

Diss. ETH No. 15469

Short N-Terminal Regions of the Calcitonin-Like Receptor Define Ligand Specificity

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences ETH

presented by

DANIELA KOLLER
fed. dipl. pharm. ETH
born September 26, 1972
citizen of Appenzell (AI), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner
Prof. Dr. J. A. Fischer, co-examiner

2004

Summary

Calcitonin (CT), α - and β -CT gene-related peptide (CGRP), adrenomedullin(AM), and amylin belong to the calcitonin family of peptides. Six or seven amino acid ring structures, formed by disulfide bonds between cysteine residues, and amidated carboxyl-termini in all these peptides are required for the biological actions. Calcitonin receptors (CTR) and initially orphan CT-like receptors (CLR) with 60% amino acid sequence similarity belong to the class B1 of G protein-coupled receptors (GPCR). The structure of the receptors for CGRP, AM and amylin were established following the discovery in 1998 of three single transmembrane-domain receptor-activity-modifying proteins (RAMP). The RAMP are required as accessory proteins for the functional expression of the CLR. CLR/RAMP1 and -2 heterodimers recognize CGRP and AM, respectively. With RAMP3 the CLR interacts with CGRP and AM. The CTR does not require RAMP to recognize CT, but the receptor associates with RAMP1 and RAMP3 to form mixed type CGRP/amylin and amylin receptors, respectively.

In the present thesis, mechanisms of interaction of the CLR with RAMP1 and RAMP2 and their ligands CGRP and AM have been investigated. Eighteen N-terminal extracellular amino acid residues adjacent to the signal sequence of the CLR share little sequence homology with the corresponding region of the CTR. The importance of this sequence for the function of the CLR has been studied. The 18 N-terminal amino acids of the human (h) CLR were either deleted (Δ 18-hCLR) or substituted by the corresponding sequence of a porcine (p) CTR, to reveal a chimeric pCTR-hCLR. The Δ 18-hCLR was inactive in the absence and presence of hRAMP1 or -2. But the pCTR-hCLR co-expressed with hRAMP1 recognized CGRP, while the interaction with AM in the presence of hRAMP2 was abolished.

In the mouse (m) CLR, progressive truncation from the N-terminus up to amino acid 20 resulted in a progressive decrease in AM recognition in the presence of mRAMP2. A detailed analysis was achieved with the introduction of deletion and alanine substitution mutations. This allowed us to identify the amino acid sequence 14 to 20 as an important structural domain within the mCLR required for its functional expression as a mCLR/mRAMP2 AM receptor. Importantly, the deletion of the amino acids 14 to 20 of the mCLR minimally affected the CGRP receptor function in the presence of mRAMP1. The substitution of the amino acids 14 to 20 by alanine residues partially restored the functional expression of the mCLR/mRAMP2 AM receptor. Moreover, the deletion of the amino acids 14 to 17 or 14 to 20 in the mCLR altered its structure in a way that chemical cross-linking was no longer possible.

In another approach, the functional role of the amino acids 64 to 74 of the mCLR with the sequence CNRTWDGWLCW was investigated. This sequence is highly conserved in family B1 GPCR. D⁶⁹ was mutated in the mCLR to alanine and glutamic acid. D69A and D69E mutations impaired the complex formation with RAMP1 and as a consequence abolished CGRP binding and signaling.

In conclusion, the extreme N-terminal 18 and 20 amino acids in the human and mouse CLR are important for high affinity interactions of CLR/RAMP1 and -2 heterodimers with CGRP and AM. The deletion of the amino acids TRNKIMT 14 to 20 in the mCLR suppressed the functional expression of the AM/CLR/RAMP complex, while maintaining CGRP receptor function with RAMP1. Moreover, aspartate⁶⁹ in the mCLR, which is conserved in family B1 GPCR is required for heterodimerization of the CLR with RAMP1 or -2 and as a consequence CGRP and AM receptor binding and signaling.

Kurzfassung

Calcitonin (CT), α - und β -*Calcitonin gene-related peptide* (CGRP), Adrenomedullin (AM) und Amylin sind sich strukturell ähnlich. Gemeinsam sind zwei Cysteine, die Disulfidbrücken und damit Ringstrukturen von sechs bis sieben Aminosäuren bilden. Diese Ringstrukturen, sowie amidierter C-Termini sind für die biologische Aktivität unerlässlich. Die Struktur der Rezeptoren für CGRP, AM und Amylin wurde 1998 durch die Entdeckung von drei *receptor-activity-modifying proteins* (RAMP) etabliert. Die RAMP bilden mit dem *CT-like receptor* (CLR) und dem *CT receptor* (CTR) Heterodimere. Ohne RAMP erkennt der CLR keine bekannten Liganden. Der CTR benötigt für seine Funktion als Rezeptor für CT kein RAMP. Zusammen mit RAMP1 wird er ein CGRP/Amylin-Rezeptor und mit RAMP3 ein Rezeptor für Amylin. CLR/RAMP1-Heterodimere sind CGRP- und CLR/RAMP2-Heterodimere AM-Rezeptoren. Damit wurde ein neues Prinzip der Funktion von an G Proteine gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gefunden. Die Aminosäuresequenz des CTR und des CLR sind 30% gleich und 60% ähnlich. Beide Rezeptoren gehören zur Familie B1 der GPCR.

In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionsmechanismen des CLR mit RAMP1 und -2 und dessen Liganden CGRP und AM untersucht. Die an die Signalsequenz des CLR anschliessenden 18 Aminosäuren bilden das extrazelluläre, N-terminale Ende und unterscheiden sich in ihrer Sequenz von der entsprechenden Stelle im CTR. Im menschlichen (h) CLR wurden diese 18 Aminosäuren entfernt (Δ 18-hCLR) oder durch die entsprechende Aminosäuresequenz eines CTR des Schweins (pCTR) ersetzt. Daraus entstand der chimäre pCTR-hCLR. Der Δ 18-hCLR war mit und ohne hRAMP inaktiv. Der chimäre pCTR-hCLR assoziiert mit hRAMP1 erkennt CGRP ähnlich dem Wildtyp. Der pCTR-hCLR/hRAMP2-Komplex geht mit AM keine erkennbare Interaktion ein.

Mit der zunehmenden Verkürzung des N-Terminus des murinen (m) CLR bis zur Aminosäure 20 wurde die AM-Rezeptorinteraktion vermindert. Die CGRP-Rezeptorfunktion wurde nur wenig beeinträchtigt. Mit der Deletion oder der Alanin-Substitution der Aminosäuren 14 bis 20 des mCLR wurde eine Rezeptordomäne identifiziert, die für die Erkennung des AM als Liganden durch den mCLR/mRAMP2 Komplex wichtig ist. Die gleiche Deletion der Aminosäuren 14 bis 20 führt zu keiner Beeinträchtigung des Signaling durch CGRP am Rezeptor/RAMP1 Komplex. Eine Stimulation von cAMP durch AM ist in mCLR(Δ 14-20)/mRAMP2 exprimierenden Zellen nicht erkennbar, obwohl beide Proteine an der Zelloberfläche exprimiert sind. Der Ersatz der Aminosäuren 14 bis

20 durch Alanine führte zu einer 100-fach verminderten EC_{50} des mCLR für AM. Ausserdem wurde die Struktur des mCLR durch das Fehlen der Aminosäuren 14 bis 17 und 14 bis 20 so verändert, dass der mCLR an der Zelloberfläche nicht mehr mit mRAMP2 über freie Aminogruppen gekrosslinkt werden konnte.

Die Aminosäuren 64 bis 74 des mCLR mit der Sequenz CNRTWDGWLCW bilden eine in der Familie B1 konservierte Domäne. D⁶⁹ ist allen gemeinsam. D69A- und D69E-Mutationen führten zu einer verminderten Komplexbildung mit mRAMP1 und dadurch zum Verlust einer cAMP-Stimulierung durch CGRP.

Die Resultate können wie folgt zusammengefasst werden: die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren des hCLR und die ersten 18 Aminosäuren des mCLR sind wichtig für die hoch affine Interaktion der CLR/RAMP1- und CLR/RAMP2-Komplexe mit CGRP oder AM. Die Deletion der Aminosäuren 14 bis 20 im mCLR verhindert die Bildung eines aktiven AM-Rezeptors mit mRAMP2, ohne jedoch die CGRP-Rezeptorfunktion mit assoziiertem mRAMP1 zu beeinträchtigen. Überdies ist das konservierte Aspartat⁶⁹ im mCLR für die Heterodimerisierung des mCLR mit mRAMP1 oder -2, und somit für dessen Funktion als CGRP oder AM-Rezeptor unerlässlich.