

مجله علوم پزشکی مدرس  
دوره ۱۲، شماره ۱: از ۹-۱  
بهار ۱۳۸۸

## کلونینگ و بیان دومن دوم گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی – یک (VEGFR-1) در اثر شیاکلی و بررسی اثر مهارى آن بر رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف انسانی

داود احمدوند<sup>۱</sup>، فاطمه رهبری زاده<sup>۲\*</sup>، بیتا گرامی زاده<sup>۳</sup>، رحیم احمدوند<sup>۴</sup>، محمدحسین کریمی<sup>۵</sup>،  
حسن اکرمی<sup>۶</sup>، پدیده عبادی<sup>۶</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، مرکز تحقیقات پیوند، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۴- مربی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران
- ۵- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
- ۶- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۲/۲۹

دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۲۰

### چکیده

**هدف:** رگ‌زایی یا تشکیل رگ‌های خونی جدید در رشد تومور و در متاستاز آن ضروری است. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و گیرنده‌های آن نقش مهمی در "رگ‌زایی وابسته به تومور" دارند و مطالعات اخیر نشان داده‌اند که دومن دوم از گیرنده یک VEGF (VEGFR-1)، یک فاکتور کلیدی برای برهم‌کنش VEGF و VEGFR-1 است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق بعد از تخلیص RNA و ساخت cDNA، دومن دوم VEGFR-1 (VEGFR-1-II) با PCR تکثیر و در ناقل T/A کلون شد. در مرحله بعد به‌منظور افزایش بیان پروتئین نوترکیب، ژن آن در پلاسمید pET22b<sup>(+)</sup> ساب‌کلون شده و در پایان ناقل به سوش باکتری مناسب بیان (Rosetta-gami 2) منتقل شد. پس از القا به‌وسیله IPTG پروتئین نوترکیب بیان شد و به‌وسیله SDS-PAGE و وسترن بلائینگ تأیید شد. سپس پروتئین نوترکیب VEGFR-1-II با کمک ستون نیکل تخلیص شده و مهار رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف انسانی (HUVEC) در حضور پروتئین نوترکیب VEGFR-1-II بررسی شد. **نتایج:** نتایج حاصل از SDS-PAGE و بلائینگ تأییدکننده موفقیت در تخلیص پروتئین نوترکیب است. میزان پروتئین خالص شده از هر لیتر کشت، با آزمون برادفورد حدود ۳۰۰ میکروگرم محاسبه شد. مهار رشد سلول‌های HUVEC با این پروتئین نوترکیب، نشان‌دهنده عملکرد رقابتی آن با VEGFR-1 در اتصال به VEGF است. **نتیجه‌گیری:** چون این پروتئین نوترکیب در شرایط آزمایشگاهی خاصیت مهار رشد سلول‌های اندوتلیالی را دارد؛ می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهارکننده رگ‌زایی در نظر گرفته شود.

**کلیدواژگان:** دومن دوم VEGFR-1، مهار رگ‌زایی، سلول‌های اندوتلیال، HUVEC

\*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

## ۱- مقدمه

رگ‌زایی یک فرایند چند مرحله‌ای است که شامل مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و سازمان‌یابی توده‌های سلولی به شکل ساختارهای لوله، اتصال ساختارهای لوله‌ای به همدیگر و در نهایت بلوغ و تشکیل عروق پایدار است [۱، ۲]. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی است. خانواده فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی شامل هفت گلیکوپروتئین ترشحی به نام‌های VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C، VEGF-D، VEGF-E، VEGF-F و فاکتور رشد جفتی (Placenta Growth Factor: PlGF) است [۳-۶]. این فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی عمل زیستی خود را روی سلول‌های هدف از طریق میان‌کنش با گیرنده‌های تیروزین کینازی موجود در غشای پلاسمایی سلول به انجام می‌رسانند. این گیرنده‌ها پس از اتصال به لیگاند خود به صورت دایمر در آمده و اتوفسفریله می‌شوند که در نهایت این موارد خود منجر به ایجاد وقایع آبشاری درون سلولی می‌شود. تاکنون گیرنده‌های تیروزین کینازی که در ارتباط با فاکتورهای رشد مذکور شناخته شده‌اند شامل VEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1)، VEGFR-2، VEGFR-3 و نوروپیلین‌ها (Neuropilins: NRPs) (NRP-1، NRP-2) هستند [۱، ۷]. VEGF-A فاکتور اصلی در فرایند رگ‌زایی است و اثر خود را از طریق فعال کردن سه گیرنده (Flt-1) VEGFR-1 و (KDR) VEGFR-2 به انجام می‌رساند [۸]. تمایل VEGFR-1 برای اتصال به VEGF-A نسبت به سایر گیرنده‌ها بسیار بیشتر است و فعالیت تیروزین کینازی آن بسیار کمتر و بی‌اهمیت است. حال آن‌که VEGFR-2 دارای فعالیت تیروزین کینازی زیادی است. این دو گیرنده از طریق مکانیسم‌های مولکولی مجزا، نقش‌های متفاوتی را در فرایند

رگ‌زایی ایفا می‌کنند [۹]. VEGFR-1 در انسان از ۱۳۳۸ اسیدآمینو تشکیل شده است و ساختمان پروتئینی آن‌ها را می‌توان به چهار بخش یعنی، دومن خارج سلولی متصل‌شونده به لیگاند، دومن گذرنده از غشا، دومن تیروزین کینازی، و ناحیه انتهای کربوکسیلی تقسیم نمود [۱۰]. سه گیرنده VEGFR-1، VEGFR-2 و VEGFR-3 از نظر ساختار کلی بسیار شبیه به یکدیگر هستند [۱۱]. دومن خارج سلولی هر سه گیرنده مذکور خود از هفت دومن شبه ایمنوگلوبولینی (Ig-like) تشکیل شده است. جایگاه اتصال VEGFR-1 به VEGF-A در دومن شبه ایمنوگلوبولینی آن واقع شده است [۱۲]. با توجه به اهمیت رگ‌زایی در پیشرفت برخی بیماری‌ها از جمله سرطان، رتینوپاتی دیابتی (Diabetic retinopathy) و آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis)، تولید فاکتوری که بتواند باعث مهار رگ‌زایی در این شرایط آسیب‌شناختی شود، امری ضروری به نظر می‌رسد [۱۳، ۱۴]. از آنجایی که فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رگ‌زایی هستند، بنابراین برای رسیدن به هدف فوق باید به این فاکتورها توجه نمود. بررسی‌های اخیر نشان می‌دهند که فرم محلول VEGFR-1 (soluble VEGFR-1: sVEGFR-1) احتمالاً به‌عنوان مهارکننده طبیعی رگ‌زایی محسوب می‌شود [۱۵]. بررسی رگ‌زایی نیازمند مدل‌هایی است تا بتوان در محیط آزمایشگاهی (In vitro) اثر ترکیبات القاکننده و مهارکننده را ارزیابی کرد. در این تحقیق با هدف بررسی آثار القایی و مهارتی دومین‌های مختلف مولکول VEGFR-1 در رگ‌زایی، کلونینگ، بیان و تخلیص قطعات مذکور انجام شده است. در این گزارش مهم‌ترین دومن خارج سلولی VEGFR-1 یعنی دومن دوم آن در ناقل بیانی pET-22b<sup>(+)</sup> کلون و بیان شده و سپس پروتئین نوترکیب تولید شده تخلیص شد و این پروتئین به محیط کشت سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC)

(TG1) ترانسفورم شد و در محیط کشت LB Agar (Luria-Bertani) حاوی آمپی سیلین غربال شدند. از طریق هضم آنزیمی و Colony-PCR و تعیین توالی ژنی سازه نو ترکیب شناسایی شد.

### ۳-۲- ساب کلونینگ در ناقل بیانی pET22b<sup>(+)</sup>

به منظور ساب کلونینگ قطعه ژنی مورد نظر از ناقل T/A به داخل ناقل بیانی pET22b<sup>(+)</sup> و با توجه به وجود کدون آغاز در آغازگر فرادست، دو آنزیم برشی محدودالتر در دو طرف منطقه درج در ناقل T/A انتخاب شد. آنزیم آغازگر فرودست باید قطعه درجی را در چارچوب His-tag وارد نماید. در این تحقیق سازه نو ترکیب T/A-VEGFR-1-II و نیز ناقل pET22b<sup>(+)</sup> با آنزیم های برشی محدودالتر *BamHI* و *SacI* هضم شدند و سازه بیانی پروکاریوتی pET22b<sup>(+)</sup>-VEGFR-1-II با اتصال قطعه ژنی VEGFR-1-II به ناقل بیانی pET22b<sup>(+)</sup> ساخته شد. انتقال به باکتری با استفاده از محصول اتصال انجام شد و انتخاب به وسیله کشت سلول های ترانسفورم در محیط کشت LB Agar حاوی آمپی سیلین انجام گرفت. سپس با Colony-PCR کلون های حاوی قطعه مطلوب انتخاب شد. پلاسمید این کلون ها تخلیص و ورود قطعه به داخل پلاسمید به وسیله هضم آنزیمی با آنزیم های *BamHI* و *SacI* تأیید شد و سپس توالی سازه نو ترکیب تعیین شد. پلاسمید تخلیص شده از کلون های انتخابی به داخل باکتری اشرشیاکلی (Rosetta-gami 2) ترانسفورم شد.

### ۴-۲- تأیید بیان پروتئین نو ترکیب

بیان VEGFR-1-II نو ترکیب در اشرشیاکلی (Rosetta-gami 2) با غلظت های متفاوت IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1 thio galactopyranoside) القا شد. بیان به وسیله SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) و وسترن بلاتینگ (Western Blotting) تأیید شد [۱۶].

اضافه شد تا اثر مهارى آن بر رشد و تکثیر این سلول ها بررسی شود.

## ۲- مواد و روش ها

### ۱-۲- کشت سلول HUVEC و استخراج RNA نام

رده سلولی HUVEC در محیط کشت سلولی DMEM و Hams-F12 (به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط شده بودند) و غلظت ۲۰ درصد از FBS (Fetal Bovine Serum) (عصاره جنینی گاو) به مدت ۲ هفته در ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. سلول ها بعد از کندن از کف با کمک پاروی سلولی، جمع آوری شدند و سپس RNA تام آن به وسیله کیت Nucleo Trap RNA (MN، آلمان) تخلیص شد.

### ۲-۲- سنتز cDNA و تکثیر با PCR و کلونینگ

بعد از تخلیص RNA تام، با استفاده از آغازگرهای (Primers) الیگو dT و ترانس کریپتاز معکوس M-MuLV (MBI-Fermentas، آلمان)، cDNA ساخته شد. سپس با استفاده از الگوی cDNA قطعه ژن کدکننده دومن دوم شبه ایمنوگلوبولینی خارج سلولی VEGFR-1 (اسید آمینه ۲۱۵-۳۲۸) با استفاده از آغازگرهای V1 جلوئی (Forward) (5'-GAATGTGCAATCTATATATTTATTAG-3') و V1 برگشتی (Reverse) (5'-TATGATTGTATTGGTTTGTCTG-3') تکثیر شد. شرایط واکنش به شرح زیر بود: مرحله اول ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه) و مرحله سوم یا مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

بعد از تخلیص محصول PCR، قطعه ژنی به وسیله DNA Ligase T4 (MBI-Fermentas، آلمان) به ناقل کلونینگ T/A (MBI-Fermentas، آلمان) متصل شد. محصولات واکنش اتصال به داخل باکتری اشرشیاکلی (*E. coli*)

(Ethylenediamineteraacetic acid)، ۱۵ میلی مول از کف جدا کرده و دو بار با (Phosphate Buffered Saline) PBS سرد شستشو داده شد. در مرحله بعدی به این سلول‌ها محیط کشت اضافه شد. از این سوسپانسیون ۵۰۰۰ سلول در هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه توزیع شد. تعداد ۱۲ چاهک برای هریک از موارد شامل پروتئین نوترکیب VEGFR-1-II و یک مورد پروتئین نوترکیب بی‌تأثیر به‌عنوان کنترل منفی (یک مولکول نانوبادی علیه MUC1) در نظر گرفته شد که در هر دو مورد، ۳ چاهک برای هر کدام از غلظت‌های صفر (به‌عنوان چاهک کنترل)، ۰/۰۲، ۰/۰۵۰ و ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر در نظر گرفته شد. کشت در شرایط فوق تا وقتی که سلول‌ها به میزان ۵۰ تا ۶۰ درصد کف چاهک‌ها را پر کنند، ادامه داده شد. در روز صفر مقادیر فوق از پروتئین‌های پروتئین نوترکیب VEGFR-1-II و پروتئین کنترل منفی، به چاهک‌ها اضافه شد.

به‌منظور تأیید اختصاصیت عملکرد VEGFR-1-II نوترکیب، از محلول VEGF (Miltenyi biotec Inc. آمریکا) استفاده شد. در این آزمون قبل از اضافه کردن VEGFR-1-II نوترکیب به چاهک‌های کشت، ۰/۰۷۵ میکروگرم در میلی لیتر VEGF با ۰/۰۵ میکروگرم در میلی لیتر VEGFR-1-II نوترکیب و ۰/۰۷۵ میکروگرم در میلی لیتر VEGF با ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر VEGFR-1-II نوترکیب در لوله‌های مجزا مخلوط و ۳۰ دقیقه انکوبه و مخلوط حاصل روزانه به محیط کشت سلولی اضافه شد. هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض محیط کشت با محیط حاوی پروتئین نوترکیب انجام شد. بعد از ۷۲ ساعت سلول‌های موجود در هر چاهک به‌طور کامل از کف جدا و با رنگ‌آمیزی حیاتی به کمک تریپان بلو (Trypan blue) رنگ‌آمیزی، شمارش و با استفاده از فرمول زیر درصد مهار محاسبه شد [۱۷]:

افزایش تعداد سلول‌ها در چاهک تیمار] - ۱۰۰ = درصد  
 [۱۰۰ × (افزایش تعداد سلول‌ها در چاهک بدون تیمار  
 آزمون فوق سه بار تکرار شد.

SDS-PAGE با ژل آکریل آمید ۱۲ درصد به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس به‌منظور آزمون بلاتینگ، باندهای پروتئینی بر روی کاغذ نیتروسلولز انتقال داده شد. در مرحله بعد با انکوباسیون کاغذ در محلول آنتی‌بادی علیه His-tag و متصل به HRP (Horseradish Peroxidase)، به مدت ۱ ساعت و سپس شستشوی کامل و در نهایت افزودن سوبسترای DAB (3'-Diaminobenzidine)، پروتئین نوترکیب مورد نظر ردیابی شد.

## ۲-۵- تخلیص پروتئین نوترکیب VEGFR-1-II

### با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل

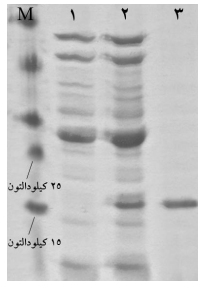
بعد از پاره کردن غشای سلولی با امواج فراصوت (Sonication) در سرما (۴ درجه سلسیوس) و در حضور آنتی‌پروتئیناز فنیل متیل سولفونیل کلراید (Phenylmethylsulphonyl fluoride: PMSF) باقی‌مانده سلولی با سانتریفوژ در سرما (دمای یخچالی) با دور ۱۲۰۰۰ و مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد. سپس تخلیص از عصاره سلولی با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل (QIAGEN، آلمان) و طبق روش کار پیشنهادی شرکت تولیدکننده انجام گرفت. در این فرایند باند پروتئین مورد نظر، به‌وسیله ایمیدازول (با غلظت ۲۵۰-۴۰۰ میلی مولار)، از ستون خارج شد. در پایان، فرایند تخلیص با SDS-PAGE و سترن بلاتینگ تأیید و میزان محصول به‌دست آمده با روش برادفورد (Bradford) سنجیده شد.

## ۲-۶- آزمون بررسی اثر مهار رشد بر

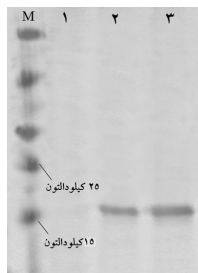
### سلول‌های HUVEC

سلول‌های HUVEC در محیط کشت مناسب و در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. در مرحله رشد لگاریتمی (میزان زنده بودن سلول‌ها ۹۹ درصد) سلول‌ها را با کمک EDTA

شد. بهترین بیان در غلظت ۱ میلی-مولار و دمای ۳۷ درجه به مدت ۶ تا ۸ ساعت به دست آمد. بیان به وسیله SDS-PAGE و بلاتینگ تأیید شد (شکل‌های ۲ و ۳) و تعیین مقدار پروتئین با آزمون برادفورد نشان می‌دهد که بعد از تخلیص حدود ۳۰۰ میکروگرم در لیتر پروتئین نوترکیب تولید شده است.



شکل ۲ نتایج SDS-PAGE در ژل ۱۲ درصد و رنگ‌آمیزی با کوماسی بریلینت بلو (Coomassie brilliant blue)، ستون ۱) عصاره سلول اشرشیاکلی بدون سازه؛ ستون ۲) عصاره سلول اشرشیاکلی حاوی سازه که بعد بیان باند حدود ۱۵ کیلوالتون دارد؛ ستون ۳) پروتئین تخلیص شده؛ ستون M) اندازه نشانگر پروتئینی که باندهای ۱۵ و ۲۵ در آن مشخص شده است.



شکل ۳ نتایج وسترن بلاتینگ که با آنتی‌بادی علیه C-myc ردیابی شده است، ستون ۱) عصاره سلول اشرشیاکلی بدون سازه؛ ستون ۲) عصاره سلول اشرشیاکلی حاوی سازه که باند حدود ۱۵ کیلوالتون دارد؛ ستون ۳) پروتئین تخلیص شده؛ ستون M) پروتئین اندازه نشانگر

### ۳-۳- آزمون بررسی اثر مهار رشد بر

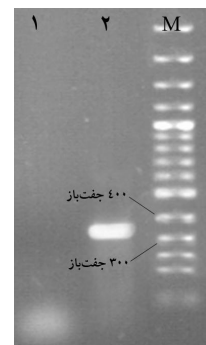
#### سلول‌های HUVEC

با افزودن VEGFR-1-II نوترکیب به محیط کشت سلول‌های HUVEC، به علت اتصال VEGF موجود در محیط به VEGFR-1-II این مولکول‌ها مانع اتصال VEGF ها به VEGFR موجود در سطح سلول شده و در نتیجه مانع از

### ۳- نتایج

#### ۳-۱- نتایج کلونینگ و ساب کلونینگ

بعد از استخراج RNA از رده سلولی HUVEC غلظت آن به وسیله اسپکتروفتومتر تعیین مقدار شد و سپس cDNA به وسیله آنزیم M-MuLV ساخته شد. نتیجه RT-PCR به وسیله آغازگرهای اختصاصی در شکل ۱ نشان داده شده است که بر وجود قطعه تکثیر شده در حدود ۳۳۰ جفت‌باز دلالت دارد. محصول درج ژن در ناقل T/A را به داخل باکتری TG1 ترانسفورم شد که از ۳۰ کلونی که به وسیله Colony-PCR چک شد، ۲۷ مورد آن‌ها قطعه مورد نظر را داشتند و برای تأیید بیشتر پلاسمید تخلیص شده از یکی از کلون‌های مثبت با هضم با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I و خارج شدن مجدد قطعه درج شده از سازه، تأیید شد و تعیین توالی نیز نتایج را تأیید کرد. سپس محصول هضم با *Bam*HI و *Sac*I بعد از تخلیص از ژل به داخل pET22b<sup>(+)</sup> که با *Bam*HI و *Sac*I هضم شده بود، کلون شد. تعیین توالی سازه نوترکیب را تأیید کرد.



شکل ۱ نتایج PCR، ستون ۱) کنترل منفی؛ ستون ۲) محصول PCR حاوی باند DNA در منطقه حدود ۳۳۰ جفت‌باز؛ ستون M) DNA اندازه نشانگر (۱۰۰-۳۰۰۰) باندهای ۳۰۰ و ۴۰۰ که محدوده مورد نظر است مشخص شده است.

#### ۳-۲- بیان و تخلیص VEGFR-1

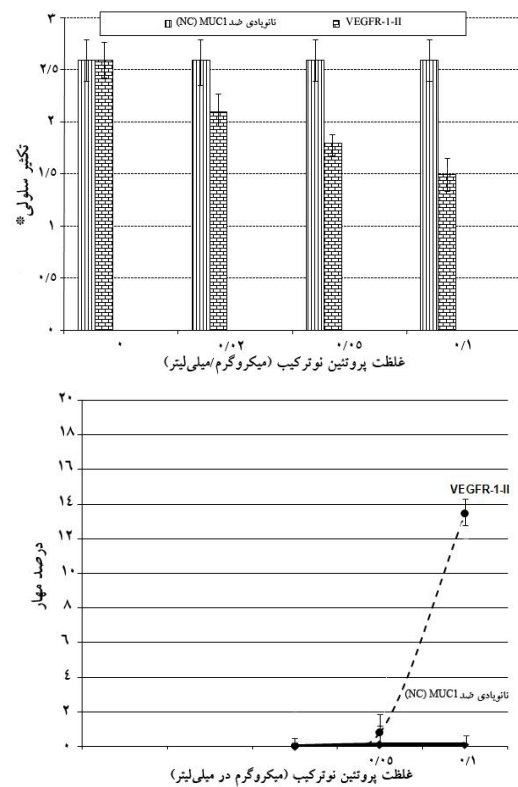
به منظور القای بیان VEGFR-1، به کشت باکتری Rosetta-gami2 ترانسفورم غلظت‌های متفاوت IPTG اضافه

#### ۴- بحث

شکل گیری عروق خونی جدید از مویرگ‌های پیشین یا رگ‌زایی، اهمیت کلیدی در طیف وسیعی از فرایندهای آسیب‌شناسی و فیزیولوژیک دارد. در هنگام رشد بافت طبیعی، مانند حالتی که در تکوین و تکامل جنین و التیام زخم وجود دارد، تشکیل عروق جدید به منظور تأمین اکسیژن و مواد مغذی و همین‌طور حذف مواد زائد انجام می‌شود [۱۸]. بنابراین فرایند رگ‌زایی نه تنها یک روند زیست‌شناختی مهم در شرایط فیزیولوژیک است، بلکه در انواعی از بیماری‌ها از جمله سرطان، رتینوپاتی دیابتی و آرتریت روماتوئید رگ‌زایی شدید جزئی از آسیب‌شناسی بوده و حائز اهمیت است [۱۳، ۱۹]. بیش از یک دهه است که نقش فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در تنظیم رگ‌زایی مطالعه شده است. تنظیم دقیق رگ‌زایی از طریق برقراری تعادل صحیح بین فاکتورهای محرک رگ‌زایی و مهارکننده‌های آن صورت می‌گیرد. با توجه به تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر، VEGFR-1 به‌خاطر داشتن ناحیه خارج سلولی که با تمایل بالا به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی متصل می‌شود (Kd آن تقریباً برابر با ۲-۱۰ پیکومولار است)، ممکن است به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی رگ‌زایی در مراحل اولیه جنینی عمل نماید. بنابراین به علت خاصیت تیروزین کینازی ضعیفی که دارد، نقش اندکی در بروز اثر زیست‌شناختی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی VEGF-A ایفا می‌نماید [۲، ۳].

یک خصوصیت مهم دیگر VEGFR-1 این است که ژن بیان‌کننده آن نه تنها یک mRNA کامل را کد می‌کند، بلکه همان ژن مسئول تولید یک mRNA کوتاه‌تری است که شکل محلول پروتئین VEGFR-1 را تولید می‌کند. شکل محلول فقط دارای دامن‌های خارج سلولی است و ممکن است مهارکننده طبیعی VEGF-A باشد [۲۰، ۲۱]. این ویژگی منحصر به فرد VEGFR-1، این مسئله را پیشنهاد می‌کند که ممکن است این گیرنده از طریق دامن‌های متصل‌شونده به لیگاند خود به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در رگ‌زایی عمل

فعال شدن مسیر سیگنالینگ VEGF/VEGFR-1 و در نتیجه تکثیر سلولی مهار می‌شود. شکل ۴ اثرهای مهارتی VEGFR-1-II را نشان می‌دهند. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت VEGFR-1-II مهار افزایش می‌یابد و بالاترین مهار مربوط به بیشترین غلظت یعنی ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر است. نتایج انکوآسیون VEGFR-1-II و VEGF با هم و قبل از افزودن به سلول‌ها نشان می‌دهد که وقتی غلظت مولی VEGFR-1-II و VEGF برابر انتخاب شود، مهار رشد سلول‌ها به‌وسیله VEGFR-1-II انجام نمی‌شود و در غلظت دو برابر از VEGFR-1-II نسبت به VEGF حدود ۱۳ درصد مهار رشد سلولی مشهود است. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود اختصاصیت عمل مولکول نوترکیب در اتصال به لیگاند خود و نیز در عملکرد اختصاصی در مهار رشد سلولی تأیید شده است.



شکل ۴ الف) نتایج بررسی اثر VEGFR-1-II بر رشد سلول‌های HUVEC (ب) نتایج میزان درصد مهار رشد سلول‌های HUVEC در تیمار با مخلوط انکوآسیون شده VEGF و VEGFR-1-II (\* تعداد سلول  $\times 10000$ )

که دارای کدون‌های نادر (کدون‌های یوکاریوتی که در باکتری‌ها استفاده نمی‌شود، چون برای آن‌ها tRNA وجود ندارد یا بسیار کم است) است، ولی مقدار تولید خالص نهایی از پروتئین نوترکیب کم بود که احتمالاً تنها راه حل این مشکل سنتز توالی به شکل مصنوعی و جایگزین کردن کدون‌های نادر با کدون‌های متداول باکتریایی باشد. اما در بررسی عملکرد پروتئین نوترکیب خوشبختانه مولکول تخلیص شده ما قابلیت مناسبی در مهار رشد سلول‌های عروقی و در نتیجه قابلیت بالقوه در مهار رگ‌زایی داشت.

با توجه به نتایج جستجو در بانک‌های اطلاعاتی Pubmed و Sciencedirect، در تحقیق حاضر برای اولین بار قابلیت دومن دوم VEGFR-1 در مهار رشد سلول‌های عروقی و نیز رقابت در اتصال به VEGF آزاد در محیط کشت و ممانعت در رشد سلول‌های عروقی مطالعه و گزارش شده است. محصول نهایی این کار تحقیقاتی می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهار رگ‌زایی و در درمان بیماری‌هایی که به علت رگ‌زایی‌های ناخواسته و آسیب‌شناختی ایجاد می‌شوند مورد استفاده باشد و از طرفی تولید عوامل بلوکه‌کننده‌ای مثل آنتی‌بادی علیه مولکول نوترکیب VEGFR-1-II در تحقیقات رگ‌زایی جایگاه ویژه‌ای دارد که در آن مورد نیز محصول تحقیق حاضر قابل استفاده خواهد بود.

## ۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق طرح مصوب مرکز تحقیقات پیوند (دانشگاه علوم پزشکی شیراز) در سال ۱۳۸۷ می‌باشد و با حمایت مالی آن مرکز به انجام رسیده است. نویسندگان لازم می‌دانند که از حمایت مالی مرکز تحقیقات پیوند شیراز، تشکر و قدردانی نمایند.

نماید و در عین حال از طریق خاصیت تیروزین کینازیش، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت در رگ‌زایی نیز باشد [۹].

فونگ (Fong) و همکارانش در سال ۱۹۹۵ گزارش دادند که موش‌های جهش یافته فاقد VEGFR-1 در یکی از مراحل جنینی خود به علت رشد بیش از حد عروق و عدم سازمان‌دهی مناسب آن‌ها می‌میرند. براساس این یافته می‌توان گفت که به احتمال زیاد VEGFR-1 به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی رگ‌زایی در دوران جنینی عمل می‌کند [۲۲]. همچنین هیراتسوکا (Hiratsuka) و همکارانش در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که موش‌هایی که دومن تیروزین کینازیش مربوط به VEGFR-1 در آن‌ها عمداً حذف شده است، دارای سلامت کامل بوده و غالباً دارای سیستم عروقی طبیعی هستند [۲۳]. نتایج فوق آشکارا نشان می‌دهند که دومن خارج سلولی متصل‌شونده به لیگاند VEGFR-1، به‌همراه بخش داخلی غشایی آن، به تنهایی برای اعمال اثر این گیرنده در عملکرد این مولکول در مراحل اولیه جنینی کافی‌اند. اخیراً چندین گروه تحقیقاتی مجزا احتمال دخالت رگ‌زایی غیرطبیعی را در پیشرفت آتروسکلروز (Atherosclerosis) شرح داده‌اند. از میان این فاکتورهای رگ‌زایی، از VEGF (به‌ویژه VEGF-A) به‌عنوان فاکتور اصلی دخیل در این مورد یاد شده است، چرا که درمان موش‌های آزمایشگاهی مبتلا به آترواسکلروز با فرم محلول VEGFR-1 منجر به مهار پیشرفت بیماری می‌شود [۲۴-۲۶].

در این تحقیق کلونینگ در ناقل بیانی و سپس تولید و تخلیص دومن دوم مولکول VEGFR-1-II انجام شد. گرچه اندازه این مولکول کوچک است و ناقل بیانی مورد استفاده قابلیت تولید بالایی دارد و غلظت‌های متفاوت IPTG آزموده شد و با وجود استفاده از میزبان اشرشیاکلی (Rosetta-gami2)

## ۶- منابع

[1] Risau W. Mechanism of angiogenesis. Nature 1997; 386(6626): 671-4.

[2] Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat Rev Cancer 2002;

- 2(10): 795-803.
- [3] Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J* 2005; 81(954): 236-42.
- [4] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.
- [5] Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5(12): 1806-14.
- [6] Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem* 2005; 280(3): 2126-31.
- [7] Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood cells Mol Dis* 2007; 38(3): 258-68.
- [8] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312(5): 549-60.
- [9] Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39(5): 469-78.
- [10] Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(20): 9026-30.
- [11] Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002; 1(3): 219-27.
- [12] Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1996; 271(10): 5638-46.
- [13] Kuemmel S, Thomas A, Landt S, Fuger A, Schmid P, Kriner M, Blohmer JU, Sehoul J, Schaller G, Lichtenegger W, Köninger A, Fuchs I. Circulating vascular endothelial growth factors and their soluble receptors in pre-invasive, invasive and recurrent cervical cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(2): 641-5.
- [14] Rahimi N, Golde TE, Meyer RD. Identification of ligand-induced proteolytic cleavage and ectodomain shedding of VEGFR-1/FLT1 in leukemic cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69(6): 2607-14.
- [15] Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 1996; 7(2): 213-21.
- [16] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.



- [17] Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol* 2004; 85(5): 233-48.
- [18] Kanazawa S, Endo H, Shioya N. Improved in vitro angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type III collagen. *Ann Plast Surg* 1993; 30(3):244-51.
- [19] Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 2003; 49(1): 32-40.
- [20] Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(22): 10705-9.
- [21] Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 5(4): 519-24.
- [22] Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376(6535): 66-70.
- [23] Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(16): 9349-54.
- [24] Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Comperolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002; 8(8): 831-40.
- [25] Zhao Q, Egashira K, Hiasa K, Ishibashi M, Inoue S, Ohtani K, Tan C, Shibuya M, Takeshita A, Sunagawa K. Essential role of vascular endothelial growth factor and Flt-1 signals in neointimal formation after periadventitial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(12): 2284-9.
- [26] Ohtani K, Egashira K, Hiasa K, Zhao Q, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Yonemitsu Y, Sueishi K, Sata M, Shibuya M, Sunagawa K. Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibiting recruitment of monocyte lineage cells. *Circulation* 2004; 110(16): 2444-52.