

Diss. ETH No. 14062

**FUNCTIONAL INTERACTION OF  
G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS OF THE  
CALCITONIN PEPTIDE FAMILY WITH  
ACCESSORY RECEPTOR-ACTIVITY-  
MODIFYING PROTEINS (RAMP)**

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

presented by  
AMAYA ALDECOA  
fed. dipl. pharm.  
born October 28, 1971  
citizen of Basel (BS), Switzerland

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

2001

## Summary

The calcitonin family of peptides includes calcitonin (CT),  $\alpha$ - and  $\beta$ -calcitonin gene-related peptide (CGRP), adrenomedullin (ADM) and amylin. They exhibit sequence homology, including ring structures linked by a disulfide bridge between cysteine residues and amidated carboxyl-termini. The structural similarities result in overlapping biological activities such as vasodilatation and inhibition of bone resorption. In 1991, the structure of the CT receptor was identified by the group of Goldring (Harvard) through expression cloning. Two years later when the CT receptor-like receptor (CRLR) was discovered by Flühmann et al. (Zürich), its 60% sequence identity with the CT receptor suggested members of the CT peptide family as candidate ligands, but the CRLR failed to respond to any of them and therefore was deemed an orphan receptor. With the discovery of novel accessory proteins called receptor-activity-modifying proteins (RAMP) by Foord et al. (GlaxoWellcome) in 1997, a new mechanism for the regulation of G protein-coupled receptors was revealed. RAMPs constitute a group of three single transmembrane spanning proteins, designated RAMP1, -2 and -3 consisting of 148 to 175 amino acids. The expression of RAMP1 and -3 with previously cloned orphan CRLR reveals CGRP receptors whereas co-transfection with RAMP2 or -3 generates ADM receptors. Without co-expressed RAMP the CRLR remains inactive. In contrast, the CT receptor does not require RAMP for functional expression, but in the presence of RAMP1, the CT receptor recognizes CGRP and amylin, and together with RAMP3 amylin alone.

In my dissertation, I have investigated possible mechanisms of the human RAMP activity which is required for modulated receptor specificity. Differential glycosylation of human (h) and rat (r) CRLR, dependent on co-expressed RAMP, was considered to define CGRP or ADM receptors in mammalian cells. In the presence of RAMP1, CRLR was transported to the cell surface as a mature glycoprotein whereas core glycosylation was observed when CRLR was expressed alone or together with RAMP2. Studies in *Drosophila* Schneider 2 (S2) cells, stably expressing rCRLR together with RAMP1 or -2, revealed CGRP and ADM receptors that exhibited the pharmacological profile and coupling to cyclic AMP production indistinguishable from that of the CRLR and RAMP co-transfected mammalian cells. However, rCRLRs expressed in S2 cells were uniformly glycosylated proteins, independent of the presence of RAMP1 or -2. Thus, the pattern of CRLR glycosylation does not define ligand specificity in *Drosophila* Schneider 2 cells.

Crosslinking of [<sup>125</sup>I]hαCGRP and [<sup>125</sup>I]rADM to S2 cells co-expressing V5-tagged rCRLR and V5-tagged RAMP1 or -2 revealed the formation of rCRLR/RAMP1 and rCRLR/RAMP2 heterodimers on the cell surface that function as specific CGRP and ADM receptors. In cell extracts not treated with crosslinker the individual protein components with the size of rCRLR, RAMP1 and -2 were observed. Thus, direct interaction of RAMP with CRLR defines ligand specificity of the receptor for CGRP or ADM.

The functional relevance of the glycosylation of myc-tagged hCRLR was investigated through suppression of N-glycosylation with tunicamycin and site directed mutagenesis. Three putative N-glycosylation sites Asn<sup>60</sup>, Asn<sup>112</sup> and Asn<sup>117</sup> are present in the amino-terminal extracellular domain of the hCRLR. In human embryonic kidney (TSA) cells co-expressing myc-hCRLR and RAMP1 or -2, tunicamycin dose-dependently inhibited the glycosylation of the myc-hCRLR and in parallel [<sup>125</sup>I]hαCGRP and [<sup>125</sup>I]hADM binding. Site directed mutagenesis of Asn to Thr identified Asn<sup>60</sup> and Asn<sup>112</sup> as the predominant N-glycosylation sites in myc-hCRLR. Mutation of one of these two sites minimally decreased the expression of myc-hCRLR as CGRP or ADM receptor. But substitution of both Asn<sup>60</sup> and Asn<sup>112</sup> by Thr reduced cell surface expression and, as a result [<sup>125</sup>I]hαCGRP and [<sup>125</sup>I]hADM binding. The mutation of Asn<sup>117</sup> to Thr revealed a receptor mutant which is delivered to the cell surface, but specific [<sup>125</sup>I]hαCGRP and [<sup>125</sup>I]hADM binding was not detectable. Thus, N-glycosylation of hCRLR at Asn<sup>60</sup> and Asn<sup>112</sup> is important for cell surface expression whereas Asn<sup>117</sup> is essential for the interaction between ligand, receptor and RAMP.

With regard to CGRP receptor function, cell surface expression and association with RAMP1, further mutants of myc-hCRLR containing substitutions of Asn<sup>117</sup> by Ala, Asp, Gln and Pro were investigated in cells expressing the individual Asn<sup>117</sup> mutants together with RAMP1. CGRP-evoked stimulation of cyclic AMP formation was impaired by Asn<sup>117</sup> to Ala or Gln substitutions and abolished when Asn<sup>117</sup> was replaced by Thr or Pro. In contrast, CGRP receptor activity of the myc-hCRLR was not affected when Asn<sup>117</sup> was substituted by Asp. Myc-immunofluorescence-staining of intact cells revealed cell surface expression of all Asn<sup>117</sup> mutants similar to the non-modified myc-hCRLR. In TSA cells expressing V5-tagged RAMP1 together with myc-hCRLR and the various Asn<sup>117</sup> mutations, cell surface crosslinking and co-immunoprecipitation revealed the formation of hCRLR/RAMP1 complexes on the cell surface. However, crosslinked [<sup>125</sup>I]hαCGRP was only detected when non-modified myc-hCRLR or the Asp mutant were co-expressed with RAMP1. Moreover, V5-

tagged RAMP1 was shown to be co-immunoprecipitated with myc-hCRLR even in the absence of crosslinker, indicating direct molecular interaction of RAMP1 with the receptor protein. Thus, substitution of Asn<sup>117</sup> by Ala, Asp, Gln, Pro and Thr does not affect N-glycosylation, cell surface expression and association with RAMP1. But with the exception of the Asn<sup>117</sup> to Asp mutant the interaction with the receptor ligand CGRP is abolished.

## Zusammenfassung

Zur Calcitonin-Peptidfamilie gehören Calcitonin (CT),  $\alpha$ - und  $\beta$ -*calcitonin gene-related peptide* (CGRP), Adrenomedullin (ADM) und Amylin. Allen gemeinsam sind amino-terminale Ringstrukturen, die durch Disulfidbrücken zustande kommen und amidierete Carboxyl-Enden. Die strukturellen Ähnlichkeiten führen zu überlappenden biologischen Wirkungen wie Gefässerweiterung und Hemmung des Knochenabbaus. 1991 wurde die Struktur des CT Rezeptors durch die Gruppe von Goldring (Harvard) mittels Expressions-Klonierung identifiziert. Als zwei Jahre später der *CT receptor-like receptor* (CRLR) durch Flühmann et al. (Zürich) entdeckt wurde, deutete dessen 60% -ige Sequenzhomologie zum CT Rezeptor darauf hin, dass Mitglieder der Calcitonin-Peptidfamilie als mögliche Liganden in Frage kämen. Da jedoch kein Ligand für den CRLR gefunden werden konnte, wurde er als „Waisenrezeptor“ publiziert. Durch die Entdeckung neuartiger, akzessorischer Proteine, genannt *receptor-activity-modifying proteins* (RAMP) durch Foord et al. (GlaxoWellcome) 1997, wurde ein neues Konzept für die Regulierung G Protein-gekoppelter Rezeptoren aufgezeigt. Bis anhin sind drei verschiedene RAMPs, genannt RAMP1, -2 und -3 bekannt, die eine einzige Transmembrandomäne aufweisen und aus 148 bis 175 Aminosäuren bestehen. Die Expression von RAMP1 und -3 mit dem ursprünglich als „Waisenrezeptor“ beschriebenen CRLR führt zur Bildung von CGRP Rezeptoren. Zusammen mit RAMP2 oder -3 bildet der CRLR ADM Rezeptoren. Ohne koexprimiertes RAMP hingegen bleibt der CRLR inaktiv. Im Gegensatz dazu wird für die funktionelle Expression des CT Rezeptors kein RAMP benötigt. Wird der CT Rezeptor jedoch zusammen mit RAMP1 exprimiert, so kann er CGRP und Amylin erkennen und mit RAMP3 lediglich Amylin.

In meiner Dissertation habe ich mögliche Mechanismen der RAMP Aktivität, welche für die modulierte Rezeptorspezifität benötigt wird, untersucht. In Säugetierzellen wurde die unterschiedliche Glykosylierung des humanen (h) und Ratten (r) CRLR in Abhängigkeit von koexprimiertem RAMP als möglicher Mechanismus für die modulierte Ligandspezifität des Rezeptors erachtet. In Anwesenheit von RAMP1 wurde der CRLR als terminal glykosylierter Rezeptor an die Zelloberfläche transportiert. Wurde er hingegen alleine oder zusammen mit RAMP2 exprimiert, so wies er lediglich eine Grund-Glykosylierung auf. Untersuchungen in *Drosophila Schneider 2* (S2) Zellen, welche den rCRLR zusammen mit RAMP1 oder -2 stabil exprimierten, zeigten die Expression von CGRP und ADM Rezeptoren, die bezüglich Ligandspezifität, -affinität

und Stimulation der zyklischen AMP Produktion von denjenigen in Säugetierzellen nicht zu unterscheiden waren. In S2 Zellen führte die Expression des rCRLR jedoch zu einem Glykoprotein, dessen Glykosylierung, unabhängig von RAMP1 oder -2, unverändert blieb. Folglich wird die Ligandspezifität des CRLR, zumindest in *Drosophila Schneider 2* Zellen, nicht durch das Glykosylierungsmuster des Rezeptors bestimmt. Crosslinking von [<sup>125</sup>I]hαCGRP und [<sup>125</sup>I]rADM an S2 Zellen, die V5-markierten rCRLR und V5-markiertes RAMP1 oder -2 exprimierten, führte zur Bildung von rCRLR/RAMP1 und rCRLR/RAMP2 Heterodimeren an der Zelloberfläche, die als spezifische Rezeptoren CGRP und ADM erkennen. Die einzelnen Proteinkomponenten rCRLR, RAMP1 und -2 wurden in Zellextrakten beobachtet, die nicht mit Crosslinker behandelt wurden. Somit bestimmt die direkte Interaktion von RAMP mit dem CRLR die Ligandspezifität des Rezeptors für CGRP und ADM.

Die funktionelle Bedeutung der Glykosylierung von myc-markiertem hCRLR wurde durch Hemmung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin und durch Mutationen der N-Glykosylierungsstellen untersucht. Der hCRLR weist drei potentielle N-Glykosylierungsstellen bei Asn<sup>60</sup>, Asn<sup>112</sup> und Asn<sup>117</sup> am amino-terminalen Ende auf. In human embryonalen Nierenzellen (TSA), die myc-hCRLR und RAMP1 oder -2 koexprimierten, hemmte Tunicamycin dosisabhängig die Glykosylierung des myc-hCRLR und parallel dazu die [<sup>125</sup>I]hαCGRP und [<sup>125</sup>I]rADM Bindung. Durch die Mutation von Asn zu Thr wurden Asn<sup>60</sup> und Asn<sup>112</sup> als vorherrschende N-Glykosylierungsstellen des myc-hCRLR identifiziert. Die Mutation von nur einer dieser beiden Stellen verminderte die Expression des myc-hCRLR als CGRP oder ADM Rezeptor nur gering. Der gleichzeitige Austausch von Asn<sup>60</sup> und Asn<sup>112</sup> durch Thr bewirkte hingegen eine Reduktion der Zelloberflächenexpression und als Folge davon eine verminderte [<sup>125</sup>I]hαCGRP und [<sup>125</sup>I]rADM Bindung. Die Mutation von Asn<sup>117</sup> zu Thr führte zur Bildung einer Rezeptormutante, die zwar an die Zelloberfläche transportiert wurde, deren spezifische [<sup>125</sup>I]hαCGRP und [<sup>125</sup>I]rADM Bindung jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Die N-Glykosylierung bei Asn<sup>60</sup> und Asn<sup>112</sup> des myc-hCRLR ist somit wichtig für dessen Zelloberflächenexpression. Asn<sup>117</sup> hingegen ist wesentlich für die Interaktion zwischen Ligand, Rezeptor und RAMP.

Im Hinblick auf die CGRP Rezeptorfunktion, der Zelloberflächenexpression und der Assoziation mit RAMP1, wurden weitere myc-hCRLR Mutanten untersucht bei denen Asn<sup>117</sup> durch Ala, Asp, Gln oder Pro ersetzt wurde. Die neuen Mutanten wurden jeweils zusammen mit RAMP1 exprimiert. Die durch CGRP hervorgerufene Stimulation der zyklischen

AMP Bildung war vermindert durch den Austausch von Asn<sup>117</sup> durch Ala oder Gln und wurde vollständig aufgehoben bei Substitution von Asn<sup>117</sup> durch Thr oder Pro. Im Gegensatz dazu wurde die CGRP Rezeptor Aktivität des myc-hCRLR nicht beeinflusst, wenn Asn<sup>117</sup> durch Asp ersetzt wurde. Die myc-Immunfluoreszenzfärbung intakter Zellen liess eine Zelloberflächenexpression aller Asn<sup>117</sup> Mutanten erkennen, die vergleichbar war mit derjenigen von nicht-modifiziertem myc-hCRLR. In TSA Zellen, die V5-markiertes RAMP1 zusammen mit myc-hCRLR und den verschiedenen Asn<sup>117</sup> Mutanten exprimierten, führte crosslinking und Ko-Immunopräzipitation zur Bildung von hCRLR/RAMP1 Komplexen an der Zelloberfläche. Gecrosslinktes [<sup>125</sup>I]hαCGRP wurde jedoch nur beim nicht-modifizierten myc-hCRLR und der Asp Mutante, koexprimiert mit RAMP1, nachgewiesen. Zudem wurde gezeigt, dass V5-markiertes RAMP1 auch in Abwesenheit von crosslinker mit myc-hCRLR ko-immunopräzipitiert werden konnte und somit auf eine direkte molekulare Interaktion zwischen RAMP1 und dem Rezeptor hinweist. Die N-Glykosylierung, die Zelloberflächenexpression und die Assoziation mit RAMP1 wird durch die Substitution von Asn<sup>117</sup> durch Ala, Asp, Gln, Pro und Thr nicht beeinflusst. Die Interaktion mit dem Rezeptorliganden CGRP hingegen ist, mit Ausnahme der Asp Mutante, aufgehoben.