

Diss. ETH No. 12352

**RECEPTORS FOR ADRENOMEDULLIN, AMYLIN, AND
PARATHYROID HORMONE: IDENTIFICATION,
PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION AND
CELLULAR MECHANISMS**

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

presented by

URS ZIMMERMANN
fed. dipl. pharm.
born 4th November 1966
citizen of Wohlen (BE)

accepted on the recommendation of

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

1998

Summary

Adrenomedullin (ADM), amylin, calcitonin (CT) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) are structurally related peptides with 6-7 amino acid ring structures linked by a disulfide bridge and with amidated C-termini. Sequence homology is highest between CGRP and amylin (approximately 50%) and amounts to approximately 20% between ADM and amylin as well as CGRP.

Human (h) ADM, a 52 amino acid polypeptide, is synthesized and secreted from adrenal medulla, endothelium and vascular smooth muscle. ADM exerts vasodilatory and bronchodilatory actions and has natriuretic and diuretic effects. In the human neuroblastoma cell line SK-N-MC, it has been demonstrated that ADM interacts with an endogenous CGRP receptor. Specific binding of [¹²⁵I]hCGRP-I was inhibited by hCGRP-I with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.32 nM. hADM(1-52), hADM(13-52), hADM(22-52) and human amylin inhibited [¹²⁵I]hCGRP-I binding at 7-, 11-, > 3000-, and > 200-fold higher concentrations, respectively. hCGRP-I, hADM(1-52), hADM(13-52) and human amylin stimulated cyclic AMP (cAMP) accumulation with half-maximal effective concentrations (EC₅₀) of 0.40, 18, 51, and 925 nM, respectively. hADM(22-52) and the CGRP receptor antagonist hCGRP-I(8-37), which lack the ring structure, failed to stimulate cAMP formation at up to 1 μM. hCGRP-I(8-37) (100 nM) antagonized hCGRP-I and hADM stimulated cAMP production with the same K_i (inhibitory constant) of 16.6 and 16.8 nM.

The indistinguishable K_i values indicate that ADM interacts with a CGRP receptor in SK-N-MC cells rather than with a specific ADM receptor. Although ADM is more distantly related to CGRP than amylin, ADM interacts more potently with the CGRP receptor in SK-N-MC cells than amylin. Hence, some of the described biological actions of ADM may be due to interaction with CGRP receptors.

Novel ADM receptors have been identified in rat astrocytes in primary culture and in the mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cell line NG108-15. In cultured rat (r) astrocytes, rADM inhibited [¹²⁵I]hADM binding with an IC₅₀ of 0.27 nM. Rat α-CGRP, rat amylin and salmon (s)CT displaced [¹²⁵I]hADM binding at 85-, 148- and > 4000-fold higher concentrations. rADM stimulated cAMP accumulation with EC₅₀ of 1.00 nM. Rat α-CGRP was 214-fold, and rat amylin and sCT were over 1000-

fold less potent. In NG108-15 cells, r- α -CGRP was inactive at up to 1 μ M. hADM(22-52) and hCGRP-I(8-37) did not stimulate cAMP production at up to 1 μ M peptide, but they antagonized rADM stimulated cAMP accumulation with K_i values of 365 nM and 92 nM in astrocytes and 45 and 1300 nM in NG108-15 cells. rADM failed to raise cytosolic free calcium concentrations in astrocytes and in NG108-15 cells.

In conclusion, novel ADM receptors have been identified in rat brain using astrocytes in primary culture and the neuroblastoma x glioma cell line NG108-15. The receptors are linked to cAMP formation, but not to increased cytosolic free calcium. Different interactions with CGRP as well as with the truncated receptor antagonists ADM(22-52) and CGRP(8-37) are consistent with ADM receptor isotypes in the brain.

Amylin, which is co-secreted along with insulin from pancreatic β -cells, is a 37 amino acid peptide involved in the regulation of carbohydrate metabolism. Amylin binding sites, co-localized with sCT and/or CGRP binding sites, have been described in lung, kidney and in brain. In the human breast carcinoma cell lines MCF-7 and T47D, which predominantly express two distinct CT receptor isoforms, [125 I]-Bolton-Hunter-[Lys¹] rat amylin ([125 I]amylin) binding and stimulation of cAMP accumulation by human amylin, hCT and hCGRP-I have been compared. In MCF-7 cells, human amylin inhibited [125 I]amylin binding with IC_{50} of 3.6 nM. hCT and hCGRP-I displaced [125 I]amylin binding at 22- and 66-fold higher concentrations. Human amylin, hCT and hCGRP-I stimulated cAMP accumulation with EC_{50} of 1.4, 1.7 and 6.3 nM, respectively, but they failed to increase cytosolic free calcium. In T47D cells, on the other hand, specific [125 I]amylin binding was not detected. The EC_{50} of hCT was 0.32 nM and human amylin and hCGRP-I were 30 and 1900 times less potent. Specific [125 I]hCT binding was inhibited in both cell lines with a pharmacological profile of hCT \gg human amylin $>$ hCGRP-I.

In conclusion, CT receptor isoforms are similarly expressed in MCF-7 and in T47D breast carcinoma cells, but MCF-7 cells alone revealed [125 I]amylin binding sites. These findings imply the co-existence in MCF-7 cells of amylin and CT receptors, both coupled to activation of adenylyl cyclase, but not to increased cytosolic free calcium.

Parathyroid hormone (PTH), a 84 amino acid single-chain polypeptide, is an important physiological regulator of calcium and phosphate homeostasis acting predominantly in the skeleton and the kidneys. PTH receptors, identified through molecular cloning, belong to the CT, secretin

subfamily of seven transmembrane G-protein-coupled receptors. In rat osteoblast-like UMR-106 cells, the role of PTH-responsive intracellular signaling pathways has been investigated using stably transfected cAMP-, serum- and phorbol ester-inducible luciferase reporter genes (CRE-luc, SRE-luc, TRE-luc). A maximal 43-fold induction of CRE-luc expression occurred in response to 100 nM rat PTH(1-34) ($EC_{50}=0.44$ nM), but SRE-luc and TRE-luc activity remained unaffected by PTH(1-34). Maximal 2.8- and 3.4-fold inductions of SRE-luc by 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) or 100 nM phorbol ester PMA, respectively, were suppressed by 100 nM PTH(1-34) (IC_{50} : 0.04 nM and 0.15 nM, respectively). Similarly, 7.3-fold induction of TRE-luc by 100 nM PMA was inhibited by 50% by 100 nM PTH(1-34) ($IC_{50}=0.5$ nM). Activation of mitogen-activated protein kinase (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).

In conclusion, in osteoblast-like UMR-106 induction of target genes and inhibition of growth factor induced genes by PTH 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.

Kurzfassung

Adrenomedullin (ADM), Amylin, Calcitonin (CT) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sind strukturverwandte Peptide mit einer Ringstruktur bestehend aus 6-7 Aminosäuren und einem amidierten C-Terminus. Die Sequenzhomologie ist zwischen CGRP und Amylin am höchsten (etwa 50%) und beträgt etwa 20% zwischen ADM und Amylin sowie CGRP.

Humanes (h) ADM, ein 52 Aminosäuren langes Polypeptid, wird im Nebennierenmark, im Endothel und in der glatten Gefäßmuskulatur synthetisiert und sezerniert. ADM hat gefässerweiternde und bronchierweiternde Eigenschaften und zeigt zudem eine natriuretische und diuretische Wirkung. In der humanen Neuroblastom Zelllinie SK-N-MC konnte gezeigt werden, dass ADM mit einem endogenen CGRP Rezeptor interagiert. Die spezifische Bindung von [¹²⁵I]hCGRP-I wurde durch hCGRP-I mit einer halb-maximal inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 0.32 nM gehemmt. hADM(1-52), hADM(13-52), hADM(22-52) und humanes Amylin hemmten die [¹²⁵I]hCGRP-I Bindung bei 7-, 11-, > 3000- und > 200-fach höheren Konzentrationen. hCGRP-I, hADM(1-52), hADM(13-52) und humanes Amylin stimulierten die Akkumulation von zyklischem AMP (cAMP) mit halb-maximal effektiven Konzentrationen (EC₅₀) von 0.40, 18, 51 und 925 nM. hADM(22-52) und der CGRP Rezeptor Antagonist hCGRP(8-37), denen die Ringstruktur fehlt, konnten die Bildung von cAMP bis zu einer Konzentration von 1 µM nicht stimulieren. hCGRP-I(8-37) (100 nM) hemmte die durch hCGRP-I und hADM stimulierte Bildung von cAMP mit resultierenden K_i (inhibitorische Konstante) Werten von 16.6 und 16.8 nM.

Die gleichen K_i Werte weisen darauf hin, dass ADM in SK-N-MC Zellen eher mit einem CGRP Rezeptor als mit einem spezifischen ADM Rezeptor interagiert. Obwohl ADM ferner verwandt mit CGRP als Amylin ist, interagiert ADM potenter als Amylin mit dem CGRP Rezeptor in SK-N-MC Zellen. Somit sind gewisse biologische Wirkungen von ADM der Interaktion mit CGRP Rezeptoren zuzuschreiben.

Neuartige ADM Rezeptoren sind in Ratten Astrozyten in Primärkultur und in der (Maus/Ratte) Neuroblastom x Gliom Hybridzelllinie NG108-15 identifiziert worden. In kultivierten Ratten (r) Astrozyten hemmte rADM die Bindung von [¹²⁵I]hADM mit einer IC₅₀ von 0.27 nM. Ratten α-CGRP, Ratten Amylin und Lachs (s)CT verdrängten die [¹²⁵I]hADM Bindung bei 85-, 148- und > 4000-fach höheren Konzentrationen. rADM stimulierte die

Akkumulation von cAMP mit einer EC_{50} von 1.00 nM. Ratten α -CGRP war 214-mal und Ratten Amylin sowie sCT waren > 1000-mal weniger potent. Ratten α -CGRP war in den NG108-15 Zellen bis zu einer Konzentration von 1 μ M inaktiv. hADM(22-52) und hCGRP-I(8-37) konnten die Produktion von cAMP bis zu einer Konzentration von 1 μ M nicht stimulieren, aber sie antagonisierten die durch rADM stimulierte Bildung von cAMP mit resultierenden K_i Werten von 365 und 92 nM in den Astrozyten und 45 und 1300 nM in den NG108-15 Zellen. In den Astrozyten und in den NG108-15 Zellen bewirkte rADM keine Erhöhung des zytosolischen Kalziums.

Schlussfolgernd sind zum ersten Mal ADM Rezeptoren im Rattenhirn unter Verwendung von Astrozyten in Primärkultur und der Neuroblastom x Gliom Zelllinie NG108-15 nachgewiesen worden. Die Rezeptoren sind mit der Bildung von cAMP, jedoch nicht mit der Erhöhung des zytosolischen Kalziums gekoppelt. Die unterschiedlichen Interaktionen sowohl mit CGRP als auch mit den verkürzten Rezeptor Antagonisten ADM(22-52) und CGRP(8-37) weisen auf die Existenz von ADM Rezeptor Subtypen im Hirn hin.

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, sind die Bindung von Bolton-Hunter-[Lys¹] Ratten Amylin ($[^{125}\text{I}]$ Amylin) und die Stimulation von cAMP durch humanes Amylin, hCT und hCGRP-I untersucht worden. In MCF-7 Zellen hemmte humanes Amylin die Bindung von $[^{125}\text{I}]$ Amylin mit einer IC_{50} von 3.6 nM. hCT und hCGRP-I verdrängten die Bindung von $[^{125}\text{I}]$ 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 $[^{125}\text{I}]$ 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 $[^{125}\text{I}]$ hCT wurde in beiden Zelllinien entsprechend dem pharmakologischen Profil von hCT >> humanes Amylin > hCGRP-I gehemmt.

Zusammenfassend zeigen die MCF-7 und T47D Brustkarzinom Zellen ein vergleichbares Expressionsmuster in Bezug auf CT Rezeptor Subtypen und auf [¹²⁵I]hCT Bindungsstellen, aber nur in MCF-7 Zellen konnten [¹²⁵I]Amylin Bindungsstellen nachgewiesen werden. Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgern, dass in MCF-7 Zellen sowohl Amylin als auch CT Rezeptoren vorkommen. Beide Rezeptoren sind mit der Aktivierung der Adenylatzyklase, jedoch nicht mit der Erhöhung des freien zytosolischen Kalziums, gekoppelt.

Parathormon (PTH), ein einkettiges 84 Aminosäuren langes Polypeptid, ist ein wichtiger physiologischer Regulator der Kalzium- und Phosphat-Homöostase mit den Hauptzielorganen Skelett und den Nieren. PTH Rezeptoren, deren Struktur mittels Klonierung aufgeklärt worden ist, zusammen mit den Rezeptoren für CT und Sekretin gehören zu einer Unterfamilie der sieben transmembranären G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In der Osteosarkom Zelllinie UMR-106 der Ratte wurde die Rolle der PTH-aktivierten intrazellulären Signalwege untersucht. Dabei wurden stabil transfektierte cAMP-, Serum- und Phorbolster-induzierbare Luziferase Reportergene verwendet (CRE-Luz, SRE-Luz, TRE-Luz). Eine maximal 43-fache Induktion der CRE-Luz Expression wurde mit 100 nM rPTH(1-34) ($EC_{50}=0.44$ nM) erhalten, dabei blieb die SRE-Luz und die TRE-Luz Aktivität unbeeinflusst. Eine maximale 2.8- und 3.4-fache Induktion der SRE-Luz durch 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) oder durch 100 nM PMA (Phorbolster) wurde durch die gleichzeitige Zugabe von 100 nM PTH(1-34) unterdrückt (IC_{50} : 0.04 nM bzw. 0.15 nM). Auf ähnliche Weise wurde die 7.3-fache Induktion der TRE-Luz durch 100 nM PMA bei gleichzeitiger Zugabe von 100 nM PTH(1-34) um 50% gehemmt ($IC_{50}=0.5$ nM). Die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) durch EGF und PMA wurde ebenfalls durch Zugabe von PTH(1-34) unterdrückt. 1 mM 8-Br-cAMP und 0.1 mM Forskolin zeigten dieselbe Wirkung wie PTH(1-34).

Zusammenfassend erfolgt in Osteosarkom UMR-106 Zellen die Induktion von Zielgenen und die Hemmung von Genen, welche durch Wachstumsfaktoren induziert werden, durch PTH vor allem über die Aktivierung des cAMP/PKA Signalweges. Dies untermauert die zentrale Rolle von PTH in der Regelung der Proliferation und der Differenzierung von Osteoblasten.