



Doctoral Thesis

Structure / function analysis of the extracellular domain of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2)

Author(s):

Ruch, Claudia

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005363933> →

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](#).

Doctoral Thesis ETH no. 17030

**Structure / function analysis of the extracellular
domain of vascular endothelial growth factor
receptor-2 (VEGFR-2)**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of
Doctor of Sciences, ETH Zürich

presented by

Claudia Ruch
Eidg. dipl. Apothekerin
born 26th Sept. 1976
Citizen of Bachenbülach (ZH), Switzerland

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. F. K. Winkler, examiner
Prof. Dr. R. Glockshuber, co-examiner
Prof. Dr. K. Ballmer-Hofer, co-examiner

Villigen, 2007

Summary

Angiogenesis is the process of blood vessel formation from pre-existing vessels. It has important functions under both physiological and pathological conditions. While physiological angiogenesis occurs during embryonic development, in the female reproductive cycle and in wound healing, abnormally enhanced angiogenesis is observed in a variety of diseases including cancer. It has been shown in several models that blocking angiogenic processes inhibits tumour growth. On the other hand, promotion of the angiogenic response proves beneficial in the treatment of ischemic conditions, such as in myocardial ischemia and infarction.

Regulation of angiogenesis is tightly controlled by a plethora of growth factors and cytokines. Among the most important factors are the members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family. They bind with distinct affinities to three types of VEGF receptors (VEGFR-1, -2, and -3). VEGFRs are transmembrane tyrosine kinases composed of seven extracellular Ig-like domains involved in ligand binding, a single transmembrane domain and an intracellular tyrosine kinase domain. Receptor activation occurs upon ligand binding, which induces VEGFR dimerisation and subsequent activation of the intracellular kinase domains. Auto- and heterophosphorylation of specific tyrosine residues within the intracellular receptor domain generates docking sites for various SH2- and PTB-domain containing adaptor molecules, which initiate downstream signalling pathways affecting cell proliferation, differentiation, migration and metabolism.

In this study we investigated the mechanism of VEGFR-2 activation. Focusing on its extracellular domain, we analysed the role of specific Ig-like domains on receptor dimerisation and activation. The extracellular domain of VEGFR-2 was produced in Sf21 and HEK 293T cells in a monomeric and in a predimerised form containing the coiled coil domain of the yeast transcription factor GCN4 as dimerising motif. The constructs were biochemically and biophysically characterised. Both constructs formed 1:2 complexes composed of one ligand dimer bound to two receptors. Surface plasmon resonance experiments revealed that the predimerised receptor construct binds VEGF with a three fold higher affinity which is mainly due to a decreased dissociation rate.

While receptor-ligand complexes could not be observed by rotary metal shadowing electron microscopy, they were successfully displayed by negative staining electron

microscopy and single particle analysis. Strikingly, the images suggested an interaction of the receptors not only at the ligand binding domains (Ig-like domains 2-3) but also in the region of Ig-like domain 4 and 7. We propose a possible model for instigation of intracellular signaling upon VEGF binding to VEGFR. Once two receptors are cross-linked to each other through interactions with ligand, their membrane-proximal Ig-like domains 7 are held in close proximity, so that the low affinity homotypic interaction between these domains can further stabilise receptor dimers.

In another project we solved the crystal structure of the VEGF-E NZ2. Chimeras of the VEGFR-2-specific VEGF-E and the VEGFR-1-specific PIGF were constructed and their binding affinities for VEGFR-1 and VEGFR-2 were determined. I contributed to this work by performing surface plasmon resonance assays to determine the affinities of the VEGF-E constructs towards VEGFR-2. The obtained data demonstrated that it is possible to engineer VEGF-chimeras with altered receptor specificity.

I also obtained preliminary results about the role of the extracellular domain in receptor activation from cell biological assays. VEGFR-2 mutants lacking individual Ig-like domains were constructed and tested for their ability to dimerise and to activate downstream signalling pathways. Special interest was put on Ig-like domain 4 since this domain has been shown to promote dimerisation in several VEGFR related receptors. A mutant VEGFR-2 lacking Ig-like domain 4 (VEGFR-2 Δ 4) was shown to form constitutive receptor dimers. However, these dimers were inactive and were neither able to transphosphorylate each other nor to activate downstream signalling molecules such as Erk-1/-2.

Finally, I was involved in a project in which a single chain antibody was developed for specific targeting of VEGFR-2. My contribution to this work consisted in performing immunofluorescence assays showing the selectivity of the antibody for human VEGFR-2 but not for mouse VEGFR-2.

Zusammenfassung

Mit Angiogenese bezeichnet man die Bildung von Blutgefäßen ausgehend von bereits existierenden Gefäßen. Es ist ein wichtiger Prozess, sowohl unter physiologischen Bedingungen wie auch in Krankheiten. Während physiologische Angiogenese sich hauptsächlich während der Entwicklung des Embryos, im Fortpflanzungszyklus der Frau oder während der Wundheilung abspielt, beobachtet man krankhafte Blutgefäßbildung in vielen Krankheiten wie z.B. dem Wachstum von Tumoren. Mehrere Modelle haben in der Vergangenheit gezeigt, dass durch Hemmung der Blutgefäßbildung das Wachstum von Tumoren verhindert werden kann. Andererseits kann ein Fördern von Angiogenese sich positiv auswirken auf die Behandlung von ischämischen Krankheiten wie z.B. bei einer Minderdurchblutung des Herzmuskels oder bei Infarkten.

Angiogenese ist im Körper streng kontrolliert durch eine Vielfalt an Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Zu den wichtigsten Faktoren gehören die Mitglieder der vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF)-Familie. Diese binden mit spezifischen Affinitäten an drei Typen von VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, -2, und -3). Die Rezeptoren sind transmembrane Tyrosinkinasen bestehend aus sieben extrazellulären, immunglobulin-ähnlichen Domänen, die den Liganden binden, sowie aus einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase. Aktiviert werden diese Rezeptoren durch Binden eines Liganden, was zur Rezeptor-Dimerisierung und anschließender Aktivierung der intrazellulären Kinase führt. Auto- und Heterophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste im intrazellulären Teil der Rezeptoren produziert Bindungsstellen für Moleküle mit SH2- und PTB-Domänen, welche wiederum Signalkaskaden initiieren, die die Zellvermehrung, -differenzierung, -wanderung und den Zellstoffwechsel regulieren.

In dieser Studie untersuchten wir den Aktivierungsmechanismus von VEGFR-2 näher. Dabei konzentrierten wir uns auf den extrazellulären Rezeptorteil und analysierten die Funktion einzelner immunglobulin-ähnlicher Domänen. Der ganze extrazelluläre Teil des VEGFR-2 wurde in Sf21 und HEK 293T Zellen produziert. Zusätzlich zu einer monomeren Form wurde eine vordimerisierte Form des Rezeptors hergestellt, die eine coiled-coil Domäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GNC4 als Dimerisierungsmotiv enthält. Die Konstrukte wurden biochemisch und biophysikalisch charakterisiert. Beide bildeten 1:2 Komplexe mit VEGF bestehend aus einem Liganddimer und zwei Rezeptoren. Oberflächenplasmonresonanzexperimente ergaben, dass der vordimerisierte Rezeptor VEGF mit einer dreimal höheren Affinität

bindet als der monomere Rezeptor. Dieser Unterschied in der Affinität ist hauptsächlich auf eine erhöhte Dissoziationsrate des Liganden vom monomeren Rezeptor zurückzuführen.

Während Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht durch rotations-metallbeschattende Elektronenmikroskopie visualisiert werden konnten, konnten solche erfolgreich mittels Negativfärbung Elektronenmikroskopie und anschliessender Einzelpartikel-Analyse nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise zeigten die Bilder nicht nur eine Rezeptor-Rezeptor Interaktion in den ligandbindenden Domänen (Domänen 2-3), sondern deuteten auch Wechselwirkungen im Bereich der Domänen 4 und 7 an. Wir erstellten daher ein mögliches Modell wie intrazelluläre Signalkaskaden durch Binden eines Liganden an den VEGFR ausgelöst werden können. Sind erst einmal zwei Rezeptoren miteinander über einen Liganden querverbunden, kommen ihre membrannahen Domänen 7 in enge Nachbarschaft zu liegen, so dass deren niedrige Affinität zueinander das Rezeptordimer weiter stabilisieren kann.

In einem anderen Projekt lösten wir die Kristallstruktur des VEGF-E NZ2. Chimären des VEGFR-2-spezifischen VEGF-E mit dem VEGFR-1-spezifischen PIGF wurden konstruiert und auf ihre Affinität zum VEGFR-1 und -2 getestet. Ich trug zu dieser Arbeit bei mit Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten, die die Affinität der VEGF-E/PIGF Chimären zu VEGFR-2 aufzeigten. Analyse der Bindungskurven zeigte, dass es möglich ist, VEGF-Chimären mit geänderter Rezeptorspezifität zu konstruieren.

Vorläufige Resultate zur Rolle der extracellulären Domäne des VEGFR-2 bei der Rezeptoraktivierung wurden in zellbiologischen Versuchen ermittelt. VEGFR-2 Mutanten, welchen einzelne immunglobulin-ähnliche Domänen fehlten, wurden konstruiert und auf ihre Fähigkeit Rezeptordimere zu bilden und intrazelluläre Signalwege zu aktivieren getestet. Besonderes Interesse galt der Domäne 4, die in VEGFR verwandten Rezeptoren eine dimerisierungsfördernde Funktion einnimmt. Eine VEGFR-2-Mutante, welcher Domäne 4 fehlt (VEGFR-2 Δ 4), bildete konstitutive Dimere, die jedoch inaktiv waren und weder sich gegenseitig phosphorylieren noch Signalmoleküle wie Erk-1/-2 aktivieren konnten.

Schliesslich war ich in ein Projekt involviert, in welchem ein Einzelketten-Antikörper gegen den VEGFR-2 entwickelt wurde. Mein Beitrag zu dieser Arbeit bestand in Immunfluoreszenzexperimenten, die zeigten, dass der Antikörper spezifisch an den menschlichen, nicht aber an den VEGFR-2 der Maus bindet.