

Dissertation ETH No. 12944

# **Molecular Characterization of the Neuropeptide Y Y<sub>2</sub>-Receptor**

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

presented by

**Nikolaus Ingenhoven**

Dipl. Chemiker  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

born December 10th, 1967  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger, examiner  
Prof. Dr. G. Folkers, co-examiner  
Prof. Dr. A. N. Eberle, co-examiner

**1998**

## SUMMARY

Neuropeptide Y (NPY) is a 36 amino acid peptide amide and a member of the pancreatic polypeptide hormone family. It is abundant in the mammalian peripheral and central nervous system and acts as a sympathetic co-transmitter that mediates vasoconstriction through direct effects or through potentiation of other vasoconstrictors. Centrally, NPY is involved in regulation of food intake, memory retention and anxiolysis.

The broad physiological relevance of NPY is reflected by the multiplicity of its receptors and gives reason for an increasing interest in NPY as new target in drug discovery. Several subtypes of NPY receptors have been cloned and pharmacologically characterized. The Y<sub>2</sub>-receptor has been characterized as the predominant NPY receptor subtype in the brain and it is particularly abundant in the hippocampus. Various effects are associated with the Y<sub>2</sub>-receptor like modulation of other neurotransmitters like glutamate and GABA, inhibition of lipolysis, antisecretory effects and enhancement of memory retention.

The major aspect of this work is the molecular characterization of the NPY Y<sub>2</sub>-receptor subtype in order to characterize the molecular mechanisms of its interaction with NPY and the correlated pharmacological responses. Insights in the structural requirements of ligand-receptor interaction provide the knowledge base which facilitates rational drug design and a better comprehension of the complex physiological mechanisms that are associated with NPY. Several aspects of the ligand-receptor interaction of NPY and the Y<sub>2</sub>-receptor subtype have been investigated in this study. NPY analogues have been synthesized in order to provide tools for receptor localization, identification and isolation and for the determination of the structure-affinity and -activity relationship of NPY and its receptors.

In order to distinguish between NPY Y<sub>1</sub>- and Y<sub>2</sub>-receptor subtypes, selective analogues of NPY have been synthesized and modified with a fluorescence label. Using two human neuroblastoma cell lines, SK-N-MC and SMS-KAN, which endogenously express the Y<sub>1</sub>- and Y<sub>2</sub>-receptor subtype, respectively, the fluorescent labeled analogues have been shown to be valuable tools to

characterize cell lines by the identification of receptor subtypes by fluorescence microscopy (Chapter 2). Moreover, irreversible labeling of the receptor subtypes has been achieved using a photoactivatable fluorescent labeled analogue of NPY.

Based on the synthesis and pharmacological investigation of cyclic NPY analogues a model for the bioactive conformation of the cyclic analogues at the Y<sub>2</sub>-receptor has been proposed (Chapter 3). Accordingly, the affinity of a ligand at the Y<sub>2</sub>-receptor is depending on the distance between its N- and C-terminus. The results of this approach suggest that the biologically active conformation of NPY that is required for receptor activation is significantly different for the Y<sub>1</sub>- and the Y<sub>2</sub>-receptor subtype.

Y<sub>1</sub>-, Y<sub>2</sub>-, and Y<sub>5</sub>-receptors appear to be involved in the effect of NPY on the control of the feeding behavior of rats. The receptors appear to coexist on presynaptic terminals of neurons in the paraventricular nucleus (PVN), possibly sharing a mechanism of action. The pharmacology of this response has been shown to resemble that of the induction of food intake, and suggests that a step in eliciting feeding involves the disinhibition of some parvocellular neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus by a presynaptic action on the GABA release (Chapter 4).

The contribution made by each amino acid sidechain of NPY to receptor binding affinity in centrally located Y<sub>1</sub>- or Y<sub>2</sub>-expressing neuroblastoma cells, and to peripheral Y<sub>2</sub>-like receptor activation in rat jejunal epithelia has been assessed by systematically exchanging single residues of NPY 1 - 36 with L-alanine. Agonist potency showed [Ala<sup>3</sup>] NPY and [Ala<sup>30</sup>] NPY to be equipotent with NPY, a 4 - 20-fold loss of activity for [Ala<sup>5</sup>] NPY, [Ala<sup>13</sup>] NPY, [Ala<sup>20</sup>] NPY, [Ala<sup>21</sup>] NPY and [Ala<sup>22</sup>] NPY; a 50 - 100-fold loss of activity for [Ala<sup>8</sup>] NPY, [Ala<sup>27</sup>] NPY, [Ala<sup>28</sup>] NPY and [Ala<sup>36</sup>] NPY, while [Ala<sup>34</sup>] NPY was inactive. This structure-activity relationship has been shown to be similar to, but not the same as that observed in Y<sub>2</sub>-expressing human neuroblastoma cells (SMS-KAN). [Ala<sup>34</sup>] NPY for example showed a 75-fold lower affinity at SMS-KAN cells compared to NPY, while it was inactive at rat jejunal epithelia cells (over 270-fold lower activity compared to NPY). This supports the existence of two Y<sub>2</sub>-receptor subtypes, a central and a peripheral one (Chapter 5).

Photoactivatable biotinylated ligand analogues of NPY, which were labeled with  $^3\text{H}$ -propionate, have been used for photoaffinity labeling of the  $\text{Y}_2$ -receptor subtype and its characterization on the protein level, which was supported by the use of  $\text{Y}_2$ -receptor subtype selective antibodies. Photoaffinity labeling of the receptor followed by SDS-PAGE and detection of the bound radioactivity, and SDS-PAGE of solubilized receptors and subsequent Western blotting revealed nearly the same molecular masses. Two proteins with molecular masses of  $58 \pm 4$  kDa and  $50 \pm 4$  kDa correspondingly have been detected for the human neuroblastoma cell line SMS-KAN, which is endogenously expressing the  $\text{Y}_2$ -receptor subtype and for CHO-Y2 cells, which have been transfected with  $\text{Y}_2$ -receptor cDNA (Chapter 7). Both proteins are suggested to represent the  $\text{Y}_2$ -receptor subtype which exhibit different amounts of glycosylation. In combination with a biotin based signal amplification method (Chapter 6) these photoactivatable NPY analogues will be valuable tools for a further detailed identification of the ligand binding sites of the  $\text{Y}_2$ -receptor.

In conclusion, a combination of cell biology, synthesis of peptide analogues, pharmacological assays and receptor biochemistry has been used to characterize the human NPY  $\text{Y}_2$ -receptor subtype.

The results of this study might be useful in drug targeting and can contribute to a better comprehension of the physiological and potential pathophysiological significance of NPY.

## ZUSAMMENFASSUNG

Neuropeptid Y ist eines der am häufigsten vorkommenden 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 Potenzierung der Aktivität weiterer Neurotransmitter. Zentral beeinflusst NPY die Nahrungsaufnahme, führt zur Steigerung der Gedächtnisleistungen und zur Sedation.

Die große physiologische Relevanz von NPY zeigt sich in der Vielzahl seiner Rezeptoren und ist der Grund für ein steigendes Interesse an NPY in der Arzneimittelforschung. Zahlreiche NPY Rezeptor-Subtypen wurden bereits kloniert und pharmakologisch charakterisiert. Der  $Y_2$ -Rezeptor wurde als der wichtigste Subtyp im Gehirn identifiziert und findet sich im Hippocampus besonders häufig. Er ist mit einer Vielzahl von Effekten, wie der Modulation anderer Neurotransmitter wie Glutamat und GABA (führt z.B. zu einer Verstärkung der Gedächtnisleistung), der Inhibierung der Lipolyse und antisekretorischen Effekten verbunden.

Der Hauptaspekt dieser Arbeit besteht in der Charakterisierung des  $Y_2$ -Rezeptor-Subtyps auf molekularer Ebene, um die molekularen Mechanismen der Interaktion mit NPY und die damit verbundenen pharmakologischen Effekte zu untersuchen.

Einblicke in die strukturellen Verhältnisse von Ligand und Rezeptor ermöglichen ein rationales Design von Arzneimitteln und ein besseres Verständnis der komplexen physiologischen Mechanismen, die mit NPY verbunden sind. In dieser Studie wurden verschiedene Aspekte der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung untersucht. Dazu wurde eine Reihe von NPY Analoga synthetisiert, die zur Lokalisation, Identifizierung und Isolierung und für die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts- und -Affinitäts-Beziehungen von NPY und seinen Rezeptoren eingesetzt wurden.

Um eine einfache Unterscheidung zwischen dem NPY  $Y_1$ - und dem  $Y_2$ -Rezeptor-Subtyp zu ermöglichen, wurden subtyp-selektive Analoga synthetisiert und mit einem Fluoreszenz-Label modifiziert. Zwei humane Neuroblastoma Zell-Linien, die den  $Y_1$ - (SK-N-MC) und den  $Y_2$ -Rezeptor-Subtyp (SMS-KAN) exprimieren, wurden als Testsystem eingesetzt. Damit konnte gezeigt werden, daß es mit Hilfe der fluoreszenz-markierten NPY Analoga möglich ist,

Zell-Linien zu charakterisieren, indem die  $Y_1$ - und  $Y_2$ -Rezeptor-Subtypen auf intakten Zellen durch Fluoreszenz-Mikroskopie identifiziert werden (Chapter 2). Darüber hinaus konnten die Rezeptor-Subtypen durch ein photoaktivierbares, fluoreszenz-markiertes NPY Analogon irreversibel markiert werden.

Die Ligand-Rezeptor-Interaktion und die durch NPY induzierten pharmakologischen Effekte wurden durch die Charakterisierung von Affinität, Aktivität und Struktur verschiedener NPY Analoga untersucht.

So wurde auf der Basis der Synthese und der pharmakologischen Untersuchung zyklischer NPY Analoga ein Modell für die bioaktive Konformation dieser Analoga erstellt (Chapter 3). Demnach wird die Affinität eines Liganden an dem  $Y_2$ -Rezeptor-Subtyp durch den Abstand zwischen seinem N- und C-Terminus bestimmt. Diese Resultate deuten darauf hin, daß sich die zur Aktivierung der Rezeptoren notwendige Konformation der Liganden für den  $Y_1$ - und den  $Y_2$ -Rezeptor-Subtyp stark unterscheidet.

Weiterhin scheinen die NPY Rezeptor-Subtypen  $Y_1$ ,  $Y_2$  und  $Y_5$  an dem Mechanismus beteiligt zu sein, über den NPY das Fressverhalten von Ratten beeinflusst. Die Rezeptoren koexistieren auf den präsynaptischen Termini von Neuronen im Paraventriculären Nucleus (PVN) und interagieren möglicherweise. Es konnte gezeigt werden, daß die Pharmakologie dieser Interaktion große Ähnlichkeit mit der der Induktion der Steigerung der Nahrungsaufnahme durch NPY aufweist. Dies deutet darauf hin, daß ein Schritt zur Steigerung der Nahrungsaufnahme die Inhibierung einiger parvozellulärer Neuronen im PVN des Hypothalamus durch eine präsynaptische Beeinflussung der GABA-Ausschüttung einschließt (Chapter 4).

Der Bedeutung jeder einzelnen Aminosäure-Seitenkette von NPY, sowohl für die Affinität von NPY an  $Y_1$ - und  $Y_2$ -Rezeptor-Subtypen in Neuroblastoma-Zellen, als auch für die Aktivierung von Rezeptoren in Epithel-Zellen des Dünndarms, wurde durch einen systematischen Austausch jeder einzelnen Aminosäure der NPY-Sequenz durch L-Alanin untersucht. Hierbei zeigte sich, daß [Ala<sup>3</sup>] NPY und [Ala<sup>30</sup>] NPY die gleiche Aktivität wie NPY aufweisen, [Ala<sup>5</sup>] NPY, [Ala<sup>13</sup>] NPY, [Ala<sup>20</sup>] NPY, [Ala<sup>21</sup>] NPY and [Ala<sup>22</sup>] NPY eine 4 - 20-fach geringere Aktivität und [Ala<sup>8</sup>] NPY, [Ala<sup>27</sup>] NPY, [Ala<sup>28</sup>] NPY und [Ala<sup>36</sup>] NPY eine 50 - 100-fach schwächere Aktivität zeigen, während [Ala<sup>34</sup>] NPY inaktiv ist. Die so ermittelte Struktur-Aktivitäts-Beziehung ist sehr ähnlich wie die für den  $Y_2$ -Rezeptor-Subtyp in humanen Neuroblastoma-Zellen (SMS-KAN) beobachtete, aber nicht exakt die

gleiche. So zeigt z.B. [Ala<sup>34</sup>] NPY im Vergleich zu NPY eine 75-fach geringere Affinität an SMS-KAN Zellen, während es an Epithel-Zellen des Dünndarms inaktiv ist, d.h. eine über 270-fach geringere Aktivität im Vergleich mit NPY aufweist. Dies unterstützt die These, nach der ein zentraler und ein peripherer Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyp existiert (Chapter 5).

Die Charakterisierung des Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyps auf der Protein-Ebene wurde mit Hilfe photoaktivierbarer, biotinylierter Analoga von NPY, die mit <sup>3</sup>H-Propionsäure modifiziert wurden, erreicht. Die Liganden wurden für das Photocrosslinking des Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyps eingesetzt und die Ergebnisse durch den Einsatz subtyp-selektiver Antikörper verifiziert. Hierzu wurden entsprechende Membran-Präparationen durch Crosslinking kovalent mit dem Ligand verbunden, die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und die gebundene Radioaktivität gemessen. Parallel dazu wurden solubilisierete Membrane ebenfalls mittels SDS-PAGE getrennt und die Molekulargewichte der Rezeptoren durch Western-Blotting unter Einsatz der subtyp-selektiven Antikörper ermittelt. Es wurden jeweils zwei Proteine mit molekularen Massen von 58 ± 4 kDa und 50 ± 4 kDa identifiziert, sowohl in humanen Neuroblastoma-Zellen (SMS-KAN), die den Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyp endogen exprimieren, als auch in Eierstock-Zellen des Chinesischen Hamsters, die mit humaner cDNA transfiziert wurden (Chapter 7). Diese beiden Proteine entsprechen vermutlich zwei unterschiedlich stark glykosylierten Formen des Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyps. In Kombination mit einer auf dem Biotin/Streptavidin-System basierenden Signalverstärkungs-Technik (Chapter 6) stellen die verwendeten photoaktivierbaren NPY Analoga wertvolle Hilfsmittel für die weitergehende detaillierte Identifizierung der NPY-Bindungsstellen des Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyps dar.

Durch diese Studie konnte gezeigt werden, daß eine Charakterisierung des humanen NPY Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyps durch eine Kombination von Zellbiologie, der Synthese von Peptid-Analoga, pharmakologischen Assays und Rezeptor-Biochemie möglich ist.

Insgesamt können die Resultate dieser Arbeit für die Entwicklung von Arzneistoffen hilfreich sein und gleichzeitig zu einem besseren Verständnis der physiologischen und potentiell pathophysiologischen Bedeutung des NPY beitragen.