



Doctoral Thesis

Targeting of the VEGF receptors by a human immunodeficiency virus-encoded angiogenic peptide

Author(s):

Weiglhofer, Wolfgang

Publication Date:

2000

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004086098> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 13981

Targeting of the VEGF receptors by a human immunodeficiency virus-encoded angiogenic peptide

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Science

Presented by

Wolfgang Weiglhofer

born April 7, 1972
Wettingen AG, Switzerland
Dipl. sc. nat. ETH

examiners:

Prof. Dr. Fritz Winkler, examiner
Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner

Zurich 2000

1. Zusammenfassung

Die Entstehung von Zytostatika-resistenten Tumoren aufgrund von genetischer Instabilität der Krebszellen und die Notwendigkeit des Transports von Pharmaka in die Tumormasse können durch anti-angiogene Therapien umgangen werden. Anti-angiogene Substanzen richten sich gegen die genetisch stabilen Blutgefäßzellen (Endothelzellen), die neu entstehende Blutgefäße in Tumoren bilden, und keine Pharmaka-Resistenz ausbilden sollten. Der vaskuläre endotheliale Gefäßwachstumsfaktor (VEGF) ist ein Schlüsselfaktor bei der Gefäßneubildung (Angiogenese) und die Zahl der VEGF Rezeptoren ist in neu geformten Blutgefäßen hochreguliert. Deshalb ist es eine vielversprechende Strategie, VEGF oder seine Rezeptoren auszuschalten, um VEGF-induzierte Angiogenese zu verhindern. VEGF wird in zahlreichen Isoformen exprimiert. Die vorherrschende Isoform, VEGF₁₆₅, ist ein basisches, Heparin-bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einer Molekularmasse von etwa 45 kDa. Niedriger Sauerstoffdruck, wie er in wachsenden Tumoren vorkommt, ist ein Schlüsselauslöser für die VEGF Expression. VEGF agiert als spezifischer Wachstums- und Überlebensfaktor für Endothelzellen und bindet zu den transmembranen Tyrosin Kinase Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR), die aus sieben extrazellulären Immunoglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranen Sequenz und einem intrazellulären Teil mit einer geteilten Kinase Domäne bestehen. Die VEGF Bindungsstelle befindet sich bei beiden Rezeptoren auf den extrazellulären Domänen 2 und 3. Das VEGF Dimer besitzt seinerseits zwei identische Rezeptor-Bindungsstellen, welche sich an beiden Enden des Moleküls über die Dimer-Grenzfläche erstrecken. Deshalb bildet VEGF einen symmetrischen, aktiven Komplex, der aus einem VEGF Dimer und zwei Rezeptor-Proteinen besteht.

Der Transaktivator der Transkription (Tat Protein) des menschlichen Immunschwächevirus Typus 1 (HIV-1) wird von infizierten Zellen freigesetzt und kann von nicht infizierten Zellen aufgenommen werden. Tat ist dadurch in der Lage, zahlreiche intrazelluläre Aktivitäten in infizierten und nicht infizierten Zellen zu vermitteln. Es ist aber auch extrazellulär durch Binden an Zelloberflächenmoleküle aktiv. Tat hat angiogene Eigenschaften und scheint die Aktivität von VEGF nachzuahmen indem es VEGFR-2 an Endothelzellen bindet und aktiviert. Es wurde festgestellt, dass eine interne, basische Peptid-Sequenz von Tat genügt, um die Phosphorylierung des VEGFR-2 zu induzieren.

Für unsere Studien wurde das basische Peptid in den Kontext eines chimären Proteins versetzt. Bakteriell Thiothredoxin (Trx) dient dabei als kleiner, stabiler Fusionspartner. Iodiertes VEGF und ein chimäres Trx/Tat Protein (Trx-bp-loop) wurden verwendet, um Bindungsstudien auf Endothelzellen durchzuführen, die entweder VEGFR-1 oder VEGFR-2 exprimieren. VEGF und Trx-bp-loop binden beide VEGF Rezeptoren mit hoher Affinität, aber konkurrieren nur teilweise für das Binden an die Rezeptoren. Dies deutet darauf hin, dass Tat und VEGF an verschiedene Stellen an den VEGF Rezeptoren binden. Trx-bp-loop stimuliert das Wachstum von Endothelzellen *in vitro* und fördert Angiogenese auf der Chorioallantois-Membran des Huhnes *in vivo*, was darauf schliessen lässt, dass sich das basische Peptid als Rezeptor-Agonist benimmt. Neue Resultate unserer Arbeit zeigen, dass das basische Peptid von Tat an Domäne 3 des extrazellulären Teils von VEGFR-2 bindet. Somit bindet es ein anderes Epitop als VEGF oder erkennt ein leicht mit der VEGF-Bindungsstelle überlappendes Epitop, da VEGF die Domänen 2 und 3 von VEGFR-2 erkennt. Das basische Peptid von Tat wird interessante Einsichten in den Mechanismus der VEGF Rezeptor Dimerisierung und Signaltransduktion erlauben, und könnte für den spezifischen Transport von therapeutischen Substanzen zu den Tumor-Blutgefäßen genutzt werden.

1. Summary

Acquired drug resistance of tumors, due to genetic instabilities of cancer cells, and the necessity of intra-tumor drug delivery may be bypassed by anti-angiogenic therapies. Anti-angiogenic drugs target the genetically stable vascular endothelial cells which line newly formed blood vessels in tumors and are not expected to develop drug resistance. Since Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key mediator of angiogenesis and its receptors are upregulated in newly formed blood vessels, it is a promising strategy to target VEGF or its receptors in order to inhibit VEGF-induced tumor angiogenesis. VEGF is expressed in various isoforms and the predominant form VEGF₁₆₅ is a basic, heparin-binding homodimeric glycoprotein of about 45 kDa. Low oxygen tension as manifest in growing tumors is a key inducer of VEGF expression. VEGF acts as a specific mitogen and survival factor for vascular endothelial cells. VEGF binds to the transmembrane tyrosine kinases receptors VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR), which consist of seven extracellular immunoglobulin-like domains, a transmembrane sequence and an intracellular split kinase domain. The VEGF binding site is located on domains 2 and 3 for both receptors. In turn, the VEGF dimer possesses two identical receptor binding sites across the dimer interface at each pole of the molecule and therefore induces a symmetrical active complex consisting of one VEGF dimer and two receptor proteins.

The transacting activator of transcription (Tat protein) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is released from virus infected cells and taken up by uninfected cells. It thereby mediates various activities intracellularly in both infected and uninfected cells. It is also active extracellularly by binding to cell surface molecules. Tat has angiogenic properties and appears to mimic VEGF activity by binding to and activating VEGFR-2 on endothelial cells. An internal basic peptide sequence of Tat was found to be sufficient to induce VEGFR-2 phosphorylation.

For our studies, the basic peptide was placed into the context of chimeric proteins, which consist of bacterial thioredoxin (Trx) as a small, rigid fusion partner. Iodinated VEGF and a chimeric Trx/Tat protein (Trx-bp-loop) were used to perform binding studies on endothelial cells expressing either VEGFR-1 or VEGFR-2. VEGF and Trx-bp-loop bind both VEGF receptors with high affinity, but only partially compete for receptor binding suggesting that Tat and VEGF bind to distinct sites on VEGF receptors. Trx-bp-loop

stimulates endothelial cell growth *in vitro* and promotes angiogenesis on the chicken chorioallantoic membrane *in vivo*, suggesting that the basic peptide behaves as a VEGF receptor agonist. Recent results from our work show that the Tat basic peptide binds to domain 3 of the extracellular part of VEGFR-2. It therefore interacts with a different epitope than VEGF. Alternatively, the basic peptide recognizes an epitope that is slightly overlapping with the VEGF binding site, since VEGF is known to bind domains 2 and 3 of VEGFR-2. The basic peptide will allow interesting insights into the mechanism of VEGF receptor dimerization and signaling, and may be exploited to specifically deliver therapeutic agents to the tumor vasculature.