

• 研究论文 •

轻链二硫键缺失突变促进链间重组二硫键 BDD-FVIII 变构体分泌

刘泽隆, 缪 静, 屈慧鸽, 迟晓艳, 朱甫祥*

(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 凝血 VIII 因子 (coagulation factor VIII, FVIII) 分子内含有 8 对二硫键, 参与维持其结构和功能, 轻链 A3 结构域中 Cys¹⁸⁹⁹/Cys¹⁹⁰³ 间的二硫键阻碍分泌, 本室曾通过在 FVIII 重链和轻链间引入重组二硫键, 证明其可促进消除 B 结构域的重链 (B domain-deleted FVIII, BDD-FVIII) 重、轻链异源二聚体的组装和分泌。本文在此基础上将 BDD-FVIII 的重链 A2 区 Met⁶⁶² 和轻链 A3 区 Asp¹⁸²⁸ 突变为 Cys, 从而构建可形成链间二硫键的变构体 F8C。将 F8C 轻链 A3 区 Cys¹⁸⁹⁹ 和 Cys¹⁹⁰³ 突变为 Gly, 从而消除内源性二硫键, 得到变构体 F8CG, 并探索这两种 BDD-FVIII 变构体的分泌促进作用。通过 HEK293 和 COS-7 细胞的基因瞬时转染实验, 检测细胞表达变构体多肽的二硫键形成情况和培养上清中变构体多肽的分泌量和凝血活性, 并检测变构体的血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 结合力。结果显示, 细胞转基因表达产物 F8C 和 F8CG 均以二硫键连接的异源二聚体多肽为主, 而野生型 BDD-FVIII 以易于解离的异源二聚体多肽为主。F8C 分泌量和活性明显高于野生型 BDD-FVIII, F8CG 的分泌量和活性相对于 F8C 得到进一步提高, 显示轻链二硫键的破坏对分泌具有促进作用, 而对 vWF 的结合力无显著性影响。本文为进一步的变构体体内转基因研究奠定了基础。

关键词: 凝血 VIII 因子; 二硫键突变; 转基因; 分泌

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)01-0054-06

Elimination of a disulfide bond in the light chain of coagulation factor VIII improves secretion of a BDD-FVIII variant with an engineered inter-chain disulfide

LIU Ze-long, MIAO Jing, QU Hui-ge, CHI Xiao-yan, ZHU Fu-xiang*

(Life Science College, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The coagulation VIII factor (FVIII) contains eight pairs of disulfide bonds, which are involved in maintaining its structure and function. It has been demonstrated that the disulfide bond between Cys¹⁸⁹⁹/Cys¹⁹⁰³ of the A3 domain in the light chain impedes secretion. In our previous work, an engineered inter-chain disulfide in the B domain-deleted FVIII (BDD-FVIII) promoted heterodimer assembly and secretion of separately expressed heavy and light chains. In this study, we constructed two BDD-FVIII variants, one of which contains an engineered inter-chain disulfide bond (F8C) between Met⁶⁶² > Cys and Asp¹⁸²⁸ > Cys mutations and another contains an endogenous A3 domain with a disrupted disulfide bond from F8C (F8CG) by replacement of Cys¹⁸⁹⁹ and Cys¹⁹⁰³ with Gly in F8C. We explored their function and secretion. By transducing F8C and F8CG into HEK293 and COS-7 cells, the formation of disulfide bonds and the secretion and coagulation activity of the two variants in the culture media and their binding affinity for von Willebrand factor (vWF) could be observed. The results show that variants F8C and F8CG are mainly the disulfide bonded heavy and light chain dimer, while the wild type BDD-FVIII (F8) is domi-

收稿日期: 2019-10-21; 修回日期: 2019-11-06.

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2010CM061); 教育部留学回国人员科研启动基金 (20071108).

*通讯作者 Tel: 86-535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0822

nated by the easily dissociated heavy and light chain dimer. The secretion and activity of F8C was significantly higher than that of F8, while the secretion and activity of F8CG was significantly higher than that of F8C. The vWF binding of the two variants is similar to F8. This indicates that the BDD-FVIII variant F8CG may be attractive molecule for protein replacement and as a transgene in gene-therapy strategies. These findings are encouraging for future studies targeting disulfide bond elimination for further enhancement of FVIII secretion.

Key words: coagulation factor VIII; disulfide bond mutation; gene transfer; secretion

X染色体连锁凝血八因子 (coagulation factor VIII, FVIII) 基因缺陷导致甲型血友病, 在男性人群中发病率为五千分之一, 主要治疗方法为血浆和重组 FVIII 蛋白替代疗法。FVIII 基因由于 mRNA 转录水平低、翻译后加工处理和跨细胞器转运等过程的复杂性, 致分泌量远低于与其具有结构同源性的凝血因子 V^[1]。由于基因重组异源表达 FVIII 水平低, 加之分离、纯化困难, 使得价格高并难以普及使用。虽然基于转基因技术的基因替代疗法有希望根治该病, 但 FVIII 基因的表达和分泌水平低下依然是基因疗法的瓶颈; 而且过大的 FVIII 基因 cDNA 难以被安全有效的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体所承载。研究表明, FVIII 分子内部存在 8 对二硫键, 分别为 A1 区 2 对、A2 区 2 对、A3 区 2 对、C1 区和 C2 区各 1 对。其中位于轻链 A3 区中 Cys¹⁸⁹⁹ 和 Cys¹⁹⁰³ 之间的二硫键的缺失突变不影响 FVIII 功能, 并可提高其分泌性^[2]。删除了位于 FVIII 重链 B 区的缩减版 FVIII, 即 B 区缺失型 FVIII (B domain-deleted FVIII, BDD-FVIII), 具有与野生型 FVIII 相似的生物学活性, 且由于其 mRNA 转录水平显著提高, 在制备基因工程蛋白质应用于临床治疗及基因治疗的研究中均采用 BDD-FVIII。本室双载体转 BDD-FVIII 基因的研究证明, 重链 A2 区 Cys⁶⁶² 和轻链 A3 区 Cys¹⁸²⁸ 突变产生的链间二硫键可促进重、轻链二聚体的形成, 并可促进其分泌^[3]。在此基础上, 本文通过 Met⁶⁶²>Cys 和 Asp¹⁸²⁸>Cys 突变, 构建了可形成链间二硫键的 BDD-FVIII 变构体 F8C, 并将 F8C 的 Cys¹⁸⁹⁹ 和 Cys¹⁹⁰³ 分别突变为 Gly, 构建了消除轻链 A3 区内源性二硫键并引入链间二硫键的 BDD-FVIII 变构体 F8CG。通过探讨两种变构体 BDD-FVIII 转基因表达产物的分泌、活性以及对 vWF (von Willebrand factor, vWF) 结合力的影响, 将为进一步进行动物体内转基因实验奠定基础。

材料与方 法

质粒与细胞系 人 BDD-FVIII 的真核表达质粒 pCMV-F8 由本实验室构建并保存。HEK293 细胞和 COS-7 细胞购自中国科学院细胞库。

主要试剂 Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit、Spin Miniprep Kit 和 HiSpeed Plasmid Midi Kit (德国 Qiagen 公司); QuikChange XL-site directed mutagenesis kit (Stratagene 公司); DMEM、Opti-MEM 培养基和 Lipofectamine 2000 转染试剂盒 (Invitrogen 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 重组人 FVIII 蛋白 (BioChain 公司); FVIII 重链多克隆抗体 H-140 (Santa Cruz 公司); FVIII 轻链单克隆抗体 ESH8 (American Diagnostica 公司); HRP 标记兔抗人 FVIII 多克隆抗体 (Novus 公司); FVIII 缺失的人血浆和正常人血浆 (George King Biomedical 公司); 兔抗人 vWF 多克隆抗体 (A 0082, Dako 公司); FVIII 活性检测的 COATEST SP FVIII 试剂盒 (Chromogenix 公司)。其他试剂均为国产或进口分析纯。

真核重组表达质粒的构建 pCMV-F8 质粒为本室前期在人野生型 VIII (wild-type-VIII, WT-VIII) 基础上构建的缺失 B 区大部分 (Ile⁷⁶¹~Asn¹⁶³⁹) 的 BDD-FVIII 真核表达质粒。以 pCMV-F8 为模板, 用两对引物 (重链 A2 区引入 Met⁶⁶²→Cys 突变的引物为 5'-CCT TCAAACACAAATGCGTCTATGAAGACACACTC-3' 和 5'-GAGTGTGTCTTCATAGACTGCTTTGTGTTTGAAGG-3'; 轻链 A3 区引入 Asp¹⁸²⁸→Cys 突变的引物为 5'-CCCCTAAATGCGAGTTTGACTGCAAAGCC-3' 和 5'-GGCTTTGCAGTCAAACCTCGCATTTAGTGGG-3'), 用 QuikChange XL-site directed mutagenesis kit 制备含 Cys⁶⁶² 和 Cys¹⁸²⁸ 突变的 BDD-FVIII 真核表达质粒 pCMV-F8C; 进一步以质粒 pCMV-F8C 为模板, 用两对引物 (轻链 A3 区引入 Cys¹⁸⁹⁹→Gly 突变的引物为 5'-GGAAAGAAACGGCAGGGCTCCCTGC-3' 和 5'-GCAGGGAGCCCTGCCGTTTCTTTCC-3'; A3 区引入 Cys¹⁹⁰³→Gly 突变的引物为 5'-GCAGGGCTCCCGGC AATATCCAGATGG-3' 和 5'-CCATCTGGATATTGCC GGGAGCCCTGC-3') 将 pCMV-F8C 中 FVIII 轻链 A3 区的 Cys¹⁸⁹⁹ 和 Cys¹⁹⁰³ 突变为 Gly, 得到真核表达质粒 pCMV-F8CG。

HEK293 和 COS-7 细胞的培养及基因转染 HEK293 和 COS-7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液贴壁培养于 5% CO₂、37 °C 培养箱。转染前 1 天

用胰蛋白酶消化分散细胞,按每孔 5×10^5 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Lipofectamine 2000脂质体按试剂盒说明书将pCMV-F8、pCMV-F8C和pCMV-F8CG各6 μg 分别转染HEK293和COS-7细胞。用空载体pcDNA3.1分别转染两种细胞作为阴性对照(Mock)。细胞转染质粒48 h后,收集培养上清和转基因HEK293细胞。

Western blot方法观察转基因细胞的蛋白质表达用冻融法裂解所收集的转基因HEK293细胞,提取细胞总蛋白,用Bradford法进行蛋白质定量,取12 μg 总蛋白上样,分别用还原性(加DTT)和非还原性(不加DTT)SDS-PAGE分离蛋白质,半干电转系统将蛋白质转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,用1:1 000稀释的兔抗人FVIII轻链单抗于37 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇孵育1 h,再用HRP-抗小鼠血清37 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇孵育1 h, ECL plus法曝光X光胶片。

ELISA定量分析分泌至培养上清的FVIII蛋白量 参照本室基于文献^[4]建立的细胞上清中FVIII浓度测定的双夹心ELISA检测法^[5],用FVIII轻链单抗包被酶标板,用HRP标记FVIII多抗作为检测抗体测定转基因细胞分泌至培养上清中的FVIII浓度。用重组人FVIII蛋白作为标准品制作标准曲线。

转基因细胞培养上清中FVIII的生物活性分析用Coatest发色分析法,参照文献^[6],按试剂盒说明书操作分析细胞培养上清中的FVIII凝血生物活性。

FVIII-vWF亲和力测定 FVIII-vWF亲和力测定方法为参照文献^[7]进行。原理为将结合于特异性抗体的vWF与含FVIII的样品反应,之后用FVIII特异性抗体检测结合于vWF的FVIII量,与FVIII标准品(正常人血浆)比较得到FVIII的vWF亲和力。用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释的兔抗人vWF多克隆抗体($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)于4 $^{\circ}\text{C}$ 每孔加100 μL 包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用PBS-0.02% Tween 20洗3次,每孔用200 μL PBS-1% BSA室温封闭1 h,洗3次,每孔加5%正常人血浆(PBS-0.1% BSA稀释)100 μL ,室温孵育1 h,洗3次,加入 CaCl_2 ($400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 100 μL ,室温放置30 min以去除与血浆中vWF结合的FVIII。然后将细胞培养上清样品用PBS-0.1% BSA按1:20稀释,每孔加100 μL ,室温孵育1 h。为探测结合的FVIII,洗板3次后每孔加100 μL 浓度为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的FVIII重链单克隆抗体ESH5,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗3次后加1:5 000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1 h后洗板10次,加反应底物OPD溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min进行显色,用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应,490 nm读板。每个样品平

行3孔。

统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2样本均数比较采用 t 检验;多样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 突变体BDD-FVIII的构建

前期工作通过删除FVIII大部分B区(del Ile⁷⁶¹~Asn¹⁶³⁹)构建了BDD-FVIII(F8),其中保留了B区N端的20个氨基酸残基(Ser⁷⁴¹~Thr⁷⁶⁰)和C端的9个氨基酸残基(Pro¹⁶⁴⁰~Arg¹⁶⁴⁸)。通过点突变将F8的Met⁶⁶²和Asp¹⁸²⁸分别突变为Cys,得到突变体F8C。通过二者之间的二硫键,F8C被凝血酶(IIa)水解活化形成异源三聚体,包括重链A1区、A2区和轻链(A3-C1-C2),其中A2区和轻链A3区之间的二硫键共价连接,可防止A2区在生理条件下快速解离所导致的活化产物不稳定和活性下降。在此基础上,将F8C中A3区的Cys¹⁸⁹⁹和Cys¹⁹⁰³突变为Gly,可破坏二者之间的内源性二硫键,得到F8CG。野生型BDD-FVIII、两种BDD-FVIII变构体及凝血酶活化产物的结构如图1所示。

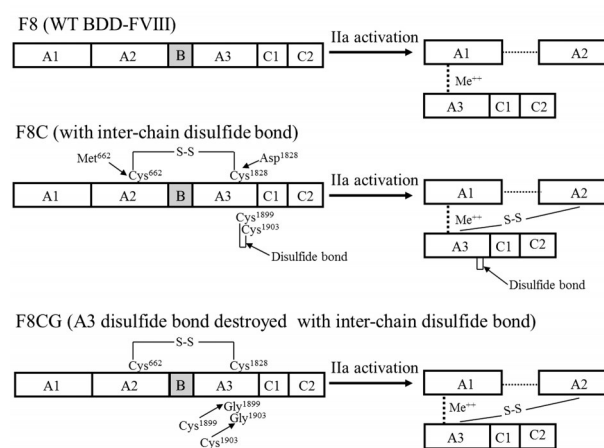


Figure 1 Schematic representation of B domain-deleted FVIII (BDD-FVIII) (F8), F8C, F8CG, and their active forms hydrolyzed by thrombin (IIa). The BDD-FVIII (F8) is generated from FVIII by deleting most of its B-domain from Ile⁷⁶¹-Asn¹⁶³⁹. The F8C is resulting from F8 by Cys mutagenesis of Met⁶⁶² in A2 and Asp¹⁸²⁸ in A3 domain. The F8CG is derived from F8C with Cys¹⁸⁹⁹ and Cys¹⁹⁰³ replaced by Gly in its A3 domain, respectively. WT: Wild-type

2 转基因表达产物检测及其二硫键连接的形成

FVIII轻链特异性单抗检测结果显示(图2),无论还原剂(DTT)存在与否,野生型BDD-FVIII可见细胞内加工产生少量二聚体BDD-FVIII蛋白条带,即离子键相连的重链(heavy chain, HC)和轻链(light chain,

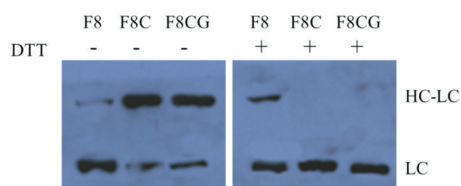


Figure 2 Western blot analysis for expressing products of transgenic HEK293 cells. Plasmids of F8, F8C, and F8CG were transfected into HEK293 cells, respectively. The total cellular proteins were collected at 48 h post-transfection and were separated by SDS-PAGE followed by Western blot. The blot was probed with a monoclonal antibody against human FVIII light chain. The left half is non-reduced samples and the right half is samples reduced with dithiothreitol (DTT). HC: Heavy chain; LC: Light chain

LC) 二聚体 (HC-LC) 以及大量脱落的 LC 多肽, 说明 HC-LC 二聚体易于解聚。而含有 Met⁶⁶²>Cys/Asp¹⁸²⁸>Cys 突变的 BDD-FVIII 变构体 F8C, 以及含有 Met⁶⁶²>Cys/Asp¹⁸²⁸>Cys 突变和 Cys¹⁸⁹⁹>Gly/Cys¹⁹⁰³>Gly 突变的 F8CG, 在非还原条件下 (不加 DTT) 主要以二聚体形式存在, 只有少量未二聚体化的 LC; 加 DTT 还原条件下二聚体形式消失, 表现为明显增多的解聚 LC, 表明 F8C 和 F8CG 两种 BDD-FVIII 变构体在细胞内加工后, 可形成链间二硫键共价结合的二聚体, 提示突变后的 Cys⁶⁶² 和 Cys¹⁸²⁸ 残基之间二硫键形成的高效性。

3 转基因细胞表达蛋白的分泌水平研究

随后, 进行了在 HC-LC 间二硫键交联突变体基础上的 A3 区内源性二硫键缺失突变对异源表达 FVIII 分泌活性的影响的研究。结果显示, HEK293 和 COS-7 两种转基因细胞上清中, 二硫键缺失变构体 FVIII (F8CG) 的分泌量分别为 (331 ± 41) 和 (348 ± 47) ng·mL⁻¹, 明显高于二硫键交联变构体 FVIII (F8C) 的分泌量, 即 (183 ± 29) 和 (199 ± 26) ng·mL⁻¹。野生型 BDD-FVIII (F8) 的 HEK293 和 COS-7 两种转基因细胞的分泌量分别为 (96 ± 31) 和 (104 ± 32) ng·mL⁻¹。两种变构体的分泌量均明显高于野生型, 表明轻链分子内二硫键的缺失可显著促进 FVIII 的分泌 (图 3)。

4 转基因细胞表达分泌产物的生物活性研究

转基因细胞培养上清的凝血生物活性结果显示 (图 4), 在 HEK293 和 COS-7 两种转基因细胞上清中, F8CG 活性分别为 (2.29 ± 0.19) 和 (2.47 ± 0.35) U·mL⁻¹, F8C 活性分别为 (1.19 ± 0.21) 和 (1.22 ± 0.25) U·mL⁻¹, 野生型 BDD-FVIII (F8) 活性分别为 (0.69 ± 0.16) 和 (0.75 ± 0.15) U·mL⁻¹。F8CG 活性明显高于 F8C 活性, 两种变构体的活性均明显高于野生型活性。结合蛋白分泌水平实验结果可知, 含有轻链二硫键可抑制 FVIII 分泌, 而缺失突变可通过改善分泌提高变构体 F8CG

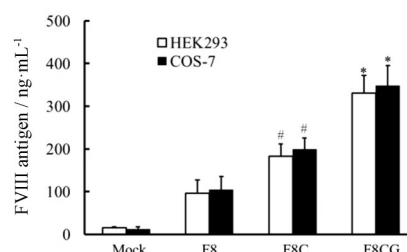


Figure 3 FVIII antigen levels secreted into the culture supernatants of transgenic HEK293 and COS-7 cells. Plasmids of BDD-FVIII (F8), F8C, F8CG, and mock control were transfected into HEK293 and COS-7 cells by Lipofectamine 2000 in triplicate. The amount of FVIII antigen secreted into the culture supernatant at 48 h after transfection was measured by ELISA. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs F8C group; # $P < 0.05$ vs F8 group

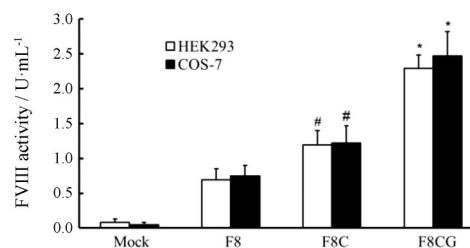


Figure 4 FVIII biological activity of supernatant from transgenic HEK293 and COS-7 cells. Plasmids expressing for BDD-FVIII (F8), F8C, F8CG and Mock control were transfected into HEK293 and COS-7 cells by Lipofectamine 2000 in triplicate. The FVIII activity secreted into the culture supernatant at 48 h after transfection was measured by chromogenic method. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs F8C group; # $P < 0.05$ vs F8 group

的活性。而且, F8CG 被凝血酶水解激活所形成的活化产物异源三聚体中的 A2 区与轻链间共价键相连, 减慢 A2 区解离, 进一步提高 F8CG 活性。

5 突变体 FVIII 的 vWF 结合力研究

vWF 与 FVIII 分子通过非共价结合达到稳定后者的作用, 没有结合 vWF 的 FVIII 半衰期仅有 1~2 h, 与 vWF 结合的 FVIII 半衰期达 12 h, 因此 vWF 对于提高 FVIII 的生物利用度十分重要。转基因细胞培养上清 FVIII-vWF 亲和力检测结果, 以野生型 BDD-FVIII (F8) 转基因表达产物的 vWF 结合力为 100%, F8CG 的 vWF 结合力为 96%~98%, F8C 的 vWF 结合力为 93%~97%, 而阴性对照细胞培养上清 (Mock) 未检测到与 vWF 结合的 FVIII。上述结果表明, FVIII 分子轻链内二硫键的缺失不影响其与 vWF 的结合 (图 5)。

讨论

FVIII 在内源性凝血途径中发挥重要作用。FVIII 基因遗传性缺陷引起的甲型血友病主要依靠血浆和重

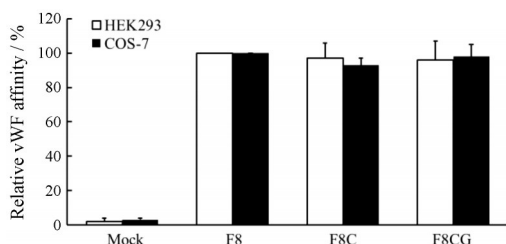


Figure 5 vWF binding capacity of transgene expressed products. The culture supernatants of transgenic HEK293 and COS-7 cells were collected, and the vWF affinity of the expressed F8, F8C, F8CG, and mock was analyzed by ELISA using the wild type F8 as reference (100% vWF binding capacity)

组蛋白输注治疗,需要反复给药,治疗费用高,难以普及。作为单基因病,基因疗法可望成为治愈该病的一个新途径,但FVIII表达和分泌低效以及FVIII基因较大难以AAV载体承载等因素影响疗效。另外,FVIII在血浆中的稳定性有赖于其与vWF结合为复合物而防止被快速降解、细胞摄取和结合于活化血小板/内皮细胞表面,没有与vWF结合的FVIII半衰期将从12 h缩短至1~2 h^[8]。提高FVIII表达和分泌的研究包括去除B结构域、重链点突变和在B结构域氨基端添加N-糖基化修饰位点等。前期通过共转染vWF基因的研究也表明,vWF的增加可促进FVIII分泌^[9]。研究表明,FVIII存在8对分子内二硫键^[10],二硫键通常被认为在维持蛋白质分子空间结构的稳定性和质量控制中具有重要作用。最近对此8个分子内二硫键的系统突变研究揭示,其中7对二硫键的缺失突变导致FVIII的分泌性降低,并会降低其生物学活性。而通过Cys¹⁹⁰³>Gly突变去除A3区的1对二硫键时,则不影响活性且分泌性提高2倍,其可能机制为,Cys¹⁹⁰³的突变可防止巯基与FVIII分子中的其他游离巯基相互作用,进而抑制分泌^[11]。本研究通过在重、轻链间引入二硫键的Cys突变并在双载体培养细胞转FVIII基因表明,轻链可通过与重链间的二硫键连接促进重链分泌^[12]。本文在BDD-FVIII的重、轻链间引入二硫键的同时,构建了链A3区内二硫键缺失变构体F8CG。细胞转基因结果显示,其分泌水平得到显著改善。生理性FVIII在细胞内加工成重链和轻链,以异源二聚体的形式分泌,链间由二价金属离子相连,易于解聚。而变构体F8C和F8CG中的Cys⁶⁶²和Cys¹⁸²⁸间二硫键交联可有效防止二聚体解聚。与重链共价结合的轻链可有效促进二聚体化F8C和F8CG的分泌,这种顺式促分泌作用和基于蛋白质剪接双载体共转重链和轻链基因后与重链肽键结合轻链顺式促进重链分泌的作用类似^[13]。轻链A3区内源性二硫键缺失进一步加强了轻链对变

构体F8CG的促分泌作用。F8CG活性的提高一方面源自其分泌量的增加,另一方面由于被凝血酶水解活化后形成了异源三聚体产物(A1/A2/A3-C1-C2)中A2区和轻链A3区间的二硫键,使A2区解离减慢,从而使活化产物半衰期延长并活性提高,而A2易于自发脱落是FVIII活化产物不稳定且快速失活的主要原因^[14]。

FVIII重链和轻链二聚体分泌后与vWF的结合可保护FVIII免于蛋白水解^[15]。FVIII与vWF结合的部位位于两个区域,即轻链A3区氨基端的酸性区和C2区羧基端的2303~2332位残基。研究表明,其中单独任何一个区域与vWF的结合力均显著低于完整的FVIII二聚体,即两个区域在空间构象上对FVIII结合具有协同作用^[16]。由于F8CG中同时引入了二硫键添加和缺失双重突变,本文进一步检测了F8CG与vWF的亲和力,结果显示其亲和力与野生型F8相近,说明F8CG中的轻链二硫键缺失并不影响其与vWF的结合。变构体F8CG的分泌性和活性得到提高、且具有与vWF的结合力,本研究为后续进一步动物体内活性及药理学实验奠定了基础。

References

- [1] Pittman DD, Tomkinson KN, Kaufman RJ. Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17329-17337.
- [2] Selvaraj SR, Scheller AN, Miao HZ, et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10: 107-115.
- [3] Zhu F, Liu Z, Miao J, et al. Enhanced plasma factor VIII activity in mice *via* cysteine mutation using dual vectors [J]. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 521-526.
- [4] Gnatenko DV, Saenko EL, Jesty J, et al. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adenoassociated virus background: applicability to haemophilia A gene therapy [J]. *Br J Haematol*, 1999, 104: 27-36.
- [5] Zhu F, Liu Z, Chi X, et al. Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: 683-689.
- [6] Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, et al. Biochemical immunological, and *in vivo* functional characterization of B-domain-deleted factor VIII [J]. *Blood*, 1993, 81: 2925-2935.
- [7] De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Chuah MK, et al. Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vectors expressing von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2006, 107: 4728-4736.
- [8] De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. von Willebrand

- factor to the rescue [J]. *Blood*, 2009, 113: 5049-5057.
- [9] Zhu F, Liu Z, Miao J, et al. Propeptide-deleted von Willebrand factor improves heavy chain secretion and bioactivity by split FVIII gene Co-transfected cells [J]. *J Chin Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2012, 32: 20-25.
- [10] McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW, et al. Locations of disulfide bonds and free cysteines in the heavy and light chains of recombinant human factor VIII (antihemophilic factor A) [J]. *Protein Sci*, 1995, 4: 740-746.
- [11] Selvaraj SR, Scheller AN, Miao HZ, et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10: 107-115.
- [12] Zhu F, Yang S, Liu Z, et al. Disulfide cross-linking enhances dual-vector based delivery of Split B-domain-deleted coagulation Factor VIII gene [J]. *Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展)*, 2012, 39: 181-187.
- [13] Chen L, Zhu F, Li J, et al. The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 1856-1862.
- [14] Fay PJ, Beattie TL, Regan LM, et al. Model for the factor VIIIa-dependent decay of the intrinsic factor Xase. Role of subunit dissociation and factor IXa-catalyzed proteolysis [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 6027-6032.
- [15] Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease [J]. *J Clin Invest*, 1977, 60: 390-404.
- [16] Saenko EL, Scandella D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 18007-18014.