光遗传学装置在生物医学领域中的应用研究进展

邵佳伟, 朱苏承, 于袁欢, 叶海峰*

华东师范大学生命科学学院上海市调控生物学重点实验室, 上海 200241

* 联系人, E-mail: hfye@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-23; 接受日期: 2017-04-23; 网络版发表日期: 2017-05-13

国家科技部重大研究计划(批准号: 2016YFA0100302)、国家自然科学基金(批准号: 31470834, 31522017, 31670869)、上海市科学技术委员会项目(批准号: 15QA1401500, 14JC1401700)和“青年千人计划”资助

摘要 光遗传学是一项整合了光学、基因操作技术、电生理等多学科交叉的具有高度时空特异性、低毒性的生物工程技术。目前已经实现了从时空上控制细胞活动并用于疾病的治疗。本文将重点介绍近些年光遗传学装置在生物医学上的应用, 阐明光遗传装置用于疾病治疗的构建和机制。此外, 本文还简要探讨了光控基因装置在实际临床治疗应用中的前景和挑战。

关键词 合成生物学, 光遗传学, 光控基因装置, 基因治疗, 细胞治疗

近几年来, 随着分子生物学的不断发展, 合成生物学取得了巨大的进展^[1,2]。作为合成生物学重要分支的哺乳动物细胞合成生物学^[3], 在疾病诊断治疗^[4-8]、生物计算机^[9]和基因编辑^[10,11]等方面取得了巨大的突破。例如, 人工设计、合成闭环式基因环路实现对代谢性疾病的诊疗一体化治疗^[4,12,13], 人工设计、合成的与门逻辑计算环路用于鉴定膀胱癌细胞^[14], 人工设计、合成的肿瘤细胞分选器^[15]以及安全小分子化学物质^[5]、光^[6,16]、微波^[17]调控基因表达治疗代谢性疾病等。

作为具有高度时空特异性、无毒副作用的光遗传学(optogenetics)装置, 引起了广大学者的兴趣。目前, 神经领域的科学家们使用光遗传学工具已经取得了一定的进展^[18-23]。此外, 科学家们还开发了蓝光、红光、紫外光和近红外光诱导的多个光遗传学装置, 包括跨膜

感光受体视黑素(melanopsin)^[6]系统、LOV(light-oxygen-voltage)系统^[24,25]、CRY2/CIB1(cryptochrome 2/cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix)系统^[26]、BLUF(blue light using FAD)系统^[27]、植物光敏素(plant phytochromes)系统^[28-30]、隐花色素系统(cryptochromes)^[31,32]、细菌光敏色素系统^[33,34]等(表1)。这些光遗传学装置应用于基因编辑^[10,11,26,35]、内源基因激活^[36,37]、控制细胞器运动^[38,39]、生物医学^[6,16,40,41]等领域。以下本文将逐一介绍光遗传学装置在这些领域的应用。

1 用于基因组基因编辑的光控装置

众所周知, 细胞的功能是由细胞核中基因组所决

引用格式: 邵佳伟, 朱苏承, 于袁欢, 等. 光遗传学装置在生物医学领域中的应用研究进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 531-543
Shao J W, Zhu S C, Yu Y H, et al. Synthetic optogenetic devices for biomedical applications. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 531-543, doi: 10.1360/N052017-00062

表 1 不同光控系统的比较

光响应元件	发色基团	分子大小(aa)	活化与失活条件(nm)	活化与失活时间	光源组织穿透性
Melanopsin	Retinal	489	470/ 黑暗	s/s	差
FKF1-GI(LOV2)	FMN	619/1173	450/ 黑暗	min/h	差
CRY2-CIB1	FAD	498/170	450/ 黑暗	s/6 min	差
ChR2	Retinal	2192	470/ 黑暗	ms/ms	差
Vivid	FMN	149	460/ 黑暗	s/s	差
PhyB	PCB	1211	650/750	s/s	一般
Bphp1	BV	731	740/630	min/min	较好

定, 精准地改编和设计基因组基因, 有利于研究和了解细胞复杂的生物学功能. 目前基因组编辑技术发展迅速, 如广泛应用于实验动物的Cre重组酶^[42,43], 可以在基因组任意位置精确产生DNA双链断裂的经典的核酸酶锌指样核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)^[44]和转录激活样效应子核酸酶(transcription-activator like effector nucleases, TALENs)^[45]以及近年来发展势头迅猛的CRISPR(clustered regularly interspaced palindromic repeats)/Cas9(CRISPR-associated protein 9)技术^[46], 为研究细胞复杂的生物学功能做出了巨大的贡献. 本文主要介绍光遗传学与基因编辑技术相结合的新技术.

1.1 基于Cre重组酶的光诱导的基因组编辑装置

Cre重组酶是一种位点特异性识别的重组酶, 其能识别长度为34 bp的LoxP(locus of X-over of P1)位点, 可以删除LoxP位点之间的片段或使其倒转^[47]. 由于其设计的简便性和高效性, 目前已广泛应用于实验动物的构建中^[42,43]. 为了更好地使用该技术, 许多研究在时间上对Cre的活性进行了控制, 例如, Jullie等人^[47]使用雷帕霉素控制Cre重组酶的活性, 使其在特定的时间发生功能, 拓展了Cre重组酶在生物医学中的应用, 但是该系统还是无法实现空间上精确调控Cre重组酶, 因此来自于杜克大学医学中心的研究者们设计了具有高度时空特异性、基于重组酶Cre的光诱导的基因组编辑装置(图1A)^[11,26]. 该装置由两部分组成, 第一部分由Cre重组酶的第19~104个氨基酸多肽与光敏隐花色素2(CRY2)融合形成(CRY2-CreN); 第二部分由CRY2相互作用的配体蛋白CIB1融合Cre重组酶的第106~343个氨基酸多肽(CIB1-CreC). 当没有蓝光刺激时(非活化状态), CRY2-CreN和CIB1-CreC分别游离在细胞核

中; 当在蓝光的照射下, 使得CRY2的构象发生改变而招募CIB1-CreC形成二聚体, 使该复合体具有完整Cre重组酶的活性而行使相应功能.

1.2 基于CRISPR/Cas9技术的光诱导的基因组编辑装置

CRISPR/Cas9技术是来自于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)对基因组基因进行表达调控或编辑的新方法^[46]. Cas9对相应的DNA序列进行切割是由向导RNA(gRNA)通过识别基因组内与之互补配对的20 bp碱基(碱基的5'端含有PAM(NGG))实现的^[48]. 在哺乳动物细胞中Cas9对DNA切割后, 机体可以通过非末端同源重组(nonhomologous end joining, NHEJ)和同源重组(homology-directed repair, HDR)的方法对DNA进行修复, 因此其可以作为基因编辑的新工具. 目前, 已经发展了多个化学物质控制Cas9活性, 如四环素调控的Cas9^[49]、雷帕霉素诱导的Split-Cas9^[50]以及短暂传送纯化的Cas9:sgRNA复合体^[51]. 这些方法目前在基因组的条件性敲除和降低CRISPR/Cas9技术脱靶效率中有所应用. 来自于东京大学的研究者们在此基础上设计了一种具有低毒性、高度空间特异以及可逆的基于CRISPR/Cas9技术的光诱导的基因组编辑装置(图1B)^[10]. 该装置由来自于丝状真菌粗糙脉孢菌(filamentous fungus *Neurospora crassa*)的pMag(positive magnet)和nMag(negative magnet)分别与来自于酿脓链球菌的spilt Cas9(N-Cas9和C-Cas9)相融合形成pMag-N-Cas9和nMag-C-Cas9两部分. 当在没有蓝光刺激时(非活化状态), pMag-N-Cas9和nMag-C-Cas9分别游离在细胞核中; 在蓝光的照射下, pMag和nMag发生二聚化, 使得pMag-N-Cas9和nMag-C-Cas9两部分合

图 1 编辑基因组基因的光控装置(网络版彩图)

A: 基于Cre重组酶的光诱导的基因组编辑装置. 在黑暗时, Cre重组酶被分成两个片段而失活, 无法进行基因编辑; 在蓝光的刺激下, 感应蓝光的光敏蛋白CRY2发生构象改变, 从而与其相应的配体蛋白CIB1相结合, 使其融合的Cre重组酶形成一个具有功能的、完整的复合体, 识别基因组中含有LoxP位点的基因组片段, 进行基因组基因编辑; B: 基于split Cas9技术的光诱导的基因组编辑装置. 在黑暗时, Cas9被分成两个片段而失活, 无法进行基因编辑; 在蓝光的刺激下, 感应蓝光的光敏蛋白pMag和nMag发生构象改变, 形成二聚体, 使得与之分别相连的N-Cas9和C-Cas9形成具有功能、完整的Cas9, 在sgRNA的带领下识别基因组基因上相应的靶序列进行基因编辑; C: 基于sgRNA的光诱导的基因组编辑装置. 在黑暗时, sgRNA的种子序列和能被紫外光(365 nm)诱导切割的寡核苷酸(protector)相结合, 使得sgRNA失活而无法行使基因编辑功能; 在紫外光的刺激下, 感应紫外光的寡核苷酸发生断裂, 使sgRNA的种子序列暴露而形成有功能的sgRNA, 引导Cas9识别基因组基因上相应的靶序列进行基因编辑

二为一, 形成具有完整Cas9活性的复合体而行使基因编辑功能, 包括基因的删除和插入. 此外, 来自剑桥大学的研究者们还开发了一种“CRISPR-plus”(CRISPR-precise light-mediated unveiling of sgRNAs)系统(图1C)^[35]. 该系统利用了一种能和sgRNA种子序列互补且能被紫外光(365 nm)诱导切割的寡核苷酸(protector), 使其和sgRNA结合(sgRNA处于失活状态), 让Cas9无法行使特定位点的切割作用; 当在紫外光照射下, 作为保护器的寡核苷酸(protector)发生断裂, 使得sgRNA种子序列暴露而活化, 引导Cas9对靶基因进行切割.

随着基因编辑技术的不断发展, 基因编辑技术得到了不断的革新和突破. 从广泛应用于模型动物的Cre重组酶到进行基因组编辑的锌指酶技术, 从具有高度精确度的TALEN技术到简单、高效的CRISPR/Cas9技术, 为基因编辑提供了强而有力的技术支持. 本文所论述的光控基因编辑技术, 不仅具有高度的时空特异性、高效的诱导性能, 而且避免了化学药物调控带来的毒副作用, 为基因编辑提供了一种崭新的技术支持.

2 用于基因组转录的光控装置

相比于基因组编辑, 调控基因组基因的转录表达, 大多数情况下具有更好的可逆作用及瞬时、短暂的表达作用, 在某些疾病治疗、研究复杂的基因网络和干细胞分化等研究中有着重要的作用^[52]. 目前, 许多研究已经利用TALE技术或CRISPR/Cas9技术进行对基因组基因进行激活研究, 本文主要介绍可调控表达、具有高度时空特异性的基因组光遗传学转录装置.

2.1 基于TALE的光诱导基因组转录装置

TALE是一种源于植物致病菌黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的靶向基因组特定基因的技术, 研究证明, TALE蛋白的氨基酸序列和碱基序列具有恒定的关系^[46,53]. 来自麻省理工和哈佛大学的研究者们利用TALE的基因组靶向功能, 结合来自于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)受蓝光调控的蛋白组合CRY/CIB1^[54,55], 设计基于TALE的光诱导的基因组转录装置(图2A)^[36].

图2 激活基因组基因的光控装置(网络版彩图)

A: 基于TALE的光诱导的基因组转录装置. 在黑暗时, 由于CRY2和CIB1没有结合能力, 因此TALE-CRY2和CIB1-effector分开位于细胞中, 无法激活目标基因; 当在蓝光的刺激下, CRY2的构象发生改变, 招募CIB1-effector, 从而起始下游基因的表达; B: 基于CRISPR/Cas9的光诱导的基因组转录装置. 在黑暗时, CRY2和CIB1没有结合能力, 因此dCas9-CIB1和CRY2PHR-activator分开位于细胞中, 无法激活目标基因; 当在蓝光的刺激下, CRY2的构象发生改变, 从而使其结合到位于目标基因的dCas9-CIB1复合体上, 从而起始下游基因的表达

该装置由两部分组成, 第一部分由具有基因组锚定作用和可定制的DNA结合功能域TALE与光敏隐花色素2(CRY2)融合形成(TALE-CRY2); 第二部分由CRY2相互作用的配体蛋白CIB1融合一个需要的效应蛋白构成(CIB1-effector). 在没有蓝光刺激时(非活化状态), TALE-CRY2结合在目的基因的启动子区域而CIB1-effector则以游离状态存在于细胞核中; 当在蓝光的照射下, 使得CRY2的构象发生改变而招募CIB1-effector到目的基因启动子区域, 从而诱导目的基因表达, 其中effector可以为任何需要的效应蛋白, 如VP64、组蛋白效应器等.

2.2 基于CRISPR/Cas9的光诱导的基因组转录装置

CRISPR/Cas9技术是来自于酿脓链球菌对基因组基因进行表达调控或编辑的新方法^[46]. 其中核酸酶缺陷型 Cas9 (catalytically dead Cas9 mutant, dCas9)结合到对应基因组位置是由向导RNA(gRNA)通过识别基因组内与之互补配对的20 bp碱基(碱基的5'端含有PAM(NGG))实现的^[56]. 目前, 已经有多个研究已经证明dCas9可以与多个转录激活子融合, 自行对感兴趣的基因进行激活, 达到实验的目的. 来自东京大学的研究

者们利用了来自于酿脓链球菌具有基因组靶向定位作用的CRISPR/Cas9技术和来自于拟南芥受蓝光调控的蛋白组合CRY/CIB1, 设计了一套基于CRISPR/Cas9的光诱导的基因组转录装置(图2B)^[37]. 该装置由3部分组成, 第一部分由具有基因组靶向作用的dCas9和CRY2相互作用的配体蛋白CIB1融合(dCas9-CIB1)形成; 第二部分由CRY2光敏隐花色素2的光裂合酶同源结构域(photolyase homology region of CRY2, CRY2PHR)融合一个需要的转录激活结构域(CRY2PHR-activator)构成; 最后一部分即为引导dCas9进行基因组定位的sgRNA. 在没有蓝光刺激时(非活化状态), 具有锚定功能的dCas9-CIB1蛋白在sgRNA的引导下结合在目的基因的启动子上, 而具有转录激活功能的CRY2PHR-activator则游离在细胞核中; 当在蓝光的照射下, CRY2PHR和CIB1发生二聚化, 招募具有转录功能的激活子到目的基因的启动子上, 诱导目的基因进行转录表达.

基于TALE和CRISPR/Cas9技术基因组基因转录装置, 其可以对基因组的任意一个基因进行调控表达. 对比化学调控基因组基因的转录表达, 光诱导的基因组转录装置具有高度的时空特异性, 可以在时间和空间为研究复杂的基因网络提供具有高度时空精密度

的工具, 为研究细胞编程、新陈代谢、机体的稳态以及记忆的形成等领域提供强而有力的技术支持。

3 用于细胞器的移动和定位的光控装置

研究表明, 细胞器的转运与分布对细胞在执行不同的功能时(如细胞分化、细胞内信号传递、细胞凋亡等)有着重要的作用^[57]。由于缺少有效和可靠的方法来控制活细胞中细胞器的运动, 因而建立细胞器与细胞功能间的直接联系变得很困难。然而, 光遗传学的快速发展以及光控系统的出现, 为控制细胞内马达分子的运动与细胞器的分布提供了新的思路和方法。

3.1 基于CRY2/CIB1的细胞器的移动和定位的光控装置

来自斯坦福大学的研究者们开发了一种新型的光控系统, 它能够通过光来控制细胞中细胞器的转运与分布(图3A)^[58]。该系统利用CRY2和CIB1蛋白在蓝光照射下, 发生二聚化的原理^[36], 将特定的细胞器、分子马达与它们相连^[59]。在蓝光的诱导下, 通过招募

动力蛋白可以将细胞器(线粒体、过氧化物酶体、溶酶体等)运送到细胞核周围; 同时, 还可通过招募驱动蛋白将细胞器运送到细胞质膜^[60]。这个过程是可逆的, 在没有蓝光照射下, CRY2和CIB1的二聚化解离, 细胞器与分子马达分开, 最终使细胞器在细胞内重新分布。

3.2 基于LOV的细胞器运动和定位的光控装置

与此同时, 来自荷兰乌得勒支大学的研究者也开发了一个光控的细胞内运输系统(图3B)。在光照条件下, 通过光敏感蛋白异源二聚化来招募特异性的细胞骨架分子马达(驱动蛋白、动力蛋白、肌球蛋白)^[55,61], 成功地实现对过氧化物酶体、循环内体、线粒体等细胞器的转运和再定位^[39,62]。同时, 这个过程也是可逆的, 可以通过撤去光照使该过程停止。此外, 在原代大鼠(*Rattus norvegicus*)海马神经元中运用这种方法, 发现动力蛋白驱动的核内体位置的变动能够抑制突触的生长, 而驱动蛋白驱动的核内体富集运动将促进它的生长。

这些系统都证明了通过光遗传学控制细胞器运动的方法是可行的。相比于其他方法, 该方法具有可

图3 控制细胞器定位和运动的光控装置(网络版彩图)

A: 基于CRY2/CIB1的光控细胞器的运动和定位装置。在黑暗条件下, CRY2和CIB1蛋白处于单体游离状态, 细胞器与分子马达无相互作用, 系统不工作。在光的照射下, 连有细胞器、分子马达的CRY2和CIB1发生二聚化, 招募的动力蛋白或驱动蛋白与细胞器相互作用, 牵动细胞器运送到细胞核内或细胞质膜上, 实现细胞器在细胞内重新定位和分布; B: 基于LOV的光控细胞器的运动和定位装置。在黑暗条件下, 光敏蛋白处于单体游离状态, 系统不工作。在光照条件下, 融合有PEX-LOV的细胞器会与工程化PDZ结构域ePDZb1(融合有分子马达)结合, 在分子马达的驱动下, 实现细胞器的转运或再定位。

逆性、毒性低、反应速度快、时间和空间的调控能力强等优势。因此,这种方法将会对细胞器的运动与分布的研究有着重要的意义。

4 光遗传学在生物医学中的应用

4.1 用于糖尿病治疗的光控装置

随着人们生活水平的不断提高,糖尿病已成为威胁人类健康的重要因素。糖尿病的主要特征表现为高血糖,继而会引发各种并发症的代谢性疾病,目前糖尿病可以分为 I 型和 II 型糖尿病^[63]。其中导致 I 型糖尿病的直接原因为患者胰腺受损,导致胰岛素分泌不足而引起高血糖,具有胰岛素依赖现象^[64]。II 型糖尿病是由于机体对胰岛素的感应不灵敏,形成胰岛素抵抗^[65,66],其占糖尿病患者人数的90%左右。传统糖尿病治疗的方法为注射胰岛素、服用药物、控制饮食等,但是这些治疗方法具有一定的局限性,例如,注射胰岛素十分不方便且具有低血糖风险、口服化学药物存在着巨大的副作用等。因此,现急需寻求一些新的

治疗模式来提高治疗的便捷性、有效性以及患者的接受度。本文将介绍使用合成生物学、光遗传学设计思路和方法进行糖尿病治疗。

(1) 基于视黑素治疗糖尿病的光控装置。视黑素(melanopsin)是一种存在于视网膜神经细胞中的一个G蛋白偶联受体^[67,68],其在蓝光刺激下,诱导下游钙离子通路打开^[69-71]。来自苏黎世联邦理工大学的研究者们利用该受体设计了用于 II 型糖尿病治疗的光控装置(图4A)^[6]。其装置主要由响应蓝光的感受器和效应器组成。其中光感受器为存在于视网膜神经细胞中的一种光敏色素——视黑素;效应器由活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)诱导的启动子和待转录的胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)组成。当在蓝光刺激下,发色团视黄醛发生异质化,使相连的视黑素构象发生改变,活化G蛋白(Gaq),磷脂酶C(phospholipase C, PLC)和磷酸激酶C(protein kinase C, PKC),引起瞬时受体电位离子通道(transient receptor potential channels, TRPCs)和胞内细胞器(内质网)钙离子通道打开,使得大量的钙离子内流,激活处于失活状态的NFAT并进入细胞核内,活化NFAT响应

图4 治疗糖尿病的光控装置(网络版彩图)

A: 基于视黑素治疗糖尿病的光控装置。在蓝光的刺激下,发色团视黄醛异质化,使与之相连的视黑素(melanopsin)构象发生改变,从而活化G蛋白(Gaq),磷脂酶C(PLC)和磷酸激酶C(PKC),引起瞬时受体电位离子通道(TRPCs)和胞内细胞器(内质网)钙离子通道打开,使钙离子快速内流,进而磷酸化活化T细胞核因子(NFAT)而入核,激活NFAT响应的启动子(P_{NFAT}),启动表达GLP-1,从而达到降血糖的效果;B: 基于光-氧-电压结构域的光受体蛋白治疗糖尿病的光控装置。在蓝光的刺激下,光敏蛋白Vivid二聚化,进而带动Gal4(1~65 aa)识别结构域的二聚化,从而使Gal4蛋白获得结合功能并作用于其DNA结合位点5×UAS上,招募转录激活因子,启动胰岛素原的表达,分泌胰岛素,从而达到降血糖的效果

的启动子,启动GLP-1的表达,从而达到降血糖的目的;当没有蓝光刺激时, GLP-1表达则处于关闭状态. 将含有该系统的工程化细胞经微胶囊包裹后植入II型糖尿病模型鼠(*db/db*), 经蓝光照射后, 小鼠(*Mus musculus*)血液中的GLP-1的表达量显著增高, 并具有明显的降血糖效果.

(2) 基于光-氧-电压结构域的光受体蛋白治疗糖尿病的光控装置. 存在于粗糙链孢霉菌(*Neurospora crassa*)中的一种光-氧-电压结构域的光受体蛋白(vivid)其能感受蓝光并发生二聚化, 形成二聚体^[72,73]. 来自华东理工大学的研究者们利用vivid蛋白, 设计了一套基于光-氧-电压结构域的光受体蛋白的光控转录装置(图4B), 并将其用于治疗糖尿病^[16]. 其具体构建如下: 该光控转录装置由具有DNA结合功能的Gal4(65)、光敏蛋白(vivid)、转录激活子VP16(viral protein 16, VP16)以及含有Gal4识别的DNA序列(UAS)的启动子组成. 其中, Gal4(65)、光敏蛋白(vivid)、转录激活子VP16融合表达形成一个复合体(Gal4(65)-vivid-VP16), 且该复合体只有当DNA结合结构域Gal4(65)形成二聚化后, 才能结合至其相应的顺式作用元件5×UAS上. 在蓝光刺激下, 光敏蛋白vivid发生二聚化, 同时促使Gal4(65)发生二聚化, 形成具有识别5×UAS的复合二聚体, 复合二聚体上的转录激活子VP16招募其他转录相关的转录激活因子, 启动含有5×UAS操纵序列的启动子, 表达下游胰岛素, 达到治疗糖尿病的目的. 将含有该系统的质粒尾静脉注射至I型糖尿病的模型鼠体内时, 在蓝光的诱导下, 具有明显的降血糖效果.

相比于小分子化学物质诱导治疗糖尿病的装置, 治疗糖尿病的光控装置具有诱导快速, 低毒性以及高度时空分辨率等特性. 因此, 该装置具有用于糖尿病治疗的巨大潜力. 相比于糖尿病的传统治疗方法, 治疗糖尿病的光控装置有着极大的便捷性, 患者只需接收蓝光的照射就可以完成糖尿病的治疗, 这为将来糖尿病的治疗提供了新思路和新方法.

4.2 用于肿瘤治疗的光控装置

随着对肿瘤免疫和肿瘤免疫逃逸机制的深入研究和相应生物技术的迅速发展, 肿瘤免疫治疗不断取得新进展, 其中过继细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)是肿瘤免疫治疗中最活跃的领域, 并取得了一定的成效^[74]. 然而如何将免疫细胞运输到组织的靶位点, 成

为了临床治疗的最大障碍^[75]. 本文将主要介绍科学家们使用光控装置在肿瘤治疗中的应用.

(1) 基于光控趋化因子受体治疗肿瘤的光控装置. 在许多疾病治疗中, T细胞免疫治疗是一种有效的治疗手段^[76]. 在过继T细胞疗法治疗肿瘤时, 它的疗效与它进入肿瘤微环境的数量有很大的关系. 研究证明, 趋化因子能够促进细胞毒性T细胞到达肿瘤部位, 与肿瘤的生长、迁徙和血管生成直接相关^[77]. 根据这些理论, 来自罗彻斯特大学的研究者们开发了一种光控趋化因子受体系统(图5A)^[78], 通过分析G蛋白偶联受体家族中两个不同受体(视紫红质受体和趋化因子受体)共同的结构功能关系, 将视紫红质 α 亚基和趋化因子受体(chemokine receptor-4, CXCR4) α 亚基^[79]偶联并在细胞表面表达^[40]. 该系统能够在波长505 nm光的照射下被激活, 使细胞内产生趋化因子信号, 同时被激活的CXCR4能招募诱导T细胞极化和迁徙到肿瘤部位^[80], 从而引起有效的肿瘤杀伤作用. 此外, 将该系统植入到黑素瘤小鼠模型中, 在光的照射下, CXCR4招募肿瘤靶向的细胞毒性T细胞, 杀伤肿瘤细胞. 结果显示, 光照组中肿瘤增长得到了抑制, 过继免疫反应明显提高.

(2) 基于Opto-CRAC治疗肿瘤的光控装置. 来自德克萨斯农工大学健康科学中心的研究者们, 设计了另一种近红外光调控系统(Opto-CRAC系统)^[41], 在免疫细胞中(T淋巴细胞、巨噬细胞等), 通过控制细胞内钙离子浓度的变化, 激活钙响应基因的表达, 进而实现对肿瘤的治疗. 该系统主要由掺有镧系元素增强转换纳米粒子(upconversion nanoparticles, UCNP)^[81]和工程化的钙通道(Opto-CRAC通道)组成(图5B)^[82]. UCNP作为微型换能器, 能够将近红外光谱的光转化成可见光. Opto-CRAC通道由ORAI1(ORAI calcium release-activated calcium modulator 1)蛋白和工程化的STIM1(stromal interaction molecule 1)蛋白组成. ORAI1是一个4次跨膜的蛋白, 是细胞膜中组成CRAC通道的亚基. 工程化的STIM1融合了光响应的LOV2(光-氧-电压结构域的光受体蛋白)结构域^[83], 实现了光对其调控. 在黑暗条件下, STIM1-CT(C端J α 螺旋)片段紧缩覆盖LOV2结构域使其保持沉默. 在光的照射下, 会使LOV2 C端J α 螺旋保持松弛, 致使STIM1-CT片段移动进而激活ORAI1钙通道. 钙通道的激活将大量钙离子涌入细胞内, 激活钙依赖的基因表达和一系列的免疫

图5 治疗肿瘤的光控装置(网络版彩图)

A: 基于光控趋化因子受体治疗肿瘤的光控装置. 在黑暗条件下, 系统不被激活保持沉默状态. 在波长505 nm光的照射下, 该环路被激活产生趋化因子信号, 同时被激活的CXCR4能招募细胞因子诱导T细胞极化, 迁徙到肿瘤部位, 引起免疫反应杀伤肿瘤细胞; B: 基于Opto-CRAC治疗肿瘤的光控装置. 在黑暗条件下, STIM1-CT16(C端Ja螺旋)片段紧收缩覆盖LOV2结构域使其保持沉默. 光照条件下, 近红外光经掺有镧系元素增频转换纳米粒子(UCNP)转变为可见光(蓝光), 在蓝光刺激下的LOV2 C端Ja螺旋保持松弛状态, 致使STIM1-CT片段移动进而激活ORAI1钙通道. 活化的钙通道会引起大量的钙离子涌入到细胞内, 活化DC细胞表达CD46, CD80和MHC-I, 从而激活T细胞杀伤肿瘤(黑色素瘤)细胞

反应, 实现对肿瘤细胞的杀伤. 此外, 把卵白蛋白(ovalbumin)作为抗原, 将Opto-CRAC系统植入黑色素瘤的小鼠模型中, 产生了很好的抗肿瘤效果. 光照组和对照组相比, 光照组小鼠中肿瘤生长明显得到了抑制, 同时抗原免疫反应的速度得到明显提高, 对肿瘤细胞

有很好的杀伤.

这些系统都很好证明了通过光遗传学治疗肿瘤的方法是可行的. 相比于其他方法, 该方法具有低毒性、可逆性、时间和空间的调控能力强等优势, 因此, 在临床上光遗传装置对于肿瘤的治疗将会有广阔

的应用前景.

4.3 用于男性勃起障碍治疗的光控装置

目前在全世界, 人机体内部因素失调导致勃起功能障碍的患者已超过1亿人, 更重要的是, 它与其他一些疾病相互关联, 如高血压、糖尿病、抑郁症等^[84]. 阴茎勃起是机体接受外界的刺激, 通过神经系统作用而产生的一种生理反应. 大脑或阴茎局部接受外界刺激, 通过中枢系统将此冲动传至阴茎海绵体, 副交感神经末梢及血管内皮细胞在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的催化下合成释放一氧化氮(nitric oxide, NO)增多, NO进入平滑肌细胞内, 激活鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC), 使平滑肌细胞内的环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)增多, 后者激活蛋白激酶K, 作用于钙离子通道, 使细胞内钙离子浓度降低, 从而引起阴茎勃起^[85]. 目前对于男性勃起障碍治疗, 通常是通过用cGMP特异性的磷酸二酯酶抑制剂, 它能够抵消或者延缓cGMP降解从而延长勃起时间, 对勃起功能障碍具有一定的疗效. 但它同时会产生一些副作用, 如对肝脏的损伤, 产生一些心脏病症等^[86,87], 由于这些因素, 限制了该方法在临床上的广泛运用. 随着合成生物学的发展, 通过光遗传装置对生理过程的精确调控, 为基因、细胞相关疾病的治疗提供了一种全新的思路和方法.

来自瑞士苏黎世联邦理工大学的研究者们开发了一种新型的光控勃起刺激器(erectile optogenetic stimulator, EROS)(图6)^[88], 在蓝光的诱导下, 通过人工合成的鸟苷酸环化酶能够在细胞中产生大量cGMP, 引起细胞内钙离子浓度下降. 将EROS系统植入雄性小鼠的海绵体中, 在蓝光的照射下, 实验组小鼠与对照组相比, 小鼠阴茎发生明显勃起甚至发生瞬间射精, 实现对勃起障碍的治疗.

EROS装置很好地证明了通过光遗传学的方法从生理上控制阴茎勃起是可行的. 相比于其他方法, 该方法具有反应速度快、副作用少、时空特异性等优势. 因此, 这种方法将会对生理性疾病的研究有着重要的意义.

5 总结与展望

随着哺乳动物合成生物学的快速发展, 在治疗各

图6 治疗男性勃起障碍的光控装置(网络版彩图)

基于EROS(融合有光感应结构域BLUF)的光控装置. 在黑暗条件下, EROS处于失活状态. 在蓝光照射下, 具有鸟苷酸环化酶活性的EROS被激活. 细胞内GTP在鸟苷酸环化酶的作用下生成cGMP, 后者激活蛋白激酶K, 作用于钙离子通道, 引发细胞内电压门控钙通道关闭, 致使细胞内钙离子浓度降低, 从而引起阴茎勃起

类疾病方面, 科学家们已经巧妙地设计出多种哺乳动物基因回路, 如化学调控治疗代谢疾病的基因回路^[5]、微波调控治疗糖尿病的基因回路^[17]、抗高血压药物调控治疗代谢综合征的基因回路等. 这些研究从一定程度上为治疗人类疾病提供了新思路和新方法.

相比于药物或微波等调控的基因回路, 光遗传学不仅在时空上控制基因表达有着明显的优势, 而且具有良好的可逆性、低毒性等优势. 因此, 在未来用于疾病治疗上具有更明显的优势. 但是, 光控基因装置也同样存在着一些问题, 例如, 蓝光的皮肤穿透性差, 从而大大限制了其在疾病治疗上的限制. 目前, 为了解决这一问体, 科学家们也已经或正在开发一些组织光透性较好的光源^[33,34]用来调控基因的表达, 相信在不远的将来, 光遗传学在疾病治疗中会有更广泛的应用. 此外, 光控基因回路和其他调控回路有着相同的问题, 如植入人体内工程化细胞的安全性问题. 目前, 对于此方面的安全的问题, 已有了一些解决措施, 例如, 使用微胶囊包裹工程化细胞移植到体内, 使得细胞固定在胶囊中不发生扩散, 也可以避免异源细胞和机体免疫细胞直接接触, 因此具有较好的免疫保护作用^[89,90], 另外, 还有一些改造患者自身的细胞或诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)疗法等^[91,92], 这些都能防止机体的免疫排斥和细胞癌化.

综上所述,虽然光控基因装置在生物医学上的应用还存在着一定的问题,但是,它在生物医学中的应用还是有着广阔的前景,相信不久的将来,它将会应

用到转化医学领域,从临床工作发现为落脚点,结合临床所需,利用光控基因装置用于临床疾病的诊断、预防和治疗之中,造福人类。

参考文献

- 1 Agapakis C M, Silver P A. Synthetic biology: exploring and exploiting genetic modularity through the design of novel biological networks. *Mol Biosyst*, 2009, 5: 704–713
- 2 Nandagopal N, Elowitz M B. Synthetic biology: integrated gene circuits. *Science*, 2011, 333: 1244–1248
- 3 Tigges M, Fussenegger M. Recent advances in mammalian synthetic biology—design of synthetic transgene control networks. *Curr Opin Biotech*, 2009, 20: 449–460
- 4 Rössger K, Charpin-El Hamri G, Fussenegger M. Reward-based hypertension control by a synthetic brain-dopamine interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 18150–18155
- 5 Ye H, Charpin-El Hamri G, Zwicky K, et al. Pharmaceutically controlled designer circuit for the treatment of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 141–146
- 6 Ye H, Daoud-El Baba M, Peng R W, et al. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*, 2011, 332: 1565–1568
- 7 Ye H, Xie M, Xue S, et al. Self-adjusting synthetic gene circuit for correcting insulin resistance. *Nat Biomed Eng*, 2016, 1: 0005
- 8 Xue S, Yin J, Shao J, et al. A synthetic-biology-inspired therapeutic strategy for targeting and treating hepatogenous diabetes. *Mol Ther*, 2017, 25: 443–455
- 9 Ausländer S, Ausländer D, Müller M, et al. Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature*, 2012, 11: 123–127
- 10 Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, et al. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 755–760
- 11 Taslimi A, Zoltowski B, Miranda J G, et al. Optimized second-generation CRY2-CIB dimerizers and photoactivatable Cre recombinase. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 425–430
- 12 Kemmer C, Gitzinger M, Daoud-El Baba M, et al. Self-sufficient control of urate homeostasis in mice by a synthetic circuit. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 355–360
- 13 Rössger K, Charpin-El-Hamri G, Fussenegger M. A closed-loop synthetic gene circuit for the treatment of diet-induced obesity in mice. *Nat Commun*, 2013, 4: 2825
- 14 Liu Y, Zeng Y, Liu L, et al. Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells. *Nat Commun*, 2014, 5: 5393
- 15 Xie Z, Wroblewska L, Prochazka L, et al. Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. *Science*, 2011, 333: 1307–1311
- 16 Wang X, Chen X, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Meth*, 2012, 9: 266–269
- 17 Stanley S A, Gagner J E, Damanpour S, et al. Radio-wave heating of iron oxide nanoparticles can regulate plasma glucose in mice. *Science*, 2012, 336: 604–608
- 18 Chen Y, Xiong M, Zhang S C. Illuminating Parkinson's therapy with optogenetics. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 149–150
- 19 Namburi P, Beyeler A, Yoroza S, et al. A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature*, 2015, 520: 675–678
- 20 Ramirez S, Liu X, MacDonald C J, et al. Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. *Nature*, 2015, 522: 335–339
- 21 Ryan T J, Roy D S, Pignatelli M, et al. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science*, 2015, 348: 1007–1013
- 22 Steinbeck J A, Choi S J, Mrejeru A, et al. Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 204–209
- 23 Wang G Q, Cen C, Li C, et al. Deactivation of excitatory neurons in the prefrontal cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. *Nat Commun*, 2015, 6: 7660
- 24 G N, Tan A, Farhatnia Y, et al. Channelrhodopsins: visual regeneration and neural activation by a light switch. *New Biotech*, 2013, 30: 461–474
- 25 Kawano F, Suzuki H, Furuya A, et al. Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nat Commun*, 2015, 6: 6256
- 26 Kennedy M J, Hughes R M, Peteya L A, et al. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Meth*, 2010, 7: 973–975

- 27 Stierl M, Stumpf P, Udvari D, et al. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *beggiatoa*. *J Biol Chem*, 2011, 286: 1181–1188
- 28 Gomez E J, Gerhardt K, Judd J, et al. Light-activated nuclear translocation of adeno-associated virus nanoparticles using phytochrome B for enhanced, tunable, and spatially programmable gene delivery. *ACS Nano*, 2016, 10: 225–237
- 29 Levskaya A, Weiner O D, Lim W A, et al. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature*, 2009, 461: 997–1001
- 30 Ni M, Tepperman J M, Quail P H. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, 1999, 400: 781–784
- 31 Lee S, Park H, Kyung T, et al. Reversible protein inactivation by optogenetic trapping in cells. *Nat Meth*, 2014, 11: 633–636
- 32 Taslimi A, Vrana J D, Chen D, et al. An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function. *Nat Commun*, 2014, 5: 4925
- 33 Folcher M, Oesterle S, Zwicky K, et al. Mind-controlled transgene expression by a wireless-powered optogenetic designer cell implant. *Nat Commun*, 2014, 5: 5392
- 34 Kaberniuk A A, Shemetov A A, Verkhusha V V. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light. *Nat Meth*, 2016, 13: 591–597
- 35 Jain P K, Ramanan V, Schepers A G, et al. Development of light-activated CRISPR using guide RNAs with photocleavable protectors. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 12440–12444
- 36 Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 2013, 500: 472–476
- 37 Nihongaki Y, Yamamoto S, Kawano F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem Biol*, 2015, 22: 169–174
- 38 Duan L, Che D, Zhang K, et al. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells. *Chem Biol*, 2015, 22: 671–682
- 39 van Bergeijk P, Adrian M, Hoogenraad C C, et al. Optogenetic control of organelle transport and positioning. *Nature*, 2015, 518: 111–114
- 40 He L, Zhang Y, Ma G, et al. Near-infrared photoactivatable control of Ca^{2+} signaling and optogenetic immunomodulation. *eLife*, 2015, 4: e10024
- 41 Xu Y, Hyun Y M, Lim K, et al. Optogenetic control of chemokine receptor signal and T-cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 6371–6376
- 42 Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *genesis*, 2000, 26: 99–109
- 43 Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, 1998, 14: 381–392
- 44 Beane J D, Lee G, Zheng Z, et al. Clinical scale zinc finger nuclease-mediated gene editing of PD-1 in tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic melanoma. *Mol Ther*, 2015, 23: 1380–1390
- 45 Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509–1512
- 46 Sternberg S H, Doudna J A. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell*, 2015, 58: 568–574
- 47 Jullien N, Sampieri F, Enjalbert A, et al. Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 131e–131
- 48 Briner A E, Donohoue P D, Gooma A A, et al. Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Mol Cell*, 2014, 56: 333–339
- 49 Dow L E, Fisher J, O'Rourke K P, et al. Inducible *in vivo* genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 390–394
- 50 Zetsche B, Volz S E, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 139–142
- 51 Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2014, 33: 73–80
- 52 Xie M, Haellman V, Fussenegger M. Synthetic biology-application-oriented cell engineering. *Curr Opin Biotech*, 2016, 40: 139–148
- 53 Moscou M J, Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501–1501
- 54 Liu H, Yu X, Li K, et al. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science*, 2008, 322: 1535–1539
- 55 Strickland D, Lin Y, Wagner E, et al. TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nat Meth*, 2012, 9: 379–384
- 56 Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173–1183
- 57 Vale R D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 2003, 112: 467–480
- 58 Bugaj L J, Choksi A T, Mesuda C K, et al. Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells. *Nat Meth*, 2013, 10:

- 249–252
- 59 Fransson S, Ruusala A, Aspenström P. The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 500–510
- 60 Cai D, Hoppe A D, Swanson J A, et al. Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *J Cell Biol*, 2007, 176: 51–63
- 61 Correia S S, Bassani S, Brown T C, et al. Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat Neurosci*, 2008, 11: 457–466
- 62 Wagner W, Brenowitz S D, Hammer J A. Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 40–48
- 63 Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, et al. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002, 55: 65–85
- 64 Cnop M, Welsh N, Jonas J C, et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 2005, 54: S97–S107
- 65 Chen L, Magliano D J, Zimmet P Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8: 228–236
- 66 Laakso M, Kuusisto J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10: 293–302
- 67 Fu Y, Zhong H, Wang M H H, et al. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 10339–10344
- 68 Panda S, Nayak S K, Campo B, et al. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*, 2005, 307: 600–604
- 69 Do M T H, Kang S H, Xue T, et al. Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells. *Nature*, 2009, 457: 281–287
- 70 Hankins M W, Peirson S N, Foster R G. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci*, 2008, 31: 27–36
- 71 Hartwick A T E, Bramley J R, Yu J, et al. Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *J Neurosci*, 2007, 27: 13468–13480
- 72 Lamb J S, Zoltowski B D, Pabst S A, et al. Time-resolved dimerization of a PAS-LOV protein measured with photocoupled small angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 12226–12227
- 73 Zoltowski B D, Schwerdtfeger C, Widom J, et al. Conformational switching in the fungal light sensor vivid. *Science*, 2007, 316: 1054–1057
- 74 Fridman W H, Pagès F, Sautès-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 298–306
- 75 Fisher B, Packard B S, Read E J, et al. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 1989, 7: 250–261
- 76 Gao J Q, Okada N, Mayumi T, et al. Immune cell recruitment and cell-based system for cancer therapy. *Pharm Res*, 2008, 25: 752–768
- 77 Karunaratne W K A, Giri L, Patel A K, et al. Optical control demonstrates switch-like PIP3 dynamics underlying the initiation of immune cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E1575–E1583
- 78 Hofmann K P, Scheerer P, Hildebrand P W, et al. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34: 540–552
- 79 Wu B, Chien E Y T, Mol C D, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 2010, 330: 1066–1071
- 80 Kumar A, Humphreys T D, Kremer K N, et al. CXCR4 physically associates with the T Cell receptor to signal in T cells. *Immunity*, 2006, 25: 213–224
- 81 Wu S, Han G, Milliron D J, et al. Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 10917–10921
- 82 Hogan P G, Lewis R S, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 491–533
- 83 Christie J M, Salomon M, Nozue K, et al. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (NPH1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8779–8783
- 84 McKinlay J B. The worldwide prevalence and epidemiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 2000, 12 Suppl 4: S6–S11
- 85 Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther*, 2005, 106: 233–266
- 86 Hong E K, Lepor H, McCullough A R. Time dependent patient satisfaction with sildenafil for erectile dysfunction (ED) after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy (RRP). *Int J Impot Res*, 1999, 11: S15–S22
- 87 Schwartz B G, Kloner R A. Cardiovascular implications of erectile dysfunction. *Circulation*, 2011, 123: e609–e611

- 88 Kim T, Folcher M, Doaud-El Baba M, et al. A synthetic erectile optogenetic stimulator enabling blue-light-inducible penile erection. [Angew Chem Int Ed Engl](#), 2015, 54: 5933–5938
- 89 Catena R, Santos E, Orive G, et al. Improvement of the monitoring and biosafety of encapsulated cells using the SFGNESTGL triple reporter system. [J Control Release](#), 2010, 146: 93–98
- 90 Yang H K, Yoon K H. Current status of encapsulated islet transplantation. [J Diabetes Complications](#), 2015, 29: 737–743
- 91 Hoban M D, Cost G J, Mendel M C, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. [Blood](#), 2015, 125: 2597–2604
- 92 Yusa K, Rashid S T, Strick-Marchand H, et al. Targeted gene correction of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. [Nature](#), 2011, 478: 391–394

Synthetic optogenetic devices for biomedical applications

SHAO JiaWei, ZHU SuCheng, YU YuanHuan & YE HaiFeng

Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Optogenetics, which is an interdisciplinary biological engineering technology involving optics, gene manipulation techniques, electrophysiology and other related disciplines, enables spatiotemporal control of cellular behaviors used for gene- and cell-based therapies through light stimulation. In this review, we describe the most recent advances in optogenetic networks designed for biomedical applications, including how light-controlled genetic devices can be designed and constructed for human disease therapy. Moreover, we briefly discuss the challenges and future perspectives optogenetic gene circuits used for clinical applications in the future.

synthetic biology, optogenetics, light-controlled genetic devices, gene-based therapy, cell-based therapy

doi: [10.1360/N052017-00062](https://doi.org/10.1360/N052017-00062)