



## Doctoral Thesis

# Receptors for parathyroid hormone (PTH), PTH-related protein (PTHrP), calcitonin and maxadilan in the nervous system

**Author(s):**

Eggenberger, Marianne Rosina

**Publication Date:**

1998

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002005643> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**RECEPTORS FOR PARATHYROID HORMONE (PTH), PTH-RELATED PROTEIN (PTHrP), CALCITONIN AND MAXADILAN IN THE NERVOUS SYSTEM**

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

presented by  
MARIANNE ROSINA EGGENBERGER  
Eidg. dipl. Pharm.  
Born on 14 July 1967  
citizen of Buchs (SG) and Meilen (ZH)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. Möhler, examiner  
Prof. Dr. J.A. Fischer, co-examiner

## ZUSAMMENFASSUNG

Parathormon und PTHrP können den Lernprozess sowie das Erinnerungsvermögen im Gehirn beeinträchtigen. Die bei diesen Wirkungen mitspielenden Rezeptoren sind noch weitgehend unbekannt.

Eine cDNS wurde aus dem menschlichen Kleinhirn isoliert. Sie kodiert für ein Protein von 593 Aminosäuren und ist identisch zur PTH/PTHrP Rezeptor kodierenden cDNS, isoliert aus der menschlichen Niere und dem Skelett. Die mit der cDNS hybridisierten mRNS konnte mit Northern-Analyse in der menschlichen Niere, der Leber und in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden. In Gehirnschnitten der Ratte waren mit in situ Hybridisierung Signale in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns zu erkennen. An humanen SK-N-MC Neuroblastom Zellen, stabil transfektiert mit der isolierten cDNS, wurde die Bindung von [<sup>125</sup>I]chPTHrP(1-36) durch amino-terminale Fragmente von PTH und PTHrP verdrängt und cAMP sowie intrazelluläres Calcium stimuliert. Mit der Isolation und der Expression der cDNS wurden Hinweise für das funktionelle Vorhandensein des PTH/PTHrP Rezeptors im Gehirn erhärtet.

Parathormon, PTHrP und CT stimulieren cAMP in Astrozyten in Primärkultur. PTHrP beeinflusst über die Aktivierung des PTH/PTHrP Rezeptors das Wachstum und die Entwicklung verschiedener Gewebe.

Die embryonalen P19 Karzinom Zellen differenzieren sich unter Behandlung mit Retinsäure in Neuronen und Astrozyten. Funktionelle CT und PTH/PTHrP Rezeptoren wurden im Verlaufe dieser Entwicklung untersucht. Spezifische [<sup>125</sup>I]sCT(1-32) Bindung war an nicht behandelten Zellen mit Hilfe der Rezeptorautoradiographie sichtbar. An differenzierten Neuronen und Astrozyten waren keine Bindungsstellen für [<sup>125</sup>I]sCT(1-32) zu erkennen. Die [<sup>125</sup>I]sCT(1-32) Bindung und die cAMP Stimulierung durch sCT waren am höchsten in nicht behandelten Zellen und nahmen während der Entwicklung von Neuronen und Astrozyten konstant ab. Eine spezifische Bindung von [<sup>125</sup>I]chPTHrP(1-36) an nicht behandelten Zellen war nicht messbar, während die cAMP Produktion noch schwach stimuliert werden konnte. Im Gegensatz dazu war bereits zu Beginn der Entwicklung von Neuronen eine spezifische Bindung von [<sup>125</sup>I]chPTHrP(1-36) messbar, während die Stimulierung von zyklischem AMP um das 10-fache zunahm.

Die Resultate zeigen, dass die CT Rezeptoren mit dem nicht differenzierten Zelltyp verknüpft sind, während die PTH/PTHrP Rezeptoren erst nach der Retinsäure induzierten Differenzierung vermehrt gebildet werden.

Maxadilan, isoliert aus der Speicheldrüse von *Lutzomyia longipalpis*, ist ein potenter Vasodilator. Es bestehen Hinweise, dass Maxadilan mit dem klonierten PACAP Typ I aber nicht dem VIP/PACAP Typ II Rezeptor interagiert.

Die humanen SH-SY5Y Neuroblastom Zellen exprimieren den PACAP Typ I Rezeptor, da die Bindung von [<sup>125</sup>I]PACAP(1-27) potenter durch PACAP(1-27) als durch VIP verdrängt wurde. [<sup>125</sup>I]Maxadilan wurde ebenfalls von SH-SY5Y Zellen erkannt und die Bindung von [<sup>125</sup>I]PACAP(1-27) und [<sup>125</sup>I]Maxadilan wurde in der Reihenfolge Maxadilan = PACAP(1-27) >> VIP verdrängt. In derselben Weise wurde auch die cAMP Produktion stimuliert. Maxadilan und PACAP(1-27) erhöhten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch das Freisetzen von Calcium aus intrazellulären Speichern und erhöhtem Einstrom von extrazellulärem Calcium. In den humanen SK-N-MC Neuroblastom und humanen embryonalen HEK293 Nieren Zellen, welche PACAP Typ I und VIP/PACAP Typ II Rezeptoren exprimieren, wurde cAMP durch Maxadilan, PACAP(1-27) und VIP mit ähnlicher Stärke stimuliert. Die Wirkung von Maxadilan und VIP waren in SK-N-MC Zellen additiv und identisch zu PACAP(1-27). Maxadilan vermochte in den humanen Brustkarzinom Zellen T47D und MCF-7, welche VIP/PACAP Typ II Rezeptoren exprimieren weder [<sup>125</sup>I]PACAP(1-27) Bindung zu verdrängen noch zyklisches AMP zu stimulieren. Diese Untersuchung zeigt, dass Maxadilan in humanen Neuroblastom Zellen ein spezifischer PACAP Typ I Rezeptor Agonist ist, der den VIP/PACAP Typ II Rezeptor nicht erkennt.

## SUMMARY

Actions of PTH and PTHrP in the brain, including impairment of learning and memory processes have been described, but the binding sites involved in the nervous system have so far not been characterized.

A cDNA encoding a PTH/PTHrP receptor protein of 593 amino acids was isolated from human cerebellum. It is identical to the PTH/PTHrP receptor cDNAs cloned from human kidney and bone. Expression of mRNA, hybridized with the cloned cDNA, was recognized by Northern blot analysis in human kidney and liver, and in different brain areas. In situ hybridization in rat brain tissue sections showed predominant signals in the Purkinje cell layer of the cerebellum. In human SK-N-MC neuroblastoma cells, stably transfected with the isolated cDNA, binding of [<sup>125</sup>I]chPTHrP(1-36) was displaced by N-terminal PTH and -PTHrP with indistinguishable IC<sub>50</sub>. Second messenger analysis revealed coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase C similar to non-neural cells. In conclusion, the isolation of the cDNA encoding the PTH/PTHrP receptor gives further evidence for the existence of a functional PTH/PTHrP receptor in the brain.

Parathyroid hormone, PTHrP and CT stimulate cAMP in cultured mouse astrocytes. PTHrP modulates growth and differentiation through interaction with the PTH/PTHrP receptor during development.

Mouse embryonic P19 carcinoma cells differentiate upon treatment with retinoic acid into neurons and astrocytes. There the functional expression of CT and PTH/PTHrP receptors was studied during differentiation. Receptor autoradiography revealed specific binding of [<sup>125</sup>I]sCT(1-32) to the untreated cells, but not to differentiated neurons and astrocytes. As a result, specific [<sup>125</sup>I]sCT(1-32) binding and sCT stimulated cAMP accumulation decreased during differentiation. [<sup>125</sup>I]chPTHrP(1-36) binding was not detectable in untreated cells but was observed throughout differentiation into neurons and astrocytes. In parallel, chPTHrP(1-36) stimulated cAMP accumulation was low in untreated cells but increased in cells committed to differentiation. Therefore, CT receptors are associated with undifferentiated cells whereas PTH/PTHrP receptors are expressed in differentiated cells upon treatment with retinoic acid.

Maxadilan, isolated from the salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*, is a potent vasodilator. There is evidence for its interaction with the cloned PACAP type I but not with the VIP/PACAP type II receptors.

The human SH-SY5Y neuroblastoma cells express PACAP type I receptors since binding of [<sup>125</sup>I]PACAP(1-27) was displaced with higher potency by PACAP(1-27) than VIP. [<sup>125</sup>I]maxadilan also bound to SH-SY5Y cells and binding of [<sup>125</sup>I]PACAP(1-27) and [<sup>125</sup>I]maxadilan was displaced with a rank order of potency of maxadilan = PACAP(1-27) >> VIP. The same findings were obtained with respect to stimulation of cAMP accumulation. Maxadilan and PACAP(1-27) also increased [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> through mobilization from intracellular stores and influx of extracellular calcium. In human SK-N-MC neuroblastoma cells and human HEK293 embryonic kidney cells, expressing both PACAP type I and VIP/PACAP type II receptors, maxadilan, PACAP and VIP stimulated cAMP levels equipotently. The effects of VIP and maxadilan were additive in SK-N-MC cells and reached those of PACAP(1-27) alone. In T47D and MCF-7 breast carcinoma cells with VIP/PACAP type II receptors, maxadilan failed to displace [<sup>125</sup>I]PACAP(1-27) binding and to stimulate cAMP accumulation. In conclusion, maxadilan is a PACAP type I receptor specific agonist not recognized by VIP/PACAP type II receptors in human neuroblastoma cells.