

Dissertation ETH No. 13120

Characterisation of Neuropeptide Y Receptors by Antibodies

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

presented by

Christophe Eckard

Dipl. Chemiker
ETH Zürich

born February 17th, 1966
citizen of Winterthur, Zurich

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger, examiner
Prof. Dr. G. Folkers, co-examiner
Dr. H. Wieland, co-examiner

1999

SUMMARY

Neuropeptide Y (NPY) is one of the most abundant neurohormones in the mammalian peripheral and central nervous system. It consists of 36 amino acids and is C-terminally amidated. A variety of physiological effects have been attributed to NPY. Peripherally NPY mediates vasoconstriction through direct effects or through potentiation of other vasoconstrictors. One of the most striking central actions of NPY is the induction of food intake. Further central effects of NPY are memory retention processes and sedation. The broad physiological relevance of NPY gives reason for an increasing interest in NPY as a new target in drug discovery.

NPY exerts its effects via several receptor subtypes. Five distinct NPY receptors subtypes have been cloned and pharmacologically characterised. They have been named Y₁-, Y₂-, Y₄/PP₁-, Y₅- and y₆-receptor subtype. All subtypes belong to the large superfamily of G-protein-coupled, heptahelical receptors. The different receptor subtypes are localised in various tissues. Tissues with high density of NPY receptors are blood vessels, kidney, adrenal glands, nerve endings and brain in human, however distribution of the receptors is species specific. The typical signaling response of NPY receptors found in almost all tissues and cell types is the inhibition of adenylyl cyclase.

It has yet been impossible to structurally characterise G-protein coupled receptor proteins by cristallography or magnetic resonance. This limits our knowledge of the NPY receptor binding site, as well as on the molecular mechanism of action. Accordingly, alternative methods are required to characterise the receptors. The major aspect of this work was the characterisation of NPY receptors on a molecular level by antibodies.

Insights in the structural requirements of ligand-receptor interaction provide the knowledge base which facilitates drug design and a better comprehension of the complex physiological mechanisms that are associated with NPY. In this work, polyclonal antibodies raised against defined segments of the NPY receptor subtypes have been used for localisation, for identification and for characterisation of the structure affinity relationships of NPY and its receptors.

Synthetic fragments of the second and third extracellular loop of the Y_{1-} , Y_{2-} , Y_{4-} and Y_{5-} -receptor subtype were used to generate selective anti-receptor antibodies. Sera were tested on intact receptors in ELISA assays and on solubilised receptors in Western blot experiments. Molecular mass was determined for each receptor protein. Because of the different glycosilation and fragmentation, several bands were stained for every receptor. For the Y_{1-} -receptor, particularly bands at 73 kDa and 51 kDa were detected. The Y_{2-} -receptor was stained at 58 kDa, 50 kDa and 35 kDa. Bands of 51 kDa and 35 kDa were found for the Y_{4-} and the Y_{5-} -receptor. Selectivity was achieved for the solubilised Y_{2-} -receptor with the antibody directed against the second extracellular loop. Serum Y_{5} E2/2 recognised the intact Y_{1-} and Y_{5-} -receptor and serum Y_{5} E3 recognised the intact Y_{1-} and Y_{4-} -receptor. In combination these sera can differentiate between the four receptor subtypes (Chapter 2).

Some of the generated antibodies were also tested on intact cells expressing the Y_{1-} , Y_{2-} , and Y_{5-} -receptor. Additionally, and in order to have another tool for receptor characterisation, Ala-substituted and centrally truncated NPY analogues were synthesised and binding was tested on the intact receptors. Sera directed against the second extracellular loop were selective for the Y_{1-} -receptor (Y_{1} E2/2) as well as for the Y_{2-} -receptor (Y_{2} E2/1). Two sera (Y_{5} E2/2 and Y_{5} E₃) recognised the Y_{2-} , and the Y_{5-} -receptor. Accordingly, in combination these sera can differentiate between the intact Y_{1-} , Y_{2-} , and Y_{5-} -receptor subtype on living cells. Furthermore, subtype selectivity was achieved for the Ala-substituted NPY analogues [A^{13}]-pNPY and [A^{27}]-pNPY at the Y_{2-} -receptor (Chapter 3).

Synthetic fragments of the N-terminus, extracellular loops and C-terminus of the Y_{1-} -receptor were used to generate anti-receptor antibodies. Solubilised membranes, containing the Y_{1-} -receptor were separated by SDS-PAGE and detected with the antibodies in subsequent Western blotting experiments. Two proteins with molecular masses of 73 kDa and 51 kDa were stained for the rat and the human Y_{1-} -receptor. Competition with NPY showed that the binding of seven antibodies is strongly inhibited. Photoactivatable NPY-analogues were used to bind the hormone covalently to its receptor. Competition efficiency strongly depended on the position of the crosslinker within the ligand. Based on this studies, a model for the ligand-receptor interaction was suggested. The N-

terminus of NPY seems to be very flexible as binding of several antibodies, raised against different parts of the receptor, is inhibited after crosslinking via position 1. Crosslinking on position 21 and 22 leads particularly to a loss of affinity of sera E2/4 and E3/2. Position 27 of NPY could possibly be close to E2/2 because crosslinking on this position most efficiently blocks sera E2/2 and E2/3 (Chapter 4).

The Y_2 -receptor subtype was in addition to the studies with antibodies also characterised by photoactivatable biotinylated analogues of NPY, which were labeled with ^3H -propionate. Photoaffinity labeling of the receptor was followed by SDS-PAGE and detection of the bound radioactivity. Additionally, the molecular mass of the receptor was verified in a Western blot experiment with the anti Y_2 antibody (Y_2 E2/1). Two proteins with molecular masses of 58 ± 4 kDa and 50 ± 4 kDa correspondingly were detected in human neuroblastoma cells (SMS-KAN), which is endogenously expressing the Y_2 -receptor subtype, and in CHO- Y_2 cells, which have been transfected with Y_2 -receptor cDNA. Both proteins represent the Y_2 -receptor subtype with different amounts of glycosylation, which was proved in digest experiments with endoglycosidase (Chapter 5).

This work proved that anti-receptor antibodies represent valuable tools in differentiation and localisation but also in characterisation of the binding site of NPY receptor subtypes. Knowledge of receptor subtype distribution in different tissues is important in order to understand the biological role of the receptors. The results of this work could allow selective detection on a protein level of NPY receptors in tissue. Combined with a better understanding of hormone-receptor interactions these results could be helpful in designing new drugs.

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. NPY ist für verschiedenste physiologische Effekte verantwortlich. Peripher wirkt NPY direkt, sowie durch die Potenzierung der Aktivität weiterer Neurotransmitter, gefäßverengend. Eine der markantesten zentralen Aktivitäten von NPY ist die Regulation der Nahrungsaufnahme. Desweiteren führt NPY zentral zur Steigerung der Gedächtnisleistungen und zur Sedation. Aufgrund seiner vielfältigen Eigenschaften als Neurotransmitter zeigt die Arzneimittelforschung ein grosses Interesse am NPY System.

NPY vermittelt seine zahlreichen Effekte über mehrere Rezeptor-Subtypen. Fünf davon wurden bereits kloniert und pharmakologisch charakterisiert. Man nennt sie Y_1 -, Y_2 -, Y_4/PP_1 - Y_5 - und y_6 -Rezeptor-Subtypen. Alle NPY Rezeptor-Subtypen gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen. Die Rezeptoren sind in den verschiedensten Geweben lokalisiert. Hohe Dichten von NPY Rezeptoren weisen zum Beispiel die Blutgefässe, die Nieren, Nervenendigungen und das Gehirn auf, wobei die Verteilung Arten spezifisch ist. In fast allen Zellen und Geweben wurde die Inhibition der Adenylatcyclase als typische Signalantwort von NPY-Rezeptoren gefunden.

Die strukturelle Charakterisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptor Proteine mittels Kristallographie oder Magnetresonanz ist bis heute nicht gelungen. Dies limitiert unser Wissen über die NPY-Rezeptor Bindungsstelle und die molekularen Mechanismen der Signalübertragung, was alternative Untersuchungsmethoden notwendig macht. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Neuropeptid Y Rezeptor-Subtypen auf molekularer Ebene mit Hilfe von anti-Rezeptor Antikörpern.

Einblicke in die strukturellen Verhältnisse von Ligand und Rezeptor sowie die Identifizierung der einzelnen Rezeptor-Subtypen in Zellen und Geweben ermöglichen ein besseres Verständnis der komplexen physiologischen Mechanismen und damit in einem nächsten Schritt rationales Design von Arznei-

mitteln. In dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörperseren gegen definierte Segmente der NPY Rezeptorsubtypen zur Lokalisation, Identifizierung und für die Untersuchung der Struktur-Affinitäts-Beziehungen von NPY und seinen Rezeptoren eingesetzt.

Um eine Unterscheidung zwischen Y_{1-} , Y_{2-} , Y_{4-} und Y_{5-} -Rezeptor-Subtyp zu ermöglichen, wurden synthetische Fragmente des zweiten und dritten extrazellulären Loops der Rezeptoren zur Herstellung von Antikörper verwendet. Die Seren wurden in ELISA-Tests an intakten Rezeptoren und in Western Blot Experimenten an solubilisierten Rezeptoren getestet. Die molekularen Massen aller Rezeptor Proteine konnten bestimmt werden. Für jeden Rezeptor wurden Banden bei mehreren Massen detektiert, was mit unterschiedlicher Glykosylierung und Fragmentierung der Rezeptor Proteine erklärt werden kann. Für den Y_{1-} -Rezeptor wurde vor allem Banden bei 73 kDa und 51 kDa detektiert. Der Y_{2-} -Rezeptor wurde bei 58 kDa, 50 kDa und 35 kDa angefärbt. Banden von 51 kDa und 35 kDa wurden für den Y_{4-} -Rezeptor und Y_{5-} -Rezeptor gefunden. Selektivität wurde am solubilisierten Y_{2-} -Rezeptoren mit dem Serum gegen den zweiten extrazellulären Loop erreicht. Das Serum Y_5 E2/2 erkannte den intakten Y_{1-} - und Y_{5-} -Rezeptor und das Serum Y_5 E3 erkannte den intakten Y_{1-} und Y_{4-} -Rezeptor. Durch Kombination dieser zwei Seren ist es möglich, die vier Rezeptorsubtypen zu unterscheiden (Chapter 2).

Einige der Antikörper wurden auch an intakten Zellen, die den Y_{1-} , Y_{2-} und Y_{5-} -Rezeptor exprimieren, getestet. Um eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit zu haben, wurden zusätzlich eine Serie von Ala-substituierten und eine Serie von im Mittelteil verkürzten NPY Analoga synthetisiert und an den intakten Rezeptoren auf Selektivität getestet. Für den Y_{1-} -Rezeptor war das Serum gegen den zweiten extrazellulären Loop (Y_1 E2/2) selektiv. Für den Y_{2-} -Rezeptor erwies sich ebenfalls das Serum gegen den zweiten extrazellulären Loop (Y_2 E2/1) als selektiv. Zwei Seren (Y_5 E2/2 und Y_5 E3) erkannten den Y_{2-} und den Y_{5-} -Rezeptor. Damit können die Seren in Kombination den Y_{1-} , Y_{2-} und Y_{5-} -Rezeptor unterscheiden. Bei den Ala-substituierten NPY Analoga wurde für $[A^{13}]$ -pNPY und $[A^{27}]$ -pNPY Subtypenselektivität für den Y_{2-} -Rezeptor erreicht (Chapter 3).

Synthetische Fragmente aus dem N- und C-Terminus und aus den extrazellulären Loops der Y_{1-} -Rezeptorsequenz wurden verwendet, um anti-

Rezeptor Antikörper herzustellen. Die Proteine von Membranpräparationen, die den Y_1 -Rezeptor enthalten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blot Experimenten mit den Antikörpern detektiert. Es konnten zwei Proteine mit den Massen von 73 kDa und 51 kDa für den Ratten und den humanen Rezeptor nachgewiesen werden. Konkurrenz der Seren mit NPY zeigte, dass sieben Antikörper stark inhibiert wurden. Es wurden photoaktivierbare NPY-Analoga verwendet, um das Hormon kovalent an den Y_1 -Rezeptor zu binden. Die Konkurrenz der Seren hing dabei stark von der Position des Crosslinkers im Liganden ab. Aus den Daten dieser Verdrängungsversuche konnte ein Modell für die Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen entwickelt werden. Der N-Terminus von NPY scheint sehr flexibel zu sein, da Crosslinking an Position 1 verschiedene Seren gegen verschiedene Stellen im Rezeptor blockierte. Crosslinking an Position 21 und 22 führt vor allem zu einem Affinitätsverlust der Seren gegen E2/4 und E3/2. Position 27 von NPY dürfte nahe von E2/2 liegen, weil Crosslinking an dieser Position zu einer starken Blockierung der Seren E2/2 und E2/3 führt (Chapter 4).

Die Charakterisierung des Y_2 -Rezeptor-Subtypes wurde neben den Antikörpern auch mit Hilfe photoaktivierbarer, biotinylierter Analoga von NPY, die mit ^3H -Propionsäure modifiziert wurden, erreicht. 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 das Molekulargewicht des Rezeptors im Western Blot mit einem anti Y_2 Antikörper verifiziert. Es wurden jeweils zwei Proteine mit molekularen Massen von 58 +/- 4 kDa und 50 +/- 4 kDa identifiziert, und zwar sowohl in humanen Neuroblastoma-Zellen (SMS-KAN), die den Y_2 -Rezeptor endogen exprimieren, als auch in Eierstock-Zellen des Chinesischen Hamsters, die mit humaner cDNA transfiziert wurden. Diese beiden Proteine entsprechen zwei unterschiedlich stark glykosilierten Formen des Y_2 -Rezeptor Subtypes, wie durch Verdau-Experimente nachgewiesen wurde (Chapter 5).

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass anti Rezeptor Antikörper wertvolle Hilfsmittel zur Unterscheidung und Lokalisierung aber auch zur Charakterisierung der Bindungsstellen von NPY Rezeptor Subtypen darstellen. Die Kenntnis der Verteilung verschiedener Rezeptor Subtypen in verschiedenen

Gewebe ist wichtig, um die biologische Rolle der Rezeptoren zu verstehen. Die Resultate dieser Arbeit könnte die selektive Detektion von NPY-Rezeptoren auf Proteinebene in Gewebe ermöglichen. Zusammen mit dem besseren Verständnis der Hormon-Rezeptor Wechselwirkungen können die erzielten Resultate für die Entwicklung von Arzneistoffen hilfreich sein.