

生物医学研究院科研季刊

2021 年第 1 季度

复旦大学生物医学研究院编

2021 年 3 月 31 日

目 录

- 顾宏周团队开发利用环化酶高效制备 DNA 单环和拓扑结构的新技术
- 徐彦辉团队《Nature Communications》揭示 mTOR 通路关键调控复合物 TSC 的结构和酶活机制
- 表观团队《Nature》报道 METTL3 调控小鼠胚胎干细胞异染色质形成机制
- 蓝斐团队与合作者《Nucleic Acids Research》揭示转录因子与表观遗传因子协同调控干细胞命运决定的机制
- 徐建青/张晓燕团队在《Journal for ImmunoTherapy of Cancer》报道 IL-21 重组溶瘤痘苗病毒单独或联合免疫细胞疗法具有强效抗肿瘤作用
- 许杰团队在《Oncogene》和《RSC Chemical Biology》报道靶向降解 PD-L1 和 PD-1 的新分子
- 顾宏周团队在《Analytical Chemistry》报道可用于阿尔兹海默症相关小分子血液检测的 RNA 传感器
- 施奇惠团队与合作者在《PNAS》报道新型肺癌循环肿瘤细胞表型
- 徐彦辉团队《Cell Research》揭示人源 RNA 聚合酶 III 转录延伸复合物的结构和转录调控机制

顾宏周团队开发利用环化酶高效制备 DNA 单环和拓扑结构的新技术

环状单链脱氧核糖核酸 (circular ssDNA) 在分子生物和 DNA 纳米技术等领域扮演着重要的角色, 如作为滚环扩增的必备模板、DNA 拓扑结构的构成单元等。目前常用的依赖于 T4 DNA 连接酶制备环状单链 DNA 的方法容易产生多聚体副产物, 导致单体环产率低; 而现有的基于 CircLigase (一种单链环化酶) 制备环状单链 DNA 的方法虽然可一定程度上减少副产物, 但是随着底物 DNA 链长度的增大, CircLigase 催化成环的效率急剧下降。因此, 高效率地制备单链环形 DNA 仍是一个亟待解决的问题。

2020 年 12 月 31 日, 我院顾宏周团队在 Analytical Chemistry 杂志发表了题为 “Programming CircLigase Catalysis for DNA Rings and Topologies” 的论文, 报道了一种基于 CircLigase 高效制备 DNA 单环和拓扑结构的新技术。这一技术主要通过单链 DNA 末端设计杂交的结构使得 CircLigase 参与的酶促

反应由不可控的熵变主导转为可控的焓变主导，从而高效率(>75%产率)无副产物地合成 DNA 单环。该技术不仅将 CircLigase 的催化 DNA 成环产率稳定地提升至 75%以上，而且突破了 CircLigase 对于可环化的 DNA 片段的长度的限制，在几百碱基的长链 DNA 上都得到了验证。课题组同时利用 CircLigase 预制备的单链 DNA 环作为起始组装材料获得了高纯度的 DNA 拓扑嵌套结构。

Programming CircLigase Catalysis for DNA Rings and Topologies

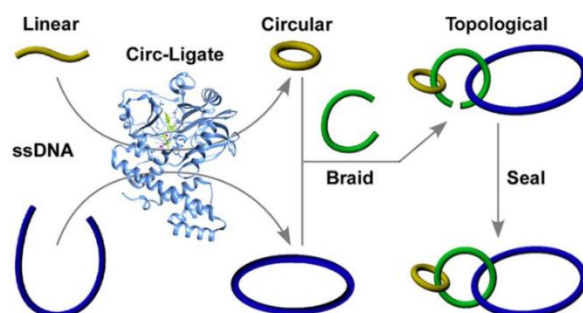
Qingting Li, Shu Zhang, Wei Li, Zhilei Ge, Chunhai Fan, and Hongzhou Gu*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04668>

Read Online

文章中首先确定了末端杂交结构对高效成环的必要性，测试了一系列参数：如反应温度、末端互补配对碱基数、末端不配对碱基个数和末端碱基种类等对成环效率的影响，并建立了可以被 CircLigase 催化高效成环的单链 DNA 模型。文章中还进一步地研究确定了对于较长（例如 200 至 500 个碱基）单链 DNA 底物链，末端杂交结构同样能帮助其高效成环。

此外，该团队进一步研究发现末端杂交结构可以从 DNA 分子内转移至 DNA 分子间，即末端杂交结构也可提高两条不同单链 DNA 分子间的连接效率。并且末端杂交结构可以由单链 DNA 底物自身互补配对提供，也可以通过一条辅助 DNA 链与单链 DNA 底物末端配对形成，两种杂交方式连接效率相当。随后，又提出末端结构通过拉近单链 DNA 底物 5' 和 3' 端距离，从而提高 CircLigase 催化成环效率的猜想。



综上，该团队提出了一种简单有效的在单链 DNA 末端设计杂交结构的策略提升 CircLigase 催化 DNA 成环的效率，而高产率和高纯度制备环状 DNA 不仅在纳米技术方面有潜在应用，也可用来筛选更加稳定的作为肿瘤诊断和治疗的新一代核酸适配体。值得一提的是，CircLigase 本身在病毒中作为一种 RNA 连接酶。由于 DNA 与 RNA 化学结构相似，因此该研究中设计末端杂交结构提高 CircLigase 环化 DNA 效率的策略理论上也适用于 RNA 底物。利用这套策略原则上也可以稳定高效地合成天然存在的环状 RNA 分子，以便在体外研究其结构和功能。

复旦大学生物医学研究院研究生李青婷为第一作者，顾宏周研究员为通讯作者。

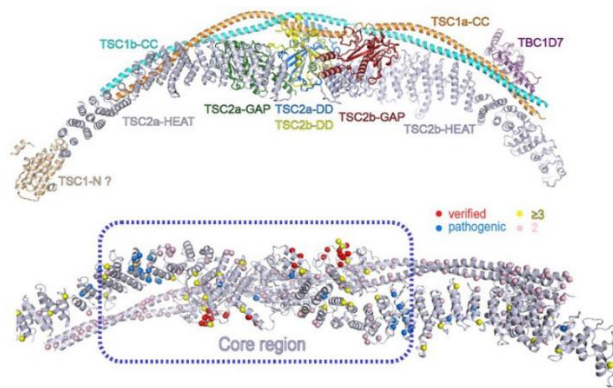
徐彦辉团队《Nature Communications》揭示 mTOR 通路关键调控复合物 TSC 的结构和酶活机制

结节性硬化症蛋白复合体 (Tuberous Sclerosis Complex, 简称 TSC 复合体) 是 mTORC1 信号通路中重要的蛋白质复合体, 其整合细胞外各种因素的刺激, 负调控 mTORC1 复合体的活性, 起到肿瘤抑制的作用。TSC 复合体包含三个亚基: TSC1, TSC2 以及 TBC1D7。其中 TSC2 包含一个 GTP 酶活化蛋白 (GTPase activating protein, 简称 GAP) 结构域, 将 GTP 形式的 Rheb 水解为 GDP 形式的 Rheb, 导致 Rheb 失活, 不能激活 mTORC1 的激酶活性, 抑制细胞生长。TSC1, TSC2 基因突变导致常染色体显性遗传疾病结节性硬化症, 影响全身各个组织, 尤其是脑、皮肤、肾脏和心脏等器官。

2021 年 1 月 12 日我院徐彦辉团队在 Nature Communications 杂志在线发表研究论文 Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb, 揭示了 TSC 复合体的结构和发挥催化活性的机制。



该研究解析了人源 TSC 复合体的结构, 发现复合体中三个亚基 (TSC1, TSC2 和 TBC1D7) 以 2:2:1 的比例构成, 整体复合物呈现独特的弓形结构。TSC1 的 Coiled-coil 二聚体形成交错的长螺旋结构, 跨在 TSC2 通过尾部 (tail-to-tail) 结合的二聚体一侧, TBC1D7 结合在 TSC1 的 C 端 Coiled-coil 位置。通过结构分析和生化研究解释了 TSC2 对底物 Rheb 发挥 GAP 活性的催化机制, 并对两者之间结合的重要位点进行了验证。TSC2 的 1643 位天冬酰胺稳定 GTP 的 γ -phosphate, 加速 Rheb 中 GTP 的水解。该研究还总结了一些关键突变位点, 对其导致疾病的机制进行了分析。



图注：TSC复合体的结构以及疾病突变位点

徐彦辉课题组副研究员杨慧蓉，博士生于子朔以及助理研究员陈曦子为本文共同第一作者，徐彦辉和杨慧蓉为共同通讯作者。复旦大学电镜中心，北京大学电镜中心，中科院生物物理所成像中心、国家蛋白质中心对该研究的数据收集给予了重要的支持。

表观团队《Nature》报道 METTL3 调控小鼠胚胎干细胞异染色质形成机制

mRNA 上的 m6A 修饰受到了广泛的关注，其对于 mRNA 的命运调控涉及其生物学功能的方方面面，包括剪接、转运、降解、翻译等，m6A 主要由 METTL3/METTL14 复合物催化，目前的研究主要集中在 METTL3/METTL14 对于细胞质中 mRNA 的调控研究。但是 METTL3 是否参与以及如何参与调控染色质功能的研究相对较少。内源性逆转录病毒（Endogenous retrovirus）元件是基因组转座子元件之一，约占小鼠基因组的 10%，为了阻止这些转座元件在基因组中四处移动造成遗传突变，细胞进化出了相应的表观遗传修饰抑制这些转座子的活性。小鼠胚胎干细胞主要通过 H3K9me3 和 H4K20me3 修饰抑制转座子 ERV 的活性，但是否还有更多的表观遗传修饰参与其中的研究相对较少。

2021 年 1 月 27 日，我院沈宏杰青年研究员和牛津大学 Yang Shi 教授合作在 Nature 杂志在线发表了 METTL3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells 的研究论文，该研究发现 METTL3 通过调控内源性逆转录病毒（Endogenous retrovirus）IAPEz 亚群上的异染色质状态，进而抑制 IAPEz 元件转录。

Article

METTL3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03210-1>

Received: 15 February 2020

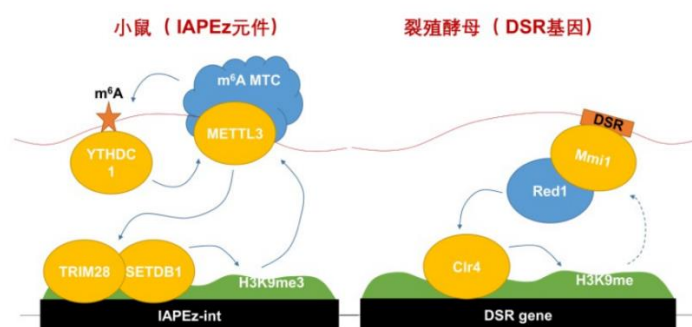
Accepted: 14 December 2020

Wenqi Xu^{1,2,3}, Jiahui Li^{1,2}, Chenxi He^{1,2}, Jing Wen^{1,2}, Honghui Ma^{1,2}, Bowen Rong^{1,2}, Jianbo Diao^{1,2}, Liyong Wang^{1,2}, Jiahua Wang^{1,2}, Feizhen Wu^{1,2}, Li Tan^{1,2}, Yujiang Geno Shi⁴, Yang Shi^{1,2,3} & Hongjie Shen^{1,2,3}

研究发现 m6A 甲基转移酶 METTL3 在小鼠胚胎干细胞 mESCs 染色质主要结合在内源性逆转录病毒（Endogenous retrovirus）IAPEz 转座子亚群上。IAPEz 转座子主要通过组蛋白 H3K9me3 和 H4K20me3 修饰来沉默，H3K9me3 主要由甲基转移酶复合物 SETDB1/TRIM28 复合物催化，H4K40me3 则主要由 SUV420H1/2 催化，并且依赖于 H3K9me3。METTL3 主要通过招募 SETDB1/TRIM28 复合物来调控 H3K9me3 修饰，同时研究者发现 METTL3 与 SETDB1/TRIM28 的相互作用不依赖于 METTL3 的酶活。

同时研究发现 METTL3 结合 IAPEz 转座子依赖于 METTL3 的催化酶活，METTL3 的各种酶活突变体都不再结合染色，进一步研究发现 METTL3 催化的 IAPEz RNA 促进了 m6A 识别子蛋白 YTHDC1 结合染色质，同时 YTHDC1 反过来促进 METTL3 在染色质上的结合，形成正向 feedback。

研究还讨论了 YTH 蛋白在裂殖酵母和哺乳细胞中调控异染色质的异同。RNA 参与异染色质形成的研究主要集中在裂殖酵母中，裂殖酵母细胞缺少 m6A 甲基催化酶 METTL3 同源物，因此 YTH 同源蛋白 Mmi1 不识别 m6A 修饰，而通过识别 RNA 上的 DSR 序列参与异染色质形成。而哺乳细胞中 YTH 同源蛋白 YTHDC1 通过识别 METTL3 催化的 m6A 修饰参与异染色质形成。研究同时还讨论了 m6A 修饰在 RNA 的 5' UTR 和 3' UTR 可能参与不同的调控作用。



图注：METTL3调控异染色质的工作模型。（左）哺乳细胞中METTL3/YTHDC1蛋白招募H3K9me3甲基转移酶复合物SETDB1/TRIM28的示意图。（右）裂殖酵母细胞中Mmi1蛋白参与调控异染色质形成的示意图。

总之，这项工作发现 METTL3 可以结合小鼠胚胎干细胞 ERV 中的 IAPEz 转座子，通过招募 SETDB1/TRIM28 维持 IAPEz 转座子上的异染色质状态。

复旦大学生物医学研究院、上海市医学表观遗传学重点实验室为论文第一署名单位，复旦大学生物医学研究院博士后徐文绮是论文的第一作者，沈宏杰博士和牛津大学 Yang Shi 教授为论文的共同通讯作者。该项工作受到复旦大学专项资助以及上海市科委，国家自然科学基金委资助。

蓝斐团队与合作者《Nucleic Acids Research》揭示转录因子与表观遗传因子协同调控干细胞命运决定的机制

细胞的命运决定受到转录因子与表观遗传因子的协同调控，例如胚胎干细胞的多能性维持，既需要关键转录因子的正确结合（如 OCT4, SOX2, NANOG 等），又需要对启动子和增强子活性的精确调控，两者密不可分。它们如何协同作用是亟需解决的科学问题。基因的启动子、超级增强子和过度活化的增强子上，都会有组蛋白甲基化 H3K4me3 及附近的 H3K4me1 的共同存在。那么这两种甲基化状态，到底是不同的甲基化酶催化出了不同的产物，还是由同一种甲基化酶的催化活性/催化时间发生变化的结果，也是一个非常值得研究的问题。

转录因子 BACH1 (BTB and CNC homology 1) 属于碱性亮氨酸拉链蛋白家族成员，其广泛存在于哺乳动物各种组织中，参与调控基因的转录。复旦大学基础医学院孟丹教授的团队前期在 Science Advances 上发表的研究中，发现 BACH1 是干细胞维持自我更新和决定谱系分化的关键调控因子。以往研究发现 BACH1 可以直接在体外让 DNA 成环，但是 BACH1 是否在体内参与调控染色质环和下游基因转录进而维持干细胞多能性还不清楚。

2021 年 1 月 27 日，孟丹教授团队与我院蓝斐研究团队合作，在 Nucleic Acids Research 杂志在线发题为 BACH1 recruits NANOG and histone H3 lysine 4 methyltransferase MLL/SET1 complexes to regulate enhancer-promoter activity and maintains pluripotency 的表论文，发现 BACH1 可以分别直接结合转录因子 NANOG 和表观遗传因子 H3K4 甲基化酶 MLL/SET1 复合物，共同招募它们到染色质上（尤其是染色质环的锚点处），调控基因启动子和增强子的 H3K4me3 水平，调控下游基因（尤其是多能性基因）的转录活性，进而维持小鼠胚胎干细胞多能性。

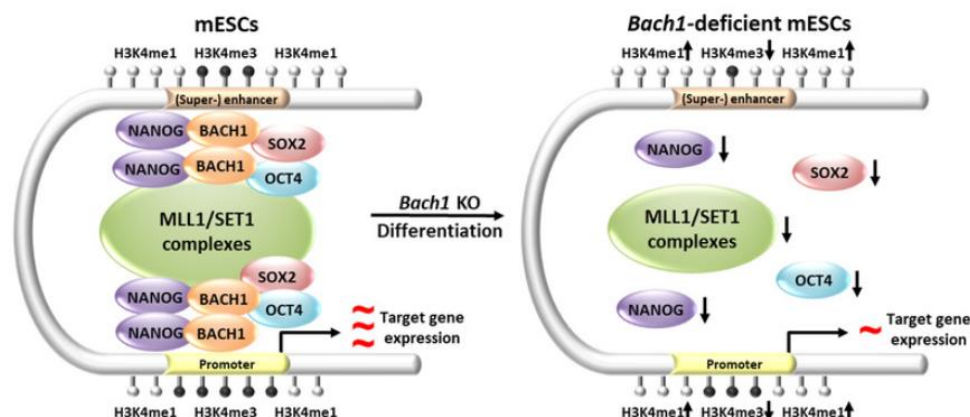
Nucleic Acids Research



The screenshot shows the article page on the Nucleic Acids Research website. The top navigation bar includes links for Issues, Section browse, Advance articles, Submit, Purchase, and About, along with a search bar. The article title is 'BACH1 recruits NANOG and histone H3 lysine 4 methyltransferase MLL/SET1 complexes to regulate enhancer promoter activity and maintains pluripotency'. The authors listed are Cong Niu, Siqing Wang, Jieyu Guo, Xiangxiang Wei, Mengping Jia, Zhaoxiang Chen, Wenxuan Gong, Yue Qin, Xinhong Wang, Xiuling Zhi, Meng Lu, Sifeng Chen, Mingxia Gu, Jianyi Zhang, Jing-Dong J Han, Fei Lan, and Dan Meng. The article was published on 27 January 2021. The left sidebar contains a table of contents with links to Abstract, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, DATA AVAILABILITY, and SUPPLEMENTARY DATA.

干细胞中 NANOG 和 H3K4 甲基化酶 MLL/SET1 复合物可以相互作用，但敲除 BACH1 基因会显著破坏这种相互作用，并且降低它们在染色质上（尤其是染色质环的锚点处）的结合，降低 H3K4me3 水平，降低增强子活性与下游基因转录活性。这提示 BACH1 像桥梁一样，沟通了 NANOG 和 MLL/SET1 复合物，共同调控启动子-增强子活性。

值得注意的是，BACH1 结合了小鼠胚胎干细胞中约 70% 的超级增强子，尤其是多能性调控基因所在的超级增强子（如 Zfp42/Rex1 和 Lif）。这些超级增强子上有 H3K4me1 和 H3K4me3 共存（包括启动子区与非启动子区）。而敲除 BACH1 基因后，则会发生 H3K4me3 下降和 H3K4me1 的上升，同时伴随着 MLL/SET1 复合物的结合强度下降。这提示 H3K4me1 和 H3K4me3 的转换，可能是由于同一种甲基化酶的催化活性/催化时间发生了变化导致的。此外，研究人员也发现 BACH1 可以调控糖酵解和氧化磷酸化的很多基因，而代谢类型的转换也被认为是干细胞命运决定的一个重要调控方式。



这项研究揭示了 BACH1 与转录因子 NANOG 和表观遗传因子 MLL/SET1 复合物协同作用，调控启动子-增强子环的组蛋白修饰与活性，进而维持胚胎干细胞多能性，证实 BACH1 在维持胚胎干细胞多能性和决定干细胞命运中发挥关键作用。这项研究结果对于干细胞命运调控的基础理论研究具有重要的科学意义。

牛琮、王司清（生物医学研究院蓝斐组博士生）、郭阶雨、魏香香、贾孟萍是论文的共同第一作者，孟丹教授和蓝斐研究员是共同通讯作者。这项研究得到了中科院马普研究所/北京大学韩敬东教授及博士生陈钊熊和龚文轩的大力支持；得到了来自国家自然科学基金重大研究计划项目、面上项目，上海市优秀学术带头人项目和上海市科委科技创新行动计划等基金的资助。

徐建青/张晓燕团队在《Journal for ImmunoTherapy of Cancer》报道 IL-21 重组溶瘤痘苗病毒单独或联合免疫细胞疗法具有强效抗肿瘤作用

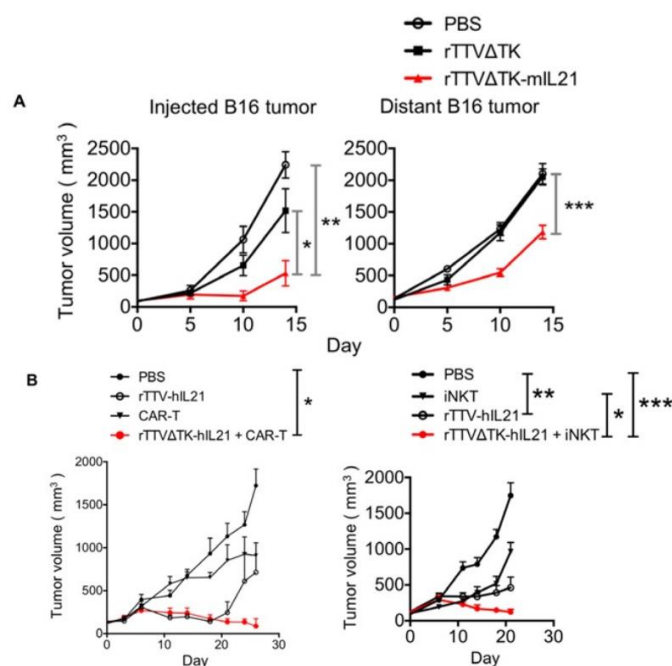
溶瘤病毒是天然的或经人工改造的、能在肿瘤组织中优势复制、直接或间接抑制肿瘤细胞生长的一类病毒。溶瘤病毒主要通过以下途径发挥抗肿瘤功能：（1）病毒在肿瘤细胞内复制导致肿瘤细胞直接杀伤；（2）病毒感染肿瘤细胞后激发并释放细胞因子，重塑肿瘤免疫微环境、趋化免疫细胞浸润到肿瘤组织，促进“冷肿瘤”向“热肿瘤”转变；（3）裂解的肿瘤细胞释放特异性抗原，与细胞因子协同，提升机体抗肿瘤特异性免疫反应；（4）溶瘤病毒可以作为载体携带肿瘤抑制基因、促凋亡基因、抗血管生成基因、自杀基因和免疫调节基因，进一步调

控肿瘤微环境，提升抑瘤功能。与其它治疗手段相比，溶瘤病毒的优点包括杀伤作用强、不易产生耐药性、较低的副作用、低成本等。因此，如何利用溶瘤病毒，提升抗肿瘤的有效性，是研究人员需要考虑的重要科学问题。

2021 年 1 月 27 日，我院徐建青、张晓燕团队在国际癌症免疫治疗协会（Society for Immunotherapy of Cancer，SITC）杂志 *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 在线发表研究论文“IL-21 arming potentiates the anti-tumor activity of an oncolytic vaccinia virus in monotherapy and combination therapy”，研究发现 IL-21 重组溶瘤痘苗病毒治疗可使小鼠局部肿瘤消退，并控制远端肿瘤的生长，其与 CAR-T 疗法或 iNKT 疗法联合应用显示了良好的协同效果，为临床肿瘤免疫治疗提供了一种有益的候选思路。



研究者以牛痘病毒天坛株（TTV752-1）作为溶瘤病毒的载体，导入免疫调节因子 IL-21，构建重组痘病毒 rTTV Δ TK-IL21。首先在三种小鼠异种移植肿瘤模型中证明，rTTV Δ TK-IL21 能够促进肿瘤局部免疫效应细胞的富集，从而使部分小鼠肿瘤完全消退并提高生存率。此后，证明了 rTTV Δ TK-IL21 可能通过参与全身免疫应答抑制治疗位点远端的肿瘤。最后，通过将 rTTV Δ TK-IL21 与 CAR-T 疗法或 iNKT 疗法联合应用，显示了良好的协同效果。



图注：rTTV Δ TK-IL21 的溶瘤效果图。（A）rTTV Δ TK-IL21 抑制治疗位点远端的肿瘤生长。（B）rTTV Δ TK-IL21 与 CAR-T 或 iNKT 疗法联合应用有效抑制肿瘤生长。

这项研究揭示了 IL-21 重组溶瘤痘苗病毒的肿瘤治疗效果及其机制，强调了其与过继细胞免疫疗法结合用于优化双药抗肿瘤疗法的潜力，为其在临床环境中的进一步探索提供了强有力的支持。

复旦大学博士研究生陈添悦和丁相卿为论文共同第一作者，徐建青教授、张晓燕教授、赵晨教授为本文通讯作者，这项工作得到了国家重点研究计划，国家传染病重大科技计划项目和上海申康医院发展中心临床研究计划等基金的资助。

许杰团队在《Oncogene》和《RSC Chemical Biology》报道靶向降解 PD-L1 和 PD-1 的新分子

近日，我院许杰课题组分别在 Oncogene 和 RSC Chemical Biology 期刊发表研究论文，报道氨氯地平（amlodipine）对 PD-L1 的诱导自噬降解作用，以及 PD1-PALM 对 PD-1 的靶向降解作用。

该课题组通过“老药新用”思路筛选已有药物分子库，发现氨氯地平（心血管疾病药物）能够显著地促进 PD-L1 蛋白在肿瘤细胞中的降解。通过机制研究，发现氨氯地平通过降低细胞浆内的钙离子水平，减少 Calpain 对 Becklin1 的剪切从而促进自噬。这种自噬是对循环内体（recycling endosome）具有高度选择性的，使富集在循环内体上的 PD-L1 蛋白发生降解。值得注意的是，MHC、PD-L2 等其它的被检测膜蛋白并未发生降解。

通过功能实验，作者发现氨氯地平能够有解肿瘤细胞和组织中的 PD-L1 蛋白，从而解除 PD-1 受体对 T 细胞的抑制作用，重新激活 CD8+细胞对肿瘤的杀伤。在 MC38 荷瘤小鼠模型中，氨氯地平以剂量依赖的方式抑制肿瘤生长，并促进了 CD8+细胞在肿瘤组织中的浸润。

由于 PD-1/PD-L1 抗体药对肿瘤细胞和正常细胞的靶蛋白都有阻断作用，因此上述免疫检查点抑制剂的副作用包括自身免疫性心肌炎，而作者发现氨氯地平并不影响心肌细胞的 PD-L1 降解，也不增加炎性细胞在心肌组织的浸润，这与循环内体在不同组织和细胞的丰度有关。因此，氨氯地平具有不同于抗体药物的作用机制，并且可能具备潜在的安全性优势，值得在今后进一步研究其与抗体药物的协同抗肿瘤作用。相关论文以 Repurposing screen identifies Amlodipine as an inducer of PD-L1 degradation and antitumor immunity 为题发表于近期发表在 Oncogene 杂志上。

Repurposing screen identifies Amlodipine as an inducer of PD-L1 degradation and antitumor immunity

Chushu Li, Han Yao, Huanbin Wang, Jing-Yuan Fang & Jie Xu ✉

Oncogene 40, 1128–1146(2021) | Cite this article

在另一项研究中，许杰课题组与我院陆豪杰教授课题组开展合作，报道了 PD-1 的棕榈酰化修饰及其对稳定 PD-1 表达的作用。通过 2-BP 小分子抑制棕榈酰化可阻断 PD-1 与 Rab11 蛋白的结合，从而促进 PD-1 运送至溶酶体降解。作者发现 PD-1 棕榈酰化修饰酶主要为 DHHC9（不同于 PD-L1 的 DHHC3），其修饰的基序为“VICSRAAR”，这种多肽与穿膜肽进行整合后，可导入细胞并竞争结合 DHHC9，抑制内源的 PD-1 棕榈酰化，从而诱导 PD-1 的溶酶体降解。



这种新的 PD-1 抑制剂不同于以往的抗体或用于阻断 PD-1/PD-L1 结合的小分子或多肽，具有较强的新颖性，相关工作以 A peptidic inhibitor for PD-1

palmitoylation targets its expression and functions 为题于近日发表在英国皇家化学会期刊 RSC Chemical Biology, 入选 Editors ' Choice, 并在期刊封面展示。

上述两项的前期工作在上海交通大学完成, 在动物模型实验和论文修稿阶段的研究依托复旦大学生物医学研究院的实验平台完成, 并获得了复旦大学科研启动经费和上海市科技创新行动计划的资助支持。

顾宏周团队在《Analytical Chemistry》报道可用于阿尔兹海默症相关小分子血液检测的 RNA 传感器

阿尔兹海默症 (Alzheimer disease, AD) 是一种神经系统退行性疾病, 以记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害等为主要症状。据世界卫生组织统计, 截止 2018 年底, 全球痴呆人数已经超过 5000 万人, 其中 AD 患者约占 70%, AD 已成为影响全球的重大公共健康问题。

硫胺素 (维生素 B1) 是人体中一种重要的化合物, 许多神经系统疾病都与体内硫胺素的缺乏有关。在生物体内, 硫胺素的活性形式是硫胺素焦磷酸 (thiamine pyrophosphate, TPP or TDP), 其作为辅酶参与代谢中的许多重要反应。在 AD 进展过程中, 脑硫胺素水平显著低于正常, 导致与 TPP 相关的酶活性下降, 进而引起脑内葡萄糖代谢障碍。近期的临床研究发现外周血中的 TPP 浓度在健康人群和 AD 人群间存在一个明显的分界线: 健康人群的 TPP 血液浓度通常大于 120 nM, 而 AD 人群的 TPP 血液浓度小于 90 nM, 且血液中 TPP 的降低在 AD 进展的初期 (认知障碍期) 即已出现。因此对血液中 TPP 的精准检测具备无创 (无需腰穿抽取脑脊液)、早期诊断 AD, 从而及时干预 AD 进程的重要价值。然而当前 TPP 的检测主要依靠高效液相色谱法 (HPLC), 虽然其精准度足够, 但是较高的专业操作和设备要求、低通量等缺点限制了其在大规模临床检测和社区人口健康普查中的应用。

**analytical
chemistry**

pubs.acs.org/ac

Article

Engineering Allosteric Ribozymes to Detect Thiamine Pyrophosphate in Whole Blood

Xinyu Du,^{||} Xiaoqin Cheng,^{||} Wei Li, Zhilei Ge, Chunjiu Zhong, Chunhai Fan, and Hongzhou Gu*

2021 年 2 月 26 日, 我院顾宏周研究团队在 Analytical Chemistry 杂志发表了题为 *Engineering Allosteric Ribozymes to Detect Thiamine Pyrophosphate in Whole Blood* 的论文, 报道了一种人造的 RNA 传感器, 其对 TPP 的亲和力 EC50 值达到 68 nM, 可在 6-600 nM 范围内线性特异感知 TPP 并作出特定位点的 RNA 自我切割; 研究人员将 TPP 引发的 RNA 探针切割事件构筑到等

温扩增信号放大的环路中，进一步实现了在 nM 范围内对血液中 TPP 的高灵敏度荧光检测（图 1）。

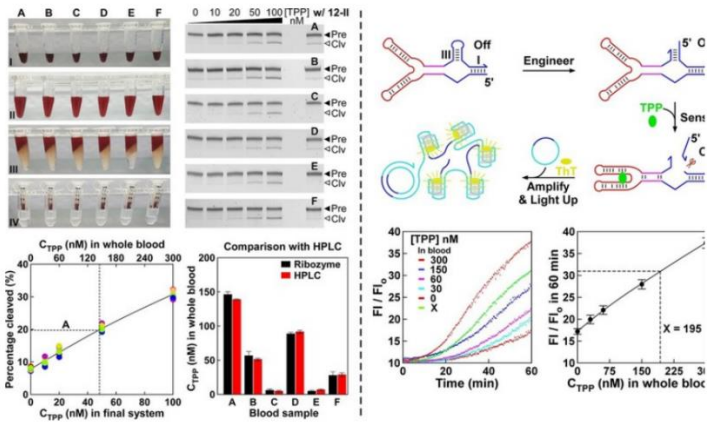


图1编辑适体核酶RNA探针用于高灵敏地检测血液中的TPP浓度

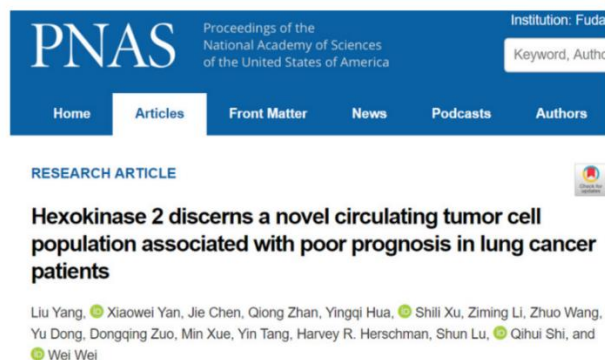
在多份血液样本中，该 RNA 探针检测出的 TPP 浓度与 HPLC 给出的数据基本一致（图 1），但前者操作难度低，可在多孔板上（如 96 或 384 孔板）利用常规设备通过简单的“混合-读取”操作实现全血 TPP 含量的高通量检测，具备用于大规模筛查的潜力。此项研究为与硫胺素缺乏相关的疾病的早期诊断和干预提供了一种新方法，也对构建类似的 RNA 探针用于临床样品中的其它生物靶标分析起到了示范作用。

复旦大学生物医学研究院博士生杜鑫雨和复旦大学附属中山医院神经内科住院医师程小芹为论文共同第一作者，顾宏周研究员为本文通讯作者。这项研究得到了上海交通大学樊春海院士及复旦大学附属中山医院钟春玖教授的大力支持。国家重点研发计划“重大慢性非传染性疾病防控研究”等资助了本研究的开展。

施奇惠团队与合作者在《PNAS》报道新型肺癌循环肿瘤细胞表型

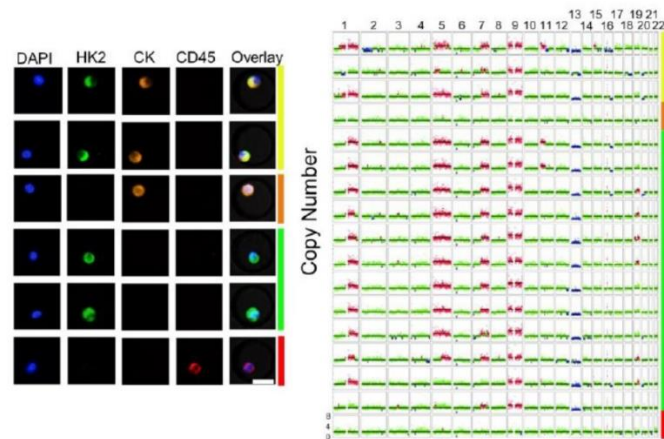
转移是癌症最重要的特征，也是导致癌症患者死亡的最主要原因。肿瘤细胞从原位病灶脱落并播散进入血液，形成远端转移的种子，而这一事件可发生在癌症的早期。在血液中检出循环肿瘤细胞（CTC）具有重要的临床价值，一方面可用于癌症诊断，因为完整的肿瘤细胞是肿瘤存在的高级别证据；另一方面也提示了癌症转移的可能。目前唯一获得FDA批准的CTC检测技术是CellSearch系统，被批准用于转移性乳腺癌、结肠癌与前列腺癌患者的CTC检测，但其在非小细胞肺癌（NSCLC）中检出率很低，这与NSCLC容易转移的临床经验不符，提示其采用的标志物可能无法有效检测NSCLC的CTC。CellSearch主要采用上皮标志物EpCAM和pan-CK（细胞角蛋白）来检测CTC，这也是大部分CTC检测技术所共同采用的标志物（可能前段样本处理与富集方法各异）。上皮标志物主要存在两个问题：一是难以检测不表达或低表达上皮标志物的CTC（灵敏度问题）；二是上

皮标志物非肿瘤细胞特有，而是所有上皮细胞所共有的，甚至在部分非上皮细胞中也可表达，因此难以确定检测到是否确为肿瘤细胞（特异性问题）。因为，一方面需寻找新的标志物解决 NSCLC 中 CTC 检出率低的问题，同时也应通过单细胞测序来验证所检测到的 CTC 并解析其分子特征以指导临床诊疗。



我院施奇惠研究团队与美国系统生物研究所巍巍团队以及上海市胸科医院陆舜团队早在 2017 年就开始使用荧光标记的代谢标志物检测肺癌患者胸腔积液中的稀有肿瘤细胞，并通过单细胞测序验证标志物的可靠性，同时在患者层面证明其具有优于脱落细胞学的诊断灵敏度（Tang et al., PNAS 2017, 114, 2544-2549）。这一工作被曾提出 Light 标准的胸腔积液专家 Richard Light 在 Faculty of 1000 Prime 上推荐。该合作团队在 2019 年采用两种功能性的荧光标记代谢探针检测肺癌患者胸腔积液中的游离肿瘤细胞并对其分型，在基因组、转录组层面研究了不同代谢表型的肿瘤细胞的分子特征与临床意义（Li et al., Nat Commun. 2019, 3856）。由于血液样本的特殊性及保存、运输的需要，常需要对样本先固定后检测，因此团队引入了新的糖酵解密切相关的标志物己糖激酶 2（HK2）用于 NSCLC 患者外周血中 CTC 的检测。这一工作以“Hexokinase 2 discerns a novel circulating tumor cell population associated with poor prognosis in lung cancer patients”为题已于近日发表于 PNAS 杂志上。

HK2 作为一个与肿瘤 Warburg 效应密切相关的酶，可用于检测血液中高糖酵解活性的肿瘤细胞（在一定阈值下），因此是一个与上皮标志物相独立的功能标志物。这一标志物与 CK 联用可大幅提升 III/IV 期 NSCLC 患者外周血中 CTC 检出率至 72%，其原因在于新标志物能够发现 NSCLC 患者血液中广泛存在的之前被忽略的 CK 阴性 CTC，且在至少一半的患者中，这种 CK 阴性的 CTC 占据了主导地位（所有患者原位组织均为 CK 阳性），这部分解释了非小细胞肺癌 CTC 检出率低的问题。同时，这种 CK 阴性的脱落肿瘤细胞在 NSCLC 患者胸腔积液和脑脊液中也广泛存在，但相比于 CK 阳性的肿瘤细胞则占比很低，这点与外周血中不同。



相比于 CK⁺ CTC，CK⁻ CTC 的尺寸更小、变形能力增强。单细胞基因组测序表明 CK⁻CTC 与 CK⁺ CTC 有相同的全基因组拷贝数变异谱，揭示了它们相同的起源。转录组测序发现 CK⁻CTC 具有与转移、靶向药物耐药相关的分子特征，同时 CK 表达与 CTC 的 EMT 状态并无必然关系，颠覆了传统 EMT 理论中认为 CK 为上皮型细胞特征的观念。在未治疗的肺腺癌患者中，外周血中 CK⁻CTC 占据主导的患者对应了更差的疗效与更短的无进展生存期。该工作展示了 NSCLC 患者外周血中更全面的 CTC 表型，并揭示了其生物学意义和临床意义。

杨柳、Xiaowei Yan、陈婕、詹琼、华萤奇为该论文的共同第一作者。复旦大学生物医学研究院施奇惠研究员与美国系统生物学研究所魏巍、上海市胸科医院陆舜为共同通讯作者。

徐彦辉团队《Cell Research》揭示人源 RNA 聚合酶 III 转录延伸复合物的结构和转录调控机制

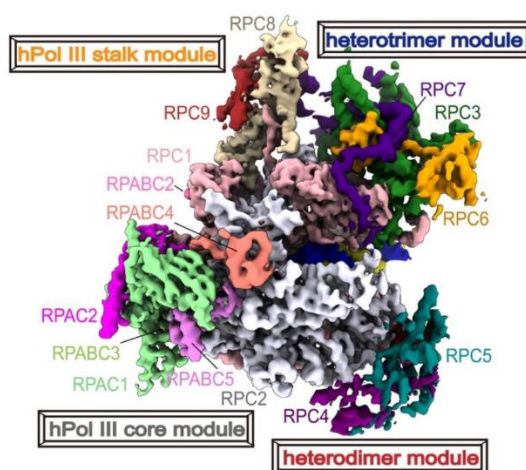
在真核生物中，三种结构保守的 RNA 聚合酶（Pol I，Pol II 和 Pol III）分别介导不同基因的转录，合成不同类型的 RNA。Pol I 定位在细胞核核仁中，主要转录 rRNA；Pol II、Pol III 均位于细胞核核质中，其中 Pol II 负责转录合成 mRNA，Pol III 负责转录合成 tRNA、5S rRNA、U6 RNA 等其他非编码小 RNA。Pol III 是真核生物中组成最为复杂的聚合酶，包含 17 个亚基，可分为结构保守的催化核心模块和外周调控模块。临床试验证明，Pol III 的突变和异常组装会导致特雷彻·柯林斯综合征、异染性脑白质营养不良、贝克威斯韦德曼氏症等疾病的发生。

2021 年 3 月 5 日我院徐彦辉团队在 Cell Research 杂志在线发表研究论文“Structure of human RNA polymerase III elongation complex”。该研究利用低温冷冻电镜单颗粒重构方法，解析了原子分辨率的人源 Pol III 转录延伸复合物的两种状态（backtracked and post-translocation）的三维结构，揭示了其转录调控的机理。

Structure of human RNA polymerase III elongation complex

Liang Li, Zishuo Yu, Dan Zhao, Yulei Ren, Haifeng Hou✉ & Yanhui Xu✉

该研究表明, 相比较于酵母的 Po1 III, 人源 Po1 III 具有结构保守的催化核心和独特的外周调控模块。RPC10 是具有核酸内切酶活性并且发挥转录校准功能的亚基, 其 N 端结构域稳定结合在 RPC4–RPC5 二聚体上, 而 C 端结构域在不同的状态下会发生大的构象变化。在 post-translocation 状态下, RPC10 的 C-ribbon 表现出高度的柔软性。而在 backtracked 状态下, RPC10 的 C-ribbon 稳定结合在 Po1 III 催化活性中心附近, 为 Po1 III 的高保真转录提供保障。这也与 RPC10 在 Po1 III 转录终止中的作用相吻合。



人源RNA聚合酶III的冷冻电镜结构

RPC7 有两种亚型, 分别为 RPC7a 和 RPC7b 组成两种不同的聚合酶复合物。其中, RPC7a 主要在未分化细胞和癌症细胞中有特异性表达。结构分析发现 RPC7a 的 N 端结构域和 RPC6 的 WH1 结构域共同作用在 PRC1 的 clamp 上, 这个相互作用面与 MAF1 (Po1 III 的负调控因子) 与 clamp 结合面正好重叠, 而 RPC7b 则不具备结合在相同位置的能力。这个研究结果从结构角度阐明了 RPC7a 可以避开 MAF1 对 Po1 III 转录抑制作用的机制。



在此研究论文审稿过程中，国际上有三个研究小组（上图）发表了关于人源 Po1 III 的研究工作，基本结构模型相似，但着重点各有不同，从多个角度共同揭示了人源 Po1 III 的结构特征以及可能的转录调控机制。

徐彦辉课题组博士后李良，博士生于子朔，赵丹为本文共同第一作者，徐彦辉研究员和侯海峰副研究员为共同通讯作者。中科院生物物理所成像中心、国家蛋白质中心、上科大冷冻电镜中心，以及正在建设中的复旦大学上海医学院电镜中心，对该研究的数据收集给予了重要的支持。