

Diss. ETH No. 12521

**Structural analysis and characterization of cell
surface receptors for calcitonin, calcitonin gene-
related peptide, parathyroid hormone and of
structurally related peptides**

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



presented by
BEAT OTTO FLÜHMANN
fed. dipl. pharm.
Born December 16, 1965
citizen of Zurich (ZH), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. E. Carafoli, Examiner
Prof. Dr. J.A. Fischer, Co-examiner

Zurich, 1998

SUMMARY

The structure of a novel calcitonin receptor-like receptor (CRLR) belonging to the receptor subfamily of calcitonin, parathyroid hormone (PTH) and secretin was identified through molecular cloning of cDNA from a human cerebellum library. The receptor protein of 461 amino acids with seven putative transmembrane domains revealed 91% and 56% sequence identity to a rat orphan CRLR and a human calcitonin (CT) receptor, respectively. CRLR encoding mRNA of 5.2 kb is predominantly expressed in the lung, heart and kidney. Specific binding of [¹²⁵I]-labeled salmon calcitonin and human calcitonin gene-related peptide-I to COS-7 cells transiently transfected with CRLR cDNA was not detectable. Cellular cAMP accumulation was indistinguishable in cDNA transfected and non-transfected control COS-7 cells and in renal tubular cells from the American opossum treated with human and salmon calcitonin, human calcitonin gene-related peptide-I and -II, human amylin, human adrenomedullin, lizard helodermin, salmon stanniocalcin and chicken PTH-related protein (PTHrP). Thus the CRLR must be considered an orphan receptor in search of a ligand.

Expression of mRNA encoding CRLR was studied in brains of adult rats and in developing fetus by *in situ* hybridization. In the central nervous system CRLR mRNA expression was localized in the piriform cortex, the central and basolateral amygdala, and the amygdalostriatal transition area. No *in situ* hybridization signals were visualized in brainstem and the Purkinje cell layer of the cerebellum with binding sites for calcitonin and calcitonin gene-related peptide, respectively. In peripheral tissues strong signals were observed in the lung throughout development. Transient expression of CRLR during fetal development was found in the liver, blood vessels, the midgut, the rectum and the urethra.

Molecular cloning of a PTH/PTHrP receptor from human cerebellum revealed a receptor identical in sequence with the PTH/PTHrP receptor cloned from kidney and osteoblast-like cell lines. Northern blot analysis revealed a 2.3 kb mRNA that was predominantly expressed in kidney and liver. mRNA expression was also observed in eight different brain areas. *In situ* hybridization in rat brain tissue sections revealed predominant signals in the Purkinje cell layer of the cerebellum and in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve. In SK-N-MC cells stably transfected with the PTH/PTHrP receptor cDNA, human PTH(1-84) and

-(1-34) displaced binding of [¹²⁵I]-labeled chicken PTHrP(1-36) with IC₅₀ values of 4.0 ± 0.6 nM and 2.0 ± 0.1 nM, and stimulated cyclic AMP accumulation with EC₅₀ values of 0.19 ± 0.06 and 0.09 ± 0.01 nM, respectively. 30% of the cells responded to 100 nM human PTH(1-34) with a 2-10 fold transient increase of cytosolic free calcium. These functional properties of PTH/PTHrP receptors in human neuroblastoma SK-N-MC cells were indistinguishable from those observed in non-neuronal tissues.

Regulation by PTH of expression of three distinct, stably transfected luciferase reporter genes responsive to cyclic AMP (CRE-luc), serum (SRE-luc) and phorbol ester (TRE-luc) has been studied in rat osteoblast-like UMR-106 cells. A maximal 43-fold induction of CRE-luc expression occurred in response to 0.1 μM rat PTH(1-34) (EC₅₀=440 pM), but SRE-luc and TRE-luc activity remained unaffected by PTH(1-34). Maximal 2.8-fold induction of SRE-luc by 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) was suppressed by 100 nM PTH(1-34) (IC₅₀=38 pM). Similarly, 7.3-fold induction of TRE-luc by 100 nM PMA was inhibited by 50% by 100 nM PTH(1-34) (IC₅₀=500 pM). Activation of MAPK by EGF and PMA was also suppressed by PTH(1-34). 1 mM 8-Br-cAMP and 0.1 mM forskolin mimicked the effects of PTH(1-34). According to these results, induction of target genes and inhibition of growth factor induced genes by PTH in osteoblast-like UMR-106 cells is predominantly mediated by activation of the cyclic AMP/PKA signaling pathway. This confirms a central role of PTH in the modulation of osteoblast proliferation and differentiation.

Amylin, calcitonin (CT) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) share limited structural homology including amino-terminal ring structures linked by a disulfide bridge and amidated carboxyl-termini. Here, we have compared [¹²⁵I]-Bolton-Hunter-[Lys¹] rat amylin ([¹²⁵I]amylin) binding and the stimulation of cyclic AMP accumulation by human (h) amylin, hCT and hCGRP-I in the human breast carcinoma cell lines MCF-7 and T47D, which predominantly express hCT_{1a} and hCT_{1b} receptor isoforms (hCTR_{1a}, -R_{1b}) at a similar total number of hCT binding sites. In MCF-7 cells, half-maximal inhibition (IC₅₀) of [¹²⁵I]amylin binding by human amylin was observed at 3.6 ± 0.8 nM (n=6). Human CT and hCGRP-I displaced [¹²⁵I]amylin binding with 22 and 66 times higher IC₅₀. [¹²⁵I]hCT binding was inhibited by hCT with an IC₅₀ of 8.1 ± 1.9 nM (n=5), and human amylin and hCGRP-I were over 100 times less potent. In T47D cells, on

the other hand, specific binding of [¹²⁵I]amylin was not observed, but hCT inhibited [¹²⁵I]hCT binding with an IC₅₀ of 3.2 ± 0.4 nM (n=3), and human amylin and hCGRP-I had over 200 times higher IC₅₀. In MCF-7 cells, half-maximal stimulation (EC₅₀) of cyclic AMP accumulation by human amylin, hCT and hCGRP-I occurred at 1.4 ± 0.2, 1.7 ± 0.4 and 6.3 ± 1.3 nM, respectively. In T47D cells, the EC₅₀ of hCT was 0.32 ± 0.02 nM (n=3), and 30- and 1900-fold higher with human amylin and hCGRP-I. In conclusion, the expression of hCTR_{1a} and -R_{1b} and [¹²⁵I]hCT binding were indistinguishable in MCF-7 and T47D cells. Yet, [¹²⁵I]amylin binding was only recognized in MCF-7 cells, consistent with a distinct amylin receptor.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein neuer Calcitonin Receptor-like Receptor (CRLR) der auf Grund seiner Aminosäuresequenz der Unterfamilie der Rezeptoren für Calcitonin, Parathormon (PTH) und Secretin zugeordnet werden kann, wurde mittels Klonierung von cDNS aus menschlichem Kleinhirn identifiziert. Das 461 Aminosäuren lange Rezeptor-Protein mit sieben mutmasslichen transmembran Regionen, zeigt 91% respektive 56% Aminosäuresequenzhomologie zu einem CRLR der Ratte und einem menschlichen Calcitonin Rezeptor. CRLR mRNS von 5.2 kb Länge wurde mit Northern Blot Analyse vorwiegend in der Lunge, dem Herz und der Niere nachgewiesen. In COS-7 Zellen, die mit CRLR enkodierender cDNS transfektiert wurden, konnte keine spezifische Bindung von [I^{125}]-markiertem Lachs Calcitonin und menschlichem Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) -I nachgewiesen werden. Die Stimulation von cyclischem AMP in transfektierten COS-7 Zellen und Opossum Nierenzellen mit menschlichem und Lachs Calcitonin, menschlichem CGRP-I und -II, Amylin und Adrenomedullin, mit Echsen Helodermin, Lachs Stanniocalcin und Hühner PTH-related Protein (PTHrP), konnte nicht von denjenigen in nicht transfektierten Zellen unterschieden werden. CRLR muss deshalb als „orphan“-Rezeptor betrachtet werden, dessen Ligand zu identifizieren bleibt.

Im Gehirn von erwachsenen Ratten und in Rattenköten in verschiedenen Entwicklungsstadien wurde die Expression von CRLR enkodierender mRNS mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungstechnik untersucht. CRLR mRNS Expression wurde im piriformen Cortex, der zentralen - und basolateralen Amygdala und in der „Amygdalostriatal Transition Area“ lokalisiert. Weder im Hirnstamm noch in der Purkinje-Zellschicht des Kleinhirns, in welchem eine hohe Dichte von CGRP Bindungsstellen nachgewiesen wurde, konnten *in situ* Hybridisierungssignale gezeigt werden. Während der Entwicklung von Rattenköten konnte in peripheren Geweben starke Signale in der Lunge beobachtet werden. Vorübergehende Expression von CRLR mRNS während der fotalen Entwicklung wurde in der Leber, den Blutgefäßen, Teilen des Darms, des Rectums und im Urether nachgewiesen.

Eine cDNS, die einen PTH/PTHrP Rezeptor enkodiert wurde aus einer cDNS Bibliothek des menschlichen Kleinhirns kloniert. Die Sequenz war identisch mit derjenigen des PTH/PTHrP Rezeptors, in der Niere und

Osteoblasten ähnlichen Zelllinien. Mit „Northern Blot“ Studien konnte die Expression einer 2.3 kb mRNS vor allem in der Niere und der Leber nachgewiesen werden. PTH/PTHrP Rezeptor enkodierende mRNS wurde auch in acht verschiedenen Hirnregionen gefunden. In situ Hybridisierung von mRNS im Gehirn der Ratte zeigte vorwiegend Signale in der Purkinje-Zellschicht des Kleinhirns und im „Mesencephalic Nucleus“ des Trigeminus Nervs. Funktionelle PTH/PTHrP Rezeptoren wurden nach stabiler Transfektion der klonierten cDNS in der menschlichen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC exprimiert. Menschliches PTH(1-34) und -(1-84) hemmten die Bindung von [¹²⁵I]-markiertem Hühner PTHrP(1-36) an transfektierten SK-N-MC Zellen mit einer IC₅₀ von 4.0 ± 0.6 nM und 2.0 ± 0.1 nM. Die halbmaximale Stimulation der Bildung von cyclischem AMP wurde mit 0.19 ± 0.06 nM menschlichem PTH(1-34) und 0.09 ± 0.01 nM menschlichem PTH(1-84) beobachtet. In 30 % der stabil transfektierten SK-N-MC Zellen wurde nach Zugabe von 100 nM menschlichem PTH(1-34) die intrazelluläre Kalziumkonzentration vorübergehend um das 2-10-fache erhöht. Folglich waren die funktionellen Eigenschaften des PTH/PTHrP Rezeptors in der menschlichen Neuroblastoma Zelllinie nicht von denen in nicht neuronalen Geweben zu unterscheiden.

Die PTH-abhängige Regulation der Expression von drei unterschiedlichen, durch cyclisches AMP (CRE-luc), Serum (SRE-luc) oder Phorbolester (TRE-luc) induzierbaren Luziferase Reporter Genen, wurde in der Osteoblasten-ähnlichen Rattenzelllinie UMR-106 untersucht. Die Stimulation von CRE-luc exprimierenden UMR-106 Zellen mit 100 nM PTH(1-34) induzierte die Luziferase Aktivität im Zellextrakt 43-fach (EC₅₀=440 pM). Die Luziferase Aktivität in SRE-luc und TRE-luc exprimierenden Zellen blieb nach Stimulation mit PTH(1-34) unverändert. Die maximal 2.8-fache Induktion von SRE-luc durch 10 ng/ml „Epidermal Growth Factor“ wurde mit 100 nM PTH(1-34) unterdrückt (IC₅₀=38 pM). Eine 7.3-fache Induktion von TRE-luc durch 100 nM Phorbolester PMA wurde mit PTH(1-34) 50% gehemmt. 1 mM 8-Br-cAMP und 0.1 mM Forskolin hatten die gleiche Wirkung wie PTH(1-34).

Die Resultate zeigten, dass PTH in Osteoblasten-ähnlichen UMR-106 Zellen die Aktivität von Zielgenen in erster Linie durch Aktivierung des cyclischen AMP/PKA Signalweges steuert, und dadurch die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten moduliert.

Amylin, das zusammen mit Insulin aus β -Zellen des Pankreas sezerniert wird, ist ein 37 Aminosäuren langes Peptid, welches in die Regulation des Kohlenhydrate-Metabolismus involviert ist. Amylin Bindungsstellen, zusammen mit Bindungsstellen für sCT und/oder CGRP, wurden in der Lunge, in der Niere und im Hirn beschrieben. In den humanen Brustkarzinom Zelllinien MCF-7 und T47D, welche hauptsächlich zwei unterschiedliche CT Rezeptor Subtypen exprimieren, haben wir die Bindung von Bolton-Hunter-[Lys¹] Ratten Amylin ($[^{125}\text{I}]\text{Amylin}$) und die Stimulation von cAMP durch humanes Amylin, hCT und hCGRP-I gemessen. In MCF-7 Zellen hemmte humanes Amylin die Bindung von $[^{125}\text{I}]\text{Amylin}$ mit einer IC_{50} von 3.6 nM. hCT und hCGRP-I verdrängten die Bindung von $[^{125}\text{I}]\text{Amylin}$ bei 22- und 66-fach höheren Konzentrationen. Humanes Amylin, hCT und hCGRP-I stimulierten die Akkumulation von cAMP mit einer EC_{50} von 1.4, 1.7 bzw. 6.3 nM, doch sie bewirkten keinen Anstieg des freien zytosolischen Kalziums. In T47D Zellen andererseits konnte keine spezifische $[^{125}\text{I}]\text{Amylin}$ Bindung nachgewiesen werden. Die EC_{50} von hCT war 0.32 nM und humanes Amylin und hCGRP-I waren 30- und 1900-mal weniger potent. Die spezifische Bindung von $[^{125}\text{I}]h\text{CT}$ wurde in beiden Zelllinien entsprechend dem pharmakologischen Profil von hCT >> humanes Amylin > hCGRP-I gehemmt.