

Aus der Klinik für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Rolle der Dimerisierung des Melanocortin-4-Rezeptors auf die Aktivierung der Gq/11 Signalisierung  
Investigating the Role of Melanocortin 4 Receptor Dimerization  
on G<sub>q/11</sub> Signaling

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Nanina Reininghaus  
aus Graz

Datum der Promotion: 29.11.2024



# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>iv</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1 Adipositas Prävalenz.....	4
1.2 Leptin-Melanocortin Signalweg.....	4
2.3 $G\alpha_q$ Signalweg und synthetischer MC4R Agonist Setmelanotide.....	5
2.4 Homo- und Heterodimerisierung von GPCRs.....	6
2.4 Fragestellung der Studie.....	7
<b>2 Methodik.....</b>	<b>9</b>
2.1 Klonierung der NanoBRET™ Konstrukte.....	9
2.2 HEK293 Kultivierung.....	11
2.3 Transfektion.....	11
2.4 Protein-Protein Interaktion via NanoBRET™.....	12
2.5 Messung von cAMP via GloSensor™.....	14
2.6 PLC Aktivierung via Reportergene-Assay.....	15
2.7 Statistische Analyse.....	16
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>17</b>
3.1 Homodimerisierung von chimären MC4R, dem CB1R und der MC4R -H158R Mutation ist verglichen mit dem MC4R-WT eingeschränkt.....	17
3.2. Donor Saturation Assays.....	18
3.3 Auswirkung der Dimerisierung auf die cAMP-Bildung.....	19
3.4 Effekt der reduzierten Homodimerisierung auf $G_{q/11}$ Signalisierung.....	21
3.4.1 Chimäre Rezeptoren weisen eine ähnliche Basalaktivität, eine erhöhte $E_{max}$ als auch eine erniedrigte $EC_{50}$ – verglichen mit dem MC4R-WT – auf.....	21

---

3.4.2 Reportergen-Assays nach Behandlung mit Pertussistoxin (PTX) zur Unterscheidung von $G_{q/11}$ und $G_{i\beta\gamma}$ Aktivierung.....	24
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>27</b>
4.1 <i>Dimer-Separierung und <math>G_s</math> Signalisierung.....</i>	27
4.2 <i>Setmelanotide und die Bedeutung der <math>G_{q/11}</math> Signalisierung im MC4R.....</i>	28
4.3 <i>Monomer/Dimer Equilibrium.....</i>	28
4.4 <i>Zusammenfassung der Ergebnisse.....</i>	29
4.5 <i>Stärken und Schwächen der Zellkultur.....</i>	30
<b>5. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>32</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>33</b>
<b>Druckexemplar(e) der Publikation(en).....</b>	<b>39</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>53</b>
<b>Komplette Publikationsliste.....</b>	<b>55</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>56</b>

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Flexi Enzyme Aminosäuren Erkennungssequenzen.....	9
Tabelle 2 Tabellarische Darstellung der Donor- / Akzeptor-Ratio.....	12
Tabelle 3 Wirksamkeit unter Maximalstimulation ( $E_{\max}$ ), mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ), Bias (Formel siehe Methoden 2.6) und relative Dimerisierung.....	24
Tabelle 4 $E_{\max}$ und $EC_{50}$ von mit Liganden stimulierten MC4R-WT und Chim 7 mit/ohne PTX Behandlung.....	26

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Leptin-Melanocortin Signalweg.....	5
Abbildung 2 Zusammensetzung der chimären Rezeptoren.....	7
Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung der Klonierung mit dem <i>Flexi</i> ® Cloning System.....	11
Abbildung 4 Schrittweiser Ablauf der NanoBRET™ Assays.....	13
Abbildung 5 Schrittweiser Ablauf der GloSensor™ Assays.....	14
Abbildung 6 Schrittweiser Ablauf der Reporteragen-Assays.....	15
Abbildung 7 Rezeptor-Dimerisierung von MC4R Chimären im Vergleich zu MC4R-WT.....	18
Abbildung 8 <i>Donor Saturation Assay</i> (DSA) zur Überprüfung von Spezifität der Rezeptor-Rezeptor Interaktion .....	19
Abbildung 9 G <sub>s</sub> Signalisierung von MC4R-WT und chimären Rezeptoren nach alpha-MSH oder Setmelanotide Stimulation .....	21
Abbildung 10 G <sub>q/11</sub> Signalisierung der chimären Rezeptoren und der H158R Mutation im Vergleich zu MC4R-WT.....	23
Abbildung 11 Reporteragen-Assays unter Zugabe von PTX von MC4R-WT und Chim 7.....	25
Abbildung 12 EC <sub>50</sub> der G <sub>q/11</sub> Signalisierung von MC4R-WT stimuliert mit Setmelanotide vs. Chim 7 stimuliert mit alpha-MSH.....	29

## Abkürzungsverzeichnis

CB1R	Cannabinoid 1 Rezeptor
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive (Wirk-)Konzentration
E <sub>max</sub>	Theoretischer Maximaleffekt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HT	HaloTag®
iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i>
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NL	NanoLuc®
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PTX	Pertussistoxin
PVN	Nucleus paraventricularis
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Die Prävalenz von Adipositas ist über die letzten Jahre hinweg kontinuierlich gestiegen, sowohl unter den Erwachsenen als auch unter Kindern. Aufgrund der häufig damit assoziierten Komorbiditäten und einer infolge dieser erniedrigten Lebenserwartung, stellt diese Entwicklung ein ernst zu nehmendes Problem unserer Gesellschaft dar. Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) ist Teil des Leptin-Melanocortin Signalwegs und spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung unserer Energiehomöostase. Mutationen in diesem Rezeptor sind ursächlich für monogen verursachter Adipositas. Diese Gegebenheit macht den MC4R zu einem wichtigen Angriffspunkt in der Adipositas-Forschung und Therapie. In früheren Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der MC4R Homodimere bildet, und die Homodimer-Bildung Einfluss auf die  $G_s$  Signalisierungseigenschaften des Rezeptors hat. Aktuelle Studien legen nahe, dass, in Hinblick auf den MC4R vor allem der  $G_{q/11}$  Signalweg eine entscheidende Rolle in der Gewichtsregulation spielt. In dieser Studie wurde daher der Einfluss, den eine MC4R Dimer-Separierung auf den  $G_{q/11}$  Signalweg hat, untersucht.

**Methoden:** Die Auswirkungen einer MC4R Dimer-Separierung wurde mithilfe von MC4R/CB1R chimären Rezeptoren untersucht. Die Chimäre wurden erstellt, indem einzelne Stellen innerhalb der Aminosäuresequenz, die potentiell für die MC4R Dimer-Bildung relevant sind, mit Sequenzen aus dem CB1R ausgetauscht wurden. Die Experimente wurden alle in HEK293 Zellen durchgeführt. NanoBRET™ Assays wurden zur Bestimmung der Homodimer-Bildung eingesetzt. Mithilfe von Luciferase-Reporter-Gen-Assays (*nuclear factor of activated T cells*, NFAT) wurde das  $G_{q/11}$  Signalisierungsverhalten der Rezeptoren untersucht. Im Anschluss wurden Teile dieser Experimente unter Zugabe von Pertussistoxin wiederholt, um den Einfluss anderer Signalkaskaden auszuschließen.

**Ergebnisse:** Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass das Homodimerisierungsverhalten des MC4R Einfluss auf dessen  $G_{q/11}$  Signalisierung hat. Wird der Rezeptor bei seiner Dimer-Bildung gestört, hat dies vor allem einen Effekt in Hinblick auf die  $EC_{50}$ . Es kommt zu einer Verschiebung hin zu niedrigeren  $EC_{50}$  Werten und damit zu einer verbesserten Signalisierung.

**Fazit:** Diese Ergebnisse liefern einen möglichen Ansatzpunkt, um die MC4R Dimer-Separierung therapeutisch einzusetzen. Hier würden in erster Linie Substanzen in Frage

kommen, welche die MC4R Dimer-Bildung unterbinden. Es sind weitere Experimente notwendig, um die gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft auch in der Praxis einsetzen zu können.

## Abstract

**Introduction:** Prevalence of obesity has continued to rise among adults and adolescents during the last decades. Due to obesity related comorbidities and associated lower life expectancy, it has become an urgent priority for health care to address this development. The melanocortin 4 receptor (MC4R) is part of the Leptin-Melanocortin pathway and is an important player, when it comes to regulating our energy intake and expenditure. Mutations in this receptor are among the most frequent monogenetic causes for obesity, therefore making the MC4R an interesting target when striving to find solutions for the obesity development. In recent studies we showed, that the MC4R can form homodimers and that this behavior can have an effect on its  $G_s$  signaling capacities. Studies that are up to date suggest, that when discussing the receptors weight regulating abilities, the  $G_{q/11}$  cascade is of higher relevance than the  $G_s$  pathway. In this study we therefore analyzed the effect MC4R Dimer separation has on its  $G_{q/11}$  signaling capacities.

**Materials and methods:** The effect of homodimer separation was investigated using MC4R/CB1R chimeras. These chimeric receptors contain certain interchanges, with the cannabinoid 1 receptor (CB1R), within their amino acid sequence that are important for dimer formation. The experiments were conducted in HEK293 cells. NanoBRET™ assays were conducted to determine receptor-receptor interaction. Luciferase-based reporter gene assays (*nuclear factor of activated T cells*, NFAT) were conducted to quantify the effect of dimer separation on  $G_{q/11}$  signaling capacities. Subsequent to regular NFAT assays pertussistoxin was added to the experimental setting in order to determine, if other cascades interfered with the measurement results.

**Results:** In this study we were able to show, that MC4R homodimerization has an effect on the receptors  $G_{q/11}$  signaling capacities. When dimer formation is inhibited, it especially effected the  $EC_{50}$ , shifting it towards lower values which means that receptor signaling is enhanced.

**Conclusion:** These findings provide an interesting starting point in finding ways to target the MC4R, in order to treat obesity. Further experiments are needed to transfer this knowledge into practice for the future.

# 1 Einleitung

## 1.1 Adipositas Prävalenz

Während der letzten Jahre hat die weltweite Prävalenz von Adipositas stark zugenommen. Laut Daten der WHO hat sich diese seit 1975 fast verdreifacht (1) und betrifft nicht nur Erwachsene, sondern vor allem auch Kinder und Jugendliche (2). Diese Entwicklung stellt aufgrund der häufig mit Adipositas vergesellschafteten Komorbiditäten eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. Übergewicht korreliert unter anderem mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Diabetes Mellitus Typ 2 (3) und von kardiovaskulären Erkrankungen (4). Es konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen hohem BMI und der Entwicklung von verschiedenen Krebserkrankungen, darunter Kolon-Karzinom und Brustkrebs, hergestellt werden (5). Aufgrund der häufig auftretenden Komorbiditäten haben übergewichtige Menschen verglichen mit der normalgewichtigen Population meist eine geringere Lebenserwartung (6). Diese Erkenntnisse heben hervor, warum es relevant ist nach Lösungsansätzen zu suchen, die helfen, diesen Trend hin zu einer zunehmend adipösen Gesellschaft zu stoppen, und im besten Fall dazu beizutragen, diesen umzukehren. In der Klinik existieren bereits Ansätze, Patienten mit extrem starkem Übergewicht zu behandeln. Nach einer Evaluation wird einigen von ihnen ein bariatrisch-chirurgischer Eingriff empfohlen. Dieser kann bei ausgewählten Betroffenen erfolgreich zu einer Gewichtsreduktion führen (7). Eine operative Behandlung ist aber weitaus nicht bei allen übergewichtigen Menschen indiziert. Als Beispiel zu nennen sind hier vor allem Kinder, die einen Defekt im Leptin-Melanocortin Signalweg aufweisen. Womöglich kann aufgrund der bei ihnen vorliegenden genetischen Komponente eine deutliche Verminderung des Übergewichts nicht durch einen operativen Eingriff erzielt werden (8-11).

## 1.2 Leptin-Melanocortin Signalweg

Der Leptin-Melanocortin Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation unseres Energiehaushalts, welcher insbesondere im Hypothalamus stattfindet. Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R), der im Fokus dieser Arbeit steht, stellt einen wichtigen Teil innerhalb dieser Signalkaskade dar. Der MC4R ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus der Klasse A (Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren) und wird vor allem im *nucleus paraventricularis* (PVN) im Hypothalamus exprimiert. Der MC4R wird von seinen endogenen

Liganden alpha-MSH und beta-MSH aktiviert. Die Signalkaskade stellt sich folgendermaßen dar: Wird Leptin aus dem adipösen Fettgewebe freigesetzt, bindet dieses den Leptinrezeptor. Infolgedessen können alpha-MSH und beta-MSH, welche im *nucleus arcuatus* aus dem *POMC*-Gen prozessiert werden, axonal zum PVN transportiert werden, den MC4R binden und verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Daraus resultiert eine Senkung des Appetits, welche wiederum im weiteren Verlauf eine verminderte Nahrungsaufnahme bedingt. Zusätzlich unterdrücken hohe Konzentrationen an Leptin orexigen-wirkende Peptide wie *Agouti-related Peptid* (AgRP) und *Neuropeptid Y* (NPY) (12). Durch dieses Zusammenspiel wird der Energieumsatz physiologisch reguliert (Abbildung 1). Mutationen im *MC4R* sind ursächlich für bis zu 5% der monogenen Ursachen für Adipositas und stellen einen wichtigen Risikofaktor für Adipositas dar (13, 14). 0.3% in der Bevölkerung haben relevante *MC4R* Mutationen (15).

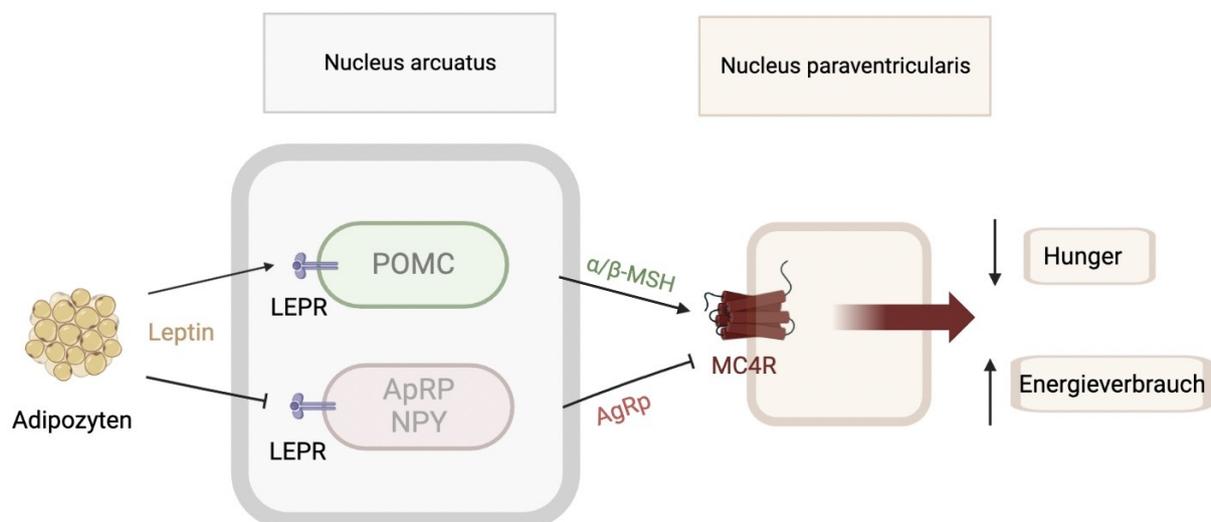


Abbildung 1 Leptin-Melanocortin Signalweg. Leptin aus dem adipösen Fettgewebe bindet im Nucleus arcuatus an seinen Leptinrezeptor. Infolgedessen werden zum einen die orexigen-wirkenden Peptide *Agouti-related Peptid* und *Neuropeptid Y* inhibiert. Zum anderen werden alpha- und beta-MSH aus dem *POMC*-Gen prozessiert und der *MC4R* aktiviert. Daraus resultiert eine Senkung des Appetits und der Energieverbrauch wird gesteigert. Die Abbildung wurde mit Hilfe von Biorender erstellt und genehmigt.

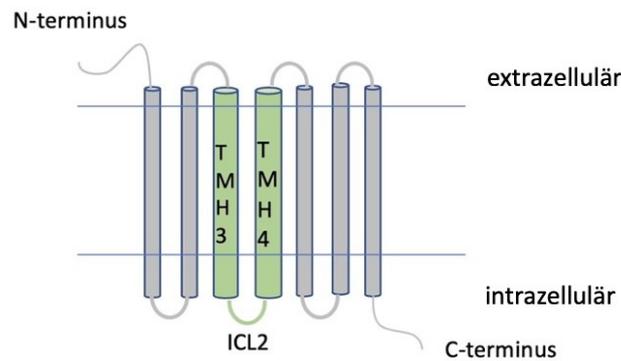
### 2.3 $G\alpha_q$ Signalweg und synthetischer *MC4R* Agonist Setmelanotide

Lange Zeit wurden die Gewicht-regulierenden Effekte des *MC4R* alleine der Aktivierung von  $G_s$  Proteinen, welche über einen Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zelle wirkt, zugeschrieben (16). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der *MC4R* weitaus mehr G-Protein Untereinheiten, nämlich  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$  und  $G_{12/13}$ , aktivieren kann (17). Laut aktuellen Studien ist die  $G\alpha_s$  Aktivierung vor allem an Regulation von Puls und Blutdruck mitbeteiligt. Die  $G\alpha_q$  Untereinheit ist in den Fokus

gerückt, wenn der Einfluss des MC4R auf Nahrungsaufnahme und Energieumsatz diskutiert wird, und scheint bezogen auf das Sättigungsgefühl eine weitaus größere Rolle zu spielen als ursprünglich angenommen (18). Diese Theorie konnte in einer Studie, in der Patienten mit Defekten im Leptin-Melanocortin Signalweg (POMC-, PCSK1- oder Leptinrezeptor-Mangel) mit Setmelanotide behandelt wurden, gestärkt werden. Setmelanotide ist ein synthetischer MC4R Agonist der *biased agonism* in Richtung  $G\alpha_q$  Aktivierung aufweist. Patienten, die mit Setmelanotide behandelt wurden, nahmen stark an Gewicht ab und berichteten keine von den bis dato bekannten Nebenwirkungen auf Puls und Blutdruck, welche durch bisher getestete synthetisch hergestellte MC4R Agonisten ausgelöst wurden (19). Von der Intervention mit Setmelanotide kann nur eine kleine Untergruppe an Patienten profitieren. Eine davon ausgeklammerte Untergruppe stellt das Patientenkollektiv, mit einem Anteil von 5 %, mit Mutationen im *MC4R* dar (19). Ein therapeutischer Ansatz für ein umfassenderes Patientenkollektiv ist ausständig.

## 2.4 Homo- und Heterodimerisierung von GPCRs

Eine Eigenschaft vieler GPCRs, darunter der MC4R, ist die Bildung von Homo- und Heterodimeren mit anderen GPCRs (20-22). Mit dem phylogenetisch nahe Verwandten Cannabinoid 1 Rezeptor (CB1R) formt der MC4R, trotz struktureller Ähnlichkeit, keine Heterodimere (22, 23). Auf der Basis dieser Erkenntnis konnte die Homodimerisierung von MC4R bereits in COS-7 Zellen, unter Einsatz von speziell erstellten MC4R/CB1R chimären Konstrukten, untersucht werden. Die chimären Rezeptoren wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese erstellt, indem *Interfaces*, die mutmaßlich eine Rolle in der Homodimer-Bildung (TMH3, TMH4 und/oder ICL2) spielen, mit dem CB1R getauscht wurden (Abbildung 2). Die Studienergebnisse gaben Aufschluss darüber, dass eine MC4R Homodimer-Separierung zu einem verstärkten  $G_{\alpha_s}$  Signal führt (24).



	TMH 3	ICL2	TMH 4
Chim 1	Asp122-Val145		
Chim 2			Val166-Phe184
Chim 3	Asp122-Val145		Val166-Phe184
Chim 4		Try153-Arg165	
Chim 5		Try153-Met161	
Chim 6		Asp146-Arg165	
Chim 7		Asp146-Met161	

Abbildung 2 Zusammensetzung der chimären Rezeptoren. In der Tabelle werden die Aminosäure Sequenzen, die mit dem CB1R ausgetauschten Regionen, dargestellt. Chim 1: Austausch in TMH3; Chim 2: Austausch in TMH4; Chim 3: Austausch in TMH3 und TMH4; Chim 4: Austausch in der ICL2 und intrazellulären Anteilen von TMH4; Chim 5: Austausch von ICL2; Chim 6: Austausch intrazellulärer Anteile von TMH3 und TMH4 und in der ICL2; Chim7: Austausch von intrazellulären Anteilen von TMH3 und ICL2 (24). Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al. (25).

## 2.4 Fragestellung der Studie

Die aktuelle Datenlage deutet darauf hin, dass die  $G_{q/11}$  Aktivierung womöglich eine bedeutendere Rolle in der Regulation der Energiehomöostase durch den MC4R spielt, als bislang angenommen (18). Diese Hypothese wurde bisher noch nicht ausreichend erforscht. Ziel dieser Arbeit ist es daher zu untersuchen, ob eine MC4R Dimer-Separierung die  $G_{q/11}$  Aktivierung beeinflusst, wie dies bereits für  $G_{\alpha_s}$  Signalisierung gezeigt werden konnte. Für die Zellexperimente wurde mit HEK293 Zellen gearbeitet, da diese im Vergleich zu COS-7 Zellen menschlichen Ursprungs sind und daher eine bessere Annäherung an den *in vivo* Zustand im Menschen ermöglichen. Neben den MC4R/CB1R chimären Konstrukten wurde zusätzlich die MC4R H158R, eine bekannte *gain-of-function* Mutation im ICL2, die eine reduzierte Homodimer-Bildung im Vergleich zum MC4R-WT aufweist, untersucht (24). In einer bisherigen Studie zeigte sich für die H158R Mutation nach alpha-MSH Stimulation bereits ein Bias hin zu einer  $G_{\alpha_q}$  Aktivierung (17). Die H158R Mutation wurde hier inkludiert, um in dieser Studie zum ersten

Mal auch den Einfluss des synthetischen MC4R Agonisten Setmelanotide auf  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_q$  Signalisierung im H158R zu untersuchen.

## 2 Methodik

Die Ergebnisse der nachfolgend aufgelisteten Experimente wurden in einer Publikation mit dem Titel „A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation“ veröffentlicht. Zur Untersuchung der Rezeptor  $G_s$  und  $G_q$  Aktivierung und der Rezeptor-Rezeptor Interaktion auf einer zellulären Ebene wurden für dieses Projekt mehrere *in vitro* Assays in HEK293 Zellen durchgeführt. Durch Zugabe von Pertussistoxin sollte eine Diskriminierung von  $G_{i/o}$  und  $G_{q/11}$  Aktivierung erfolgen. Zur Bereitstellung der jeweiligen Konstrukte wurden weit verbreitete molekularbiologische Methoden verwendet (26). MC4R-WT und CB1R cDNA wurde mittels PCR amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDps kloniert. MC4R H158R Mutation und MC4R/CB1R Chimäre lagen der Arbeitsgruppe bereits aus anderen Experimenten, in pcDps, vor (24). Für die Protein-Protein-Interaktionsassays wurde die Methode der *nano bioluminescence resonance energy transfer* (NanoBRET™) gewählt. Dafür wurden die cDNA von MC4R, CB1R, H158R und den Chimären 1-7 in ein Flexi-Vektor-System (pFC14A, PFC32K) kloniert.

### 2.1 Klonierung der NanoBRET™ Konstrukte

Um die Protein-Protein Interaktion via NanoBRET™ untersuchen zu können, wurden die Konstrukte am C-Terminus mit einem Tag HaloTag® (HT) und am N-Terminus mit einer Luciferase, NanoLuc® (NL), versehen. Für dieses Vorgehen wurde das Flexi® Cloning System (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Das Flexi® Cloning System basiert auf einer direktionalen Klonierungsmethode, die durch den Einsatz selten vorkommender Restriktionsenzyme, Sgfl und PmeI, ermöglicht wird. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme können ausgewählte DNA-Abschnitte einfach in den Vektor eingebracht werden. Um Proteine C-terminal zu markieren, ist zusätzlich der Einsatz von EcoICRI notwendig. Die Restriktionsenzyme sind in der Tabelle 1 mit ihren spezifischen Erkennungssequenzen aufgeführt.

Tabelle 1 Flexi Enzyme Aminosäuren Erkennungssequenzen. (Eigene Tabelle)

	Enzyme	Erkennungssequenz
Flexi® Enzyme Blend (Sgfl/PmeI)	Sgfl	5'...GCG AT▼CGC...3' 3'... CGC ▲TA GCG ...5'

	PmeI	5'...GTTT▼AAAC...3' 3'...CAAA▲TTTG...5'
Carboxy Flexi® Enzyme Blend (SgfI/EcoICRI)	SgfI	5'...GCG AT▼CGC...3' 3'... CGC ▲TA GCG ...5'
	EcoICRI	5'...GAG▼CTC...3' 3'... CTC ▲GAG ...5'

Für diese Arbeit wurden die Flexi-Vektoren pFC14A (Promega, Mannheim, Deutschland) – dieser weist eine Ampicillin-Resistenz auf – und pFC32K (Promega, Mannheim, Deutschland) – dieser weist eine Kanamycin-Resistenz auf – ausgewählt.

Die cDNA des WT-MC4R, der chimären Rezeptoren, der H158R Mutation und des CB1R wurden im ersten Schritt mittels PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Um die amplifizierten DNA-Abschnitte in den gewünschten Expressionsvektor zu klonieren, wurden die DNA mit Restriktionsenzymen (siehe Tabelle 1) geschnitten. Nach dem Restriktionsverdau wiesen die voneinander getrennten DNA-Stücke an ihren Enden 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen auf und konnten mittels DNA-Ligase (T4 DNA-Ligase) mit dem Vektor vereint werden. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels Transformation in kompetente *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5α eingebracht und auf Agarplatten ausgestrichen. Je nach im Vektor integrierter Resistenz wurde Ampicillin- oder Kanamycin-haltiger Agar gewählt, um die Klone, bei denen eine erfolgreiche Ligation stattgefunden hatte, zu isolieren. Zur Isolierung der Vektorplasmide aus den Bakterien wurde anschließend eine Midipräparation mittels Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 3). Anschließend wurde die DNA-Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung auf korrekte Basenabfolge kontrolliert.

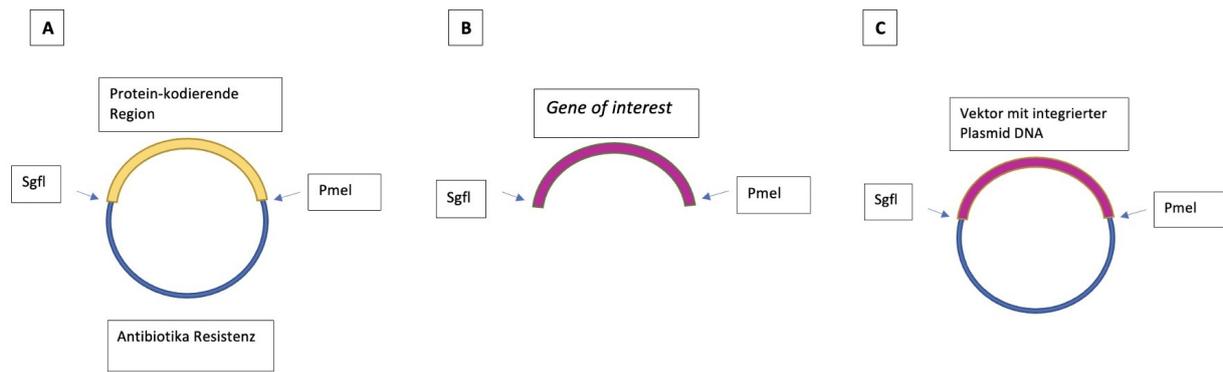


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung der Klonierung mit dem Flexi® Cloning System. 1. Der Vektor weist, neben weiteren hier nicht abgebildeten kodierenden Regionen, eine Stelle, die für eine Antibiotika-Resistenz kodiert, auf. In der Abbildung wird auch die Protein-kodierende Region, gelb markiert, dargestellt. Diese ermöglicht es, zusammen mit den Restriktionsenzymen, einen gewünschten Vektor einzufügen. 2. Gene of interest steht in diesem Fall für den MC4R, den CB1R, die chimären Rezeptoren und die H158R Mutation. 3. Vereinfachte Darstellung des fertig klonierten Produktes. (Eigene Abbildung)

## 2.2 HEK293 Kultivierung

Für die Zellkulturexperimente wurden HEK293 Zellen von ATCC eingesetzt. Bei den HEK 293 Zellen (*Human Embryonic Kidney Cells*) handelt es sich um künstlich transformierte Zellen, die von menschlichen embryonalen Nierenzellen abstammen. HEK-Zellen wachsen adhärent, lassen sich problemlos transfizieren und können gut in einem serumfreien Medium kultiviert werden. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Polystyrol beschichteten Zellkulturflaschen, welche in MEM Earle's-Medium (Biochrom, Berlin) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Für die NanoBRET™ Assays wurden die Zellen in 6-well Platten (4 x 10<sup>5</sup> HEK293 Zellen/well) gesät; für die *Donor Saturation Assays* wurden die Zellen in 12-well Platten (4 x 10<sup>5</sup> Zellen/well) gesät; für GloSensor™ wurden Zellen in weiße 96-well Platten (Corning, Costar, AZ, USA) (1,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/well) gesät; für die Luciferase Reporter-Gen-Assays wurden die Zellen in poly-L-Lysin beschichtete (0,1% in H<sub>2</sub>O in einer Verdünnung von 1:20) (Gibco, Waltham, MA, USA) durchsichtige 96-well Platten (Falcon, Kaiserslautern, Deutschland) (1,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/well) gesät.

## 2.3 Transfektion

Chimäre Rezeptoren, H158R Mutation und der CB1R wurden, unter Einsatz von Transfektionsreagenzien (0,45µl Metafectene™ oder 8µl FuGENE® HD), in HEK293 Zellen transfiziert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein transientes Transfektionssystem unter Zugabe von Metafectene™ (Biontex, München, Deutsch-

land) oder FuGene<sup>®</sup> HD (Promega, Mannheim, Deutschland) gewählt. Zellen der BRET Assays wurden 4 - 6 Stunden nach Aussaat mit 8µL FuGENE<sup>®</sup> HD und 1.4 µg DNA in Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA, USA) transfiziert. FuGENE<sup>®</sup> HD ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, das eine geringe Autofluoreszenz aufweist und sich daher für Assays, die auf Fluoreszenzfarbstoffen basieren, eignet. Die BRET Partner wurden in einer Ratio von 1:5 (NL:HT) unter Zugabe von 200ng Carrier DNA (pGEM3Z) transfiziert und die *wells* für 20 Stunden bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um die Protein-Expression zu ermöglichen. Bei den *Donor Saturation Assays* wurde eine konstante Donor-Konzentration (NL-Konstrukt) unter Einsatz von FuGENE<sup>®</sup> HD transfiziert, während die Akzeptor- Konzentration (HT-Konstrukt) schrittweise erhöht wurde. Das Grundschema der Donor-/ Akzeptor-Ratio ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Tabellarische Darstellung der Donor-/ Akzeptor-Ratio. (Eigene Tabelle)

	NL Donor (ng)	HT Akzeptor (ng)	A/D Ratio
<b>1</b>	10	1000	100
<b>2</b>	10	800	80
<b>3</b>	10	600	60
<b>4</b>	10	500	50
<b>5</b>	10	250	25
<b>6</b>	10	100	10
<b>7</b>	10	50	5
<b>8</b>	10	0	Nur Carrier DNA

Zellen für GloSensor<sup>™</sup> und Reporter-Gen-Assays wurden mit Metafectene<sup>™</sup> transfiziert. Für die GloSensor<sup>™</sup> Assays wurden HEK293 Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit 0,6 µL Metafectene<sup>™</sup> und 60 ng Plasmid DNA transfiziert. Zusätzlich wurde 60 ng pGloSensor<sup>™</sup>-22F cAMP-Plasmid hinzugefügt. HEK293 Zellen der Reporter-Gen-Assays wurden 24 Stunden nach Aussaat mit 0,45 µL Metafectene und 45 ng Plasmid DNA unter Zugabe von 45 ng Reporter DNA (pGL4.3(luc2P/NFAT/Hygro)) transfiziert.

## 2.4 Protein-Protein Interaktion via NanoBRET<sup>™</sup>

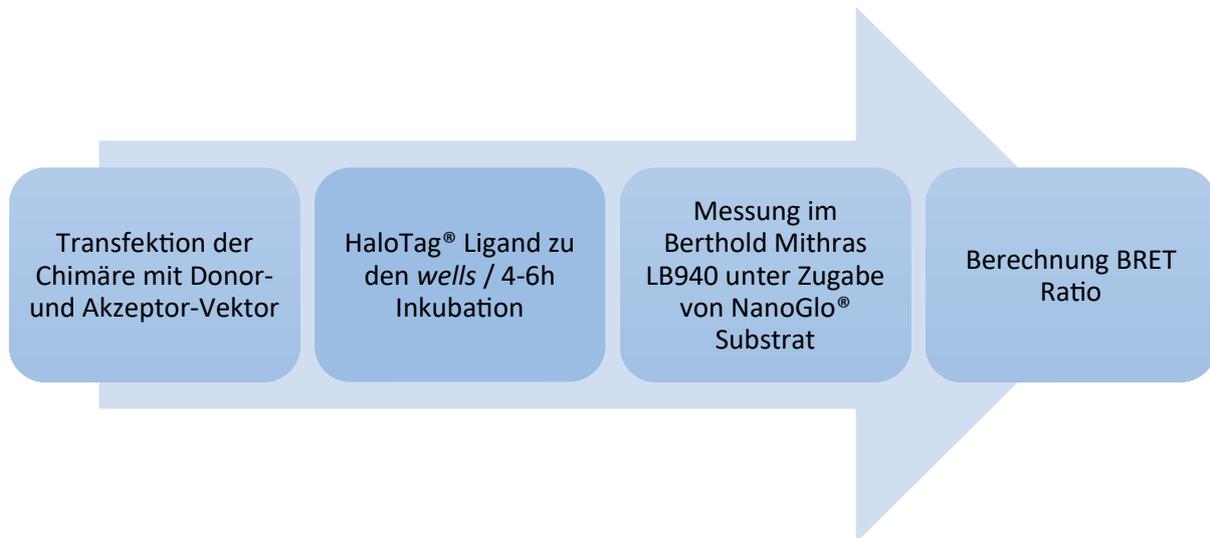


Abbildung 4 Schrittweiser Ablauf der NanoBRET™ Assays. (Eigene Abbildung)

NanoBRET™ (Promega, Mannheim, Deutschland) Assay basiert auf dem *Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assay* (BRET). Dieses Verfahren ermöglicht es in lebendigen Zellen Protein-Protein Interaktion darzustellen und ist daher eine geeignete Methode, um das Phänomen der Dimer-Bildung zweier oder mehrerer Rezeptoren zu untersuchen. Bei NanoBRET™ wird HT, ein mit Fluorophor markiertes Protein, als Akzeptor und NL, eine Luciferase, als Energie-Donor verwendet. Im Vergleich zu dem konventionellen BRET Assay, bei der eine Renilla-Luciferase verwendet wird, wird bei NanoBRET™ eine weite spektrale Trennung der Donor- und Akzeptor-Emission ermöglicht und dadurch die Assay-Sensitivität erhöht. Die Rezeptoren wurden mithilfe eines Flexi-Vektor-Systems kloniert und entweder C-terminal mit HT, oder C-terminal mit NL versehen. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die Zellen aus den wells gelöst und für 5 Minuten bei 130g, unter Bildung eines Pellets, zentrifugiert. Der Überschuss wurde abgesaugt und die Zellen in Opti-MEM ohne Phenolrot mit 4% FBS (Gibco, Mannheim, Deutschland) re-suspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem LUNA *Automated Cell Counter* gezählt, durch Zugabe von Opti-MEM ohne Phenolrot mit 4% FBS auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml gebracht und in zwei Pools geteilt. Die Zellen wurden im Anschluss in Triplikaten in neue 96-well Platten (100µl/well) umgesetzt und für 4 - 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Messung wurden 25µl/well NanoGlo® Substrat mithilfe des Berthold Mithras LB 940 (Bad Wildbad, Deutschland) injiziert (Abbildung 4). Die Donor- und Akzeptor-Emissionen wurden bei deren jeweiligen Emissionsspektrum gemessen. Die BRET Ratio wurde unter Einsatz folgender Formel berechnet:

$$BRET\ Ratio = \frac{Akzeptor\ Emission(618\ nm)}{Donor\ Emission(460\ nm)}$$

Die Ratio wurde unter Abzug der Hintergrundemission (keine Akzeptor-DMSO-Kontrolle) und Umwandlung in milliBRET units (mBU) angepasst.

$$BRET\ Ratio = (BRET\ Ratio_{sample} - BRET\ Ratio_{no\ acceptor\ control}) \times 100$$

Zur graphischen Darstellung wurde Delta BRET errechnet.

$$\Delta\ BRET = BRET\ Ratio_{Chimär\ Rezeptor} - BRET\ Ratio_{WT-MC4R}$$

## 2.5 Messung von cAMP via GloSensor™

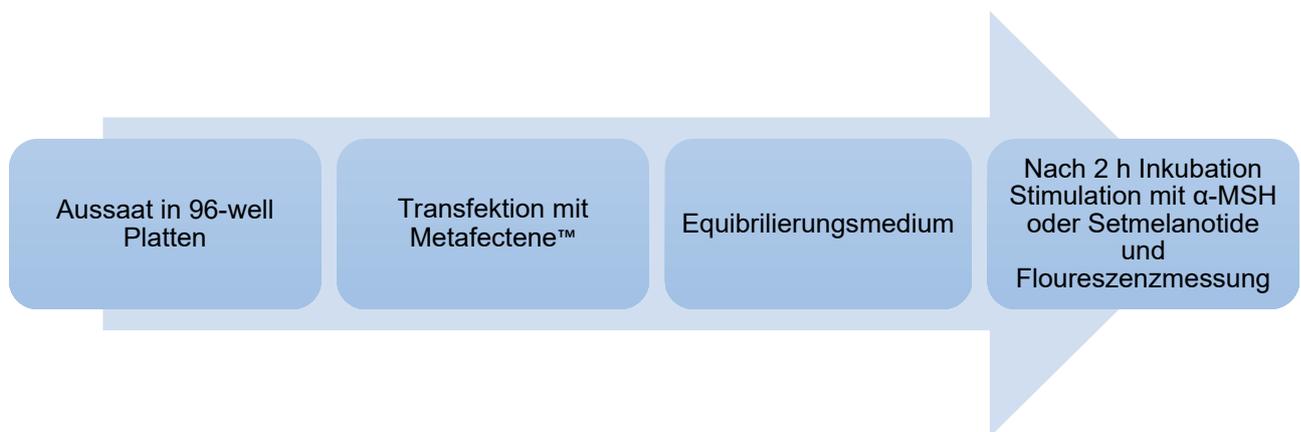


Abbildung 5 Schrittweiser Ablauf der GloSensor™ Assays. (Eigene Abbildung)

GloSensor™ Assay ermöglicht es einen cAMP-Anstieg live, in lebendigen Zellen, zu messen. Der Messwert lässt direkte Rückschlüsse auf die G<sub>s</sub>-gekoppelte GPCR-Aktivierung innerhalb der Zellen zu. Bindet ein Ligand an seinen GPCR, kann es innerhalb der Zelle zu einer Aktivierung des G<sub>s</sub> Signalwegs kommen, wodurch in der Zelle, über eine Aktivierung der Adenylatzyklase, cAMP ansteigt. GloSensor™ basiert auf einem genetisch modifizierten Biosensor F22, der eine cAMP-Bindungsstelle besitzt und an eine Luciferase gekoppelt ist. Bindet cAMP, kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Lichtemission triggert. Je höher die gemessene Lichtemission, desto mehr cAMP wird in der Zelle gebildet. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für zwei Stunden mit einem Equibrilierungsmedium inkubiert. Das Equibrilierungsmedium bestand aus 88% CO<sub>2</sub>-abhängigem Medium, 10% FKS und 2% GloSensor™ cAMP Reagenz. Nach abgelaufener Inkubation wurden zuerst die Basalwerte im Luminometer (Berthold Mithras LB 940) gemessen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1µM alpha-MSH oder 1µM Setmelanotide stimuliert. Die Negativkontrolle wurde nur mit pcDps behandelt und nicht stimuliert. Zur Positivkontrolle wurden einige Zellen mit 1µM Isoprote-

renol aus der Klasse der nicht-selektiven Betasympathomimetika stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte eine Serie von 21 weiteren Messungen in 2-minütigen Intervallen, bei denen der durch den Liganden ausgelöste cAMP-Anstieg gemessen wurde (Abbildung 5).

Für die GloSensor™ Experimente unter Einfluss von PTX wurden die Zellen 18 Stunden vor Stimulation mit 10µl Pertussistoxin (PTX) (50ng/ml) pro well inkubiert. Die gemessenen Werte wurden als relative Lichteinheit (RLU) ausgewertet. Die totale cAMP-Akkumulation wird als Fläche unter der Kurve (AUC) graphisch dargestellt.

## 2.6 PLC Aktivierung via Reportergene-Assay

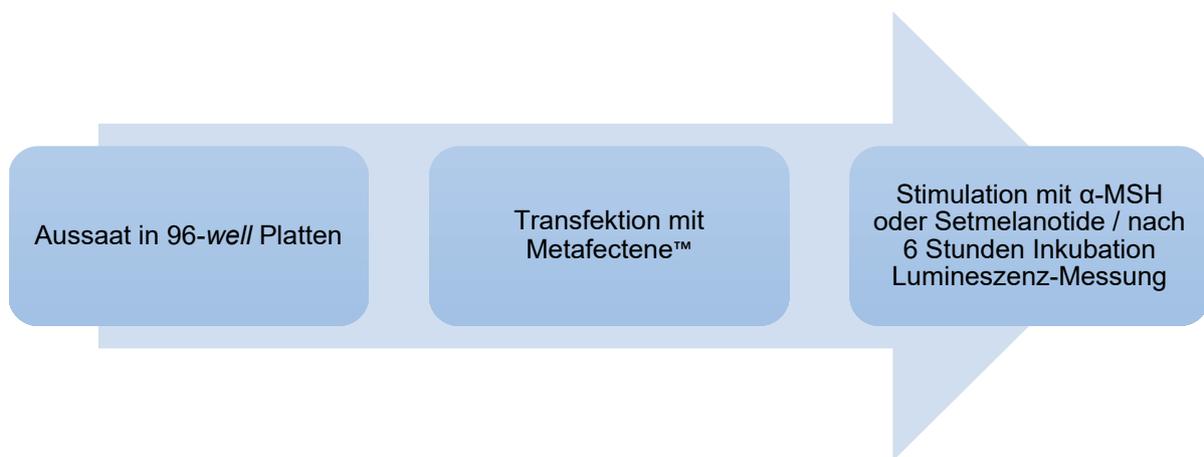


Abbildung 6 Schrittweiser Ablauf der Reportergene-Assays. (Eigene Abbildung)

Um PLC Aktivierung zu untersuchen, wurde eine Luciferase als Reportergen gewählt. Wird der  $G_{q/11}$  Signalweg eines Rezeptors aktiviert, kommt es innerhalb der Zelle zu einem  $Ca^{2+}$  Anstieg wodurch die Phosphatase Calcineurin aktiviert wird. NFAT wird dephosphoryliert und kann an seine Zielgene NFAT RE (*nuclear factor of activated T cell response element*) binden. Für die Reportergene-Assays in dieser Arbeit wurde ein NFAT-RE gebunden an eine Firefly Luciferase (NFAT-RE-luc) gewählt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in absteigender Konzentration ( $10^{-5}$  M bis  $10^{-10}$  M) mit alpha-MSH oder Setmelanotide stimuliert und für 6 Stunden bei  $37^{\circ}$  und 5%  $CO_2$  inkubiert. Die Zellen der NFAT-Experimente, bei denen der Effekt von PTX beobachtet werden sollte, wurden vor Stimulation mit einem Zusatz von 50ng/ml PTX für 18 Stunden inkubiert. Zur Charakterisierung der  $G_{q/11}$  Signalkaskade wurde die Stimulation mit alpha-MSH oder Setmelanotide nach 6 Stunden beendet und die Zellen mit 50µl Passive Lysis Buffer (PLB, Promega, Mannheim, Deutschland) lysiert. Im Anschluss wurden die Platten für mindestens 15 Minuten bei minus  $80^{\circ}C$  gefroren. Für die Mes-

sung wurde 10µL des Zelllysates auf weiße 96-well Platten übertragen und im Berthold Mithras LB 940 unter Zugabe von 40µL Firefly Luciferase Substrat (Promega, Mannheim, Deutschland) ausgewertet (Abbildung 6).

Der Signalisierungsbias wurde anhand folgender Formel, beschrieben von Kenakin (27), ausgewertet:

$$\Delta \log \left( \frac{E_{max}}{EC_{50}} \right) = \log \left( \frac{E_{max,A}}{EC_{50,A}} \right) - \log \left( \frac{E_{max,B}}{EC_{50,B}} \right)$$

A steht für die jeweiligen chimären Rezeptoren und B für den MC4R-WT, der als Referenz gewählt wurde.  $E_{max}$  wurde mittels Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt und beschreibt den Maximaleffekt.  $EC_{50}$  beschreibt die mittlere effektive Konzentration. Zur vereinfachten Darstellung wurde der Antilog des Bias berechnet.

$$bias = 10^{\Delta \log \left( \frac{E_{max}}{EC_{50}} \right)}$$

## 2.7 Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt und stammen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Tests und die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) wurden mittels GraphPad Prism 9.3.1 unternommen. Zur graphischen Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurven wurde die nichtlineare Regression gewählt. Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test oder dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Ein p-Wert  $<0.05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, den Effekt, den eine MC4R Oligomerisierung auf dessen Signalisierungseigenschaften hat, in einem menschlichen Zellsystem, den HEK293 Zellen, zu untersuchen. Die dafür eingesetzten chimären Rezeptoren werden in Abbildung 2 dargestellt.

#### 3.1 Homodimerisierung von chimären MC4R, dem CB1R und der MC4R -H158R Mutation ist verglichen mit dem MC4R-WT eingeschränkt.

Im ersten Schritt wurde eine Negativkontrolle etabliert. Dafür wurde das Heterodimerisierungsverhalten des MC4R-WT mit dem CB1R getestet. Die BRET Paare wurden in zwei möglichen Konstellationen untersucht. Sowohl die Interaktion zwischen MC4R, markiert mit NL, und CB1R, markiert mit HT, als auch die umgekehrte Zusammenstellung, CB1R mit NL und MC4R, fusioniert mit HT, wurde untersucht. Zusätzlich wurde auch das Homodimerisierungsverhalten der jeweiligen Rezeptoren mit sich selbst getestet. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Interaktion zwischen dem MC4R-WT und dem CB1R signifikant niedriger war, als die Dimer-Bildung des MC4R-WT mit sich selbst. Vergleicht man die Ergebnisse der Menge an formierten Homodimer-Paaren (MC4R-WT + MC4R-WT vs. CB1R + CB1R) sieht man, dass die Menge an gebildeten CB1R Homodimeren, im Vergleich zu der Menge an MC4R-WT Homodimeren, signifikant kleiner ist (Abbildung 7A). NanoBRET™ Assays wurden daher auch im weiteren Verlauf zur Untersuchung der Dimerisierung der MC4R/CB1R chimären Rezeptoren und der MC4R-WT H158R Mutation durchgeführt.

Unter den chimären MC4R/CB1R Rezeptoren zeigte Chim 1 keine signifikant eingeschränkte Tendenz Homodimere zu bilden, verglichen mit dem MC4R-WT. Chim 2 und Chim 3 wiesen sogar eine stärkere Tendenz zur Rezeptor-Rezeptor Interaktion auf als der MC4R-WT. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Erkenntnis früherer Experimente in COS-7 Zellen, in denen für diese chimären Rezeptoren eine reduzierte Oberflächenexpression festgestellt wurde, wurden Chimäre 1, 2 und 3 von weiteren Experimenten exkludiert (24). Alle anderen Chimären, darunter Chim 4, Chim 5 und Chim 7 als auch die H158R Mutation, zeigten eine, im Vergleich zum MC4R-WT, signifikant eingeschränkte Homodimerisierung. Für Chim 5 und Chim 7 wurde die stärkste Dimer-Suppression, in

anderen Worten, Unterdrückung der Homodimerformierung, verzeichnet (Abbildung 7B). Diese Resultate decken sich mit Ergebnissen der ELISA Experimente, die in COS-7 Zellen durchgeführt wurden (24).

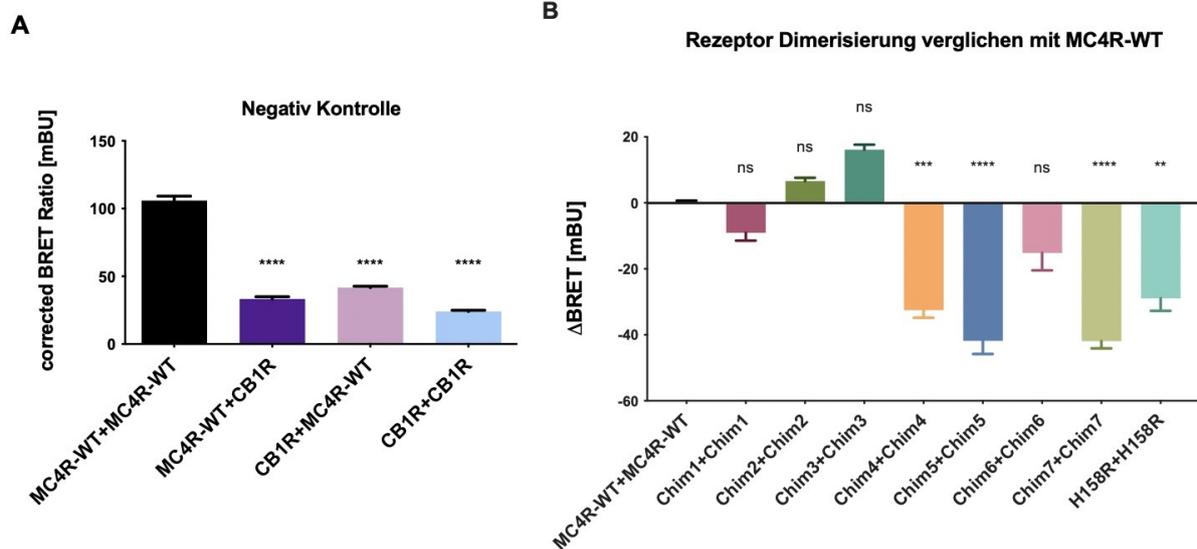


Abbildung 7 Rezeptor-Dimerisierung von MC4R Chimären im Vergleich zu MC4R-WT. Die Rezeptor-Rezeptor Interaktion der chimären Rezeptoren und der H158R Mutation wurde mittels NanoBRET™ untersucht. HEK293 Zellen wurden mit beiden BRET Partnern, entweder C-terminal mit dem Energie-Donor NL oder mit dem Protein Tag HT, welcher den Energieakzeptor NanoBRET™ Ligand 618 binden kann, fusioniert. (A) Die Negativkontrolle mit CB1R. Daten sind als BRET Ratio in milliBRET units (mBU) angegeben. (B) ΔBRET wird berechnet aus der Differenz der BRET Ratios der Chimäre und MC4R-WT. Negative Werte deuten auf eine, verglichen mit dem MC4R-WT, reduzierte Rezeptor-Dimerisierung hin. Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente, durchgeführt in Triplikaten. Werte sind als Mittelwert ± SEM der BRET Ratios dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, der Durchschnitt der WT-Säule wurde mit dem Durchschnitt der anderen Säulen verglichen. Statistische Signifikanz ist definiert als \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al (25).

### 3.2. Donor Saturation Assays

*Donor Saturation Assays* (DSA) werden durchgeführt, um auf eine spezifische Interaktion zwischen Interaktionspartnern zu testen. *Donor Saturation Assays* wurden exemplarisch für MC4R-WT, Chim 7 und die H158R durchgeführt. Eine lineare Grafik deutet auf eine unspezifische Interaktion hin. Ein eher hyperbolisches Verhalten der Grafik ist bezeichnend für eine spezifische Interaktion. Der CB1R diente in jedem Fall als Negativkontrolle. Sowohl für den WT (Abbildung 8A) als auch Chim 7 (Abbildung 8B) und die H158R Mutation (Abbildung 8C) konnte eine spezifische Interaktion nachgewiesen werden.

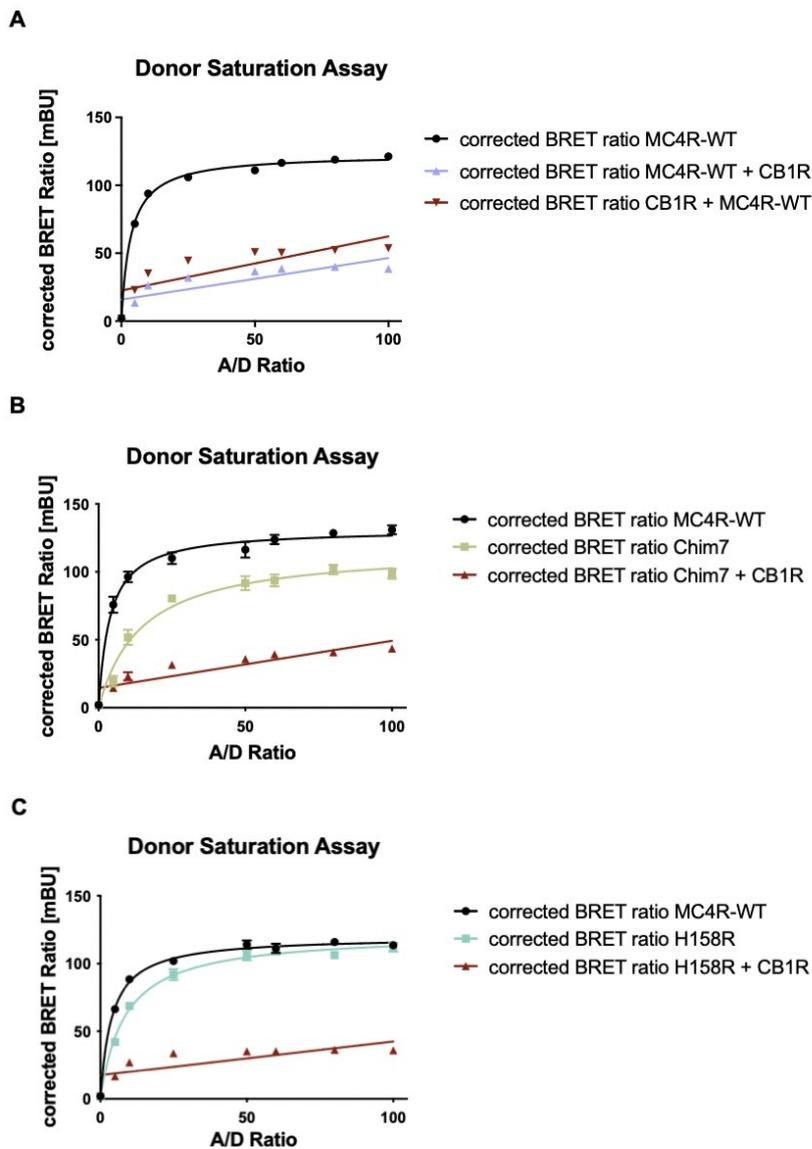


Abbildung 8 Donor Saturation Assay (DSA) zur Überprüfung von Spezifität der Rezeptor-Rezeptor Interaktion. HEK293 Zellen wurden mit einer ansteigenden Menge an Akzeptor transfiziert, der Donor-Anteil wurde bei jeder Transfektion gleich gehalten. Die Interaktion zwischen zwei Rezeptoren gilt als spezifisch, wenn ein Sättigungsgrad ( $B_{max}$ ) erreicht werden kann. Dieses Verhalten stellt sich graphisch mittels einer hyperbolischen Kurve dar; bei einer unspezifischen Interaktion wäre eine lineare zu erwarten. (A) Die Bildung von MC4R-WT Homodimeren stellt eine spezifische Rezeptor-Rezeptor Interaktion dar, dies ist graphisch anhand der schwarzen Kurve zu erkennen. Die negativen Kontrollen weisen einen linearen Anstieg auf. (B) Die Homodimerisierung von Chim 7 ist hier neben der MC4R-WT Homodimerisierung dargestellt. Die Interaktion von Chim 7 NL mit CB1R HT diente als Negativkontrolle. Chim 7 weist eine spezifische Homodimerisierung auf. (C) Homodimerisierung von MC4R H158R wurde neben einer Positiv- und einer Negativ- Kontrolle dargestellt. Die H158R Mutation weist spezifische Homodimer-Bildung auf. Grafiken bilden Daten aus drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten, ab. Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM. (Eigene Abbildung)

### 3.3 Auswirkung der Dimerisierung auf die cAMP-Bildung

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die chimären Rezeptoren höhere basale cAMP Werte aufweisen, als der MC4R-WT. Auch nach NDP-alpha-MSH (ein nicht selektiver MCR-Agonist (28, 29)), zeigten die chimären Rezeptoren höhere cAMP

Werte als der MC4R-WT nach NDP-alpha-MSH Stimulation (24). Diese Daten beziehen sich auf Akkumulations-Assays, die in COS-7 Zellen durchgeführt wurden. In dieser Studie wurden die Ergebnisse mittels GloSensor™ in HEK293 Zellen für Chim 5, Chim 6 und Chim 7 repliziert. GloSensor™ Assay erlaubt eine dynamische Messung des cAMP-Anstiegs in lebendigen Zellen. Um die neuen Daten mit den Ergebnissen der vorherigen Studie in COS-7 Zellen vergleichen zu können, wurde für die Stimulation mit alpha-MSH und Setmelanotide eine Konzentration von 1µM gewählt. Chim 5, Chim 6 und Chim 7 zeigten nach alpha-MSH Stimulation höhere cAMP-Werte als der MC4R-WT (Abbildung 9A). Mittels One-way ANOVA mit Kruskal-Wallis Test wurde die Fläche unter der Kurve von Chim 5/ Chim 6/ Chim 7, stimuliert sowohl mit alpha-MSH als auch mit Setmelanotide, berechnet und jeweils mit der Fläche unter der Kurve von MC4R-WT statistisch verglichen.

Diese Ergebnisse waren nicht signifikant (Abbildung 9 B/C). Die Experimente wurden in vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten durchgeführt. Wie für alpha-MSH zeigten die Chim 5, Chim 6 und Chim 7 auch nach Setmelanotide Stimulation leicht erhöhte cAMP-Werte – im Vergleich zum MC4R-WT (Abbildung 6D). Chim 5, Chim 6 und Chim 7 wiesen nicht signifikant erhöhte Basalwerte im Vergleich zum MC4R-WT auf (Abbildung 9E).

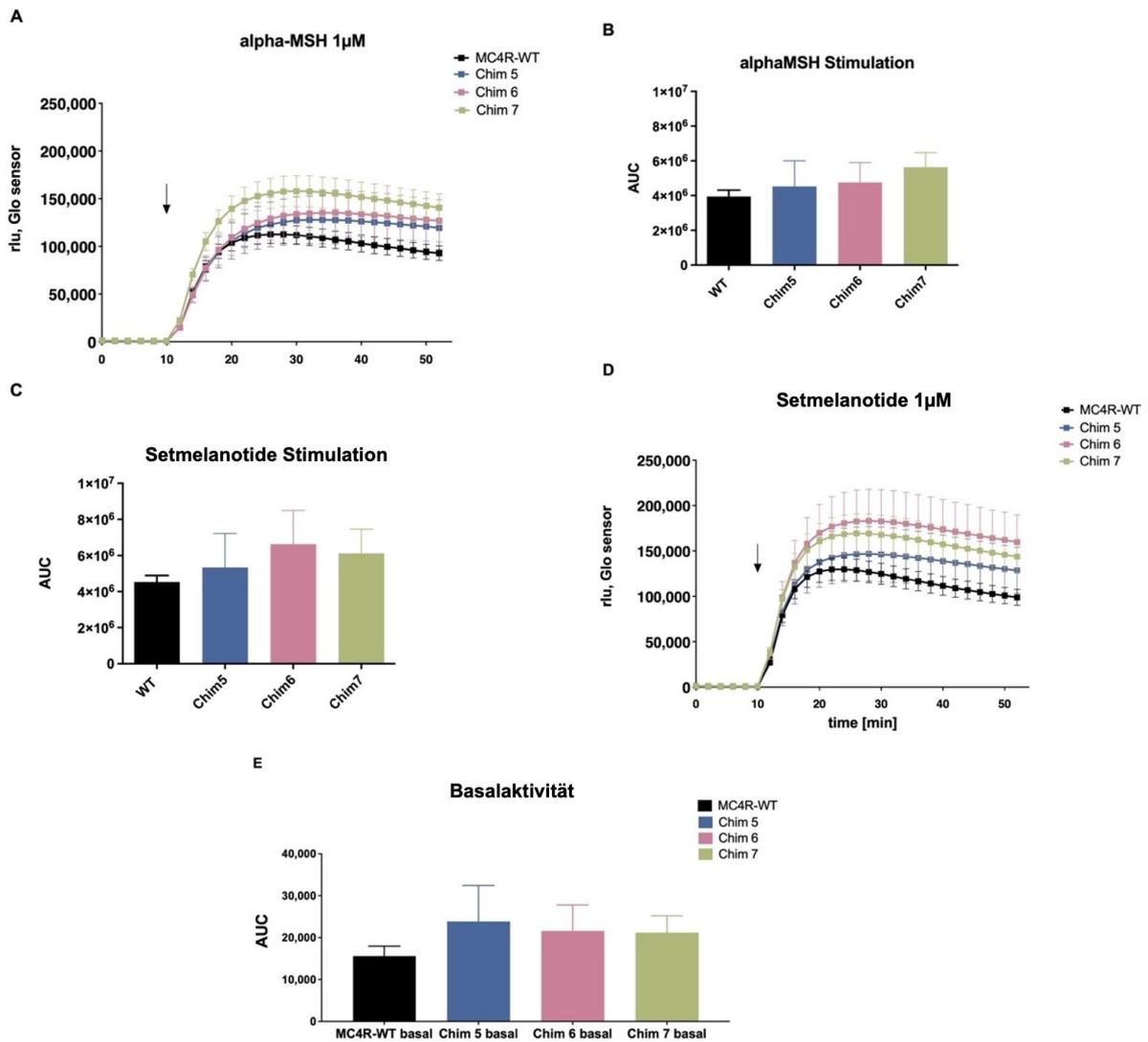


Abbildung 9  $G_s$  Signalisierung von MC4R-WT und chimären Rezeptoren nach alpha-MSH oder Setmelanotide Stimulation. HEK293 Zellen wurden mit WT oder chimären Rezeptoren und GloSensor<sup>TM</sup> Reporter transfiziert; die Zellen wurden mit (A/B) alpha-MSH (1 $\mu$ M) oder (C/D) Setmelanotide (1 $\mu$ M) stimuliert und deren cAMP-Anstieg gemessen. Der Pfeil deutet den Start der liganden-induzierten Stimulation an. In Abbildung B und C sind die Flächen unter der Kurve graphisch dargestellt. Die Akkumulation von cAMP wurde über die Zeit gemessen und in relativen light units (rlu) quantifiziert. (C) Chimäre Rezeptoren weisen eine höhere basale  $G_s$  Aktivität im Vergleich zu MC4R-WT auf. Die Grafik zeigt die Fläche unter der Kurve (AUC) der Lumineszenz-Werte aus den lebend Zell-cAMP-Messungen. Zur statistischen Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Kruskal Wallis Test durchgeführt. Verglichen wurde die Fläche unter der Kurve von MC4R-WT mit der Fläche unter der Kurve der chimären Rezeptoren nach alpha-MSH oder Setmelanotide Stimulation. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM. Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al. (25).

### 3.4 Effekt der reduzierten Homodimerisierung auf $G_{q/11}$ Signalisierung

3.4.1 Chimäre Rezeptoren weisen eine ähnliche Basalaktivität, eine erhöhte  $E_{max}$  als auch eine erniedrigte  $EC_{50}$  – verglichen mit dem MC4R-WT – auf.

Im nächsten Schritt wurden alle chimären Rezeptoren und die H158R Mutation mittels Reportergergen-Assays auf ihre  $G_{q/11}$  Signalisierungseigenschaften getestet. Dabei wurde die Phospholipase C (PLC) Aktivität anhand einer Messung des *nuclear factor of activa-*

*ted T-cell (NFAT) responsive element* ermittelt (Abbildung 10). Alle Chimäre wiesen eine, verglichen zum MC4R-WT, ähnliche Basalaktivität auf. Die chimären Rezeptoren Chim 4, Chim 5, Chim 6 und Chim 7 wiesen, im Vergleich zum MC4R-WT, eine signifikant erhöhte PLC Aktivierung (durch  $G_{q/11}$ ) nach alpha-MSH Stimulation ( $1\mu\text{M}$ ) auf. Auch die H158R Mutation zeigte einen höheren Maximaleffekt ( $E_{\text{max}}$ ) als der MC4R-WT nach alpha-MSH Stimulation ( $1\mu\text{M}$ ). Die Stimulation mit Setmelanotide bewirkte nur für Chim 7 eine signifikante Steigerung der  $E_{\text{max}}$  (Abbildung 10A). Tabelle 3 bildet eine Übersicht der Ergebnisse aus den Reporteragen-Assays nach Stimulation mit alpha-MSH oder Setmelanotide ab. Die Werte stammen aus den Konzentrations-Wirkungskurven (Abbildung 10B-E). Eine Inhibition der Rezeptor-Homodimerisierung hatte deutliche Auswirkungen auf die  $EC_{50}$ . Interessanterweise präsentierten sich die  $EC_{50}$  Werte von Chim 6 ( $5.58 \pm 1.29 \text{ nM}$ ) und von Chim 7 ( $6.33 \pm 1.1 \text{ nM}$ ) nach alpha-MSH Stimulation ähnlich wie die  $EC_{50}$  von MC4R-WT ( $4.04 \pm 0.5 \text{ nM}$ ) nach einer Stimulation mit Setmelanotide ( $4.04 \pm 0.5 \text{ nM}$ ). Generell zeigten alle chimären Rezeptoren, als auch die H158R Mutation niedrigere  $EC_{50}$  Werte, verglichen mit dem jeweiligen  $EC_{50}$  Wert des MC4R-WT. Dies trifft sowohl auf die Stimulation mit alpha-MSH als auch auf die Stimulation mit Setmelanotide zu. Signifikant niedrigere  $EC_{50}$  Werte (d.h. eine verbesserte Signalisierung) zeigten sich für Chim 4, Chim 6 und Chim 7 nach alpha-MSH Stimulation und für Chim 4 und Chim 7 nach Setmelanotide Stimulation (Abbildung 10A/B). Diese Aussage ergibt sich durch den Vergleich der chimären Rezeptoren mit den jeweiligen MC4R-WT  $EC_{50}$  Daten. Um weitere Effekte, die eine Homodimer-Inhibition auf die Rezeptor  $G_{q/11}$  Aktivierung haben kann, zu ermitteln, wurde der Signalisierungsbias berechnet. Besonders nach alpha-MSH Stimulation zeigten die chimären Rezeptoren und die H158R Mutation einen starken Bias in Richtung PLC Aktivierung. Dieser Trend zeigte sich auch nach einer Stimulation mit Setmelanotide (Tabelle 3).

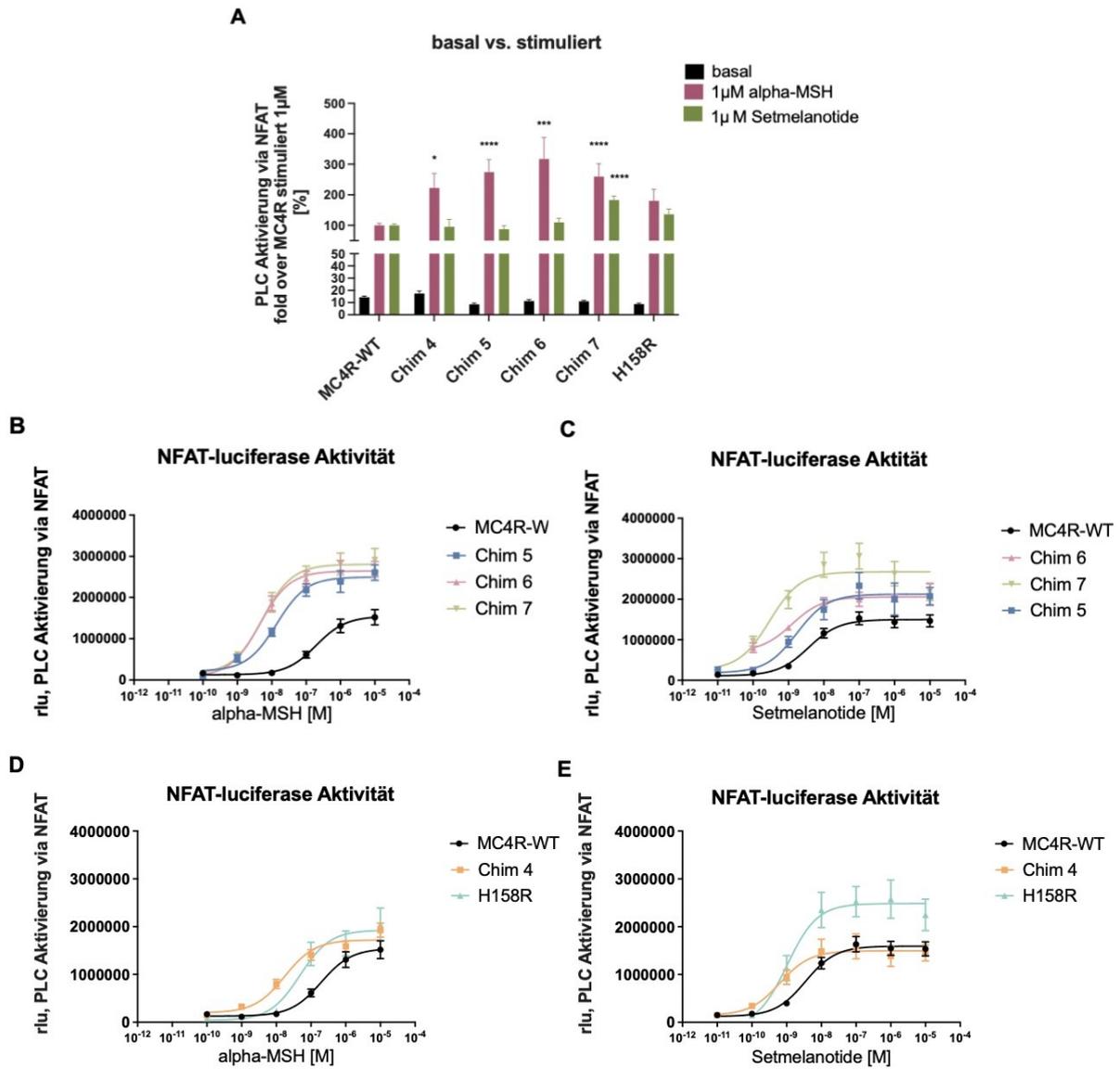


Abbildung 10  $G_{q/11}$  Signalisierung der chimären Rezeptoren und der H158R Mutation im Vergleich zu MC4R-WT. NFAT Reporter-Gen-Assays,  $G_{q/11}$  Signalisierung quantifiziert in relativen Licht-Einheiten (rlu). HEK293 Zellen wurden mit MC4R-WT, chimären Rezeptoren oder der H158R Mutation transfiziert. (A) Basalaktivität und  $1\mu\text{M}$  stimulierte Werte der chimären Rezeptoren und der H158R Mutation im Vergleich zu dem MC4R-WT. Die Basalaktivität der chimären Rezeptoren ist der Basalaktivität von MC4R-WT ähnlich. Chim 4, Chim 5, Chim 6 und Chim 7 weisen einen signifikanten alpha-MSH induzierten Anstieg der  $G_{q/11}$  Aktivierung, verglichen mit dem alpha-MSH stimulierten MC4R-WT, auf. Werte sind als fold over des mit  $1\mu\text{M}$  stimuliertem MC4R-WT dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Hierbei wurde der MC4R-WT mit den chimären Rezeptoren und der H158R Mutation verglichen. Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM. Statistische Signifikanz ist angegeben als \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Für die Konzentrations-Wirkungskurven wurden Chim 5, Chim 6 und Chim 7 mit absteigenden Konzentrationen von (B) alpha-MSH oder (C) Setmelanotide stimuliert. Konzentrations-Wirkungskurven von Chim 4 und H158R Mutation stimuliert mit absteigenden Konzentrationen von (D) alpha-MSH oder (E) Setmelanotide. Daten sind als raw data rlu angegeben. Werte ergeben sich aus WT (alpha-MSH  $n=10$ , Setmelanotide  $n=17$ ), H158R ( $n=4$ ), Chim 4 (alpha-MSH  $n=5$ , Setmelanotide  $n=7$ ), Chim 5 ( $n=4$ ), Chim 6 (alpha-MSH  $n=4$ , Setmelanotide  $n=3$ ), Chim 7 (alpha-MSH  $n=9$ , Setmelanotide  $n=10$ ). Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM.  $E_{\text{max}}$  und  $EC_{50}$  Werte sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al. (25).

*Tabelle 3 Wirksamkeit unter Maximalstimulation ( $E_{max}$ ), mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ), Bias (Formel siehe Methoden 2.6) und relative Dimerisierung. Ein Vergleich von MC4R-WT, chimären Rezeptoren und der H158R Mutation. Mittels Konzentrations-Wirkungskurven wurde die  $EC_{50}$  nach alpha-MSH oder Setmelanotide Stimulation bestimmt. Daten stammen aus vier bis neun unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM. Zur statistischen Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, bei der die  $E_{max}$  von MC4R-WT mit chimären Rezeptoren oder die  $EC_{50}$  von MC4R-WT mit den chimären Rezeptoren verglichen wurde. Statistische Signifikanz ist angegeben als a\*  $p < 0.05$ , b\*\*  $p > 0.01$ , c\*\*\*  $p < 0.001$ , d\*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Der MC4R-WT diente als Referenz zur Berechnung des Bias und wurde als Wert 1 festgelegt. Der Bias (Chimäre versus MC4R) ist nach alpha-MSH Stimulation stärker als nach Setmelanotide Stimulation. Die Werte leiten sich aus den  $EC_{50}$  und  $E_{max}$  Werten ab, die aus den Konzentrations-Wirkungskurven stammen. Daten der relativen Dimerisierung im Vergleich zum MC4R-WT stammen aus NanoBRET™ (Abbildung 4) Daten. Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al. (25).*

MC4R-WT/ MC4R/CB1R chimera	alpha-MSH			Setmelanotide			NanoBRET™
	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M [fold over MC4R-WT stimulated 1 $\mu$ M]	$EC_{50}$ [nM]	Bias	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M [fold over MC4R-WT stimulated 1 $\mu$ M]	$EC_{50}$ [nM]	Bias	relative dimerization compared to WT
MC4R-WT	100	264 $\pm$ 65.9	1	100	4.04 $\pm$ 0.5	1	0
Chim 4	222.32 $\pm$ 47.50 a	14.7 $\pm$ 6.69 a	39.89	115.16 $\pm$ 15.10	0.71 $\pm$ 0.17 c	3.05	-32,55
Chim 5	274.42 $\pm$ 41.18 d	16.4 $\pm$ 6.06	44.22	87.31 $\pm$ 11.58	1.46 $\pm$ 0.38	6.58	-41,83
Chim 6	317.48 $\pm$ 70.5 c	5.85 $\pm$ 1.29 b	<b>143.14</b>	109.76 $\pm$ 13.20	1.25 $\pm$ 0.11	2.41	-15,19
Chim 7	259.59 $\pm$ 42.18 d	<b>6.33 <math>\pm</math> 1.1 c</b>	<b>108.13</b>	182.83 $\pm$ 13.18 d	0.43 $\pm$ 0.12 d	17.32	-41,19
H158R	180.32 $\pm$ 37.67	49.2 $\pm$ 11.2	9.67	135.93 $\pm$ 17.16	1.8 $\pm$ 0.68	3.05	-28,94

### 3.4.2 Reportergeren-Assays nach Behandlung mit Pertussistoxin (PTX) zur Unterscheidung von $G_{q/11}$ und $G_{i\beta\gamma}$ Aktivierung

Eine Aktivierung von PLC kann sowohl durch  $G_{\alpha_q}$  Rekrutierung als auch die Aktivierung der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von  $G_{i/0}$  entstehen und bedeutet daher nicht automatisch eine reine  $G_{q/11}$  Aktivierung (30). Um herauszufinden, ob die Ergebnisse, die auf eine erhöhte PLC Aktivierung in chimären Rezeptoren hinweisen, tatsächlich vollständig auf eine  $G_{q/11}$  Aktivierung zurückzuführen sind, wurden zusätzliche NFAT Experimente mit dem MC4R-WT und Chim 7 durchgeführt. Die Zellen wurden mit Pertussistoxin (PTX), einem  $G_{i/0}$  Inhibitor, vorbehandelt. Bei Anwesenheit von PTX werden die  $G_{i/0}$  Untereinheiten in einem inaktiven Zustand gehalten, wodurch dieser Signalweg blockiert wird (31). Zwischen dem Maximizeffekt ( $E_{max}$ ) von MC4R-WT nach alpha-MSH Stimulation und dem MC4R-WT + PTX nach alpha-MSH Stimulation gab es keinen großen Unterschied. Für Chim 7 + PTX zeigte sich eine signifikante Abnahme der  $E_{max}$  verglichen mit dem unbe-

handelten Chim 7. Der mit PTX behandelte Chim 7 Rezeptor zeigte signifikant erniedrigte  $EC_{50}$  Werte im Vergleich zu dem unbehandelten Chim 7. Diese Tendenz konnte für den MC4R-WT + PTX nicht gezeigt werden (Abbildung 11A, Tabelle 4). Nach der Stimulation mit Setmelanotide war die  $EC_{50}$  nur für den mit PTX behandelten MC4R-WT versus MC4R-WT ohne PTX signifikant erniedrigt. Dies war für Chim 7+ PTX versus Chim 7 ohne PTX nicht der Fall. Bezüglich des Maximaleffektes ( $E_{max}$ ) wiesen sowohl der MC4R-WT, als auch Chim 7 erniedrigte  $E_{max}$  Werte, bezogen auf die  $G_{q/11}$  Aktivierung im Fall einer  $G_{i/0}$  Blockierung durch PTX, auf (Abbildung 11B, Tabelle 4). Mit einem Fokus auf die alpha-MSH Stimulation, die sich einer Stimulation mit dem natürlich *in vivo* vorkommenden, endogenen MC4R-Ligand anzunähern versucht, scheint die Behandlung mit PTX einen stärkeren Effekt auf den Maximaleffekt ( $E_{max}$ ) zu haben als auf die  $EC_{50}$ . Die Blockade von  $G_{i/0}$  Untereinheiten führte zu einer signifikanten Verschiebung in Richtung niedriger  $EC_{50}$  Werte für Chim 7 nach alpha-MSH Stimulation, was auf eine erhöhte  $G_{q/11}$  Aktivierung im Chim 7 Rezeptor hindeutet.

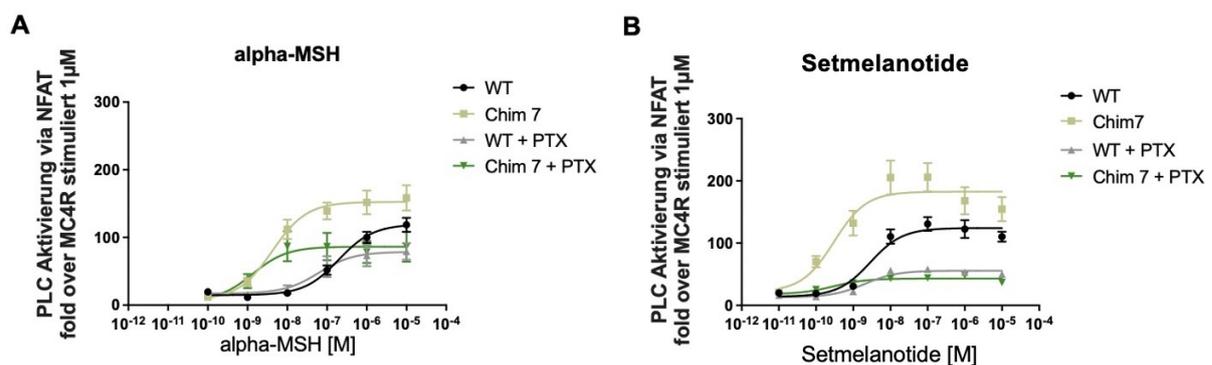


Abbildung 11 Reporter-Gen-Assays unter Zugabe von PTX von MC4R-WT und Chim7. Calcium Mobilisierung wurde mittels NFAT-Reporter-Gen-Assay gemessen. HEK293 Zellen wurden teilweise mit PTX behandelt und teilweise nicht mit PTX behandelt, um zu ermitteln, ob der gemessene  $Ca^{2+}$  Anstieg alleine auf eine  $G_{q/11}$  Aktivierung zurückzuführen ist. Die Daten sind als Prozent von MC4R-WT Signalisierung angegeben. Zellen wurden mit (A) alpha-MSH (fold over MC4R-WT mit 1µM als 100% gesetzt) oder mit (B) Setmelanotide (fold over MC4R-WT mit 1µM als 100% gesetzt).  $E_{max}$  und  $EC_{50}$  Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Daten stammen aus zwei bis neun unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM. Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al. (25).

*Tabelle 4*  $E_{max}$  und  $EC_{50}$  von mit Liganden stimulierten MC4R-WT und Chim 7 mit/ohne PTX Behandlung.  $EC_{50}$  nach alpha-MSH oder Setmelanotide Stimulation wurde mittels Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt. Daten stammen aus zwei bis neun unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM. Statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney Test durchgeführt, wobei  $E_{max}$  von MC4R-WT oder Chim 7 mit den jeweiligen WT + PTX oder Chim 7 + PTX verglichen wurden. Die selbe Analyse wurde auch für die  $EC_{50}$  Ergebnisse durchgeführt. Statistische Signifikanz ist angegeben als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al. (25).

MC4R-WT/Chim7	alpha-MSH		Setmelanotide	
	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M [fold over MC4R-WT stimulated 1 $\mu$ M]	$EC_{50}$ [nM]	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M [fold over MC4R-WT stimulated 1 $\mu$ M]	$EC_{50}$ [nM]
MC4R-WT	100	264 $\pm$ 65.9	100	4.04 $\pm$ 0.5
MC4R-WT + PTX	96.98 $\pm$ 14.22	396 $\pm$ 313	70.26 $\pm$ 9.13 **	1.91 $\pm$ 0.36 *
Chim 7	259.59 $\pm$ 42.18	6.33 $\pm$ 1.1	182.83 $\pm$ 13.18	0.43 $\pm$ 0.12
Chim 7 + PTX	100.26 $\pm$ 13.8**	1.8 $\pm$ 0.51*	67.17 $\pm$ 12.40 ****	0.45 $\pm$ 0.08

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss, den die MC4R Dimer-Bildung auf die  $G_{q/11}$  Signalisierung hat, zu untersuchen. Für diesen Zweck wurden chimäre Rezeptoren, die Austauschstellen mit dem CB1R besitzen, untersucht. Der CB1R stellt insofern eine gute Wahl dar, da er dem MC4R strukturell ähnelt, aber keine starke Interaktion mit dem Rezeptor aufweist (22, 23). Die Experimente wurden in HEK293 Zellen durchgeführt. Diese sind in der GPCR-Forschung bereits etabliert und weisen weitere Vorteile auf, die unter 4.5 ausführlich erläutert werden. Eine bereits veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass eine MC4R Dimer-Separierung eine positive Auswirkung auf die  $G_s$  Signalisierungseigenschaften hat (24). Aktuelle Studienergebnisse deuten darauf hin, dass vor allem der  $G_{q/11}$  Signalweg eine wichtige Rolle für die gewichtsmodulierende Funktion des MC4R spielt (18, 19). In Anbetracht dieser Erkenntnisse wurde die Arbeitshypothese dieser Arbeit formuliert. Mit dem neu zur Verfügung stehenden Ligand Setmelanotide, der teilweise schon klinisch etabliert ist (32), war es außerdem spannend, diesen im direkten Vergleich mit alpha-MSH an den Chimären zu testen und die Effekte zu analysieren.

### 4.1 Dimer-Separierung und $G_s$ Signalisierung

Es ist schon länger bekannt, dass der MC4R eine wichtige Rolle für unsere Energiehomöostase und damit für die Gewichtsregulation spielt. Auch die Eigenschaft des MC4R bei Aktivierung unterschiedliche Signalkaskaden in Gang zu setzen, wurde mittlerweile erforscht und experimentell gezeigt (17). Aufgrund seiner Rolle in der Appetitregulation wird, in der Hoffnung ein Medikament gegen Übergewicht zu entwickeln, schon lange eine Möglichkeit gesucht, gezielt Einfluss auf den MC4R zu nehmen. Unterschiedlichste Versuche ein solches Medikament zu etablieren, scheiterten aber bislang (33). Die Tatsache, dass der MC4R ein sehr komplexes Wirkspektrum aufweist, macht deutlich, warum es wichtig ist, den MC4R eingehend auf einer pharmakologischen Ebene zu untersuchen. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass MC4R Dimer-Separierung einen positiven Effekt auf dessen  $G_s$  Signalisierung hat (24). Die für die damalige Studie erstellten Chimäre wurden auch in der aktuellen Studie verwendet. Die Chimäre wurden mit dem Verdacht erstellt, dass die intrazellulären Regionen THM3-ICL3-TMH4 eine wichtige Rolle für die Dimer-Bindung spielen (34-36). Die unterschiedlichen Chimäre

weisen einzelne oder mehrere Substitutionen mit dem CB1R in diesen Regionen auf. Da in der Studie Piechowski *et al.* Experimentell eine Dimer-Separierung der Chimäre nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass die gewählten Substitutionspunkte eine wichtige Rolle für die Dimer-Separierung spielen. Laut der Studie führt eine Dimer-Separierung zu einer gesteigerten basal- als auch zu einer gesteigerten Liganden-stimulierten  $G_s$  Signalisierung im MC4R (24). Diese Ergebnisse konnten in der aktuellen Studie in HEK293 Zellen mittels GloSensor™ repliziert werden.

## 4.2 Setmelanotide und die Bedeutung der $G_{q/11}$ Signalisierung im MC4R

Ein spannender Durchbruch in der gezielten Adipositas-Forschung konnte für Patienten mit *POMC* oder Leptinrezeptor Mutationen erreicht werden. Mit Setmelanotide wurde im November 2020 ein Medikament von der FDA U.S. zugelassen, mit welchem einige dieser Patienten, in einem Studiensetting, eine beträchtliche Gewichtsreduktion erreichen konnten (19, 32). Setmelanotide ist das erste Medikament unter den synthetischen MC4R Agonisten, welches seine gewünschte Wirkung ohne die bisher für diese Gruppe bekannten Nebenwirkungen, wie zum Beispiel der Induktion eines erhöhten Blutdrucks, entfalten kann. Interessanterweise weist Setmelanotide einen starken Bias in Richtung einer  $G_{q/11}$  Aktivierung auf (19). In der Zusammenschau stärken diese Erkenntnisse die Theorie, dass die Signalisierung über  $G_{q/11}$  eine wichtige Rolle für die Gewichtsregulation spielt. Ergebnisse, der für die aktuelle Arbeit durchgeführten Experimente, konnten zeigen, dass eine MC4R Dimer-Separation zu einer gesteigerten  $G_{q/11}$  Signalisierung führt. Chim 6 und Chim 7 zeigten, im Vergleich zum MC4R-WT, eine starke Verringerung der  $EC_{50}$  Werte, was in anderen Worten eine bessere  $G_{q/11}$  Signalisierung für Chim 6 und 7 bedeutet. Zusätzlich konnten bereits bestehende Daten zur H158R, einer *gain-of function* Mutation im ICL, repliziert werden. Auch in den aktuellen Experimenten zeigte die H158R einen Bias in Richtung  $G_{q/11}$  Aktivierung nach Stimulation mit alpha-MSH. Mittels NanoBRET™ konnten wir zum ersten Mal darstellen, dass die H158R Homodimer-Bildung eine spezifische Interaktion darstellt (Abbildung 5).

## 4.3 Monomer/Dimer Equilibrium

Eine weitere wichtige Erkenntnis, die sich in den letzten Jahren herauskristallisiert hat, ist, dass GPCRs als eine Mischung aus Monomeren und Dimeren exprimiert werden e.g. (37, 38). Dieses Verhalten, Dimere bilden zu können, kann sich nachweislich auf

die Signalisierungseigenschaften auswirken. Als Beispiel zu nennen ist hier der *Corticotropin releasing factor type 1*, für den ein Zustand in einem Monomer/Dimer Equilibrium nachgewiesen werden konnte (39, 40). Für den MC4R ist bis dato nicht bekannt, in welchem Verhältnis der Rezeptor als Monomer oder Dimer vorliegt. Um besser zu verstehen, welche Vorteile eine Dimer-Separierung im menschlichen Organismus haben könnte, ist es wichtig dieser Frage in weiteren Experimenten nachzugehen.

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Dimer-Separierung vor allem einen starken Effekt auf die Potenz der  $G_{q/11}$  Aktivierung hat. Die  $EC_{50}$  von mit alpha-MSH stimulierten Chim 7 ist vergleichbar mit der  $EC_{50}$  von mit Setmelanotide stimulierten MC4R-WT (Abbildung 12). Dieser Effekt ist bedeutend, wenn man bedenkt, dass Setmelanotide den MC4R-WT viel stärker aktivieren kann als alpha-MSH. Einen Ansatz dieses Phänomen zu erklären, bietet ein Blick auf die MC4R/G-Protein-Stöchiometrie. Liegt der MC4R als Dimer vor kann nur ein G-Protein den Dimer-Rezeptor binden (Stöchiometrie 2:1). Liegen die Rezeptoren als einzelne Monomere vor, kann je MC4R ein G-Protein binden (41). Die Erkenntnisse aus der aktuellen Studie machen deutlich, dass es für den MC4R, vor allem in Bezug auf sein funktionelles Verhalten, noch viele offene Fragen gibt.

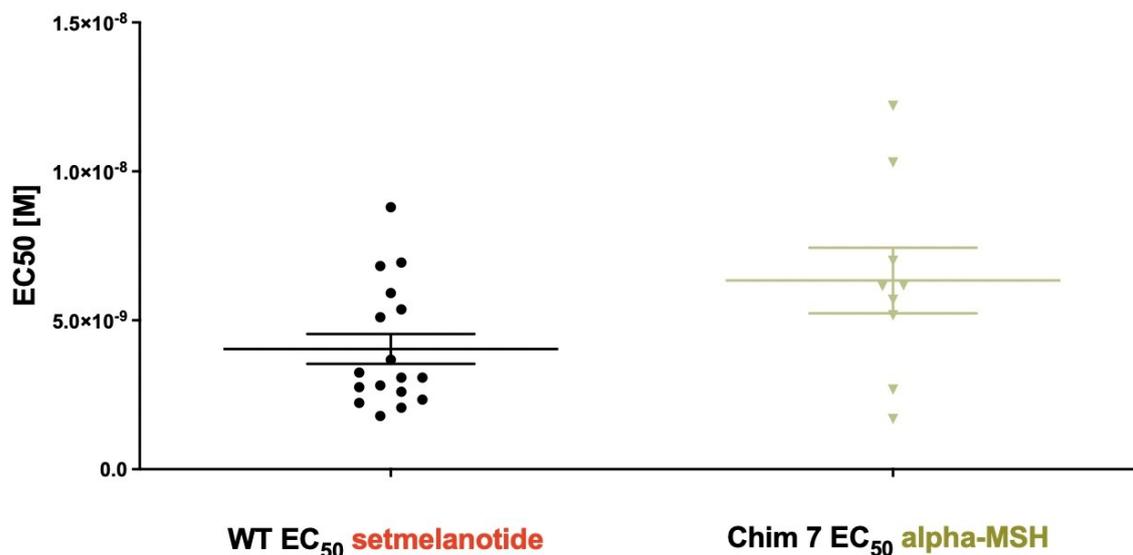


Abbildung 12  $EC_{50}$  der  $G_{q/11}$  Signalisierung von MC4R-WT stimuliert mit Setmelanotide vs. Chim 7 stimuliert mit alpha-MSH. Die Potenz wurde mittels Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt.  $EC_{50}$  MC4R-WT nach Setmelanotide Stimulation ( $4.04 \pm 0.5$  nM) präsentierte sich ähnlich zur  $EC_{50}$  von Chim 7 nach Stimulation mit alpha-MSH ( $6.33 \pm$

1.1 nM). Daten stammen aus 9 bis 17 Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Daten repräsentieren Mittelwert  $\pm$  SEM. Mit Genehmigung modifiziert nach Reininghaus et al. (25).

#### 4.5 Stärken und Schwächen der Zellkultur

Bei Experimenten, die in einem Zellmodell durchgeführt werden, ist bei der Auslegung der Ergebnisse auf Systeme außerhalb der Zellkultur Vorsicht geboten. Direkte Rückschlüsse auf das *in vivo* Verhalten im Menschen können nicht einfach ohne Weiteres gezogen werden. Unser Ziel war es ein Zellmodell zu wählen, welches den realen Bedingungen im Menschen möglichst nahekommt. Deshalb wurden in dieser Studie, anders als in der Studie von Piechowski *et al.*, die den Effekt der MC4R Homodimerisierung auf G<sub>s</sub> Signalisierung untersuchte (24), keine COS-7 Zellen gewählt. COS-7 Zellen leiten sich von der *African Green Monkey (Chlorocebus aethiops)* Zell-Linie ab, haben daher keinen menschlichen Ursprung (42). Stattdessen wurden die aktuellen Experimente in menschlichen HEK293 Zellen durchgeführt. HEK293 Zellen sind in der GPCR-Forschung etabliert und exprimieren keine MC-Rezeptoren (MC1R-MC5R). Sie stammen von menschlichen Nierenzellen ab (43, 44).

Ein Verfahren, mit dem praxisnahe Experimente durchgeführt werden können, ist die Arbeit mit iPSC. Der Einsatz von iPSC ermöglicht es, neben Neuronen, jegliche Gewebe für Experimente zu generieren (45). PVN (nucleus paraventricularis) Neurone exprimieren den MC4R und würden ein, dem menschlichen Organismus, viel näheres experimentelles Setting bieten als die herkömmliche Zellkultur (12). An dieser Stelle ist deshalb wichtig zu erwähnen, dass aktuell noch kein gutes System bekannt ist, mit dem man PVN Neurone aus iPSC generieren kann. Sollte das gelingen, würde dies einen Durchbruch in der MC4R-Forschung bedeuten.

Mittlerweile ist bekannt, dass auch Proteine Einfluss auf Rezeptor-Signalisierung nehmen können. Wichtig zu erwähnen sind für den MC4R die *Melanocortin Receptor Accessory Proteine* MRAP1 und MRAP2. Insbesondere MRAP2 wird unter anderem im menschlichen Gehirn exprimiert und nimmt dort nachweislich Einfluss auf die MC4R Signalisierungseigenschaften. Daraus leitet sich die Arbeitshypothese ab, dass MRAP2 sterisch zu einer Dimer-Separierung führen könnte (46). Der Vorteil von HEK293 Zellen ist, dass diese in geringen Mengen MRAP2 exprimieren und damit eine gewisse Ähnlichkeit zu dem Setting im menschlichen Gehirn bieten (46). Aber auch hier kann nur von einem Versuch der Annäherung an die Gegebenheiten im Menschen gesprochen

werden. Aufgrund der Tatsache, dass viele variable Faktoren Einfluss auf die Rezeptor-Funktion im menschlichen Körper nehmen können, ist es wichtig, an dieser Stelle auf die Limitation von Zellmodellen hinzuweisen und klar zu betonen, dass Ergebnisse nicht 1:1 auf den menschlichen Organismus übertragen werden können.

## 5. Schlussfolgerungen

In der Studie konnte experimentell gezeigt werden, dass eine Dimer-Separierung von MC4R nicht nur einen positiven Einfluss auf die  $G_s$  sondern auch auf die  $G_q$  Signalisierung in HEK293 Zellen hat. Der Effekt ist besonders in Hinblick auf die Rezeptor-Potenz deutlich. Die Dimer-Separation führt zu einer niedrigeren  $EC_{50}$  und damit zu einer besseren  $G_{q/11}$  Signalisierung. Die Ergebnisse der Studie machen deutlich, dass viele Fakten zum MC4R noch nicht bekannt sind. Das Interesse diesen Rezeptor pharmakologisch zu beeinflussen macht den MC4R zu einem wichtigen Bestandteil aktueller Forschung. Unter anderem gilt es in Zukunft zu klären, in welchem Verhältnis der Rezeptor in einem Dimer- oder Monomer-Zustand existiert. Dies könnte auch abhängig vom Expressionsort des Rezeptors sein. Um aus den in dieser Studie präsentierten Daten medizinische Interventionen ableiten zu können, sind weitere Studien notwendig. Ziel ist es, diese Informationen eines Tages gezielt für eine pharmakologische Intervention nutzen zu können.

## Literaturverzeichnis

1. Boutari C, Mantzoros CS. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. *Metabolism*. 2022;133:155217.
2. NDC rfc. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017;390(10113):2627-42.
3. Bjerregaard LG, Jensen BW, Ångquist L, Osler M, Sørensen TIA, Baker JL. Change in Overweight from Childhood to Early Adulthood and Risk of Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2018;378(14):1302-12.
4. Twig G, Yaniv G, Levine H, Leiba A, Goldberger N, Derazne E, Ben-Ami Shor D, Tzur D, Afek A, Shamiss A, Haklai Z, Kark JD. Body-Mass Index in 2.3 Million Adolescents and Cardiovascular Death in Adulthood. *N Engl J Med*. 2016;374(25):2430-40.
5. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene*. 2004;23(38):6365-78.
6. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288-98.
7. Arterburn DE, Telem DA, Kushner RF, Courcoulas AP. Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review. *Jama*. 2020;324(9):879-87.
8. Farooqi IS, O'Rahilly S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol*. 2014;223(1):T63-70.
9. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998;392(6674):398-401.
10. Aslan IR, Ranadive SA, Ersoy BA, Rogers SJ, Lustig RH, Vaisse C. Bariatric surgery in a patient with complete MC4R deficiency. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(3):457-61.
11. Poitou C, Puder L, Dubern B, Krabusch P, Genser L, Wiegand S, Verkindt H, Köhn A, von Schwartzberg RJ, Flück C, Pattou F, Laville M, Kühnen P, Clément K. Long-term outcomes of bariatric surgery in patients with bi-allelic mutations in the POMC, LEPR, and MC4R genes. *Surg Obes Relat Dis*. 2021;17(8):1449-56.
12. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*. 2005;8(5):571-8.
13. Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest*. 2000;106(2):271-9.
14. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest*. 2000;106(2):253-62.
15. Wade KH, Lam BYH, Melvin A, Pan W, Corbin LJ, Hughes DA, Rainbow K, Chen JH, Duckett K, Liu X, Mokrosiński J, Mörseburg A, Neaves S, Williamson A, Zhang C, Farooqi IS, Yeo GSH, Timpson NJ, O'Rahilly S. Loss-of-function mutations in the melanocortin 4 receptor in a UK birth cohort. *Nat Med*. 2021;27(6):1088-96.
16. Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DeValle J, Yamada T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem*. 1993;268(20):15174-9.

17. Paisdzior S, Dimitriou IM, Schöpe PC, Annibale P, Scheerer P, Krude H, Lohse MJ, Biebermann H, Kühnen P. Differential Signaling Profiles of MC4R Mutations with Three Different Ligands. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4).
18. Li YQ, Shrestha Y, Pandey M, Chen M, Kablan A, Gavrilova O, Offermanns S, Weinstein LS. G(q/11) $\alpha$  and G(s) $\alpha$  mediate distinct physiological responses to central melanocortins. *J Clin Invest.* 2016;126(1):40-9.
19. Clément K, Biebermann H, Farooqi IS, Van der Ploeg L, Wolters B, Poitou C, Puder L, Fiedorek F, Gottesdiener K, Kleinau G, Heyder N, Scheerer P, Blume-Peytavi U, Jahnke I, Sharma S, Mokrosinski J, Wiegand S, Müller A, Weiß K, Mai K, Spranger J, Grüters A, Blankenstein O, Krude H, Kühnen P. MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nat Med.* 2018;24(5):551-5.
20. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo j.* 1999;18(7):1723-9.
21. Angers S, Salahpour A, Bouvier M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:409-35.
22. Rediger A, Tarnow P, Bickenbach A, Schaefer M, Krude H, Gruters A, Biebermann H. Heterodimerization of hypothalamic G-protein-coupled receptors involved in weight regulation. *Obes Facts.* 2009;2(2):80-6.
23. Biebermann H, Krude H, Elsner A, Chubanov V, Gudermann T, Grüters A. Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes.* 2003;52(12):2984-8.
24. Piechowski CL, Rediger A, Lagemann C, Mühlhaus J, Müller A, Pratzka J, Tarnow P, Grüters A, Krude H, Kleinau G, Biebermann H. Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop 2. *J Mol Endocrinol.* 2013;51(1):109-18.
25. Reininghaus N, Paisdzior S, Höpfner F, Jyrch S, Cetindag C, Scheerer P, Kühnen P, Biebermann H. A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation. *Biomolecules.* 2022;12(8).
26. Hoseini SS, Sauer MG. Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *J Biol Eng.* 2015;9:2.
27. Kenakin T. A Scale of Agonism and Allosteric Modulation for Assessment of Selectivity, Bias, and Receptor Mutation. *Mol Pharmacol.* 2017;92(4):414-24.
28. Heyder NA, Kleinau G, Speck D, Schmidt A, Paisdzior S, Szczepek M, Bauer B, Koch A, Gallandi M, Kwiatkowski D, Bürger J, Mielke T, Beck-Sickingler AG, Hildebrand PW, Spahn CMT, Hilger D, Schacherl M, Biebermann H, Hilal T, Kühnen P, Kobilka BK, Scheerer P. Structures of active melanocortin-4 receptor-Gs-protein complexes with NDP- $\alpha$ -MSH and setmelanotide. *Cell Res.* 2021;31(11):1176-89.
29. Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, Hadley ME. 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone: a highly potent  $\alpha$ -melanotropin with ultralong biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(10):5754-8.
30. Boyer JL, Graber SG, Waldo GL, Harden TK, Garrison JC. Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein  $\alpha$ - and  $\beta$  gamma-subunits. *J Biol Chem.* 1994;269(4):2814-9.
31. Katada T. The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(12):2103-11.
32. Clément K, van den Akker E, Argente J, Bahm A, Chung WK, Connors H, De Waele K, Farooqi IS, Gonneau-Lejeune J, Gordon G, Kohlsdorf K, Poitou C, Puder L,

- Swain J, Stewart M, Yuan G, Wabitsch M, Kühnen P. Efficacy and safety of setmelanotide, an MC4R agonist, in individuals with severe obesity due to LEPR or POMC deficiency: single-arm, open-label, multicentre, phase 3 trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(12):960-70.
33. Kühnen P, Krude H, Biebermann H. Melanocortin-4 Receptor Signalling: Importance for Weight Regulation and Obesity Treatment. *Trends Mol Med.* 2019;25(2):136-48.
34. Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H, Javitch JA. Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(48):17495-500.
35. Carrillo JJ, López-Giménez JF, Milligan G. Multiple interactions between transmembrane helices generate the oligomeric alpha1b-adrenoceptor. *Mol Pharmacol.* 2004;66(5):1123-37.
36. Mancía F, Assur Z, Herman AG, Siegel R, Hendrickson WA. Ligand sensitivity in dimeric associations of the serotonin 5HT<sub>2c</sub> receptor. *EMBO Rep.* 2008;9(4):363-9.
37. Collet TH, Dubern B, Mokrosinski J, Connors H, Keogh JM, Mendes de Oliveira E, Henning E, Poitou-Bernert C, Oppert JM, Tounian P, Marchelli F, Alili R, Le Beyec J, Pépin D, Lacorte JM, Gottesdiener A, Bounds R, Sharma S, Folster C, Henderson B, O'Rahilly S, Stoner E, Gottesdiener K, Panaro BL, Cone RD, Clément K, Farooqi IS, Van der Ploeg LHT. Evaluation of a melanocortin-4 receptor (MC4R) agonist (Setmelanotide) in MC4R deficiency. *Mol Metab.* 2017;6(10):1321-9.
38. Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 2004;5(1):30-4.
39. Kasai RS, Suzuki KG, Prossnitz ER, Koyama-Honda I, Nakada C, Fujiwara TK, Kusumi A. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol.* 2011;192(3):463-80.
40. Teichmann A, Gibert A, Lampe A, Grzesik P, Rutz C, Furkert J, Schmoranzler J, Krause G, Wiesner B, Schüle R. The specific monomer/dimer equilibrium of the corticotropin-releasing factor receptor type 1 is established in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2014;289(35):24250-62.
41. Kleinau G, Heyder NA, Tao YX, Scheerer P. Structural Complexity and Plasticity of Signaling Regulation at the Melanocortin-4 Receptor. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16).
42. Hancock JF. COS Cell Expression. *Methods Mol Biol.* 1992;8:153-8.
43. Rached M, El Mourabit H, Buronfosse A, Blondet A, Naville D, Begeot M, Penhoat A. Expression of the human melanocortin-2 receptor in different eukaryotic cells. *Peptides.* 2005;26(10):1842-7.
44. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59-74.
45. Malik N, Rao MS. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol.* 2013;997:23-33.
46. Schonnop L, Kleinau G, Herrfurth N, Volckmar AL, Cetindag C, Müller A, Peters T, Herpertz S, Antel J, Hebebrand J, Biebermann H, Hinney A. Decreased melanocortin-4 receptor function conferred by an infrequent variant at the human melanocortin receptor accessory protein 2 gene. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(9):1976-82.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nanina Reininghaus, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Rolle der Dimerisierung des Melanocortin-4-Rezeptors auf die Aktivierung der Gq/11 Signalisierung“ / „Investigating the Role of Melanocortin 4 Receptor Dimerization on Gq/11 Signaling“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer un-wahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Die Anteile an der/n jeweiligen Publikation/en sind so deutlich und detailliert zu erklären, dass es der Promotionskommission und den wissenschaftlichen Gutachtern ohne Probleme möglich ist zu erkennen, was Sie selbst dazu beigetragen haben. Wünschenswert wäre ein konkreter Bezug zur Publikation wie z. B.: „aus meiner statistischen Auswertung sind die Tabellen 1, 4, 47 und 60 entstanden.“

Ihre Anteilserklärung binden Sie bitte mit in alle Exemplare Ihre Dissertation ein. Auf diesen eingebundenen Erklärungen brauchen nur Sie zu unterschreiben, die Unterschrift Ihres/r Erstbetreuers/in ist nicht erforderlich! Allerdings benötigen wir ein separates Exemplar für Ihre Akte. Auf diesem muss auch Ihr/e Erstbetreuer/in unterschreiben!

Wenn Sie im Standard-Track (Dr. med., Dr. med. dent., Dr. rer. medic.) eine Publikationspromotion beabsichtigen und dazu nur eine einzige Publikation vorlegen, gilt Folgendes:

Sie sind alleinige/r Erstautor/in: Dann binden Sie bitte Ihre Anteilserklärung mit in Ihre Dissertation ein. Auf dieser Version brauchen nur Sie zu unterschreiben. Ein weiteres Exemplar, auf dem Sie und Ihr/e Erstbetreuer/in unterschrieben haben, legen Sie den Unterlagen für die Akte bei.

Sie teilen sich die Erstautorenschaft mit jemand anderem: Dies ist nur auf Antrag möglich und ist sichtbar anzugeben. Legen Sie dazu ein formloses Schreiben den Unterlagen zur Eröffnung bei. Auch ist in diesem Fall die Erklärung von beiden Autoren/innen abzugeben. Nur Ihre eigene Erklärung ist mit in Ihre Dissertation mit einzubinden. Auf diesem Exemplar brauchen nur Sie selbst zu unterschreiben. Darüber hinaus legen Sie bitte noch eine weitere von Ihnen und Ihrem/r Erstbetreuer/in unterschriebene Erklärung sowie die Erklärung des/der anderen Erstautors/in mit dessen/deren Unterschrift für die Akte vor.]

Nanina Reininghaus hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Nanina Reininghaus, Sarah Paisdzior, Friederike Höpfner, Sabine Jyrch, Cigdem Cetindag, Patrick Scheerer, Peter Kühnen and Heike Biebermann, A setmelanotide-like effect at MC4R is achieved by MC4R dimer separation, *biomolecules*, 2022

Beitrag im Einzelnen (bitte ausführlich ausführen):

- Planung und Konzeption der Fragestellung (zusammen mit Biebermann H., Paisdzior S., Kühnen P.)
- Die Klonierung und die Assays wurden eigenständig von mir durchgeführt (beigebracht von: Biebermann H., Paisdzior S., Jyrch S., Cetindag C. und zusätzlich unterstützt durch: Höpfner F.)
- Die Datenanalyse wurde in Absprache mit mit Biebermann H., Paisdzior S., Scheerer P., Kühnen P. eigenständig durchgeführt
- Aus meiner statistischen Auswertung wurden die Abbildungen 1 bis 9 von mir erstellt (kontrolliert von Biebermann H. und Paisdzior S.)

- Aus meiner statistischen Auswertung wurden die Tabellen 1 bis 4 von mir erstellt (kontrolliert von Biebermann H und Paisdzior S.)
- Interpretation der Daten und Diskussion der Ergebnisse (Hauptanteil, zusammen mit Biebermann H. und Paisdzior S.)
- Konzeption und Entwurf des Manuskripts (Hauptanteil, zusammen mit Biebermann H. und Paisdzior S.)
- Schreiben des Manuskripts (Hauptanteil, zusammen mit Co-Autoren)
- Erstellen der Revisionen (Hauptanteil, zusammen mit Co-Autoren)

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

**Druckexemplar(e) der Publikation(en)**

Article

# A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation

Nanina Reininghaus<sup>1</sup>, Sarah Paisdzior<sup>1</sup> , Friederike Höpfner<sup>1</sup>, Sabine Jyrch<sup>1</sup>, Cigdem Cetindag<sup>1</sup>, Patrick Scheerer<sup>2,3</sup> , Peter Kühnen<sup>1</sup> and Heike Biebermann<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Institute of Experimental Pediatric Endocrinology, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Group Protein X-ray Crystallography and Signal Transduction, Institute of Medical Physics and Biophysics, 10117 Berlin, Germany

<sup>3</sup> DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Berlin, 13353 Berlin, Germany

\* Correspondence: heike.biebermann@charite.de

**Abstract:** Melanocortin 4 receptor (MC4R) is part of the leptin-melanocortin pathway and plays an essential role in mediating energy homeostasis. Mutations in the *MC4R* are the most frequent monogenic cause for obesity. Due to increasing numbers of people with excess body weight, the MC4R has become a target of interest in the search of treatment options. We have previously reported that the MC4R forms homodimers, affecting receptor  $G_s$  signaling properties. Recent studies introducing setmelanotide, a novel synthetic MC4R agonist, suggest a predominant role of the  $G_{q/11}$  pathway regarding weight regulation. In this study, we analyzed effects of inhibiting homodimerization on  $G_{q/11}$  signaling using previously reported MC4R/CB1R chimeras. NanoBRET<sup>TM</sup> studies to determine protein–protein interaction were conducted, confirming decreased homodimerization capacities of chimeric receptors in HEK293 cells.  $G_{q/11}$  signaling of chimeric receptors was analyzed using luciferase-based reporter gene (NFAT) assays. Results demonstrate an improvement of alpha-MSH-induced NFAT signaling of chimeras, reaching the level of setmelanotide signaling at wild-type MC4R (MC4R-WT). In summary, our study shows that inhibiting homodimerization has a setmelanotide-like effect on  $G_{q/11}$  signaling, with chimeric receptors presenting increased potency compared to MC4R-WT. These findings indicate the potential of inhibiting MC4R homodimerization as a therapeutic target to treat obesity.

**Keywords:** melanocortin 4 receptor; MC4R; obesity; homodimer;  $G_{q/11}$ ; signaling; GPCR



**Citation:** Reininghaus, N.; Paisdzior, S.; Höpfner, F.; Jyrch, S.; Cetindag, C.; Scheerer, P.; Kühnen, P.; Biebermann, H. A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1119. <https://doi.org/10.3390/biom12081119>

Academic Editors: Paolo Annibale and Marco Scarselli

Received: 21 June 2022

Accepted: 12 August 2022

Published: 15 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The prevalence of obesity has increased immensely over the past years, not only for the adult population but also among children and adolescents [1,2]. Obesity poses a worldwide health challenge as it is a major risk factor for developing conditions such as diabetes type 2 [3] and cardiovascular diseases [4]. This reality highlights the importance of finding treatment options to target this strain on global health. Bariatric surgery has strong evidence of efficacy and is especially recommended for specific patients with severe obesity [5]. Surgery is, however, not an option for all patients suffering from obesity, especially not for children with weaknesses in the leptin-melanocortin pathway [6–9]. The leptin-melanocortin signaling pathway regulates energy homeostasis in the hypothalamus, therefore playing a key role in regulating body weight [10]. Recently, we reported setmelanotide as effective in treating patients with proopiomelanocortin (*POMC*) or leptin receptor (*LEPR*) deficiency [11,12]. Only a small subset of patients profit from this medical intervention. Therefore, an option for a broader group of patients is urgently needed.

The melanocortin-4 receptor (MC4R) is one of the key G-protein-coupled receptors (GPCR) in the leptin–melanocortin signaling pathway. Mutations in the *MC4R* account for up to 5% of obesity cases and are the most frequent monogenic cause for obesity [13–15]. Due to the discovery that GPCRs can act as dimers, thus affecting signaling abilities, finding ways to study dimerization behavior and respective effects has become a common field of interest [16–18]. Although several instances of MC4R homo- and heterodimerization have been reported over the years [19], the MC4R does not interact with the phylogenetically close cannabinoid receptor type 1 (CB1R) [19,20]. By using MC4R/CB1R chimeras, we were able to recently show that MC4R homodimer separation leads to an increase in G<sub>s</sub> activation in COS-7 cells [21]. Activation of G<sub>s</sub> signaling is the major signaling pathway of MC4R [22], and the 3D structures of various MC4R/G<sub>s</sub> complexes have recently been solved, including by us [23,24]. However over recent years, it was identified that other pathways are activated as well [25]. In particular, G<sub>q/11</sub> signaling seems to play a so far underestimated role in MC4R-induced weight regulation [12,26].

Therefore, the objective of this study was to investigate if homodimer separation of the MC4R also has an effect on G<sub>q/11</sub> activation. For this purpose, reported MC4R/CB1R chimeras were investigated using human cell line HEK293 cells, specifically focusing on G<sub>q/11</sub> activation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ligands and Plasmids

The endogenous ligand alpha-MSH was purchased from Merck (Taufkirchen, Germany). MC4R-WT, CB1R cDNA was amplified from genomic DNA and cloned into eukaryotic expression vector pcDps. MC4R-H158R as well as MC4R/CB1R chimeric receptors were recently generated in this expression vector [21]. For protein–protein interaction NanoBRET™ assays, the cDNA of MC4R, CB1R, and H158R as well as chimeric constructs 1–7 were cloned into Flexi expression vectors, respectively, pFC14A (Promega, Mannheim, Germany) and pFC32K (Promega, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's protocol.

### 2.2. Cell Culture

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cell line was purchased from ATCC and regularly tested for mycoplasma contamination using DAPI staining. Cells were maintained in minimal essential medium (MEM, Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Waltham, MA, USA) and NEAA incubated at 37 °C in humidified air containing 5% CO<sub>2</sub>. For the BRET assays, 4 × 10<sup>5</sup> HEK293 cells per well were seeded in 6-well plates for transfection. For the donor saturation assays (DSA), 4 × 10<sup>5</sup> HEK293 cells per well were seeded in 12-well plates. For GloSensor™ assays, 1.5 × 10<sup>4</sup> cells per well were seeded in white 96-well plates (Corning, Costar, AZ, USA). For the NFAT luciferase-based reporter gene assay, 1.5 × 10<sup>4</sup> cells per well were seeded in poly-L-lysine-coated (Gibco, Waltham, MA, USA) 96-well translucent plates (Falcon, Kaiserslautern, Germany) and incubated for 24 h.

### 2.3. Transfection

For BRET assays, HEK293 cells were transfected 4–6 h after seeding. Transfection was performed using 8 µL FuGene HD (Promega, Mannheim, Germany) and 1.4 µg DNA in Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA, USA). The BRET partners were co-transfected using a NL/HT ratio of 1:5 (200 ng: 1 µg). In addition, 200 ng Carrier DNA (pGEM3Z) was added. For GloSensor™, HEK293 cells were transfected 24 h after seeding with 60 ng plasmid DNA and 0.6 µL Metafectene (Biontex, Munich, Germany), according to the manufacturer's protocol. An additional 60 ng of pGloSensor™-22F cAMP Plasmid was added. For reporter gene assays, HEK293 cells were transfected 24 h after seeding with 45 ng plasmid DNA and 0.45 µL Metafectene (Biontex, Munich, Germany), according to the manufacturer's

protocol. A total of 45 ng of reporter DNA (pGL4.3(luc2P/NFAT/Hygro)) was additionally transfected per well in MEM without supplements.

#### 2.4. Determination of Protein–Protein Interaction via NanoBRET™

The interaction between MC4R-WT, CB1R, and the chimeric receptors was determined using NanoBRET™ (Promega, Mannheim, Germany). The receptors were either C-terminally tagged with HaloTag (HT) as an energy acceptor or C-terminally fused with NanoLuc (NL) as an energy donor. Then, 20 h after transfection, cells were detached from the wells and centrifuged at  $130\times g$  for 5 min and the pellet was resuspended in Opti-MEM (Gibco) without phenol red, supplemented with 4% FBS (Gibco). Cells were adjusted to  $2 \times 10^5$  cells/mL and divided into two pools, adding either DMSO or HaloTag@Ligand 618. The cells were then reseeded into white opaque 96-well plates (Corning, Costar) and incubated for 4–6 h at  $37^\circ$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Measurements were conducted using the Berthold Mithras LB 940, injecting 25  $\mu\text{L}$ /well of NanoGlo@substrate and measuring donor and acceptor emission at 460 nm and 618 nm, respectively. The BRET Ratio was calculated by dividing acceptor emission by donor emission. In order to correct for background bleedthrough, the background ratio (no acceptor DMSO control) was subtracted, and the unit was changed into miliBRET (mBU).

$$\text{BRET Ratio} = \frac{\text{emission acceptor (618 nm)}}{\text{emission donor (460 nm)}} \quad (1)$$

$$\text{BRET Ratio} = (\text{BRET Ratio}_{\text{sample}} - \text{BRETRatio}_{\text{no acceptor control}}) \times 1000 \quad (2)$$

For graphical depiction the delta BRET was calculated

$$\Delta\text{BRET} = \text{BRETRatio}_{\text{chimeric receptor}} - \text{BRETRatio}_{\text{WT-MC4R}} \quad (3)$$

#### 2.5. Determination of cAMP Accumulation via GloSensor™

$G_s$  signaling was measured using cAMP assay GloSensor™, enabling real-time measurements of cAMP accumulation. HEK293 cells were transfected with either MC4R-WT or chimeric receptors. Two days after transfection, cells were equilibrated with a mixture of 88%  $\text{CO}_2$ -dependent medium (Gibco, Waltham, MA, USA), 10% FCS, and 2% GloSensor™ cAMP Reagent. In case of PTX pretreatment, 10  $\mu\text{L}$  of 50 ng/mL PTX was added to cells 18 h before stimulation. Non-PTX-treated cells received 10  $\mu\text{L}$  MEM without supplements (Gibco Minimum Essential Media, Waltham, MA, USA) per well at the same time point. Bioluminescence was quantified using a Berthold Microplate Reader (Mithras LB940, Berthold Technologies GmbH and Co., Bad Wildbad, Germany). After basal measurement for 10 min, cells were stimulated with 1  $\mu\text{M}$  alpha-MSH, or 1  $\mu\text{M}$  setmelanotide, and measured for 21 times at 2 min intervals. Cells stimulated with 1  $\mu\text{M}$  isoproterenol served as an internal control. GloSensor™ results were expressed as relative luminescence units (RLU). The total cAMP formation was assessed in the time–response curve by calculating the area under the curve (AUC).

#### 2.6. Measurements of PLC Activation Using Reporter Gene Assays

In order to determine phospholipase C (PLC) activation, luciferase-based reporter gene assays were conducted. Then, 48 h after transfection, cells were challenged with alpha-MSH or setmelanotide, using decreasing concentrations ( $10^{-5}$  M to  $10^{-10}$  M) for 6 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . In a case of PTX pretreatment experiments, 50 ng/mL PTX was added to cells 18 h before stimulation. After incubation, stimulation was stopped by discarding the media, and subsequent cell lysis was induced by adding 50  $\mu\text{L}$  passive lysis buffer (PLB; Promega, Mannheim, Germany). For measurements, 10  $\mu\text{L}$  of the lysate was transferred to a white opaque 96-well plate. Measurements were conducted by injecting 40  $\mu\text{L}$  firefly luciferase substrate (Promega, Mannheim, Germany), and luminescence was

determined with a plate reader (Mithras LB940). Signaling bias was analyzed using the formula described by Kenakin [27]:

$$\Delta \log \left( \frac{E_{\max}}{EC_{50}} \right) = \log \left( \frac{E_{\max, A}}{EC_{50, A}} \right) - \log \left( \frac{E_{\max, B}}{EC_{50, B}} \right) \quad (4)$$

with A referring to the respective chimeric receptor and B being the reference (MC4R-WT).  $E_{\max}$  was determined from concentration–response curves and depicts the maximal response (efficacy);  $EC_{50}$  describes the potency. Bias was further calculated, creating the antilog.

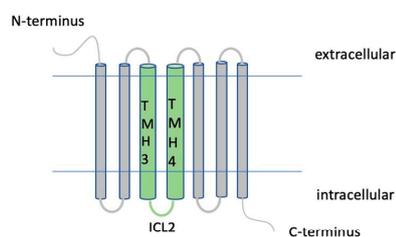
$$\text{bias} = 10^{\Delta \log \left( \frac{E_{\max}}{EC_{50}} \right)} \quad (5)$$

### 2.7. Statistical Analysis

All data represent mean  $\pm$  SEM. Statistical testing and calculation of area under the curve were performed using GraphPad Prism 9.3.1 software (San Diego, CA, USA). For concentration–response curves, a non-linear regression model for sigmoidal response was used. Hyperbolic curves were adapted by the non-linear regression of standard curves to interpolate. Significance between parameters was either calculated using a one-way ANOVA with Kruskal–Wallis test or the Mann–Whitney test, with  $p \leq 0.05$  set as significant. For more details, see descriptions in the figures below.

### 3. Results

The aim of this study was to investigate MC4R oligomeric behavior and downstream signaling in a human cell model. Therefore, we worked with HEK293 cells, a well-established cell model for working with GPCRs. We recently reported MC4R monomerization in COS-7 cells using an ELISA approach [21]. For this study, the reported chimeric constructs (Figure 1) were used for application of a NanoBRET™ assay studying protein–protein interaction, and therefore appropriated tags were added.

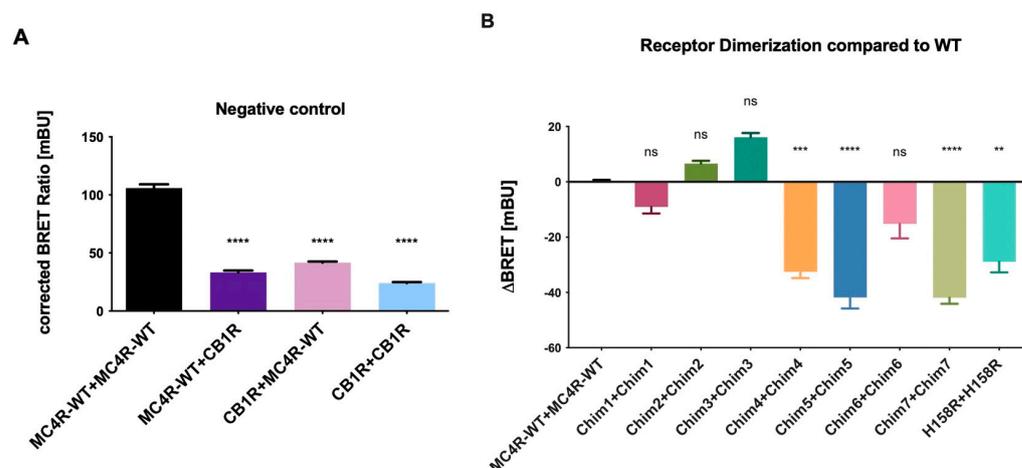


	TMH 3	ICL2	TMH 4
Chim 1	Asp122-Val145		
Chim 2			Val166-Phe184
Chim 3	Asp122-Val145		Val166-Phe184
Chim 4		Try153-Arg165	
Chim 5		Try153-Met161	
Chim 6		Asp146-Arg165	
Chim 7		Asp146-Met161	

**Figure 1. Arrangement of MC4R/CB1R chimeric constructs.** The table illustrates amino acid sequences and regions interchanged with the CB1R via overlap PCR. Chimera specification: Chim 1: substitution of TMH3; Chim 2: substitution of TMH4; Chim 3: substitution of TMH3 and TMH4 regions; Chim 4: substitution of ICL2 and intracellular parts of TMH4; Chim 5: substitution of ICL2; Chim 6: substitution of intracellular parts of TMH3, ICL2, and intracellular parts of TMH4; Chim 7: substitution of intracellular parts of TMH3 and ICL2 [21]. Cloning of HaloTag (HT) and NanoLuc (NL) was performed using SgfI and EcoICRI enzymes. The HT Tag is situated at the C-terminal end of the gene after a HT7 linker and a TEV protease recognition sequence. The NL is also situated at the C-terminal, NL protein coding region following after a Linker (region 14471461). The vectors were obtained from Promega, and cloning was conducted according to Flexi® Vector Systems protocol.

### 3.1. Homodimerization Capacities of Chimeric CB1R/MC4R and MC4R-H158R Mutation Were Reduced when Compared to MC4R-WT

Heterodimerization of MC4R-WT and CB1R as negative control was tested, pairing BRET partners in two possible ways, assessing the interaction between MC4R tagged with NL plus CB1R tagged with HT and an interaction of the pairing CB1R NL plus MC4R HT. We found receptor heterodimerization of MC4R-WT and CB1R was significantly reduced for both groupings when compared to MC4R-WT homodimerization as expected. CB1R homodimerization was also decreased compared to MC4R-WT homodimerization (Figure 2A). The NanoBRET™ assay was therefore chosen as a suitable method to investigate receptor dimerization of chimeric MC4R/CB1R variants. Additionally, the MC4R H158R, a classified gain-of-function mutation located in the second intracellular loop (ICL2) [25], which has decreased ability to form homodimers, was included. The MC4R-CB1R chimeras Chim 1, Chim 2, and Chim 3 showed no significant (Chim 1) or increased (Chim 2, Chim 3) receptor–receptor interaction, compared to MC4R-WT. Due to these results and the fact that Chim 1, Chim 2, and Chim 3 have shown impaired cell surface expression in previous experiments conducted in COS-7 cells, they were excluded from further experiments [21]. Chim 4, Chim 5, Chim 7, and the H158R gain-of function mutation showed significantly impaired dimerization capacities. Chim 5 and Chim 7 exhibited the maximum suppression of dimer formation (Figure 2B). The results are in line with previous results deriving from sandwich ELISA experiments conducted in COS-7 cells [21]. Donor saturation assays (DSA) were conducted for WT, Chim 7, and H158R to test the specificity of homodimer interaction. A specific interaction could be verified for all three constructs (Supplementary Information, Figure S1).

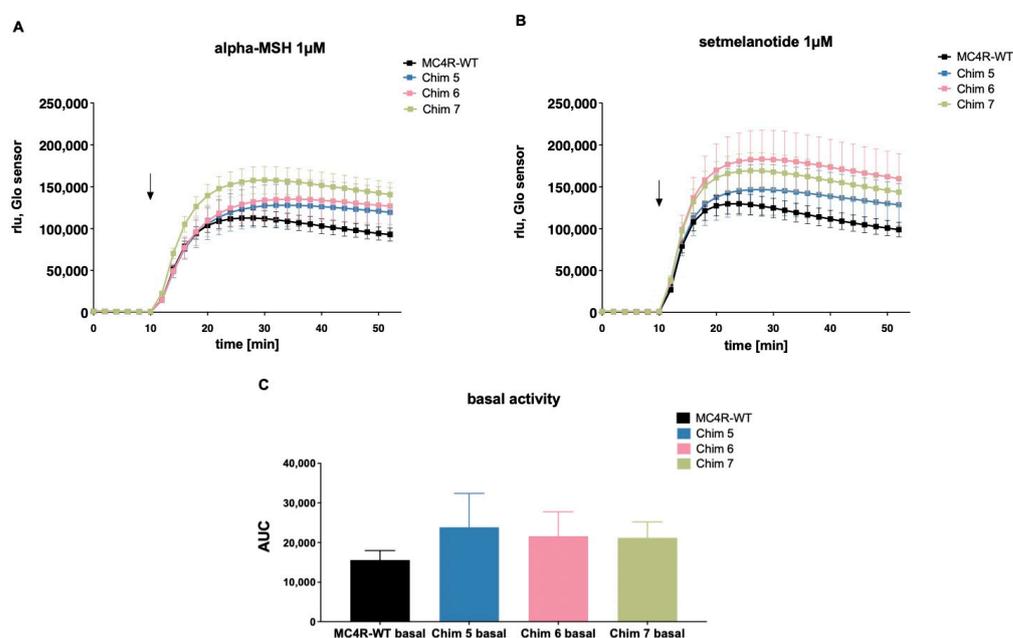


**Figure 2.** Receptor dimerization of MC4R chimeras compared to MC4R-WT. Dimerization of chimeric MC4R/CB1R receptors and H158R gain of function mutation was analyzed by performing NanoBRET™ assays. HEK293 cells were co-transfected with either BRET partners, C-terminally tagged with the energy donor NanoLuc or the protein tag HaloTag, able to bind the energy acceptor, the NanoBRET™ ligand 618. (A) CB1R is a non-interactive partner of MC4R and served as the negative control. Data are shown as BRET ratio in milliBRET units (mBU). (B)  $\Delta$ BRET values were calculated as difference between BRET ratios of chimeras and MC4R-WT. Negative values represent a decrease in dimerization capacities compared to MC4R-WT dimerization. Data represent three independent experiments, each performed in triplicate. Values represent mean  $\pm$  SEM of calculated BRET ratios. A one-way ANOVA with Kruskal–Wallis test was performed for statistical analysis, and the mean of the WT column was compared to the mean of all the other columns. Statistical significance was defined as \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.2. Effect of Homodimerization on cAMP Formation

In a previous study, we presented data showing chimeric receptors exhibiting higher basal cAMP levels and higher NDP-alpha-MSH (a non-selective MCR agonist [23,28])

stimulated cAMP levels, compared to MC4R-WT [21]. Results were based on cAMP accumulation assays in COS-7 cells. In this study, we replicated the results for Chim 5, Chim 6, and Chim 7 in human HEK293 cells. Experiments were performed using GloSensor™ assay enabling dynamic live cell measurement of cAMP increase. In order to compare the results of this study with results previously achieved in COS-7 cells, we used the same concentration of 1  $\mu$ M for alpha-MSH and setmelanotide. In the current study, effects of setmelanotide stimulation on cAMP production of chimeric receptors were evaluated. GloSensor™ results showed that alpha-MSH stimulation of Chim 5, Chim 6, and Chim 7 exhibited elevated cAMP production compared to WT (Figure 3A). A one-way ANOVA with Kruskal–Wallis test was performed, comparing area under the curve of MC4R-WT to Chim5, Chim 6, and Chim 7, stimulated with alpha-MSH or setmelanotide. The results turned out to be non-significant. The experiments were performed in triplicate of four independent experiments. This discrepancy might be explained by the different cell system and method used. Setmelanotide stimulation led to a similar increase in cAMP production in the chimeric receptors, compared to respectively alpha-MSH-induced cAMP increase (Figure 3B). Chim 5 to 7 exhibited qualitatively elevated basal cAMP levels compared to WT (Figure 3C).



**Figure 3.**  $G_s$  signaling properties of MC4R-WT and chimeric receptors under alpha-MSH and setmelanotide stimulation. HEK293 cells were transfected with WT receptor or chimeric receptors and GloSensor™ reporter. Cells were stimulated with (A) alpha-MSH (1  $\mu$ M) or (B) setmelanotide (1  $\mu$ M) and assayed for increase in cAMP. The arrow indicates the start of ligand stimulation. cAMP accumulation was assessed over time and quantified in relative light units (rlu). (C) Chimeric receptors showed a higher basal  $G_s$  activity compared to MC4R-WT. The data are shown as area under the curve (AUC) of luminescence values from live cell cAMP accumulation. For statistical analysis, a one-way ANOVA with Kruskal–Wallis test was performed, comparing area under the curve of MC4R-WT to chimeric receptors stimulated with alpha-MSH or setmelanotide. The results turned out to be non-significant. Data represent four independent experiments, each performed in triplicate. Values represent mean  $\pm$  SEM.

### 3.3. Effects of Reduced Homodimerization on $G_{q/11}$ Signaling

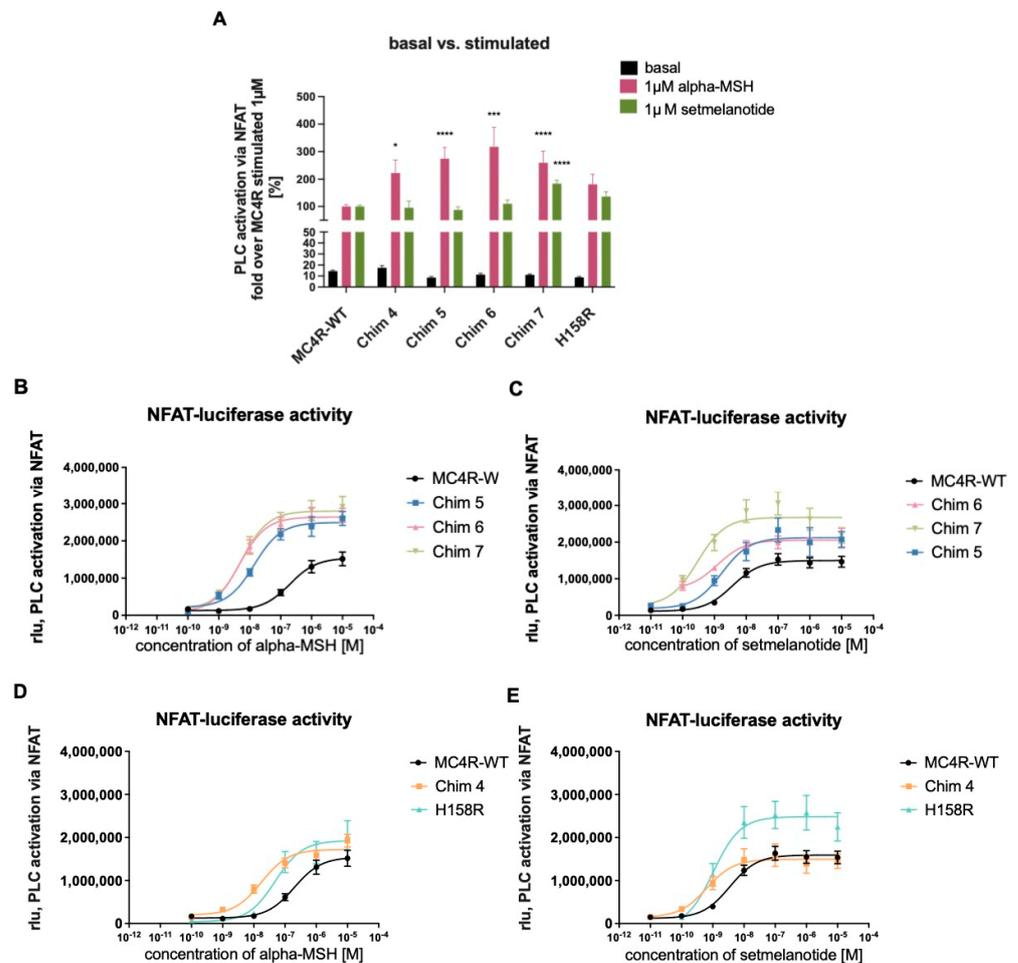
#### 3.3.1. Chimeric Receptors Exhibited Similar Basal Activity and Increased Efficacy as Well as Improved Potency Compared to MC4R-WT

Next, all chimeric receptors and the H158R mutation were tested for  $G_{q/11}$  signaling properties. For this purpose, we conducted reporter gene assays, measuring phospholipase C (PLC) activity through nuclear factor of activated T cell (NFAT) responsive element

(Figure 4). All tested MC4R/CB1R chimeras showed similar basal  $G_{q/11}$  activity compared to MC4R-WT. Chim 4, Chim 5, Chim 6, and Chim 7 exhibited significantly elevated PLC activation via  $G_{q/11}$  after alpha-MSH stimulation (1  $\mu$ M). The mutation H158R also exhibited higher efficacy ( $E_{max}$ ) compared to MC4R-WT. Setmelanotide stimulation only led to a significant increase in efficacy for Chim 7, compared to MC4R-WT (Figure 4A). Table 1 shows the evaluation of chimeric receptor  $G_{q/11}$  signaling capacities compared to MC4R-WT after challenge with alpha-MSH or setmelanotide. The values are derived from concentration response experiments (Figure 4B–E). Reduced homodimerization results in a prominent effect on receptor potency. Intriguingly,  $EC_{50}$  values of Chim 6 ( $5.85 \pm 1.29$  nM) and of Chim 7 ( $6.33 \pm 1.1$  nM) after alpha-MSH stimulation were similar to  $EC_{50}$  of MC4R-WT after setmelanotide challenge ( $4.04 \pm 0.5$  nM). Of note, all chimeric receptors as well as the H158R mutation presented improved potency, compared to MC4R-WT  $EC_{50}$  value after alpha-MSH and after setmelanotide stimulation. Significant decrease in potency could be shown for Chim 4, Chim 6, and Chim 7 after alpha-MSH stimulation and for Chim 4 and Chim 7 after setmelanotide challenge, compared to MC4R-WT. The effects of impaired MC4R homodimerization on  $G_{q/11}$  signaling were also assessed through calculating the signaling bias. In particular, after alpha-MSH stimulation, all chimeric receptors and the H158R mutation showed a strong bias towards PLC activation compared to MC4R-WT. Chimeric receptors and H158R mutation also demonstrated a bias towards PLC activation after challenge with setmelanotide (Table 1).

**Table 1. Efficacy ( $E_{max}$ ), potency ( $EC_{50}$ ), and bias of ligand stimulated MC4R-WT, chimeric receptors, and H158R.** Concentration–response curves were used to determine potency under alpha-MSH and setmelanotide stimulation. Data are given as the result of four to nine independent experiments performed in triplicate. Values represent mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with Kruskal–Wallis test comparing  $E_{max}$  of WT to variants or  $EC_{50}$  of WT to the variants. Statistical significance is indicated by a \*  $p < 0.05$ , b \*\*  $p < 0.01$ , c \*\*\*  $p < 0.001$ , and d \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . For calculation of bias, MC4R-WT serves as a reference and is plotted at a value of 1. The bias (chimeras versus MC4R) is stronger after alpha-MSH stimulation than after setmelanotide stimulation. The values are derived from  $EC_{50}$  and  $E_{max}$  values and originate from the concentration–response curves. Data are given as a result of four to nine independent experiments performed in triplicate. Data of relative dimerization compared to WT originates from Figure 2 NanoBRET™ data.

MC4R-WT/ MC4R/CB1R Chimera	Alpha-MSH			Setmelanotide			NanoBRET™
	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M (Fold over MC4R-WT Stimulated 1 $\mu$ M)	$EC_{50}$ (nM)	Bias	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M (Fold over MC4R-WT Stimulated 1 $\mu$ M)	$EC_{50}$ (nM)	Bias	Relative Dimerization Compared to WT
MC4R-WT	100	$264 \pm 65.9$	1	100	$4.04 \pm 0.5$	1	0
Chim 4	$222.32 \pm 47.50$ a	$14.7 \pm 6.69$ a	39.89	$115.16 \pm 15.10$	$0.71 \pm 0.17$ c	3.05	−32.55
Chim 5	$274.42 \pm 41.18$ d	$16.4 \pm 6.06$	44.22	$87.31 \pm 11.58$	$1.46 \pm 0.38$	6.58	−41.83
Chim 6	$317.48 \pm 70.5$ c	$5.85 \pm 1.29$ b	<b>143.14</b>	$109.76 \pm 13.20$	$1.25 \pm 0.11$	2.41	−15.19
Chim 7	$259.59 \pm 42.18$ d	$6.33 \pm 1.1$ c	<b>108.13</b>	$182.83 \pm 13.18$ d	$0.43 \pm 0.12$ d	17.32	−41.19
H158R	$180.32 \pm 37.67$	$49.2 \pm 11.2$	9.67	$135.93 \pm 17.16$	$1.8 \pm 0.68$	3.05	−28.94

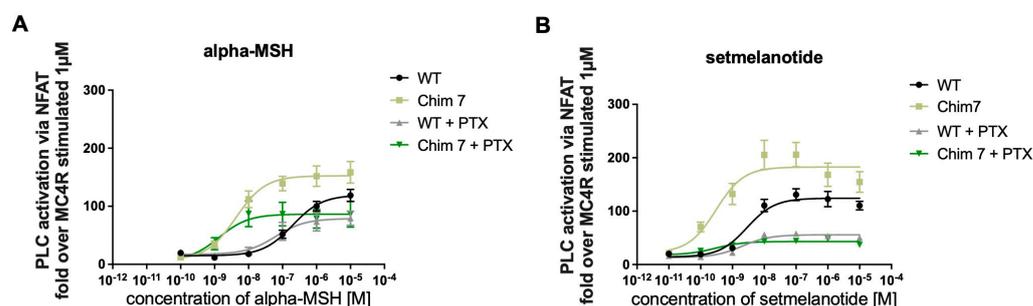


**Figure 4.**  $G_{q/11}$  signaling of chimeric receptors and the H158R mutation compared to MC4R-WT. NFAT-reporter gene assay quantifying relative light units (rlu) to determine  $G_{q/11}$  signaling capacities. HEK 293 cells were transfected with MC4R-WT, chimeric receptors, or H158R mutation. (A) Basal activity and 1  $\mu$ M stimulated values of chimeric receptors and the H158R mutation compared to MC4R-WT. Basal activity of chimeric receptors is very similar to MC4R-WT. Chim 4, Chim 5, Chim 6, and Chim 7 displayed significant alpha-MSH induced increase in  $G_{q/11}$  activity compared to alpha-MSH stimulated MC4R-WT. Values represent fold over 1  $\mu$ M stimulated MC4R-WT. For statistical analysis, a one-way ANOVA with Kruskal–Wallis test was performed, comparing MC4R-WT to chimeric receptors and the H158R mutation. Values represent mean  $\pm$  SEM. Statistical significance is indicated by \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Concentration response curves of Chim5, Chim 6, and Chim 7 cells were stimulated with different concentrations of (B) alpha-MSH or (C) setmelanotide. Concentration response curves of Chim 4 and H158R mutation were stimulated with different concentrations of (D) alpha-MSH or (E) setmelanotide. Data are given as raw rlu. Data represent WT (alphaMSH  $n = 10$ , setmelanotide  $n = 17$ ), H158R ( $n = 4$ ), Chim 4 (alpha-MSH  $n = 5$ , setmelanotide  $n = 7$ ), Chim 5 ( $n = 4$ ), Chim 6 (alpha-MSH  $n = 4$ , setmelanotide  $n = 3$ ), and Chim 7 (alpha-MSH  $n = 9$ , setmelanotide = 10) experiments, each performed in triplicate. Values represent mean  $\pm$  SEM.  $E_{max}$  and  $EC_{50}$  values are summarized in Table 1.

### 3.3.2. Treatment with Pertussis Toxin (PTX) to Discriminate between $G_{q/11}$ and $G_i\beta\gamma$ Activation of PLC

PLC activation can be a mixture of  $G_{q/11}$  activation and activation of  $\beta\gamma$ -subunits of  $G_{i/0}$  [29]. In order to determine whether the increase in PLC activation in chimeric receptors can fully be attributed to  $G_{q/11}$  activation, additional NFAT experiments were conducted including MC4R-WT and Chim 7. Cells were pretreated with pertussis toxin (PTX), a  $G_{i/0}$  inhibitor. In the presence of PTX, the  $G_{i/0}$  subunits are locked in their inactivate state,

blocking this pathway [30]. Concentration–response curves after alpha-MSH challenge in the presence of PTX demonstrated a similar efficacy for MC4R-WT compared to signaling in the absence of PTX. For Chim 7, a reduction in efficacy compared to non-PTX treatment (significant) was observed. A shift towards lower  $EC_{50}$  values, indicating a significant decrease in potency for Chim 7 occurred, but not for MC4R-WT (Figure 5A, Table 2). After setmelanotide stimulation, the potency was only decreased for MC4R-WT but not for Chim 7 when comparing non-PTX to PTX data. As for efficacy, MC4R-WT as well as Chim 7 exhibited reduced maximal signaling via  $G_{q/11}$  in the case of  $G_{i/0}$  blockage through PTX (Figure 5B, Table 2). Focusing on the alpha-MSH, the natural endogenous ligand of MC4R, PTX treatment appeared to affect receptor efficacy more than it affected receptor potency. The blocking of  $G_{i/0}$  subunits led to a significant shift towards lower  $EC_{50}$  values for Chim 7 after alpha-MSH stimulation, indicating an increase in  $G_{q/11}$  signaling for Chim 7.



**Figure 5.** NFAT reporter gene assay investigating signaling profile of PTX pretreated MC4R-WT and Chim 7. Calcium mobilization was measured using NFAT reporter gene assay. HEK293 cells were pretreated with PTX or not, assessing possible increase in  $Ca^{2+}$  due to  $G_i$  signaling effects. Data are given in percentage of MC4R-WT-WT signaling. Cells were stimulated with (A) alpha-MSH (fold over MC4R-WT at 1  $\mu$ M was set as 100%) or with (B) setmelanotide (fold over MC4R-WT at 1  $\mu$ M was set as 100%).  $E_{max}$  and  $EC_{50}$  values are summarized in Table 2. Data represent two to nine independent experiments, each performed in triplicate. Values represent mean  $\pm$  SEM.

**Table 2.** Potency ( $EC_{50}$ ) of ligand stimulated MC4R-WT and Chim 7 including PTX pretreatment. Concentration-response curves were used to determine potency under alpha-MSH and setmelanotide stimulation. Data are given as the result of two to nine independent experiments performed in triplicate. Values represent mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test comparing  $E_{max}$  of WT or Chim 7 to respective WT + PTX or Chim 7 + PTX. The same testing was performed for statistical  $EC_{50}$  analysis and comparison. Statistical significance is indicated by \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.0001$ .

MC4R-WT/Chim7	Alpha-MSH		Setmelanotide	
	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M (Fold over MC4R-WT Stimulated 1 $\mu$ M)	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ at 1 $\mu$ M (Fold over MC4R-WT Stimulated 1 $\mu$ M)	$EC_{50}$ (nM)
MC4R-WT	100	264 $\pm$ 65.9	100	4.04 $\pm$ 0.5
MC4R-WT + PTX	96.98 $\pm$ 14.22	396 $\pm$ 313	70.26 $\pm$ 9.13 **	1.91 $\pm$ 0.36 *
Chim 7	259.59 $\pm$ 42.18	6.33 $\pm$ 1.1	182.83 $\pm$ 13.18	0.43 $\pm$ 0.12
Chim 7 + PTX	100.26 $\pm$ 13.8 **	1.8 $\pm$ 0.51 *	67.17 $\pm$ 12.40 ****	0.45 $\pm$ 0.08

#### 4. Discussion

The MC4R plays an essential role in weight regulation. Therefore, targeting the MC4R for anti-obesity treatment appeared obvious, but was rather unsuccessful for a long time [31]. The MC4R is a promiscuous receptor and able to activate different G proteins, thus presenting a broad signaling profile [25]. Subsequently, it is highly important to characterize the receptors' full pharmacological profile and interaction capability. In this study, we analyzed effects of MC4R homodimerization on  $G_{q/11}$  subunit signaling, which appears to be a promising target regarding obesity treatment [12].

We recently showed dimer separation of the MC4R has a positive effect on  $G_s$  signaling. The study detected that multiple and single substitutions in the THM3-ICL2-TMH4 intra-

cellular region of the MC4R inhibit dimerization, showing that these regions are important for homodimer formation. Hindering dimer formation led to an increase in basal and stimulated  $G_s$  signaling. These experiments were performed using COS-7 cells, and only  $G_s$  signaling was investigated [21].

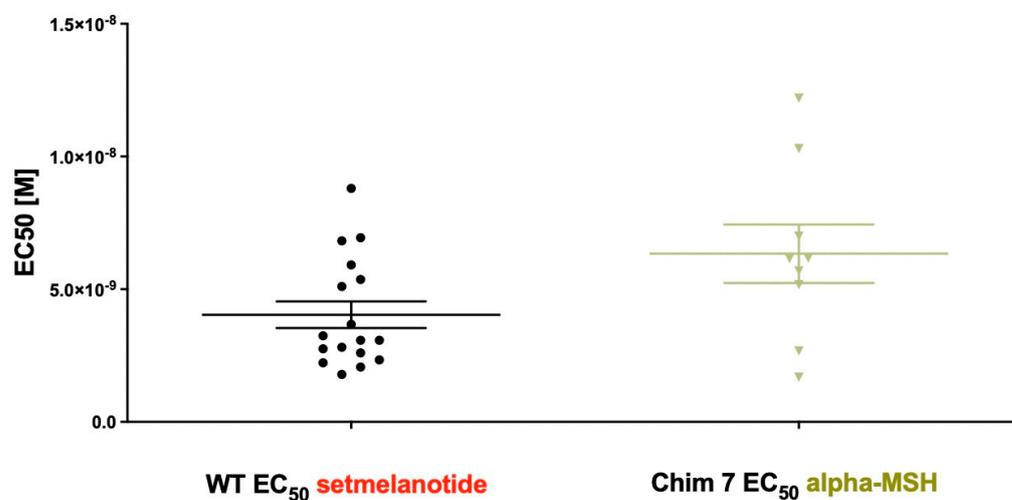
These findings could be replicated in the present study using HEK293 cells and the GloSensor™ technique, enabling live cell measurements. HEK293 cells are well established in GPCR research as they do not express the various MC receptors (MC1R–MC5R) [32]. COS-7 cells are derived from African green monkey (*Chlorocebus aethiops*) cell line [33], whereas HEK293 cells are derived from the human kidney cell line [34]. HEK 293 cell line is superior to COS-7 cells as this cell model allows for a closer approximation to human physiology, although in order to study MC4R function, it is still by far not optimal. One limitation of this model is that HEK293 cells cannot provide the same physiological setting that is present in the hypothalamic (*paraventricular nucleus*), where most MC4R activity related to weight regulation is anticipated [10]. Additionally, the marginal presence of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) in HEK293 cells, which possibly influences MC4R signaling and is discussed in detail below, should be taken into consideration [35,36].

Due to recent studies discussing the prominent role of the  $G_{q/11}$  activation, in terms of regulating energy homeostasis, it was compelling to investigate whether these findings also apply for MC4R dimer separation [7,26]. In this study, we showed that by inducing dimer separation,  $G_{q/11}$  subunit signaling was increased. Chim 6 and Chim 7 showed strongly decreased  $EC_{50}$  values after alpha-MSH stimulation compared to MC4R-WT potency. Setmelanotide was first approved in November 2020 by the U.S. FDA (USA) and is a novel medication for treating obesity caused by *POMC* and *LEPR* deficiency [37]. This cyclic peptide is a MC4R agonist that shows a strong bias towards  $G_{q/11}$  [7]. So far, study results showed that setmelanotide is not as effective in rescuing signaling in MC4R mutation patients, as it is in the treatment of *POMC* and *LEPR* deficiency [38]. Among other things, a reason for this might be that certain mutations can alter the receptor ligand binding domain, making it impossible for the ligand to bind to the mutated MC4R. Therefore, it was highly interesting to prove if MC4R dimer hindrance can have comparable effects on receptor potency compared to setmelanotide. Experimental results on the MC4R H158R mutation are in line with already existing data on the H158R, showing a bias towards  $G_{q/11}$  activation upon alpha-MSH stimulation [25]. We further provide data on the specificity of the H158R homodimer formation via NanoBRET™, which has not been shown before (Figure S1).

In recent years, studies have revealed that GPCRs are expressed as a mixture of monomers and dimers, thus affecting the way how GPCR signal transduction occurs, e.g., [38,39]. New data identified that the expression pattern of monomer and dimer formation can be dynamic. For the corticotropin-releasing factor receptor type 1a, a monomer/dimer equilibrium was identified. These data suggest that other GPCRs might exist in a state of a monomer/dimer equilibrium [40,41]. Such data are currently not available for MC4R. Therefore, it would be of high importance to find out to what extent the MC4R exists in a dimeric state (homo- or hetero-dimeric states) to allow better characterization of the benefits that the induction of MC4R dimer separation might have on downstream signaling effects.

It is striking that the induction of dimer separation had such a prominent effect on ligand-induced  $G_{q/11}$  signaling potency, as Chim 7 activated with alpha-MSH is comparable to MC4R-WT stimulated with setmelanotide (Figure 6). A possible explanation why dimer separation could lead to increased signaling capacities might be MC4R/G protein stoichiometry. In a dimeric state, only one G protein molecule can access the receptor dimer, due to steric reasons (stoichiometry 2:1). A monomerized receptor is able to couple one G protein molecule to each receptor (stoichiometry 2:2); this might cause higher signaling capacities due to doubled G protein activation [42]. This mechanism is important when wanting to discuss possibilities for therapeutical interventions. A protein of interest could be the accessory protein MRAP2. MRAP2 is hypothesized to interact with MC4R in

particular by causing steric separation of the MC4R homodimers. Results showed that co-expression of MRAP2 with MC4R enhances  $G_s$  signaling. This makes MRAP2 an interesting endogenous allosteric factor when discussing dimer separation and its benefits [36].



**Figure 6.** EC<sub>50</sub> of  $G_{q/11}$  signaling of MC4R-WT stimulated with setmelanotide compared to EC<sub>50</sub> of Chim 7 stimulated with alpha-MSH. Concentration–response curves were used to determine potency. EC<sub>50</sub> of MC4R-WT after setmelanotide stimulation ( $4.04 \pm 0.5$  nM) appeared similar to EC<sub>50</sub> of Chim 7 after alpha-MSH stimulation ( $6.33 \pm 1.1$  nM). Data are given as the result of 9 to 17 independent experiments performed in triplicate. Values represent mean  $\pm$  SEM.

Taken together, the study results provide information on the positive effect that inducing dimer separation of the MC4R has on  $G_s$  as well as  $G_{q/11}$  signaling capacities in human HEK293 cells. The results showed that dimer separation especially affects receptor potency, resulting in a shift towards lower EC<sub>50</sub> values. Further investigation on MC4R monomer/dimer equilibrium is required to fully understand possible benefits of this approach. Future experiments ought to focus on finding ways to successfully induce dimer separation of the MC4R, perhaps allowing dimer separation to become a means of therapeutical intervention, helping a broader spectrum of obese patients.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12081119/s1>, Figure S1: Donor saturation assays (DSA) investigating the specificity of receptor–receptor interaction of WT, Chim 7, and H158R.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.B., P.K., S.P.; methodology, N.R., H.B., S.P., S.J., C.C., F.H.; data analysis, N.R., S.P., H.B., P.S., P.K.; investigation, N.R., S.P., S.J., C.C., F.H.; resources, H.B., P.S.; data curation, N.R., H.B., S.P.; writing—original draft preparation, N.R., H.B., P.K.; writing—review and editing, N.R., H.B., S.P., P.S., P.K.; visualization, N.R.; supervision, P.K., H.B., S.P.; project administration H.B., P.K.; funding acquisition, P.S., H.B., P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (German Research Foundation) through SFB1423, project number 421152132, subproject B02 to H.B. and P.K. subprojects A01 and Z03 to P.S., and by project numbers 430971019 and 430970922 to P.K., as well as by the European Union’s Horizon 2020 MSCA Program under grant agreement 956314 (ALLODD) to P.S.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article or Supplementary Material. The data presented in this study are available in Table S1 “Source data file”.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Collaboration, N.R.F. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: A pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* **2017**, *390*, 2627–2642.
2. Blüher, M. Obesity: Global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 288–298. [[CrossRef](#)]
3. Bjerregaard, L.G.; Jensen, B.W.; Ängquist, L.; Osler, M.; Sørensen, T.I.; Baker, J.L. Change in Overweight from Childhood to Early Adulthood and Risk of Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 1302–1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Twig, G.; Yaniv, G.; Levine, H.; Leiba, A.; Goldberger, N.; Derazne, E.; Shor, D.B.-A.; Tzur, D.; Afek, A.; Shamiss, A.; et al. Body-Mass Index in 2.3 Million Adolescents and Cardiovascular Death in Adulthood. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 2430–2440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Arterburn, D.E.; Telem, D.A.; Kushner, R.F.; Courcoulas, A.P. Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review. *JAMA* **2020**, *324*, 879–887. [[CrossRef](#)]
6. Farooqi, I.S.; O'Rahilly, S. 20 YEARS OF LEPTIN: Human disorders of leptin action. *J. Endocrinol.* **2014**, *223*, T63–T70. [[CrossRef](#)]
7. Clément, K.; Vaisse, C.; Lahlou, N.; Cabrol, S.; Pelloux, V.; Cassuto, D.; Gourmelen, M.; Dina, C.; Chambaz, J.; Lacorte, J.-M.; et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **1998**, *392*, 398–401. [[CrossRef](#)]
8. Aslan, I.R.; A Ranadive, S.; A Ersoy, B.; Rogers, S.J.; Lustig, R.H.; Vaisse, C. Bariatric surgery in a patient with complete MC4R deficiency. *Int. J. Obes.* **2010**, *35*, 457–461. [[CrossRef](#)]
9. Poitou, C.; Puder, L.; Dubern, B.; Krabusch, P.; Genser, L.; Wiegand, S.; Verkindt, H.; Köhn, A.; von Schwartzberg, R.J.; Flück, C.; et al. Long-term outcomes of bariatric surgery in patients with bi-allelic mutations in the POMC, LEPR, and MC4R genes. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **2021**, *17*, 1449–1456. [[CrossRef](#)]
10. Cone, R.D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 571–578. [[CrossRef](#)]
11. Kühnen, P.; Clément, K.; Wiegand, S.; Blankenstein, O.; Gottesdiener, K.; Martini, L.L.; Mai, K.; Blume-Peytavi, U.; Grüters, A.; Krude, H. Proopiomelanocortin Deficiency Treated with a Melanocortin-4 Receptor Agonist. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 240–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Clément, K.; Biebermann, H.; Farooqi, I.S.; Van Der Ploeg, L.; Wolters, B.; Poitou, C.; Puder, L.; Fiedorek, F.; Gottesdiener, K.; Kleinau, G.; et al. MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 551–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vaisse, C.; Clément, K.; Durand, E.; Hercberg, S.; Guy-Grand, B.; Froguel, P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J. Clin. Investig.* **2000**, *106*, 253–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Farooqi, I.S.; Yeo, G.S.; Keogh, J.M.; Aminian, S.; Jebb, S.A.; Butler, G.; Cheetham, T.; O'Rahilly, S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J. Clin. Investig.* **2000**, *106*, 271–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Heyder, N.; Kleinau, G.; Szczepek, M.; Kwiatkowski, D.; Speck, D.; Soletto, L.; Cerdá-Reverter, J.M.; Krude, H.; Kühnen, P.; Biebermann, H.; et al. Signal Transduction and Pathogenic Modifications at the Melanocortin-4 Receptor: A Structural Perspective. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 515. [[CrossRef](#)]
16. Maggio, R.; Vogel, Z.; Wess, J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 3103–3107. [[CrossRef](#)]
17. Angers, S.; Salahpour, A.; Bouvier, M. Dimerization: An Emerging Concept for G Protein-Coupled Receptor Ontogeny and Function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 409–435. [[CrossRef](#)]
18. İşbilir, A.; Möller, J.; Arimont, M.; Bobkov, V.; Perpiñá-Viciano, C.; Hoffmann, C.; Inoue, A.; Heukers, R.; de Graaf, C.; Smit, M.J.; et al. Advanced fluorescence microscopy reveals disruption of dynamic CXCR4 dimerization by subpocket-specific inverse agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 29144–29154. [[CrossRef](#)]
19. Rediger, A.; Tarnow, P.; Bickenbach, A.; Schaefer, M.; Krude, H.; Grüters, A.; Biebermann, H. Heterodimerization of Hypothalamic G-Protein-Coupled Receptors Involved in Weight Regulation. *Obes. Facts* **2009**, *2*, 80–86. [[CrossRef](#)]
20. Biebermann, H.; Krude, H.; Elsner, A.; Chubanov, V.; Gudermann, T.; Grüters, A. Autosomal-Dominant Mode of Inheritance of a Melanocortin-4 Receptor Mutation in a Patient with Severe Early-Onset Obesity Is Due to a Dominant-Negative Effect Caused by Receptor Dimerization. *Diabetes* **2003**, *52*, 2984–2988. [[CrossRef](#)]
21. Piechowski, C.L.; Rediger, A.; Lagemann, C.; Mühlhaus, J.; Müller, A.; Pratzka, J.; Tarnow, P.; Grüters, A.; Krude, H.; Kleinau, G.; et al. Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop 2. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *51*, 109–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gantz, I.; Miwa, H.; Konda, Y.; Shimoto, Y.; Tashiro, T.; Watson, S.J.; Delvalle, J.; Yamada, T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*. [[CrossRef](#)]
23. Heyder, N.A.; Kleinau, G.; Speck, D.; Schmidt, A.; Paisdzior, S.; Szczepek, M.; Bauer, B.; Koch, A.; Gallandi, M.; Kwiatkowski, D.; et al. Structures of active melanocortin-4 receptor-Gs-protein complexes with NDP- $\alpha$ -MSH and setmelanotide. *Cell Res.* **2021**, *31*, 1176–1189. [[CrossRef](#)]
24. Israeli, H.; Degtjarik, O.; Fierro, F.; Chunilal, V.; Gill, A.K.; Roth, N.J.; Botta, J.; Prabahar, V.; Peleg, Y.; Chan, L.F.; et al. Structure reveals the activation mechanism of the MC4 receptor to initiate satiation signaling. *Science* **2021**, *372*, 808–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Paisdzior, S.; Dimitriou, I.M.; Schöpe, P.C.; Annibale, P.; Scheerer, P.; Krude, H.; Lohse, M.J.; Biebermann, H.; Kühnen, P. Differential Signaling Profiles of MC4R Mutations with Three Different Ligands. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Li, Y.Q.; Shrestha, Y.; Pandey, M.; Chen, M.; Kablan, A.; Gravrilo, O.; Offermanns, S.; Weinstein, L.S. G(q/11) $\alpha$  and G(s) $\alpha$  mediate distinct physiological responses to central melanocortins. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 40–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kenakin, T.P. A Scale of Agonism and Allosteric Modulation for Assessment of Selectivity, Bias, and Receptor Mutation. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *92*, 414–424. [[CrossRef](#)]
28. Sawyer, T.K.; Sanfilippo, P.J.; Hruby, V.J.; Engel, M.H.; Heward, C.B.; Burnett, J.B.; E Hadley, M. 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone: A highly potent  $\alpha$ -melanotropin with ultralong biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 5754–5758. [[CrossRef](#)]
29. Boyer, J.L.; Graber, S.G.; Waldo, G.L.; Harden, T.K.; Garrison, J.C. Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein  $\alpha$ - and  $\beta$   $\gamma$ -subunits. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*. [[CrossRef](#)]
30. Katada, T. The Inhibitory G Protein Gi Identified as Pertussis Toxin-Catalyzed ADP-Ribosylation. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 2103–2111. [[CrossRef](#)]
31. Kühnen, P.; Krude, H.; Biebermann, H. Melanocortin-4 Receptor Signalling: Importance for Weight Regulation and Obesity Treatment. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 136–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rached, M.; El Mourabit, H.; Buronfosse, A.; Blondet, A.; Naville, D.; Begeot, M.; Penhoat, A. Expression of the human melanocortin-2 receptor in different eukaryotic cells. *Peptides* **2005**, *26*, 1842–1847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hancock, J.F. COS Cell Expression. *Methods Mol. Biol.* **1992**, *8*, 153–158. [[PubMed](#)]
34. Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**, *36*, 59–74. [[CrossRef](#)]
35. Sebag, J.A.; Zhang, C.; Hinkle, P.M.; Bradshaw, A.M.; Cone, R.D. Developmental Control of the Melanocortin-4 Receptor by MRAP2 Proteins in Zebrafish. *Science* **2013**, *341*, 278–281. [[CrossRef](#)]
36. Schonnop, L.; Kleinau, G.; Herrfurth, N.; Volckmar, A.-L.; Cetindag, C.; Müller, A.; Peters, T.; Herpertz, S.; Antel, J.; Hebebrand, J.; et al. Decreased melanocortin-4 receptor function conferred by an infrequent variant at the human melanocortin receptor accessory protein 2 gene. *Obesity* **2016**, *24*, 1976–1982. [[CrossRef](#)]
37. Clément, K.; Akker, E.V.D.; Argente, J.; Bahm, A.; Chung, W.K.; Connors, H.; De Waele, K.; Farooqi, I.S.; Gonneau-Lejeune, J.; Gordon, G.; et al. Efficacy and safety of setmelanotide, an MC4R agonist, in individuals with severe obesity due to LEPR or POMC deficiency: Single-arm, open-label, multicentre, phase 3 trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2020**, *8*, 960–970. [[CrossRef](#)]
38. Collet, T.H.; Dubern, B.; Mokrosinski, J.; Connors, H.; Keogh, J.M.; Mendes de Oliveira, E.; Henning, E.; Poitou-Bernert, C.; Oppert, J.M.; Tounian, P.; et al. Evaluation of a melanocortin-4 receptor (MC4R) agonist (Setmelanotide) in MC4R deficiency. *Mol. Metab.* **2017**, *6*, 1321–1329. [[CrossRef](#)]
39. Terrillon, S.; Bouvier, M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 30–34. [[CrossRef](#)]
40. Kasai, R.S.; Suzuki, K.G.N.; Prossnitz, E.R.; Koyama-Honda, I.; Nakada, C.; Fujiwara, T.K.; Kusumi, A. Full characterization of GPCR monomer–dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 463–480. [[CrossRef](#)]
41. Teichmann, A.; Gibert, A.; Lampe, A.; Grzesik, P.; Rutz, C.; Furkert, J.; Schmoranzler, J.; Krause, G.; Wiesner, B.; Schüle, R. The Specific Monomer/Dimer Equilibrium of the Corticotropin-releasing Factor Receptor Type 1 Is Established in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 24250–24262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kleinau, G.; Heyder, N.A.; Tao, Y.-X.; Scheerer, P. Structural Complexity and Plasticity of Signaling Regulation at the Melanocortin-4 Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Komplette Publikationsliste

1. Reininghaus N, Paisdzior S, Höpfner F, Jyrch S, Cetindag C, Scheerer P, Kühnen P, Biebermann H. A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation. *Biomolecules*. 2022;12(8).

**Impact Factor:** 6.064

2. Höpfner F, Paisdzior S, Reininghaus N, Sohail I, Scheerer P, Annibale P, Biebermann H, Kühnen P. Evaluation of Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Nonsense Mutations by Aminoglycoside. *Life (Basel)*. 2022;12(11).

**Impact Factor:** 3.253

## Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. med. Kühnen für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Übernahme meiner Betreuung und seine profunde Expertise aus der klinischen Forschung, um bei diesem, doch sehr grundlagenforschungsbasierten Thema, die Brücke zum klinischen Alltag zu schlagen.

Ein ebenso großer Dank gilt auch Prof. Dr. Heike Biebermann für die unendlich wertschätzende Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Besonders hervorheben möchte ich ihre ansteckende und mitreißende Begeisterung für das Projekt, die nicht lediglich inhaltliche, sondern auch moralisch wertvolle Unterstützung sowie die stets prompten Rückmeldungen auf Fragen jeglicher Art. Danke für alles, was ich von dir lernen durfte! An dieser Stelle auch ein großer Dank an Dr. rer. nat. Paisdzior für das geduldige Heranführen zur Durchführung aller für die Arbeit so wichtigen Experimente und deine unterstützend aufmunternden Worte, wenn es einmal nicht so geklappt hat. Ohne deine Tipps und Tricks hätte ich oft nicht mehr weiter gewusst. Von dir habe ich gelernt, den Mut in schwierigen Phasen nicht zu verlieren und die Freude und Motivation an der Laborarbeit stets beizubehalten.

Ebenso möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie der Charité für die schöne Zeit, in der ich Teil des Teams war, danken. Hier besonders erwähnen möchte ich Sabine und Cigdem, die es geschafft haben, mich sogar aus aussichtslos erscheinenden Sackgassen heraus zu manövrieren. Danke für eure tatkräftige Unterstützung.

Bei allen Kooperationspartnern möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken. Danke an Dr. Scheerer für seine Unterstützung des Projekts, insbesondere in der kritischen Endphase des Feinschliffes vor Einreichung des Manuskriptes.

Zuletzt gilt mein Dank auch meiner Familie, danke, dass ihr mich während der schönen, aber auch anstrengenden Phasen des Studiums und der Doktorarbeit fortwährend unterstützt habt.