

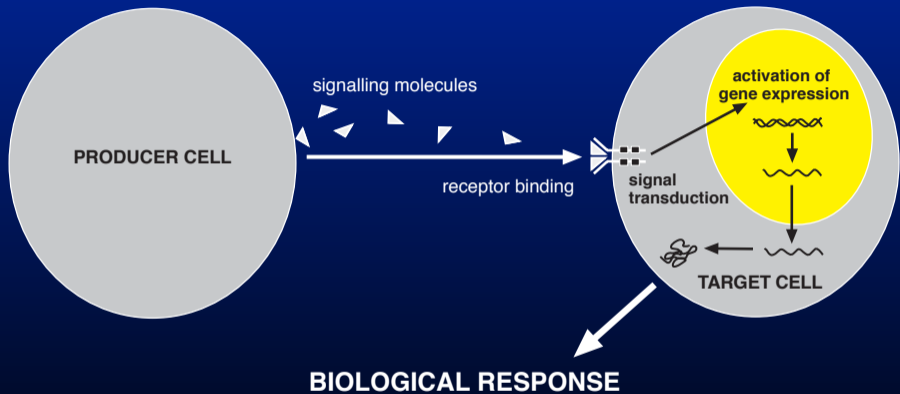
# Functional Analysis of VEGF-B and VEGF-C

Markku Michael Jeltsch  
Pro Gradu

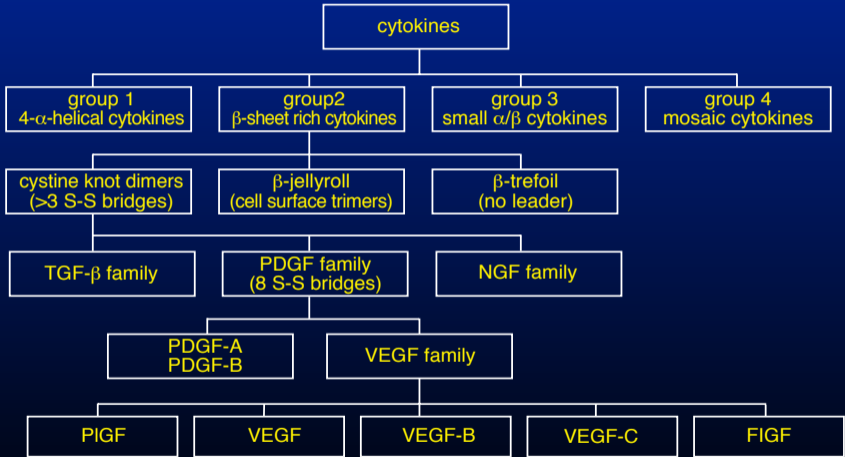
University of Helsinki  
Department of Biosciences

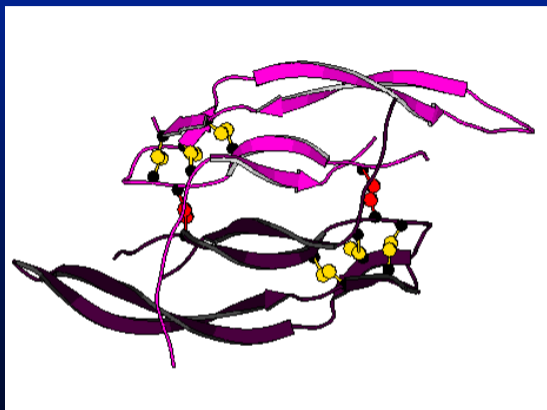
Faculty of Sciences  
Division of Biochemistry

January 1997



# THE CLASSIFICATION OF CYTOKINES





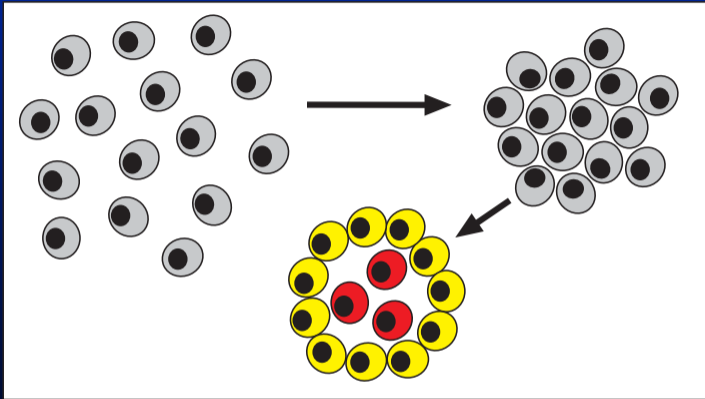
CRYSTAL STRUCTURE OF PDGF-BB

# AMINO ACID SEQUENCE ALIGNMENT OF PDGF FAMILY MEMBERS

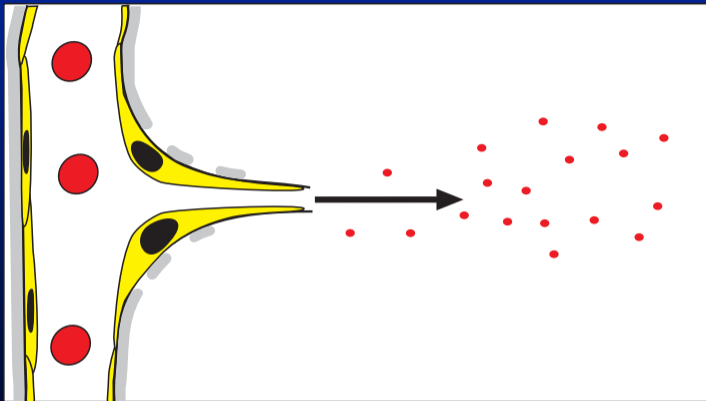
PDGF-A .....MRTLACL<sup>1</sup>LLLLGCGYL<sup>2</sup>AHVLA<sup>3</sup>EEAEI<sup>4</sup>PREVIER<sup>5</sup>LARSQ<sup>6</sup>IHS<sup>7</sup>IRDL<sup>8</sup>Q<sup>9</sup>RLL<sup>10</sup>EID<sup>11</sup>SVG<sup>12</sup>SEDSL<sup>13</sup>D<sup>14</sup>.TSL<sup>15</sup>.  
 PDGF-B .....M<sup>1</sup>NRCWA<sup>2</sup>.L<sup>3</sup>FLSL<sup>4</sup>CCY<sup>5</sup>LR<sup>6</sup>LVSA<sup>7</sup>EGD<sup>8</sup>PI<sup>9</sup>PEELY<sup>10</sup>EMLSD<sup>11</sup>HS<sup>12</sup>SIR<sup>13</sup>SFDD<sup>14</sup>L<sup>15</sup>Q<sup>16</sup>RLL<sup>17</sup>HGDP<sup>18</sup>.GEEDGA<sup>19</sup>E<sup>20</sup>LDL<sup>21</sup>..  
 PlGF-1 .....MPVM<sup>1</sup>R<sup>2</sup>LF<sup>3</sup>PC<sup>4</sup>..FL<sup>5</sup>Q<sup>6</sup>LL<sup>7</sup>AG<sup>8</sup>LAL<sup>9</sup>...P  
 VEGF165 .....MN<sup>1</sup>FLLS<sup>2</sup>..VW<sup>3</sup>HWSL<sup>4</sup>L<sup>5</sup>LL<sup>6</sup>LY<sup>7</sup>LHH  
 VEGF-B167 .....MS<sup>1</sup>PLLR<sup>2</sup>..RL<sup>3</sup>LLAAL<sup>4</sup>L<sup>5</sup>QL<sup>6</sup>AP<sup>7</sup>AQ  
 VEGF-C MHL<sup>1</sup>LG<sup>2</sup>FP<sup>3</sup>SV<sup>4</sup>AC<sup>5</sup>SL<sup>6</sup>LA<sup>7</sup>ALL<sup>8</sup>PG<sup>9</sup>PR<sup>10</sup>.E<sup>11</sup>AP<sup>12</sup>AAAA<sup>13</sup>AF<sup>14</sup>ES<sup>15</sup>GL<sup>16</sup>DL<sup>17</sup>SD<sup>18</sup>AE<sup>19</sup>PD<sup>20</sup>AGE<sup>21</sup>AT<sup>22</sup>AY<sup>23</sup>ASK<sup>24</sup>D<sup>25</sup>LE<sup>26</sup>EQ<sup>27</sup>LR<sup>28</sup>SV<sup>29</sup>SV<sup>30</sup>DEL<sup>31</sup>MT<sup>32</sup>V<sup>33</sup>LY<sup>34</sup>PEY<sup>35</sup>WK<sup>36</sup>MY<sup>37</sup>K<sup>38</sup>Q<sup>39</sup>CL<sup>40</sup>R<sup>41</sup>KG<sup>42</sup>GW<sup>43</sup>Q  
 FIGF MY<sup>1</sup>REW<sup>2</sup>V<sup>3</sup>V<sup>4</sup>V<sup>5</sup>V<sup>6</sup>VM<sup>7</sup>ML<sup>8</sup>LY<sup>9</sup>Q<sup>10</sup>LV<sup>11</sup>Q<sup>12</sup>G<sup>13</sup>SS<sup>14</sup>NE<sup>15</sup>H<sup>16</sup>GP<sup>17</sup>K<sup>18</sup>RS<sup>19</sup>SQ<sup>20</sup>TL<sup>21</sup>ERS<sup>22</sup>.....EQ<sup>23</sup>Q<sup>24</sup>I<sup>25</sup>RA<sup>26</sup>ASS<sup>27</sup>LE<sup>28</sup>EL<sup>29</sup>LR<sup>30</sup>ITH<sup>31</sup>SE<sup>32</sup>D<sup>33</sup>W<sup>34</sup>KL<sup>35</sup>WR<sup>36</sup>CL<sup>37</sup>RL<sup>38</sup>KS<sup>39</sup>F<sup>40</sup>.

PDGF-A ..AH<sup>1</sup>GV<sup>2</sup>HAT<sup>3</sup>K<sup>4</sup>H<sup>5</sup>V<sup>6</sup>PE<sup>7</sup>K<sup>8</sup>R<sup>9</sup>PL<sup>10</sup>..PI<sup>11</sup>RR<sup>12</sup>K<sup>13</sup>RS<sup>14</sup>I<sup>15</sup>.....EE<sup>16</sup>AV<sup>17</sup>PA<sup>18</sup>V<sup>19</sup>CK<sup>20</sup>TR<sup>21</sup>TV<sup>22</sup>I<sup>23</sup>YE<sup>24</sup>I<sup>25</sup>PR<sup>26</sup>SQ<sup>27</sup>VD<sup>28</sup>PTS<sup>29</sup>AN<sup>30</sup>FL<sup>31</sup>I<sup>32</sup>W<sup>33</sup>PP<sup>34</sup>CV<sup>35</sup>EV<sup>36</sup>K<sup>37</sup>RC<sup>38</sup>TG<sup>39</sup>CC<sup>40</sup>NT<sup>41</sup>SS<sup>42</sup>VK<sup>43</sup>C<sup>44</sup>Q<sup>45</sup>PS<sup>46</sup>R<sup>47</sup>VH  
 PDGF-B ..M<sup>1</sup>TR<sup>2</sup>SH<sup>3</sup>SG<sup>4</sup>GE<sup>5</sup>LES<sup>6</sup>.....L<sup>7</sup>ARG<sup>8</sup>RR<sup>9</sup>SL<sup>10</sup>G<sup>11</sup>SL<sup>12</sup>IA<sup>13</sup>E<sup>14</sup>P<sup>15</sup>AM<sup>16</sup>IA<sup>17</sup>E<sup>18</sup>CK<sup>19</sup>TR<sup>20</sup>TE<sup>21</sup>VE<sup>22</sup>FE<sup>23</sup>IS<sup>24</sup>RR<sup>25</sup>L<sup>26</sup>ID<sup>27</sup>RT<sup>28</sup>NAN<sup>29</sup>FL<sup>30</sup>V<sup>31</sup>W<sup>32</sup>PP<sup>33</sup>CV<sup>34</sup>EV<sup>35</sup>Q<sup>36</sup>RC<sup>37</sup>SG<sup>38</sup>CC<sup>39</sup>NN<sup>40</sup>RV<sup>41</sup>Q<sup>42</sup>CR<sup>43</sup>PT<sup>44</sup>Q<sup>45</sup>VQ  
 PlGF-1 AV<sup>1</sup>PP<sup>2</sup>Q<sup>3</sup>QW<sup>4</sup>.....AL<sup>5</sup>SAG<sup>6</sup>NS<sup>7</sup>SE<sup>8</sup>VE<sup>9</sup>V<sup>10</sup>PF<sup>11</sup>Q<sup>12</sup>E<sup>13</sup>.VW<sup>14</sup>GR<sup>15</sup>SY<sup>16</sup>CR<sup>17</sup>ALER<sup>18</sup>L<sup>19</sup>VD<sup>20</sup>V<sup>21</sup>VE<sup>22</sup>Y<sup>23</sup>PS<sup>24</sup>..E<sup>25</sup>VE<sup>26</sup>H<sup>27</sup>MF<sup>28</sup>PS<sup>29</sup>CV<sup>30</sup>S<sup>31</sup>LL<sup>32</sup>RC<sup>33</sup>TG<sup>34</sup>CC<sup>35</sup>G<sup>36</sup>DN<sup>37</sup>EL<sup>38</sup>HC<sup>39</sup>VP<sup>40</sup>V<sup>41</sup>ETA  
 VEGF165 AK<sup>1</sup>WS<sup>2</sup>QA<sup>3</sup>A<sup>4</sup>.....PM<sup>5</sup>AB<sup>6</sup>EG<sup>7</sup>G<sup>8</sup>Q<sup>9</sup>NH<sup>10</sup>HE<sup>11</sup>V<sup>12</sup>V<sup>13</sup>K<sup>14</sup>F<sup>15</sup>MD<sup>16</sup>.VY<sup>17</sup>QR<sup>18</sup>SY<sup>19</sup>CH<sup>20</sup>PI<sup>21</sup>ET<sup>22</sup>LV<sup>23</sup>DI<sup>24</sup>F<sup>25</sup>Q<sup>26</sup>E<sup>27</sup>Y<sup>28</sup>PD<sup>29</sup>..E<sup>30</sup>I<sup>31</sup>E<sup>32</sup>Y<sup>33</sup>I<sup>34</sup>FK<sup>35</sup>PS<sup>36</sup>CV<sup>37</sup>PL<sup>38</sup>RC<sup>39</sup>GG<sup>40</sup>CC<sup>41</sup>N<sup>42</sup>DE<sup>43</sup>GL<sup>44</sup>EC<sup>45</sup>VP<sup>46</sup>T<sup>47</sup>E<sup>48</sup>S  
 VEGF-B167 AP<sup>1</sup>VS<sup>2</sup>QP<sup>3</sup>.....D<sup>4</sup>AP<sup>5</sup>GH<sup>6</sup>QR<sup>7</sup>K<sup>8</sup>V<sup>9</sup>VS<sup>10</sup>W<sup>11</sup>ID<sup>12</sup>.VY<sup>13</sup>TR<sup>14</sup>AT<sup>15</sup>CP<sup>16</sup>RE<sup>17</sup>V<sup>18</sup>V<sup>19</sup>PL<sup>20</sup>T<sup>21</sup>VEL<sup>22</sup>MG<sup>23</sup>..TV<sup>24</sup>AK<sup>25</sup>Q<sup>26</sup>LV<sup>27</sup>PS<sup>28</sup>CV<sup>29</sup>TV<sup>30</sup>Q<sup>31</sup>RC<sup>32</sup>GG<sup>33</sup>CC<sup>34</sup>PD<sup>35</sup>D<sup>36</sup>GL<sup>37</sup>EC<sup>38</sup>VP<sup>39</sup>T<sup>40</sup>G<sup>41</sup>QH  
 VEGF-C HN<sup>1</sup>RE<sup>2</sup>Q<sup>3</sup>AN<sup>4</sup>LN<sup>5</sup>SR<sup>6</sup>TEE<sup>7</sup>..TI<sup>8</sup>K<sup>9</sup>FA<sup>10</sup>A<sup>11</sup>A<sup>12</sup>H<sup>13</sup>Y<sup>14</sup>NT<sup>15</sup>E<sup>16</sup>IL<sup>17</sup>KS<sup>18</sup>ID<sup>19</sup>NE<sup>20</sup>WR<sup>21</sup>K<sup>22</sup>T<sup>23</sup>QC<sup>24</sup>MP<sup>25</sup>RE<sup>26</sup>VC<sup>27</sup>ID<sup>28</sup>V<sup>29</sup>G<sup>30</sup>KE<sup>31</sup>FG<sup>32</sup>V<sup>33</sup>..AT<sup>34</sup>NT<sup>35</sup>FF<sup>36</sup>KK<sup>37</sup>PP<sup>38</sup>CV<sup>39</sup>SV<sup>40</sup>Y<sup>41</sup>RC<sup>42</sup>GG<sup>43</sup>CC<sup>44</sup>N<sup>45</sup>SE<sup>46</sup>GL<sup>47</sup>QC<sup>48</sup>MT<sup>49</sup>ST<sup>50</sup>S  
 FIGF .....T<sup>1</sup>S<sup>2</sup>M<sup>3</sup>D<sup>4</sup>S<sup>5</sup>R<sup>6</sup>S<sup>7</sup>AS<sup>8</sup>H<sup>9</sup>R<sup>10</sup>STR<sup>11</sup>FA<sup>12</sup>AT<sup>13</sup>F<sup>14</sup>Y<sup>15</sup>DI<sup>16</sup>ET<sup>17</sup>L<sup>18</sup>K<sup>19</sup>V<sup>20</sup>ID<sup>21</sup>E<sup>22</sup>W<sup>23</sup>Q<sup>24</sup>RT<sup>25</sup>QC<sup>26</sup>SP<sup>27</sup>RE<sup>28</sup>TC<sup>29</sup>VE<sup>30</sup>V<sup>31</sup>A<sup>32</sup>SEL<sup>33</sup>GK<sup>34</sup>..ST<sup>35</sup>NT<sup>36</sup>FF<sup>37</sup>KK<sup>38</sup>PP<sup>39</sup>CV<sup>40</sup>N<sup>41</sup>V<sup>42</sup>FR<sup>43</sup>CG<sup>44</sup>CC<sup>45</sup>NE<sup>46</sup>ES<sup>47</sup>LI<sup>48</sup>C<sup>49</sup>MT<sup>50</sup>ST<sup>51</sup>S

PDGF-A HRS<sup>1</sup>V<sup>2</sup>K<sup>3</sup>V<sup>4</sup>AK<sup>5</sup>VE<sup>6</sup>Y<sup>7</sup>VR<sup>8</sup>KK<sup>9</sup>PK<sup>10</sup>L<sup>11</sup>KE<sup>12</sup>V<sup>13</sup>Q<sup>14</sup>VR<sup>15</sup>LEE<sup>16</sup>H<sup>17</sup>LE<sup>18</sup>CA<sup>19</sup>CT<sup>20</sup>TS<sup>21</sup>LN<sup>22</sup>PD<sup>23</sup>Y<sup>24</sup>RE<sup>25</sup>ED<sup>26</sup>TD<sup>27</sup>VR  
 PDGF-B LRP<sup>1</sup>V<sup>2</sup>Q<sup>3</sup>VR<sup>4</sup>K<sup>5</sup>IE<sup>6</sup>IV<sup>7</sup>R<sup>8</sup>KK<sup>9</sup>PI<sup>10</sup>FK<sup>11</sup>KAT<sup>12</sup>VT<sup>13</sup>LED<sup>14</sup>H<sup>15</sup>LA<sup>16</sup>CK<sup>17</sup>ET<sup>18</sup>VAA<sup>19</sup>ARP<sup>20</sup>V<sup>21</sup>TR<sup>22</sup>SP<sup>23</sup>GG<sup>24</sup>S<sup>25</sup>Q<sup>26</sup>E<sup>27</sup>Q<sup>28</sup>RA<sup>29</sup>KT<sup>30</sup>P<sup>31</sup>Q<sup>32</sup>TR<sup>33</sup>VT<sup>34</sup>IR<sup>35</sup>TV<sup>36</sup>RV<sup>37</sup>RR<sup>38</sup>PP<sup>39</sup>KG<sup>40</sup>K<sup>41</sup>HR<sup>42</sup>FK<sup>43</sup>HT<sup>44</sup>HD<sup>45</sup>K<sup>46</sup>TAL<sup>47</sup>KE...  
 PlGF-1 NVT<sup>1</sup>M<sup>2</sup>QL<sup>3</sup>L<sup>4</sup>KIR<sup>5</sup>SG<sup>6</sup>..DR<sup>7</sup>P<sup>8</sup>.SY<sup>9</sup>VEL<sup>10</sup>T<sup>11</sup>PS<sup>12</sup>QH<sup>13</sup>VR<sup>14</sup>CE<sup>15</sup>CR<sup>16</sup>PL<sup>17</sup>RE<sup>18</sup>K<sup>19</sup>M<sup>20</sup>K<sup>21</sup>PER<sup>22</sup>CG<sup>23</sup>D<sup>24</sup>V<sup>25</sup>AP<sup>26</sup>RR  
 VEGF165 NIT<sup>1</sup>M<sup>2</sup>Q<sup>3</sup>IM<sup>4</sup>RI<sup>5</sup>K<sup>6</sup>PH<sup>7</sup>..QG<sup>8</sup>Q<sup>9</sup>.HI<sup>10</sup>G<sup>11</sup>EM<sup>12</sup>S<sup>13</sup>FL<sup>14</sup>QH<sup>15</sup>NK<sup>16</sup>CE<sup>17</sup>CR<sup>18</sup>PK<sup>19</sup>K<sup>20</sup>DR<sup>21</sup>.....AR<sup>22</sup>Q<sup>23</sup>EN<sup>24</sup>PC<sup>25</sup>GP<sup>26</sup>CS<sup>27</sup>ERR<sup>28</sup>..HL<sup>29</sup>F<sup>30</sup>V<sup>31</sup>Q<sup>32</sup>D<sup>33</sup>P<sup>34</sup>T<sup>35</sup>CK<sup>36</sup>CS<sup>37</sup>CK<sup>38</sup>NT  
 .....DS<sup>39</sup>R<sup>40</sup>CK<sup>41</sup>AR<sup>42</sup>Q<sup>43</sup>L<sup>44</sup>..EL<sup>45</sup>..N<sup>46</sup>ERT<sup>47</sup>CR<sup>48</sup>CK<sup>49</sup>K<sup>50</sup>PR<sup>51</sup>R  
 VEGF-B167 QVR<sup>1</sup>M<sup>2</sup>Q<sup>3</sup>IL<sup>4</sup>MIR<sup>5</sup>YP<sup>6</sup>SS<sup>7</sup>Q<sup>8</sup>...LG<sup>9</sup>EM<sup>10</sup>S<sup>11</sup>LEE<sup>12</sup>H<sup>13</sup>S<sup>14</sup>Q<sup>15</sup>CE<sup>16</sup>CR<sup>17</sup>PK<sup>18</sup>KK<sup>19</sup>D<sup>20</sup>.....SA<sup>21</sup>V<sup>22</sup>K<sup>23</sup>PD<sup>24</sup>SR<sup>25</sup>PL<sup>26</sup>C<sup>27</sup>PR<sup>28</sup>CT<sup>29</sup>QH<sup>30</sup>H<sup>31</sup>Q<sup>32</sup>..RP<sup>33</sup>..D<sup>34</sup>PR<sup>35</sup>T<sup>36</sup>CR<sup>37</sup>CR<sup>38</sup>RR<sup>39</sup>  
 .....S<sup>40</sup>FL<sup>41</sup>RC<sup>42</sup>Q<sup>43</sup>GR<sup>44</sup>GL<sup>45</sup>..EL<sup>46</sup>..NP<sup>47</sup>DT<sup>48</sup>CR<sup>49</sup>CR<sup>50</sup>KL<sup>51</sup>RR  
 VEGF-C YLS<sup>1</sup>KT<sup>2</sup>LF<sup>3</sup>EI<sup>4</sup>TV<sup>5</sup>PL<sup>6</sup>S<sup>7</sup>Q<sup>8</sup>GP<sup>9</sup>.KP<sup>10</sup>VT<sup>11</sup>IS<sup>12</sup>PAN<sup>13</sup>H<sup>14</sup>TS<sup>15</sup>CR<sup>16</sup>MS<sup>17</sup>KL<sup>18</sup>DV<sup>19</sup>.YR<sup>20</sup>Q<sup>21</sup>V<sup>22</sup>HS<sup>23</sup>I<sup>24</sup>IR<sup>25</sup>RS<sup>26</sup>.LP<sup>27</sup>AT<sup>28</sup>LP<sup>29</sup>QC<sup>30</sup>QA<sup>31</sup>ANK<sup>32</sup>T<sup>33</sup>CP<sup>34</sup>TNY<sup>35</sup>M<sup>36</sup>WN<sup>37</sup>N<sup>38</sup>HI<sup>39</sup>CR<sup>40</sup>CLA<sup>41</sup>QE  
 .....LA<sup>42</sup>Q<sup>43</sup>ED<sup>44</sup>FM<sup>45</sup>F<sup>46</sup>SS<sup>47</sup>D<sup>48</sup>AG<sup>49</sup>DD<sup>50</sup>ST<sup>51</sup>D<sup>52</sup>GF<sup>53</sup>H<sup>54</sup>DI<sup>55</sup>CG<sup>56</sup>.PN<sup>57</sup>K<sup>58</sup>..EL<sup>59</sup>..DE<sup>60</sup>ET<sup>61</sup>C<sup>62</sup>Q<sup>63</sup>CV<sup>64</sup>CR<sup>65</sup>AG  
 .....LR<sup>66</sup>P<sup>67</sup>AS<sup>68</sup>CG<sup>69</sup>.PH<sup>70</sup>K<sup>71</sup>..EL<sup>72</sup>..DR<sup>73</sup>NS<sup>74</sup>C<sup>75</sup>Q<sup>76</sup>CV<sup>77</sup>CK<sup>78</sup>KN<sup>79</sup>K  
 .....LF<sup>80</sup>PS<sup>81</sup>Q<sup>82</sup>CG<sup>83</sup>.AN<sup>84</sup>R<sup>85</sup>..EF<sup>86</sup>..DE<sup>87</sup>NT<sup>88</sup>C<sup>89</sup>Q<sup>90</sup>CV<sup>91</sup>CK<sup>92</sup>RT  
 .....CP<sup>93</sup>.RN<sup>94</sup>Q<sup>95</sup>..PL<sup>96</sup>..NP<sup>97</sup>G<sup>98</sup>KA<sup>99</sup>CE<sup>100</sup>CT<sup>101</sup>ES  
 .....P<sup>102</sup>Q<sup>103</sup>K<sup>104</sup>CL<sup>105</sup>L<sup>106</sup>KG<sup>107</sup>..KF<sup>108</sup>..HH<sup>109</sup>Q<sup>110</sup>T<sup>111</sup>CS<sup>112</sup>Y<sup>113</sup>RR  
 .....P<sup>114</sup>CT<sup>115</sup>NR<sup>116</sup>Q<sup>117</sup>KA<sup>118</sup>CE<sup>119</sup>PG<sup>120</sup>F<sup>121</sup>SY<sup>122</sup>SEE<sup>123</sup>V<sup>124</sup>CR<sup>125</sup>CV<sup>126</sup>PS<sup>127</sup>Y<sup>128</sup>WK<sup>129</sup>RP<sup>130</sup>Q<sup>131</sup>MS  
 FIGF YIS<sup>1</sup>K<sup>2</sup>Q<sup>3</sup>LF<sup>4</sup>EI<sup>5</sup>SV<sup>6</sup>PL<sup>7</sup>TS<sup>8</sup>V<sup>9</sup>P<sup>10</sup>.EL<sup>11</sup>V<sup>12</sup>P<sup>13</sup>V<sup>14</sup>K<sup>15</sup>VAN<sup>16</sup>H<sup>17</sup>T<sup>18</sup>G<sup>19</sup>CK<sup>20</sup>CL<sup>21</sup>PT<sup>22</sup>AP<sup>23</sup>R<sup>24</sup>HP<sup>25</sup>Y<sup>26</sup>..SI<sup>27</sup>IR<sup>28</sup>RS<sup>29</sup>Q<sup>30</sup>I<sup>31</sup>PE<sup>32</sup>ED<sup>33</sup>R<sup>34</sup>CS<sup>35</sup>HS<sup>36</sup>SK<sup>37</sup>KL<sup>38</sup>CP<sup>39</sup>ID<sup>40</sup>ML<sup>41</sup>WD<sup>42</sup>SN<sup>43</sup>CK<sup>44</sup>CK<sup>45</sup>V  
 .....L<sup>46</sup>.QE<sup>47</sup>EN<sup>48</sup>PL<sup>49</sup>AG<sup>50</sup>TE<sup>51</sup>.DH<sup>52</sup>SH<sup>53</sup>L<sup>54</sup>Q<sup>55</sup>E<sup>56</sup>PAL<sup>57</sup>CG<sup>58</sup>.PH<sup>59</sup>M<sup>60</sup>..MF<sup>61</sup>..DE<sup>62</sup>DR<sup>63</sup>CE<sup>64</sup>CV<sup>65</sup>CK  
 .....TP<sup>66</sup>CP<sup>67</sup>.K<sup>68</sup>DL<sup>69</sup>..IQ<sup>70</sup>..HP<sup>71</sup>KN<sup>72</sup>CS<sup>73</sup>CF<sup>74</sup>E<sup>75</sup>CK  
 .....ES<sup>76</sup>LET<sup>77</sup>CC<sup>78</sup>Q<sup>79</sup>.KH<sup>80</sup>K<sup>81</sup>..LF<sup>82</sup>..HP<sup>83</sup>DT<sup>84</sup>CS<sup>85</sup>CE<sup>86</sup>DR<sup>87</sup>CP  
 .....FH<sup>88</sup>TR<sup>89</sup>P<sup>90</sup>CAS<sup>91</sup>G<sup>92</sup>KT<sup>93</sup>.....ACA<sup>94</sup>HK<sup>95</sup>CR<sup>96</sup>FP<sup>97</sup>KE<sup>98</sup>KR...



## VASCULOGENESIS



## ANGIOGENESIS

# Angiogenesis in the adult

Female reproductive cycle and pregnancy

Exercise-induced angiogenesis

Wound healing

Skin diseases

Rheumatoid arthritis

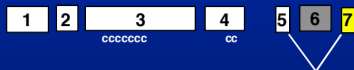
Ocular neovascularization

Ischemic heart and limbs

Tumor angiogenesis

Vascular endothelial growth factor (VEGF)	(Connolly, et al., JBC, 264: 20017-24, Leung, et al., Science, 246: 1306-9, Plouët, et al., EMBO J, 8: 3801-6)	Identity to VEGF in the VEGF homology domain
Placental growth factor (PlGF)	(Maglione, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 9267-71)	~53%
VEGF-B/VEGF-related factor (VRF)	(Grimmond, et al., Genome Res, 6: 124-131, Olofsson, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 2576-81, Olofsson, et al., JBC, 271: 19310-19317, Townson, et al., Biochem Biophys Res Com, 220: 922-8)	~43%
VEGF-C/VEGF-related protein (VRP)	(Joukov, et al., EMBO J, 15: 290-98, Lee, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 1988-1992)	~30%
C-fos-induced growth factor (FIGF)	(Orlandini, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 11675-80)	~27%
Flt-1 (VEGFR-1)	(Shibuya, et al., Oncogene, 5: 519-524)	Identity to Flt-1 in the extracellular domain
Flk-1/KDR (VEGFR-2)	(Matthews, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 9026-30, Terman, et al., Oncogene, 6: 1677-83)	~36%
Flt-4 (VEGFR-3)	(Galland, et al., Genomics, 13: 475-8, Pajusola, et al., Cancer Res, 52: 5738-43)	~33%

PIGF



VEGF



VEGF-B



VEGF-C



ccccccc

cc

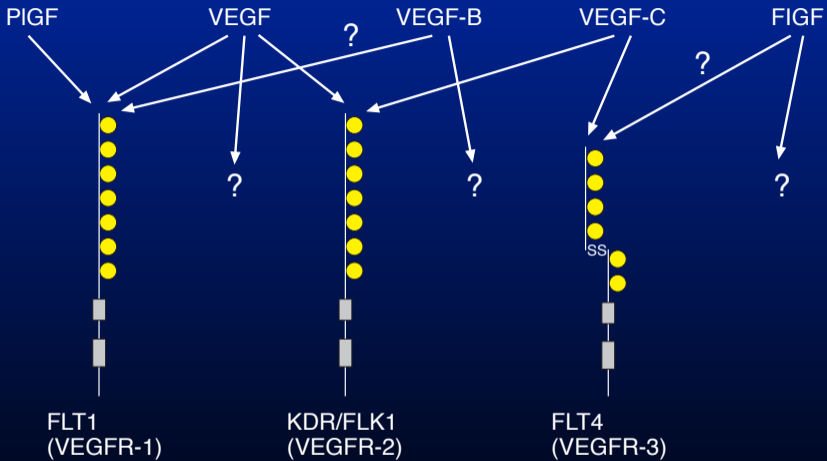
8 conserved cystein residues of the cystine knot consensus sequence (PDGF family subtype) C(24-26X)C(5X)CXXCC(6X)C32-36)CXC

cccc

4 conserved cysteins of the BR3P repeat C(10-14X)CXCXC

ccc

3 conserved cysteins of an incomplete BR3P repeat C(10-14X)CXC



## **Aim**

Comparison of the biological effects of VEGF, VEGF-B and VEGF-C in vivo

## **Hypothesis**

VEGF-C is a growth factor for lymphatic endothelial cells

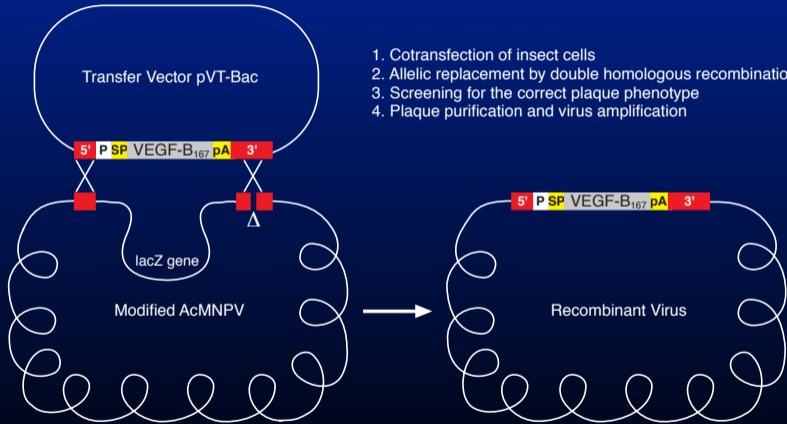
## **Approaches**

Transgenic mice overexpressing VEGF-B and VEGF-C

Direct application of recombinant VEGF-B and VEGF-C

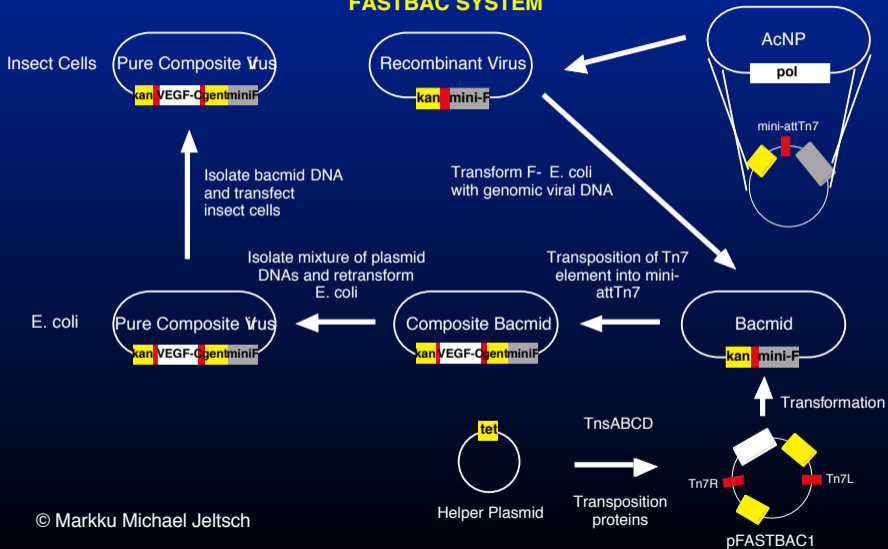
# THE BACULOVIRUS PROTEIN EXPRESSION SYSTEM

## ALLELIC REPLACEMENT IN INSECT CELLS



# THE BACULOVIRUS PROTEIN EXPRESSION SYSTEM

## FASTBAC SYSTEM





Infection of HF cells with recombinant virus



Harvest of cell supernatant



Concentration of cell supernatant by ultrafiltration



His<sub>6</sub>-tag affinity chromatography (Ni<sup>2+</sup> NTA)



Size exclusion chromatography (Sephadex G-25)



Quantitative, qualitative and functional assays

Coomassie Brilliant Blue staining

Western blotting & detection with VEGF-C specific antibody

Stimulation of receptor tyrosine phosphorylation in transfected NIH-3T3 cells

# Applications

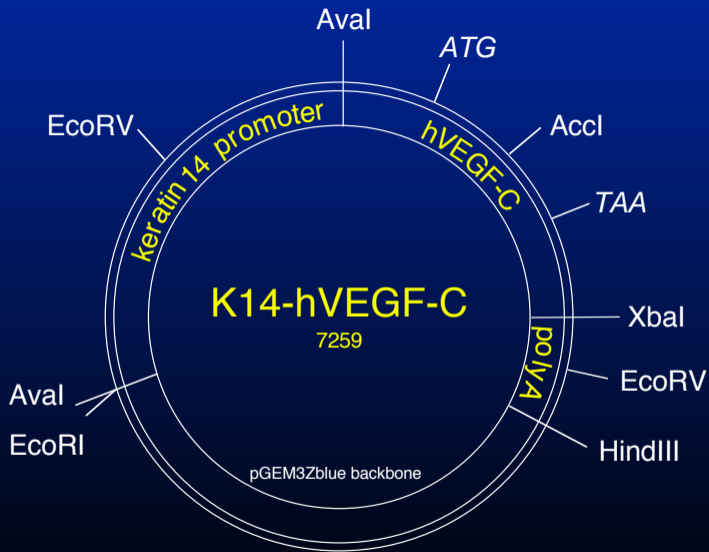
Chorioallantoic membrane assay

Rabbit cornea assay

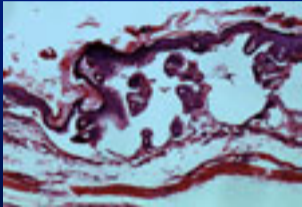
Injection into quail embryos

Effects on non-endothelial cells

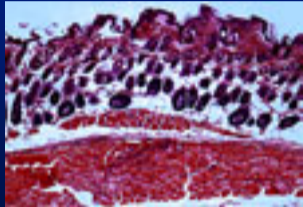
Antibody production







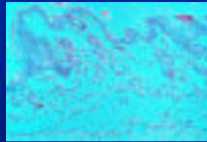
dorsal skin



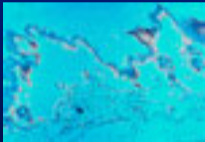
control mouse



VEGF-C



VEGF-C, sense control



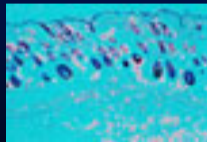
Flt-4



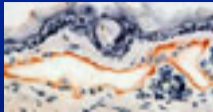
Flt-4, control mouse



FLK-2



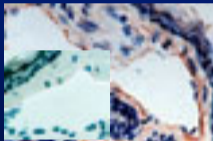
FLK-2, control mouse



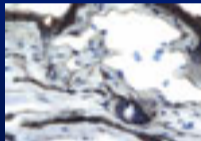
PECAM



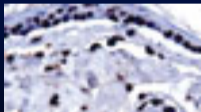
Desmoplakin I & II



Flt-4



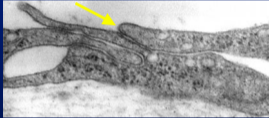
Collagen XVIII



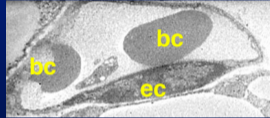
BrdU



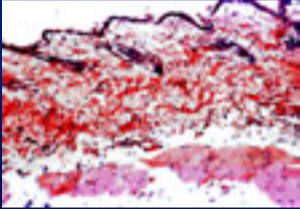
BrdU, control



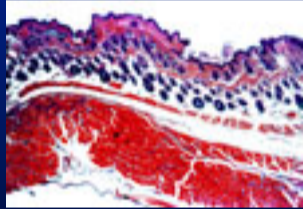
abnormal vessel



blood vessel



dorsal skin (VEGF-B<sub>167</sub>  
transgenic mouse)



control mouse

## Conclusions

VEGF-C is a growth factor specific for lymphatic endothelial cells and causes hyperplasia of the lymphatic vasculature in vivo

VEGF-C acts in a paracrine fashion

The biological role of VEGF-B remains unknown and mysterious

## The Molecular/Cancer Biology Laboratory, Haartman Institute

Athina Lymboussaki  
Dmitry Chilov  
Eija Korpelainen  
Elena Arighi  
Eola Kukk  
Erika Hatva  
Imre Västrik  
Isto Lahtinen  
Juha Klefström  
Kari Alitalo

Katri Pajusola  
Niklas Ekman  
Matthias Bergman  
Satu Vainikka  
Suvi Taira  
Tarja Sorsa  
Yuji Gunji  
Vijay Kumar  
Vladimir Joukov

Special thanks to Nina Korsisaari for assembling the first baculovirus shuttle vectors and Arja Kaipainen for continuing the analysis of the K14-VEGF-C mice while I was writing my Pro Gradu.

## My collaborators from outside the Haartman Institute

Sirpa Kontusaari (University of Oulu):  $\alpha$ -MHC mice

Stefano Mandriotta (University of Geneva): RIP mice

Xiao-Juan Meng, Merja Lakso and Heikki Rauvala (University of Helsinki, Viikki Biocentre): K14 mice

Ilkka Julkunen (National Public Health Institute, Helsinki): Expertise and practical help in the baculoviral work