

前肽缺失vWF促进细胞分泌蛋白质剪接的L303E/F309S突变体凝血第八因子

朱甫祥* 刘泽隆 缪静 屈慧鸽 迟晓艳
(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025)

摘要 该文旨在探索前肽缺失的von Willebrand因子(vWF- Δ Pro)对蛋白质剪接的L303E/F309S突变体凝血第八因子(FVIII)分泌的影响。将vWF- Δ Pro基因与蛋白内含子融合的FVIII重链和轻链基因共转HEK293细胞。结果显示, 转vWF- Δ Pro细胞的剪接蛋白FVIII分泌量和活性分别为(196 \pm 27) ng/mL和(1.39 \pm 0.31) IU/mL, 明显高于对照细胞的(116 \pm 24) ng/mL和(0.91 \pm 0.18) IU/mL。表明vWF- Δ Pro可提高剪接的L303E/F309S突变体FVIII蛋白分泌量和活性。

关键词 vWF; 凝血第八因子; 蛋白质剪接; 分泌

运用蛋白内含子(intein)蛋白质反式剪接功能的双载体转FVIII基因表明, 反式剪接可将FVIII重链和轻链共价连接, 产生凝血活性^[1]。但FVIII重链存在与内质网分子伴侣蛋白BiP结合位点, 使FVIII分泌性降低^[2-3]。本室最近将L303E/F309S双突变引入FVIII重链表明, 重链和剪接FVIII的分泌性得到改善^[4]。

vWF具有FVIII生理性载体和分子伴侣功能, 可在细胞分泌部位促进异源二聚体FVIII的组装和分泌, 防止FVIII被蛋白水解酶快速降解, 无vWF结合的FVIII的半衰期从12小时缩短到1~2小时^[5]。vWF由含22 aa的信号肽的2 813 aa组成, 分子结构域从N端到C端排列为D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2, 与FVIII结合区位于D'和D3区, D1和D2结构域即Ala23-Arg763为其前肽(pro-peptide), 去除此前肽后的vWF- Δ Pro只能形成二聚体而不能形成多聚物, 保留与FVIII结合的活性, 但失去结合血小板功能^[6]。为进一步提高剪接FVIII的分泌性和活性, 本文观察到转vWF- Δ Pro基因可明显提高双载体转L303E/F309S突变体FVIII基因细胞分泌剪接FVIII和活性, 为进一步动物体内实验提供了依据。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞

含有人vWF cDNA的真核表达质粒pSVHvWF1由美国华盛顿大学Sadler教授惠赠。vWF- Δ Pro的真核表达载体pCMV-vWF Δ Pro、L303E/F309S点突变的人B区缺失型FVIII(BDD-FVIII)重链和轻链与蛋白内含

子的融合基因表达载体pCMV-DMHCIntN和pCMV-IntCLC以及BDD-FVIII的真核表达载体pCMV-F8为本室构建^[4,7]。HEK293细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 工具酶和主要试剂

质粒提取试剂盒为Qiagen公司产品; DMEM、Lipofectamine 2000和Trizol试剂盒购自Invitrogen公司; cDNA合成试剂盒为Fermentas公司产品。人vWF多抗和HRP标记的兔抗人vWF多抗购自Dako公司。人重组FVIII为BioChain公司产品, 人FVIII重链单抗ESH5和HRP标记的轻链抗体ESH8购自American Diagnostica公司。FVIII活性检测Coatest试剂盒购自Chromogenix公司。

1.3 HEK293细胞培养及基因转染

HEK293细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液贴壁培养于含5% CO₂的37 °C培养箱。转染前一天接种于6孔培养板, 每孔5 \times 10⁵细胞, 细胞融合至80%以上时, 按Lipofectamine2000试剂盒说明书进行基因转染, 实验组用pCMV-vWF Δ Pro、pCMV-DMHCIntN和pCMV-IntCLC各4 μ g共转染; 对照组用pCMV-DMHCIntN和pCMV-IntCLC共转染。另设pCMV-F8转染组, pcDNA3.1转染作为阴性对照(Mock)。转染后48 h收集细胞和培养上清。

1.4 RT-PCR检测vWF- Δ Pro的表达

按照Trizol试剂盒说明书提取细胞总RNA, 以其

收稿日期: 2012-05-14 接受日期: 2012-07-16

山东省自然科学基金(No.ZR2010CM061)资助项目

*通讯作者。Tel: 0535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

mRNA为模板反转录成cDNA。用Primer 5.0软件设计的vWF- Δ Pro和内参照GAPDH引物(vWF- Δ Pro: 上游5'-CTC TGT GGA TTC AGT GGA TGC A-3'、下游5'-CTG CAG GCA CCA TTA TGG AGA-3'、扩增片段长573 bp; GAPDH: 上游5'-GAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3'、下游5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3'、扩增片段长498 bp)。PCR参数: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 54 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min。用1.5%琼脂糖电泳分析扩增产物。

1.5 培养上清中的vWF- Δ Pro浓度分析

参照文献[8]用夹心ELISA检测培养上清的vWF- Δ Pro抗原量。

1.6 ELISA分析培养上清中剪接蛋白量

参照文献[9]用双夹心ELISA检测上清中剪接的BDD-FVIII。

1.7 细胞培养上清中FVIII的生物活性分析

用Coatest发色法, 参照文献[10], 按说明书分析

细胞培养上清的FVIII生物活性。

1.8 实验结果的统计学处理

定量数据以平均数 \pm 标准差表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

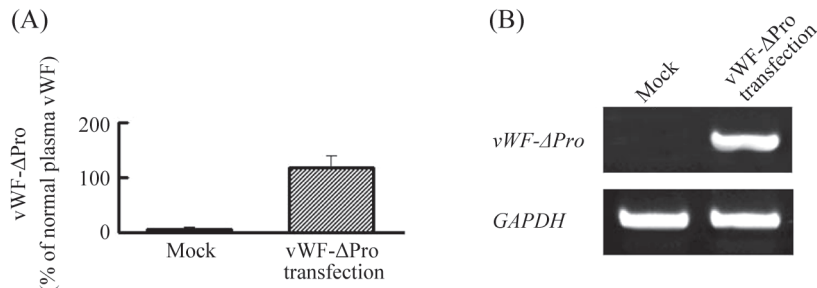
2 结果

2.1 转vWF- Δ Pro基因细胞分泌的vWF- Δ Pro量和细胞内表达

用vWF多抗的ELISA结果显示(图1A), 转vWF- Δ Pro细胞分泌的vWF- Δ Pro为正常血浆水平的(118 \pm 21)%, Mock对照细胞未检测到vWF- Δ Pro的表达。RT-PCR结果显示, 细胞内有明显的vWF- Δ Pro表达(图1B)。

2.2 vWF- Δ Pro提高细胞剪接BDD-FVIII的分泌量

双夹心ELISA检测结果显示(图2), 转vWF- Δ Pro细胞共转DMHCIntN和IntCLC后剪接BDD-FVIII分泌量为(196 \pm 27) ng/mL, 明显高于对照细胞的(116 \pm 24) ng/mL, 表明vWF- Δ Pro可促进剪接BDD-FVIII的分泌。另外, 转BDD-FVIII细胞显示, vWF- Δ Pro也可提高BDD-FVIII

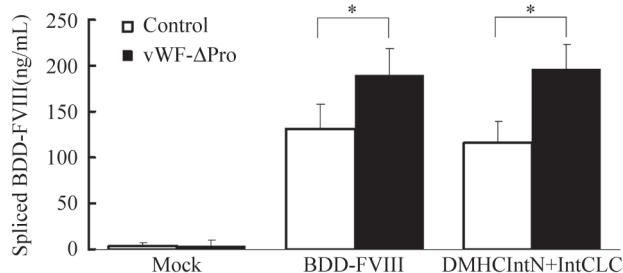


A: 转基因细胞培养上清分泌的vWF- Δ Pro, 结果以mean \pm S.D.表示, $n=5$; B: 转基因细胞总RNA的RT-PCR结果。

A: quantification of vWF- Δ Pro in culture supernatant of transgenic cell, data are represented as mean \pm S.D., $n=5$; B: RT-PCR of total RNA of transgenic cell.

图1 转vWF- Δ Pro的分泌水平和细胞内表达

Fig.1 Secretion and intracellular expression of vWF- Δ Pro in transgenic cell



结果以mean \pm S.D.表示, $n=6$, $*P < 0.05$ 。

Data are represented as mean \pm S.D., $n=6$, $*P < 0.05$ 。

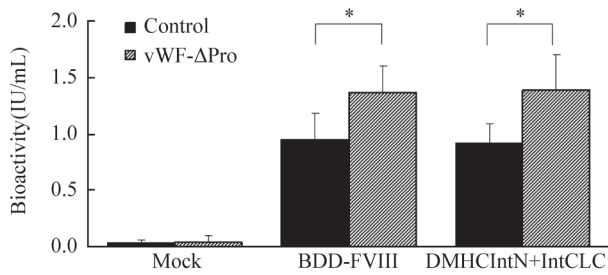
图2 转基因细胞分泌的剪接BDD-FVIII蛋白浓度

Fig.2 Spliced BDD-FVIII secreted by co-transgenic cell

的分泌, 为(189 \pm 30) ng/mL, 而未转vWF- Δ Pro细胞为(131 \pm 27) ng/mL, 二者相比, $P < 0.05$, 双载体转基因细胞的剪接BDD-FVIII分泌量与其接近。

2.3 vWF- Δ Pro促进共转基因细胞分泌FVIII生物活性

用Coatest法分析结果显示(图3), 双载体共转DMHCIntN和IntCLC基因, 在转vWF- Δ Pro情况下为(1.39 \pm 0.31) IU/mL, 高于对照细胞(0.91 \pm 0.18) IU/mL, 二者相比, $P < 0.05$, 差异具有显著性, 表明vWF- Δ Pro可促进共转基因细胞分泌FVIII凝血活性。另外, vWF- Δ Pro也可明显提高转BDD-FVIII基因细胞分泌FVIII



结果以mean±S.D.表示, $n=6$, $*P<0.05$ 。

Data are represented as mean±S.D., $n=6$, $*P<0.05$.

图3 转基因细胞分泌的凝血生物活性

Fig.3 FVIII bioactivity in supernatants of gene transfected cells

凝血活性。

3 讨论

本文用vWF-ΔPro基因转染培养的HEK293细胞观察到细胞内明显的vWF-ΔPro表达, 并显示较高的vWF-ΔPro分泌水平。本室以前将BDD-FVIII重链中的Leu303和Phe309分别突变为Glu和Ser以降低与内质网分子伴侣蛋白BiP的亲合力, 运用Ssp DnaB蛋白内含子介导的蛋白质剪接进行双载体转基因表明, 可提高细胞对剪接突变体BDD-FVIII的分泌量和凝血活性^[4]。在此基础上, 本文通过共转vWF-ΔPro基因, 使剪接的突变体BDD-FVIII的分泌水平进一步提高, 相应地, 生物活性也得到提升, 表明vWF-ΔPro可明显促进剪接突变体BDD-FVIII的分泌性。Kaufman等^[11]在细胞水平转FVIII基因研究表明, 在细胞培养液中加入vWF时可促进异源二聚体FVIII蛋白的分泌量。本室曾用双载体转FVIII基因证明, FVIII轻链具有顺式和反式促进FVIII重链分泌的作用^[12]。研究表明, 轻链反式促进重链分泌作用的结构基础源自轻链N端的酸性区, 将该区附加到重链所构建的重链突变体的分泌性提高3~5倍, 而该酸性区也可结合vWF^[13]。由于生理性vWF主要合成部位在血管内皮细胞而非肝细胞, 在运用以肝脏为主要靶器官的AAV载体进行的甲型血友病基因治疗中, 肝脏靶向转vWF-ΔPro基因可以通过提高双载体转突变体BDD-FVIII基因后剪接BDD-FVIII的分泌水平使凝血活性得到改善, 同时避免转野生型vWF基因的表达产物多聚体vWF蛋白可能导致的血小板聚集和血栓形成。

迄今已有500多种蛋白内含子发现于细菌、古细菌和单细胞真核生物的宿主蛋白, 由其介导的精确、高效、无需能量消耗和不依赖细胞的蛋白质剪接作用在蛋白质相关研究中得到广泛应用^[14]。本室最近在培养细胞转基因实验中证明, 运用两种不同的蛋白内含子可催化三片段vWF的反式剪接, 观察到功能性vWF多聚体蛋白的形成, 并表现出与FVIII结合力^[15]。本工作为后续动物体内实验提高基于蛋白质剪接的双载体转FVIII基因功效提供了依据。

参考文献 (References)

- Zhu FX, Liu ZL, Chi XY, Qu HG. Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci China Life Sci* 2010; 53(6): 683-9.
- Miao HZ, Sirachainan N, Palme L, Kucab P, Cunningham MA, Kaufman RJ, *et al.* Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood* 2004; 103(9): 3412-9.
- Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 1997; 272(39): 24121-4.
- 朱甫祥, 杨树德, 刘泽隆, 缪静, 屈慧鸽, 迟晓艳. L303E/F309S突变促进细胞分泌内含肽连接的B区缺失型凝血VIII因子. *中国细胞生物学学报*(Zhu Fuxiang, Yang Shude, Liu Zelong, Miao Jing, Qu Huige, Chi Xiaoyan. L303E/F309S mutations enhance secretion of intein-ligated B-domain-deleted coagulation factor VIII. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(4): 575-81.
- de Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. von Willebrand factor to the rescue. *Blood* 2009; 113(21): 5049-57.
- Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ. The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266(32): 21948-55.
- 朱甫祥, 杨树德, 刘泽隆, 屈慧鸽, 迟晓艳. vWF-ΔPro改善基于蛋白质剪接的双载体BDD-FVIII基因转移. *中国生物化学与分子生物学报*(Zhu Fuxiang, Yang Shude, Liu Zelong, Qu Huige, Chi Xiaoyan. vWF-ΔPro improves protein splicing-based dual vector transfer of B domain-deleted FVIII gene. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2010; 26(8): 720-6.
- Lankhof H, van Hoeij M, Schiphorst ME, Bracke M, Wu YP, Ijsseldijk MJ, *et al.* A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost* 1996; 75(6): 950-8.
- Gnatenko DV, Saenko EL, Jesty J, Cao LX, Hearing P, Bahou WF. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: Applicability to haemophilia A gene therapy. *Br J Haematol* 1999; 104(1): 27-36.
- Sarkar R, Tetreault R, Gao G, Wang L, Bell P, Chandler R, *et al.* Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood* 2004; 103(4): 1253-60.
- Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mam-

- malian cell. *J Biol Chem* 1988; 263(13): 6352-62.
- 12 Chen LX, Zhu FX, Li J, Lu H, Jiang HY, Sarkar R, *et al.* The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther* 2007; 15(10): 1856-62.
- 13 Chen LX, Lu H, Wang JH, Sarkar R, Yang X, Wang HL, *et al.* Enhanced factor VIII heavy chain for gene therapy of hemophilia A. *Mol Ther* 2009; 17(3): 417-24.
- 14 Vila-Perello M, Muir TW. Biological applications of protein splicing. *Cell* 2010; 143(2): 191-200.
- 15 朱甫祥, 杨树德, 刘泽隆, 缪静, 屈慧鸽, 迟晓艳. 内含肽介导三段vWF基因真核细胞转移的翻译后连接及其功能性多聚体形成. *生物化学与生物物理进展*(Zhu Fuxiang, Yang Shude, Liu Zelong, Miao Jing, Qu Huige, Chi Xiaoyan. Post-translational ligation and functional multimerization of von willebrand factor after intein-mediated tri-fragmental gene delivery in eukaryotic cell. *Prog Biochem Biophys*) 2011; 38(1): 67-74.

Propeptide-deleted von Willebrand Factor Improves Secretion of Protein Spliced L303E/F309S Mutated FVIII

Zhu Fuxiang*, Liu Zelong, Miao Jing, Qu Huige, Chi Xiaoyan
(Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract We recently demonstrated that L303E and F309S mutation in the A1 domain of heavy chain of coagulation factor VIII (FVIII) could improve secretion of spliced FVIII in protein-splicing based dual-vector delivery of FVIII gene. In this study, we further investigated the effect of a propeptide-deleted form of the von Willebrand factor (vWF- Δ Pro), a functional FVIII carrier co-transfection on secretion of protein spliced FVIII with L303E/F309S mutation. By co-transfection of HEK293 cell with both heavy and light chain genes fused to intein, a protein splicing element and *vWF- Δ Pro* gene, an ELISA was performed to determine secreted spliced FVIII and Coatest was used to measure secreted bioactivity. The data demonstrated that vWF- Δ Pro co-expressed cell displayed a much higher levels of secretion of spliced FVIII (196 \pm 27) ng/mL, compared to control cell (116 \pm 24) ng/mL. The secreted bioactivity by vWF- Δ Pro co-expressed cell (1.39 \pm 0.31) IU/mL was also greater than that of control cell (0.91 \pm 0.18) IU/mL. Therefore, vWF- Δ Pro may further improve efficacy of dual-vector delivery of *FVIII* gene by enhancing secretion of spliced L303E/F309S mutated FVIII encouraging our ongoing *in vivo* investigation for improvement of two-vector FVIII transgene.

Key words von Willebrand factor; coagulation factor VIII; protein splicing; secretion

Received: May 14, 2012 Accepted: July 16, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No.ZR2010CM061)

*Corresponding author. Tel: 86-535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com