

Diss. ETH No. 13184

**LIGAND BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION  
OF VERTEBRATE  
SOMATOSTATIN RECEPTORS  
RECOMBINANTLY EXPRESSED IN CCL39 CELLS**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of  
Doctor of Natural Science

Presented by

SANDRA SIEHLER

Dipl. Biol., University of Karlsruhe (TH)  
born January 4, 1971  
Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Gerd Folkers, Examiner  
Prof. Dr. Vladimir Pliska, Co-examiner  
Dr. Daniel Hoyer, Co-examiner

Zürich, 1999

## Summary

Somatostatin (SRIF = somatotropin release inhibiting factor) is a hormone/neuropeptide with multiple endocrine and exocrine effects, effects on inhibition of hormone release, cognitive functions, behaviour, sleep activity and inhibition of tumour growth. The SRIF analogue octreotide is used to treat acromegaly, hormone-secreting tumours, and AIDS-related diarrhoea. In mammals, the SRIF family includes SRIF<sub>14</sub>, SRIF<sub>28</sub>, and the recently identified and putative neuropeptide cortistatin (CST); non-mammalian vertebrates possess SRIF<sub>14</sub> and a second SRIF variant.

A class of G-protein-coupled receptors, the somatostatin receptors, mediate the actions of SRIF, and five mammalian subtypes (sst<sub>1-5</sub>) have been cloned; SRIF receptors are specifically expressed in brain, periphery, and many tumours. The third cytoplasmatic loop of G-protein-coupled receptors is suggested to link the receptors to G-proteins, which couple the receptors to specific intracellular signalling cascades. Many cellular effector proteins such as phospholipase C (PLC), phospholipase A<sub>2</sub>, calcium channels, potassium channels, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, adenylate cyclase (AC), protein tyrosine phosphatases, mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p53 are reported to be specifically modulated by SRIF receptor subtypes.

In this study, the five human SRIF receptor subtypes, and the first cloned non-mammalian SRIF receptor, fish sst<sub>3</sub> receptor (of *Apteronotus albifrons*), were characterised by analysing their binding and transductional features under the same environment, i.e. by stable receptor expression in CCL39 hamster lung fibroblast cells.

CST<sub>14/17</sub> and the iodinated analogue [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>10</sup>]CST<sub>14</sub>, bound with similar high affinity to all five human SRIF receptors, and thus the pharmacological profiles of the iodinated peptide was established with a number of SRIF/ CST analogues; the affinity profiles were comparable to those established using [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub>. This underlines the close relation of CST and SRIF peptides, although specific CST receptors may also exist.

Very marked differences in peptide affinities for SRIF receptors have been described in the literature; therefore additional synthetic radioligands ([<sup>125</sup>I]CGP 23996, [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]octreotide) were used to establish affinity profiles. Surprisingly, [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]octreotide labelled beside human sst<sub>2</sub> also sst<sub>5</sub> receptor sites with high affinity, and some other classically sst<sub>2</sub>-selective compounds (octreotide, seglitide etc.) showed high affinity to sst<sub>5</sub> receptors; hence, sst<sub>5</sub> receptors may mediate physiological effects of octreotide, which previously were attributed to the sst<sub>2</sub> subtype solely.

Ligand affinities and receptor densities were radioligand-dependent at human sst<sub>5</sub>, but not at sst<sub>1-4</sub> receptors: e.g. [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub> labelled seven times more sst<sub>5</sub> receptor sites than [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]octreotide, and the affinity of e.g. octreotide defined with [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub> was 100-fold lower compared to that defined with [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]octreotide.

Although the non-iodinated analogues of the four radioligands are full agonists in functional studies, their binding to sst<sub>5</sub> receptors was differently modulated by the GTP-analogue guanylylimidodiphosphate (GppNHp): e.g. [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]octreotide binding was highly affected suggesting selective labelling of G-protein-coupled sst<sub>5</sub> receptors, whereas [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub> and [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>10</sup>]CST<sub>14</sub> seem to label rather uncoupled receptors and hence a higher density; radioligand binding at sst<sub>2</sub>/ sst<sub>3</sub> receptors was markedly inhibited, and rather unaffected at sst<sub>1</sub>/ sst<sub>4</sub> receptors.

The data do not fit the ternary complex model, instead the existence of multiple G-protein-coupled/ -uncoupled agonist-specific receptor states may be proposed.

In functional studies, all five SRIF receptors inhibited forskolin-stimulated adenylate cyclase (FSAC) activity, *hsst*<sub>2-5</sub> receptors stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding (G-protein activation), and *sst*<sub>3/5</sub> activated PLC activity (measured by IP<sub>x</sub> accumulation, intracellular Ca<sup>2+</sup> increase), the latter effect being only partially pertussis toxin (PTX) sensitive (i.e. partly mediated by G<sub>i/o</sub>).

Pharmacological profiles of human SRIF receptors established in these three functional assays correlated significantly, but to various extents even at the same receptor with the different radioligand binding profiles; functional data of *sst*<sub>1/2</sub> receptors correlated only modestly with the affinity profiles suggesting other effector pathways to be more important. In addition, the potency rank orders of SRIF/ CST ligands examined at each human SRIF receptor subtype was distinct from one functional assay to the other, and compared to the affinity profiles. These findings support the hypothesis of receptor induced effector trafficking by presumably different agonist-specific receptor states.

In the brain, fish *sst*<sub>3</sub> receptor transcripts, as detected by RT-PCR, and fish *sst*<sub>3</sub> protein seem to be present, since the profile of *fsst*<sub>3</sub> receptors expressed in CCL39 cells correlated highly with that of native brain receptors [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub> binding; however, biphasic curves in brain and low correlation with liver sites suggest additional fish SRIF receptors. At recombinant *fsst*<sub>3</sub> receptors radioligand-dependency of receptor densities, affinities, and GppNHp-sensitivity was documented using [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub>, [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>10</sup>]CST<sub>14</sub>, [<sup>125</sup>I]CGP 23996, [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]octreotide, similar to the human *sst*<sub>5</sub> receptor. Coupling to signalling pathways seems to be highly conserved between fish and mammalian SRIF receptors: *fsst*<sub>3</sub> receptors mediate stimulation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding, inhibition of FSAC via G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, and PLC activation partly via G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>. Pharmacological profiles of radioligand binding and functional tests correlated with each other with variations, supporting again a model of specific agonist-induced receptor conformations; species differences on pharmacology: *fsst*<sub>3</sub> profiles fitted best with the *hsst*<sub>5</sub> receptor profiles, in spite of the highest sequence homology with the *hsst*<sub>3</sub> subtype.

**Keywords:** somatostatin (SRIF), cortistatin (CST), octreotide, human recombinant somatostatin receptors (*hsst*<sub>1-5</sub>), fish somatostatin receptor 3; (*fsst*<sub>3</sub>), CCL39 Chinese hamster lung fibroblast cells, guanylylimidodiphosphate (GppNHp), guanosine-5'-O-(3-thio)-triphosphate (GTP $\gamma$ S), adenylate cyclase (AC), phospholipase C (PLC), inositol phosphate (IP<sub>x</sub>), intracellular calcium, pertussis toxin (PTX).

## Kurzfassung

Somatostatin (SRIF = Somatotropin-Freisetzung-inhibierender Faktor) ist ein Hormon/Neuropeptid mit zahlreichen endokrinen und exokrinen Wirkungen, Wirkungen auf Inhibition von Hormon-Freisetzungen, kognitive Funktionen, Verhalten, Schlafaktivität, und auf Hemmung von Tumorwachstum. Das SRIF-Analog Octreotide wird zur Behandlung von Akromegalie, Hormon-sekretierenden Tumoren, und von AIDS-abhängiger Diarrhoea verwendet. Bei Säugern umfasst die SRIF-Familie SRIF<sub>14</sub>, SRIF<sub>28</sub>, sowie das kürzlich identifizierte und vermutlich existente Neuropeptid Cortistatin (CST); Wirbeltiere, die nicht der Klasse der Säuger angehören, besitzen SRIF<sub>14</sub> und eine zweite SRIF-Variante.

Eine Klasse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Somatostatin-Rezeptoren, vermitteln die Wirkungen von SRIF, und fünf Subtypen (sst<sub>1-5</sub>) sind bei Säugern kloniert worden; SRIF-Rezeptoren sind im Gehirn, in der Peripherie, und in vielen Tumoren spezifisch exprimiert. Die dritte cytoplasmatische Schleife von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren verbindet vermutlich die Rezeptoren mit G-Proteinen, welche die Rezeptoren an spezifische intrazelluläre Signalkaskaden koppeln. Es wird berichtet, dass viele zelluläre Effektorproteine, wie z. B. Phospholipase C (PLC), Phospholipase A<sub>2</sub>, Calciumkanäle, Kaliumkanäle, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschpumpen, Adenylat-Cyclase (AC), Proteintyrosin-Phosphatasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) oder p53 von SRIF-Rezeptorsubtypen spezifisch moduliert werden.

In dieser Studie wurden die fünf humanen SRIF-Rezeptorsubtypen, und der erste von einem Nichtsäuger klonierte SRIF-Rezeptor, der Fish sst<sub>3</sub> Rezeptor (von *Apterionotus albifrons*), durch Analyse von Bindungs- und Transduktionseigenschaften im gleichen System charakterisiert, d. h. durch stabile Rezeptorexpression in CCL39 Hamster-Lungenfibroblastenzellen.

CST<sub>14/17</sub> und das iodierter Analog [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>10</sup>]CST<sub>14</sub>, banden mit ähnlich hoher Affinität an alle fünf menschlichen SRIF-Rezeptoren, und somit wurden die pharmakologischen Profile des iodierten Peptids mit einer Anzahl an SRIF/ CST Analogas erstellt; die Affinitätsprofile waren vergleichbar mit den unter Verwendung von [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub> erstellten Profilen. Dies unterstreicht die enge Verwandtschaft von CST- und SRIF-Peptiden, obgleich auch spezifische CST-Rezeptoren existieren könnten.

Für SRIF-Rezeptoren wurden grosse Unterschiede von Peptidaffinitäten in der Literatur beschrieben; deshalb wurden zusätzliche, synthetische Radioliganden ([<sup>125</sup>I]CGP 23996, [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]Octreotide) verwendet, um Affinitätsprofile zu erstellen. Überraschenderweise markierte [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]Octreotide neben humanen sst<sub>2</sub> auch humane sst<sub>5</sub> Rezeptorstellen mit hoher Affinität, und einige andere klassisch sst<sub>2</sub>-selektiven Verbindungen (Octreotide, Seglitide etc.) zeigten hohe Affinität für sst<sub>5</sub> Rezeptoren; folglich vermitteln sst<sub>5</sub> Rezeptoren möglicherweise physiologische Wirkungen von Octreotide, welche zuvor einzig dem sst<sub>2</sub>-Subtyp zugeordnet wurden.

Ligandenaffinitäten und Rezeptordichte waren bei menschlichen sst<sub>5</sub> Rezeptoren Radioliganden-abhängig, nicht aber bei sst<sub>1-4</sub> Rezeptoren: z. B. markierte [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub> siebenmal mehr sst<sub>5</sub> Rezeptorstellen als [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]Octreotide, und die von z. B. Octreotide ermittelte Affinität war mit [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF<sub>28</sub> 100-mal niedriger als mit [<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]Octreotide.

Obwohl die nicht-iodierten Analoga der vier Radioliganden in funktionellen Studien volle Agonisten sind, war deren Bindung an  $ss_5$  Rezeptoren durch das GTP-Analog Guanylylimidodiphosphat (GppNHp) unterschiedlich moduliert: die Bindung von z. B. [ $^{125}$ I][Tyr<sup>3</sup>]Ocreotide war stark inhibiert, was auf ein selektives Markieren von G-Protein-gekoppelten  $ss_5$  Rezeptoren hinweist, während [ $^{125}$ I]LTT-SRIF<sub>28</sub> und [ $^{125}$ I][Tyr<sup>10</sup>]CST<sub>14</sub> eher ungekoppelte Rezeptoren und daher eine höhere Dichte zu markieren scheinen; die Radioligandenbindung von  $ss_2$ / $ss_3$  Rezeptoren war deutlich inhibiert, und eher unbeeinträchtigt bei  $ss_1$ / $ss_4$  Rezeptoren. Diese Daten passen nicht in das ternäre Komplex-Modell, stattdessen kann die Existenz von multiplen G-Protein-gekoppelten/ -ungekoppelten Agonist-spezifischen Rezeptorzuständen vermutet werden.

In funktionellen Studien inhibierten alle fünf SRIF-Rezeptoren Forskolin-stimulierte Adenylat-Cyclase (FSAC)-Aktivität,  $hsst_{2-5}$  Rezeptoren stimulierten [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung (G-Protein-Aktivierung), und  $ss_3$ / $ss_5$  Rezeptoren aktivierten PLC-Aktivität (gemessen durch IP<sub>x</sub>-Akkumulation, intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg), wobei der letztere Effekt nur teilweise Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiv (d. h. nur teils durch G<sub>i/o</sub> vermittelt) war.

Die in diesen drei funktionellen Versuchsmethoden an menschlichen SRIF-Rezeptoren erstellten pharmakologischen Profile korrelierten signifikant, aber selbst am gleichen Rezeptor zu einem unterschiedlichem Grad mit den verschiedenen Radioliganden-Bindungsprofilen; funktionelle Daten von  $ss_1$ / $ss_2$  Rezeptoren korrelierten nur mässig mit den Affinitätsprofilen, was darauf hinweist, dass andere Effektor-Signalwege bedeutsamer sind. Ausserdem war bei jedem SRIF-Rezeptorsubtypen die untersuchten Reihenfolgen der Potenzen von SRIF/ CST- Liganden von einem funktionellen Assay zum anderen verschieden, sowie verglichen zu den Affinitätsprofilen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese von Rezeptor-induziertem Effektor-“Trafficking” durch vermutlich verschiedene Agonist-spezifische Rezeptorzustände.

Im Gehirn scheinen Fisch  $ss_3$  Rezeptor-Transkripte, welche durch RT-PCR nachgewiesen wurden, und Fisch  $ss_3$  Protein vorhanden zu sein, da das [ $^{125}$ I]LTT-SRIF<sub>28</sub>-Bindungsprofil von in CCL39-Zellen exprimierten  $fsst_3$  Rezeptoren stark mit dem von natürlich vorkommenden Gehirnzuständen korreliert; jedoch lassen biphasische Kurven im Gehirn und die schwache Korrelation mit Leber-Bindungsstellen zusätzliche Fisch-SRIF-Rezeptoren vermuten. Beim rekombinanten  $fsst_3$  Rezeptor wurde unter Verwendung von [ $^{125}$ I]LTT-SRIF<sub>28</sub>, [ $^{125}$ I][Tyr<sup>10</sup>]CST<sub>14</sub>, [ $^{125}$ I]CGP 23996, und [ $^{125}$ I][Tyr<sup>3</sup>]Ocreotide Radioliganden-Abhängigkeit der Rezeptordichte, der Affinitäten, und der GppNHp-Sensitivität gemessen - ähnlich wie beim menschlichen  $ss_5$  Rezeptor. Das Koppeln an Signalwege scheint bei Fisch- und Säuger-SRIF-Rezeptoren hoch konserviert zu sein: Fisch  $ss_3$  Rezeptoren vermitteln Stimulation von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung, Inhibition von FSAC über G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, und PLC-Aktivierung teilweise über G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>. Die pharmakologischen Profile von Radioligandenbindung und funktionellen Tests korrelierten unterschiedlich stark miteinander, was erneut das Modell der spezifischen Agonist-induzierten Rezeptorkonformationen unterstützt; pharmakologische Arten-Unterschiede: die  $fsst_3$  Profile stimmten am besten mit den  $hsst_5$  Profilen überein, trotz der grössten Sequenzhomologie mit dem  $hsst_3$  Subtyp.

**Stichworte:** Somatostatin (SRIF), Cortistatin (CST), Octreotide, menschliche rekombinante Somatostatin-Rezeptoren (hsst<sub>1-5</sub>), Fisch-Somatostatin-Rezeptor 3; (fsst<sub>3</sub>), CCL39 Hamster-Lungenfibroblastenzellen, Guanylylimidodiphosphat (GppNHp), Guanosine-5`O-(3-thio)-Triphosphat (GTP $\gamma$ S), Adenylat-Cyclase (AC), Phospholipase C (PLC), Inositolphosphat (IP<sub>x</sub>), intrazelluläres Calcium, Pertussis-Toxin (PTX).