

DISS. ETH NO. 24723

CRYSTAL STRUCTURE OF THE HUMAN CC CHEMOKINE RECEPTOR 7

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KATHRIN JASMIN JÄGER

M.Sc. Biomolecular Engineering, Technische Universität Darmstadt, Germany

born on 22.10.1988
citizen of the Federal Republic of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Gebhard Schertler, examiner
Dr. Jörg Standfuss, co-examiner
Dr. Roger Dawson, co-examiner
Prof. Dr. Volodymyr Korkhov, co-examiner

2017

Abstract

CC chemokine receptor 7 (CCR7) is one of 19 members of the chemokine receptor subfamily that belongs to the rhodopsin-like (class A) G protein-coupled receptors (GPCRs). Chemokine receptors control immune cell migration during inflammation, development and routine immune surveillance [1] and are thought to be among the most drugable targets of the immune system [2]. The two sole small protein ligands guiding CCR7 are the two chemokines CCL19 and CCL21 and their interactions with the receptor are mainly responsible for the homing of B cells, T cells and antigen-presenting dendritic cells to the lymph nodes. Thus, CCR7 is critical for the generation of immunity and peripheral tolerance [3]. Moreover, CCR7 has a functional role in tumor progression and metastasis in over 25 different cancer cells [4] and CCR7 expression in cancer cells is correlated with lymph node metastasis [5, 6, 7]. The ability to metastasize is what characterizes life-threatening cancerogenic cells, as 90% of cancer-associated mortality is linked to metastasis [8], which explains the pharmaceutical interest in CCR7 and makes it an interesting target for structure-based drug design.

This work focuses on the determination of a high-resolution, small molecule antagonist-bound crystal structure of CCR7 and investigation of novel insertion proteins for the crystallization of a human GPCR. Previous to this thesis, 57 CCR7 constructs were designed to increase the chance of successful crystallization in which intracellular loop 3 (ICL3) was substituted by 17 new soluble proteins or T4 lysozyme (T4L). These constructs have been screened for their expression in *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) cells and thermostability properties before. The best constructs among them, including one T4L and five new insertion protein constructs, have been used for large-scale expression, purification and crystallization in this work. Although the new insertion proteins represented a high diversity in size and fold, all CCR7 variants could be expressed and purified in sufficient amount for crystallization experiments and a pure, homogenous and stable sample was obtained for all CCR7 variants tested. To obtain a CCR7 crystal structure, in total 14 CCR7 constructs were screened for their crystallization properties in three consecutive rounds of construct screening. Moreover, the co-crystallization of nanobodies raised by alpaca immunization was tested to improve the diffraction of CCR7 crystals. In addition, CCR7 crystals were screened for diffraction using the powerful X-ray free-electron laser (XFEL) pulses. In the end the schematic shortening of the linker sites between the insertion protein and the receptor led to the crystal structure of CCR7.

The structure of the CCR7 receptor bound to the small molecule antagonist RO5453424 was solved with fusion protein IP9, which with its molecular weight of 53000 Dalton is the largest known insertion protein used for GPCR crystallization so far. The CCR7 IP9 structure exhibits an open crystal lattice arrangement with a high flexibility for CCR7, likely showing a biological relevant conformation of the receptor. Moreover, CCR7 is among the few examples with a small molecule antagonist bound in an allosteric binding pocket located on the intracellular side of the receptor that is formed by the intracellular ends of TM1, TM2, TM3, TM6 and TM7, ICL1 and helix VIII. Based on overlay with the $\beta 2$ adrenergic receptor-G_s complex structure [9] and the transducing peptide opsin structure [10], the small molecule binding site in CCR7 spatially overlaps with the G protein binding site at the intracellular end of TM6. Therefore, the allosteric ligand RO5453424 supposedly prevents G protein coupling to the receptor and exerts allosteric antagonism [11, 12]. RO5453424 also partially occupies the arrestin binding site as shown by overlay with the rhodopsin-arrestin complex structure [13]. In combination with the known chemokine receptor structures, the structure of CCR7 deepens our knowledge about this allosteric binding pocket, which will serve as a starting point for designing new drugs targeting chemokine receptors in general and CCR7 during metastasis on CCR7 expressing tumor cells.

Zusammenfassung

Der CC-Motiv-Chemokinrezeptor 7 (CCR7) ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren, welche zur Klasse der Rhodopsin-ähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören. Chemokinrezeptoren sind Proteine in der Oberflächenmembran von Immunzellen und werden durch zugehörige kleine Proteine, die Chemokine, aktiviert. Sie steuern sowohl die kontrollierte Zellbewegung von Immunzellen während Entzündungsprozessen, als auch bei der Zelldifferenzierung und während der Routineüberwachung des Immunsystems [1]. Es wird vermutet, dass Chemokinrezeptoren den Teil des Immunsystems darstellen, der am besten mit niedermolekularen Verbindungen beeinflusst werden kann [2]. Die Strukturaufklärung von Chemokinrezeptoren ist daher von großem pharmazeutischen Interesse.

Die zwei einzigen, mit CCR7 interagierenden, kleinen Proteinliganden sind die beiden Chemokine CCL19 und CCL21 und ihre Interaktion mit dem Rezeptor ist hauptsächlich verantwortlich für den Rücktransport von B-Zellen, T-Zellen und Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen zu den Lymphknoten. Daher hat CCR7 eine kritische Rolle bei der Erzeugung von Immunität, aber auch peripherer Immuntoleranz [3]. CCR7 wird jedoch nicht nur von Immunzellen, sondern auch von Krebszellen produziert. Wissenschaftliche Untersuchungen ergaben, dass CCR7 eine funktionelle Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung in über 25 verschiedenen Krebsarten [4] einnimmt. Zusätzlich scheint die CCR7 Expression in Krebszellen mit einer Metastasierung über die Lymphknoten [5, 6, 7] zusammenzuhängen. Es wird angenommen, dass Metastasierung 90 % der Krebs-assoziierten Mortalität ausmacht [8], weswegen CCR7 einen interessanten Angriffspunkt für strukturbasiertes Arzneimitteldesign darstellt.

Die vorliegende Doktorarbeit befasst sich mit der Charakterisierung und Kristallisation von humangen CCR7-Varianten. Die Rezeptorvarianten wurden in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda (Sf9)*) hergestellt und die intrazelluläre Proteinschleife 3 (intracellular loop 3, ICL3) verändert, um die Chance einer erfolgreichen Kristallisation zu erhöhen. Dazu wurde ICL3 durch fünf neue, bis dato nicht in der Literatur beschriebene Fusionsproteine, als auch durch T4-Lysozym (T4L) ersetzt. Obwohl die neuen Fusionsproteine eine große Vielfalt an Größe und Faltung aufweisen, konnten alle neuen CCR7-Varianten mit hoher Reinheit und Stabilität und in ausreichender Menge für Kristallisationsexperimente hergestellt werden. Die Kristalle verschiedener CCR7-Varianten und das Rezeptordesign an sich wurden kontinuierlich optimiert. Dennoch waren die anfänglichen CCR7-Kristalle nicht gut genug, um hochauflösende strukturelle Informationen über den Rezeptor zu erhalten. Um eine Verbesserung der Kristalle zu erzielen, wurden daher Alpakas mit CCR7 Rezeptorprotein immunisiert, deren Antikörper isoliert und als Kristallisationsshelfer getestet. Zusätzlich wurde versucht, die Beugung der CCR7 Kristalle durch Messung an einem leistungsstarken Freie-Elektronen-Laser (X-ray free-electron laser, XFEL) zu verstärken. Schlussendlich führte die systematische Optimierung der Fusionsstellen zwischen Rezeptor und Fusionsprotein zu einer hochauflösenden CCR7 Kristallstruktur.

Die finale CCR7 Kristallstruktur wurde durch ein Proteinkonstrukt erhalten, welches die katalytische und unregelmäßige Domäne von Sialidase NanA aus *Streptococcus pneumoniae* in ICL3 enthält. Mit einem Molekulargewicht von 53 kDa stellt Sialidase NanA das bisher größte zur GPCR-Kristallisation verwendete Fusionsprotein dar. Die CCR7 Struktur weist eine offene Kristallgitteranordnung auf, welche eine hohe Flexibilität des Rezeptors im Kristallgitter ermöglicht und daher vermutlich eine biologisch relevante Konformation des Rezeptors zeigt. Darüber hinaus gehört CCR7 zu den wenigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die mit einer niedermolekularen Verbindung (Ligand RO5453424) in einer allosterischen Bindetasche auf der intrazellulären Seite des Rezeptors kristallisiert wurden. Diese allosterische Bindetasche befindet sich an den intrazellulären Enden der Transmembranhelices 1, 2, 6 und 7 und

involviert darüber hinaus Aminosäurereste in ICL1 und Helix VIII. Durch Überlagerung von CCR7 mit einer GPCR-G-Protein-Komplexstruktur [9] wird ersichtlich, dass die Bindung von RO5453424 in der allosterischen Bindetasche die G-Protein-Bindestelle am intrazellulären Ende von Transmembranhelix 6 sterisch blockiert. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von RO5453424 eine G-Protein-Bindung an den Rezeptor verhindert und somit als allosterischer Antagonist wirkt [11, 12]. Darüber hinaus scheint RO5453424 auch die Arrestin-Bindestelle sterisch zu blockieren, wie durch Überlagerung der CCR7 Struktur mit der Rhodopsin-Arrestin-Komplexstruktur [13] deutlich wird. Zusammen mit den bekannten Chemokinrezeptorstrukturen von CCR2 und CCR9 erweitert die Struktur von CCR7 unser Wissen über diese allosterische, intrazelluläre Bindetasche und dient als Ausgangspunkt für die Entwicklung spezifischer Medikamente, die in die CCR7-assoziierte Metastasierung von Krebszellen eingreifen.