

Dissertation ETH No. 13271

**The Neuropeptide Y Family: Molecular
Characterization of the Multi-Ligand /
Multi-Receptor System**

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

presented by

Chiara Cabrele

Dottore in Chimica
Universita' degli Studi di Padova

Born June 6th, 1969
Citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

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

1999

SUMMARY

Neuropeptide Y (NPY), pancreatic polypeptide (PP) and peptide YY (PYY) are members of the NPY hormone family. They consist of 36 amino acids, are C-terminally amidated and show high sequence homology, which is 69% between NPY and PYY, and 50% between NPY and PP. The X-ray structure of avian PP reveals a hairpin-like fold of a type II polyproline helix (residues 1-8) and of an α -helix (residues 14-31). The C-terminal pentapeptide adopts a flexible turn projecting away from the hairpin loop. NPY is one of the most abundant neuropeptides in the central and peripheral nervous systems, and is present in high concentrations in the brain, especially in the cortical areas, hippocampus and hypothalamus. The most relevant biological actions of NPY are vasoconstriction, stimulation of food intake, increase in memory retention, inhibition of the sexual behavior, anxiolysis, regulation of neurotransmitter release, and modulation of ethanol consumption. These effects are transmitted by at least five different receptor subtypes which belong to the large superfamily of the G-protein coupled receptors; they are referred to as the Y_1 -, Y_2 -, Y_4 -, Y_5 - and y_6 -receptors. The affinity of NPY and PYY is in the subnanomolar range for the receptors Y_1 , Y_2 and Y_5 (IC_{50} 0.04-0.8 nM), while their Y_4 -receptor affinity is in the nanomolar range (IC_{50} 5.5 nM for NPY). In contrast to NPY and PYY, the third member of the NPY family, PP, binds to the Y_4 -receptor with subnanomolar affinity (IC_{50} 0.04 nM), while to the other receptors only with nanomolar (Y_5) and micromolar (Y_1 and Y_2) affinity.

In order to characterize each receptor subtype individually on the structural as well as on the biological level, highly potent and selective compounds are required, which would recognize only one receptor in a specific manner. A combination of different approaches that leads to the identification of the structural and functional features which are responsible for the pharmacological profile of the native ligand has been applied. To gain insight into the most important requirements of the primary structure, systematic alanine-scanning, N-/C-terminal and central truncation of NPY were performed (chapter 1). Based on the results of these investigations, it was concluded that the C-terminal pentapeptide is essential for the binding to all Y-receptors, while the behavior of N-terminally and centrally truncated peptides was different with respect to each receptor (chapter 1). Among the alanine-monosubstituted NPY analogs, $[Ala^{13}]$ -NPY and $[Ala^{27}]$ -NPY turned out to be Y_2 -receptor selective (75- to 370-fold relative to the other receptors; chapter 2). Because of

the flexibility of the peptide conformation, it is generally required to introduce constraints into the molecule, in order to limit the number of the conformations energetically accessible to the peptide. Thus, with the aim of inducing a more rigid conformation of the C-terminus of NPY, we designed analogs containing the NPY segments 1-4 and 33-36 connected by a spacer between the residues 4 and 33, and head to tail cyclized through a second spacer (chapter 3). For the preparation of these peptides, a method was developed that allows not only to carry out the chain assembly on the solid phase but also to couple the N- and C-termini while the peptide is still bound to the solid support. This was achieved by the attachment of the phenolic group of tyrosine methyl ester, representing Tyr³⁶ of NPY, to the resin. The amino function of this amino acid was used to elongate the peptide chain, while its carboxy function was submitted to cyclization after hydrolysis of the methyl ester. Fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-butyl chemistry was chosen for the chain assembly, and the recovery of the free phenolic group was smoothly accomplished with trifluoroacetic acid in the presence of suitable scavengers. The cyclic peptides showed circular dichroism (CD) spectra characteristic of β -turns. The binding affinity of the compounds was tested at the Y₁-, Y₂- and Y₅-receptor systems: although with moderate affinity, they turned out to be Y₁-receptor preferring ligands. These results showed that only eight amino acids which correspond to the N- and C-termini of NPY are sufficient to displace some native peptide from the Y₁-receptor binding site (chapter 3).

The binding properties of the members of the NPY family at the Y-receptors were modulated by the design of chimeric analogs of NPY, PYY and PP. In general, the introduction of PP segments into NPY led to a decrease in affinity at all receptors and also to a destabilization of the helical structure in solution. In contrast, the presence of NPY positions in human PP (hPP) did not affect the high affinity at the Y₄-receptor, but significantly increased the affinity at the other receptors: in particular, the chimeric analog of hPP containing the NPY segments 1-7 and 19-23 turned out to be as potent as NPY at the Y₁-receptor and > five-fold more potent at the Y₅-receptor (IC₅₀ 0.1 nM). All hPP analogs maintained the highly helical character of hPP, however their tertiary structure was more similar to that of NPY than of hPP, as suggested by their CD profiles (chapter 4).

In the search for selective NPY ligands, the conformationally constrained aminoisobutyric acid (Aib) was used to design a compound that selectively bound to the Y₅-receptor: [Ala³¹, Aib³²]-NPY (IC₅₀ 5 nM). This analog was found to act as an agonist of NPY *in vitro* and to stimulate food intake in rats. The solution structure of [Ala³¹, Aib³²]-

NPY was investigated by CD, 2D-NMR and molecular dynamics. Comparison with the structure of the native NPY revealed a conformational change in the C-terminal part of the peptide: while the analog adopted a 3_{10} -helical turn in the region 28-31, followed by a not well defined structure, NPY showed an α -helix extending to the C-terminal end. Furthermore, in contrast to NPY, for the Aib-containing analog no dimerization was observed under the NMR conditions (chapter 5).

To investigate the ability of the motif Ala-Aib to induce Y_5 -receptor selectivity, we introduced it into the chimeric analogs of hPP with the highest affinity at the Y_5 -receptor. Accordingly, the new [Ala³¹, Aib³²]-containing chimera turned out to be Y_5 -receptor selective with subnanomolar affinity (IC_{50} up to 0.2 nM). They were tested *in vitro* and *in vivo* and were found to be agonists of NPY and to increase food intake in rats (chapter 5).

Further [Ala³¹, Aib³²]-containing analogs of NPY and of the PP/NPY chimera were synthesized: all peptides were Y_5 -receptor selective. This supported the hypothesis that the motif Ala-Aib is a key motif for selectivity at the Y_5 -receptor. To better understand the structural role of Aib at position 32, other amino acids were introduced at this position, like proline, D-proline and hydroxyproline (Hyp): while [Ala³¹, Pro³²]-NPY and [Ala³¹, Hyp³²]-NPY selectively bound to the Y_5 -receptor with a good affinity (12 nM and 40 nM, respectively), the introduction of D-proline led to a drastic loss of affinity. These results suggested that the presence of a turn-inducing motif at position 32 of NPY may favor the binding at the Y_5 -receptor in a specific way that is not tolerated at the other Y -receptors.

In conclusion, structure-affinity and structure-activity relationship studies led to the development of the first class of potent Y_5 -receptor selective agonists: the administration of these selective molecules *in vivo* induced increase in food intake in a dose-dependent manner. This observation suggests that the orexigenic function of NPY may be transmitted by the Y_5 -receptor. Therefore, the structural and biological characterization of this receptor is of major importance for the understanding of the complex mechanism that regulates feeding and for the development of anti-obesity drugs. To this aim, the selective Aib-containing analogs provide a very important and promising tool.

ZUSAMMENFASSUNG

Neuropeptid Y (NPY), pankreatisches Polypeptid (PP) und Peptid YY (PYY) sind Hormone, die zu der NPY-Familie gehören. Sie bestehen aus 36 Aminosäuren, sind C-terminal amidiert und zeigen hohe strukturelle Homologie, die 69% zwischen NPY und PYY, und 50% zwischen NPY und PP beträgt. Die Röntgenstruktur von Vogel-PP zeigt eine antiparallele Faltung einer Polyprolin Helix II (Reste 1-8) und einer α -Helix (Reste 14-31). Das C-terminale Pentapeptid ist ungeordnet. NPY ist eines der am häufigsten vorhandenen Neuropeptide in den zentralen und peripheren Nervensystemen, und ist in hohen Konzentrationen im Gehirn, besonders in den kortikalen Bereichen, im Hippocampus und im Hypothalamus anwesend. Die relevantesten biologischen Funktionen von NPY sind Gefäßverengung, Stimulation der Nahrungsaufnahme, Steigerung der Gedächtnisleistung, Hemmung des sexuellen Verhaltens, Anxiolyse, Regelung der Neurotransmitterausschüttung und Modulation des Äthanolkonsums. Diese Effekte werden durch mindestens fünf unterschiedliche Rezeptoren übertragen, die zu der Familie der G-Protein gekoppelter Rezeptoren gehören: Y_{1-} , Y_{2-} , Y_{4-} , Y_{5-} und y_6 -Rezeptor. Die Affinität von NPY und PYY liegt im subnanomolaren Bereich für die Rezeptoren Y_1 , Y_2 und Y_5 (IC_{50} 0.04-0.8 nM), während die Affinität am Y_4 -Rezeptor im nanomolaren Bereich (IC_{50} 5.5 nM für NPY) liegt. Im Gegensatz zu NPY und PYY bindet das Peptid PP an den Y_4 -Rezeptor mit subnanomolarer Affinität (IC_{50} 0.04 nM), während es an den anderen Rezeptoren nur mit nanomolarer (Y_5) und micromolarer (Y_1 und Y_2) Affinität bindet.

Um jeden Rezeptorsubtyp strukturell sowie biologisch zu charakterisieren, werden Moleküle benötigt, die nur einen einzigen Rezeptor in einer spezifischen Weise erkennen. Unterschiedliche Verfahren, die zu der Erkenntnis der strukturellen und Funktionseigenschaften führen, welche für das pharmakologische Profil des natürlichen Liganden verantwortlich sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit kombiniert. Um Einblick in die wichtigsten Anforderungen der Primärstruktur zu bekommen, wurde ein systematischer Alanin-Austausch und N-/C-terminal und zentrale Verkürzung von NPY durchgeführt (Kapitel 1). Gestützt auf die Resultate dieser Untersuchungen wurde gefolgert, daß das C-terminale Pentapeptid für die Bindung an alle Y-Rezeptoren notwendig ist, während das Verhalten von N-terminal und von zentral verkürzten Peptiden in Bezug auf jeden Rezeptor unterschiedlich ist (Kapitel 1). Unter den Alanin-

monosubstituierten Analoga von NPY waren [Ala¹³]-NPY und [Ala²⁷]-NPY selektiv für den Y₂-Rezeptor (75- bzw. 370-fach im Verhältnis zu den anderen Rezeptoren; Kapitel 2).

Aufgrund der Flexibilität der Peptidkette ist es im Allgemeinen notwendig, konformationelle Einschränkungen in dem Molekül vorzunehmen, um die Zahl der Freiheitsgrade zu beschränken, die dem Peptid energisch zugänglich sind. Mit dem Ziel, eine rigidere Konformation des C-Terminus von NPY zu erhalten, entwarfen wir Analoga von NPY, welche die Segmente 1-4 und 33-36 verbunden durch ein Spacer zwischen den Resten 4 und 33 enthalten, und die durch einen zweiten Spacer zwischen den N- und C-Resten zyklisiert sind (Kapitel 3). Für die Herstellung dieser Peptide entwickelten wir eine Methode, die nicht nur die Verlängerung der Peptidkette auf dem festen Polymerträger erlaubt, sondern die Zyklisierung der N- und C-Termini ermöglicht, während sich das Peptid noch am festen Support befindet. Dies wurde durch das Anknüpfen der Phenolgruppe von Tyrosinmethylester, welcher Tyr³⁶ von NPY darstellt, an das Harz erzielt. Dessen Aminofunktion wurde verwendet, um die Peptidkette zu verlängern, während die Carboxyfunktion für die Zyklisierung nach Hydrolyse des Methylesters aktiviert wurde. Die Fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-butyl Strategie wurde für die Peptidsynthese gewählt, und die Abspaltung der Phenolgruppe vom Harz erfolgte glatt mit Trifluoressigsäure in Anwesenheit von geeigneten Abfängern. Die Zirkular-Dichroismus (CD) Spektren der zyklischen Peptide zeigten die Anwesenheit von β -Turns. Die Verbindungen wurden an den Y₁-, Y₂- und Y₅-Rezeptor Systemen getestet: obwohl nur mit mäßiger Affinität bevorzugten sie den Y₁-Rezeptor. Diese Resultate zeigten, daß nur acht Aminosäuren, die den N- und C-terminal Segmente von NPY entsprechen, ausreichend sind, das am Y₁-Rezeptor gebundene natürliche Peptid von der Bindungsstelle zum Teil zu verdrängen (Kapitel 3).

Die Bindungsaffinitäten der Peptide der NPY-Familie an den Y-Rezeptoren wurden durch das Design von Chimär-Analoga von NPY, PYY und PP moduliert. Im allgemeinen führte die Einführung der PP-Segmente in NPY zu einer Abnahme an der Affinität an allen Rezeptoren und auch zu einer Destabilisierung der helikalen Struktur in Lösung. Demgegenüber beeinflusste das Vorhandensein der NPY-Positionen in menschlichem PP (hPP) die hohe Affinität am Y₄-Rezeptor nicht, und erhöht zudem erheblich die Affinität an den anderen Rezeptoren: insbesondere war die Bindung des Chimär-Analogen von hPP, welches die NPY-Segmente 1-7 und 19-23 enthält, am Y₁-Rezeptor (IC₅₀ 0.1 nM) so stark affin wie bei NPY und am Y₅-Rezeptor sogar > fünf-fach stärker. Alle hPP-Analoga behielten die stabile helikale Konformation von hPP, obwohl ihre tertiäre Struktur

ähnlicher der von NPY als der von hPP war, was durch ihre CD-Profile nahegelegt wurde (Kapitel 4).

In der Suche nach selektiven NPY-Liganden wurde die konformativ eingeschränkte Aminoisobuttersäure (Aib) benutzt. Es wurde das Molekül [Ala³¹, Aib³²]-NPY synthetisiert, das selektiv an den Y₅-Rezeptor bindet (IC₅₀ 5 nM). Dieses Analogon wirkte als ein Agonist von NPY *in vitro* und erhöht die Nahrungsaufnahme in Ratten. Die Struktur in Lösung von [Ala³¹, Aib³²]-NPY wurde durch CD, 2D-NMR und molekulare Dynamik bestimmt. Der Vergleich mit der Struktur des natürlichen NPY zeigte eine Konformationsänderung im C-terminalen Bereich des Peptids: während das Analogon einen ₃₁₀-helikalen Turn von den Resten 28-31, gefolgt von einer nicht sehr gut definierten Struktur, aufweist, hat NPY eine α -Helix in diesem Bereich, die sich bis zum C-Terminus fortsetzt. Im Gegensatz zu NPY wurde außerdem für das Aib-enthaltende Analogon keine Dimerisierung unter NMR Bedingungen beobachtet (Kapitel 5).

Um die Fähigkeit des Motivs Ala-Aib, am Y₅-Rezeptor Selektivität zu induzieren, besser zu verstehen, führten wir dieses in Chimär-Analoga von hPP ein, die die höchste Affinität am Y₅-Rezeptor aufwiesen. Dementsprechend resultierten neue, Y₅-Rezeptor selektive [Ala³¹, Aib³²]-enthaltende Chimära mit subnanomolarer Affinität (IC₅₀ bis zu 0.2 nM). Sie wurden *in vitro* und *in vivo* getestet und wirkten als Agonisten von NPY an Zellen sowie stimulierten sie die Nahrungsaufnahme in Ratten (Kapitel 5).

Weitere [Ala³¹, Aib³²]-enthaltende Analoga von NPY und der PP/NPY Chimära wurden synthetisiert: alle Peptide waren selektiv für den Y₅-Rezeptor. Diese Resultate unterstützten die Hypothese, daß das Motiv Ala-Aib ein Schlüsselmotiv für die Selektivität am Y₅-Rezeptor ist (Kapitel 6).

Um die strukturelle Rolle von Aib in der Position 32 besser zu verstehen, wurden andere Aminosäuren, wie Prolin, D-Prolin und Hydroxyprolin (Hyp) in dieser Position eingeführt: während [Ala³¹, Pro³²]-NPY und [Ala³¹, Hyp³²]-NPY an den Y₅-Rezeptor mit guter Affinität selektiv binden (12 nM bzw. 40 nM), führte die Einführung von D-Prolin zu einem drastischen Verlust der Affinität. Diese Resultate legen nahe, daß das Vorhandensein eines Turns, den das Element in Position 32 von NPY verursacht, die Bindung an den Y₅-Rezeptor in einer spezifischen Weise begünstigen kann, die nicht durch die anderen Y-Rezeptoren zugelassen wird (Kapitel 6).

Zusammenfassend kann gefolgert werden, daß Studien über Struktur-Affinität und Struktur-Aktivität zu der Entwicklung der ersten hoch affinen und selektiven Agonisten am Y₅-Rezeptor führten: diese selektiven Moleküle verursachten eine Zunahme der Nahrungsaufnahme in Ratten in einer dosisabhängigen Weise. Diese Beobachtung legt

nahe, daß die Funktion von NPY, die Nahrungsaufnahme zu stimulieren, durch den Y₅-Rezeptor übertragen werden kann. Folglich sind die strukturellen und biologischen Eigenschaften dieses Rezeptors für das Verständnis des komplizierten Mechanismus, der die Nahrungsaufnahme regelt, und für die Entwicklung von Arzneimittel gegen die Fettsucht von entscheidender Bedeutung. Für dieses Ziel stellen die selektiven Aib-enthaltenden Analoga einen sehr wichtigen und vielversprechenden Ansatz dar.