

**STRUCTURE FUNCTION ANALYSIS OF
NEUROFILIN INTERACTIONS WITH
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTORS**

A dissertation submitted to

ETH ZÜRICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

FELIX STEFFEN GRÜNEWALD

Master of Biochemistry, University of Gent

born December 1st, 1980

citizen of Neunkirchen / Saar (Germany)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Fritz K. Winkler (examiner)

Prof. Dr. Sabine Werner (co-examiner)

Dr. Andrea E. Prota (co-examiner)

2010

Summary

Neuropilins (NRP-1 and NRP-2) are type I transmembrane glycoproteins that function as parts of coreceptor complexes in processes as diverse as angiogenesis, neuronal guidance and cell adhesion. Both neuropilins are receptors for guidance molecules from the semaphorin family and growth factors from the vascular endothelial growth factor (VEGF) family, but their specificity for individual ligands and their physiologic responses are different. NRPs lack intracellular domains that would allow them to transmit their responses independently, but mediate signaling by forming complexes with other receptors, such as plexins, VEGF receptors (VEGFRs) and integrins.

VEGFs are among the major mediators of angiogenesis. They belong to a family of secreted glycoproteins that includes the mammalian members VEGF-A, -B, -C and -D and placenta growth factor as well as homologues of viral origin called VEGF-E. *In vitro*, VEGFs are promoters of endothelial cell survival, proliferation and migration. *In vivo*, VEGFs increase vascular permeability, activate endothelial cells and act as chemoattractants for nascent vessel sprouts. VEGF function is mediated through binding to multiple VEGF receptors expressed on endothelial cells. These include three types of tyrosine kinase growth factor receptors, VEGFR-1, -2 and -3 as well as the nonsignaling coreceptors NRP-1 and NRP-2.

Despite the wealth of information on the distinct biological roles of these molecules, many aspects of the molecular mechanisms remain poorly understood. Information on how signals from different signaling molecules are discerned and how modulation of the cellular responses to these ligands are modulated by NRPs and lead to precisely defined cellular reactions is limited. Structural information of the extracellular domains of NRPs, their coreceptors and ligands may aid in understanding ligand recognition, signal transduction, and specificity.

This thesis aimed at exploring the molecular interactions underlying the modulation of VEGF signaling through the NRP / VEGFR receptor complex.

The first part focuses on functional aspects of VEGF / NRP-1 interactions. A diversity of VEGF-A variants is generated by alternative splicing, that differ in their abilities to bind heparin and NRP-1. VEGF-A binding to NRP-1 correlates with its ability to bind to heparin and is dependent on exons 7 and 8 of VEGF-A. Here, we show that the ability of VEGFs to bind to NRP-1 *in vitro* and to promote coreceptor complex assembly between VEGFR-2 and NRP-1 corresponds to their angiogenic potencies.

To identify the minimal NRP-1 binding epitopes of VEGF-A and VEGF-E, we constructed different gain- and loss-of-function variants of these growth factors based on the sequence alignment of neuropilin binding and non-binding VEGFs. Using surface plasmon resonance (SPR) technology, we compared their affinities towards NRP-1 to those of native VEGF-A isoforms and VEGF-E NZ2. Their affinity towards NRP-1 was then correlated to their ability to promote stable coreceptor complex formation, VEGFR-2 activation and their angiogenic potential. We identified the carboxyterminal peptides DKPRR and RPPR as the NRP-1 binding motifs of VEGF-A₁₆₅ and VEGF-E NZ2, respectively. The specificity of this interaction was confirmed by direct binding of these peptides to NRP-1 and their ability to inhibit VEGF / NRP-1 binding. Importantly, the ability of a VEGF to promote stable coreceptor complex formation correlates with its potency in an *in vitro* model for angiogenic differentiation. A biochemical analysis suggests that the NRP / VEGF interaction is exclusively determined by this carboxyterminal interaction.

In order to get a detailed picture of the interactions between the high affinity peptides and NRPs, we determined the crystal structures of a NRP-2 extracellular domain fragment in complex with the VEGF-A₁₆₅ and VEGF-E NZ2 homologue peptides DKPRR and RPPR. We provide experimental evidence of a conserved binding mode of VEGFs towards NRP-1 and NRP-2. The primary interaction of both peptides includes contacts between the free carboxyterminus and side chain of the terminal arginine residue on the one hand, and a binding site formed by the loops at the top of the b1-domain of NRP-2 on the other hand. A conserved hydrogen bond between the backbone carbonyl of the antepenultimate peptide residue and a tyrosine residue of NRP-1 stabilizes the interaction. The side chains of the peptide residues preceding the arginine do not participate in specific interactions. We suggest that the higher affinity of the RPPR peptide as compared to DKPRR may result from entropic stabilization by the restricted conformation imposed by the diproline motif. The conformation of the residues preceding the carboxyterminal arginine of the bound peptides constrains the possibilities for additional interactions between NRPs and VEGFs.

Zusammenfassung

Neuropiline (NRP-1 und NRP-2) sind Typ I Transmembranproteine mit regulatorischen Funktionen bei Vorgängen der Organ- und Embryonalentwicklung sowie in pathologischen Situationen wie Tumorentwicklung oder diabetischer Retinopathie. Beide Neuropiline sind an verschiedenartigen Prozessen wie Angiogenese, Neuralentwicklung und Zelladhäsion beteiligt. Als Teil von Rezeptorkomplexen übertragen sie Signale von Wachstumsfaktoren wie den VEGFs (vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren) und Signalmolekülen wie den Semaphorinen. Aufgrund ihrer Selektivität für unterschiedliche Signalmoleküle und ihrer unterschiedlichen Gewebslokalisation unterscheiden sich jedoch die physiologischen Reaktionen, die durch NRP-1 und NRP-2 vermittelt werden. Neuropilinen fehlt eine intrazelluläre Domäne, mit der sie ihre Reaktionen unabhängig von anderen Rezeptoren vermitteln könnten. Daher funktionieren sie meist als Teil von größeren Rezeptorkomplexen im Verband mit Plexinen, Integrinen oder VEGF Rezeptoren (VEGFR).

VEGFs gehören zu den wichtigsten Promotoren bei der Regulation von Blutgefäßneubildung. Sie sind eine Gruppe von sekretierten Proteinen, zu denen in Säugetieren VEGF-A, -B, -C und -D sowie PlGF (Plazentawachstumsfaktor) gehören. Außerdem wurden virale Homologe (VEGF-E) identifiziert. *In vitro* fördern VEGFs Überleben, Proliferation und Migration von Endothelzellen; *in vivo* fördern sie Permeabilität von Gefäßen, initiieren die Verzweigung von Blutgefäßen durch die Aktivierung von Endothelzellen und lenken Migration und Wachstum von Zellen während der Blutgefäßentwicklung. Die Funktion der VEGFs wird durch membranständige Rezeptoren vermittelt, zu denen die Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1, -2 und -3 sowie die Korezeptoren NRP-1 und NRP-2 gehören.

Trotz der Fülle an Informationen über die verschiedenen biologischen Funktionen dieser Moleküle sind viele molekulare Mechanismen ihrer Wirkung weiterhin unbekannt. Strukturmodelle der extrazellulären Domänen von Neuropilinen, ihrer Liganden und Korezeptoren können zum Verständnis von Liganderkennung, Signaltransduktion und Spezifität beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Wechselwirkungen, die der Modulation der VEGF Signalübertragung durch Neuropiline zugrunde liegen, zu erforschen.

Das erste Projekt fokussiert auf funktionelle Aspekten der VEGF / NRP-1 Interaktion. Alternatives RNA-Spleißen bringt eine Vielzahl VEGF-Varianten hervor, die sich in ihrer Affinität zu NRP-1 unterscheiden. Hier zeigen wir, daß die Bindungsstärke von VEGFs zu NRP-1

in vitro mit der Bildung eines trimeren Korezeptorkomplexes mit VEGFR-2 und der angiogenesefördernden Wirkung des jeweiligen VEGFs korreliert.

Zur Identifizierung des minimalen NRP-1 Bindungsepitops von VEGF-A und VEGF-E wurden basierend auf Sequenzanalysen verschiedene Gain-of-Function- und Loss-of-Function-Mutanten konstruiert. Ihre Affinität zu NRP-1 wurde mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanztechnologie bestimmt und mit ihrer Fähigkeit korreliert, stabile Korezeptorkomplexe zu bilden, VEGFR-2 zu aktivieren und Blutgefäßneubildung in Angiogenesemodellen hervorzurufen. Wir identifizierten die carboxyterminalen Peptide DKPRR und RPPR als NRP-1 Bindungsmotive von VEGF-A₁₆₅ und VEGF-E. Die Spezifität dieser Interaktion wurde durch direkte Bindungsstudien und Verdrängungsexperimente bestätigt. Die biologische Bedeutung der Bindungsmotive ergibt sich aus der Fähigkeit von VEGFs mit hoher Affinität zu NRP-1 einen trimeren Rezeptorkomplex zu induzieren und Blutgefäßneubildung zu stimulieren. Biochemische Analysen weisen darauf hin, daß die carboxyterminale Interaktion allein bestimmend ist für die Affinität zwischen VEGFs und Neuropilinen.

Um die Wechselwirkungen zwischen den hochaffinen Peptiden und Neuropilinen genauer zu charakterisieren, bestimmten wir die Röntgenkristallstrukturen eines extrazellulären Fragments von NRP-2 im Komplex mit den VEGF-A₁₆₅ und VEGF-E NZ2 homologen Peptiden DKPRR und RPPR. Wir führen den experimentellen Nachweis eines konservierten Bindungsmodus der VEGFs mit Neuropilinen. Die primäre Wechselwirkung beider Peptide mit NRP beruht auf Kontakten zwischen dem freien Carboxyterminus und der Seitenkette des terminalen Arginins mit einer Bindungsstelle in der b1-Domäne von NRP-2. Eine konservierte Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe der drittletzten Aminosäure und einem Tyrosinrest (Tyr299) von NRP-2 stabilisiert die Interaktion. Die übrigen Aminosäureseitenketten des Peptides tragen nicht zu spezifischen Wechselwirkungen bei. Die Konformation der gebundenen Peptide schränkt die Möglichkeiten für zusätzliche Interaktionen zwischen Neuropilinen und VEGFs ein.