in zinc finger engineering. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, **10**(4): 411 – 416
- [19] Fujita T, Nolan GP, Ghosh S *et al*. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. *Genes Dev*, 1992, **6**(5): 775 – 787
- [20] Liu PQ, Rebar EJ, Zhang L *et al*. Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. *J Biol Chem*, 2001, **276**(14): 11323 – 11334
- [21] Seipel K, Georgiev O, Schaffner W. A minimal transcription activation domain consisting of a specific array of aspartic acid and leucine residues. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1994, **375**(7): 463 – 470
- [22] Yaghai R, Cutting GR. Optimized regulation of gene expression using artificial transcription factor. *Molecular Therapy*, 2002, **5**(6): 685 – 694
- [23] Mapp AK, Ansari AZ, Ptashne M *et al*. Activation of gene expression by small molecule transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(8): 3930 – 3935
- [24] Sengupta DJ, Wickens M, Fields S. Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *RNA*, 1999, **5**(4): 596 – 601
- [25] Bellefroid EJ, Poncelet DA, Lecocq PJ *et al*. The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(9): 3608 – 3612
- [26] Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM *et al*. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, 1997, **387**(6628): 43 – 48
- [27] Segal DJ, Stege JT, Barbas CF III. Zinc fingers and a green thumb: manipulating gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6**(2): 163 – 168
- [28] Fisher AL, Caudy M, Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev*, 1998, **12**(13): 1931 – 1940
- [29] Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC *et al*. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*, 1998, **394**(6693): 592 – 595
- [30] Chandrasegaran S, Smith J. Chimaeric restriction enzymes: what is next? *Biol Chem*, 1999, **380**(7 – 8): 841 – 848
- [31] Xu GL, Bestor TH. Cytosine methylation targeted to predetermined sequences. *Nat Genet*, 1997, **17**(4): 376 – 378
- [32] Bushman FD, Miller MD. Tethering human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes to target DNA promotes integration at nearby sites. *J Virol*, 1997, **71**(1): 458 – 464
- [33] Beretta GL, Binaschi M, Zagni E *et al*. Tethering a type IB topoisomerase to a DNA site by enzyme fusion to a heterologous site-selective DNA-binding protein domain. *Cancer Res*, 1999, **59**(15): 3689 – 3697
- [34] Nardelli J, Gibson T, Charnay P. Zinc finger-DNA recognition: analysis of base specificity by site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(16): 4137 – 4144
- [35] Corbi N, Libri V, Fanciulli M *et al*. Binding properties of the artificial zinc finger coding gene sint1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **253**(3): 686 – 692
- [36] Christy BA, Lau LF, Nathans D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with “zinc finger” sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(21): 7857 – 7861
- [37] Rebar EJ, Pabo CO. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science*, 1994, **263**(5147): 671 – 673
- [38] Choo Y, Klug A. Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized zinc fingers displayed on phage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(23): 11163 – 11167
- [39] Greisman HA, Pabo CO. A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science*, 1997, **275**(5300): 657 – 661

- [40] Isalan M, Klug A, Choo Y. A rapid, generally applicable method to engineer zinc fingers illustrated by targeting the HIV-1 promoter. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(7):656 - 660
- [41] Isalan M, Choo Y. Rapid, high-throughput engineering of sequence-specific zinc finger DNA-binding proteins. *Methods Enzymol*, 2001, **340**:593 - 609
- [42] Bartsevich VV, Juliano RL. Regulation of the MDR1 gene by transcriptional repressors selected using peptide combination libraries. *Mol Pharmacol*, 2000, **58**(1):1 - 10
- [43] Joung JK, Ramm EI, Pabo CO. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(13):7382 - 7387
- [44] Blancafort P, Magnenat L, Barbas CF III. Scanning the human genome with combinatorial transcription factor libraries. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(3):269 - 274
- [45] Liu Q, Segal DJ, Chiara JB *et al*. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(11):5525 - 5530
- [46] Pomerantz JL, Wolfe SA, Pabo CO. Structure-based design of a dimeric zinc finger protein. *Biochemistry*, 1998, **37**(4):965 - 970
- [47] Urnov FD, Rebar EJ. Designed transcription factor as tools for therapeutics and functional genomics. *Biochem Pharmacol*, 2002, **64**(5-6):919 - 923
- [48] Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ *et al*. PPAR γ knock down by engineered transcription factors: exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis. *Gene Dev*, 2002, **16**(1):27 - 32
- [49] Reynolds L, Ullman C, Moore M *et al*. Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(4):1615 - 1620
- [50] Segal DJ, Gonçalves J, Eberhardt S *et al*. Attenuation of HIV-1 Replication in Primary Human Cells with a Designed Zinc Finger Transcription Factor. *J Biol Chem*, 2004, **279**(15):14509 - 14519
- [51] Papworth M, Moore M, Isalan M *et al*. Inhibition of the herpes simplex virus 1 gene expression by designer zinc-finger transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(4):1621 - 1626
- [52] Bartsevich VV, Juliano RL. Regulation of the MDR1 gene by transcriptional repressors selected using peptide combinatorial libraries. *Mol Pharmacol*, 2000, **58**(1):1 - 10
- [53] Beerli RR, Dreier B, Barbas CF III. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(4):1495 - 1500
- [54] Dreier B, Beerli RR, Segal DJ *et al*. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J Biol Chem*, 2001, **276**(31):29466 - 29478
- [55] Zhang L, Spratt SK, Liu Q *et al*. Synthetic zinc finger transcription factor action at an endogenous chromosomal site. *J Biol Chem*, 2000, **275**(43):33850 - 33860
- [56] Rebar EJ, Huang Y, Hickey R *et al*. Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors. *Nat Med*, 2002, **8**(12):1427 - 1432
- [57] Jamieson AC, Miller JC, Pabo CO. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**(5):361 - 368
- [58] Zhao XH (赵兴卉), Zhu XD (朱旭东), Liu J (刘娟) *et al*. Construction of a SV40 Promoter Specific Artificial Transcription Factor. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19**(5):608 - 612
- [59] Lai DZ (来大志), Weng SJ (翁少洁), Yu CM (于长明) *et al*. Enhancement of foreign gene expression in CHO cells by human elongation factor 1 α subunit promoter and artificial transcription activator factors. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2004, **31**(2):118 - 126
- [60] Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 1991, **252**(5007):809 - 817