

# 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

朱甫祥\* 杨树德 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** 凝血 VIII 因子(FVIII)尽管与凝血 V 因子具有相似的结构, 但其分泌的低效性不仅限制了重组产品在甲型血友病患者中的广泛应用, 也困扰基于转 FVIII 基因的基因治疗。为了提高 FVIII 的分泌效率, 在我们以前用内含肽(intein)的蛋白质剪接功能介导的双载体转 B 区缺失型 FVIII (BDD-FVIII)基因研究的基础上, 探讨了重链 L303E/F309S 双突变对剪接 BDD-FVIII 蛋白分泌的影响。PCR 突变法将 L303E/F309S 双突变引入我们以前构建的融合 *Ssp* DnaB 内含肽的野生型重链(HCIntN), 得到融合内含肽的重链突变基因(DMHCIntN), 与融合内含肽的轻链(IntCLC)基因共转染培养的 293 细胞, 用 ELISA 检测了培养上清中的重链多肽和剪接的 BDD-FVIII 蛋白浓度, 用 Coatest 法分析了培养上清的凝血生物活性。结果显示, 单独转 DMHCIntN 和 DMHCIntN 与 IntCLC 共转染细胞上清中的分泌的重链多肽浓度分别为(35±12) ng/ml 和(178±19) ng/ml, 高于单独转 HCIntN 细胞和 HCIntN 与 IntCLC 共转细胞[(14±6) ng/ml 和(127±23) ng/ml]; 共转 DMHCIntN 和 IntCLC 细胞上清中剪接的 BDD-FVIII 蛋白浓度和活性分别为(128±24) ng/ml 和(1.01±0.15) U/ml, 明显高于共转 HCIntN 和 IntCLC 细胞[(90±12) ng/ml 和(0.71±0.14) U/ml]; 另外, 单独转 DMHCIntN 和 IntCLC 的细胞合并培养后的上清也检测到剪接的 BDD-FVIII 蛋白[(20±3) ng/ml]和活性[(0.17±0.07) U/ml]。结果表明, 双突变可提高重链的分泌效率并明显被轻链顺式提高, 伴之以剪接 BDD-FVIII 的分泌增加, 表明内含肽对双载体转 BDD-FVIII 基因功效的改善并表现出不依赖细胞机制的 BDD-FVIII 剪接作用。为进一步动物体内实验运用内含肽的双 AAV 转重链双突变 BDD-FVIII 基因研究奠定了基础。

**关键词** B 区缺失型 FVIII; 突变重链; 分泌; 内含肽; 蛋白质剪接

甲型血友病是一种 X-染色体连锁性出血疾病, 由凝血 VIII 因子(coagulation factor VIII, FVIII)基因缺陷导致。FVIII 作为一种辅因子参与活化的 FIX 对 FX 的酶促激活, 血浆浓度为 100~200 ng/ml<sup>[1]</sup>。目前针对甲型血友病的主要治疗方法包括血浆浓缩物和基因重组 FVIII 产品替代治疗, 尽管对于止血和预防出血有较好的疗效, 但存在潜在性血源性传染病播散、抑制性抗体产生和费用高等缺点<sup>[2]</sup>。由于该病属于单基因缺陷性疾病, 基因治疗是其理想的疗法, 但编码 FVIII 的基因较大, 难以被拥有较多优点(可感染非分裂期细胞和使转基因长期表达)的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体包装; 另外, FVIII 翻译后的分泌过程中与内质网分子伴侣蛋白结合, 使其分泌效率远低于具有相似结构的其它凝血因子如 FV<sup>[3]</sup>, 引起低水平 FVIII 表达, 影响基因治疗的效果。目前克服 AAV 容量限制的策略之一为应用双 AAV 载体的重链和轻链共转 FVIII 基因<sup>[4,5]</sup>, 但重链多肽分泌

效率远低于轻链多肽, 导致出现分泌的重、轻链量的不均衡性问题, 一方面使过多分泌的轻链多肽为无效分泌, 另一方面淤积于细胞内的重链多肽会使细胞变得不稳定, 甚至会诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。为了提高 FVIII 的分泌性, 基于对 FVIII 分子重链中存在与内质网分子伴侣蛋白 BiP 结合位点的认识, 有人将其分子 A1 区的疏水口袋中的 Phe<sup>309</sup> 突变为 Ser 后可降低 FVIII 分泌对于 ATP 能量消耗的依赖, 使 FVIII 的分泌量增加 3 倍, 联合将 Leu<sup>303</sup> 突变为 Glu 后会进一步提高其分泌性<sup>[7]</sup>。我们最近运用内含肽(intein)蛋白质剪接技术的双载体共转 B 区缺失型 FVIII(B-domain-de-

收稿日期: 2010-04-26 接受日期: 2010-07-02

山东省自然科学基金(No. Y2005D14), 烟台市科技计划项目(No. 2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金(No. 20071108)和鲁东大学学科建设项目资助项目

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

leted FVIII, *BDD-FVIII*)基因研究表明,轻链不仅可顺式促进重链多肽的分泌,而且重链与轻链间肽键的连接反应不依赖细胞机制<sup>[8,9]</sup>。内含肽是包埋于蛋白质前体中的多肽序列,类似于RNA的剪接反应,在翻译后水平催化宿主蛋白的剪接反应,使其自身被切除伴随以两侧宿主蛋白间的肽键连接<sup>[10]</sup>。本文将具有促进FVIII分泌的双突变L303E/F309S引入BDD-FVIII重链,运用蛋白质剪接技术,进行双载体培养细胞共转重、轻链基因,观察到明显改善的剪接BDD-FVIII蛋白的分泌和活性,为进一步动物体内基于内含肽的双AAV转双突变的*BDD-FVIII*基因研究提供了实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株和细胞

含有*Ssp DnaB*内含肽编码序列的质粒pMST为加拿大Dalhousie大学医学院Liu P教授实验室构建,本室保存。包含FVIII编码基因的质粒pXX-FVIII为美国Pittsburgh大学分子遗传与生物化学系基因治疗中心Xiao教授实验室构建,本室保存。含有BDD-FVIII cDNA的真核表达质粒pCMV-F8由本实验室构建。BDD-FVIII重链、轻链与*Ssp DnaB*内含肽融合基因的真核表达载体pCMV-HCIntN和pCMV-IntCLC为本室之前的工作构建<sup>[9]</sup>。大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 为本室保存,293细胞购自中国科学院细胞库。

### 1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶、DNA连接酶试剂盒、DNA分子量标准产自New England Biolabs公司;Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit、Spin Miniprep Kit均为Qiagen公司产品。DMEM和Opti-MEM培养基、Lipofectamine 2000转染试剂盒购自Invitrogen公司;胎牛血清购自Hyclone公司;重组FVIII为BioChain公司产品;FVIII的重链单克隆抗体ESH-5、轻链单克隆抗体ESH8和HRP标记的ESH8购自American Diagnostica公司;HRP标记的兔抗人FVIII多克隆抗体购自Novus公司;人正常参比血浆为George King Biomedical公司产品;FVIII活性检测的COATEST SP FVIII试剂盒购自Chromogenix公司。其它试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.3 真核重组表达质粒的构建

以本室以前工作中构建的含有BDD-FVIII重链与*Ssp DnaB*内含肽融合基因的表达质粒pCMV-HCIntN为模板,以5'-AGG ACA GTT TCT ACT GTT TTG-3'

(正向)和5'-TCG TCC ATC AAG AGT GTT TG-3'(反向)为引物,通过反向PCR扩增得到引入Leu303 $\rightarrow$ Glu(L303E)突变的线性pCMV-HCIntN,自连接后成为含L303E的载体pCMV-L303EHCIntN;再以pCMV-L303EHCIntN为模板,以5'-TTG TCA TAT CTC TTC CCA CC-3'(正向)和5'-GAC AGT AGA AAC TGT CCT TC-3'(反向)为引物进行反向PCR扩增引入Phe309 $\rightarrow$ Ser(F309S)突变,得到线性化含双突变(L303E/F309S)的pCMV-HCIntN,自连接后即成为融合内含肽的含L303E和F309S双突变重链基因的表达载体pCMV-DMHCIntN。与以前构建的含有BDD-FVIII轻链与*Ssp DnaB*内含肽融合基因的表达质粒pCMV-IntCLC构成一对载体。

### 1.4 细胞培养及基因转染

293细胞于5% CO<sub>2</sub>, 37°C培养箱以含10%胎牛血清的DMEM培养液贴壁培养。转染前一天用胰蛋白酶消化分散细胞,按每孔 $5 \times 10^5$ 个细胞于2 ml DMEM培养液将细胞转接于6孔培养板,待细胞生长融合至80%以上时,用Lipofectamine2000脂质体按试剂盒说明书进行转染,将两种质粒pCMV-DMHCIntN和pCMV-IntCLC按等比率各4  $\mu$ g混合稀释于250  $\mu$ l的Opti-MEM培养液,与室温放置5 min的含20  $\mu$ l脂质体的250  $\mu$ l Opti-MEM培养液混合后继续室温放置20 min,共转染293细胞。同时用pCMV-F8转染293细胞、用pCMV-HCIntN和pCMV-IntCLC共转染293细胞作为对照,并用空载体pcDNA3.1转染293细胞作为阴性对照(Mock)。培养箱内温育5 h后换以2 ml的新鲜Opti-MEM培养液,继续培养48 h,收集培养上清,并在收集的上清中加40  $\mu$ l混合蛋白酶抑制剂。为观察内含肽在培养上清中的剪接反应,按上法分别单独用pCMV-DMHCIntN和pCMV-IntCLC转染293细胞,培养24 h后合并两组细胞继续培养48 h,收集上清。

### 1.5 细胞培养上清中分泌的重、轻链多肽以及剪接的BDD-FVIII蛋白浓度分析

参照我们以前建立的重链特异性ELISA方法检测培养上清中的重链蛋白浓度<sup>[8]</sup>。用浓度为2  $\mu$ g/ml的FVIII重链单抗ESH5包被酶标板,用洗涤液(PBS/0.05% Tween-20)洗板3次,每孔用200  $\mu$ l封闭液(PBS + 1% BSA + 0.05% Tween-20),37°C温育2 h,洗板3次后,按每孔100  $\mu$ l加上清样品或标准品FVIII,每个样品及每个稀释度的标准品分别平行重复加样3个孔,37°C温育1 h,洗板后每孔加入100  $\mu$ l浓度为

2  $\mu\text{g/ml}$  的 HRP 标记 FVIII 多克隆抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h 后洗板, 加反应底物 OPD 溶液 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min 进行显色, 用 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 490 nm 读板。

以轻链特异性 ELISA 检测培养上清的轻链蛋白浓度<sup>[8]</sup>。用浓度为 2  $\mu\text{g/ml}$  的 FVIII 轻链单抗 ESH8 包被酶标板, 洗板、封闭后, 按每孔 100  $\mu\text{l}$  加上清样品或标准品 FVIII, 每个样品及每个稀释度的标准品分别平行重复加样 3 个孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h, 洗板后每孔加入 100  $\mu\text{l}$  浓度为 2  $\mu\text{g/ml}$  的 HRP 标记 FVIII 多克隆抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h 后洗板, 加反应底物 OPD 溶液 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min 进行显色, 用 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 490 nm 读板。

参考文献<sup>[11]</sup>用双夹心 ELISA 检测上清中的全长 BDD-FVIII 蛋白量, 将以 2  $\mu\text{g/ml}$  稀释的 FVIII 重链单抗 ESH5 每孔 100  $\mu\text{l}$  加入 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$  包被过夜, 洗板、封闭后, 将收集的培养上清和用 Opti-MEM 培养液稀释的标准品 FVIII (浓度范围为 300~10 ng/ml), 每个样品及每个稀释度的标准品分别平行重复加样 3 个孔, 每孔 100  $\mu\text{l}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h, 洗板后每孔加入 100  $\mu\text{l}$  浓度为 2  $\mu\text{g/ml}$  的 HRP 标记轻链单抗 ESH8, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h 后洗板 10 次, 加 OPD 溶液后 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min 进行显色, 用 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 490 nm 读板。以系列稀释的标准品的浓度和吸光值绘制标准工作曲线, 根据测得的上清样品的吸光值从标准曲线读取 FVIII 浓度。

### 1.6 细胞培养上清中剪接 BDD-FVIII 产生的生物活性分析

参考文献<sup>[12]</sup>用 Coatest 发色分析试剂盒按照试剂盒说明书操作分析上清的 FVIII 生物活性。以正常人参比血浆 (FVIII 活性为 1.0 U/ml), 用 Opti-MEM 培养液配成低浓度范围 (1%~20%) 和高浓度范围 (20%~150%) 两种浓度系列, 系列反应后 405 nm 处读取吸光值, 以稀释百分比为横坐标、405 nm 吸光值为纵坐标分别绘制低量程和高量程标准曲线, 由培养上清样品测得的吸光值从标准曲线读出相应的百分比值, 以 100% 为 1.0 U/ml 换算为上清的 FVIII 生物活性。

### 1.7 实验结果的统计学处理

实验数以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Student's *t*-test 进行组间比较和统计学分析, 以  $P < 0.05$  定为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 L303E/F309S 双突变 BDD-FVIII 重链的构建

FVIII 的分子的结构为 A1-A2-B-A3-C1-C2, 去掉大部分 B 结构域 ( $\Delta 761\sim 1639$ ) 后的 FVIII 为 BDD-FVIII。我们以前的工作将 BDD-FVIII 于 Gln<sup>1656</sup>-Ser<sup>1657</sup> 之间断裂为重链和轻链, 分别与 *Ssp* DnaB 内含肽融合, 构建了融合内含肽的重链 (HCIntN) 和轻链 (IntCLC), 将它们分别插入真核表达载体 pcDNA3.1(+) 后得到一对质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC<sup>[8]</sup>; 本文用 PCR 方法将 pCMV-HCIntN 中重链 A1 区的 Leu<sup>303</sup> 和 Phe<sup>309</sup> 分别突变成 Glu 和 Ser, 得到融合内含肽的双突变重链 DMHCIntN。上述几种 FVIII 的结构见图 1。

### 2.2 培养上清中重链、轻链多肽以及剪接的 BDD-FVIII 蛋白分泌量

为观察重链 A1 区 L303E/F309S 双突变对融合内含肽的重链多肽 (DMHCIntN) 分泌的影响, 重链特异性 ELISA 结果显示, 单独转 DMHCIntN 细胞分泌至培养上清的重链多肽浓度为 (35 $\pm$ 12) ng/ml, 明显高于单独转内含肽融合野生型重链基因 (HCIntN) 细胞重链多肽分泌量 (14 $\pm$ 6) ng/ml ( $P < 0.05$ ), 表明双突变可较好地促进重链分泌。与融合内含肽轻链基因 (IntCLC) 共转染细胞的重链多肽分泌量进一步增加到 (178 $\pm$ 19) ng/ml, 高于共转 HCIntN 细胞的重链多肽分泌量为 (127 $\pm$ 23) ng/ml, 也高于转 BDD-FVIII 对照细胞的分泌量 (138 $\pm$ 23) ng/ml, 由于内含肽催化轻链与多肽的共价连接, 表明轻链多肽可以顺式作用的方式明显地促进双突变重链的分泌 (图 2)。

我们以前的研究证明, BDD-FVIII 的轻链分泌效率明显高于重链<sup>[8]</sup>。为了观察共转双突变重链基因对轻链多肽分泌的影响, 轻链特异性 ELISA 结果显示, DMHCIntN 与 IntCLC 共转染细胞分泌的轻链量为 (297 $\pm$ 24) ng/ml, HCIntN 与 IntCLC 共转染细胞为 (261 $\pm$ 34) ng/ml, 单独转 IntCLC 细胞为 (282 $\pm$ 25) ng/ml, 三者之间无明显差别 ( $P > 0.05$ ), 但均明显高于转 BDD-FVIII 对照细胞分泌的轻链量 (132 $\pm$ 21) ng/ml, 说明重链双突变对轻链的分泌无明显影响, 但单独的轻链分泌明显高于完整的 BDD-FVIII 分子的轻链分泌, 由于 BDD-FVIII 分子中轻链和重链的等比率关系, 说明受重链分泌低效的影响, 轻链的分泌也随之降低 (图 3)。

生理性 FVIII 功能的发挥有赖于其重链和轻链异源二聚体的形成, 为观察共转基因细胞中双突变重链对内含肽介导的剪接 BDD-FVIII 蛋白分泌的影响, 用重链抗体为包被抗体和轻链抗体为检测抗体的双夹心 ELISA 结果显示, 共转 DMHCIntN 和 IntCLC 细胞上清中剪接的 BDD-FVIII 蛋白量为 (128 $\pm$ 24) ng/ml,

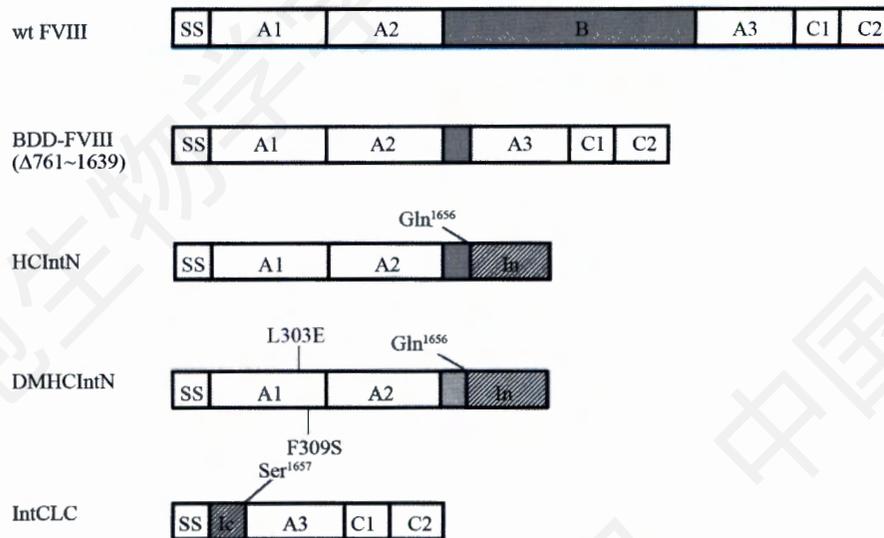


Fig. 1 Schematic representation of FVIII

The wild-type human full-length FVIII (wt FVIII) contains three distinct structural domains including A1-3, B, and C1-2 arranged as A1-A2-B-A3-C1-C2. The BDD-FVIII was produced by deleting amino acids of B-domain from 761 to 1639 with a small B-domain retained. A pair of intein-contained heavy and light chains termed HCIntN and IntCLC were constructed previously by splitting BDD-FVIII before Ser1657 to heavy and light chains, and fusing N- and C-terminus (termed In and Ic) of *Ssp* DnaB intein to them. The intein-fused BDD-FVIII heavy chain with double mutation sites L303E/F309S (DMHCIntN) was produced by PCR directed mutagenesis based on HCIntN. SS: signal sequence of FVIII.

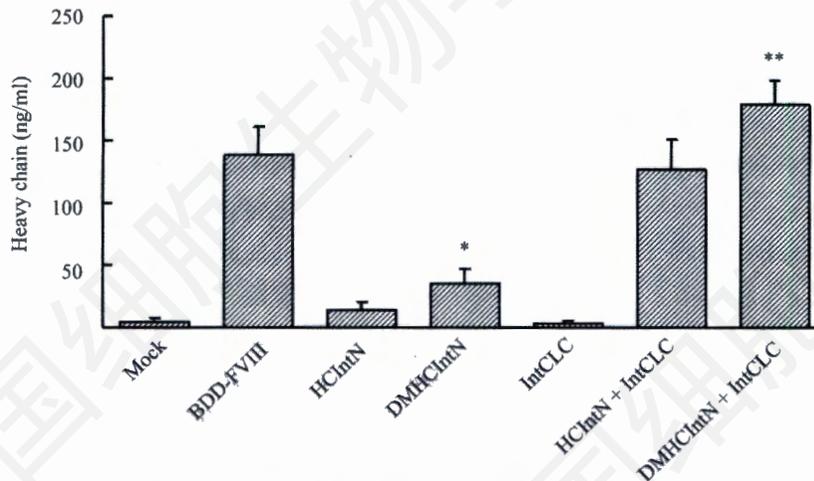


Fig. 2 Levels of secreted heavy chain peptide in supernatants

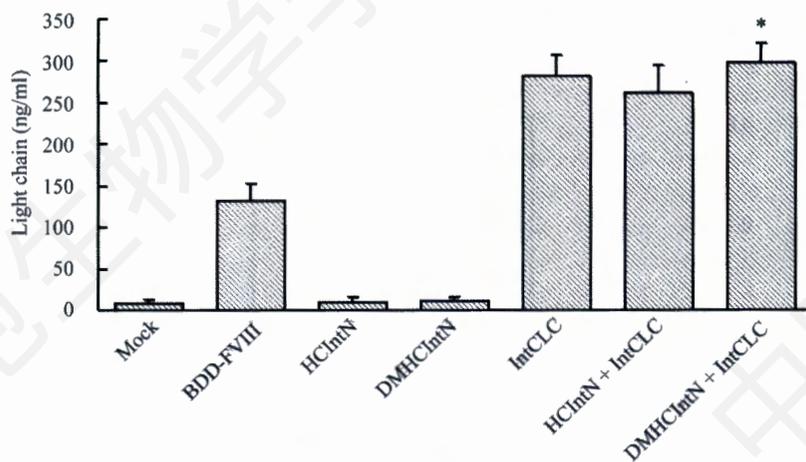
The data are represented as the mean $\pm$ SD.  $n=3$  in each group, \* $P<0.05$  vs HCIntN transfection, \*\* $P<0.05$  vs HCIntN and IntCLC co-transfection.

明显高于共转HCIntN和IntCLC细胞上清中分泌的剪接BDD-FVIII蛋白 [(90 $\pm$ 12) ng/ml], 也高于转BDD-FVIII对照细胞上清中分泌的剪接BDD-FVIII蛋白 [(113 $\pm$ 23) ng/ml], 表明重链的双突变可明显提高培养上清中内含肽剪接的BDD-FVIII蛋白分泌量。从分别转DMHCIntN和IntCLC细胞混合培养后的上清中检测到剪接的BDD-FVIII蛋白 [(20 $\pm$ 3) ng/ml], 为分泌后的重链和轻链在内含肽的蛋白质反式剪接作用下产生, 表明内含肽可不依赖细胞机制对双突变重

链和轻链进行剪接(图4)。

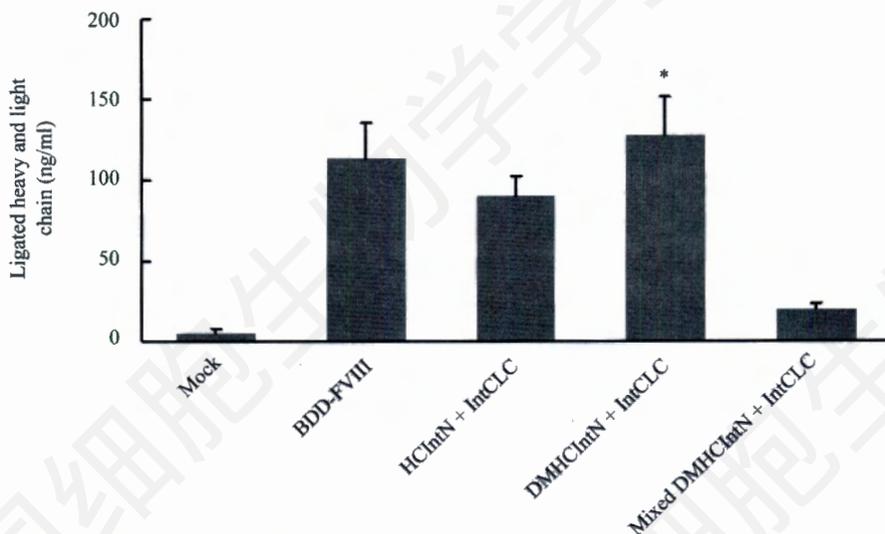
### 2.3 细胞上清中转基因表达产物剪接产生的凝血生物活性

应用生色分析法检测的培养上清的凝血生物活性显示, 共转DMHCIntN和IntCLC细胞培养上清的凝血生物活性为(1.01 $\pm$ 0.15) U/ml, 由内含肽剪接的BDD-FVIII产生, 高于共转HCIntN和IntCLC细胞上清的凝血生物活性[(0.71 $\pm$ 0.14) U/ml] ( $P<0.05$ ), 也高于转BDD-FVIII对照细胞培养上清的凝血生物活性



**Fig. 3 Light chain peptide levels in supernatants**

The data are represented as the mean $\pm$ SD.  $n=3$  in each group, \* $P>0.05$  vs *HCIntN* plus *IntCLC* co-transfection and *IntCLC* transfection but  $P<0.01$  vs *BDD-FVIII* transfection.



**Fig. 4 Levels of ligated BDD-FVIII protein produced by protein trans-splicing**

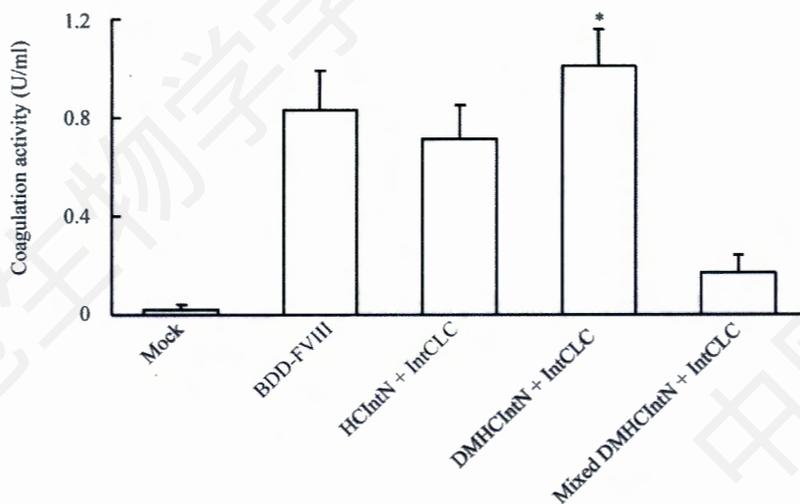
The data are represented as the mean $\pm$ SD.  $n=3$  in each group, \* $P<0.05$  vs *HCIntN* and *IntCLC* co-transfection, and  $P>0.05$  vs *BDD-FVIII* transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with *DMHCIntN* and *IntCLC* shows detectable BDD-FVIII produced by splicing.

[(0.83 $\pm$ 0.16) U/ml]。结合上述剪接蛋白量的检测结果,表明重链双突变可通过提高内含肽介导与轻链剪接形成的 BDD-FVIII 蛋白量提高凝血活性。另外,单独转 *DMHCIntN* 和 *IntCLC* 细胞合并培养上清检测到一定水平的凝血活性[(0.17 $\pm$ 0.07) U/ml],表明内含肽可不依赖细胞机制的剪接反应产生凝血活性(图 5)。

### 3 讨论

在我们前期运用内含肽的蛋白质反式剪接的双载体转 *BDD-FVIII* 基因研究基础上,本文进一步通过

在重链的 A1 区引入 L303E/F309S 双突变转基因证明,此种变构体重链的分泌性明显得到改善,并且被内含肽介导与重链共价连接的轻链以顺式的方式进一步增强,与野生型重链基因相比,双载体转 *BDD-FVIII* 基因的能效得到提高。相对于应用 AAV 基因载体的乙型血友病基因治疗临床试验的成功开展<sup>[13,14]</sup>,甲型血友病基因治疗进展缓慢,主要障碍为过大的 *FVIII* 编码基因难以为 AAV 包装和 *FVIII* 的低分泌性使血浆中的 *FVIII* 表达水平过低<sup>[15]</sup>。基于对生理性 *FVIII* 加工、分泌过程中功能性异源二聚体形成机制的认识,



**Fig. 5 Coagulation activity derived from spliced BDD-FVIII in supernatants**

The data are represented as the mean $\pm$ SD.  $n=3$  in each group,  $*P<0.05$  vs *HCIntN+IntCLC* co-transfection and  $P>0.05$  vs *BDD-FVIII* transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with *DMHCIntN* and *IntCLC* show detectable coagulation activity.

运用双载体转 *FVIII* 基因是解决 AAV 容量限制的一种策略<sup>[4,5]</sup>, 但由于重链分泌低效率带来新的链不均衡性问题, 而且异源二聚体形成有赖重、轻链在同一靶细胞的分泌过程中相遇并在分子伴侣帮助下在两条多肽链间形成二硫键, 因此, 这种双载体转基因的效果依赖于重、轻链基因进入同一靶细胞内的表达, 不同细胞分泌至上清的重链和轻链多肽难以形成异源二聚体<sup>[16]</sup>。鉴于 *BDD-FVIII* 的分泌特性, 我们运用内含肽具有的不依赖细胞机制的高效、精确的蛋白质剪接功能催化的多肽之间肽键无缝连接的特性, 由转内含肽融合的重、轻链基因细胞混合培养体系表明, 表达、分泌后的重、轻链多肽可在内含肽的催化作用下剪接形成以肽键相连的完整 *BDD-FVIII* 分子, 发挥凝血生物活性(图 4, 图 5), 因此无需重、轻链基因转染同一靶细胞, 即可产生剪接的凝血功能的 *BDD-FVIII*, 和依赖细胞机制的双载体转基因技术相比, 具有明显的优点。另外, 本文的双突变重链转基因表明, 其分泌量是野生型重链的 2.5 倍, 说明干扰重链与内质网 BiP 的结合可促进其分泌, 部分缓解了重链分泌性问题, 但仍明显低于轻链的分泌, 说明影响重链分泌因素的复杂性; 轻链表现出对重链的顺式促分泌作用, 使共转基因表达后与其在内含肽的蛋白质剪接作用下连接的双突变重链分泌量大幅增加, 明显高于轻链与野生型重链共转基因细胞的重链分泌, 同时也使分泌至培养上清中的剪接 *BDD-FVIII* 蛋白量和由其产生的生物活性明显提高, 提高了基于

内含肽的双载体转 *BDD-FVIII* 基因的实际功效。内含肽的高效蛋白质剪接功能作为蛋白质工程和药物开发的有力工具, 如体内外多肽的连接、多肽环化、蛋白质纯化、生物传感器及基因治疗等近年来受到重视<sup>[17,18]</sup>。本研究为进一步运用蛋白质剪接技术的双 AAV 载体转含双突变重链的 *BDD-FVIII* 基因动物体内实验、提高 *BDD-FVIII* 的表达水平提供了实验依据。

## 致谢

感谢加拿大 Dalhousie 大学医学院 Liu P 教授提供的 *Ssp DnaB* 内含肽基因以及所提供的蛋白质剪接技术帮助。

## 参考文献(References)

- 1 Vandendriessche T, Collen D, Chuah MKL. Gene therapy for the hemophiliac. *J Thromb Haemost* 2003;1:1550-8.
- 2 Murphy SL, High KA. Gene therapy for haemophilia. *Br J Haematol* 2008;140: 479-87.
- 3 Kaufman RJ, Pipe SW, Tagliavacca L, Swaroop M, Moussalli M. Biosynthesis assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8(Suppl 2): S3-14.
- 4 Burton M, Nakai H, Colosi P, Cunningham J, Mitchell R, Couto L. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12725-30.
- 5 Scallan CD, Liu T, Parker AE, Patarroyo-White SL, Chen H, Jiang H, et al. Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light

- chains of FVIII. *Blood* 2003; 102: 3919-26.
- 6 Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006; 124: 587-99.
  - 7 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: 24121-4.
  - 8 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.
  - 9 Zhu FX, Liu ZL, Chi XY, Qu HG. Protein *trans*-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci Chin Life Sci* 2010; 53(6): 683-9.
  - 10 Perler FB. The ins and outs of gene expression control. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 824-6.
  - 11 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: 27-36.
  - 12 Sarkar R, Tetreault R, Gao GP, Wang LL, Bell P, Chandler R, *et al.* Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood* 2004; 103: 1253-60.
  - 13 Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12: 342-7.
  - 14 Jiang H, Pierce GF, Ozelo MC, de Paula EV, Vargas JA, Smith P, *et al.* Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* 2006; 14: 452-5.
  - 15 Pierce GF, Lillicrap D, Pipe SW, Vandendriessche T. Gene therapy, bioengineered clotting factors and novel technologies for hemophilia treatment. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 901-6.
  - 16 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.
  - 17 Gimble FS. Putting protein splicing to work. *Chem Biol* 1998; 5: R251-6.
  - 18 Cheriyan M, Perler FB. Protein splicing: A versatile tool for drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 899-907.

## L303E/F309S Mutations Enhance Secretion of Intein-Ligated B-Domain-Deleted Coagulation Factor VIII

Fu-Xiang Zhu\*, Shu-De Yang, Ze-Long Liu, Jing Miao, Hui-Ge Qu, Xiao-Yan Chi  
(Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China)

**Abstract** The coagulation factor VIII (FVIII) has a similar structure with factor V but its inefficient secretion not only hampered the wide use of recombinant FVIII product for treatment of hemophilia A but adversely affected the FVIII transgene-based gene therapy for its low levels of expression. Our previous work demonstrated that an intein's protein splicing can be used in delivery of the B-domain-deleted FVIII (BDD-FVIII) gene by a dual vector system. In this study, the effect of L303E/F309S mutations within FVIII heavy chain on secretion of an intein-spliced BDD-FVIII protein was investigated. A PCR directed mutagenesis was performed to produce the intein-fused heavy chain containing L303E/F309S mutations (DMHCIntN) from the *Ssp* DnaB intein-fused wild-type heavy chain (HCIntN) constructed previously. By co-transfection of the cultured 293 cells with *DMHCIntN* and intein-fused light chain (*IntCLC*) genes, the amount of secreted heavy chain polypeptide and spliced intact BDD-FVIII protein and coagulation activity in the culture supernatant were respectively determined by ELISA and Coatest assay. The data showed that the amount of heavy chain in supernatant from cells transfected with DMHCIntN alone and both DMHCIntN plus IntCLC were (35±12) ng/ml and (178±19) ng/ml greater than that of HCIntN alone and HCIntN plus IntCLC cotransfection [(14±6) ng/ml and (127±23) ng/ml]. The amount of spliced BDD-FVIII and coagulation activity in supernatant from DMHCIntN and IntCLC cotransfected cells were (128±24) ng/ml and (1.01±0.15) U/ml respectively also higher than HCIntN and IntCLC cotransfection [(90±12) ng/ml and (0.71±0.14) U/ml]. The spliced BDD-FVIII and its activity were also detected in supernatant of mixed cells transfected with DMHCIntN and IntCLC individually [(20±3) ng/ml and (0.17±0.07) U/ml]. The results demonstrated that secretion of the mutated heavy chain can be markedly improved by the light chain in *cis* with an increased secretion of spliced FVIII, and intein can increase efficacy of dual-vector delivery of the doubly mutated *BDD-FVIII* gene with splicing independently of any cellular mechanisms. It encourages our ongoing study in animal model *in vivo* by using intein-based dual-AAV vector to transfer doubly mutated *BDD-FVIII* gene.

**Key words** B-domain-deleted FVIII; mutated heavy chain; secretion; intein; protein splicing

Received: April 26, 2010      Accepted: July 2, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province(No.Y2005D14), Science and Technology Program of Yantai City(No.2008152), the Scientific Research Foundation from Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars(No. 20071108) and the Discipline Construction Funds of Ludong University

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