



Doctoral Thesis

## Green fluorescent protein as a novel tool to study neuropeptide Y receptors

**Author(s):**

Dinger, Michaela Corina

**Publication Date:**

2002

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004394009> →

**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](#).

Dissertation ETH No. 14661

**Green Fluorescent Protein  
as a Novel Tool to Study  
Neuropeptide Y Receptors**

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

presented by

**Michaela Corina Dinger**

Apothekerin  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

born June 15<sup>th</sup>, 1972  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

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

**2002**

## SUMMARY

The green fluorescent protein (GFP) was isolated from the jelly-fish *Aequorea victoria* and emits green light upon excitation. GFP possesses various excellent properties that make it to a powerful tool for different applications. One great advantage of GFP is that it is naturally fluorescent, thus GFP does not require any additional substrates. Furthermore, the fluorescence is not species specific and the application is possible in living cells. GFP can also be used for the generation of fusion proteins. Recently, spectral variants of GFP were developed, the blue-, the cyan-, the red and the yellow fluorescent protein (BFP, CFP, DSRed, YFP). These fluorescent proteins are characterized by the same excellent features. Numerous application include their application as reporters for gene expression, as markers to study cell lineage during development and as fusion proteins for cell biology. Besides other reporter genes like luciferase,  $\beta$ -galactosidase and chloramphenicol acetyltransferase, GFP reached greatest popularity and can also be applied for the investigation of G-protein coupled receptors (Chapter 1).

The major aim of this work was the application of GFP as reporter gene for the study of NPY receptor ligand interaction and as tool for the investigation of NPY receptor dimerization. So far, five distinct NPY receptors have been cloned ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$ ,  $y_6$ ). They all belong to the rhodopsin-like superfamily of G-protein coupled receptors. Their activation results in the inhibition of adenylyl cyclase and in an increase of intracellular calcium concentration ( $G_i$ ). The natural ligand of these receptors is neuropeptide Y (NPY), a 36 amino acid peptide amide that belongs to the family of pancreatic polypeptides. NPY modulates numerous physiological processes including regulation of cardiovascular and renal functions, intestinal motility, memory retention, feeding and anxiety.

In order to characterize and to study each receptor individually highly potent and selective compounds are required that recognize only one receptor. Accordingly, assays are necessary that can be used for the identification of selective and potent NPY ligands. Therefore, a novel reporter gene assay system was generated with GFP as reporter gene for the investigation of  $G_i$ -protein

coupled receptors (chapter 2). The activity of a ligand after binding can be easily determined by using this assay. A further big advantage of this system is that the lysis of cells is not necessary and that it does not require any additional substrates. In contrast, the reporter gene luciferase requires the lysis of cells and the addition of a substrate. For the establishment of this system reporter gene vectors with cAMP responding elements (CRE) were cloned. Subsequently, the expression of GFP depends on cAMP-concentration. The studies demonstrated that the sensitivity of this assay is dependent on the number of CREs and that the system can be applied to living cells. This assay was used to determine NPY binding to the  $Y_5$ -receptor as well as its activity. It was possible to measure a dose response curve by using different NPY concentrations. An  $EC_{50}$  value ( $2.6 \pm 2.2$  nM) could be calculated. The  $EC_{50}$  value was comparable to the  $IC_{50}$  value obtained from a conventional binding assay ( $2.6 \pm 2.1$  nM). Furthermore, this reporter gene system could be used for the identification of well characterized and selective NPY analogues.

Conventional methods for the determination of the affinity and the activity of a ligand are competition assays for binding and cAMP-assays as functional assay. Competition assays were used to determine the  $IC_{50}$  values of different fluorescence labelled NPY analogues and their agonistic properties could be proven (Chapter 3). These analogues were applied to study the conformation of NPY in solution. The cAMP-assay, a functional assay, determines the cAMP concentration after activation or inhibition of the adenylyl cyclase. This assay was applied for the investigation of peptides with preference for the  $Y_1$ -receptor. Among the tested analogues  $[F^7, P^{34}]NPY$  and  $[R^6, P^{34}]NPY$  have been found to show the highest  $Y_1$ -receptor affinity with subnanomolar affinity. Accordingly, it was important to determine their agonistic or antagonistic property. By using the cAMP-assay the selective ligands were identified as agonists (Chapter 4).

Besides the investigation of NPY receptor ligand interaction GFP was further applied for the investigation of NPY receptor dimerization. Up to now NPY receptors were thought to act as monomer, but there are several evidence that NPY receptors can form dimers.

In order to study homodimerization of NPY receptors, the FRET (fluorescence resonance energy transfer) technique was applied (Chapter 5). FRET is described

as a method to study receptor dimerization. This technique measures the transfer of energy from a donor molecule to an acceptor molecule when they are less than 50 Å apart. Subsequently, fusion proteins of the hY<sub>1</sub>-, hY<sub>2</sub>- or hY<sub>5</sub>-receptor sequence were generated that were tagged to the green-, cyan-, yellow- or the red-fluorescent protein (GFP, CFP, YFP, DSRed) at their carboxy-terminus. These fluorescent proteins provided the suited properties to be used as FRET-pairs. Binding and functional studies proved that these fusion proteins are still active. Coexpression of the FRET pair receptors hY<sub>1</sub>-CFP/hY<sub>1</sub>-YFP, hY<sub>1</sub>-GFP/hY<sub>1</sub>-DSRed, hY<sub>2</sub>-CFP/hY<sub>2</sub>-YFP, hY<sub>2</sub>-GFP/hY<sub>2</sub>-DSRed, hY<sub>5</sub>-CFP/hY<sub>5</sub>-YFP and hY<sub>5</sub>-GFP/hY<sub>5</sub>-DSRed in BHK cells was analysed by fluorescence microscopy and fluorescence spectroscopy. A significant FRET effect was found with both techniques and both FRET pairs in a receptors subtype depending manner. Whereas, the hY<sub>2</sub>-receptor was less prone to dimerization, hY<sub>1</sub> and hY<sub>5</sub> had a strong tendency. However, the FRET effect was neither dependent on an agonist stimulation nor on GTPγS incubation as shown by quantitative fluorescence spectroscopy.

GFP and its spectral variants were also used for the investigation of the NPY receptor heterodimerization (Chapter 6). This time BHK cells were cotransfected with different NPY receptor subtypes fused to a FRET pair, respectively. Surprisingly, heterodimerization could not be studied, because the coexpression of two different receptor subtypes was not possible. The hY<sub>1</sub>-receptor expression was suppressed in the presence of the hY<sub>2</sub>- and hY<sub>5</sub>-receptor, respectively. Furthermore, the hY<sub>2</sub>-receptor disturbed the expression of the hY<sub>5</sub>-receptor. Identical results were obtained from fluorescence spectroscopy and fluorescence microscopy. In order to investigate two different NPY receptor subtypes in the same cellular system SMS-KAN cells (Y<sub>2</sub>) were transfected with the hY<sub>1</sub>- and the hY<sub>5</sub>-receptor, respectively. Binding studies were performed with selective NPY analogues [Ahx<sup>5-24</sup>]NPY (Y<sub>2</sub>), [L<sup>31</sup>,P<sup>34</sup>]NPY (Y<sub>1</sub>, Y<sub>5</sub>), [Ala<sup>31</sup>,Aib<sup>32</sup>]NPY (Y<sub>5</sub>), [R<sup>6</sup>,P<sup>34</sup>]NPY (Y<sub>1</sub>) and [F<sup>7</sup>,P<sup>34</sup>]NPY (Y<sub>1</sub>). The results showed that the expression of the receptors was again disturbed. The reasons for the unbalanced expression are not yet clear (Chapter 6).

In conclusion, this work presents that GFP is a valuable tool for the investigation of NPY receptors. By using the novel reporter gene assay the *in vitro*

testing of new NPY agonists gets faster and signal pathways and signal transduction networks might be easier to study. Furthermore, the homodimerization and heterodimerization studies provide new aspects for our understanding how NPY receptors are organized.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das grün fluoreszierende Protein, kurz GFP genannt, wurde aus der Leuchtqualle *Aequorea victoria* isoliert und kann nach Anregung grün fluoreszierendes Licht emittieren. GFP verfügt über zahlreiche exzellente Eigenschaften, die es zu einem wertvollen Werkzeug der Zell- und Molekularbiologie machen. Zum einen benötigt GFP zur Emittierung von „grünem Licht“ keinen Zusatz an Cofaktoren. Weiterhin kann GFP *in vivo* appliziert werden. Die Expression des Proteins ist nicht vom verwendeten Organismus abhängig. Auch wurden zahlreiche spektrale Varianten des GFP entwickelt, das blau, türkis, rot und gelb fluoreszierende Protein (BFP, CFP, DSRed, YFP), die die gleichen Eigenschaften wie GFP besitzen. Seit kurzem wird GFP und seine Varianten sehr erfolgreich für die Entwicklung von Fusionsproteinen eingesetzt. Die Eigenschaften des GFP erlauben seine Verwendung als Reportergen bei der Untersuchung von Genexpression, in Studien über Zellaufbau und Zellentwicklung und wie bereits erwähnt als Fusionsprotein für die Untersuchung zahlreicher zellulärer Prozesse. Neben anderen Reportergenen wie Luciferase,  $\beta$ -Galactosidase und Chloramphenicol-Acetyltransferase wurde GFP zu einem der wichtigsten und bedeutendsten Reportergenen, das inzwischen auch für die Untersuchung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren verwendet werden kann (Kapitel 1).

Das Hauptziel dieser Arbeit war, Neuropeptid Y (NPY) Rezeptoren mittels GFP zu untersuchen. Einerseits wurde ein neuartiger Assay mit GFP als Reportergen entwickelt, der zur Untersuchung von NPY-Rezeptor-Liganden-Interaktionen diente, andererseits wurde das Dimerisierungsverhalten von NPY-Rezeptoren mit Hilfe von GFP erforscht.

NPY-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen. Diese Rezeptoren vermitteln ihre typische Signalantwort durch eine Inhibierung der Adenylatcyclase und durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ( $G_i$ ). Fünf Rezeptor-Subtypen wurden bereits kloniert und pharmakologisch charakterisiert. Der natürliche Ligand dieser Rezeptoren ist das Neuropeptid Y (NPY), ein Peptidamid, das aus 36

Aminosäuren besteht und zur Familie der pankreatischen Polypeptide gehört. NPY ist für die verschiedensten physiologischen Effekte wie die Regulation des Blutdruckes, die Nierenfunktion, die Darmtätigkeit, die Gedächtnisleistung und die Nahrungsaufnahme sowie die Anxiolyse verantwortlich.

Damit jeder NPY-Rezeptorsubtyp sowohl strukturell als auch biologisch untersucht werden kann, werden Moleküle benötigt, die nur einen einzigen Rezeptor in einer spezifischen Weise erkennen. Daher ist es erforderlich Verfahren zu entwickeln, mit denen man diese Moleküle identifizieren kann. Aus diesem Grund wurde der Reporterassay mit GFP als Reporter entwickelt, um auf einfache Weise NPY-Rezeptor-Liganden-Interaktionen zu untersuchen (Kapitel 2). Mit Hilfe dieses Assays kann die Aktivität eines Liganden nach seiner Bindung an den Rezeptor leicht bestimmt werden. Ein weiterer großer Vorteil dieses Assays ist, dass weder die Lyse von Zellen noch die Zugabe von Substraten erforderlich ist. Bei Assays mit Luciferase als Reporter ist dies dagegen notwendig. Zur Etablierung dieses neuartigen Reporterassays wurden Vektoren mit cAMP-responding elements (CRE) kloniert, wodurch die Expression des GFPs von der cAMP Konzentration abhängig ist. Durchgeführte Studien zeigten, dass die Sensitivität des Assays von der Anzahl an CREs abhängt und dass die Applikation des Assays *in vivo* möglich ist. Dieser Reporterassay wurde für die Untersuchung des NPY Y<sub>5</sub> Rezeptorsubtypes eingesetzt. Die Bindung von NPY an den Y<sub>5</sub>-Rezeptor und seine Aktivität konnte gezeigt werden. In Abhängigkeit von der NPY-Konzentration wurden unterschiedliche Mengen an GFP exprimiert und ein EC<sub>50</sub>-Wert von  $2.6 \pm 2.2$  nM konnte berechnet werden, der vergleichbar mit dem IC<sub>50</sub>-Wert  $2.6 \pm 2.1$  nM der Kompetitionsstudien ist. Desweiteren konnten auch selektive NPY Abkömmlinge identifiziert werden.

Eine übliche Methode zur Bestimmung der Affinität eines Liganden sind Kompetitionsstudien, zur Bestimmung der Aktivität werden cAMP-Assays eingesetzt. Kompetitionsstudien wurden zur Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten fluoreszenzmarkierter NPY-Analoga verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Peptide mit unterschiedlichen Affinitäten an NPY-Rezeptoren binden (Kapitel 3). Diese NPY Abkömmlinge wurden für Konformationsstudien von NPY in Lösung verwendet. Der cAMP-Assay, der die Konzentration an cAMP nach einer Stimulierung oder Inhibierung der Adenylatcyclase misst, wurde zur



Bestimmung der Aktivität von Peptiden eingesetzt, die bevorzugt am  $Y_1$ -Rezeptoren binden (Kapitel 4). Die Peptide  $[F^7, P^{34}]NPY$  und  $[R^6, P^{34}]NPY$  zeigten die stärkste, selektive Bindung für den  $Y_1$ -Rezeptor. Mit Hilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Peptiden um Agonisten handelt.

Neben der Untersuchung von NPY-Rezeptor-Liganden-Interaktionen wurde GFP für die Untersuchung der NPY-Rezeptordimerisierung eingesetzt. Bis vor kurzem nahm man an, dass NPY-Rezeptoren nur als Monomere vorliegen, aber unterschiedliche Studien zeigten, dass NPY-Rezeptoren auch als Dimere vorliegen könnten. Zur Untersuchung einer möglichen Homodimerisierung wurde die FRET (Fluoreszenzresonanz Energietransfer) Methode angewendet (Kapitel 5). Diese Methode wurde erfolgreich zur Untersuchung von Rezeptordimerisierung eingesetzt. Mit Hilfe von FRET kann man einen Energietransfer von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül messen, vorausgesetzt dass die Distanz beider Moleküle nicht größer als 50 Å ist. Deshalb wurden Fusionsproteine mit NPY-Rezeptorsequenzen ( $hY_1$ ,  $hY_2$ ,  $hY_5$ ) erzeugt, die an ihrem C-terminalen Ende mit fluoreszierenden Proteinen (CFP, GFP, DSRRed, YFP) markiert wurden. Diese fluoreszierenden Proteine können als FRET-Paare (Donor und Akzeptormoleküle) verwendet werden. Durch Bindungsstudien und cAMP-Assays konnte gezeigt werden, dass die klonierten Fusionsproteine funktionell und aktiv sind. BHK Zellen wurden mit den Fusionsproteinen  $hY_1$ -CFP/ $hY_1$ -YFP,  $hY_1$ -GFP/ $hY_1$ -DSRed,  $hY_2$ -CFP/ $hY_2$ -YFP,  $hY_2$ -GFP/ $hY_2$ -DSRed,  $hY_5$ -CFP/ $hY_5$ -YFP oder  $hY_5$ -GFP/ $hY_5$ -DSRed transfiziert und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Ein signifikanter FRET-Effekt wurde mit beiden Methoden und mit beiden FRET-Paaren für alle drei Rezeptorsubtypen gefunden. Der  $hY_2$ -Rezeptor dimerisierte dabei jedoch weniger stark im Vergleich zum  $hY_1$ - oder  $hY_5$ -Rezeptor, die eine starke Dimerisierungstendenz zeigten. Weiterhin konnte durch fluoreszenzspektroskopische Aufnahmen gezeigt werden, dass der FRET-Effekt weder vom Liganden noch von GTP $\gamma$ S beeinflusst wurde.

GFP und seine spektralen Varianten wurde auch zur Untersuchung des Heterodimerisierungsverhalten von NPY-Rezeptoren eingesetzt (Kapitel 6). Nun wurden BHK Zellen mit unterschiedlichen Rezeptorsubtypen transfiziert. Überraschender Weise konnte eine Heterodimerisierung nicht beobachtet werden, da die Coexpression von unterschiedlichen Rezeptorsubtypen nicht möglich war.

Die Expression des hY<sub>1</sub>-Rezeptors wurde sowohl in der Gegenwart des hY<sub>2</sub>-Rezeptors als auch durch den hY<sub>5</sub>-Rezeptor unterdrückt. Weiterhin wurde die Expression des hY<sub>5</sub>-Rezeptors durch den hY<sub>2</sub>-Rezeptor gestört. Vergleichbare Ergebnisse wurden sowohl durch die Fluoreszenzmikroskopie als auch durch die Fluoreszenzspektroskopie erhalten. Um dennoch zwei verschiedene NPY-Rezeptorsubtypen im gleichen zellulären System zu untersuchen, wurden SMS-KAN-Zellen, die den Y<sub>2</sub>-Rezeptor endogen exprimieren, parallel mit dem hY<sub>1</sub>-Rezeptor oder mit dem hY<sub>5</sub>-Rezeptor transfiziert (Kapitel 6). Anschließend wurden Bindungsstudien mit unterschiedlichen selektiven NPY-Analoga, [Ahx<sup>5-24</sup>]NPY (Y<sub>2</sub>), [L<sup>31</sup>,P<sup>34</sup>]NPY (Y<sub>1</sub>, Y<sub>5</sub>), [Ala<sup>31</sup>,Aib<sup>32</sup>]NPY (Y<sub>5</sub>), [R<sup>6</sup>,P<sup>34</sup>]NPY (Y<sub>1</sub>) und [F<sup>7</sup>,P<sup>34</sup>]NPY (Y<sub>1</sub>) durchgeführt. Diese zeigten, dass eine Coexpression beider Rezeptoren (Y<sub>1</sub>/Y<sub>2</sub> oder Y<sub>2</sub>/Y<sub>5</sub>) erneut gestört war. Zur Zeit gibt es noch keine Erklärung für diesen Sachverhalt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GFP ein geeignetes Werkzeug ist, mit dem man NPY-Rezeptoren untersuchen kann. Mit dem neu entwickelten Reporterassay wird die *in vitro* Untersuchung von NPY Agonisten beschleunigt und Signalwege und deren Vernetzung können auf einfache Weise untersucht werden. Weiterhin können die Homodimerisierungs- und Heterodimerisierungsstudien dazu beitragen, die Funktionsweise von NPY-Rezeptoren aufzuklären.