

VEGF and NOTCH in blood vessels, an intricate and fascinating interplay

Citation for published version (APA):

Caolo, V. (2011). *VEGF and NOTCH in blood vessels, an intricate and fascinating interplay*. *Datawyse / Universitaire Pers Maastricht*. <https://doi.org/10.26481/dis.20110511vc>

Document status and date:

Published: 01/01/2011

DOI:

[10.26481/dis.20110511vc](https://doi.org/10.26481/dis.20110511vc)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In this thesis, the role of VEGF and NOTCH Signaling Pathways in cardiovascular development and function has been investigated. The effects of VEGF on DLL4 expression, NOTCH signaling and ADAM activity in endothelial cells (ECs) have been explored. Also, the consequences of altered NOTCH signaling for vessel function have been studied at cellular as well as the organ level.

In **Chapter 1**, a general introduction of this thesis is provided. The interaction between VEGF and NOTCH signaling pathway is described together with their effects on arterial endothelial cell differentiation and sprouting. The NOTCH signaling role in SMCs behavior is introduced along with potential implications of NOTCH signaling modulation for vascular remodeling.

In **Chapter 2** we provide new insights into the molecular interaction between the NOTCH and VEGF signaling pathways in ECs. We demonstrated that VEGF-induced DLL4 expression depends on NOTCH activation in HCMvECs. Accordingly, NOTCH signaling was activated by VEGF, as was shown by overexpression of the NOTCH target gene HES-1 and transactivation of a promoter containing multiple RBP-Jk binding sites. Next, activation of NOTCH signaling, by NICD overexpression or recombinant DLL4 stimulation, induced the expression of DLL4 ligand. Also, we reported that NICD-induced DLL4 promoter activity was dependent on RBP-Jk sites but independent of the FOXC2 binding site, previously reported to be required in regulating DLL4 expression downstream VEGF. Moreover, constitutively active FOXC2 did not affect *DLL4* expression.

We speculated that the induction of DLL4 by activated NOTCH might provide a positive feed-forward signaling mechanism that propagates NOTCH-signaling between neighboring ECs. Indeed, DLL4-eGFP transfected ECs induced DLL4 expression in non-transfected cells in close vicinity in a NOTCH-dependent way. As DLL4 regulates crucial processes in vascular growth, such as EC sprouting and arterial specification, a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying its regulation will undoubtedly help to develop new strategies for the treatment of blood vessel-related pathologies.

In **Chapter 3** the VEGF effect on ADAM-10 activation, an essential metalloproteinase involved in NOTCH processing and activation, has been studied. Using a Yeast-two-hybrid assay, ADAM-10 was identified as a novel binding partner of VEGFR-2. Such interaction was further confirmed by immuno-precipitation experiments. Remarkably, VEGF stimulation induced ADAM-10 expression and its activity in ECs. VEGF-activated ADAM-10 mediated ectodomain shedding of VEGFR-2, providing a negative feed-back mechanism that shuts down VEGF signaling in ECs. VEGF induced-ADAM-10 also resulted in cleavage of VE-cadherin, increasing

vascular permeability and, facilitated EC migration. Therefore, VEGF increased vascular permeability in an ADAM-10 dependent manner and inhibition of ADAM-10 reduced EC migration and chemotaxis. For the first time, we reported that ADAM-10 is expressed in human atherosclerotic lesions and associated with plaque progression and neovascularization. Altogether, these data provide evidence of a role for ADAM10 in atherosclerosis and neovascularization. As ADAM-10 is involved in NOTCH signaling proteolysis and activation, and VEGF has been reported to activate NOTCH signaling, these results provide an important link between VEGF and NOTCH signaling activation as well.

In **Chapter 4** the role of VEGF and NOTCH signaling in arterial endothelial differentiation is addressed. In mutant *Vegf120/120* mouse embryos, the endothelial cells of coronary arteries failed to gain a proper arterial phenotype (i.e. high level of activated Notch1, Jagged1, Dll4 and ephrinB2 and low levels of VEGFR-2, EphB4 and COUP-TFII), while the endothelial cells of coronary veins showed ectopic expression of the arterial markers together with low expression of the venous markers. Moreover, the media of coronary arteries was underdeveloped with decreased number of pericytes expressing α SMA, NP1, Dll1, Jagged2 and Notch3, whereas coronary veins showed an increase in cells positive for these markers.

Vegf is mainly expressed in the area where coronary arteries develop in normal mouse embryos. This part of the coronary system is expected to be subjected to high levels of VEGF-signaling due to retention of the larger VEGF splicing variants in the heparin-containing extracellular matrix and to NP-1-modulated amplification. In the subepicardially located coronary veins therefore, low VEGF-signaling levels are expected. Due to lack of retention of VEGF120 in the extracellular matrix and lack of NP-1-mediated amplification in *Vegf120/120* mouse embryo, the inverse is likely the case, leading to the observed coronary anomalies. These data imply that VEGF and the downstream NOTCH signaling are essential for arterial endothelial differentiation and arteriogenesis with consequences for coronary artery development and performance.

In **Chapter 5** the negative effect of a soluble NOTCH ligand, sJag1, on NOTCH signaling and neointima formation is studied. Rat carotid arteries subjected to balloon injury showed increase of Notch1, Notch3 and Jagged-1 expression at day 3 and 14 post-injury. In these injured vessels, Notch signaling was activated as was shown by increased expression of the NOTCH target-gene Herp2. We found that adenoviral-sJag1 transfection reduced neo-intima formation in the carotid artery and enhanced re-endothelialization, whereas adenoviral-full length Jagged-1 (Fl-Jag1) or -LacZ had no effect. As neointima is the result of uncontrolled proliferation and migration of SMCs, we analyzed the effect of sJag1 on SMCs behavior by transducing CSMCs with sJag1. In line with our expectations, sJag1 reduced both migration and proliferation of CSMCs compared to Fl-Jag1 or LacZ used as control,

whereas no effect on ECs was observed. Moreover, injury-induced Herp2 expression was dramatically reduced in injured vessels treated with adenoviral-sJag1. Accordingly, CASMCs infected with Ad-sJag1 or treated with sJag recombinant protein showed decreased Herp2 expression compared to their respective controls. These observations prompted us to speculate that sJag1 prevents SMC migration and proliferation by interfering with Herp2 mediated NOTCH signaling. In line with these speculations, overexpression of Herp2 rescued the reduced migratory capacity of sJag1-treated CASMCs. Thus, sJag1 can inhibit neo-intima formation after balloon injury by decreasing SMC proliferation and migration through interference with NOTCH-Herp2 signaling.

Chapter 6 provides a general discussion of the data presented in this thesis. First we discussed the new insights in the NOTCH and VEGF signaling molecular interaction provided by our studies. In particular, the major role of VEGFR-2 and the existence of a positive feed-forward loop - that involves activated NOTCH signaling - in VEGF-induced DLL4 expression was examined. The activation of ADAM-10 by VEGF and its implication in NOTCH signaling activation downstream of VEGF has been discussed. Second we focused on the consequence of altered NOTCH signaling at the tissue/organ level. The DLL4 blockade as potential therapeutic tool in tumor growth was introduced. In addition, the implication of VEGF and NOTCH signaling pathway in arterial differentiation and development of coronary artery was discussed. Finally we considered therapeutic use of sJag to inhibit neointima formation following PCI.

Samenvatting

In dit proefschrift zijn de vascular endothelial growth factor (VEGF) en NOTCH signaal wegen bestudeerd wegens hun rol in de ontwikkeling en functie van het bloedvat stelsel. Meer specifiek hebben we het effect van VEGF op de expressie van Delta-like 4 (DLL4) en de activiteit van NOTCH en “a desintegrin associated metalloprotease” (ADAM) in endotheel cellen onderzocht. Tenslotte hebben we enkele functionele consequenties van veranderde NOTCH activatie bekeken in vasculaire cellen als ook in bloedvaten.

Hoofdstuk 1 leidt het onderwerp van het promotieonderzoek in. Hierin worden de VEGF en NOTCH signaalwegen beschreven en wordt tevens het verband geschetst met differentiatie en het spruiten – bijvoorbeeld bij nieuwvorming van bloedvaten- van slagaderlijk endotheel. Vervolgens wordt de rol van NOTCH activatie op het gedrag van gladde spiercellen besproken en de mogelijk gevolgen daarvan voor vaatwand remodellering.

In **Hoofdstuk 2** verschaffen we nieuw inzicht in de moleculaire interactie tussen de NOTCH and VEGF signaalwegen in endotheelcellen. In humane coronaire microvasculaire endotheel cellen (HCMvECs) hebben we laten zien dat NOTCH activatie nodig was voor de expressie van DLL4 door VEGF. Deze NOTCH activatie bleek uit de inductie van het NOTCH afhankelijke “hairy enhancer of split” (HES-1) door VEGF, evenals uit reporter assays met een promotor rijk aan RBP-Jk transactivatie domeinen. Het intracellulaire domein van NOTCH (NICD) dat verantwoordelijk is voor de transcriptie-activatie, leidde ook tot overexpressie van DLL4, evenals recombinant DLL4 (rDLL4) zelf dat als ligand van NOTCH zorgt voor NOTCH activatie. In tegenstelling tot studies van anderen hebben we geen aanwijzingen gevonden dat FOXC2 betrokken is bij DLL4 expressie. Promotor constructen zonder het FOX bindende domein lieten toch activatie zien, terwijl overexpressie van FOXC2 niet leidde tot DLL4 expressie.

De observatie dat rDLL4 aanzet tot DLL4 expressie suggereert een positieve terugkoppelfunctie waarin initiëring van NOTCH activatie snel leidt tot het overdragen van de activatie op naburige cellen. Het bleek inderdaad dat DLL4 overexprimerende cellen leidde tot NOTCH activatie van naburige cellen met DLL4 expressie tot gevolg.

Omdat DLL4 betrokken is bij spruiten van nieuwe bloedvaten en bij differentiatie in slagaderlijke bloedvaten zal beter inzicht in dit proces kunnen leiden tot nieuwe therapieën.

In **Hoofdstuk 3** is het effect van VEGF op activatie van ADAM10 bestudeerd. ADAM-10 is een essentieel metalloprotease voor NOTCH activatie. In een ‘Yeast-two-hybrid’ systeem werd ADAM10 als bindingspartner van VEGFR-2 geïdentificeerd en

dit werd bevestigd door immunoprecipitatie. VEGF stimuleerde ADAM-10 expressie en activiteit in endotheelcellen. Aangezien ADAM10 op zijn beurt leidt tot afbraak van het extracellulaire deel van VEGFR-2 en daarmee de receptor inactieveert, lijkt ADAM-10 onderdeel te zijn van een negatief terugkoppelingsmechanisme. VEGF geïnduceerde ADAM-10 resulteerde ook in de afbraak van VE-cadherin en dus in verhoogde permeabiliteit en endotheelcel migratie. Deze laatste effecten bleken ook door ADAM-17 te kunnen worden bewerkstelligd. ADAM-10 blijkt in human atherosclerotische plaques voor te komen en is geassocieerd met plaque-groei en vaatnieuwvorming in de plaque. Aangezien ADAM-10 activatie noodzakelijk is voor NOTCH activatie en VEGF ook leidt tot activatie van NOTCH, is het waarschijnlijk dat ADAM-10 een noodzakelijk onderdeel is van de VEGF-NOTCH as.

In **Hoofdstuk 4** wordt de rol van VEGF en NOTCH in slagaderlijke differentiatie gedurende de embryonale ontwikkeling besproken. In *Vegf120/120* muize-embryo's vormen ondergaan endotheelcellen onvoldoende slagaderlijke differentiatie. Hun expressie van slagaderlijke kenmerken als Notch1, Jagged1, Dll4 en EphrinB2 bleef laag, terwijl aderlijke kenmerken als EphB4 en COUP-TFII hoog bleven. Aan de andere kant, werden plaatselijk slagaderlijke kenmerken gevonden in typische aderlijke posities als de kransadereën. De media van de slagaders ontwikkelde zich ook onvoldoende met verlaagde aantallen pericyten die α SMA, NP1, Dll1, Jagged2 en Notch3 exprimeren, terwijl de adereën juist meer van deze cellen recruteerden. In normale embryo's wordt vegf vooral gevonden in de gebieden waar kransslagadereën worden gevormd. Deze hoge expressie leidt tot retentie van heparine bindende varianten van vegf (zoals vegf164, 188) en deze hoge expressie wordt mogelijk nog versterkt door neuropilin-1 (NP-1) gemedieerde activatie. De adereën ontwikkelen zich in de subepicardiale laag waar lage vegf spiegels heersen. Echter, Vegf120 bindt niet aan de heparine en wordt ook niet versterkt door NP-1, zodat slagaderlijke differentiatie verminderd is. Deze observaties impliceren dat VEGF en NOTCH activatie essentieel zijn voor slagaderlijke differentiatie en daarmee voor de functie van het bloedvat stelsel als geheel.

Hoofdstuk 5 beschrijft de inhibitie van NOTCH door een niet membraan gebonden ligand, het zogenaamde 'soluble Jagged-1' (sJag1), die in een model van vaatwandschade leidt tot verminderde vorming van een neo-intima. Vaatwandschade leidt tot expressie van NOTCH1, NOTCH3 en Jagged-1 in 3–14 dagen na de schade. Bovendien was NOTCH geactiveerd aangezien we Herp-2 in deze vaten konden aantonen. Behandeling met sJag-1 verminderde de vorming van neointima en versnelde de regeneratie van endotheel in deze halsslagadereën terwijl membraan gebonden Jagged-1 of LacZ geen effect hadden. Neointima is het gevolg van gladde spiercel migratie, proliferatie en matrixeitwit synthese. In gladde spiercellen van kransslagadereën (CASMCs) leidde sJag1 inderdaad tot verminderde proliferatie en migratie alsook tot verminderde Herp-2 expressie. Gelijktijdige overexpressie van Herp-2 kon de sJag-1 verminderde migratie en proliferatie

tegenaan, wat suggereert dat NOTCH activatie inderdaad door sJag1 werd geïnhibeerd. Er werd dus geconcludeerd dat sJag1 neointima vorming remt door de migratie en proliferatie van gladde spiercellen te verminderen doordat NOTCH-Herp-2 activatie wordt verhinderd.

Hoofdstuk 6 is een algemene bespreking van alle data die in dit proefschrift worden gepresenteerd. Eerst worden de nieuwe inzichten in de interactie tussen VEGF en NOTCH signaalwegen besproken. In het bijzonder wordt het positieve terugkoppelingsmechanisme van VEGF, NOTCH activatie en DLL4 expressie bediscussieerd. ADAM-10 activatie lijkt noodzakelijk te zijn voor dit proces, terwijl afbraak van de VEGF receptor zou kunnen leiden tot een natuurlijke rem op dit systeem. Vervolgens hebben we de rol van veranderde NOTCH activatie in cel- en orgaan-systemen besproken, waarbij DLL4 blokkade therapeutisch wordt ingezet bij kanker. Bovendien blijkt tijdens de embryonale ontwikkeling NOTCH activatie nodig te zijn voor normale ontwikkeling van met name het slagaderlijke deel van het vaatstelsel. Tenslotte hebben we de mogelijkheden besproken om remming van NOTCH activatie therapeutisch in te zetten tegen excessieve neointima vorming na PCI.