

Dissertation ETH No. 15161

Molecular Characterization of Neuropeptide Receptors

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

presented by

Martin M. Höfliger

Eidg. dipl. Apotheker
ETH Zürich

born September 29th, 1971
citizen of Freienbach, Schwyz

accepted on the recommendation of

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

2003

SUMMARY

Membrane bound cell surface receptors can act as trigger molecules, where binding of a ligand, representing a signal from the outside leads to a certain response inside the cell. The investigation of this intercellular communication is a basis for the understanding of many physiological as well as pathophysiological processes on a molecular level. G-protein coupled receptors (GPCRs) represent the by far biggest group of cell surface receptors. This superfamily comprises among others the subfamily of rhodopsin like GPCRs with the subfamily of the neuropeptide receptors. The lack of any structural data for G-protein coupled receptors, with the exception of rhodopsin forces us to apply indirect approaches to characterize G-protein coupled receptor – ligand interaction.

Neuropeptide Y (NPY) receptors are members of the peptide GPCR family. NPY, a 36 amino acid peptide, belongs to the pancreatic polypeptide family, for which until today in human 6 different receptors have been published, the NPY-Y₁, NPY-Y₂, NPY-Y₃, NPY-Y₄, NPY-Y₅ and the NPY-y₆ receptor. The NPY-Y₄ receptor's endogenous ligand is however the pancreatic polypeptide (PP), the NPY-y₆ receptor in human is only a fragment and not functional, whereas the NPY-Y₃ receptor has only been characterized pharmacologically and has not been cloned yet.

The present work is focused on the investigation of the NPY-Y₂ receptor. This receptor plays a role in the regulation of a great variety of processes such as, circadian rhythm, memory retention, nociception and blood pressure regulation. In MHH-NB-11 a novel neuroblastoma cell line has been identified to express the NPY-Y₂ receptor, exclusively. The binding kinetics of the receptor in this cell line have been determined in radioactive binding assays with [³H]propionyl-NPY. The K_d value is 0.53 ± 0.12 nM and the cells carry 7866 ± 505 binding sites. Those findings were compared with two neuroblastoma cell lines previously shown to express NPY-Y₂ receptors, CHP-234 and SMS-KAN cells. Like all other NPY receptors, the NPY-Y₂ receptor is coupled to G_{i/o} proteins. Incubation of MHH-NB-11 cells with NPY was shown to significantly reduce the level of intracellular cAMP.

With the generation and characterization of a nuclease resistant RNA aptamer directed against neuropeptide Y the aptamer technique has for the first time been used to investigate the peptide's interaction with its receptor. In binding experiments using C- and N-terminally shortened as well as centrally truncated and receptor subtype selective analogues the aptamer showed preference for NPY-Y₂ receptor specific analogues of NPY. Analogues with specificity for the NPY-Y₁ or NPY-Y₅ receptor were recognized with considerably lower affinities. The closely related pancreatic polypeptide was not recognized by the aptamer. These facts indicate that the aptamer recognizes an epitope on the peptide which is also responsible for binding to the NPY-Y₂ receptor. This NPY-Y₂ receptor mimicking effect was confirmed in competition experiments with the receptors. In those experiments, the aptamer displaced [³H]propionyl-NPY at the NPY-Y₂ receptor with a considerably lower K_i value than at the NPY-Y₁ or the NPY-Y₅ receptor, respectively. In a similar approach, the selection of RNA aptamers against the NPY-Y₅ receptor was performed. The second intracellular loop of G-protein coupled receptors plays an important role in the binding of G-proteins and therefore for signal transduction. A peptide comprising this loop (amino acids 148-167) of the hNPY-Y₅ receptor has been N-terminally linked to a cysteine residue and immobilization via the thiol group was performed on a thiopropyl sepharose column suitable for selection of binding RNA. 12 RNA Sequences have been selected which are currently characterized for their affinity for the target peptide.

Angiotensin receptors are part of the peptide GPCR family, too. The octapeptide angiotensin II (Ang II) is a major regulator of cardiovascular function and body fluid homeostasis. It exerts its biological actions via two subtypes of receptors, AT₁ and AT₂. Monoclonal antibodies against these receptors and Ang II itself have been generated and used to determine the intraadrenal localization in male adult rats. In Western blots analysis of rat adrenal protein extracts, the anti-AT₁ antibody recognized two bands with an apparent molecular weight of 73 and 97 kDa, respectively, whereas staining with the anti-AT₂ antibody led to bands of 73 and 120 kDa. Unfortunately a similar approach for the NPY-receptors did not work out.

The solubilization of the NPY-Y₂ receptor from cell membranes with the non-ionic detergent n-octyl-β-D-glucopyranoside was performed as a technique

providing the possibility of enrichment and purification of GPCRs. Successful solubilization was confirmed by anti receptor antibodies in Western blotting experiments. The functionality of the receptors under the applied conditions was tested in surface plasmon resonance (SPR) experiments. SPR is an optical phenomenon occurring at the interface between a gold chip and a liquid flow cell related to the change of the refractive index of the liquid in the flow cell. With the BIAcore[®] technique this phenomenon can be used to characterize the interaction of binding partners in solution. Indications for binding of the receptors to an NPY analogue immobilized on BIAcore's sensor chip CM5 were found, but the bad regeneration properties of the sensor chip turned out to be a major limitation for the sufficient reproduction of the experiment.

A method for the analysis of complex mixtures of membrane proteins was established using a combination of nano-HPLC and nano-electrospray ionization Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FTICRMS). Membrane proteins were solubilized from COS-6 cell membranes and separated by electrophoresis in polyacrylamide gels. Coomassie Blue stained bands were cut out and *in-gel* digested with trypsin. Depending on the evaluation method nano-HPLC / nano-ESI-FTICRMS was able to identify up to 15 proteins from a single band with mass accuracies < 5 ppm, impressively demonstrating the advantages of this method.

The NPY-Y₂ receptor expressed in COS-6 cell membranes has been examined by photoaffinity labeling studies. [N_α-biotinyl-Ahx₂, Ahx⁵⁻²⁴(Tmd)Phe²⁷] NPY, an NPY-Y₂ receptor selective analogue containing the photoactivatable amino acid 4-(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl-phenylalanine ((Tmd)Phe) has been used to optimize crosslinking conditions in a non-radioactive approach. Crosslinking was investigated in Western blotting experiments using alkaline phosphatase conjugated streptavidin's (AP-streptavidin) affinity for the biotinylated ligand for detection. Applying 10⁻⁵ M of the labeled ligand, two bands of 52 and 56 kDa were detected by AP-streptavidin. These molecular weights correspond to the receptor's apparent molecular weight determined by antibody staining. The lower of the two bands was displaceable by 10fold excess of unlabeled NPY during the crosslinking procedure. Furthermore a new photoaffinity labeled ligand has been developed containing the photolabel [3-nitro-5-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3yl]phenoxy]-

(9CI)] acetic acid (DAG0532), attached to 2,3 diaminopropionic acid introduced in position 27 of the ligand's sequence. DAG0532 has the advantage that it is not only photoactivatable, but can also be specifically hydrolyzed under conditions applying 0.01 M NaOH and irradiation with UV-light. If hydrolysis takes place in a mixture of $H_2^{16}O$ and $H_2^{18}O$, the resulting isotope pattern can be used for selective identification of crosslinked fragments by mass spectrometry after tryptic digestion of samples. The new photoactivatable ligand with the sequence [N_α -biotinyl-Ahx₂, Ahx⁵⁻²⁴, Dpr²⁷(DAG0532)] NPY was shown to bind to NPY-Y₂ receptors and was further investigated in crosslinking experiments according to the optimized conditions found with [N_α -biotinyl-Ahx₂, Ahx⁵⁻²⁴ (Tmd)Phe²⁷] NPY. In Western blots, AP-streptavidin detected a crosslinked band at 52 kDa. This band, however, under the applied conditions, was not displaceable by 10fold excess of NPY. Bands corresponding to the molecular weights of the receptor double band detected on Western blots were cut from Coomassie stained gels of crosslinked and non-crosslinked samples. They were subjected to tryptic in-gel digestion, peptide fragments were extracted from the gel and analyzed by nano-HPLC / nano-FTICRMS. However no tryptic fragments of the NPY-Y₂ receptor were detected in those experiments indicating that the loss of the receptor during the work-up procedure was too high to reach the detection limit.

To present, with the exception of rhodopsin, there is a lack of detailed structural data of G-protein coupled receptors. Therefore the presented studies and results represent a collection of small, but essential mosaic stones on the way to a more general understanding of neuropeptide receptor-ligand interactions.

ZUSAMMENFASSUNG

Membrangebundene Rezeptoren der Zelloberfläche können als Schaltermoleküle fungieren, bei denen die Bindung eines Liganden, welcher ein Signal von aussen darstellt, zu einer bestimmten Antwort in der Zelle führt. Die Untersuchung dieser Kommunikation zwischen Zellen ist eine Grundlage für das Verständnis vieler physiologischer, wie auch pathophysiologischer Prozesse auf molekularer Ebene. G-Protein gekoppelte Rezeptoren bilden die weitaus grösste Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren. Diese Familie schliesst unter anderen auch die Unterfamilie der rhodopsinähnlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit deren Unterfamilie der Neuropeptid Rezeptoren ein. Der Mangel jeglicher Strukturdaten für G-Protein gekoppelte Rezeptoren, mit Ausnahme von Rhodopsin, macht eine Anwendung indirekter Vorgehensweisen zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ihren Liganden notwendig.

Neuropeptid Y (NPY) Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Peptidrezeptoren. NPY, ein 36 Aminosäuren langes Peptid ist Teil der Familie der Pankreatischen Polypeptide. Bis heute wurden für NPY im Menschen 6 verschiedene Rezeptoren publiziert, nämlich der NPY-Y₁, NPY-Y₂, NPY-Y₃, NPY-Y₄, NPY-Y₅ und der NPY-y₆ Rezeptor. Der endogene Ligand des NPY-Y₄ Rezeptors ist jedoch das Pankreatische Polypeptid (PP), der NPY-y₆ Rezeptor existiert im Menschen nur als Fragment und ist nicht funktionell, wohingegen der NPY-Y₃ Rezeptor bislang nur pharmakologisch untersucht und nicht kloniert wurde.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung des NPY-Y₂ Rezeptors. Dieser Rezeptor spielt bei der Steuerung einer Vielzahl von Prozessen eine Rolle, darunter der Tag-Nacht Rhythmus, das Erinnerungsvermögen, die Schmerzempfindung und die Regulation des Blutdruckes. Mit MHH-NB-11 wurde eine neue Neuroblastom-Zelllinie identifiziert, welche ausschliesslich den NPY-Y₂ Rezeptor exprimiert. Die Bindungskinetik des Rezeptors in dieser Zelllinie wurde in radioaktiven Bindungsstudien unter Verwendung von [³H]propionyl-NPY bestimmt. Der K_d-Wert ist 0.53 ± 0.12 nM und die Zellen tragen 7866 ± 505 Bindungsstellen.

Diese Ergebnisse wurden mit denen von CHP-234 und SMS-KAN, zwei Neuroblastom-Zelllinien, von denen die Expression von NPY-Y₂ Rezeptoren bereits länger bekannt ist, verglichen. Wie alle NPY Rezeptoren ist der NPY-Y₂ Rezeptor an G_{i/o} Proteine gekoppelt. Es wurde gezeigt, dass die Inkubation von MHH-NB-11 Zellen mit NPY den Spiegel an intrazellulärem cAMP significant reduziert.

Mit der Erzeugung und Untersuchung eines gegen Neuropeptid Y gerichteten nukleaseresistenten RNA-Aptamers wurde die Aptamertechnik zum ersten Mal dazu verwendet, um die Wechselwirkung zwischen dem Peptid und seinem Rezeptor zu untersuchen. In Bindungsexperimenten in welchen C- und N-terminal verkürzte, sowie zentral verkürzte und Rezeptorsubtyp selektive Analoga verwendet wurden fand das Aptamer bevorzugt NPY-Y₂ selektive Analoga von NPY. NPY-Y₁ oder NPY-Y₅ Rezeptor selektive Analoga wurden mit deutlich niedrigeren Affinitäten erkannt. Das nahe verwandte Pankreatische Polypeptid wurde vom Aptamer nicht erkannt. Diese Tatsachen weisen darauf hin, dass das Aptamer ein Epitop auf dem Peptid erkennt, welches auch für die Bindung zum NPY-Y₂ Rezeptor verantwortlich ist. Dieser NPY-Y₂ Rezeptor mimetische Effekt wurde in Kompetitionsstudien mit den Rezeptoren bestätigt. Bei diesen Experimenten verdrängte das Aptamer [³H]propionyl-NPY am NPY-Y₂ Rezeptor mit einem wesentlich niedrigeren K_i-Wert als am NPY-Y₁ oder dem NPY-Y₅ Rezeptor. In einem ähnlichen Ansatz wurde die Selektion eines RNA-Aptamers gegen den NPY-Y₅ Rezeptor durchgeführt. Der zweite intrazelluläre Loop G-Protein gekoppelter Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung der G-Proteine und damit bei der Signaltransduktion. Ein Peptid das diesen Loop beim NPY-Y₅ Rezeptor umfasst (Aminosäuren 148-167) wurde N-terminal an Cystein gekoppelt und über die Thiolgruppe auf einer für die Selektion bindender RNA geeigneten Thiopropylsepharose-Säule immobilisiert. 12 RNA Sequenzen wurden selektiert, welche derzeit auf ihre Affinität zum Zielpeptid untersucht werden.

Angiotensinrezeptoren sind ebenfalls Teil der Familie G-Protein gekoppelter Peptidrezeptoren. Das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) ist ein wichtiger Regulator kardiovaskulärer Funktionen und des Flüssigkeitshaushaltes. Es übt seine biologischen Wirkungen über zwei Rezeptorsubtypen, AT₁ und AT₂, aus. Gegen diese Rezeptoren und gegen Ang II selbst wurden monoklonale Antikörper

erzeugt, und dazu verwendet, die intraadrenale Lokalisierung in erwachsenen männlichen Ratten zu bestimmen. Bei der Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus der Rattennebenniere erkannte der anti-AT₁ Antikörper zwei Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 73 und 93 kDa, wohingegen die Färbung mit dem anti-AT₂ Antikörper zu Banden von 73 und 120 kDa führte. Leider hat ein ähnlicher Ansatz für die NPY-Rezeptoren nicht zum Erfolg geführt.

Die Solubilisierung des NPY-Y₂ Rezeptors aus Zellmembranen, eine Technik, die die Möglichkeit zur Anreicherung und Aufreinigung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren bietet, wurde mit dem nichtionischen Detergens n-Octyl- β -D-glucopyranosid durchgeführt. Eine erfolgreiche Solubilisierung wurde durch Detektion mit Antikörpern in Western Blot Experimenten bestätigt. Die Funktionalität des Rezeptors unter den verwendeten Bedingungen wurde in Oberflächenplasmonresonanz(OPR)-Experimenten getestet. OPR ist ein optisches Phänomen, welches an der Grenzfläche zwischen einem Goldchip und einer Flusszelle auftritt und welches mit der Änderung des Brechungsindex der Flüssigkeit in der Messzelle in Zusammenhang steht. Mit Hilfe der BIAcore[®] Technik kann dieses Phänomen zur Charakterisierung der Wechselwirkung von Bindungspartnern in Lösung verwendet werden. Es wurden Hinweise für die Bindung der Rezeptoren an ein auf dem CM5 Sensor Chip von BIAcore immobilisiertes NPY Analogon gefunden, doch die schlechte Regenerierbarkeit des Sensor Chips stellte sich als grosses Hindernis für eine ausreichende Reproduktion des Experiments heraus.

Unter Verwendung einer Kombination aus nano-HPLC und nano-Electrospray Ionization Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance Massenspektrometrie (ESI-FTICRMS) wurde eine Methode zur Analyse komplexer Gemische von Membranproteinen etabliert. Membranproteine wurden aus COS-6 Zellmembranen solubilisiert und durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen getrennt. Coomassie-Blau gefärbte Banden wurden ausgeschnitten und mit Trypsin im Gel verdaut. In Abhängigkeit von der Auswertemethode war es mit nano-HPLC / nano-FTICRMS möglich bis zu 15 Proteine aus einer einzelnen Bande mit Massengenauigkeiten von < 5ppm zu identifizieren, was eindrucksvoll die Vorteile dieser Methode zeigt.

Der in COS-6 Zellmembranen exprimierte NPY-Y₂ Rezeptor wurde in Photoaffinitätsmarkierungsstudien untersucht. [N_α-biotinyl-Ahx₂, Ahx⁵⁻²⁴(Tmd)Phe²⁷] NPY, ein NPY-Y₂-selektives Analogon, welches die photoaktivierbare Aminosäure 4-(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl-phenylalanine ((Tmd)Phe) enthält, wurde verwendet, um die Crosslinking-Bedingungen in einem nichtradioaktiven Ansatz zu optimieren. Das Ergebnis des Crosslinkings wurde in Western Blot Experimenten untersucht. Zur Detektion wurde mit Alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin (AP-Streptavidin) verwendet, welches eine hohe Affinität zum biotinylierten Liganden besitzt. Bei Verwendung von 10⁻⁵ M des markierten Liganden wurden mit AP-Stretavidin zwei Banden mit Molekulargewichten von 52 und 56 kDa nachgewiesen. Diese Molekulargewichte entsprechen dem durch Antikörperfärbung ermittelten apparenten Molekulargewicht des Rezeptors. Die niedrigere der beiden Banden war durch 10fachen Überschuss von unmarkiertem NPY während des Crosslinkings verdrängbar. Des Weiteren wurde ein neuer photoaffinitätsmarkierter Ligand entwickelt, welcher das Photolabel [3-Nitro-5-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3yl]phenoxy]-(9Cl)-essigsäure (DAG0532) enthält. Dieses wurde an 2,3 Diaminopropionsäure gekoppelt, welche in Position 27 der Sequenz des Liganden eingeführt wurde. DAG0532 besitzt den Vorteil, dass es nicht nur photoaktivierbar ist, sondern auch in Gegenwart von 0.01 M NaOH unter Bestrahlung mit UV-Licht spezifisch hydrolysiert werden kann. Wenn die Hydrolyse in einer Mischung aus H₂¹⁶O und H₂¹⁸O stattfindet, kann das resultierende Isotopenmuster dazu verwendet werden, nach dem tryptischen Verdau von Proben photoaffinitätsmarkierte Fragmente mittels Massenspektrometrie selektiv zu identifizieren. Es wurde gezeigt, dass der neue photoaktivierbare Ligand mit der Sequenz [N_α-biotinyl-Ahx₂, Ahx⁵⁻²⁴, Dpr²⁷(DAG0532)] NPY an NPY-Y₂ Rezeptoren bindet und dieser wurde gemäss den mit [N_α-biotinyl-Ahx₂, Ahx⁵⁻²⁴(Tmd)Phe²⁷] NPY gefundenen optimierten Bedingungen in Crosslinking-Experimenten weiter untersucht. Auf Western Blots erkannte AP-Streptavidin bei 52 kDa eine photoaffinitätsmarkierte Bande. Diese Bande war jedoch unter den verwendeten Bedingungen nicht durch 10fachen Überschuss von NPY verdrängbar. Banden welche den auf Western Blots gefundenen Molekulargewichten der Rezeptordoppelbande entsprechen wurden aus Coomassie Blau gefärbten Gelen photoaffinitätsmarkierter und nicht

photoaffinitätsmarkierter Proben ausgeschnitten. Sie wurden im Gel mit Trypsin verdaut, die Peptidfragmente aus dem Gel extrahiert und mittels nano-HPLC / nano-FTICRMS analysiert. Es wurden jedoch in diesen Experimenten jedoch keine tryptischen Fragmente des NPY-Y₂ Rezeptors nachgewiesen, was darauf hinweist, dass der Verlust an Rezeptor während der Aufarbeitung zu gross war, um über der Nachweisgrenze zu sein.

Bis heute gibt es, mit Ausnahme von Rhodopsin, einen Mangel an detaillierten Strukturdaten für G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Daher stellen die vorgelegten Studien und Ergebnisse eine Sammlung kleiner aber unverzichtbarer Mosaiksteine auf dem Weg zu einem umfassenderen Verständnis der Wechselwirkung zwischen den untersuchten Neuropeptidrezeptoren und ihren Liganden dar.