

## **Evaluation of anticancer peptide VEGF111b secretion in HEK293 human cells**

**Sadeghi M<sup>1\*</sup>, Hojati Z<sup>2</sup>**

1- Human Genetic Research Center, Baqiyatallah Medical Sciences University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I. R. Iran.

Received March 14, 2016; Accepted November 21, 2016

### **Abstract:**

**Background:** VEGF111b is a new isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF) recently considered as a new anticancer drug. The aim of this study was to evaluate the VEGF111b secretion from HEK293 cell wall in order to commercial production of this recombinant factor.

**Materials and Methods:** After the design of VEGF111b sequence using OLIGO software and NCBI gene bank data, it was cloned into the pBUD.cE4.1 vector. The pBUD.VEGF111b recombinant vector was transfected into HEK293 cells using lipofectamine kit. Forty-eight hours after the transfection the production of VEGF111b was estimated by Western blotting and Human anti VEGF antibody. The VEGF111b secretion into cell culture and cell lysate extract was measured using ELISA.

**Results:** The correct cloning of VEGF111b into pBUD.cE4.1vector was confirmed using enzymatic digestion and gel electrophoresis. The observed production of recombinant peptide in HEK293 was confirmed with 12KDa band in cell lysate extract of Western blotting. The ELISA results at 450 nanometer absorbance for cell culture media and cell lysate extract were  $19.20 \pm 2.81$  pg/ml and  $32.87 \pm 7.42$  pg/ml, respectively. However, no VEGF111b expression was observed in negative controls.

**Conclusion:** The findings of this study indicate the powerful ability of transformation and secretion of VEGF111b from HEK293 cell wall to cell culture media with no breaking and proteolytic digestion. It seems that the commercial production and purification of this therapeutic peptide from HEK293 cell culture would be possible with high efficiency.

**Keywords:** Vascular Endothelial Growth Factor A, Secretion, HEK293

### **\* Corresponding Author.**

**Email:** ms.sadeghi@yahoo.com

**Tel:** 0098 212 640 3292

**Fax:** 0098 218 893 0684

**Conflict of Interests:** *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2017; Vol. 21, No 1, Pages 28-34*

**Please cite this article as:** Sadeghi M, Hojati Z. Evaluation of anticancer peptide VEGF111b secretion in HEK293 human cells. *Feyz* 2017; 21(1): 28-34.

# بررسی میزان ترشح خارج سلولی پپتید ضد سرطان VEGF111b در سلول‌های انسانی HEK-293

مرتضی صادقی<sup>\*۱</sup>، زهره حاجتی<sup>۲</sup>

خلاصه:

**سابقه و هدف:** VEGF111b یک ایزوفرم جدید از فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) است که اخیراً به‌عنوان یک داروی ضد سرطان مطرح شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی میزان ترشح این پروتئین از دیواره سلول‌های HEK293 به‌منظور تولید تجاری این فاکتور نو ترکیب است.

**مواد و روش‌ها:** توالی VEGF111b توسط نرم‌افزار OLIGO و اطلاعات ژن بانک NCBI طراحی و داخل وکتور pBUD.cE4.1 کلون شد. وکتور نو ترکیب pBUD.VEGF111b با استفاده از کیت لیپوفکتامین به داخل سلول‌های HEK293 ترانسفکت شد. تولید VEGF111b ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن در عصاره لیز سلولی توسط وسترن بلائینگ و آنتی‌بادی Human anti-VEGF بررسی شد. میزان ترشح VEGF111b در عصاره لیز سلولی و محیط کشت سلولی به روش ELISA اندازه‌گیری گردید.

**نتایج:** کلونینگ صحیح قطعه VEGF111b در وکتور pBUD.cE4.1 توسط هضم آنزیمی و ژل الکتروفورز تأیید شد. مشاهده باند شارپ ۱۲ کیلو دالتن در نتایج وسترن بلات عصاره لیز سلولی نشان‌گر تولید پپتید نو ترکیب VEGF111b در سلول‌های HEK293 بود. نتایج الیزا در جذب نوری ۴۵۰ نانومتر برای VEGF111b در محیط کشت سلولی و عصاره لیز سلولی به ترتیب برابر با  $19/20 \pm 2/81$  pg/ml و  $32/87 \pm 7/42$  pg/ml بود. و در نمونه‌های کنترل منفی بیان VEGF-111b مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های این مطالعه نشان‌گر قابلیت بالای انتقال و ترشح VEGF111b از دیواره سلول‌های HEK293 به محیط کشت سلولی بدون شکستگی و هضم پروتئولیتیکی است. به‌نظر می‌رسد تولید تجاری این پپتید دارویی و تخلیص از محیط کشت سلولی HEK293 با بازدهی بالا امکان‌پذیر باشد.

**واژگان کلیدی:** فاکتور رشد اندوتلیال عروقی A، ترشح، HEK293

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۳۴-۲۸

## مقدمه

رگ‌زایی به فرایند شکل‌گیری عروق خونی جدید از عروق قدیمی اطلاق می‌گردد. این فرایند شامل تمایز سلول‌های اندوتلیال از سلول‌های پیش‌ساز مزودرمی محل می‌شود. VEGF-A نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مرتبط با رگ‌زایی بر عهده دارد. این فاکتور رگ‌زایی بقا زیستی، تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتلیال را تحریک می‌کند [۱]. VEGF در آنژیوژنز تومورها به‌صورت یک فاکتور کلیدی عمل نموده و رشد رگ‌های جدید از رگ‌های قبلی را تحریک می‌کند. بدین ترتیب مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز سلول‌های تومور فراهم می‌گردد و در نتیجه باعث رشد و متاستاز تومور می‌شود [۳،۲].

<sup>۱</sup> استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران  
<sup>۲</sup> دانشیار، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

\* **نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، پژوهشگاه ژنتیک

تلفن: ۰۲۱ ۲۶۴۰۳۲۹۲

درون‌پس: ۰۲۱۸۸۹۳۰۶۸۴

پست الکترونیک: ms.sadeghi@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۹/۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۴

ایزوفرم‌های مختلف VEGF-A بر اساس اسپیلیسینگ متفاوت در دو خانواده VEGF-xxx یا ایزوفرم‌های پیش‌رگ‌زا و VEGF-xxxب یا ایزوفرم‌های ضد رگ‌زا تقسیم‌بندی می‌شوند. جایگاه پیرایش نزدیک در آگزون ۸ منجر به تولید ایزوفرم‌های با خاصیت رگ‌زایی یا همان VEGFxxx می‌شود، درحالی‌که جایگاه پیرایش دور، باعث ایجاد ایزوفرم‌های ضد رگ‌زایی VEGFxxxب می‌شود. در حالت طبیعی در سلول پیرایش متناوب ژن VEGF A باعث تولید حداقل ۷ ایزوفرم مختلف با طول‌های ۱۶۵، ۱۲۱، ۱۸۹، ۲۰۶، ۱۸۳، ۱۴۵، ۱۱۱، و ۱۴۷ اسید آمینه می‌شود. ایجاد این ایزوفرم‌های مختلف از طریق پیرایش متناوب در آگزون‌های ۶، ۷ و ۸ حاصل می‌شود و آگزون‌های ۵-۱ در تمام این ایزوفرم‌ها ثابت هستند. مهم‌ترین اعضاء گروه XXXb شامل VEGFA189b، VEGF-A145b، VEGFA165b، VEGFA183b و VEGF121b هستند. در مقایسه با ایزوفرم‌های پیش‌رگ‌زا، خانواده ایزوفرم‌های VEGF-xxxب از طریق انتخاب جایگاه پیرایش DSS ایجاد شده و آگزون 8b در آنها اسید آمینه‌های SLTRKD را کد می‌کند [۵،۴]. VEGF-A روی گیرنده‌های خاص غشاء سلولی با نام VEGF-R1 و VEGF-R2 عمل می‌کنند که جزء گیرنده‌های

طراحی و کلونینگ ایزوفرم VEGF111b:

ایزوفرم نو ترکیب VEGF111b به طور طبیعی در سلول وجود ندارد و طراحی آن با استفاده از داده‌های موجود در ژن بانک NCBI و نرم‌افزار Oligo 7 انجام شد. طراحی به گونه‌ای صورت گرفت که اگزون‌های ۱-۴ ژن VEGF به توالی اگزون b ۸ متصل شود؛ بدین ترتیب اگزون‌های ۵، ۶ و ۷ از توالی اصلی حذف شد و به جای اگزون ۸، اگزون 8b قرار داده شد. جایگاه طول نهایی توالی پس از برش توسط آنزیم‌های محدودگر برابر ۴۲۹ جفت باز در نظر گرفته شد. توالی توسط نماینده کمپانی فرمتاز در ایران سنتز شد (شکل شماره ۱، C). برای ترانسفورم قطعه نو ترکیب 111b به داخل سلول‌ها از وکتور pBudCE4.1 استفاده شد. وکتور توسط آنزیم‌های محدودگر BglIII و KpnI (Thermo) طبق دستورالعمل شرکت سازنده برش داده شد و توالی vegf111b با استفاده از آنزیم Ther- T4 DNA ligase (Thermo) طبق دستورالعمل شرکت به پائین دست پرو-موتور EF-1 $\alpha$  وکتور الحاق شد (شکل شماره ۱، A).

ترانسفکشن سلول‌های HEK293

وکتور نو ترکیب pBUD.VEGF111b حاوی ژن VEGF111b با استفاده از کیت لیپوفکتامین (Invitrogen) به سلول‌های HEK293 منتقل شد. برای این منظور، ابتدا در حدود  $350 \times 10^2$  سلول در هر پلیت کشت داده شد و پلیت حاوی سلول برای رسیدن به رشد معادل ۸۰-۵۰ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO<sub>2</sub> ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس، به ازای هر خانه از پلیت ۱۰۰  $\mu$ l محیط فاقد سرم و ۵۰۰ ng از DNA پلاسمیدی با هم مخلوط شد و ۱  $\mu$ l از بافر PLUS<sup>TM</sup> Reagent به مخلوط DNA پلاسمیدی و محیط فاقد سرم اضافه شد. به مخلوط فوق ۳۰  $\mu$ l از Lipo- و ۱۰۰  $\mu$ l fectamine<sup>®</sup> LTX (۲/۵  $\mu$ l به ازای هر خانه) اضافه شد و ۱۰۰ پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد با رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شد.

وسترن بلا تیگ:

برای انجام وسترن بلات پس از ۴۸ ساعت از سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از بافر لیزکننده (Buffer RLT) و هموژنیزاسیون توسط سرنگ استریل عصاره لیز سلول‌های تهیه شد و از عصاره لیز سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای انجام وسترن بلات ۵  $\mu$ l از مارکر پروتئین و ۱۰

تیروزین کینازی هستند و با اتصال لیگاند به صورت دایمر درآمده و باعث فعال کردن مسیرهای پایین دستی انتقال پیام از جمله فعال سازی فسفولیپاز گاما (PLC $\gamma$ ) و فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز و انتقال Ca<sup>2+</sup> می‌شود [۷،۶]. اگرچه VEGF-A با گرایش بیشتری به VEGF-R1 متصل می‌شود، ولی مطالعات نشان می‌دهد بیشتر تحریکات رگ‌زایی VEGF-A توسط گیرنده دوم یعنی VEGF-R2 انجام می‌شود [۸]. در تولید پروتئین‌های نو ترکیب با حجم بالا ترشح پروتئین به محیط خارج سلولی یکی از الزامات امکان تولید و استخراج این محصولات از طریق سلول‌های یوکاریوتی است. از آنجائی که VEGF-A دارای توالی سیگنال است، انتظار می‌رود که هم‌زمان با ترجمه به شبکه رتیکولوم آندوپلاسمی منتقل شود و در آنجا پپتید نشانه آن جدا شده و سپس به غشاء سلول منتقل شود [۹-۱۱]. ایزوفرم‌های سلولی VEGF-A در خارج سلول با شبکه ماتریکس خارج سلولی و نوروفیرین متصل می‌شوند و در مجاورت غشاء سلول باقی می‌مانند و همین امر باعث کاهش ترشح آنها به خارج سلول می‌شود [۱۲-۱۴]. جایگاه اتصال به هپارین و ماتریکس خارج سلولی در اگزون‌های ۶ و ۷ قرار دارد. ایزوفرم نو ترکیب VEGF111b به طور طبیعی در سلول وجود ندارد و برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ کلون و بیان شد. این ایزو-فرم دارای اگزون‌های ۱ تا ۴ و اگزون 8b از ژن VEGFA است. با حذف این اگزون‌های ۵ تا ۷ انتظار می‌رود این ایزوفرم به نورو-فیرین، هپارین و ماتریکس خارج سلولی متصل نشود و به خوبی به خارج سلول ترشح شود [۱۵]. با توجه به پتانسیل بالای سلول‌های انسانی Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK-293) در تولید پروتئین‌های نو ترکیب و اهمیت داروئی VEGF-111b در این مطالعه ما برای اولین بار در ایران به بررسی میزان بیان و ترشح این پروتئین در سلول‌های HEK293 پرداختیم.

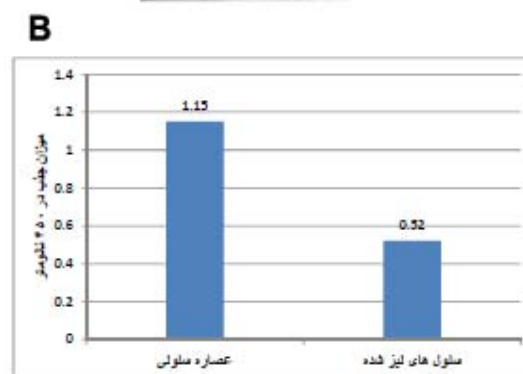
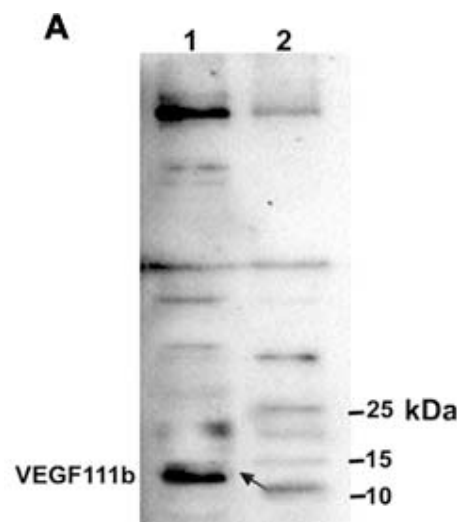
## مواد و روش‌ها

کشت سلول و وکتور:

برای انجام این مطالعه تجربی سلول‌های انسانی HEK293 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط GlutaMAX DMEM, High Glucose, حاوی 10% FBS+P/S 1% حاوی ۰/۰۵ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استر-پتومایسین (P/S) ساخت فرمتاز، و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی-گراد، CO<sub>2</sub> ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد. در این مطالعه از وکتور بیانی pBUD.CE4.1 استفاده شد و قطعه ژنی VEGF111b با طول ۴۲۹ جفت باز تحت پروموتور EF-1 $\alpha$  این وکتور کلون گردید.



در فرایندهای فیزیولوژیکی مانند شکل‌گیری و تکامل جنین، درمان زخم‌ها و سیکل‌های بازسازی در بدن افراد بالغ است [۱۷،۱۶].



شکل شماره ۲- نتایج وسترن بلات و الایزا پروتئین VEGF111b.

A: تائید بیان پروتئین نو ترکیب VEGF111b در سلول‌های HEK293 با استفاده از وسترن بلات. پروتئین نو ترکیب با طول ۱۲ کیلو دالتن در لاین ۱ مشخص شده است. B: نتایج تکنیک الایزا. میزان جذب نوری VEGF-111b در ۴۵۰ نانومتر در سلول‌های عصاره لیز شده و محیط کشت سلولی.

فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) از فاکتورهای مولکولی اصلی تحریک کننده رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال هستند [۱۹،۱۸]. افزایش بیان VEGF در بسیاری از تومورهای انسانی گزارش شده است و با تکثیر سلول‌های توموری و مناساز تومور در ارتباط است. همچنین، VEGF‌های خانواده B به لحاظ عملکرد آنتاگونیست در مقایسه با ایزوفرم‌های معمولی و جلوگیری از تشکیل عروق خونی جدید به عنوان فاکتورهای درمانی مهم در مهار رشد تومورها و درمان سرطان شناخته می‌شوند [۲۰]. با توجه به اهمیت دارویی این ایزوفرم‌ها در این مطالعه ما به بررسی میزان ترشح ایزوفرم جدید VEGF111b در سلول‌های انسانی HEK-

293 پرداختیم. طبق یافته‌های ما این پروتئین نو ترکیب به خوبی در سلول‌های HEK293 بیان می‌شود و یافته‌های الایزا محیط کشت سلولی بیانگر ترشح خوب این پروتئین با غلظت  $19/20 \pm 2/81$  پیکوگرم در میلی‌لیتر به محیط کشت سلولی است. میزان ترشح VEGF در مرحله اول و در سطح میزان mRNA و پایداری mRNA توسط میزان هایپوکسی تنظیم می‌شود [۲۱-۲۳]. برای ترشح مناسب یک پروتئین از غشاء سلولی به محیط خارج سلولی موارد متعددی از جمله نوع وکتور و نوع سلول میزبان و همچنین ساختار پروتئین مربوط اهمیت دارد. در مطالعات قبلی انجام شده روی ترشح VEGF گزارش شده است که مهار گلیکوزیلاسیون VEGF165b توسط Tunicamycin باعث افزایش ترشح خارج سلولی این پپتید شده و روی عملکرد مولکولی آن تاثیری ندارد [۲۵،۲۴]. با توجه به اینکه جایگاه اصلی گلیکوزیلاسیون در VEGF توسط اگزون‌های ۵ تا ۷ کد می‌شود و طراحی ایزوفرم VEGF111b طوری صورت گرفته که این اگزون از آن حذف شده است، بنابراین VEGF111b گلیکوزیله نمی‌شود. به نظر می‌رسد ترشح خوب VEGF111b به محیط خارج سلولی در درجه اول به علت طراحی مناسب این پپتید باشد. همچنین، در مطالعات قبلی گزارش شده است که ایزوفرم‌های سلولی VEGF قادر به اتصال به ماتریکس خارج سلولی (ECM) هستند و این امر باعث اتصال ایزوفرم‌ها به دیواره سلولی می‌شود [۲۶-۲۸]. البته جزئیات اینکه آیا VEGF از طریق ECM به دیواره سلول تولید کننده متصل می‌شود یا دیواره سلول پذیرنده، هنوز به روشنی مشخص نشده است، ولی عنوان شده است که یکی از دلایل کاهش ترشح VEGF‌های طبیعی می‌تواند اتصال به ECM باشد. البته در برخی مطالعات گزارش شده است که این حالت بیشتر در مورد ایزوفرم‌های بلند VEGF مانند VEGF206 و VEGF189 اتفاق می‌افتد [۲۹]. در مورد ترشح VEGF‌ها از غشاء پلاسمایی از آنجایی که نواحی اتصال به هپارین در C ترمینال پپتید وجود دارد، به نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش ترشح در پپتیدهای بلندتر نسبت به ایزوفرم‌های کوتاه‌تر VEGF همین امر باشد [۳۰]. با توجه به حذف اگزون‌های ۵، ۶ و ۷ از قسمت C ترمینال در VEGF111b به نظر می‌رسد ترشح خوب این پروتئین به دلیل طراحی خاص آن و حذف شدن نواحی اتصال به هپارین و ماتریکس خارج سلولی (اگزون‌های ۶ و ۷) در این ایزوفرم باشد.

#### نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما به بررسی میزان ترشح VEGF111b در سلول‌های HEK293 پرداختیم. طبق یافته‌های ما در تولید این

### تشکر و قدردانی

از بخش تحصیلات تکمیلی و گروه ژنتیک دانشگاه اصفهان به خاطر همکاری در فراهم آوردن وسایل و مواد مورد نیاز این مطالعه تشکر می‌گردد.

### References:

- [1] Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. The role of angiogenesis in solid tumors: an over-view. *Eur J Intern Med* 2009; 20(7): 663-71.
- [2] Drevs J. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. *EJC Supplements* 2008; 6: 7-13.
- [3] Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(4): 409-20.
- [4] Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62(14): 4123-31.
- [5] Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF<sub>xxx</sub>b, are down-regulated in pre-eclamptic placenta at term. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110(5): 575-85.
- [6] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93(8): 1493-5.
- [7] Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011; 437(2): 169-83.
- [8] Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24(2): 188-93.
- [9] Carmeliet P, Ruiz de Almodovar C. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(10): 1763-78.
- [10] Huez I, Bornes S, Bresson D, Creancier L, Prats H. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol* 2001; 15(12): 2197-210.
- [11] Meiron M, Anunu R, Scheinman EJ, Hashmueli S, Levi BZ. New isoforms of VEGF are translated from alternative initiation CUG codons located in its 5'UTR. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282(4): 1053-60.
- [12] Tee MK, Jaffe RB. A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. *Biochem J* 2001; 359 (Pt 1): 219-26.
- [13] Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial

فاکتور توسط سلول‌های HEK293 ترشح بالای خارج سلولی پپتید 111b بدون شکستگی و هضم پروتئولیتیکی حاصل می‌شود و به‌نظر می‌رسد تولید تجاری و استحصال این فاکتور از محیط کشت سلولی در حجم بالا امکان‌پذیر باشد.

growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267(36): 26031-7.

[14] Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002; 16(20): 2684-98.

[15] Gu F, Li X, Kong J, Pan B, Sun M, Zheng L, et al. VEGF111b, a new member of VEGF<sub>xxx</sub>b isoforms and induced by mitomycin C, inhibits angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441(1): 18-24

[16] Dvorak HF. VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol* 2000; 24(1): 75-8.

[17] Raab S, Plate KH. Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 113(6): 607-26.

[18] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 2005; 109(3): 227-41.

[19] Emamgholipour S, Bandehpour M, Shabani P, Maghen L, Yaghmaee B, Kazemi B. Mutagenesis in sequence encoding of human factor VII for gene therapy of hemophilia. *DARU* 2009; 17(4): 294-8.

[20] Rennel E, Waine E, Guan H, Schüler Y, Leenders W, Woolard J, et al. The endogenous antiangiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* 2008; 98(7): 1250-7.

[21] Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 2002; 109(3): 327-36.

[22] Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* 2008; 4(4): 241-6.

[23] von Degenfeld G, Banfi A, Springer ML, Wagner RA, Jacobi J, Ozawa CR, et al. Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia. *FASEB J* 2006; 20(14): 2657-9.

[24] Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 505-15.

[25] Walter DH1, Hink U, Asahara T, Van Belle E, Horowitz J, Tsurumi Y, et al. The in vivo bioactivity of vascular endothelial growth

factor/vascular permeability factor is independent of N-linked glycosylation. *Lab Invest* 1996; 74(2): 546–56.

[26] Chen E, Hermanson S, Ekker SC. Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood* 2004; 103(5): 1710–9.

[27] Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, Murray J, Nishimura T, Mostafavi-Pour Z, et al. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ Res* 2006; 99(8): 853–60.

[28] Krilleke D, DeErkenez A, Schubert W, Giri I, Robinson GS, Ng YS, et al. Molecular mapping and

functional characterization of the VEGF164 heparin-binding domain. *J Biol Chem* 2007; 282(38): 28045–56.

[29] Ruiz de AC, Coulon C, Salin PA, Knevels E, Chounlamountri N, Poesen K. Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci* 2010; 30(45): 15052–66.

[30] Chen S, Chakrabarti R, Keats EC, Chen M, Chakrabarti S, Khan ZA. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by extra domain B segment of fibronectin in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(13): 8333–43.