



Doctoral Thesis

Structure affinity relationships of neuropeptide Y and calcitonin gene related peptide with their specific receptors

Author(s):

Rist, Beate

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001843355> →

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](#).

18. Nov. 1997

**Structure Affinity Relationships of Neuropeptide Y
and Calcitonin Gene Related Peptide with their
Specific Receptors**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Beate Rist

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Beate Rist', with a large, stylized flourish at the end.

1997

Summary

Neuropeptide Y is a 36-mer peptide amide which is abundant in the mammalian peripheral and central nervous system. It is a sympathetic co-transmitter mediating vasoconstriction through direct effects or through potentiation of other vasoconstrictors. Moreover, NPY is centrally involved in regulation of food intake, memory retention and anxiolysis.

Calcitonin gene related peptide (CGRP) is a 37 residue neuropeptide, which causes vasodilatation, increase in heart rate, and decrease in food intake. Furthermore, it plays a role in the regulation of the calcium metabolism and in insulin secretion.

Their important biological activities are responsible for the increasing interest in these two neuropeptides as new targets in drug discovery. Their multiple physiological relevance is accompanied by receptor multiplicity. Several subtypes of NPY- and CGRP receptors have been pharmacologically characterised before their more recent cloning. The aim of this work was to gain further detailed information about structure-affinity relationships between distinct receptor subtypes of NPY and CGRP, respectively, and their corresponding specific ligands. The development of receptor subtype selective agonists and/or antagonists which are structurally well defined was the main challenge of this work.

In 1994 little was known about the structural prerequisites for ligand binding at the Y_1 receptor. Therefore, we performed a systematic approach to develop a reduced size analogue. Centrally truncated NPY analogues have been synthesised. Affinity was investigated on human neuroblastoma cells SK-N-MC which exclusively express the human Y_1 receptor subtype. We succeeded in identifying the first small peptidic ligand binding to the Y_1 receptor with an K_i of 20 nM. It became evident that no definite amino acid of the loop region of NPY is essential for Y_1 receptor recognition. The over all three-dimensional arrangement induced by a specific orientation of the C-terminus with respect to the N-terminus seems to be one of the main parameter for receptor interaction (Chapter 2).

In parallel the Y_2 receptor has been characterised pharmacologically in great detail. Smaller centrally and N-terminally truncated analogues such as [Ahx⁵⁻²⁴] NPY have been identified as full Y_2 receptor agonists. Nevertheless it was still unclear whether only the C-

terminal amino acids are involved in receptor interaction. It was speculated that in the centrally truncated analogues, that exhibit high Y_2 receptor affinity, the N-terminal residues only serve to stabilise a certain conformation of the C-terminus. We designed more rigid C-terminal analogues of the segment Ac-25-36 NPY, in order to stabilise potential biological active conformations. We succeeded in developing the small molecule, [Lys²⁸-Glu³²]NPY Ac-25-36, which has been stabilised by an intramolecular lactam-bridge. This cyclopeptide shows high selective Y_2 receptor affinity and activity. In a biological assay it has been characterised as potent agonist which is as active as the natural ligand NPY. We solved the 3D solution structure of [Lys²⁸-Glu³²]NPY Ac-25-36 using 2D NMR techniques and compared it with the linear, inactive peptide (Chapter 3).

In total 19 cyclic analogues of the C-terminal dodecapeptide NPY Ac-25-36 have been synthesised. Cyclisation was performed by side chain lactamisation of ornithine or lysine and glutamic or aspartic acid. We found that the size, the position, the orientation, the configuration and the location of the cycle plays an important role for receptor recognition. Circular dichroism studies have been performed to characterise the secondary structure of each peptide. The pharmacological and spectral data showed, that the α -helical content was not the predominant factor for high Y_2 receptor affinity. Using molecular dynamics we were able to propose a model for the bioactive conformation of the cyclic analogues. It became evident that the distances between the N- and C-terminus allow to discriminate between peptides with high binding affinity and those with low binding affinity. The study suggests a turn-like structure. None of the cyclopeptides exhibit significant affinity to the Y_1 receptor. Thus, these results support the hypothesis of a discontinuous binding site of NPY at the Y_1 receptor (Chapter 4).

Compared to the NPY receptors the CGRP receptors have been much less characterised, yet. Structure-activity studies of reduced size CGRP analogues showed that the C- and N-terminal region of the hormone may interact independently with their receptors. Since we were interested in antagonistic ligands at the hCGRP₁ receptor, we focused on the optimisation of the structurally poorly defined C-terminal part. The segment CGRP 28-37 which is known as selective CGRP₁ antagonist has been modified systematically, in order to elucidate the essential requirements for its receptor interaction. Our approach yielded in a series of high affinity ligands, including [D³¹, P³⁴, F³⁵]CGRP 27-37 which exhibits a 100-

fold increased affinity compared to the unmodified segment. So far, this is the smallest CGRP analogue that shows hCGRP₁ receptor affinity in the nanomolar range (Chapter 5).

Testing of the most potent CGPR-analogue compounds in *in vivo* models confirmed their antagonistic properties. Furthermore, the exchange of amino acid Asp³¹ to Asn³¹ prolonged the effect from 30 min to 1 h which suggest that position 31 is critical for proteolytic cleavage. Secondary structure investigations made by circular dichroism revealed that increase in ordered structure correlates well with affinity (Chapter 6).

Detailed information on neuropeptide Y, calcitonin gene related peptide and their receptors has just recently begun to increase with the establishment of suitable pharmacological assays, with the development of receptor sub-type selective ligands, as well as with the recent cloning of the Y₂-, Y₄/PP₁-, Y₅-, Y₆- and the CGRP₁ receptor. The results of structure-affinity and activity studies obtained with peptidic ligands can be very useful to develop non-peptide receptor antagonists. Nevertheless, further research is needed to increase the understanding of the physiological and potential pathophysiological significance of NPY and CGRP.

Zusammenfassung

Neuropeptid Y ist eines der häufigsten Neurohormone des peripheren und zentralen Nervensystems der Säugetiere. Es besteht aus 36 Aminosäuren und ist C-terminal amidiert. Peripher wirkt NPY direkt gefässverengend sowie durch die Steigerung der Aktivität weiterer Neurotransmitter. Zentral beeinflusst NPY die Nahrungsaufnahme, führt zur Steigerung der Gedächtnisleistung und zur Sedation.

Calcitonin gene related peptide (CGRP) ist ein Neurohormon welches aus 37 Aminosäuren aufgebaut ist. Es zeigt gefässweiternde Wirkung, führt zur Steigerung der Herzfrequenz und zu einer verminderten Nahrungsaufnahme. Weiterhin spielt es eine Rolle bei der Regulation des Calciumhaushalts und bei der Insulinausschüttung.

Ihre vielfältigen und für die Regulation physiologischer Prozesse wesentlichen Aufgaben machen diese beiden Neurohormone als Ausgangsmoleküle für einen rationalen Ansatz in der Wirkstoffentwicklung interessant. Mehrere Subtypen von NPY und CGRP Rezeptoren sind bekannt und wurden pharmakologisch charakterisiert noch bevor sie kloniert worden sind. Ein Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung subtyp-selektiver Liganden für NPY (Y_1/Y_2) und CGRP₁ Rezeptoren. Eine weitere Herausforderung war die Herausarbeitung der strukturellen Merkmale solcher selektiver Verbindungen, um sie als Leitsubstanzen in der Wirkstoffentwicklung einzusetzen.

Im Jahre 1994 war noch wenig über die strukturellen Voraussetzungen, die ein Ligand mitbringen muss, der an den Y_1 Rezeptor bindet, bekannt. Ich wählte einen systematischen Ansatz, um verkürzte Analoga zu entwickeln. Da der mittlere Bereich des NPY Moleküls nicht entscheidend für eine Y_1 Rezeptorbindung zu sein schien, wurden diskontinuierliche NPY Analoga dargestellt. Ihre Affinität wurde an humanen Neuroblastomazellen getestet, welche ausschliesslich den humanen Y_1 Rezeptor exprimieren. Wir konnten den ersten kleinen peptidischen Liganden identifizieren, der mit einer IC_{50} von 20 nM an den Y_1 Rezeptor bindet. Es wurde deutlich, dass keine bestimmte Aminosäure aus der Loop-region von NPY essentiell für die Rezeptorerkennung ist. Die dreidimensionale Anordnung des Liganden, induziert durch eine spezifische Orientierung des C-Terminus in Bezug auf den N-Terminus, scheint dagegen einer der Hauptparameter für die Rezeptor-Ligand-Interaktion zu sein (Chapter 2).

Im Gegensatz zum Y_1 - war der Y_2 Rezeptor 1994 bereits im Detail pharmakologisch charakterisiert. Kleinere, zentral und N-terminal verkürzte Analoga waren als potente Y_2 Rezeptor-Agonisten bekannt. Trotzdem war immer noch nicht klar, ob ausschliesslich die C-terminalen Aminosäuren direkt in die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen involviert sind. Diskontinuierliche Analoga wie z.B. [Ahx⁵⁻²⁴]NPY zeigten vor allem hohe Y_2 Rezeptoraffinitäten. Dies führte zu der Vermutung, dass die N-terminalen Aminosäurereste nur zur Stabilisierung einer Konformation dienen könnten, die für die Bindung des C-Terminus entscheidend ist. Ich konstruierte starre Analoga des C-terminalen Segments Ac-25-36 NPY, um die potentielle biologisch aktive Konformation zu stabilisieren. Es gelang uns, ein cyclisches Dodekapeptid zu entwickeln, [Lys²⁸-Glu³²]NPY Ac-25-36, welches durch eine intramolekulare Lactambrücke an Flexibilität verlor. Dieses Cyclopeptid zeigte eine hohe spezifische und selektive Y_2 Rezeptoraffinität und -aktivität. Im biologischen Assay war es genauso aktiv wie der natürliche Ligand NPY. Wir bestimmten die dreidimensionale Struktur von [Lys²⁸-Glu³²]NPY Ac-25-36 mittels 2D NMR in Lösung und verglichen diese mit der des linearen inaktiven Analogons [Lys²⁸,Glu³²]NPY Ac-25-36 (Chapter 3).

Insgesamt wurden 19 cyclische Analoga des C-terminalen Dodekapeptides NPY Ac-25-36 synthetisiert. Die Cyclisierung erfolgte über die funktionellen Gruppen der Seitenketten von Ornithin oder Lysin und Asparagin- oder Glutaminsäure. Es stellte sich heraus, dass die Grösse, die Position, die Orientierung, die Konfiguration sowie die dreidimensionale Anordnung der Lactambrücke entscheidend für die Rezeptorererkennung sind. Um die Sekundärstruktur der einzelnen Cyclopeptide näher zu charakterisieren, wurden Circular dichroismusstudien durchgeführt. Die pharmakologischen und spektroskopischen Daten zeigten, dass der α -helikale Charakter alleine, nicht der entscheidende Faktor für eine gute Bindung am Y_2 Rezeptor darstellt. Moleküldynamiksimulationen mit ausgewählten Cyclopeptiden führten zu einem Modell, welches die wesentlichen konformativen Merkmale der bioaktiven Analoga verdeutlicht. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die Abstände zwischen N- und C-Terminus. Diese erlauben eine Unterscheidung zwischen Analoga mit guter und schlechter Bindungskapazität bezüglich des Y_2 Rezeptors.

Keines der synthetisierten Cyclopeptide zeigte eine signifikante Bindung an den Y_1 Rezeptor. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese einer diskontinuierlichen Bindungsstelle des NPYs am Y_1 Rezeptor (Chapter 4).

Im Vergleich zu den NPY Rezeptorsubtypen sind die des CGRPs pharmakologisch weitaus schlechter charakterisiert. Struktur-Aktivitätsstudien von verkürzten CGRP Analoga zeigten, dass die C- und die N-terminale Region des Hormons unabhängig von einander mit den spezifischen Rezeptoren interagieren. Da wir an antagonistisch wirkenden Liganden bezüglich des CGRP₁ Rezeptors interessiert waren, konzentrierten wir uns auf den strukturell kaum beschriebenen C-terminalen Bereich. Das Segment CGRP 28-37 ist als selektiver CGRP₁ Rezeptor Antagonist bekannt. Ich modifizierte dieses Fragment systematisch, um die essentiellen Erfordernisse für eine Rezeptorinteraktion aufzuklären. Dieser Ansatz führte zu einer Serie von hochaffinen Liganden, unter ihnen [D³¹, P³⁴, F³⁵]CGRP 27-37, welcher eine 100 fach höhere Affinität aufweist als das unmodifizierte Segment. Bisher ist [D³¹, P³⁴, F³⁵]CGRP 27-37 das kleinste CGRP-Analogon welches eine Rezeptoraffinität (IC₅₀) im nanomolaren Bereich zeigt (Chapter 5).

Aktivitätsstudien der hochaffinen CGRP₁ Rezeptor Verbindungen in *in vivo* Modellen bestätigten deren antagonistische Wirkung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Austausch von Asn³¹ durch Asp³¹ den antagonistischen Effekt von 1 h auf 30 min verkürzt. Dies lässt den Schluss zu, dass eine saure Aminosäure in Position 31 den Abbau durch Proteasen begünstigt. Circular dichroismusuntersuchungen der entsprechenden Analoga verdeutlichten, dass die Zunahme der Bindungsaffinität mit der Ausbildung einer geordneten Struktur korreliert (Chapter 6).

Innerhalb des letzten Jahres ist das Wissen über Neuropeptid Y, CGRP und deren Rezeptoren enorm angewachsen. Detaillierte Informationen wurden durch die Etablierung von aussagekräftigen pharmakologischen Assays, durch die Entwicklung der Rezeptorsubtyp-selektiven Liganden und nicht zuletzt durch die Klonierung des Y₂-, Y₄/PP₁-, Y₅-, Y₆- und des CGRP₁ Rezeptors erhalten. Die Ergebnisse, welche durch Struktur-Affinitäts- und Aktivitätsstudien mit peptidischen Liganden erhalten wurden, können für die Entwicklung von nicht-peptidischen Antagonisten eingesetzt werden. Trotzdem sind weitere Anstrengungen von Nöten, um die physiologische und potentielle pathophysiologische Signifikanz von NPY und CGRP zu erforschen und zu verstehen.