

# Neuropeptide Y and orexins

## key factors in the hypothalamic regulation of food intake

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Söll, Richard Martin

**Publication date:**

2000

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004109291>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Dissertation ETH No. 13977

**Neuropeptide Y and Orexins:  
Key Factors in the Hypothalamic Regulation of  
Food Intake**

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

presented by

**Richard Martin Söll**

Eidg. dipl. Apotheker

born May 7th, 1968

Citizen of Wattwil (SG), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger, examiner

Prof. Dr. G. Folkers, co-examiner

**2000**

## SUMMARY

In our days obesity and overweight are beginning to replace undernutrition and infectious diseases as the most significant contributor to the reduction of public health. This asks for a broader understanding of the regulation of food intake and energy homeostasis in human body, in order to encounter this tendency adequately and, where necessary, with sufficient medical treatment. The understanding of overweight and obesity as a willful misconduct with respect to food intake, has recently been extended by a genomically determined approach to understand the individual regulation of energy expenditure and food intake. The superior operating center for energy homeostasis is localized in the hypothalamic region of the central nervous system. A big series of neurotransmitters, mainly neuropeptides, are acting and interacting there in a redundant system (chapter 1). Leptin and insulin, two peripheral adiposity signals, circulate in the blood at levels proportional to the body fat content and enter the central nervous system in proportion to their plasma level. They evolve a wide range of action in the hypothalamus via specific receptors. Deficiency of either peptide induces food intake, whereas central administration into the brain does the opposite. Neuropeptide Y (NPY) and the orexins A and B are three of the important neuropeptides, which transmit the action of leptin and insulin in the hypothalamus. NPY acts in human via at least three different receptor subtypes. They all belong to the superfamily of heptahelical G-protein coupled receptors and are referred to as Y<sub>1</sub>-, Y<sub>2</sub>- and Y<sub>5</sub>-receptor. Furthermore, pancreatic polypeptide binds to Y<sub>4</sub>-receptors. The food intake stimulating effect of NPY is exerted – as known so far – via a team-play of Y<sub>1</sub>- and Y<sub>5</sub>-receptors. Involvement and function of these two receptor subtypes in signal transduction of NPY-induced food intake can be investigated best by a set of highly receptor subtype selective agonists and antagonists. Whereas for the Y<sub>5</sub>-receptor selective agonists and antagonists are known, for the Y<sub>1</sub>-receptor only selective antagonists are reported and it still lacks a highly selective agonist. This work presents the first NPY-based analogs with Y<sub>1</sub>-receptor preference and information about the role of specific amino acid positions of NPY for binding to the Y-receptor subtypes. Amongst the tested analogs, [F<sup>7</sup>,

P<sup>34</sup>] pNPY has been found to show highest Y<sub>1</sub>-receptor affinity, with subnanomolar affinity to the Y<sub>1</sub>-receptor, and K<sub>i</sub> values of 32 nM and 34 nM at the Y<sub>2</sub>- and Y<sub>5</sub>-subtype, respectively. In addition, variations of position 6, especially [R<sup>6</sup>, P<sup>34</sup>] pNPY and variations within positions 20-23 of NPY were found to result in analogs with Y<sub>1</sub>-receptor preference (chapter 2). With respect to antagonist, several Y<sub>1</sub>-receptor selective ligands are known. One of the mostly applied peptide antagonist at the Y<sub>1</sub>-receptor, a homodimer called GR231118, turned out to be a potent agonist at the Y<sub>4</sub>-receptor as well. In order to discriminate between Y<sub>1</sub>-receptor antagonism and Y<sub>4</sub>-receptor agonism, systematic variation of the monomeric sequence of GR231118 was performed with regard to hydrophobicity, size, charge, acidity and orientation of the side-chain of the newly introduced amino acids (chapter 3). This resulted in a set of peptides with increased Y<sub>1</sub>-receptor selectivity, which provided promising information for the development of new, highly selective Y<sub>1</sub>-receptor antagonists. Dimerization of the most interesting sequences by disulfide coupling showed significant increase in receptor affinity (chapter 3).

Besides the characterization of different receptor subtypes, NPY analogs can further be used for the characterization of species specific differences of a distinct receptor subtype (chapter 4). This was performed on the human, rat and guinea pig Y<sub>4</sub>-receptors, using [A<sup>33</sup>]pNPY, [A<sup>34</sup>]pNPY, [A<sup>35</sup>]pNPY, [A<sup>36</sup>]pNPY, a set of centrally truncated NPY analogs and <sup>125</sup>I-hPP (human pancreatic polypeptide) or <sup>125</sup>I-PYY (peptide YY) as radioligands. NPY and PYY competed with <sup>125</sup>I-hPP at Y<sub>4</sub>-receptors expressed in CHO cells according to a two-site model. This was investigated for guinea pig Y<sub>4</sub> by saturation with either radiolabeled hPP or pPYY. The number of high-affinity binding-sites for <sup>125</sup>I-pPYY was about 60% of the receptors recognized by <sup>125</sup>I-hPP. Porcine [Ala<sup>34</sup>]NPY and [Ahx<sup>8-20</sup>]NPY bound to rat Y<sub>4</sub>, but not to human or guinea pig Y<sub>4</sub>, according to a two-site model. These results suggest that different full agonists can distinguish between different active conformations of the guinea pig Y<sub>4</sub> receptor and that Y<sub>4</sub> receptors may display functional differences in vivo between human, guinea pig, and rat (chapter 4).

Orexin A and B, also known as hypocretin 1 and 2, are two recently discovered hypothalamic neuropeptides, which are importantly involved in the regulation of food intake and in the sleep-wake cycle. Orexin A is a 33 amino acid peptide amid

with two intramolecular disulfide bonds and orexin B a linear 28 amino acid peptide amid. In order to provide orexin A for biological and pharmacological tests, four different synthesis methods for the synthesis of peptides containing two disulfide bonds are compared and optimised regarding to reaction time, purity of the crude peptide and yield of the purified peptide. A new one-step cyclisation method in solution is presented for fast, easy and high yield synthesis of orexin A, based on iodine oxidation in acetic acid/water using S-acetamidomethyl (S-Acm) and S-trityl (S-Trt) as cysteine protecting groups. Furthermore, this work indicates the building of different mono- or bicyclic configurations of orexin A after unselective disulfide formation, indicating the necessity of selective formation of the two disulfide bonds in the synthesis of orexin A (chapter 5). Orexin A and B are endogenous ligands of two closely related G-protein-coupled receptors termed  $OX_1$  and  $OX_2$ . Up to now, no structure-activity relationships of any of the two orexin peptides have been reported, nor any potent subtype selective antagonist or agonist is known to characterize the physiological and pharmacological role of the two receptor subtypes. Structure-affinity relationships of fragments and analogs of orexin A and B were investigated on  $OX_1$ - and  $OX_2$ -receptors, expressed in CHO cells, and on SK-N-MC-cells (chapter 6). The results suggest the importance of the almost conserved C-terminal decapeptide of orexin A and B for ligand-receptor interaction. N-terminal fragments completely or almost completely lost binding. Orexin B(18-28), the C-terminal undecapeptide of orexin B, is presented as the first high affinity peptide antagonist at the  $OX_1$ -receptor. This compound did not alter intracellular calcium concentration, investigated by fluorometric imaging technique, despite very high binding. The C-terminal methionine residue of orexin B was found to be crucial for receptor activation. Interestingly, it could be sufficiently replaced by leucine, the C-terminal residue of orexin A. Binding experiments on SK-N-MC cells, a human neuroblastoma cell line, revealed the existence of an orexin-receptor. Differences in the binding profile of orexin A and B fragments at the  $OX_1$ -/ $OX_2$ -receptors and the receptor on SK-N-MC cells give raise to the suggestion of a third orexin receptor subtype (chapter 6).

## ZUSAMMENFASSUNG

Übergewicht und Fettleibigkeit (Obesitas) lösen in unseren Tagen weltweit die Unterernährung und infektiöse Krankheiten als wesentlichsten Faktor zur Verminderung von Gesundheit und Wohlbefinden ab. Daher besteht Bedarf die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushalts besser zu verstehen, um dieser Tendenz adäquat und mit entsprechender medizinischer Behandlung begegnen zu können. Das Verständnis von Übergewicht und Obesitas als willentliches Fehlverhalten in Bezug auf die Nahrungsaufnahme, wurde in den vergangenen Jahren erweitert durch einen genetisch begründeten Ansatz. Das übergeordnete Schaltzentrum für den Energiehaushalt im Gehirn ist im Hypothalamus lokalisiert. Eine grosse Anzahl von Neurotransmittern, vor allem Neuropeptide, wirken dort in einem hoch komplexen System (Kapitel 1). Leptin und Insulin sind zwei periphere Signalproteine, die im Blut in Konzentrationen proportional zur Menge an Körperfett zirkulieren. Im Verhältnis zu ihrer Plasmakonzentration gelangen sie über die Blut-Hirn-Schranke ins zentrale Nervensystem. Im Hypothalamus entfalten sie ein weites Wirkungsspektrum über spezifische Rezeptoren. Mangel an oder Fehlen von einem dieser Signalproteine führt zu vermehrter Nahrungsaufnahme und ihre Verabreichung direkt ins zentrale Nervensystem bewirkt das Gegenteil. Neuropeptid Y (NPY) und die Orexine A und B sind drei der wichtigen Neuropeptide, welche die Wirkung von Insulin und Leptin im Hypothalamus weiterleiten. NPY wirkt im Menschen über mindestens drei verschiedene Rezeptoren. Alle gehören zur Grossfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und sie werden als  $Y_1$ -,  $Y_2$ - und  $Y_5$ -Rezeptor bezeichnet. Zur gleichen Familie gehört auch der  $Y_4$ -Rezeptor, der das verwandte Pankreatische Polypeptid (PP) bindet. Die Stimulation der Nahrungsaufnahme durch NPY wird, soweit bekannt, über ein Zusammenspiel von  $Y_1$ - und  $Y_5$ -Rezeptoren vermittelt. Die genaue Funktion dieser zwei Rezeptorsubtypen in der Signalübertragung von NPY-induzierter Stimulation der Nahrungsaufnahme, kann am besten mittels hochaffiner und rezeptorsubtyp-spezifischer Agonisten und Antagonisten untersucht werden. Für den  $Y_5$ -Rezeptor sind selektive Agonisten und Antagonisten bekannt, am  $Y_1$ -Rezeptor nur selektive Antagonisten und es fehlt ein hochselektiver Agonist. Diese Arbeit präsentiert die ersten peptidischen

Agonisten auf NPY-Basis mit hoher Präferenz zum  $Y_1$ -Rezeptor und gibt Informationen über die Wichtigkeit einzelner Aminosäuren von NPY für die Bindungsaffinität an den Y-Rezeptor Subtypen. Höchste  $Y_1$ -Rezeptor Präferenz (> 3000-fach) unter den getesteten Verbindungen wurde mit  $[F^7, P^{34}]$  pNPY erreicht, welches subnanomolare Affinität am  $Y_1$ -Rezeptor aufwies und  $K_i$ -Werte von 32 nM und 34 nM am  $Y_2$ - und  $Y_5$ -Rezeptor. Des Weiteren wurde eine Präferenz zum  $Y_1$ -Rezeptor für Verbindungen gefunden mit Variationen in Position 6 von NPY, vor allem für  $[R^6, P^{34}]$  pNPY, sowie für Analoga mit Abweichungen in Positionen 20-23 (Kapitel 2). Was Antagonisten an Y-Rezeptoren betrifft, so sind einige subtypspezifische Liganden für den  $Y_1$ -Rezeptor bekannt. GR231118, ein zu Testzwecken sehr häufig eingesetzter homodimerer Antagonist am  $Y_1$ -Rezeptor, bindet auch als hochaffiner Agonist am  $Y_4$ -Subtyp. Um zwischen  $Y_4$ -Rezeptor Agonismus und  $Y_1$ -Rezeptor Antagonismus zu differenzieren, wurden systematische Variationen der monomeren Sequenz von GR231118 durchgeführt (Kapitel 3). Aminosäuren wurden ausgetauscht im Hinblick auf Lipophilie, Grösse, Säure-Basen Eigenschaften, Rigidität und Orientierung der Seitenketten der neu eingefügten Komponenten. Das führte zu einer Anzahl von Peptiden mit erhöhter  $Y_1$ -Rezeptor Selektivität, welche vielversprechende Informationen für die Entwicklung neuer, hochselektiver Antagonisten am  $Y_1$ -Rezeptor liefern. Dimerisierung ausgewählter Sequenzen durch Disulfidkupplung führte zu einer markanten Erhöhung der Bindungsaffinität (Kapitel 3).

Ausser für die Charakterisierung verschiedener Rezeptor Subtypen, können Neuropeptid Y Analoga auch für die Bestimmung spezies-spezifischer Unterschiede eines einzelnen Subtyps gebraucht werden (Kapitel 4). Das wurde zur Untersuchung des  $Y_4$ -Rezeptors von Mensch, Ratte und Guinea Pig ausgenutzt, wobei  $[A^{33}]$ pNPY,  $[A^{34}]$ pNPY,  $[A^{35}]$ pNPY,  $[A^{36}]$ pNPY, eine Anzahl zentral verkürzter NPY Analoga und  $^{125}I$ -hPP (humanes Pankreatisches Polypeptid) oder  $^{125}I$ -PYY (Peptid YY) als Radioliganden eingesetzt wurden. NPY und PYY verdrängen  $^{125}I$ -hPP an  $Y_4$ -Rezeptoren nach einem Modell mit zwei Bindungsstellen. Das wurde durch Sättigungsassays am Guinea Pig  $Y_4$ -Rezeptor belegt, unter Anwendung von hPP oder pPYY als Radioliganden. Die Anzahl an hochaffinen Bindungsstellen für  $^{125}I$ -pPYY betrug ungefähr 60% der Rezeptorbindungsstellen, die durch  $^{125}I$ -hPP erkannt wurden.  $[Ala^{34}]$ pNPY und

[Ahx<sup>8-20</sup>]NPY banden an Y<sub>4</sub>-Rezeptoren von Ratten, nicht aber von Menschen oder Guinea Pigs, nach einem Modell mit zwei Bindungsstellen. Diese Resultate legen nahe, dass verschiedene volle Agonisten zwischen verschiedenen aktiven Konformationen von Guinea Pig Y<sub>4</sub>-Rezeptoren unterscheiden können und dass Y<sub>4</sub>-Rezeptoren in vivo funktionelle Unterschiede zwischen Menschen, Ratten und Guinea Pigs aufweisen (Kapitel 4).

Orexin A und B, auch bekannt unter dem Namen Hypocretin 1 und 2, sind zwei erst vor kurzem entdeckte Neuropeptide, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme und im Schlaf-Wach-Zyklus spielen. Orexin A ist ein 33 Aminosäuren langes Peptidamid mit zwei intramolekularen Disulfidbrücken, Orexin B ein lineares, 28 Aminosäuren langes Peptidamid. Um Orexin A für biologische und pharmakologische Tests zur Verfügung stellen zu können, wurden vier verschiedene Methoden zur Synthese von Peptiden mit zwei intramolekularen Disulfidbrücken verglichen und optimiert in Bezug auf Reaktionszeit, Reinheit des Rohproduktes und Gehalt des gereinigten Peptides (Kapitel 5). Eine neue Methode zur Synthese von Orexin A wurde entwickelt, welche in kurzer Zeit und bei geringem Material- und Zeitaufwand zu hoher Ausbeute führt. Die selektive Bildung der zwei Disulfidbindungen in Lösung basiert auf einer Iod-Oxidation in einem Essigsäure/Wasser Gemisch unter Anwendung von S-Acetamidomethyl (S-Acm) und S-Trityl (S-Trt) als Cystein Schutzgruppen. Die Bildung verschiedener mono- oder bityklischer Konfigurationen nach unselektiver Disulfidverknüpfung verlangte eine selektive Schutzgruppenstrategie bei der Bildung der zwei Disulfidbrücken in der Synthese von Orexin A (Kapitel 5). Orexin A und B sind endogene Liganden an OX<sub>1</sub> und OX<sub>2</sub>, zwei nahe verwandten G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Bis jetzt wurden weder für Orexin A noch für Orexin B Struktur-Wirkungs-Beziehungen publiziert, noch subtypselektive Agonisten oder Antagonisten, die für die physiologische und pharmakologische Charakterisierung der Rezeptorsubtypen nötig wären. Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Fragmenten und Analoga von Orexin A und B wurden untersucht (Kapitel 6). OX<sub>1</sub>- und OX<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden kloniert und in CHO-Zellen exprimiert. Die Bindungsstudien weisen auf die Wichtigkeit des C-terminalen Dekapeptides von Orexin A und B für die Ligand-Rezeptor Wechselwirkung hin. N-terminale Fragmente verloren die Bindungsaffinität



beinahe ganz. Als erster hochaffiner peptidischer Antagonist am  $OX_1$ -Rezeptor wurde Orexin B(18-28), das C-terminale Undecapeptid von Orexin B, gefunden. Diese Verbindung hatte, trotz hoher Bindungsaffinität, keinen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Eine wesentliche Rolle in der Rezeptoraktivierung wurde für das C-terminale Methionin von Orexin B gefunden, welches allerdings durch Leucin, die C-terminale Aminosäure von Orexin A, ohne Wirkungsverlust ersetzt werden konnte. Zusätzliche Bindungsexperimente zeigten die Existenz eines Orexin-bindenden Rezeptors auf SK-N-MC Zellen, einer humanen Neuroblastoma Zelllinie. Abweichungen im Bindungsprofil von Orexin A und B Fragmenten zwischen den  $OX_1$ -/ $OX_2$ -Rezeptoren und SK-N-MC-Zellen, weisen auf die mögliche Existenz eines dritten Orexinrezeptor-Subtyps hin (Kapitel 6).