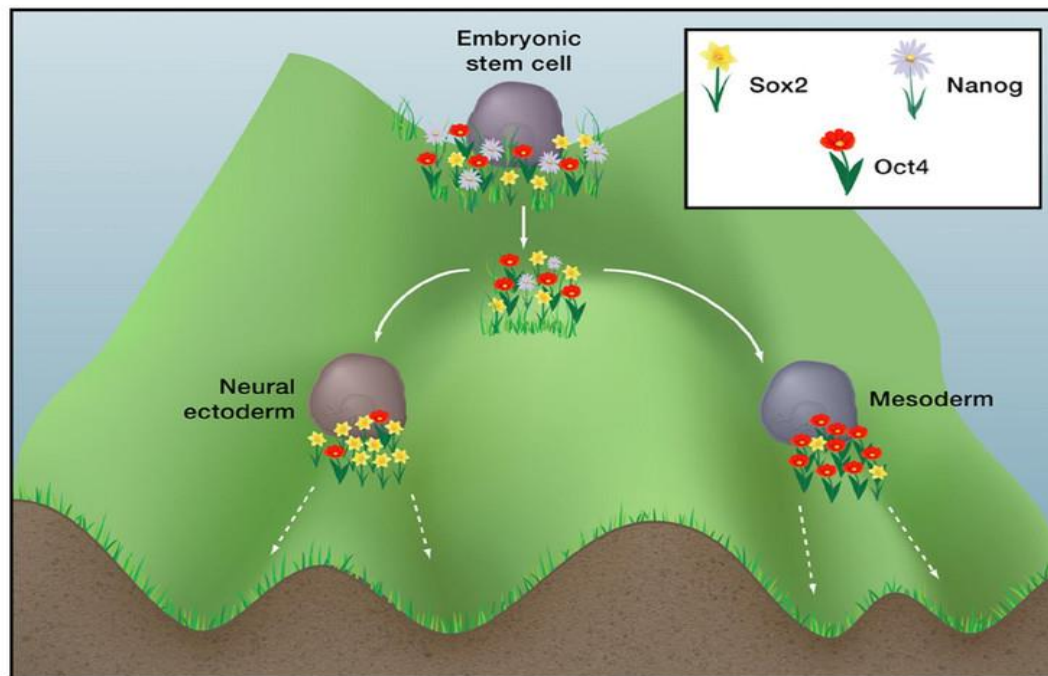


# 构建四稳态基因网络工程

## 接近瓦丁顿表遗传景观和细胞命运决定机制



文献翻译：何焯健 程小桔 汤晨  
文献解读：程小桔 汤晨  
PPT制作：汤晨 程小桔



研究背景

MINPA最优四稳态性的验证分析

多稳定性的可操作和滞后性验证

MINPA模型导向四稳态的实验演示

研究意义

实验材料

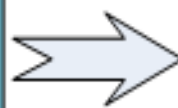
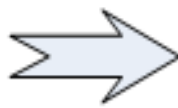
术语解释

理论层面

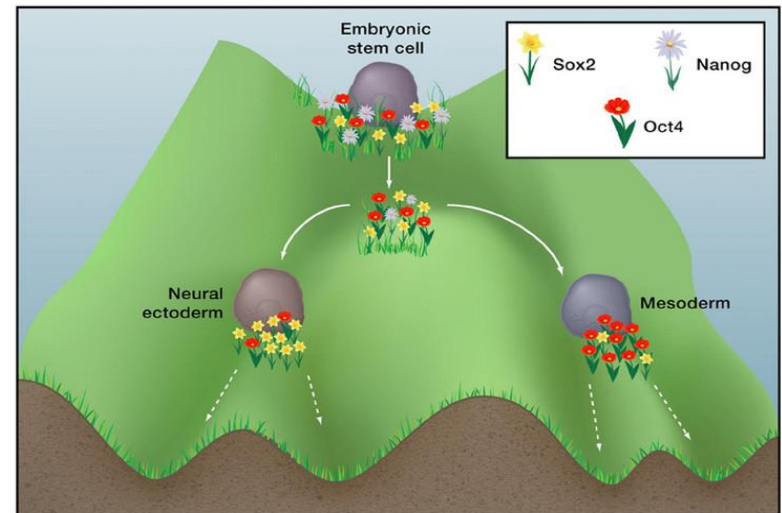
实验层面

构建详细的分叉模型

顺序诱导法

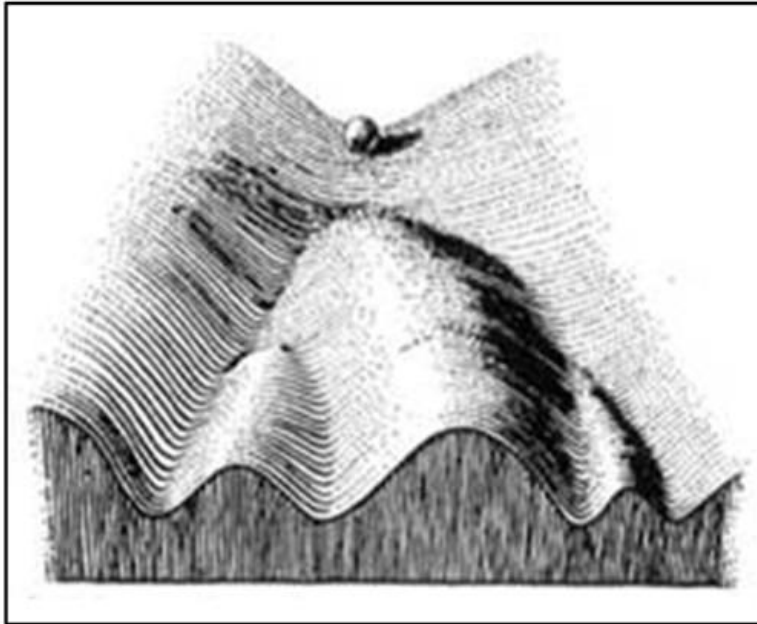


Waddington (1905-1975) 是当时著名的、英国发育生物学家和遗传学家，在说明基因、环境等因素与发育关系时，提出了**表遗传景观**这一概念。在这一比喻说明中，他设想球（相当于细胞）从山岗顶端沿山坡滚下，山坡是由一系列分岔的山谷和山谷间的山脊组成，表遗传学景观的三维深度意含影响发育的各种因子。当多个球从山坡最高点滚下时，其运行轨迹代表细胞不同的发育分化途径。山岗底部的最低点，这代表了最终细胞命运的决定，即特定组织类型的形成；一旦进入谷底，就很难跨过山脊进入邻近山谷，或者回到上坡的位置，这表示随着细胞类型不断分化，增加了分化终末细的不可逆性。

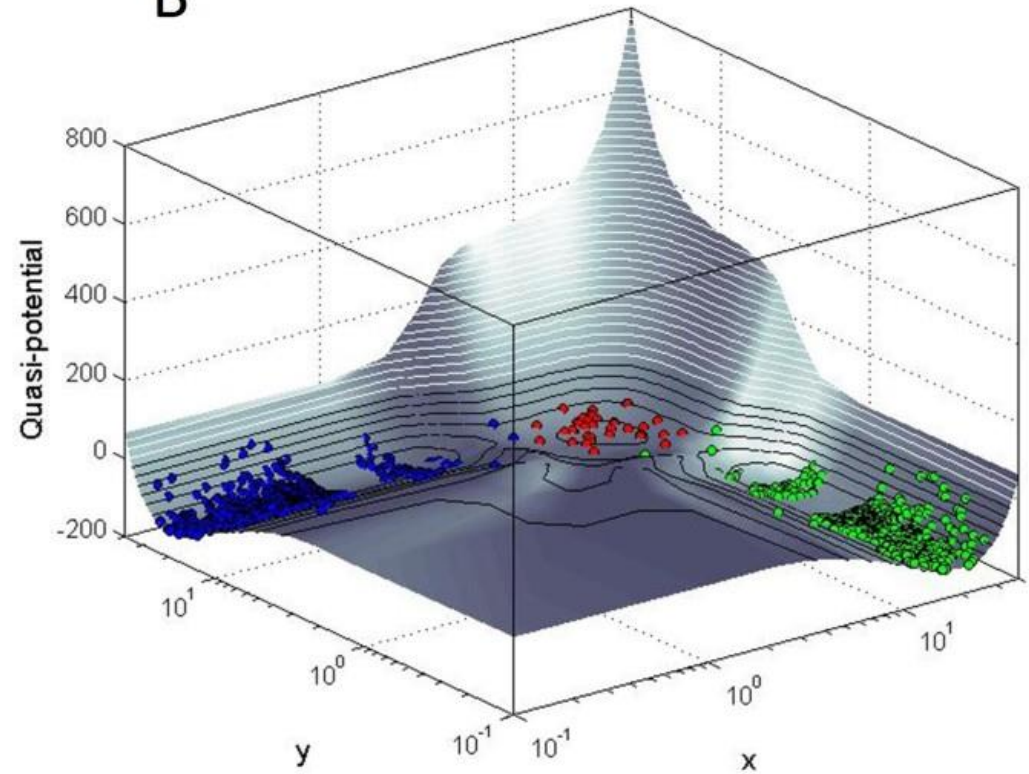


# Waddington Landscape

A



B



# 合成四稳态基因网络工程

本文测试了不同的拓扑结构，并验证了一个具有相互抑制和自动激活的合成基因回路是四稳态的，这可以直接研究工程化景观中四重细胞命运的确切。我们发现细胞确实倾向于局部最小值，信号诱导通过调节多态景观的形状来决定细胞命运。由模型预测指导的实验表明，顺序诱导通过依次改变景观将细胞导向不同的最终状态而产生不同的细胞命运。

这项工作构建了一个合成生物学框架来接近细胞命运的确切，并为目标分化提出了一个基于景观的对固定诱导序列的解释。

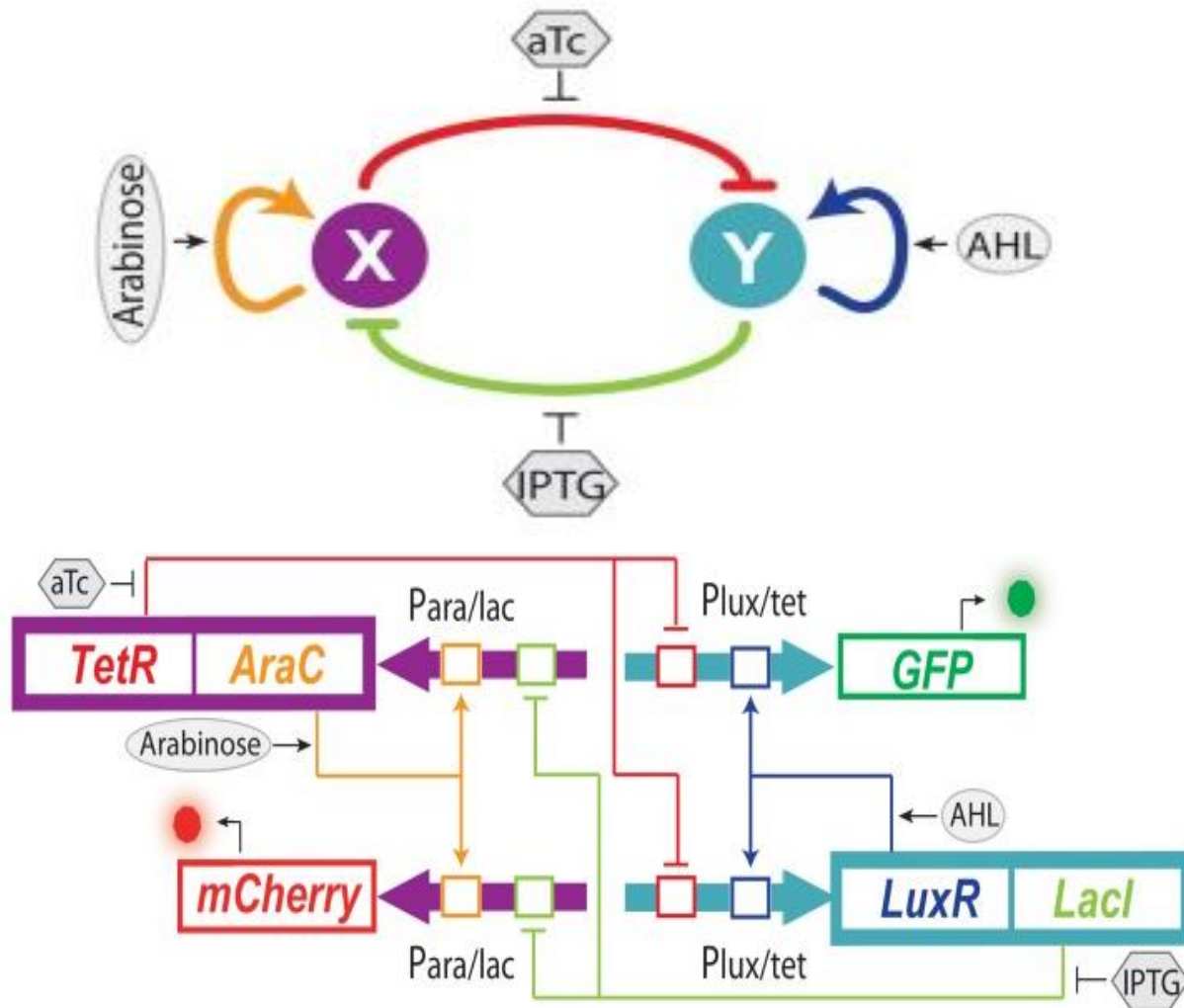
# 人造版的MINPA基因网络

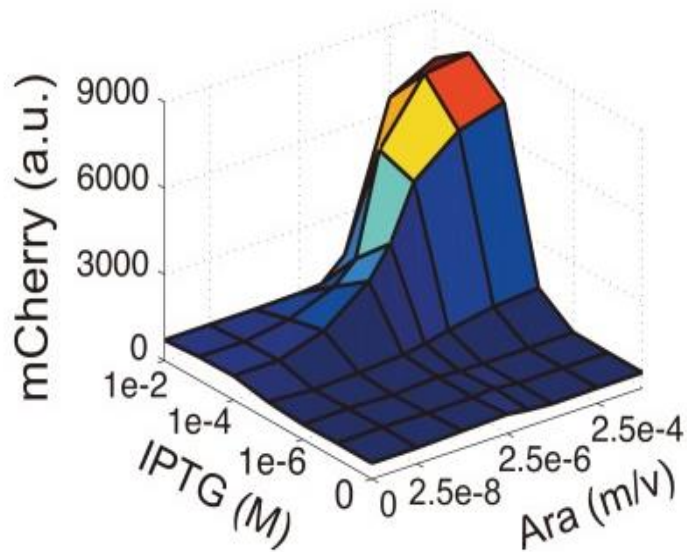
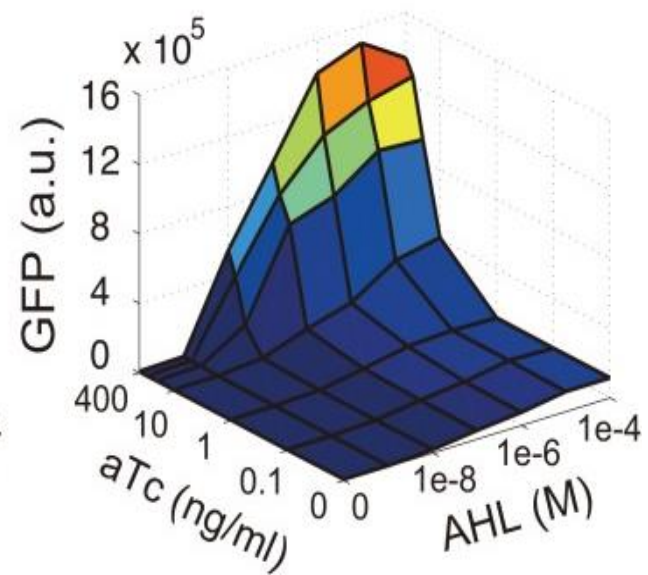
使用大肠杆菌的细菌作为模型来研究：

因为细菌细胞可以使用转录因子网络中的多重性来响应来自环境的线索而在不同的行为或状态之间切换，通常不会专门分化为特定的细胞类型。

由于这些原理的运转只需要基因表达调控的最基本的方面，它们也适用于哺乳动物细胞中的细胞分化规则。

# MINPA基因网络




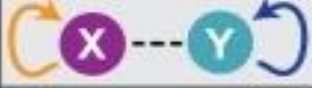



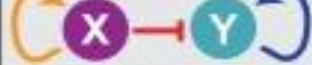


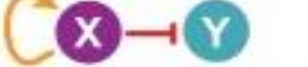






**D****E**

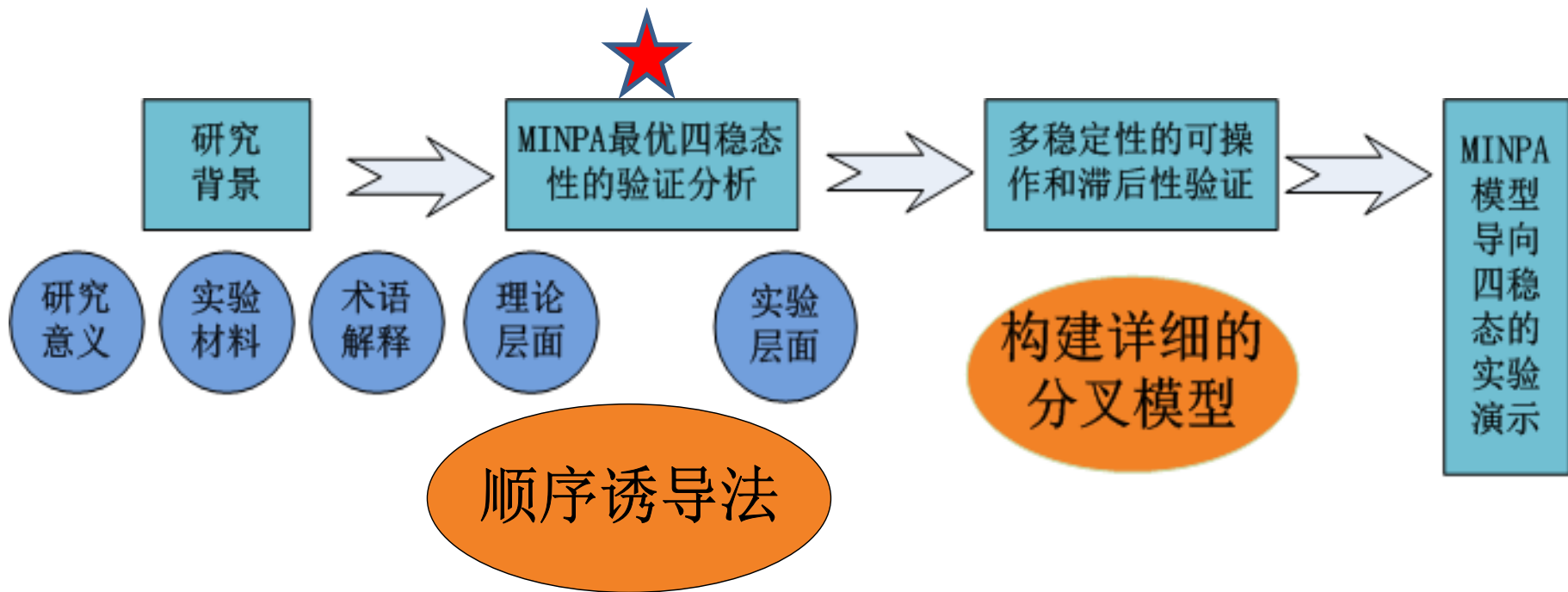
通过Arabinose (Ara) 和IPTG以及AHL和aTc分别诱导的Para / lac (D) 和Plux / tet (E) 的动态反应。呈现的数据是三次重复的平均值。

绿色荧光蛋白 (GFP) 和红色荧光蛋白 (mCherry) 作为活细胞中Plux / tet和Para / lac活性的相应读数。



Type	Index	Topology	Type	Index	Topology
R	T1		R <sup>2</sup>	T5	
	T4		A <sup>2</sup>	T10	
A	T8		RA <sup>2</sup>	T11	
	T2			T14	
R-A	T3		R <sup>2</sup> A	T7	
	T12			T13	
RA	T9		R <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	T15	
	T6				

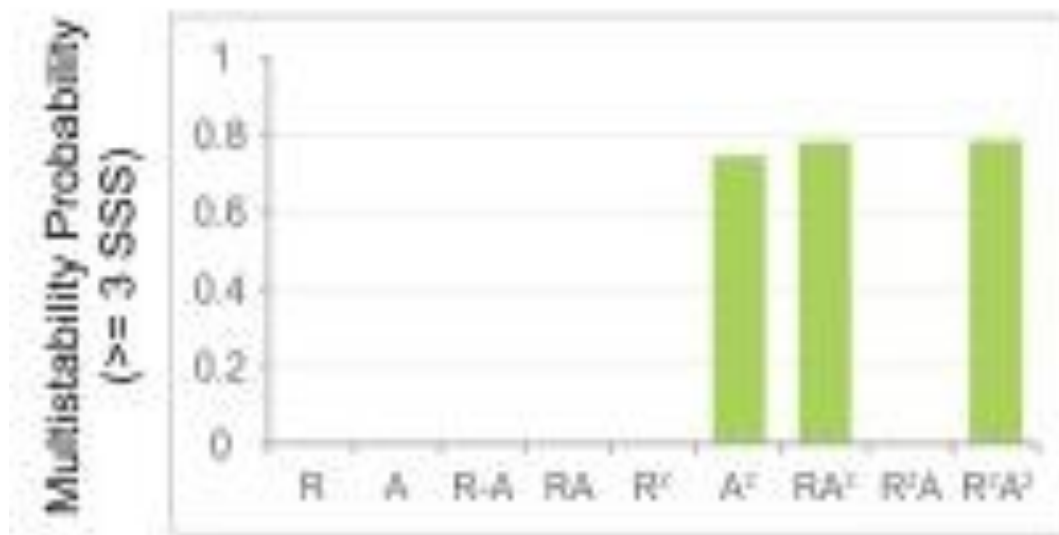
MINPA及其14个子网的列表。T表示“拓扑”。R代表“抑制”，A代表“自动激活”。上标用于描述这种类型边缘的数量。接下来用阴影背景的拓扑结构进行实验分析。



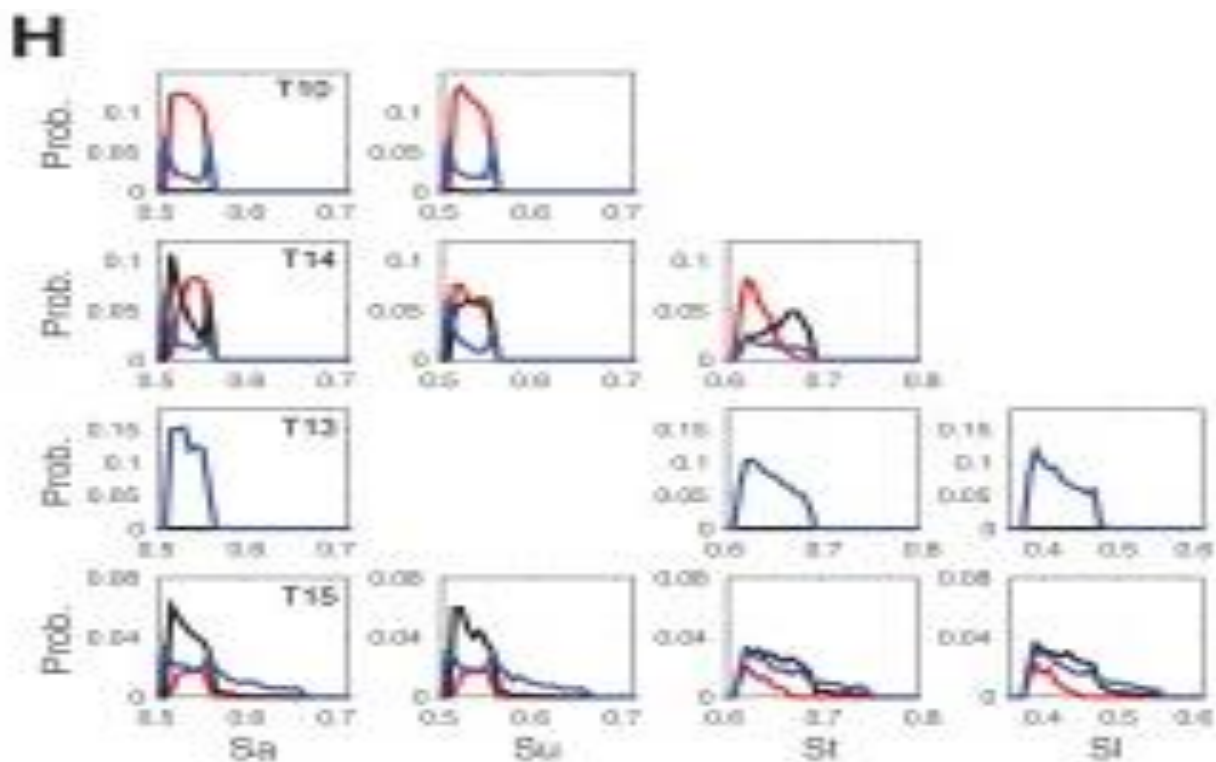
MINPA及其所有子网络的拓扑结构可以分为四层：

基于调控的边的数量从一到四维网络，并进一步分为九组 激活和抑制的配置。通过对每个非平凡网络的大参数范围进行计算搜索发现，A2, RA2, R2A2 具有很高的三稳态性或四稳态性。

SSS: stable steady states




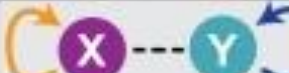





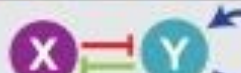







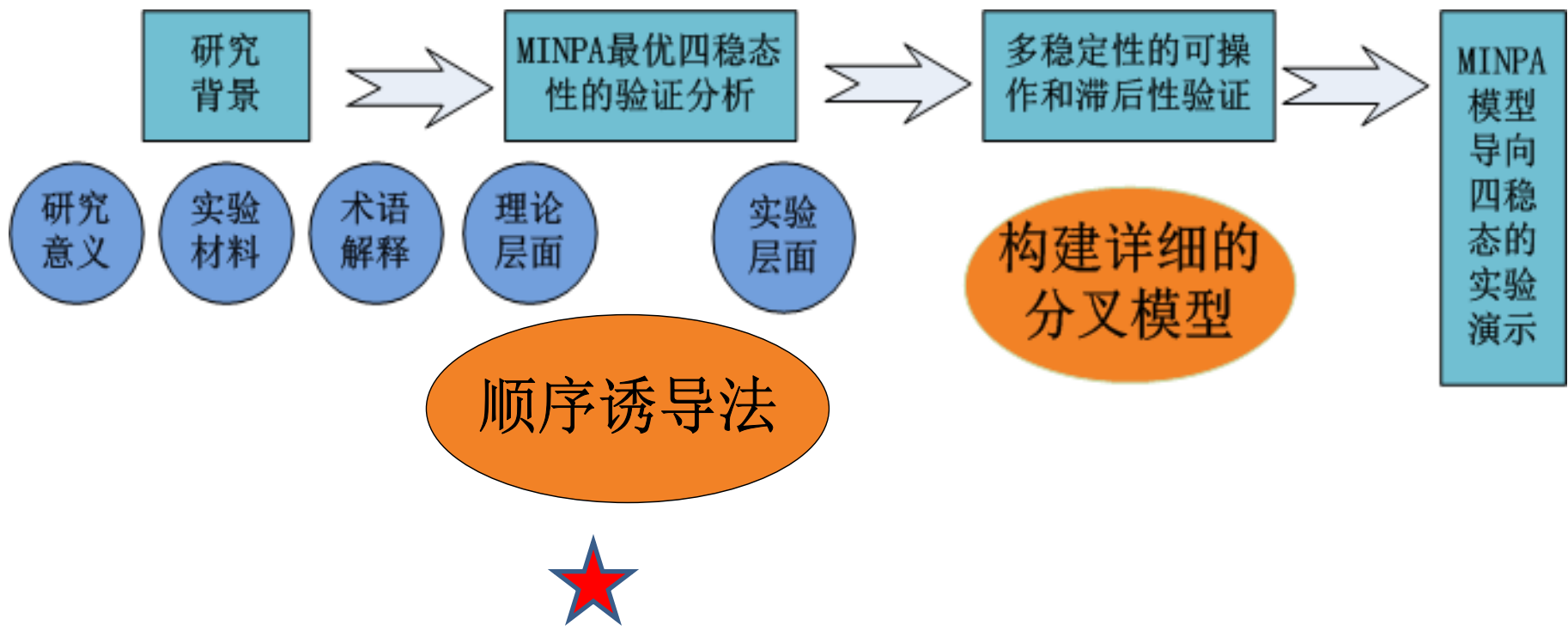
然而，MINPA具有比其他两个更广的参数分布这表明它对参数变化更具抗性，因此可能在实验设置中实现多重性。



为了实验评估这些网络的动态特性，我们构建了9个回路，包括可调正反馈（T6和T9），相互抑制（T5），双正反馈（T10）及其组合（T7， T11， T13， T14 和T15）。

一维网络（T1， T4， T2和T8）和平凡的二维网络（T3和T12）由于其低多元概率被排除。所有图案都使用相同的组件组合构建。

Type	Index	Topology	Type	Index	Topology
R	T1		R <sup>2</sup>	T5	
	T4		A <sup>2</sup>	T10	
A	T8		RA <sup>2</sup>	T11	
	T2			T14	
R-A	T3		R <sup>2</sup> A	T7	
	T12			T13	
RA	T9		R <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	T15	
	T6				

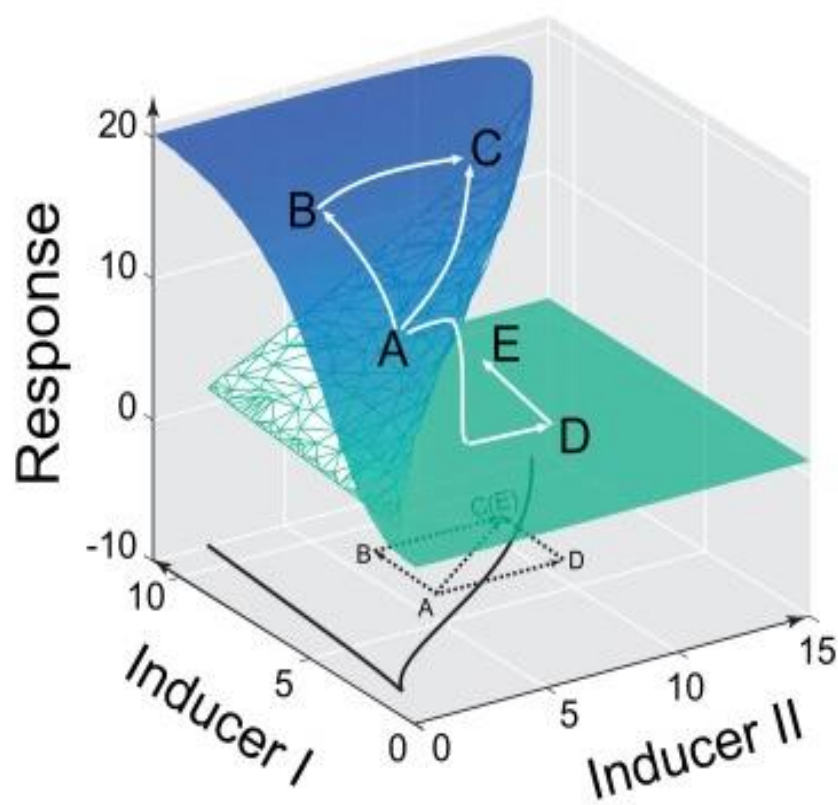


# 顺序诱导

目的：优化未知高维分岔空间的搜索

主要概念：依赖于多变量基因网络可以表现出不连续的跳跃从一个状态到另一个状态来响应参数（诱导物）组合的变化。

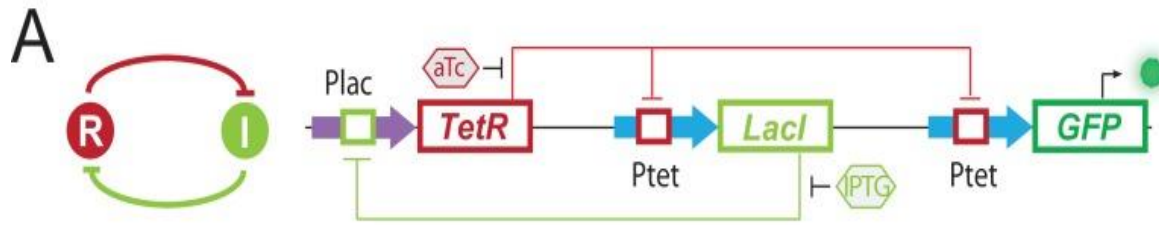
原因：探索回路的多重性通常需要全面的滞后实验，涵盖所有诱导剂的广泛剂量范围，但是其对于具有四种诱导剂的九个复杂网络变得不可行。



该回路可以由两个外部诱导器调谐，当两个诱导物同时诱导时，细胞可以直接达到双稳态区域的状态C.如果诱导剂I首先诱导细胞进入状态B，则在诱导剂II添加后，细胞也将达到状态C。然而，如果首先应用相同剂量的诱导剂II，则细胞将在低反应表面上跨越分岔平面到状态D，然后通过加入诱导剂I达到状态E。状态C和E是具有相同诱导剂量的两种不同的稳态，说明滞后性和验证了多态性。

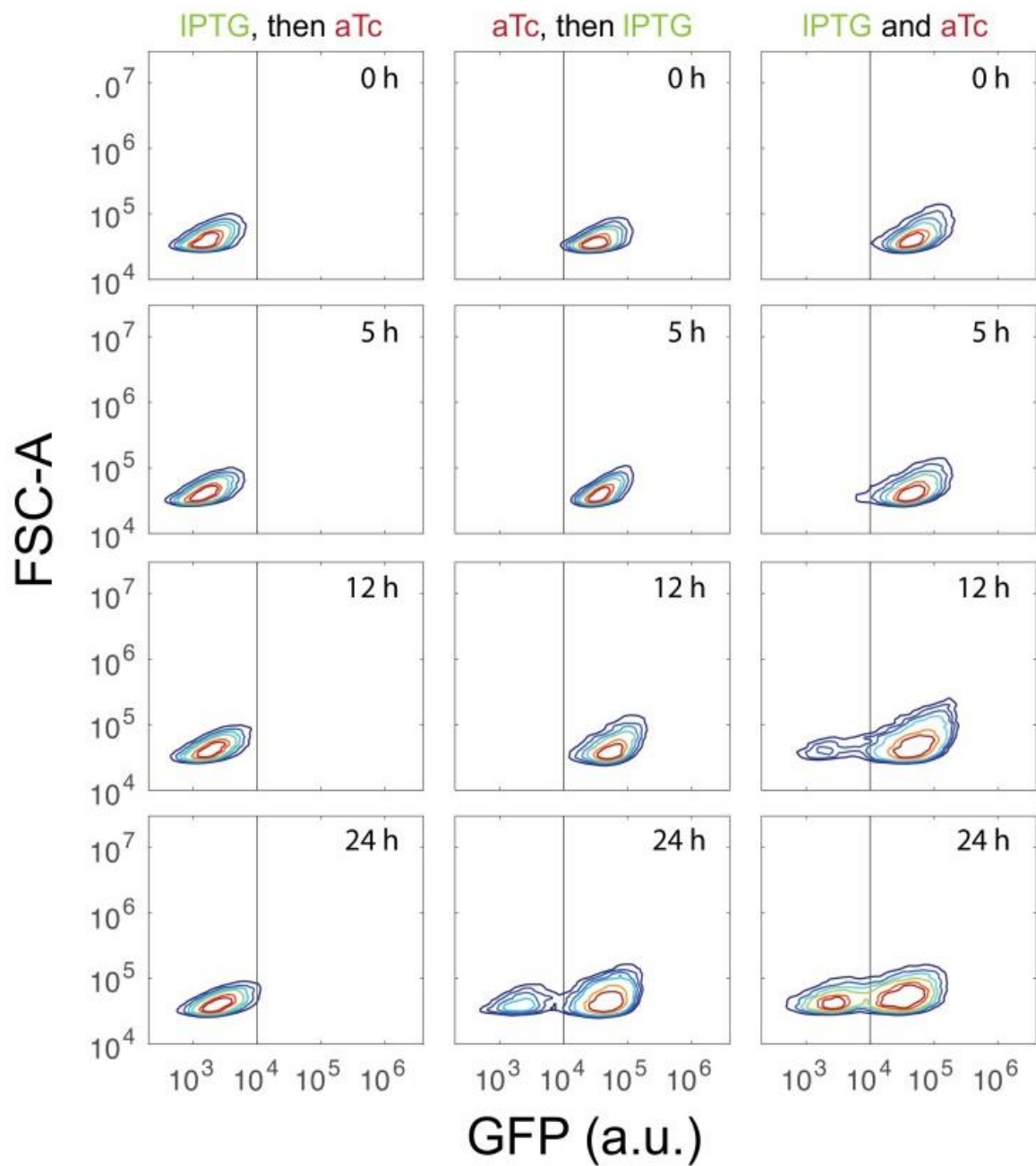


# 构建了一个合成的拨动开关回路 验证理论分析

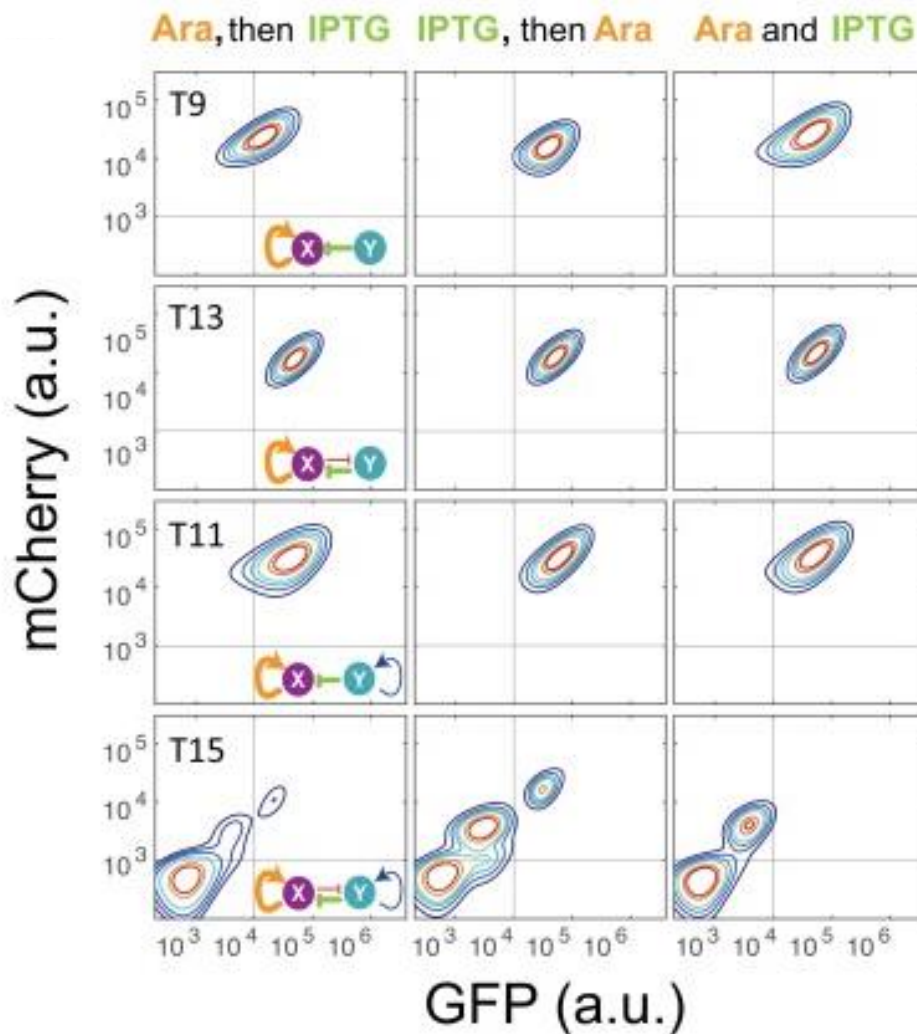


设计三个对比试验：

- 1 先使用IPTG诱导回路5小时，然后加入aTc
- 2 先用aTc诱导然后加入IPTG
- 3 同时用aTc和IPTG诱导产生相似的细胞分布。



结果表明，  
顺序诱导可  
用作快速探  
索复杂非平  
衡系统的多  
态潜力景观  
的策略。

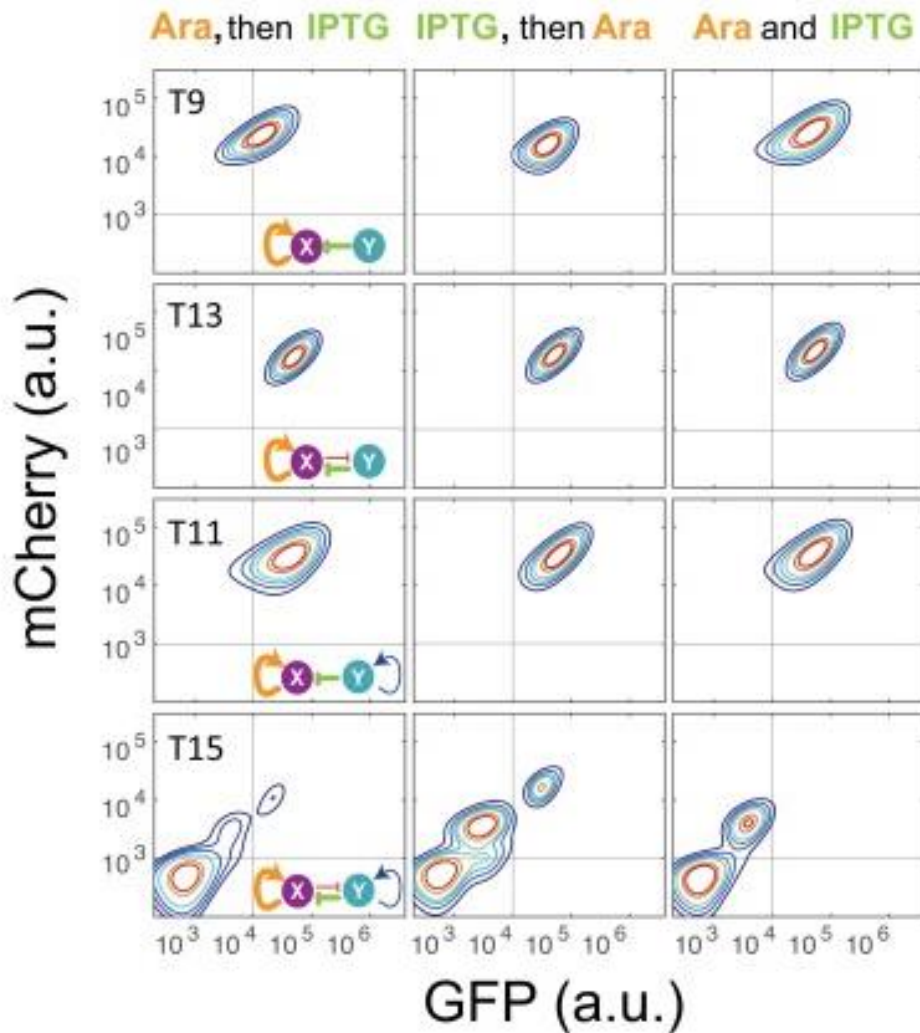


Arabinose和IPTG分别应用于T9, T13, T11和T15。可以看出, 只有T15在三种诱导模式之间表现出显著的表达差异, 而其他诱导模式则显示出很小的变化。应该注意的是, T15还表现出三种状态荧光表达, 这表明存在基因表达噪声的多态性。

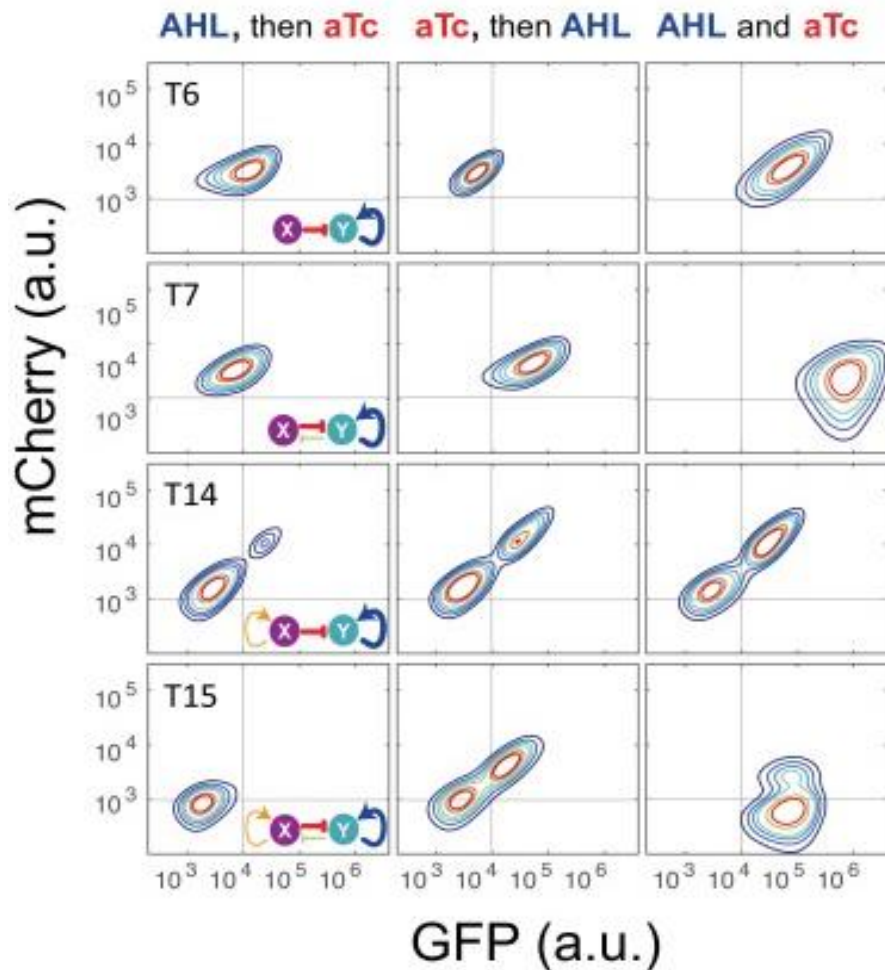
# 顺序诱导应用于本次实验

使用顺序诱导方法，我们使用流式细胞术测试了九个回路。

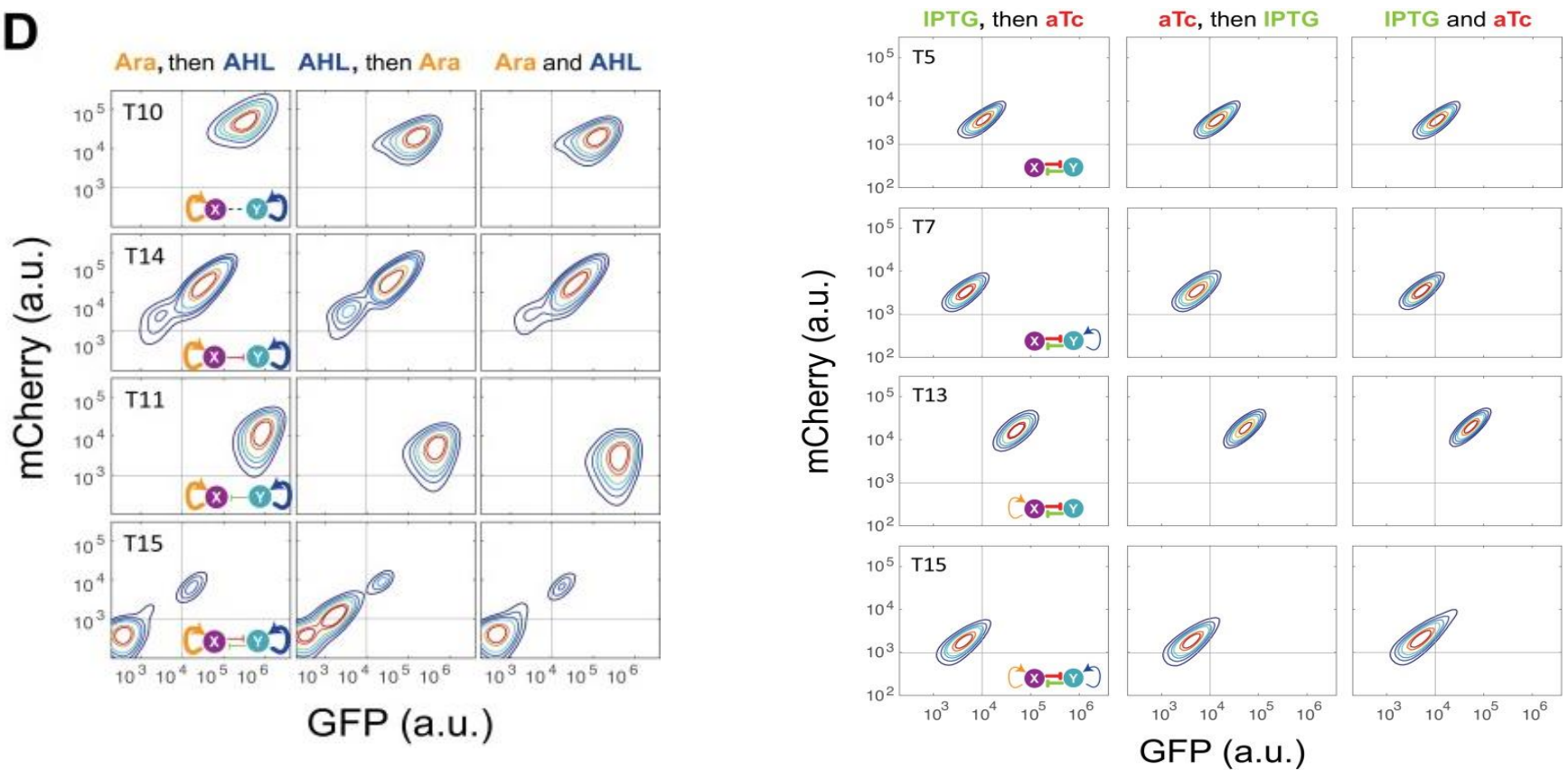
细胞首先由诱导剂I诱导，然后将诱导剂II加入培养基中另外24小时。根据回路的结构，使用了四种不同的双诱导剂组合。



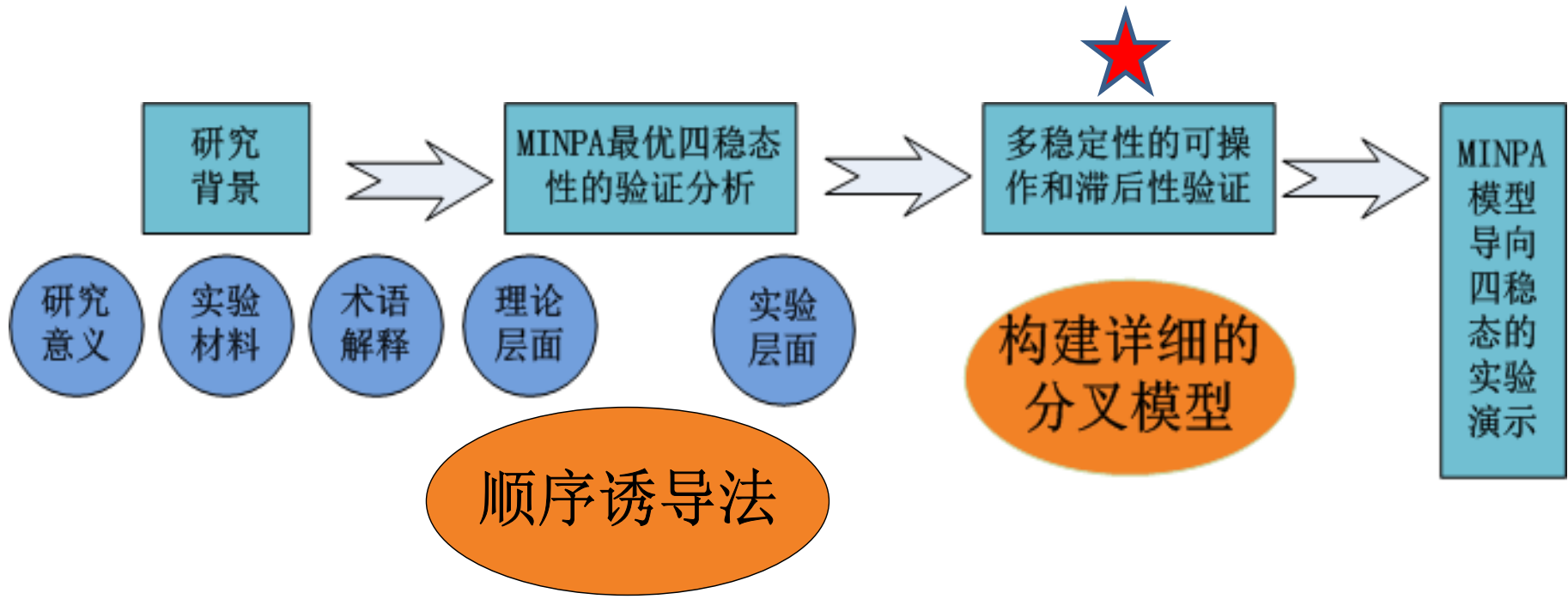
Arabinose和IPTG分别应用于T9, T13, T11和T15。可以看出, 只有T15在三种诱导模式之间表现出显著的表达差异, 而其他诱导模式则显示出很小的变化。应该注意的是, T15还表现出三种状态荧光表达, 这表明存在基因表达噪声的多态性。



AHL和aTc应用于T6, T7, T14和T15。结果表明, 只有T15在不同的诱导下表现出显著的荧光模式变化, 而T6和T7表现出轻微均匀的表达变化。T14虽然表现出双峰性, 但仅显示三个诱导之间的两个群体的比例变化, 而没有分岔的迹象。

**D**

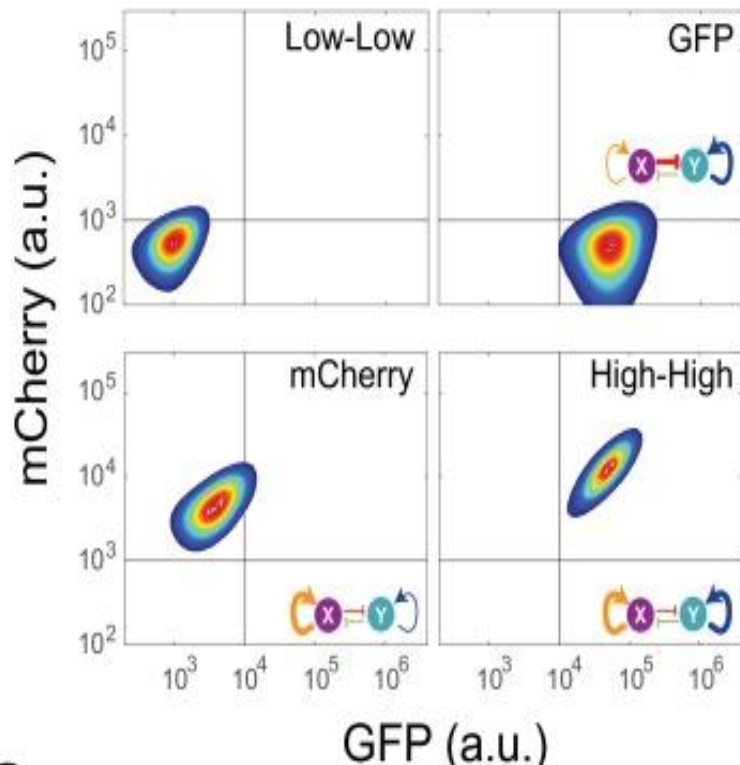
Arabinose和AHL组合的顺序诱导对T10, T14和T11几乎没有影响, 但是T15显示了AHL-then-Arabinose诱导下的三个显著的群体。综合来看, 在顺序诱导下, 完整的MINPA拓扑结构T15显示了种群异质性的最多样化和复杂性, 表明该回路在我们的诱导范围内有最大潜力产生复杂多重性, 从而使我们能够逼近Waddington景观。





# 多稳定性的分岔和滞后验证

接下来，通过使用四种诱导剂（Arabinose, AHL, aTc和IPTG）微调调控强度并扰乱系统来进一步检查T15的操作原理和完全可控性。



这些结果验证了我们的工程MINPA回路能按照设定起作用且完全可控，分别通过适当的诱导可达到四种不同的状态。

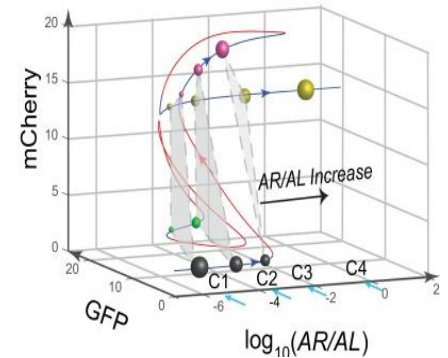
未诱导的细胞：低GFP和低mCherry表达

在AHL和aTc的诱导下：观察到高GFP和低mCherry

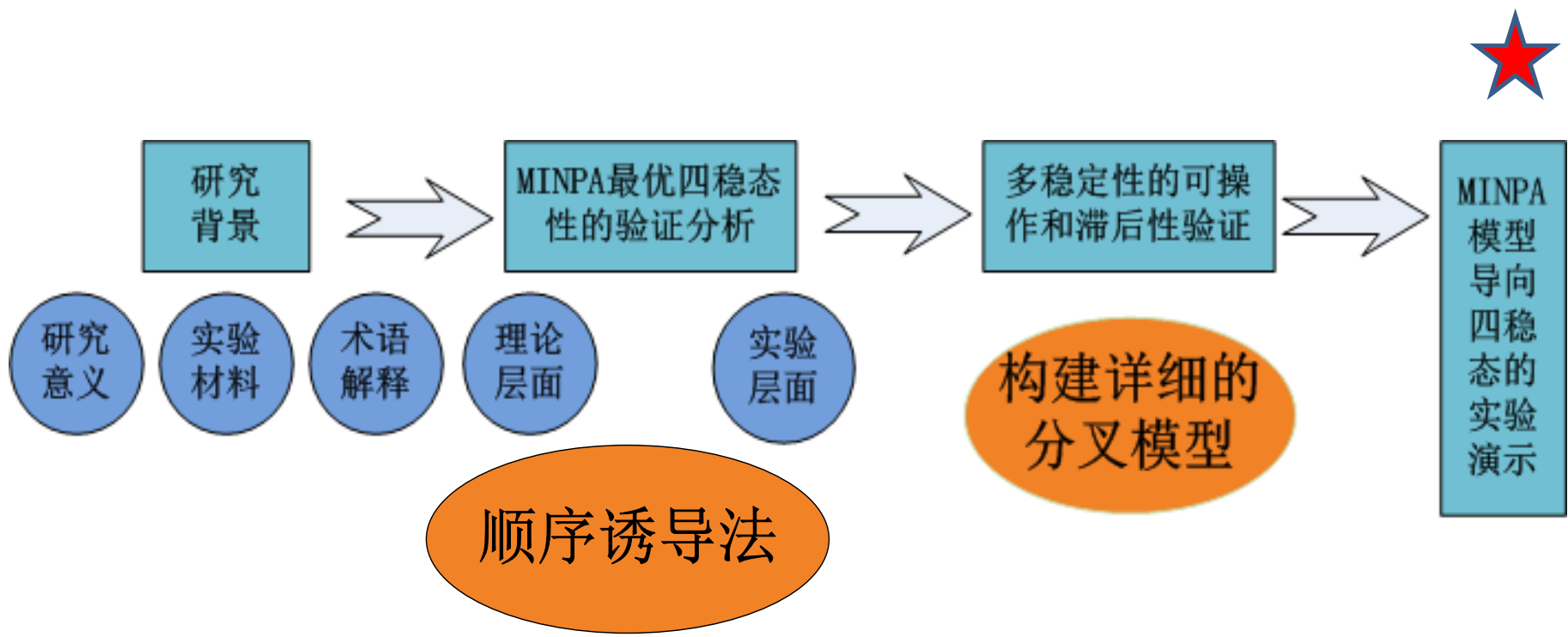
在Arabinose诱导下：低GFP和高mCherry

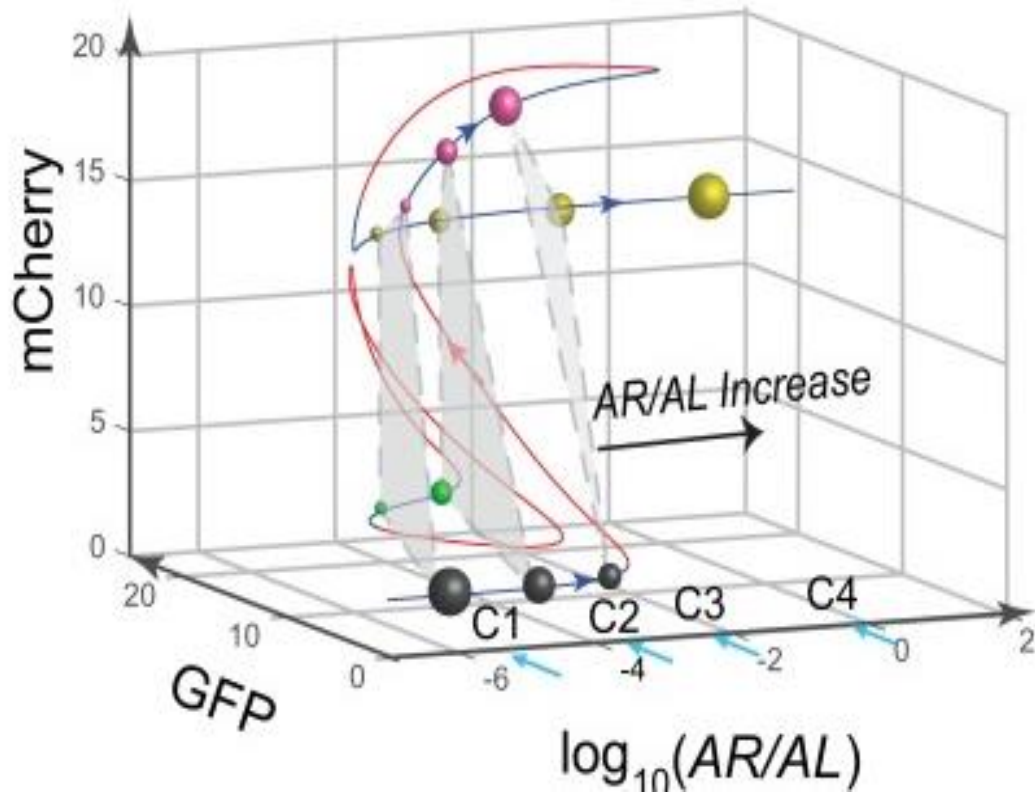
在用Arabinose和AHL诱导下：高GFP和mCherry。

# 分岔分析模型

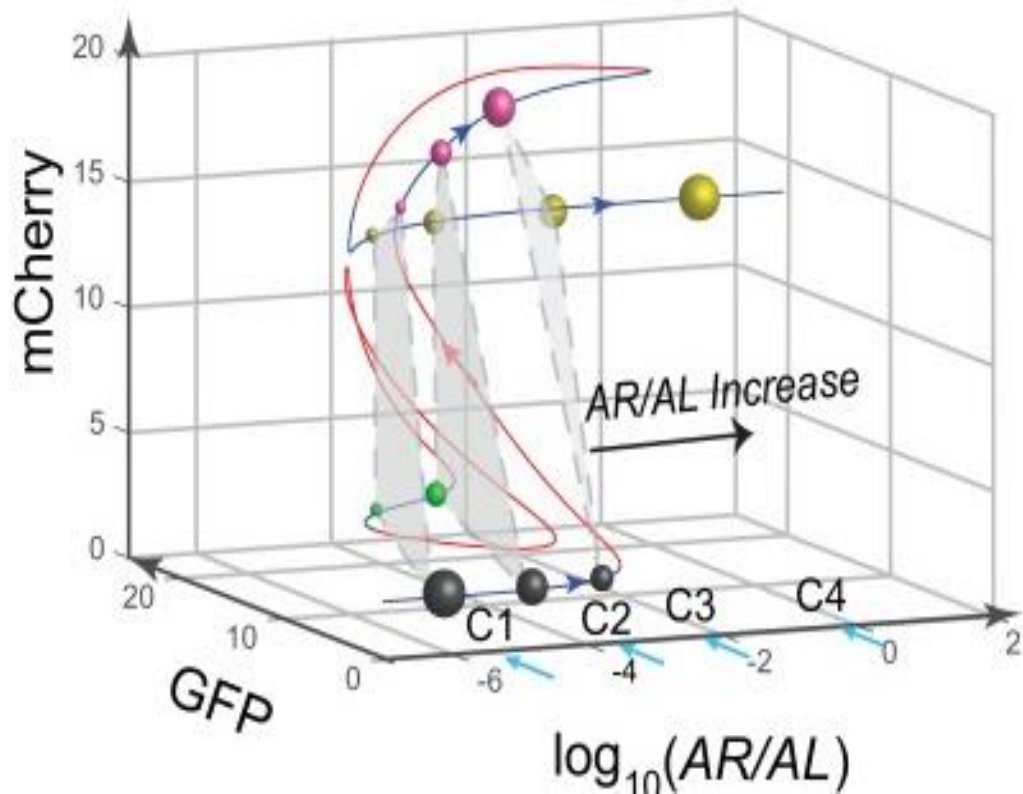


为了帮助设计实验进一步研究回路的四稳态，开发了一个详细的数学模型来描述系统。使用从混合启动子测试实验得到的参数，进行分岔分析以系统地量化MINPA的动态行为。

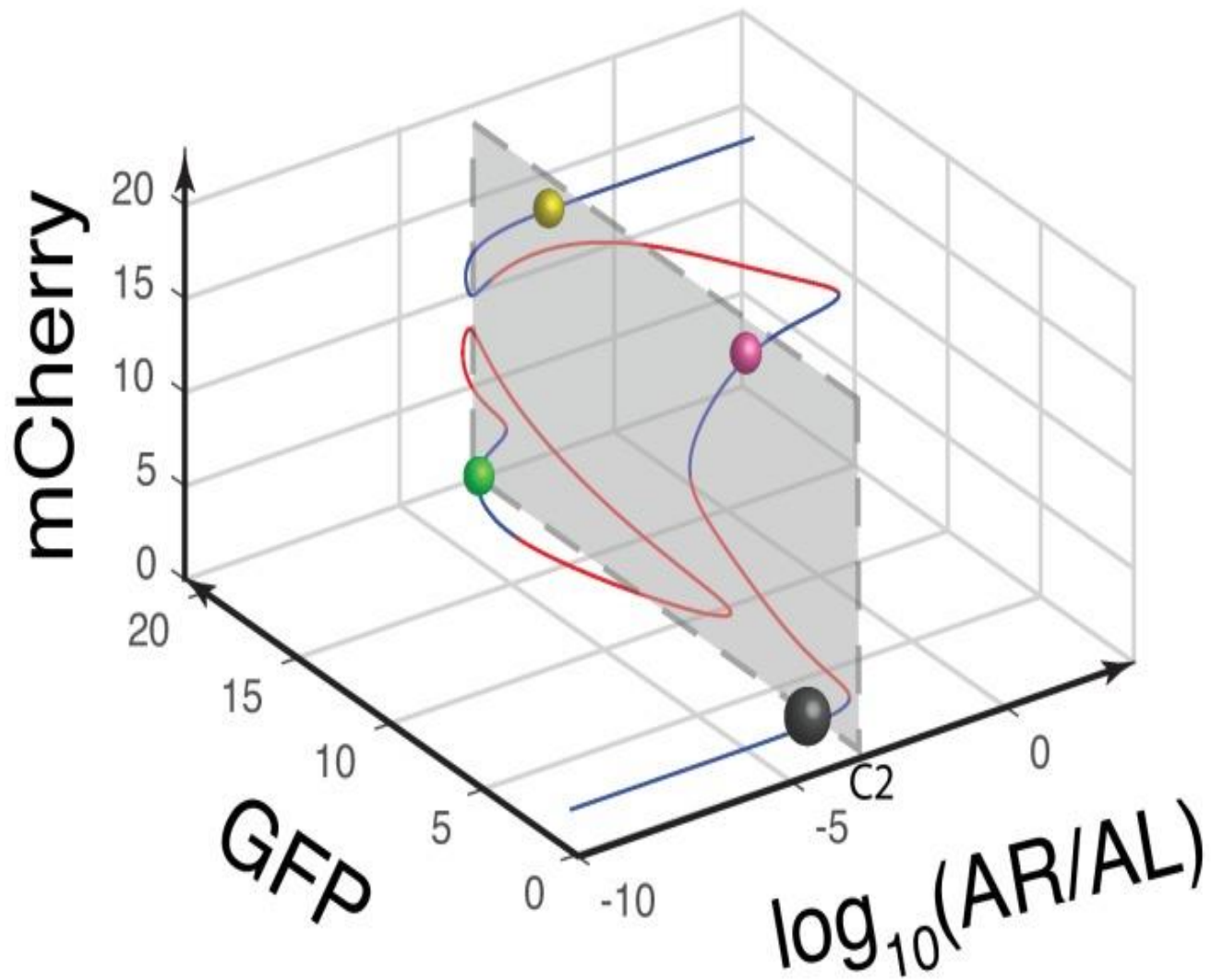


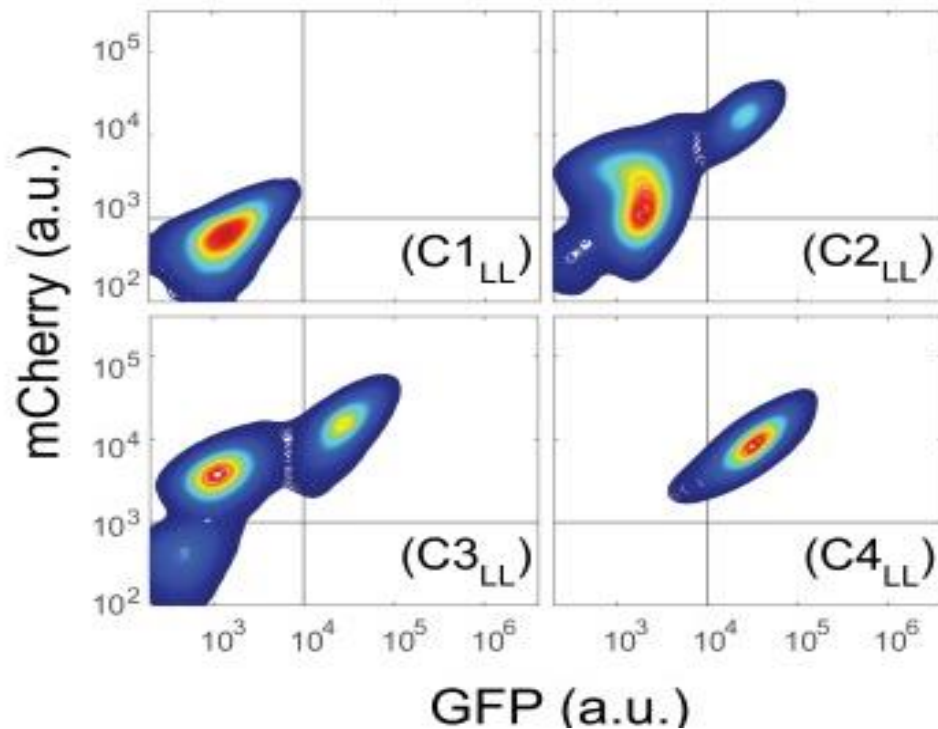


“AR / AL”是由Arabinose和AHL浓度的固定比率组成的集成参数。四个有色球体，分别代表LL（灰色），GFP（绿色），mCherry（玫瑰）和HH（金）状态，球体的大小与每个状态的吸引力相关联。C1，C2，C3和C4是用于实验探测的四种递增浓度的Arabinose和AHL。



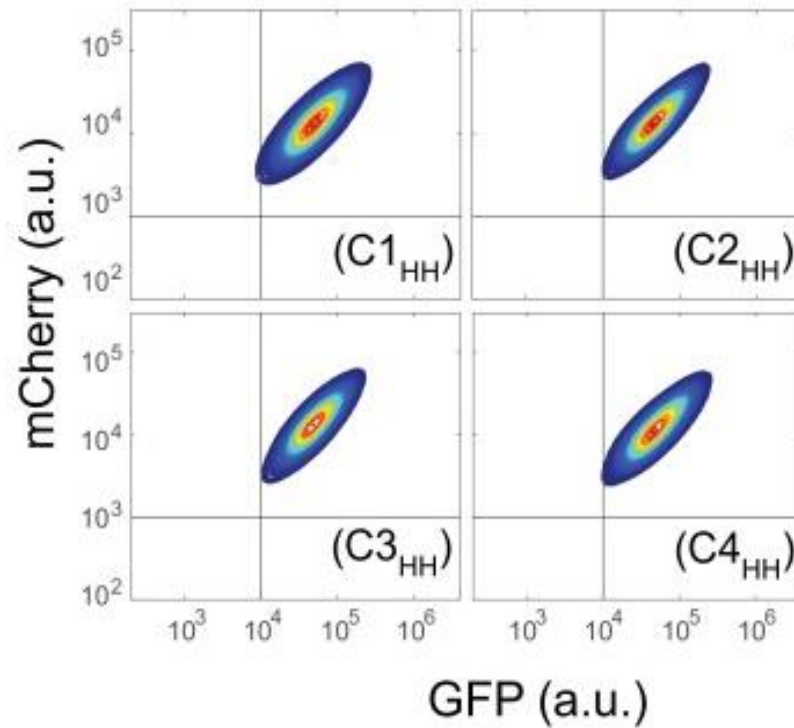
但当  $AR / AL$  低时，low-low 状态具有主导吸引力。当  $AR / AL$  水平处于中间范围内时，不同状态之间的相对稳定性变得可比。当  $AR / AL$  水平从 C1 增加到 C2 时，回路的四稳态性变得很明显。当  $AR / AL$  从 C2 继续增加到 C3，而其他三个 SSS 保持稳定，GFP 分岔的稳定性消失。  $AR / AL$  的进一步增加只能产生一个稳定的 high-high 的状态，如最大尺寸的橙色球体。



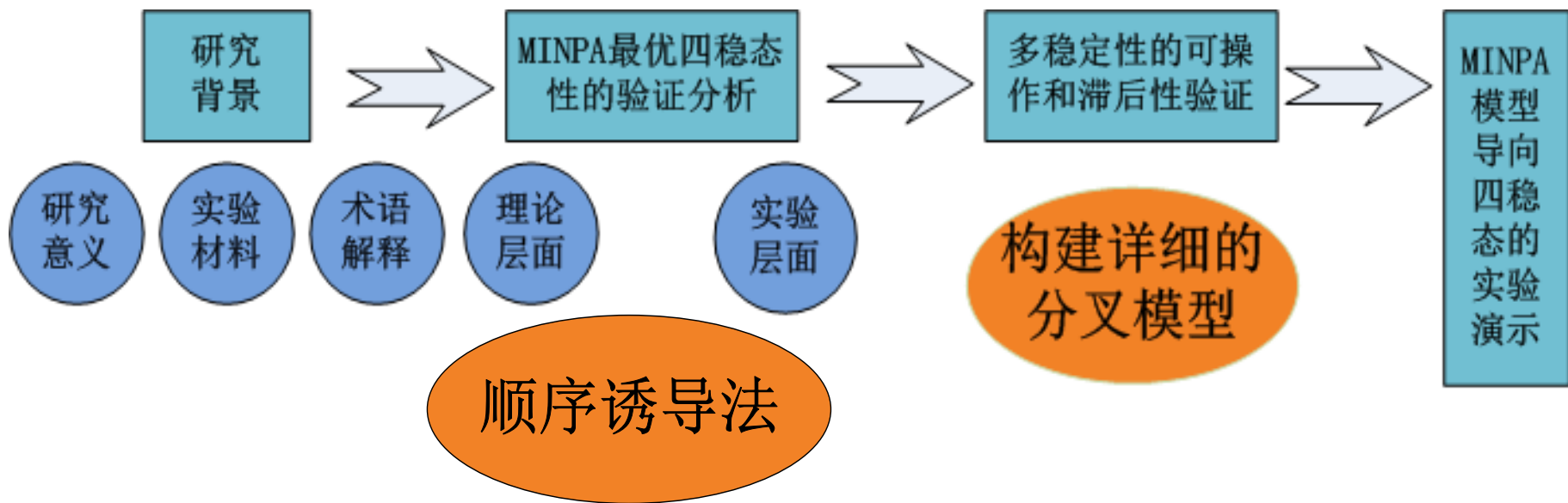


C1LL（在C1条件下生长的初始low-low状态的细胞）中，C4LL显示出均匀的high-high荧光图，因为low-low状态是主要吸引力。而C3LL确实表明了三个态，这是预测的三态性的结果。C2LL实验表现出足够的异质性来表示high-high, low-low和mCherry状态，但没有GFP状态的显著痕迹。鉴于GFP状态是通过组合诱导AHL和aTc实现的，我们假设这里的GFP状态不容易通过AHL单独诱导获得





接下来，收集在high-high状态下初始化的细胞，并将其稀释成具有相同浓度的AR / AL的新鲜培养基（图3D和图3图补充2J）。如预测的那样，这些细胞即使使用低至C1浓度的诱导也能保持high-high的表达谱，也证明该系统在C1时已经是多态的。总而言之，两组实验对比证明了明显的滞后，并验证了四种预测SSS中三种的存在。

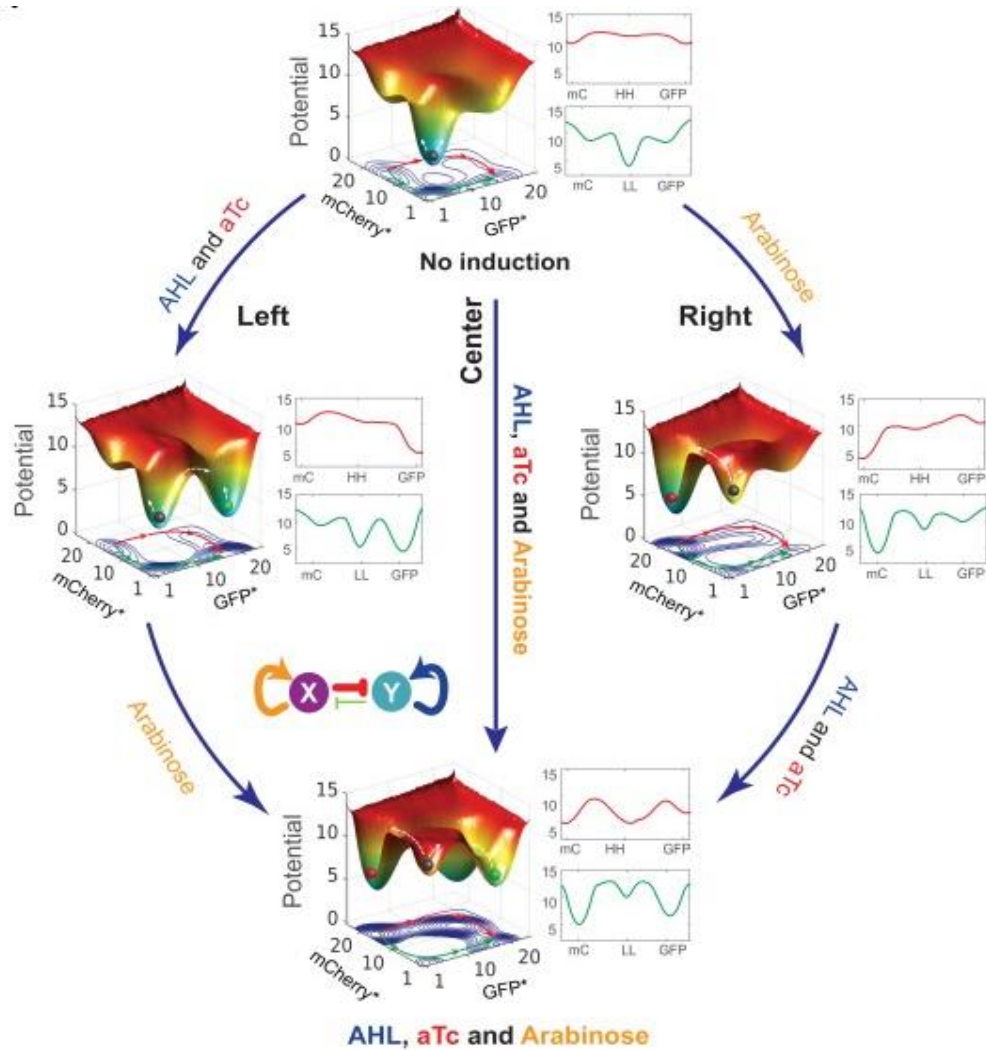


# MINPA模型导向四稳态的实验演示

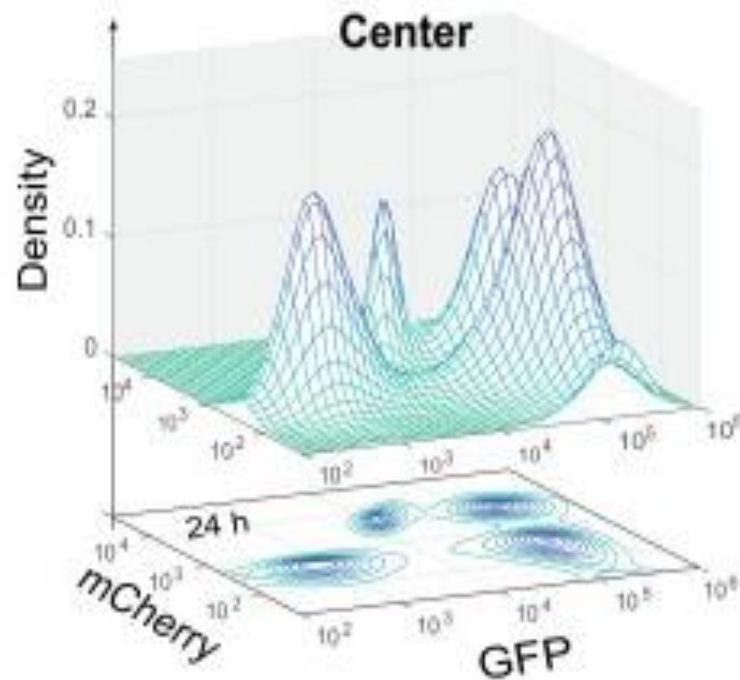
为了进一步研究什么决定了该三稳态系统中某些SSS的可及性以及细胞如何进入这个吸引人的状态，我们考虑到基因表达随机性来描绘MINPA的准潜在吸引子概况，其计算为GFP和mCherry相位空间中静止分布密度的负对数函数。

这里采用的是加权综合随机游走算法，可以从初始均匀分布中有效计算静态密度分布。

# 具有相同MINPA网络的细胞 在不同的诱导下表现出不同的状态

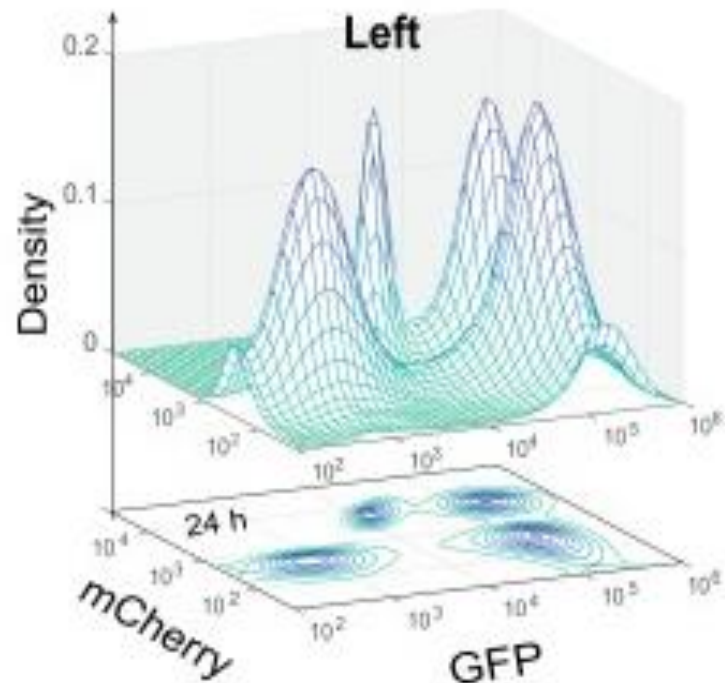


红线描绘从mCherry状态到high-high状态到GFP状态的电位，  
而绿色表示从mCherry状态到low-low态到GFP状态的潜力。



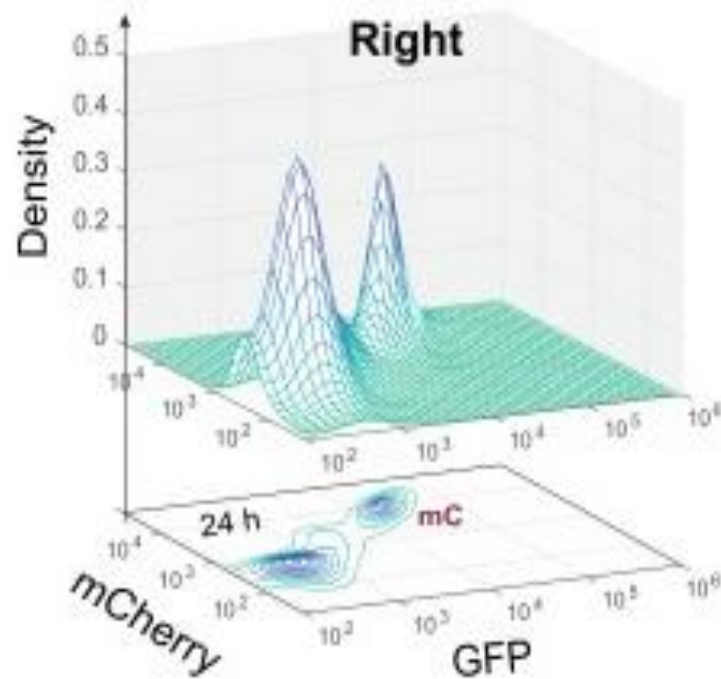
由于Arabinose和AHL组合不足以使细胞达到所有四种SSS，所以我们选择在组合中添加aTc以进一步促进这四个SSS之间的细胞转换。

实验验证显示为用Arabinose，AHL和aTc这种混合诱导极大地促进了细胞从低-低态到其他三种状态的转变，从而出现四稳态分布。而AHL和aTc促进更稳定的GFP状态（左中心），而Arabinose诱导调节景观偏向mCherry状态（右中心）。



左路线和右路线尽管最初的和最后的景观是一样的，但是每个路线的动力学完全不同，可能导致不同的结果。

通过比较状态障碍高度，我们假设通过左路径行走的细胞将在诱导AHL和aTc时开始从低-低状态转变为GFP状态。随后的Arabinose诱导将使mCherry状态可及。因此，一些具有GFP状态的细胞将转变到高高状态，而一些低-低状态细胞转变为mCherry状态，导致所有四种状态的细胞。



当首先用Arabinose诱导时，mCherry的沟谷是如此之深，细胞跳到高高状态将是困难的，由于其低吸引力，低低状态细胞也难以转运到GFP状态，因此，当应用AHL和aTc时，细胞主要处于mCherry状态，导致双峰分布。

# Discussion

长期以来，多重性和所产生的景观被认为是细胞用于维持多能性和引导分化的基础机制。研究者们还建立了理论框架，量化瓦德顿景观和细胞发育的生物学途径。

该假设的实验验证和对该机制的充分理解将有助于揭示所有细胞类型的分化动力学和途径，这在生物学中仍然是一个突出的问题。



在这项研究中，我们设计了可调控的MINPA回路，并表明它可以通过塑造潜在的概观来指导细胞命运选择，以荧光表达为代表。MINPA代表了最复杂的双节点网络拓扑结构之一，其中包括四个实现网络规则的基因。生物学复杂性与调控联系的数量相关而不是基因的数量。因此，MINPA的密集连接和复杂动力学可能提供了一个框架来了解类似密集连接的基因调控网络。

结合数学建模和实验调查，本研究提供了Waddington景观的原理证明。此外，我们使用该回路来演示不同的顺序诱导器可以以特定顺序改变景观，并将细胞指引到不同的最终状态。

THANKS!

