

构建多顺反子表达载体的有效工具——FMDV 2A

An Efficient Tool for the Construction of Multiple-cistronic Vectors : FMDV 2A

刘必胜¹, 刘新垣^{1,2*}, 钱程^{1,3*}

LIU Bi-Sheng¹, LIU Xin-Yuan^{1,2*} and QIAN Cheng^{1,3*}

1 浙江理工大学新元医学与生物技术研究所 杭州 310018

2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031

3 Division of Gene Therapy and Hepatology, Medical School, University of Navarra 31008, Spain

1 Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

2 Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

3 Division of Gene Therapy and Hepatology, Medical School, University of Navarra 31008, Spain

摘要 近年来肿瘤多基因治疗倍受关注,然而目前缺少一种有效的构建多顺反子的工具。传统的构建多顺反子的工具,如 IRES 等,由于存在结构大,上下游基因表达差异显著等缺陷,严重限制了其应用。FMDV 2A 因其具有结构小、剪切效率高等优点为多基因治疗带来了新的希望。主要介绍了 FMDV 2A 的特性、“剪切”活力及其在构建多顺反子载体中的应用。

关键词 FMDV 2A, 多顺反子, 基因治疗, 肿瘤

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0765-05

Abstract Recently, cancer therapy with multiple genes has been attached with great attention. However, at present there is no efficient tool to construct multiple-cistrons. The large sizes and the imbalance in expression of most traditional tools, such as ribosome entry sites (IRESes), greatly block their wide employment in the construction of multiple cistronic gene therapy vectors. The self-cleaving peptide 2A from foot-and-mouth disease virus (FMDV) has a very small size, and more importantly, high cleavage activity in artificial bicistron, which bring new hope for multiple genes therapy strategy. In this article, the characteristics and cleavage activities of FMDV 2A will be elucidated, and we further outline its applications in cancer gene therapy.

Key words FMDV 2A, multiple-cistron, gene therapy, cancers

肿瘤的发生往往是多基因改变的结果,这使人们认识到单基因治疗的不足,导入并表达多个治疗基因在基因治疗领域便有着重要的应用价值^[1]。目前多基因治疗主要采取两种途径:(1)多个携带单

基因的独立载体系统同时转染靶细胞,其优点是自由调节各种治疗基因的表达量,使各基因在时间上协调组合。缺点是效率太低、工作量大^[2]。(2)构建多顺反子载体,即在一个载体上实现多种基因

Received: January 15, 2007; Accepted: February 8, 2007.

This work was supported by the grants from the National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2004CB518804) and the Main Projects in Science and Technology Office of Zhejiang Province (No. 2006C23006).

* Corresponding author. QIAN Cheng, Tel: +86-571-86843182, E-mail: cqian3184@yahoo.com.cn

LIU Xin-Yuan, Tel: +86-21-54921126, E-mail: xyliu@sibs.ac.cn

国家自然科学基金项目“973”项目(No. 2004CB518804)浙江省科技厅重点项目(No. 2006C23006)

的共表达^[3]。目前构建多顺反子载体的策略主要包括:构建多启动子(multiple promoters)表达载体、构建剪切(splicing)载体、表达融合基因(fusagene)、基因之间以内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)连接、基因之间以自剪切多肽 2A(self-cleaving 2A peptide)连接等^[4,5]。然而这些策略中除了自剪切多肽 2A 外,大多已逐步被放弃。究其原因主要是基因起始效率低,上游基因与下游基因的表达严重不平衡。如病毒源 IRES encephalomyocarditis virus (ECMV) IRES 曾被用于构建多顺反子,但是由于存在一些缺陷严重影响了其在多顺反子载体构建中的应用^[6-9],主要有(1)IRES 介导的上下游基因表达不平衡,通常下游基因的表达量仅是上游的 20% 到 50%;(2)IRES 自身结构较大,其应用常受到载体容量的限制。

口蹄疫病毒(food and mouth virus disease, FMDV) 2A 是自剪切多肽的典型。由于 FMDV 2A 具有剪切效率高,上下游基因表达平衡性好,以及结构短小的优点,使其成为构建多顺反子载体的理想工具之一。本文主要介绍了 FMDV 2A 的特性、“剪切”活力及其在构建多顺反子载体中的应用。

1 口蹄疫病毒(food and mouth virus disease, FMDV) 2A

FMDV 属小核糖核酸病毒,是一种正链 RNA 病毒,其基因组内含有一个长的开放读码框,编码一个 225kD 的多聚蛋白前体^[10,11](图 1)。这个多聚蛋白前体在翻译时即由 2A 在其 C 端进行“原初剪切”,得到外壳蛋白前体(P1-2A)和 2BC/P3。

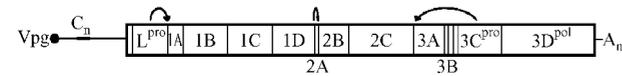


图 1 小核糖核酸病毒蛋白前体的自剪切

Fig.1 Picornavirus 'primary' polyprotein cleavages

The genome of picornavirus is shown with the single long ORF in boxed areas. Primary intramolecular cleavages are shown (curved arrows).

到目前为止, FMDV 2A RNA 序列在所有口蹄疫病毒中高度保守(图 2)。而多肽 2A C 端最后三个

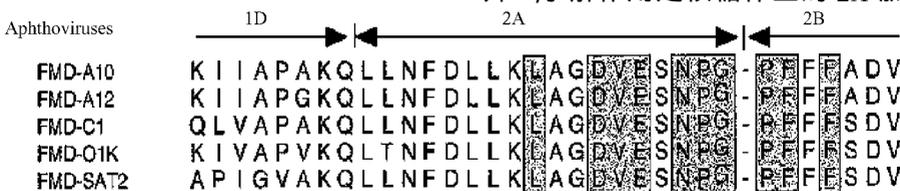


图 2 FMDV 2A 中保守氨基酸

Fig.2 Conserved amino acid residues in the aligned sequences of FMDV 2A

氨基酸(-NPG-)和 2B 蛋白 N 端第一个氨基酸(-Pro-)则完全保守^[12]。心病毒(Cardiovirus)中多聚蛋白前体在自身 2A 作用下发生与之类似的原初剪切^[13,14]。虽然心病毒 2A 仅在 C 端高度保守,但是其 C 端却与 FMDV 2A(18aa)高度相似^[15]。由心病毒 2A(180aa)到 FMDV 2A(18aa)可能反应了一种进化过程。心病毒和 FMDV 2A 多肽序列中均含有一个高度保守的基序即“-DxExNPGP-”,该保守元件在 2A 起始剪切中起到关键作用。

其他小核糖核酸病毒如肠道病毒(enterovirus)和鼻病毒(rhinovirus)也发生类似的初始剪切。所不同的是,这类 2A 在其 N 端剪切多聚蛋白前体,形成 P1 蛋白和 2A-P2 蛋白。

将这两类病毒比较发现,尽管心病毒 2A 蛋白(150aa)分子量大小与肠道病毒和鼻病毒的 2A 接近,但序列上却没有任何同源性^[16,17]。研究发现肠道病毒和鼻病毒 2A 属于蛋白酶类,而 FMDV 和心病毒 2A 则是非蛋白酶类^[18]。

除了 FMDV 2A 外,在其它多种病毒中也发现有相同功能的“类 2A 蛋白”(图 3)。这些“类 2A 蛋白”与 FMDV 2A 有较大的同源性,并且大多能够在体外实现高效剪切。

2 FMDV 2A 的“剪切”机制

FMDV 2A 独特的“剪切”机制决定了 2A 只有在真核翻译系统中有活性,而在原核翻译系统中无活性。研究表明 2A 和 2B 总是在 Gly 和 Pro 之间“切开”,动力学和结构模型分析表明, Gly 和 Pro 之间的肽键实际上并未形成^[14]。在翻译过程中, 2A 的高级结构对核糖体肽基转移酶中心造成空间排阻,使肽基(2A)-tRNA 酯键无法形成。由于空间排阻使 Pro-tRNA 氨基氮亲核进攻无法完成,代之则是肽基(2A)-tRNA 酯键的水解作用,形成与 2A 的融合蛋白,同时核糖体能继续翻译下游蛋白 2B,整个过程不需要任何蛋白酶参与^[18]。可见, 2A 能起到类似蛋白水解酶的作用,在 2A 和 2B 位点将其顺式“切开”,水解作用是核糖体上的 2A 肽酰-tRNA 作用于

<i>Picornaviruses;</i>		2A-Mediated 'Cleavage'
		↓
EMC-B	GIFNAHYAGYFADLLIHD I ETNPG	P-
FMD-A12	LLNFDLLKLAGD V ESNPG	P-
FMD-O1K	LTNFDLLKLAGD V ESNPG	P-
ERAV	CTNYSLLKLAGD V ESNPG	P-
ERBV	GATNFSLLKLAGD V ELNPG	P-
PTV-1	GPGATNFSLLKQAGD V EENPG	P-
<i>Insect Viruses;</i>		
CrPV	-FLRKRTQLLMSGD V ESNPG	P-
DCV	-EAARQMLLLLSGD V ETNPG	P-
ABPV	-GSWTDILLLLLSGD V ETNPG	P-
IFV	-TRAEIEDELIRAGI E SNPG	P-
TaV	-RAEGRGSLTLCGD V EENPG	P-
<i>Trypanosoma spp. Repeated Sequences;</i>		
<i>T. brucei</i> TSR1	-SSIIRTKMLVSGD V EENPG	P-
<i>T. cruzi</i> AP Endonuclease	-CDAQRQKLLLSGD I EQNPG	P-
<i>Type C Rotaviruses;</i>		
Porcine Rotavirus	-AKFQIDKILISGD V ELNPG	P-
Human Rotavirus	-SKFQIDKILISGD I ELNPG	P-

图3 多种病毒中检测到有自剪切活性的“类2A蛋白”

Fig.3 “2A-like” peptides which have self-cleaving activities in various viruses

2A 3'-O 腺苷脂酰键产生的。序列分析发现, FMDV 2A 的序列高度保守, 最后三个氨基酸(-NPG-)则完全保守, 并且2B蛋白N端第一个氨基酸Pro也完全保守。推测2A保守的结构可能在阻止肽键形成和继续合成下游多肽的过程中起作用, 同时也是高剪切活力的保证。

3 FMDV 2A 的剪切活力及剪切特性

FMDV 基因表达产物中不存在未剪切的多聚蛋白前体, 因此 FMDV 2A 的天然剪切活力可达到100%。而多数情况下, FMDV 2A 对体外构建的多顺反子无法完全剪切, 剪切效率大多在85%~95%之间^[19]。本研究组利用 FMDV 2A 以溶瘤腺病毒为载体成功实现了 IL-24 基因和 TRAIL 基因在多种肿瘤细胞中的共表达。免疫印记检测发现三种基因表达产物, TRAIL 蛋白、IL-24-2A 蛋白以及蛋白剪切前体 IL-24-2A-TRAIL。这可能是由于体外构建的多顺反子体系中 2A 的“剪切”活性在某种程度上受到其周围氨基酸序列或蛋白质空间结构域的影响^[20]。另外, 2A 的剪切活性还可能与前体蛋白总量或体外细胞系有关。

定点突变实验研究表明, Gly-Pro 剪切位点下游序列的改变并不影响 2A 介导的剪切效率, 而上游序列的改变则会产生一定影响。在 2A 上游插入 FMDV 衣壳蛋白 1D 部分序列会使剪切效率提高到

95%至100%^[14, 21]。

基于病毒源的 IRES 多顺反子系统, 上下游基因的选择和顺序往往能够显著影响多基因的共表达, 并且 IRES 多顺反子系统具有明显的组织特异性。FMDV 2A 则与之不同: 基因的选择与上下游顺序对其剪切活性基本没有影响。同时, 研究表明, 2A 在肝癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞以及肺癌细胞中对多顺反子的剪切无显著的组织特异性。

研究发现, 2A 不影响多顺反子中各种蛋白的细胞定位及生物活性。Abdelhak El Amrani 等人发现, 多顺反子中各种蛋白质加上信号肽后, 其在植物细胞中的定位不受 2A 影响^[22]。另外, 携带双顺反子 HoxB4-2A-GFP 的逆转录病毒能同时表达核蛋白 HoxB4 和细胞质荧光蛋白, 并且发现 2A 不影响蛋白质的细胞内定位^[23]。S Furler 等人利用腺相关病毒携带 SOD-2A-EGFP, 在检测到荧光蛋白高效表达的同时, 也发现多肽尾巴 2A 不影响 SOD 酶的活性^[24]。

4 FMDV 2A 在构建多顺反子载体中的应用

体外构建 FMDV 2A 多顺反子的特点是: 基因之间以 2A 序列连接, 同时去除上游基因的终止密码子以形成一个长的开放读码框。翻译时多聚蛋白可在编码 2A 区域的 C 端被 2A 切割开, 释放出融合了 2A 多肽尾巴的上游蛋白, 以及完整的下游蛋白(带

有 N 端的一个脯氨酸)。目前, FMDV 2A 多顺反子系统已被应用于腺病毒(adenovirus, Ad) 逆转录病毒(retrovirus)^[25-28]、慢病毒(lentivirus)^[29]、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)^[30]等载体的构建, 以实现多种治疗目的。Jianmin F. 等人在慢病毒载体中利用 FMDV 2A 同时表达单克隆抗体 DC101 的重链和轻链, 从而实现了全长抗体在体内持续高效的表达, 并取得了显著的抗肿瘤效果^[31]。Yuan Lin 等人以慢病毒为载体利用 2A 在血液干细胞中同时表达耐药基因 MGMT 和荧光素酶基因, 药物筛选时以观察血液干细胞的动态迁移和增殖^[32]。

由于 FMDV 2A 结构小, 不仅可以缓解某些载体如 AVV 装载量的压力, 也为联合应用多种工具构建三个及以上顺反子提供了可能。Andrea LS 等人以逆转录病毒为载体, 利用多个 2A 同时实现了 T 细胞受体 CD3 蛋白复合体的多亚基共表达, 并且检测到了 CD3 的生物学功能^[33]。Pablo de Felipe 等人以逆转录病毒为载体, 利用 FMDV 2A 和 ECMV IRES 同时共表达五个基因, 并获得了高滴度的病毒^[24]。

在我们研究组, 刘新垣院士和钱程教授提出了双靶向双基因病毒治疗策略(Dual-Targeting Dual Gene-Virotherapy), 即利用双靶向病毒载体携带两个具有协同/互补作用的抗肿瘤基因, 以取得更好的抗肿瘤效果。根据这个新策略, 我们利用 FMDV 2A 实现了 IL-24 和 TRAIL 这两个最具前景的抗肿瘤基因的同时表达。研究发现该新型病毒能够有效地共表达外源基因, 并在体内肝癌模型中取得了显著的疗效。

5 问题与展望

FMDV 2A 作为一种构建多顺反子的有效工具, 其短小的基因序列和高效的剪切效率为多基因治疗带来了新的希望。然而, 为了更好地实现多基因治疗的目的, 还需进行以下几方面的改进 (1) 尽量减少未剪切的多聚蛋白前体。虽然利用 2A 能够实现多种蛋白的高效表达, 但在体外实验中仍能检测到未剪切的蛋白前体。如何进一步优化 2A 序列, 使其在人工构建的多顺反子中实现完全剪切将是以后努力的方向。同时, “类 2A 蛋白”的发现^[34]拓展了我们对自剪切多肽的认识: 在某些病毒中可能存在一些小分子序列, 这些序列虽然比 2A 更为精简但剪切活性却很高。这为我们研究自剪切多肽的作用机理提供了很好的素材, 并为人工合成活力更高、结构更小的多肽提供了思路。(2) 提高病毒载体的滴度。利用 2A 可将多种治疗基因克隆到同一载体,

但是治疗基因的表达可能会影响病毒载体的滴度。这可能是由于外源基因的表达影响病毒的复制, 或病毒的装载容量太大影响病毒的包装。因此, 在进行多基因治疗时要注意外源基因和载体的合理选择。Pablo de Felipe 等人^[24]的策略是以逆转录病毒为载体携带多顺反子, 在 LTR 序列后加入 2A 序列, 并联合使用 ECMV 的 IRES 序列。这样可同时表达五种蛋白, 并获得了高滴度的病毒。

随着对自剪切多肽的不断深入研究, 相信今后可以对其进行更加合理和灵活的应用, 使其在多基因治疗或其它方面发挥更大的作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Okada H, Giezeman-Smits KM, Tahara H, *et al.* Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduced IL-4 plus HSVtk tumor vaccine. *Gene Ther*, 1999, **6**: 219 - 226.
- [2] Pei ZF, Chu L, Zou WG, *et al.* An oncolytic adenoviral vector of smac increasee antitumor activity of against HCC in human cells and in mice. *Hepatology* 2004, **39**: 1371 - 1381.
- [3] Ngoi SM, Chien AC, Lee CGL. Exploiting internal ribosome entry sites in gene therapy vector design. *Curr Gen Ther*, 2004, **4**: 15 - 31.
- [4] De Felipe P. Polycistronic viral vectors. *Curr Gene Ther*, 2002, **2**(3): 355 - 378.
- [5] Emerman M, Temin HM. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell*, 1984, **39**: 449 - 467.
- [6] Wong ET, Ngoi SM, Lee CGL. Improved co-expression of multiple genes in vectors containing internal ribosome entry sites (IRESes) from huamn genes. *Gene Ther* 2002, **9**: 337 - 344.
- [7] Mizuguchi H, Xu Z, Ishii Watabe A, *et al.* IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 2000, **1**: 376 - 382.
- [8] Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, *et al.* Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**: 3327 - 3334.
- [9] Chappell SA, Edelman GM, Mauro VP. A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**: 1536 - 1541.
- [10] Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, *et al.* Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology* 2005, **79**: 6487 - 6504.
- [11] Saiz JC, Cairo J, Medina M, *et al.* Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontinuous epitopes involved in viral neutralization. *Journal of Virology*, 1994, **68**: 4557 - 4564.
- [12] Michelle LL, Donnelly, David Gani, Mike Flint, *et al.* The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *Journal of General Virology*, 1997, **78**: 13 - 21.

- [13] Michelle LL Donnelly ,Garry Luke ,Amit Mehrotra ,*et al.* Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein ' cleavage ' mechanism indicates not a proteolytic reaction ,but a novel translational effect 'a putative ribosomal ' skip ' . *Journal of General Virology* ,2001 ,**82** : 1013 – 1025 .
- [14] Martin D Ryan ,Michelle Donnelly ,Arwel Lewis ,*et al.* A model for nonstoichiometric , cotranslational protein scission in eukaryotic ribosomes . *Bioorganic Chemistry* ,1999 **27** :55 – 79 .
- [15] Hahn H , Palmenberg AC . Deletion mapping of the encephalomyocarditis virus primary cleavage site . *Journal of Virology* ,2001 **75** :7215 – 7218 .
- [16] Toyoda H ,Nicklin M ,Murray MG ,*et al.* A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein . *Cell* ,1998 **45** :761 – 770 .
- [17] Sommergruber W ,Zorn M ,Blaas D ,*et al.* Polypeptide 2A of human rhinovirus type 2 :identification as a protease and characterization by mutational analysis . *Virology* ,1989 **169** :68 – 77 .
- [18] Jan Z , Frank JMK , Jochem MD , *et al.* Genetic analysis of mengovirus protein 2A :its function in polyprotein processing and virus reproduction . *Journal of Virology* ,1998 **79** :17 – 25 .
- [19] Mattion NM , Hamish EC , Crowley JC , *et al.* Foot-and-mouth disease virus 2A protease mediates cleavage in attenuated sabin 3 poliovirus vectors engineered for delivery of foreign antigens . *J Virol* ,1996 **70** :8124 – 8127 .
- [20] Ypma-Wong MF ,Filman DJ ,Hogle JM ,*et al.* Structural domains of the poliovirus polyprotein are major determinants for proteolytic cleavage at Gln-Gly pairs . *J Biol Chem* ,1998 **263** :17846 – 17856 .
- [21] de Felipe P ,Martin V ,Cortes ML ,*et al.* Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy . *Gene Therapy* ,1999 **6** :198 – 208 .
- [22] Abdelhak Ei Amrani ,Barakate A ,Barak MA ,*et al.* Coordinate expression and independent subcellular targeting of multiple protein from a single transgene . *Plant Physiology* ,2004 **135** :16 – 24 .
- [23] Klump H ,Schiedlmeier B ,Vogt B ,*et al.* Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy . *Gene Ther* ,2001 **10** :811 – 817 .
- [24] Furler S ,Paterna JC ,Weibel M ,*et al.* Recombinant AAV vector containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons . *Gene Therapy* ,2001 **8** :864 – 873 .
- [25] Pablo de Felipe Marta Izquierdo . Construction and characterization of pentacistronic retrovirus vectors . *Journal of General Virology* , 2003 **84** :1281 – 1285 .
- [26] Klump H ,Schiedlmeier B ,Vogt B ,*et al.* Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy . *Gene Ther* ,2001 **8** :811 – 817 .
- [27] De Felipe P ,Izquierdo M . Tricistronic and tetracistronic retroviral vectors for gene transfer . *Hum Gene Ther* ,2000 **11** :1921 – 1931 .
- [28] Michael D Milsom , Catherine Gavin , Rebecca Baldwin , *et al.* Generation of novel ,high titer ,multi-cistronic retroviral vectors which simultaneously express individual proteins in different subcellular locations of hematopoietic cells . *Blood* ,2004 **15** :771 – 779 .
- [29] Chinnasamy N ,Milsom M ,Neuenfeldt J ,*et al.* Development of novel multigene lentiviral vectors . *Blood* ,2004 **104** :5272 – 5281 .
- [30] Furler S ,Paterna JC ,Weibel M ,*et al.* Recombinant AAV vector containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons . *Gene Therapy* ,2001 **8** :864 – 873 .
- [31] Fang JM ,Qian JJ ,Yi S ,*et al.* Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide . *Nature Biotechnology* , 2005 **10** :1038 – 1087 .
- [32] Lin Y ,Cheung P ,Wilson DL ,*et al.* Dynamic patterns of migration and expansion of hematopoiesis during MGMT mediated drug selection . *Blood* ,2004 **104** :156 – 162 .
- [33] Andrea L Szymczak ,Greg JW ,Wang Y ,*et al.* Correction of multi-gene deficiency *in vivo* using a single ' self-cleaving ' 2A peptide-based retroviral vector . *Nature Biotechnology* ,2004 **22** :589 – 594 .
- [34] Michelle LL Donnelly ,Lorraine E Hughes ,Garry Luke ,*et al.* The ' cleavage ' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring ' 2A-like ' sequences . *Journal of General Virology* ,2001 **82** :1027 – 1041 .