

Diss. ETH Nr. 14129

Structural Aspects of Neuropeptide Y: Implications of the Membrane-bound State for Receptor Recognition and Subtype Selection Studied by NMR

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

presented by
Reto Bader
Diplom-Biologe
Universität Bern

born on April 25, 1971
citizen of Olten (Solothurn)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Gerd Folkers, examiner
Prof. Dr. Annette G. Beck-Sickinger, co-examiner
Dr. Oliver Zerbe, co-examiner

2001

Summary

The present dissertation is concerned with the determination and interpretation of structure-activity-relationships of the neurohormone and -transmitter neuropeptide Y (NPY). NPY is a 36-residue and C-terminally amidated peptide hormone and represents the natural ligand of the NPY family of G protein coupled receptors. This family consists of 6 presently known receptor subtypes, that have been associated with several important physiological effects. As could be shown previously, the selective recognition of the NPY Y₅ receptor, which is involved in the regulation of food intake, is achieved by the introduction of a characteristic dipeptidic key motif in positions 31/32. The presented nuclear magnetic resonance (NMR) studies allow to discuss this phenomenon on a structural basis.

In the first part of this work, native NPY is structurally characterized in solution. For some peptide hormones it is postulated, that binding to the cell membrane, in which the receptors are embedded, is an essential step preceding receptor recognition. The studies have therefore also been conducted in the presence of dodecylphosphocholine (DPC) micelles, which is a well-known membrane-mimetics in NMR spectroscopy. In order to simplify the resonance assignment procedure with respect to signal overlap and to permit the investigation of dynamics, NPY-glycine (pro-NPY 1-37) was cloned C-terminally fused to decahistidine-tagged ubiquitin. The fusion-protein was expressed while uniformly labeling the nitrogen atoms with the ¹⁵N-isotope. The purification strategy was based on Ni²⁺-affinity chromatography. The conversion of NPY-glycine into the C-terminally amidated NPY was performed by use of the enzyme peptidylglycine- α -amidating monooxygenase. The studies of NPY free in solution focussed on the characterization of its quaternary

structure. A heterodimer was formed consisting of ^{15}N -labeled NPY and ^{14}N -NPY, that contained the spin-label TOAC in position 34. In a $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -HSQC experiment it was shown that in the absence of membranes the hydrophobic side of the helix is masked by dimerization in parallel as well as anti-parallel arrangements, however, without involving the C-terminal tetrapeptide. The flexibility of the C-terminal part is supported by ^{15}N -relaxation measurements, so that the C terminus retains the high flexibility observed in aqueous solution. In addition, the question was addressed, whether the N terminus folds back onto the C-terminal helix. Such a tertiary fold had previously been described for the pancreatic polypeptide (PP) and was postulated for all members of the NPY hormone family, known as the „PP fold“. However, from the present data such a conformation can clearly be excluded for NPY at the given sample-conditions. Moreover, the structure of membrane-bound NPY was solved based upon distance and dihedral angle restraints, which were estimated from NOE data and scalar coupling constants. Whereas the N terminus is unstructured which is obvious from the low density of inter-residual NOEs, the second half of the molecule is in a regular α -helical conformation. The helical section comprising residues 21-30 could be determined to a very high precision (RMSD for the backbone atoms: 0.23 Å). The comparison with a previously published NPY dimer structure, which was measured in aqueous solution, reveals a conformational change at the C-terminal tetrapeptide. Membrane-integrating spin-labels as well as amide proton-/deuterium-exchange experiments gave evidence for a surface-associated topology on the membrane. Obviously, the association is driven by interactions of the hydrophobic side-chains of the amphipathic α -helix with the phospholipids, which guides the C-terminal tyrosine-amide into a membrane-affiliated position. The global and internal backbone-dynamics of NPY in water and on DPC micelles were characterized by ^{15}N -relaxation-experiments and quantified by calculation of generalized order parameters following the Lipari-Szabo approach. The N terminus is completely flexible in water as well as in the

membrane-bound state. On the other hand, association to the membrane via the C-terminal segment leads to a strong stabilization of the helical conformation.

The second part of the thesis describes the structural characteristics of a class of NPY-mutants, that exhibit Y₅ receptor selectivity. The comparison of the published solution structure of NPY with the one of the first Y₅ receptor selective agonist, [Ala³¹, Aib³²]-NPY, as described herein, revealed a different conformation in the C-terminal region. The α -helix of NPY is substituted by a 3₁₀-helical turn in the mutant encompassing residues 28 to 31, followed by a flexible C terminus. Very similar receptor-subtype binding profiles are found for analogues, in which the non-biogenic residue aminoisobutyric acid (Aib) is replaced by proline. Once two appropriate point mutations had been introduced into the DNA-sequence of NPY by site-directed mutagenesis the recombinant production of ¹⁵N-labeled [Ala³¹, Pro³²]-NPY became possible. NMR-data were then collected in the presence of DPC-micelles under the same conditions used for NPY and compared to them. Although the global fold is very similar to NPY, there are again significant differences in the helical region and at the C terminus, which most probably play a role for the receptor-subtype selective recognition. Very high generalized order parameters between 0.9 and 1 as well as characteristic low scalar coupling constants for residues 21-30 are indicative of an almost rigid helical peptide backbone. On the other hand, the C terminus is clearly more flexible in the mutant than in NPY and is no longer in a regular α -helical conformation. However, the preferred proximity of the C-terminal tyrosine-amide to the membrane still persists. Enlarged proton-/deuterium-exchange rates together with a concomitantly decreased global correlation time suggest a lower affinity to the membrane. It is assumed, that the mutant possesses fewer membrane-anchoring residues. On the other hand, its orientation on the membrane is more well-defined and the reduced-length helical segment is more rigid. The C-terminal hexapeptide can be considered as

a short but nevertheless flexible loop on the membrane surface. It is speculated, that in contrast to NPY, the positions of two basic amino acids, that are known to be essential for receptor binding, are less well-defined and probably display a higher average distance to the membrane.

One of the binding sites of NPY is supposed to be localized in the third extracellular loop of the Y receptors. To study possible interactions between NPY and/or the receptor-subtype selective mutants with this loop, a peptide was synthesized by solid phase synthesis, which comprised the sequence of the third extracellular loop of the Y₁ receptor. Hydrocarbon-chains were coupled to the N and C termini of the peptide in order to anchor the loop-mimicking molecule onto the micelles. A slightly sequence-modified construct was successfully synthesized and enabled the measurement of 1D ¹H-NMR-spectra of satisfactory quality in dodecylphosphocholine micelles. However, NPY did not display any resonance shifts in the presence of the loop-mimicking peptide, suggesting that the ligand does not interact with the isolated receptor fragment.

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Bestimmung und Interpretation von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Neurohormons und -transmitters Neuropeptid Y (NPY). NPY ist ein 36 Aminosäuren umfassendes, C-terminal amidiertes Peptidhormon, das den natürlichen Ligand der NPY Familie von G Protein gekoppelten Rezeptoren (Y_n -Rezeptoren) darstellt. Diese Familie besteht aus 6 bis heute identifizierten Rezeptor-Subtypen, die mit verschiedenen physiologisch-bedeutsamen Effekten assoziiert werden. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass durch die Einführung eines bestimmten Dipeptid-Motivs an Position 31/32 die selektive Erkennung des in der Regulation der Nahrungsaufnahme involvierten NPY Y_5 Rezeptor-Subtypen vermittelt wird. Die hier präsentierten Kernresonanzspektroskopie (NMR)-Studien erlauben es, die Rezeptor-Subtyp Spezifität auf einer strukturellen Basis zu diskutieren.

Im ersten Teil der Arbeit wird das native NPY in Lösung strukturell charakterisiert. Für einige Peptidhormone wird postuliert, dass die Bindung an die Zellmembran, in denen die Rezeptoren eingelagert sind, ein essentieller, der Rezeptorerkennung vorgelagerter Schritt ist. Die Studien wurden deshalb auch in Gegenwart von Dodecylphosphocholin (DPC)-Mizellen, einem in der NMR-Spektroskopie häufig verwendeten Membran-Mimetikum durchgeführt. Um die Resonanzzuordnungen zu vereinfachen und Dynamikuntersuchungen zu ermöglichen, wurde NPY uniform ^{15}N -Isotopen-markiert dargestellt. Dazu wurde NPY-Glycin (Pro-NPY 1-37) C-terminal mit Decahistidin-Ubiquitin als Fusionsprotein kloniert und exprimiert. Die Reinigungsstrategie basierte auf Ni^{2+} -Affinitätschromatographie. Die Konversion von NPY-Glycin zum C-terminalen Amid erfolgte mit dem Enzym Peptidylglycin α -amidierende Mono-

oxygenase. Die Untersuchungen von NPY frei in Lösung konzentrierten sich auf die Bestimmung der Quartärstruktur. Dazu wurde aus ^{15}N -markierten NPY und ^{14}N -NPY, welches das Spinlabel TOAC an Position 34 enthielt, ein Heterodimer hergestellt. Mit einem solchen Sample konnte in einem $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -HSQC Experiment gezeigt werden, dass die hydrophobe Seite der Helix in Abwesenheit von Membranen durch Dimerisierung in sowohl paralleler als auch antiparalleler Helix-Anordnung markiert ist. Davon ausgeschlossen ist allerdings das C-terminale Tetrapeptid. Dadurch erfährt dieses Segment in wässriger Lösung eine erhöhte Flexibilität, wie durch Messung der ^{15}N -Relaxation gezeigt werden konnte. Zudem wurde der Frage nachgegangen, ob der N-Terminus, dem aPP-Fold (Pankreatisches Polypeptid des Vogels) gleichkommend, auf die C-terminale Helix rückfaltet. Diese früher postulierte Rückfaltung liess sich bei den gegebenen Proben-Bedingungen klar ausschliessen. Zudem wurde die Struktur von Membran-gebundenen NPY aufgrund von Distanz- und Diederwinkeleinschränkungen, die aus NOE Daten und skalaren Kopplungen gewonnen wurden, ermittelt. Während der N Terminus infolge geringer inter-residueller NOE-Dichte keine gut definierte Architektur erkennen lässt, ist die zweite Molekülhälfte in einer regulären α -helikalen Konformation gefaltet, deren dreidimensionale Koordinaten in der Region der Reste 21-31 mit einer sehr hohen Präzision (RMSD für die Rückgratome: 0.23 Å) bestimmt werden konnten. Der Vergleich mit einer publizierten NPY-Dimer-Struktur, die in wässriger Umgebung gemessen worden war, zeigt eine konformationelle Änderung am C-terminalen Tetrapeptid. Die Ursache hierfür wurde deutlich, nachdem Membran-integrierende Spin-Label und Amidproton/-Deuterium-Austausch-Experimente die Orientierung von NPY auf der Membranoberfläche enthüllten. Offenbar wird die Membran-Assoziation durch die Interaktion von hydrophoben Seitenketten der amphipathischen α -Helix mit den Phospholipiden gesteuert, wodurch das C-

terminale Tyrosin-Amid in einer Membran-zugewandten Position zu liegen kommt. Die globale und interne Rückgrats-Dynamik von NPY auf Mizellen wurde mit ^{15}N -Relaxationsexperimenten charakterisiert und im Rahmen des Lipari-Szabo Ansatzes in Form von Ordnungsparametern quantifiziert. Der N Terminus ist in Wasser und in der Membran-gebundenen Form gleichermaßen äusserst flexibel. Dagegen führt die Membran-Assoziation des C-terminalen Bereichs zu einer starken Stabilisierung der helikalen Konformation.

Der zweite Teil der Dissertation beschreibt die strukturellen Merkmale einer Klasse von NPY-Mutanten, die Y_5 Rezeptorsubtyp-Selektivität zeigen. Vom ersten Y_5 Rezeptor-selektiven Agonisten, [Ala³¹, Aib³²]-NPY, wurde die Lösungsstruktur bestimmt. Im Vergleich mit NPY wurde eine Konformationsänderung im C-terminalen Bereich gefunden. Die α -Helix von NPY wird im selektiven Agonisten durch einen 3_{10} -helikalen Turn zwischen den Resten 28-31, gefolgt von einem ungeordneten C Terminus, ersetzt. Gleiche Rezeptorsubtyp-Bindungsprofile werden gefunden, wenn die unnatürliche Aminoisobuttersäure (Aib) durch ein natürliches Prolin substituiert wird. Die rekombinante Herstellung von [Ala³¹, Pro³²]-NPY in ^{15}N -markierter Form wurde möglich, nachdem zwei entsprechende Punktmutationen in der DNA-Sequenz von NPY mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese eingeführt worden waren. Die NMR-Daten wurden diesmal in Gegenwart von DPC-Mizellen unter gleichen Bedingungen wie für NPY erhoben. Der Vergleich mit NPY zeigt, dass es, obwohl die globale Architektur derjenigen von NPY sehr ähnlich sieht, wiederum signifikante Unterschiede im helikalen Bereich und am C Terminus gibt, die demnach wahrscheinlich eine Rolle bei der spezifischen Rezeptorerkennung spielen. Die Reste 21-30, die sich unmittelbar vor der Mutation befinden, zeigen Ordnungsparameter zwischen 0.9 und 1 sowie charakteristisch tiefe skalare Kopplungskonstanten und somit eine beinahe rigide helikale Rückgrats-Konformation an. Anderer-

seits ist der C Terminus der Mutante deutlich flexibler als jener von NPY und nicht mehr α -helikal gefaltet. Dabei wird jedoch die bevorzugte Membrannähe des C-terminalen Tyrosin-Amids nicht aufgegeben. Ausserdem deuten erhöhte Proton-/Deuterium-Austauschraten bei einer gleichzeitig erniedrigten globalen Korrelationszeit eine schwächere Membran-Affinität an. Offenbar bindet die Mutante aufgrund ihrer etwas schlechteren Membranverankerung zwar weniger gut an die Mizelle, kann sich dafür aber im verkürzten helikalen Bereich besser und mit erhöhter Rigidität auf ihr ausrichten. Das C-terminale Hexapeptid andererseits kann als kurze, aber trotzdem flexible Schleife auf der Membranoberfläche betrachtet werden. In dieser sind im Gegensatz zum nativen NPY die beiden für die Rezeptorbindung essentiellen basischen Arginin Aminosäuren weniger genau definiert und möglicherweise in einem grösseren durchschnittlichen Abstand zur Membran positioniert.

Eine Bindungsstelle von NPY wird in der dritten extrazellulären Schleife der Y Rezeptoren vermutet. Um allfällige Interaktionen zwischen NPY, bzw. Rezeptor-Subtyp-selektiven Mutanten und der Schleife NMR-spektroskopisch zu charakterisieren, wurden deshalb im letzten Teil der Arbeit Anstrengungen unternommen, die Peptidsequenz der Schleife des Y₁ Rezeptors mittels Peptidfestphasensynthese herzustellen. Durch N- und C-terminale Kupplung von Kohlenwasserstoffketten sollte das Schleifen-imitierende Molekül in die Mizellen verankert werden. Ein leicht sequenz-modifiziertes Konstrukt konnte erfolgreich synthetisiert werden und erlaubte es, in der Gegenwart von Mizellen eindimensionale ¹H-Spektren von guter Qualität aufzunehmen. Allerdings wurden bei NPY in der Gegenwart des Schleifen-imitierenden Peptids keinerlei Resonanzverschiebungen beobachtet, was ein starker Hinweis dafür ist, dass der Ligand mit dem Rezeptorfragment nicht interagiert.