



Doctoral Thesis

## Functional interaction of receptor-activity-modifying proteins (RAMP) with G protein-coupled receptors

**Author(s):**

Müller-Steiner, Sarah

**Publication Date:**

2003

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004625510> →

**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](#).

Diss. ETH No. 15236

# **Functional Interaction of Receptor-Activity- Modifying Proteins (RAMP) with G Protein- coupled Receptors**

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

presented by

**SARAH MUELLER-STEINER**

fed. dipl. pharm.

born January 24, 1975

citizen of Niedergesteln (VS), Switzerland

Hohtenn (VS), Switzerland

Dättlikon (ZH), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Möhler, examiner

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

2003

## Summary

The calcitonin family of peptides consists of calcitonin (CT),  $\alpha$ - and  $\beta$ -calcitonin gene-related peptide (CGRP), adrenomedullin (AM) and amylin. They have in common 6- or 7 amino acid ring structures, linked by disulfide bonds between cysteine residues, and amidated carboxyl-termini, required for biological activity. Due to limited structural similarities, they exhibit cross-reaction with their receptors which results in overlapping biological actions, e.g. vasodilatation and inhibition of bone resorption. Calcitonin receptors (CTR) and initially orphan calcitonin-like receptors (CLR) with 60% amino acid sequence similarity belong to the class B of G protein-coupled receptors (GPCRs). Until 1997, no molecular structures could be assigned to CGRP, AM and amylin receptors. The discovery of three novel single transmembrane domain proteins, called receptor-activity-modifying proteins (RAMP) interacting with the CLR and CTR has revealed a new paradigm of G protein-coupled receptor function. RAMPs are small type I transmembrane proteins with 30% structural homology. The human (h) CLR requires the presence of RAMP1 or RAMP2 for its functional expression at the cell surface as a CGRP or AM receptor, respectively. Moreover, a hCTR is an amylin/CGRP or an amylin receptor in the presence of RAMP1 and -3, respectively.

hRAMP1 consists of an N-terminal extracellular domain of 91 amino acids, including 6 cysteine residues, a single transmembrane domain and a short C-terminal intracellular QSKRTEGIV sequence. Deletion of the N-terminal cysteine of RAMP1 and substitution of the fifth cysteine by an alanine maintained wild-type activity, whereas single Cys $\rightarrow$ Ala substitutions at the other four positions abolished RAMP1 function. Interestingly, C-terminal truncation of RAMP1 by four amino acids

maintained receptor function and the CLR was required for the transport of RAMP1 to the cell surface. Further truncation of RAMP1 through removal of the remaining five intracellular amino acids revealed CLR-independent cell surface delivery, but otherwise normal RAMP1 activity. The intracellular QSKRT sequence contains a signal for intracellular retention that is overridden in the RAMP1/CLR complex. Sequential shortening of the RAMP1 transmembrane domain resulted in progressively impaired association with the CLR and, as a consequence, abolished CGRP receptor function.

In conclusion, the 9 amino acid intracellular tail is not required for the functional association with the CLR. The 4 cysteine residues in the N-terminal extracellular domain of RAMP1, that are conserved in RAMP2 and -3, are important for the co-transport with the CLR to the cell surface and, as a consequence, for normal CGRP receptor function of the RAMP1/CLR complex. This is consistent with two disulfide bridges required for proper folding of RAMP1.

## Kurzfassung

Die Calcitonin-Peptidfamilie setzt sich zusammen aus Calcitonin (CT),  $\alpha$ - und  $\beta$ -Calcitonin *gene-related peptide* (CGRP), Adrenomedullin (AM) und Amylin. Ihnen gemeinsam sind Ringstrukturen aus 6 bis 7 Aminosäuren, gebildet durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, sowie amidierter Carboxylenden. Aufgrund ihrer begrenzten strukturellen Ähnlichkeiten zeigen sie Kreuzreaktion mit ihren Rezeptoren. Dies führt zu überlappenden biologischen Wirkungen, wie Vasodilatation und Hemmung des Knochenabbaus. Calcitonin-Rezeptoren (CTR) und die anfänglich als *orphan*-Rezeptoren publizierte Calcitonin-like receptors (CLR) weisen eine 60%ige Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz auf und gehören zur Klasse B der G Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Vermutung war naheliegend, dass es sich beim CLR um einen CGRP-Rezeptor handelt. Dieser konnte aber erst 1997 durch die Entdeckung eines neuartigen Proteins, genannt *receptor-activity-modifying protein* (RAMP), welches mit dem CLR und einem CTR interagiert, bestätigt werden. Damit wurde ein neues Prinzip der Funktion an G Proteine gekoppelten Rezeptoren vorgefunden. Die drei bekannten RAMP sind Typ I-transmembranöse Proteine mit 30%iger Homologie untereinander. Der humane CLR benötigt RAMP1 oder RAMP2 für seine funktionelle Expression als CGRP- oder AM-Rezeptor an der Zelloberfläche. Der hCTR Isotyp 2 ist ein Amylin/CGRP-Rezeptor mit RAMP1 und ein Amylin-Rezeptor mit RAMP3.

Humanes RAMP1 besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne mit 91 Aminosäuren, inklusive sechs Cysteinen, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer kurzen C-terminalen intrazellulären QSKRTEGIV Sequenz. Bei der Deletion des N-terminalen Cysteins und

der Substitution des fünften Cysteins war die Funktion von RAMP1 unverändert verglichen mit dem Wildtyp. Die Substitution der übrigen vier Cysteine durch Alanin verhinderte jedoch normale RAMP1 Funktion. C-terminale Verkürzung von RAMP1 um vier Aminosäuren zeigte unveränderte Rezeptor Funktion und der CLR wurde benötigt für den Transport von RAMP1 zur Zelloberfläche. Die Entfernung der übrigen fünf intrazellulären Aminosäuren resultierte in einem CLR unabhängigen Transport zur Zelloberfläche, aber sonst normaler RAMP1 Funktion. Die intrazelluläre QSKRT Sequenz enthält ein Signal für intrazelluläre Retention, welches durch die RAMP/CLR Komplexbildung überdeckt wird. Eine weitere Verkürzung der RAMP1 Transmembrandomäne beeinträchtigte in zunehmendem Mass die Assoziation mit dem CLR und verhinderte damit die CGRP Rezeptor Funktion.

Zusammengefasst werden die 9 Aminosäuren des intrazellulären C-Terminus für die funktionelle Assoziation mit dem CLR nicht benötigt. Die vier Cysteine der N-terminalen extrazellulären Domäne hingegen, die in RAMP2 und -3 konserviert sind, spielen eine wichtige Rolle beim Ko-Transport von RAMP1 und dem CLR zur Zelloberfläche und sind damit wichtig für die CGRP Rezeptor Funktion des RAMP1/CLR Komplexes. Dies deutet auf zwei Disulfidbrücken hin, die verantwortlich sind für die richtige Faltung von RAMP1.