



Doctoral Thesis

Functional analysis of transmembrane domain mutants of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2)

Author(s):

Dell'Era-Dosch, Debora

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005820843> →

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](#).

**Functional analysis of transmembrane domain mutants
of vascular endothelial growth factor receptor 2
(VEGFR-2)**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Debora Dell'Era-Dosch

Dipl. Zool. UNIZH
born August 21, 1977
citizen of Tinizong-Rona GR

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. F. K. Winkler, examiner
Prof. Dr. K. Ballmer-Hofer, co-examiner
Prof. Dr. S. Werner, co-examiner

2009

Summary

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing vasculature, is an important component of normal physiological processes such as embryonic development, wound healing and in the female reproductive cycle. Angiogenesis also contributes to several pathological situations including tumor growth, rheumatoid arthritis and degenerative eye disorders.

Among the different players involved in the regulation of angiogenic processes, the members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family play a predominant role. VEGFs bind with distinct affinities to three variants of receptor tyrosine kinases, VEGF receptor-1, -2 and -3, expressed on the surface of endothelial and some haematopoietic cells. VEGFRs consist of seven extracellular immunoglobulin-like domains followed by a single transmembrane-spanning region, a cytosolic juxtamembrane domain and a split cytoplasmic tyrosine kinase domain. Ligand binding to the extracellular portion of VEGFRs triggers the dimerization of receptor monomers followed by structural rearrangements in the extra- and intracellular part of the receptor which lead to the activation of the kinase domains. Auto- and heterophosphorylation of specific tyrosine residues within the receptor intracellular domain generate docking sites for a variety of signaling molecules. These events lead to the formation of a multimeric signal transduction complex and the subsequent activation of signaling pathways with pleiotropic effects such as cell proliferation, migration and differentiation. The molecular mechanisms responsible for receptor dimerization and the subsequent steps leading to activation of the intracellular kinase domain are only partially understood.

In this study we investigated the role of receptor dimerization in the activation of VEGFR-2. This was achieved by creating a series of truncated and full length VEGFR-2 mutants carrying artificial, dimerization-promoting transmembrane domains (TMDs) that dimerize receptor monomers in various conformations. The activity of receptor dimers was assessed by *in vitro* autophosphorylation assay and by immunofluorescence staining with phospho- and receptor-specific antibodies. One particular TMD gave rise to highly active kinase dimers and, when introduced into the full length receptor instead of the native TMD, promoted ligand-independent activation. Other dimerizing TMDs blocked ligand-mediated receptor activation, suggesting that dimerization is necessary, but not sufficient, for receptor activation

and that a distinct orientation of the kinase domains relative to each other is required for kinase activation.

To date, only limited structural information is available for the intracellular domain of VEGFR-2. This structure was derived using a truncated tyrosine kinase domain from which important flexible regions were removed. Moreover, there is no report of a high resolution structure for a receptor carrying a TMD. For these reasons, in a second project, we evaluated various expression systems from prokaryotes to eukaryotes that allow the production of soluble and membrane-bound VEGFR-2 tyrosine kinase in large amounts for structural analysis. Satisfactory preliminary results were obtained with the baculovirus expression system.

Zusammenfassung

Angiogenese, die Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen, ist eine wichtige Komponente bei normalen physiologischen Prozessen, wie der Entwicklung eines Embryos, der Wundheilung oder dem Fortplantungszyklus der Frau. Angiogenese betrifft aber auch Krankheiten wie Tumorwachstum, rheumatoide Arthritis und verschiedene degenerative Augenkrankheiten.

Proteinfaktoren, die zur vascular endothelial growth factor (VEGF) Familie gehören, nehmen eine vorherrschende Rolle in der Regulierung der angiogenetischen Prozesse ein. Sie binden mit unterschiedlichen Affinitäten an drei verschiedene Varianten von Rezeptortyrosinkinasen (VEGF-Rezeptor-1, -2 und -3), die auf der Oberfläche von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. VEGF-Rezeptoren bestehen aus sieben extrazellulären immunoglobulin-ähnlichen Domänen, gefolgt von einer Transmembrandomäne, einer zytosolischen Juxtamembranregion und einer zytoplasmatischen katalytischen Tyrosinkinasedomäne, die durch eine Insertion unterteilt ist. Die Bindung eines VEGF Liganden an den extrazellulären Teil des Rezeptors führt zur Rezeptordimerisierung, gefolgt von extra- und intrazellulären Strukturänderungen, die anschliessend zur Aktivierung der intrazellulären Kinase führen. Auto- und Heterophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste im intrazellulären Teil der Rezeptoren führen zur Bildung von Bindungsstellen für verschiedene Signalmoleküle. Diese Vorgänge leiten die Aktivierung von Signalkaskaden ein, die unter anderem die Zellvermehrung, -wanderung und -differenzierung regulieren. Genaue molekulare Kenntnisse über die Rezeptordimerisierung und die Schritte, die zur Aktivierung der intrazellulären Kinasedomäne führen, sind nur teilweise vorhanden.

In dieser Studie untersuchten wir die Rolle der Rezeptordimerisierung bei der Aktivierung von VEGFR-2. Dieses Ziel wurde erreicht, indem wir eine Reihe von vollständigen und verkürzten VEGFR-2 Mutanten mit unterschiedlich veränderten Transmembrandomänen konstruiert haben, die eine Rezeptordimerisierung fördern. Diese unterschiedlichen Transmembrandomänen führen zur Dimerisierung der Rezeptoren in jeweils unterschiedlichen Konformationen. Die Kinaseaktivität wurde mittels eines „*in vitro* kinase assay“ und einer phospo- und rezeptorspezifischen Antikörper Immunfärbung von fixierten Zellen ermittelt. Eine dieser

Transmembrandomänen führte zu starker konstitutiver Aktivierung des Rezeptordimers. Wenn in einem vollständigen Rezeptor die natürliche durch diese künstliche Transmembrandomäne ersetzt wurde, führte das zu einer Ligand-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors. Andere Transmembrandomänen, die ebenfalls zu einer Rezeptordimerisierung führten, blockierten jedoch die Ligand-abhängige Aktivierung. Das weist darauf hin, dass eine Dimerisierung für die Rezeptoraktivierung zwar notwendig, nicht aber ausreichend ist. Offenbar ist zusätzlich eine spezifische Orientierung der Kinasen für deren Aktivierung erforderlich.

Bis heute sind nur beschränkte Strukturinformationen über die intrazelluläre Domäne von VEGFR-2 verfügbar. Diese wurden von einer löslichen und unvollständigen Tyrosinkinase abgeleitet, bei der wichtige flexible Bereiche entfernt worden sind. Ebenso existiert noch keine hochauflösende Struktur eines Rezeptors, der auch die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Kinasedomäne umfasst. Aus diesen Gründen wurden in einem zweiten Projekt verschiedene prokaryotische und eukaryotische Systeme für die Produktion von löslicher und membrangebundener VEGFR-2 Kinase getestet, um eine genügend grosse Menge dieser Proteine für strukturelle Analysen zu erhalten. Die besten Ergebnisse wurden bis jetzt mit dem Baculovirus Expressionssystem erreicht.