

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

## DISSERTATION

Die funktionelle Relevanz von Oligomerisierung *in vitro* und *in vivo* am Beispiel von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der hypothalamischen Gewichtsregulation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Leonie Piechowski  
aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract .....	2
2. Einleitung .....	4
2.1 Übergewicht und Adipositas sind ein globales Gesundheitsproblem .....	4
2.2 Hypothalamische Gewichtsregulation .....	5
2.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	6
2.3.1 <i>Melanocortin-4-Rezeptor</i> .....	7
2.3.2 <i>Melanocortin-3-Rezeptor</i> .....	7
2.3.3 <i>Growth-Hormone-Secreteagogue-Rezeptor / Ghrelin-Rezeptor</i> .....	8
2.3.4 <i>G-Protein-gekoppelter Rezeptor 83</i> .....	8
2.3.5 <i>GPCR-Interaktionen in der Gewichtsregulation</i> .....	9
3. Zielstellungen .....	9
3.1 Charakterisierung des MC4R-Homodimers.....	10
3.2 Untersuchung der funktionellen Relevanz des MC3R/GHSR-Heterodimers ...	10
3.3 Untersuchung eines potenziell in der Gewichtsregulation involvierten GPCRs - der orphanen GPR83 .....	10
4. Methodik.....	11
5. Ergebnisse .....	12
5.1 Homodimerisierung des MC4R inhibiert dessen Signalisierungskapazität.....	12
5.2 Gegensätzliche Beeinflussung der Signalisierung zwischen MC3R und GHSR in Heterooligomeren .....	13
5.3 Der GPR83 ist in der Lage, mit den an der Gewichtsregulation beteiligten Rezeptoren, GHSR und MC3R, zu interagieren, und beeinflusst deren Signalisierungskapazität.....	14
6. Diskussion.....	15
6.1 Identifikation von Interaktionsbereichen des MC4R-Homodimers und erhöhte Signalisierungseigenschaften nach Oligomer-Separierung.....	15
6.2 Oligomerisierung von GPCRs spielt eine funktionelle Rolle .....	16

---

6.3	Die potenzielle Funktion des GPR83 in der Gewichtsregulation konnte durch identifizierte Heterodimere bestärkt werden .....	17
6.4	Schlussbetrachtungen.....	18
7.	Literaturverzeichnis .....	20
8.	Eidesstattliche Versicherung .....	28
9.	Anteilerklärung.....	29
10.	Druckexemplare der ausgewählten Publikation .....	31
10.1	Publikation 1:..... Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop two. ( <i>J Mol Endocrinol. 2013</i> ).....	31
10.2	Publikation 2:..... Mutually Opposite Signal Modulation by Hypothalamic Heterodimerization of Ghrelin and Melanocortin-3 Receptors. ( <i>J Biol Chem. 2011</i> ) .....	32
10.3	Publikation 3:..... The orphan receptor Gpr83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms. ( <i>Nat Commun. 2013</i> ) .....	33
11.	Curriculum Vitae.....	34
12.	Publikationsliste.....	36
13.	Danksagung .....	38
14.	Anhang.....	39

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abk.</b>	<b>Abkürzung</b>
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
Abb	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AgRP	Agouti-related Protein
Ala	Alanin
ARC	Nucleus arcuatus
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BiFC	Biomolekulare Fluoreszenzkomplementation Assay
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
CB1R	Cannabinoid-1-Rezeptor (Gen <i>CNR1</i> )
COS-7	Nierenzellen der grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethiops</i>
DAG	Diacylglycerol
DAP	2,3-Diaminophenazin
DMV	dorsomedialer Hypothalamus
ECL	extrazelluläre Schleife (extracellular loop)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FLAG	spezifischer Protein-Tag (AS-Sequenz: DYKDDDDK)
GHSR	Ghrelin-Rezeptor (Growth hormone secretagogue receptor)
Glu	Glutaminsäure
GOAT	Ghrelin-O-Acyltransferase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein-coupled receptor)
GPR83	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 83
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
HA	Hämagglutinin (Protein-Tag (AS-Sequenz: YPYDVPDYA))

---

His	Histidin
ICL	intrazelluläre Schleife (intracellular loop)
IP3	Inositoltrisphosphat
LEP	Leptin
LEPR	Leptin-Rezeptor
Leu	Leucin
LHA	lateraler Hypothalamus (lateral hypothalamic area)
MC3R	Melanocortin-3-Rezeptor (melanocortin-3 receptor)
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor (melanocortin-4 receptor)
NPY	Neuropeptid Y
NPY2R	Neuropeptid-Y-Rezeptor Y2
OPD	o-Phenylendiamin
PCSK1	Proprotein-Convertase 1 (Prohormone convertase-1)
Phe	Phenylalanin
PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon (melanocyte-stimulating hormone)
NPBWR1	Neuropeptid-B/W-Rezeptor 1
SDS	Standard-Deviation-Score
Tab	Tabelle
TMH	Transmembranhelix
YFP	Gelb-Fluoreszierendes-Protein (Yellow Fluorescent Protein)
WHO	World Health Organization

## 1.1 Zusammenfassung

Übergewicht und Adipositas gehören zu den größten Gesundheitsproblemen weltweit. Die damit assoziierten Störungen sind schwerwiegend und gegenwärtig sind keine adäquaten Therapien für langanhaltende Gewichtsreduktionen verfügbar. Um hierfür geeignete Ansatzpunkte zu finden, ist die Kenntnis regulatorischer Abläufe innerhalb der Appetitregulation eine zwingende Voraussetzung. Die übergeordnete Regulation der Nahrungsaufnahme erfolgt zentral im Hypothalamus. Ein homologes Netzwerk aus Rezeptoren und ihrer Liganden ermöglicht eine individuelle Koordinierung von Energiezufuhr und Energieumsetzung. Unter anderem spielen hier Vertreter der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) eine bisher nur in Ansätzen verstandene Rolle. GPCRs sind Angriffspunkt für ca. 50 % aller bisher bekannten pharmakologischen Wirkstoffe, da sie ideale Kandidaten für gezielte Eingriffe in physiologische und pathophysiologische Prozesse sind.

Im Hypothalamus sind unter anderem der Melanocortin-3-Rezeptor (MC3R), Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) und der Ghrelin-Rezeptor (GHSR) in die Appetitregulation involviert. Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, für diese und weitere Rezeptoren potenzielle Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen und deren Einfluss auf die Signalisierungseigenschaften zu ermitteln. Dafür wurden verschiedene molekularbiologische Methoden angewandt, um Interaktionen nachzuweisen und Signalisierung zu quantifizieren.

Versuche mit spezifisch angefertigten Rezeptor-Chimären des MC4R deuten darauf hin, dass sich ein MC4R-Homodimer (zwei interagierende Rezeptor-Monomere) von einem Monomer in den Signalisierungscharakteristika unterscheidet, wobei auch ein möglicher Interaktionspunkt zwischen den Monomeren identifiziert werden konnte.

Ein Hauptergebnis dieser Forschungsarbeiten ist, dass bei Wechselwirkung zwischen MC3R und GHSR die Signalisierungskapazitäten gegenläufig beeinflusst werden. Die MC3R-Kapazität wird dabei verstärkt, die des GHSR inhibiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der GHSR und MC3R auch mit einem orphanen GPCR, dem G-Protein-gekoppelte Rezeptor 83 (GPR83) interagieren. Die GHSR-vermittelte Signalisierung wird ebenfalls durch den interagierenden GPR83 inhibiert, wohingegen die Signalisierungsfähigkeit des MC3R bei Interaktion mit dem GPR83 signifikant zunimmt.

Diese Arbeiten haben daher für verschiedene hypothalamisch lokalisierte GPCRs

demonstriert, dass sie gegenseitige Interaktionen eingehen können (Homo- und/oder Heterooligomere) und sich dabei direkt in ihrer Funktionalität beeinflussen. Dies bedeutet, dass bisherige Modelle unter singulärer Betrachtung dieser Rezeptoren nicht vollständig waren und ein komplexeres Funktions- und Steuerungsbild auch *in vivo* vorliegen könnte. Weiterhin ist daraus zu schlussfolgern, dass wechselseitige Beeinflussungen und das Zusammenspiel verschiedener Liganden und Rezeptoren ein viel genaueres Bild der Feinjustierung der Energiehomöostase liefern könnten, als bisher bekannt ist. Durch dieses Wissen ist auch eine genauere Zielstellung für die Entwicklung von pharmakologischen Wirkstoffen möglich, welche zum Beispiel auf eine simultane Beeinflussung von interagierenden GPCRs abzielen könnte. Perspektivisch könnte damit nicht nur eine erhöhte Effizienz, sondern auch eine verbesserte Gewebespezifität und damit eine Reduzierung von Nebenwirkungen erreicht werden.

## 1.2 Abstract

Adiposity is one of the main health problems encountered worldwide and is associated with severe illnesses. Adequate therapies for long-term weight reduction are currently unavailable. Thus, identifying the specific causal mechanisms of obesity is necessary in order to detect the level to intervene.

Energy homeostasis is centrally regulated in the hypothalamus by specific ligands and their receptors. For example, G-protein-coupled receptors (GPCRs) have been shown to have an important role in energy consumption and expenditure. However, the specific mechanisms through which GPCRs influence energy homeostasis remain unclear. In general, 50 % of pharmacological drugs target GPCRs; therefore, GPCRs constitute ideal sites of actions to implement specific interventions targeting pathophysiological processes.

Among other receptors, the melanocortin-3 receptor (MC3R), the melanocortin-4 receptor (MC4R) and the ghrelin receptor (GHSR) are involved in the hypothalamic regulation of appetite. The objective of this thesis was to analyze potential protein-protein interactions between these receptors as well as their influence on signaling properties. To do this, several molecular biological methods were used to identify the presence of interactions and to quantify the signaling properties.

Experiments using specifically designed MC4R chimeras indicated that the signaling characteristics of an MC4R-homodimer (two interacting receptor monomers) differ to

---

those of monomers, and possible interaction points between two monomers was detected.

One main result of this research is that there is a mutually opposite influence of the signaling capacity between MC3R and GHSR: as the capacity of the MC3R strongly increases, the GHSR capacity is inhibited. Furthermore it was shown that the GHSR and MC3R also interact with the orphan G-protein coupled receptor 83 (GPR83). Finally, during interactions with the GPR83, signaling capacity is inhibited for the GHSR whereas it is significantly enhanced for the MC3R.

These studies demonstrate that different hypothalamic localized GPCRs assume mutual interactions (homo- and/or heterooligomers) and directly influence each other's functionality. This means that previous models depicting interactions between these receptors under singular examination are not supported, and that a more complex function and regulation process *in vivo* could exist. Furthermore, it was shown that the interplay between different ligands and receptors, as well as their mutual interactions, could provide a more detailed pattern of the vernier adjustment of energy homeostasis than previously known models. This finding is a prerequisite for the development of pharmacological agents simultaneously targeting, for example, two interacting GPCRs. Such compounds could not only be more efficient, but could also have enhanced tissue specificity resulting in a reduction of side-effects.

## 2. Einleitung

### 2.1 Übergewicht und Adipositas sind ein globales Gesundheitsproblem

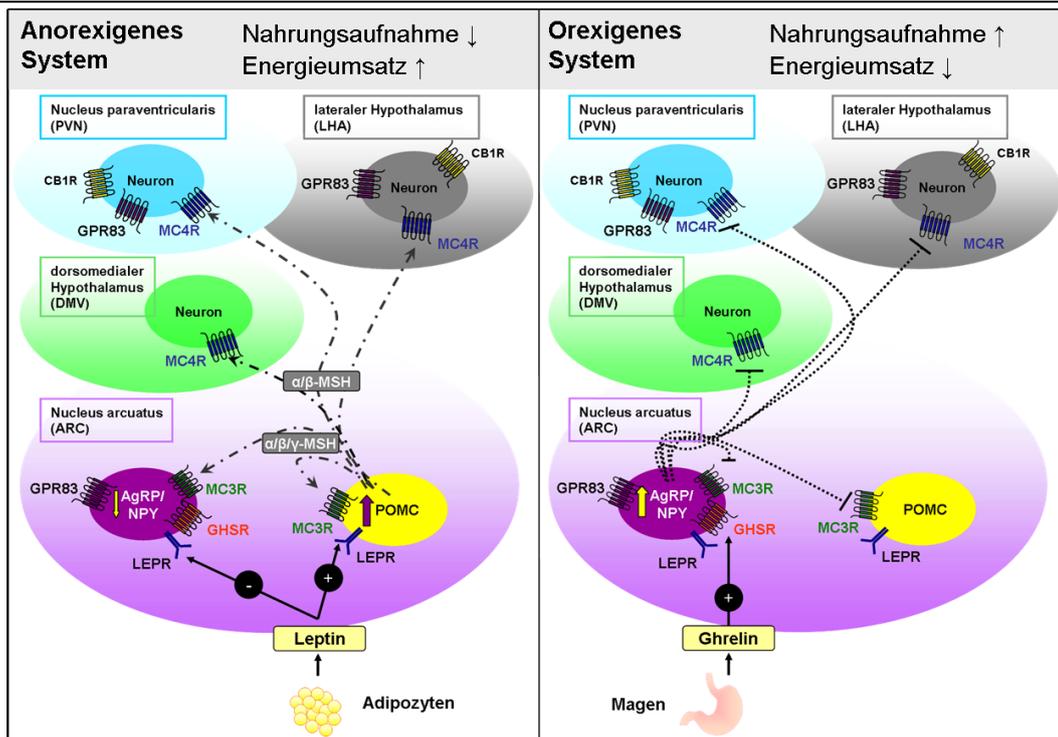
Adipositas ist durch überdurchschnittlich angereichertes Körperfett mit krankhaften Auswirkungen gekennzeichnet. Die World Health Organization (WHO) definiert einen Körpermassenindex (Body Mass Index / BMI - Quotient aus Gewicht und Körpergröße zum Quadrat ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )) ab 25 als übergewichtig und ab einem BMI von 30 als adipös (WHO, 2000). Bei Kindern erfolgt die Bestimmung des Übergewichts anhand geschlechtsspezifischen BMI-Altersperzentilen und alters- und geschlechtskorrigierten Standard-Deviation-Scores (SDS). Ab der 90. Perzentile gilt ein Kind als übergewichtig und oberhalb der 97. Perzentile als adipös (S2 Leitlinien, 2012). Die Prävalenzen von Übergewicht und Adipositas sind in den letzten Jahren stark gestiegen; mittlerweile werden weltweit eine Milliarde Erwachsene als adipös angesehen, das entspricht 14 % der Weltbevölkerung (Taskforce, 2010). Die physischen und psychischen Folgen des Übergewichtes sind schwerwiegend, häufig treten Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II und Herz-Kreislauf-Beschwerden auf (Rossen *et al.*, 2012). Ebenfalls werden bestimmte Krebsformen und eine erhöhte Mortalitätsrate mit starkem Übergewicht assoziiert (Donini *et al.*, 2012, Feneberg *et al.*, 2012). Bei Kindern und Jugendlichen treten häufig Komorbiditäten auf und daher ist dieses Problem im besonderen Maße zu beachten (Ebbeling *et al.*, 2002, Pulgaron, 2013).

Adipositas kann durch Umwelteinflüsse und genetische Faktoren verursacht werden. Zwillingsstudien ergaben, dass die Varianz des Körpergewichts zwischen 57 und 86 % durch Erbanlagen bestimmt wird. Hierbei besitzen gerade Kinder eine besondere Dynamik und werden stärker durch genetische Faktoren beeinflusst (Silventoinen *et al.*, 2009). Genetisch induzierte Adipositas lässt sich in monogene und polygene Adipositas unterteilen. In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten mehrere Genloci identifiziert werden, für die eine Assoziation mit Adipositas bestätigt werden konnte (Speliotes *et al.*, 2010). Die polygene Adipositas kann durch das Auftreten gleich mehrerer Genvarianten in diesen Loci induziert werden (Hinney *et al.*, 2010, Rojas *et al.*, 2012). Die monogene Adipositas hingegen kann durch einen einzelnen Gendefekt, in einem der bisher bekannten fünf Kandidatengene des wichtigsten Signalweges in der Appetitregulation, ausgelöst werden (Hinney *et al.*, 1997). Mutationen im Leptin (*LEP*) (Montague *et al.*, 1997), Leptin-Rezeptor (*LEPR*) (Clement *et al.*, 1998), Proprotein-Convertase 1 (*PCSK1*) (Jackson *et al.*, 1997), Proopiomelanocortin (*POMC*) (Krude *et*

al., 2003) oder dem Melanocortin-4-Rezeptor (*MC4R*) (Yeo *et al.*, 1998) können zu einem stark übergewichtigen Phänotyp führen.

## 2.2 Hypothalamische Gewichtsregulation

Das Körpergewicht wird durch Nahrungsaufnahme und Energieumsatz reguliert, dabei werden Hunger und Sättigung durch verschiedenste Signale gesteuert. Ein peripheres Signal wurde 1994 von Friedmann in Form des Hormons Leptin identifiziert (Zhang *et al.*, 1994). Leptin wird in Abhängigkeit zum vorhandenen Körperfett sezerniert, diese Entdeckung bot die Voraussetzung für die Aufklärung des Leptin-Melanocortin-Signalweges und dessen Bedeutung für die Regulation der Energiehomöostase (Maffei *et al.*, 1995). In Abbildung 1 wird schematisch die derzeitige bekannte hypothalamische Gewichtsregulation in Hinblick auf involvierte und in dieser Arbeit thematisierte GPCRs beschrieben. Der Signalweg kann in ein anorexigenes (Nahrungsaufnahme hemmendes) und ein orexigenes (Nahrungsaufnahme steigerndes) System unterteilt werden, welche über bestimmte Neuronen und Schlüsselproteine miteinander verknüpft sind. Zu den Schlüsselproteinen gehört das anorexigene Prohormon POMC, welches durch hohe Mengen an zirkulierendem Leptin exprimiert wird. Das Vorläuferprotein POMC wird posttranslational unter anderem zu  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Melanozyten-stimulierenden Hormonen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -MSH) prozessiert, die den anorexigenen MC4R und den autoregulatorisch wirkenden MC3R aktivieren (Begriffe *et al.*, 2013, Cowley *et al.*, 2001). Das orexigene System wird durch das im Magen sezernierte Hormon Ghrelin und dessen spezifischen Rezeptor (GHSR) aktiviert, indem die Expression der orexigenen Peptide Agouti-related Protein (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY) hochreguliert werden (Cowley *et al.*, 2003). AgRP bindet mit einer hohen Affinität am MC3R und MC4R, wodurch es zu einer Inhibierung beider Rezeptoren kommt (Begriffe *et al.*, 2013). Der MC4R nimmt eine exponierte Stellung im Leptin-Melanocortin-Regelkreis ein und bei 2 bis 6 % aller extrem übergewichtigen Kinder und Jugendlichen konnten Mutationen im MC4R-Gen identifiziert werden. Somit stellen sie den häufigsten Hauptgendefekt bei dem Auftreten von frühmanifesten Adipositas dar (Hinney *et al.*, 2006). Die Bedeutung des MC4R wird auch durch den stark ausgeprägten Phänotyp der MC4R<sup>-/-</sup>-Knockout-Maus bestätigt. MC4R defiziente Mäuse sind hyperphag, hypometabolisch und extrem übergewichtig (Ste Marie *et al.*, 2000).



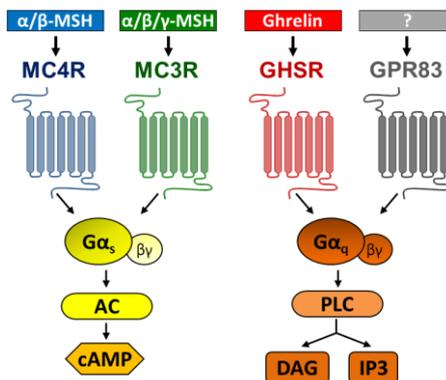
**Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des Leptin-Melanocortin-Signalweges**

Leptin wird in Abhängigkeit des Füllzustandes der Adipozyten sekretiert und stimuliert im Nucleus arcuatus (ARC) die Expression des anorexigenen Prohormons Proopiomelanocortin (POMC / lila Pfeil), welches u.a. zu  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Melanozyten-stimulierenden Hormonen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -MSH) prozessiert wird und inhibiert die Expression der orexigenen Peptide Agouti-related Protein (AgRP / gelber Pfeil) und Neuropeptid Y (NPY). Die Stimulation des MC4R im Nucleus paraventricularis (PVN) mittels  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH führt zur Inhibierung der Nahrungsaufnahme, die Aktivierung des MC4R im lateralem Hypothalamus (LHA) und im dorsomedialen Hypothalamus (DMV) hingegen induziert einen erhöhten Energieumsatz (Balthasar et al., 2005). Da der MC3R im ARC sowohl auf den AgRP- als auch auf den POMC-Neuronen exprimiert wird, wirkt die Stimulation dieses Rezeptors durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -MSH höchstwahrscheinlich als Vermittler zwischen Appetitanregung und Appetithemmung und wird daher auch als Autorezeptor bezeichnet (Cowley et al., 2001). Das orexigene Hormon Ghrelin wird vom Magen sezerniert und führt zur Aktivierung des GHSR und zur Expression von AgRP und NPY (gelber Pfeil) (Kamegai et al., 2000, 2001). AgRP ist ein inverser Agonist des MC4R und wirkt orexigen. (LEPR – Leptin-Rezeptor; alle weiteren Abkürzungen der dargestellten Rezeptoren werden in der Tabelle im Anhang erläutert.)

### 2.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

GPCRs sind an der Regulation fast aller physiologischen Prozesse im Körper beteiligt und daher häufigster Angriffspunkt von Medikamenten (Mason et al., 2012, Tyndall et al., 2005). GPCRs unterscheiden sich in ihren konkreten physiologischen Funktionen, sind aber durch eine gemeinsame generelle Architektur gekennzeichnet: Sieben helikale Elemente durchspannen die Zellmembran (Transmembranhelices/TMH), welche durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen (ECL/ICL) miteinander verbunden sind (Kobilka et al., 2007). GPCRs können multipel in verschiedenen Geweben vorkommen, aber auch gewebsspezifisch exprimiert sein. Verschiedenste Signale wie Peptide, Amine, Photone, Hormone oder Ionen können an GPCRs binden und in hochspezifische Effekte mittels heterotrimerer GTP-bindender Proteine (G-Protein) und auch

G-Protein-unabhängig (z. B.  $\beta$ -Arrestin) übertragen werden (Lefkowitz, 2007, Rosenbaum *et al.*, 2009). Bisher sind nicht für alle GPCRs spezifische stimulierende Signale (z. B. in Form von Liganden) bekannt. Solche orphanen GPCRs sind auch zahlreich in hypothalamischen Regionen zu finden und könnten potenzielle therapeutische Angriffspunkte sein. Im Leptin-Melanocortin-Signalweg spielen GPCRs eine entscheidende Rolle und im Folgenden werden die in dieser Arbeit behandelten GPCRs einzeln betrachtet.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der genutzten Signalwege des MC4R, MC3R, GHSR und GPR83**

Die in dieser Arbeit thematisierten GPCRs binden an unterschiedlichen G-Protein-Untereinheiten. Der MC4R und MC3R signalisieren über die  $G\alpha_s$ -Untereinheit, welche die Adenylylcyclase (AC) aktiviert und Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) konvertiert. Der GHSR und GPR83 binden die  $G\alpha_q$ -Untereinheit, welche die Phospholipasen C (PLC) zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) stimuliert.

### 2.3.1 Melanocortin-4-Rezeptor

Der wichtigste Vertreter in der Energiehomöostase ist der MC4R, der im Hypothalamus und dort hauptsächlich im PVN, LHA und DMV exprimiert wird (siehe Abb. 1 und Anhang Tab. 1), aber auch unter anderem im Rückenmark, Hirnstamm und Penisgewebe zu finden ist. Der durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH stimulierbare und durch AgRP inhibierbare MC4R koppelt hauptsächlich an das  $G\alpha_s$ -Protein (siehe Abb. 2), kann aber auch weitere G-Protein-unabhängige Effektoren aktivieren (ERK1/2) (Sutton *et al.*, 2005). Die Stimulation des MC4R im PVN hat einen anorexigenen Effekt zur Folge. Eine weitere Eigenschaft des MC4R ist die schwache Liganden-unabhängige Aktivität (im Weiteren auch Basalaktivität genannt) (Nijenhuis *et al.*, 2001). Versuche, den MC4R im Menschen als therapeutischen Angriffspunkt für die Behandlung von Adipositas zu nutzen, schlugen bislang fehl. Ein Problem stellte hierbei die nicht vorhandene gewebespezifische Selektivität der getesteten Liganden dar (Van Der Ploeg *et al.*, 2002).

### 2.3.2 Melanocortin-3-Rezeptor

Die Rolle des MC3R in der Appetitregulation ist komplex, und noch nicht vollständig aufgeklärt. Der MC3R wird im Pankreas, im Magen, in der Plazenta und im Hypothalamus, aber am dominantesten im ARC exprimiert (siehe Abb. 1 und Anhang Tab. 1). Der

MC3R kann wie der MC4R durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH stimuliert (siehe Abb. 2) und AgRP inhibiert werden, aber er besitzt auch die Möglichkeit, selektiv  $\gamma$ -MSH zu binden, was auf eine unterschiedliche Regulation des MC4R und des MC3R hinweist (Begriffe *et al.*, 2013). MC3R-defiziente Mäuse (MC3R<sup>-/-</sup>) zeigen einen hypometabolischen und übergewichtigen Phänotyp, der jedoch nicht durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme wie bei der MC4R<sup>-/-</sup>-Knockout-Maus begründet ist. Durch diese Beobachtungen wird dem MC3R eine wichtige Rolle in der Energiehomöostase und nicht in der Appetitregulation zugeschrieben (Begriffe *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Growth-Hormone-Secretagogue-Rezeptor / Ghrelin-Rezeptor

Der Growth-Hormone-Secretagogue-Rezeptor (oder auch Ghrelin-Rezeptor (GHSR1a)) wurde zunächst als Rezeptor beschrieben, der die Ausschüttung von Wachstumshormonen stimulieren kann (Li *et al.*, 2013). Erst nachdem sein endogener Ligand Ghrelin im Magen identifiziert wurde, konnte seine wichtige Funktion im Energiemetabolismus aufgeklärt werden (Kojima *et al.*, 1999). Ghrelin ist ein orexigenes Peptid, dem eine nahrungsmittelsensorische Funktion zugeschrieben wird, da in Abhängigkeit der zugeführten Nahrungsfette die für die Aktivierung essenzielle Octansäureveresterung des Ghrelins durch das Enzyme Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) erfolgt (Kirchner *et al.*, 2009). Der GHSR wird unter anderem im Pankreas, in der Bauchspeicheldrüse, in der Hypophyse und im Hypothalamus exprimiert (siehe Abb. 1 und Anhang Tab. 1)(Guan *et al.*, 1997). Die Stimulation des GHSR führt zur Aktivierung der G $\alpha_q$ -Proteine (siehe Abb. 2) und der GHSR weist eine extrem hohe Basalaktivität auf (Holst *et al.*, 2003). Versuche, die orexigene Wirkung des GHSR therapeutisch zu nutzen, blieben weitgehend ohne Erfolg. Die häufig großen Peptide können die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und viele getestete Liganden führten zu einer ungewollten Somatotropin-Ausschüttung (zusammengefasst in (Kirchner *et al.*, 2012)).

### 2.3.4 G-Protein-gekoppelter Rezeptor 83

In dieser Arbeit wurde exemplarisch ein orphaner GPCR auf seine Eigenschaften untersucht: der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 83 (GPR83). Er wird unter anderem im Hypothalamus und dort auch in den für die Gewichtsregulation wichtigen Nuclei ARC, PVN und LHA exprimiert (siehe Abb. 1 und Anhang Tab. 1) (Brezillon *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass der GPR83 einen regulatorischen Einfluss auf die Thermogenese und die zirkulierenden Adiponektin-Konzentrationen hat (Dubins *et al.*, 2012). Kürzlich konn-

te durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der mit dem humanen zu 87 % identische Maus-mGpr83 (Sah *et al.*, 2007) eine Basalaktivität im  $G\alpha_q$ -induzierten Signalweg aufweist (siehe Abb. 2) und mit physiologisch relevanten Zink-Konzentrationen stimulierbar ist (Müller, A. *et al.*, 2013).

### 2.3.5 GPCR-Interaktionen in der Gewichtsregulation

Seit einigen Jahren ist bekannt und akzeptiert, dass GPCRs nicht nur in einer monomeren Form existieren, sondern auch als interagierende Einheiten in Form von Homodimeren (gleiche GPCRs) oder Heterodimeren (unterschiedliche GPCRs) (Angers *et al.*, 2002). Es wurde bewiesen, dass die Oligomerisierung (mehrere Monomere interagieren miteinander; im Folgenden auch als Dimerisierung bezeichnet, da wir nicht zwischen Oligomeren und Dimeren unterscheiden können) die Oberflächenexpression, die Spezifität der G-Proteinkopplung und auch die Signalisierungseigenschaften beeinflussen kann (Smith *et al.*, 2010). Die Interaktion zweier Rezeptoren ist maßgeblich an der physiologischen Spezialisierung von Rezeptoren beteiligt und kann auch von pathophysiologischer Relevanz sein (Abdalla *et al.*, 2001). Pharmakologisch ist diese funktionelle Besonderheit von GPCRs bis jetzt wenig beachtet worden. Für die in dieser Arbeit thematisierten GPCRs MC3R, MC4R, GHSR und GPR83 ist bekannt, dass sie Homooligomere bilden (Biebermann *et al.*, 2003, Jiang *et al.*, 2006, Mandrika *et al.*, 2005, Müller, A. *et al.*, 2013). Kürzlich konnten für einige dieser Rezeptoren auch neue Interaktionspartner identifiziert werden. Der MC4R ist in der Lage, mit dem Neuropeptid-B/W-Rezeptor 1 (NPBWR1/GPR7) und der MC3R mit dem GHSR Heterodimere zu bilden, jedoch ist nicht bekannt, ob sowohl die Homo- als auch die Heterodimerbildung eine funktionelle Relevanz aufweist (Rediger *et al.*, 2009).

## 3. Zielstellungen

Unter dem Gesichtspunkt des geschilderten, global ansteigenden Adipositasproblems ist es äußerst wichtig, Wissenslücken zur Gewichtsregulation zu schließen, um hochspezifische und effiziente Therapieoptionen zu generieren. Aufklärung der Relevanz von Interaktionen zwischen appetitregulierenden GPCRs könnte dazu beitragen, tiefergehende Erklärungen und damit Therapieansätze zu finden. Da in die Appetitregulation involvierte GPCRs ein interessantes pharmakologisches Angriffsziel darstellen, wurde in dieser Arbeit auf die Identifikation und funktionelle Relevanz von bestimmten GPCR-

---

GPCR-Interaktionen abgezielt.

### **3.1 Charakterisierung des MC4R-Homodimers**

Eine Schlüsselrolle in der hypothalamischen Gewichtsregulation kommt dem MC4R zu. Die Entwicklung humanspezifischer und hochpotenter anorexigener MC4R-Agonisten schlug bislang fehl. Ein Grund dafür könnte darin begründet sein, dass nicht alle Eigenschaften des MC4R berücksichtigt wurden. Es sollten daher dimerisierungsrelevante Eigenschaften des MC4R untersucht werden, um ihn in seiner grundlegenden Funktionsweise zu verstehen und um potenziell pharmakologisch nutzbare Mechanismen zu erkennen. Ziel war es, potenzielle Interaktionsbereiche des MC4R zu identifizieren und die funktionellen Parameter des MC4R-Homodimers mit denen des MC4R-Monomeres zu vergleichen.

### **3.2 Untersuchung der funktionellen Relevanz des MC3R/GHSR-Heterodimers**

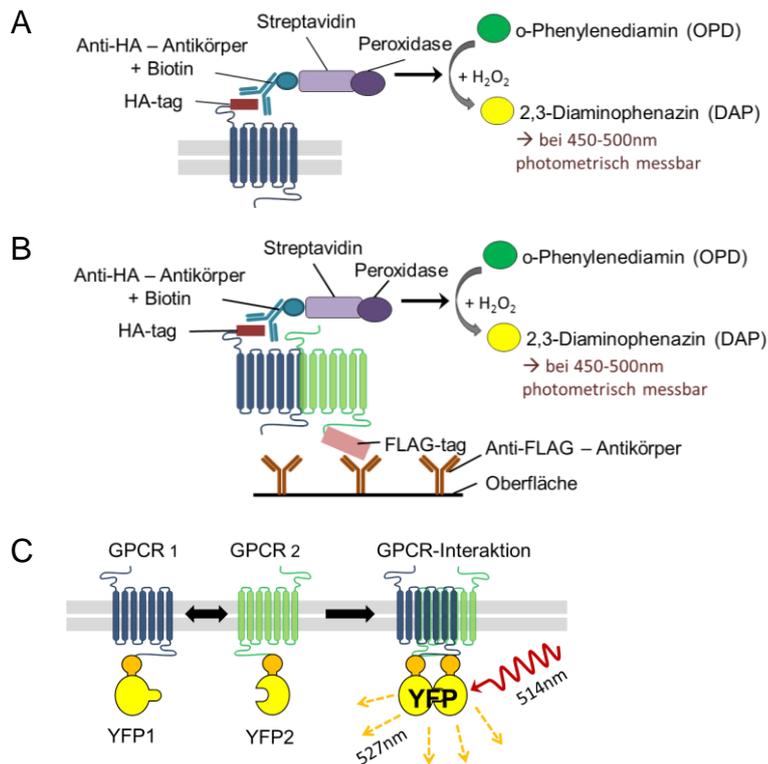
Mit Hinblick auf den GHSR als potenzielles Ziel für die pharmakologische Intervention von Übergewicht und den bisher mäßigen Erfolg, diesen selektiv anzugreifen, bietet die Identifikation der Interaktion mit dem ebenfalls an der Gewichtsregulation involvierten MC3R neue Möglichkeiten (Rediger *et al.*, 2009). Daher war es Ziel dieser Arbeit, die funktionellen Auswirkungen dieser Interaktion auf beide Rezeptoren zu untersuchen, um potenzielle neue Gesichtspunkte im Zusammenspiel der Rezeptoren aufzudecken.

### **3.3 Untersuchung eines potenziell in der Gewichtsregulation involvierten GPCRs - der orphanen GPR83**

Bei orphanen Rezeptoren sind die endogenen Liganden und die Signalisierungseigenschaften noch nicht bekannt. Durch die Lokalisation dieser Rezeptoren in funktionell wichtigen Regionen stellen gerade diese Rezeptoren ein potenzielles Ziel für Therapeutika dar. Die genaue Funktion des hypothalamisch exprimierten orphanen GPR83 ist noch weitgehend unklar. Er besitzt jedoch zu den orexigenen Neuropeptid-Y-Rezeptoren eine 35%ige Sequenzübereinstimmung und scheint potenziell in die Gewichtsregulation involviert zu sein (Dubins *et al.*, 2012, Sah *et al.*, 2007). Durch Vorarbeiten ist uns bekannt, dass der GPR83 in der Lage ist, Homodimere zu bilden (Müller, A. *et al.*, 2013). Diese Tatsache induzierte die Frage, ob er auch mit anderen GPCRs interagiert und diese Interaktionen modulatorische Funktion auf andere GPCRs in gleichem Gewebe haben könnte.

## 4. Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden molekularbiologische Standardmethoden und Methoden zur funktionellen Charakterisierung von GPCRs verwendet, die in den jeweiligen Publikationen beschrieben sind (Müller, T. D. *et al.*, 2013, Piechowski *et al.*, 2013, Rediger *et al.*, 2011). Im Folgenden werden nur die generellen Prinzipien der verwendeten Methoden zur Bestimmung der Oberflächenexpression und GPCR-Interaktionen in Abbildung 3 komprimiert zusammengefasst.



**Abbildung 3: Prinzipielle Darstellung der verwendeten Methoden zur Bestimmung der Oberflächenexpression und Dimerisierungseigenschaften von GPCRs**

**A)** Die Detektion der Oberflächenexpression erfolgt in intakten Zellen über den HA-Epitop-markierten N-Terminus des Rezeptors, auf immunologischer Basis (ELISA; Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Die Bindung eines Biotin-markierten Anti-HA-Antikörpers bietet die Bindungsfläche für ein Peroxidasegekoppeltes Streptavidin. Die Peroxidase oxidiert das Substrat o-Phenylendiamin (OPD), wodurch ein gelblicher photometrisch messbarer Farbstoff entsteht. **B)** Die Bestimmung des Dimerisierungsverhaltens kann auf der Basis eines Sandwich-ELISAs im Zelllysat durch die Detektion zweier unterschiedlich epitopmarkierter GPCRs erfolgen. Der C-terminal FLAG-markierte Rezeptor wird an der antikörperbeschichteten Oberfläche gebunden und im Fall einer Interaktion kann der zweite N-terminal HA-markierte Rezeptor in gleicher Weise wie in (A) beschrieben nachgewiesen werden. **C)** Das Biomolekulare Fluoreszenzkomplementations Assay (BiFC) basiert auf der Komplementation eines in zwei Hälften geteilten Fluoreszenzproteins (in (Müller, T. D. *et al.*, 2013) auch Protein Complementation Assay/PCA genannt). In unserem Fall wurden die zu charakterisierenden GPCRs jeweils C-terminal mit einer Hälfte eines gelb fluoreszierenden Proteins (Yellow Fluorescent Protein/YFP) fusioniert. Dabei besteht YFP1 aus den Aminosäuren (AS) 2-158 und YFP2 aus AS 159-238. Nach Interaktion der beiden GPCRs ist die Rekonstruktion der beiden inaktiven YFP-Hälften zu einem aktiven YFP möglich. Mit dieser Methode ist der Nachweis von Proteininteraktionen in lebenden Zellen möglich. Die Fluoreszenz wurde entweder mit Hilfe des CytoFluor 2300 Plate Reader (CytoFluor™, Millipore, Bedford, USA) oder mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCanto II flow cytometer, BD Biosciences, USA) bestimmt. Die genaue Durchführung ist den Publikationen (Müller, T. D. *et al.*, 2013, Piechowski *et al.*, 2013, Rediger *et al.*, 2011) zu entnehmen.

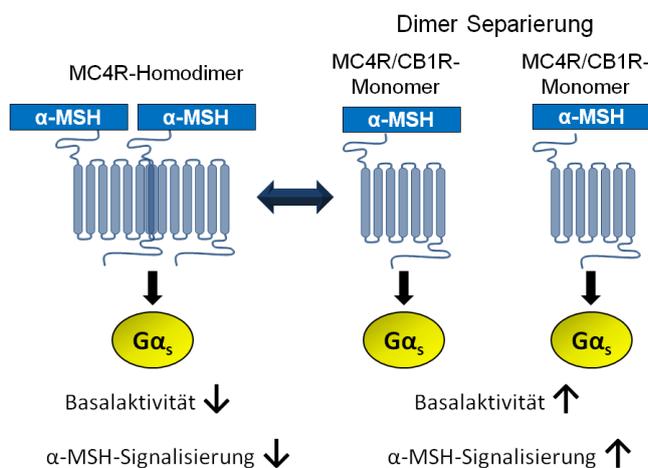
## 5. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Hauptergebnisse der drei ausgewählten Publikationen zusammengefasst.

### 5.1 Homodimerisierung des MC4R inhibiert dessen Signalisierungskapazität

**Publikation 1:** Piechowski, C. L. et al. (2013): Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop two. *Journal of Molecular Endocrinology* [Epub ahead of print]

Um eine potenzielle funktionelle Relevanz des MC4R-Homodimers gegenüber MC4R-Monomeren zu untersuchen, wurden bestimmte Bereiche des MC4R durch korrespondierende Bestandteile des Cannabinoid-1-Rezeptors (CB1R/CNR1) ausgetauscht. Dem CB1R ist es nicht möglich, mit dem MC4R zu interagieren, und die Substitutionen sollten daher potenziell zu einer MC4R-Dimer-Separierung führen (Rediger et al., 2009). Mit diesem Versuchsansatz konnten das MC4R-Oligomer teilweise dissoziiert und die funktionellen Unterschiede des monomeren MC4R zum Oligomer ermittelt werden. Diese Versuche lieferten Hinweise, dass der intrazelluläre Bereich der TMH3, TMH4 und insbesondere der ICL2 eine Rolle bei der Konstituierung eines MC4R-Homodimers spielen. Substitutionen in diesem Bereich führten zu einer stark verminderten Dimerisierungskapazität, aber interessanterweise auch gleichzeitig zu einer verstärkten Liganden-unabhängigen und Liganden-induzierten Signalisierung des MC4R (dargestellt in Abb. 4). Diese Effekte konnten auch für die konstitutiv aktive Patientenmutation MC4R-His158Arg, die im ICL2 lokalisiert ist, bestätigt werden.



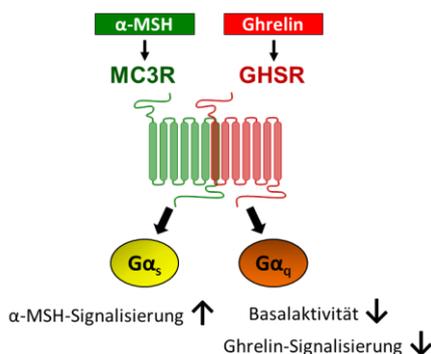
**Abbildung 4: MC4R-Dimer-Separierung induziert verbesserte Signalisierungseigenschaften.**

MC4R/CB1R-Chimäre zeigten eine verminderte Dimerisierungskapazität mit einhergehender Erhöhung der Basalaktivität und einer verstärkten Signalisierungskapazität nach Ligandenstimulation.

## 5.2 Gegensätzliche Beeinflussung der Signalisierung zwischen MC3R und GHSR in Heterooligomeren

**Publikation 2:** Rediger, A.\*, Piechowski, C. L.\*, Yi, C. X.\* *et al.* (2011): Mutually Opposite Signal Modulation by Hypothalamic Heterodimerization of Ghrelin and Melanocortin-3 Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(45):39623-31.

Die im *Nucleus arcuatus* (ARC) kolokalisierten und *in vitro* nachgewiesenermaßen interagierenden MC3R und GHSR nutzen unterschiedliche Signalwege (siehe Abb. 2). Mit Hilfe von Koexpressions- und Stimulationsversuchen konnte die gegenseitige und entgegengesetzte Beeinflussung auf das jeweilige spezifische Signalisierungsverhalten der beiden Interaktionspartner ermittelt werden. Die durch  $\alpha$ -MSH induzierte cAMP-Akkumulation ( $G\alpha_s$ -Signalisierung) des MC3R wird durch die Interaktion mit dem GHSR um das Zweifache erhöht. Diese enorme Steigerung der Signalisierungskapazität des MC3R wird im Folgenden auch als Hyperstimulation bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird sowohl die Ghrelin-induzierte als auch die Liganden-unabhängige  $G\alpha_q$ -Aktivität des GHSR durch die Heterodimerisierung auf ca. ~60 % reduziert (zusammengefasst in Abb. 5). Zusätzlich wurde mit zwei unterschiedlichen Ansätzen der Einfluss der Liganden-unabhängigen Signalisierung des GHSR auf die cAMP-Hyperstimulation des MC3R im Heterodimer untersucht, indem die Basalaktivität des GHSR vermindert wurde. Zunächst mit Hilfe zweier in kleinwüchsigen, annähernd normalgewichtigen Patienten vorkommenden GHSR-Mutationen (Ala204Glu, Phe279Leu), die beide eine stark verminderte Basalaktivität aufweisen (Pantel *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde die Basalaktivität mittels des inversen Agonisten des GHSR, der Substanz P, inhibiert. Durch den Einsatz von Substanz P oder durch Koexpression der GHSR-Varianten wurde die Hyperstimulationsfähigkeit des MC3R im MC3R/GHSR-Heterodimer verhindert. Damit wurde erstmals gezeigt, dass die basal aktive Konformation des GHSR einen essenziellen Einfluss auf die Signalisierungseigenschaften des Interaktionspartners hat.



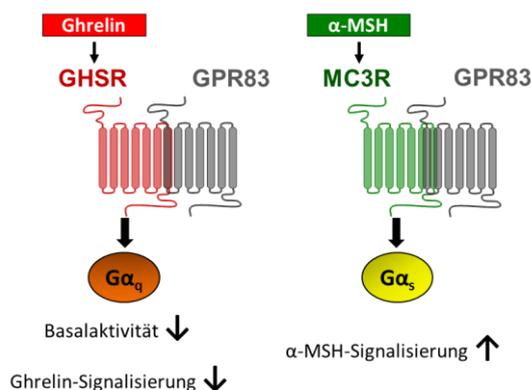
**Abbildung 5: Die MC3R/GHSR-Interaktion beeinflusst beide Rezeptoren in ihren Signalisierungseigenschaften.**

Die MC3R vermittelte Signalisierungskapazität wird durch die Interaktion mit dem konstitutiv aktiven GHSR im hohen Maße erhöht. Die Basalaktivität und die Signalisierungsfähigkeit des GHSR nach Ligandenstimulation wird durch die Interaktion mit dem MC3R inhibiert.

### 5.3 Der GPR83 ist in der Lage, mit den an der Gewichtsregulation beteiligten Rezeptoren, GHSR und MC3R, zu interagieren, und beeinflusst deren Signalisierungskapazität

**Publikation 3:** Müller, T. D.\*, Müller, A.\*, ... Piechowski, C. L. *et al.* (2013): The orphan receptor GPR83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms. ***Nature Communications***, 4:1968

Der GPR83 wird in gewichtsregulatorisch interessanten Bereichen des Hypothalamus exprimiert und auch weitere Indizien sprechen für eine Funktion in der Energiehomöostase. Die genaue Funktion des GPR83 ist noch unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass er *in vitro* Homodimere bildet (Müller, A. *et al.*, 2013) und die hypothalamische GPR83-Expression in Mäusen zeitabhängig durch Hungern herabgesenkt und durch eine anschließende Hochfettdiät wieder erhöht werden kann. Dieser Effekt in der nahrungsabhängigen Expression ist zu der des zirkulierenden Ghrelins völlig konträr. Daher untersuchten wir die *In-vivo*-Kokalisation und die Interaktionsbereitschaft des GPR83 mit dem Ghrelin-detectierenden Rezeptor GHSR. Wir konnten zeigen, dass der GPR83 *in vivo* im *Nucleus arcuatus* mit dem GHSR koexprimiert wird und *in vitro* mit dem GHSR Heterooligomere bildet. Diese Interaktion inhibiert die Ghrelin-induzierte  $G\alpha_q$ -Signalisierung des GHSR um 43 %, ohne dass die Expressionseigenschaften beeinflusst werden. Veranlasst durch die kürzliche Identifikation des MC3R/GHSR-Dimers und dessen starke funktionelle Relevanz untersuchten wir die Interaktionsbereitschaft des GPR83 mit dem MC3R (Rediger *et al.*, 2011). Der GPR83 ist auch mit dem MC3R in der Lage, Heterooligomere zu bilden, wodurch ebenfalls die Signalisierungskapazität moduliert wird. Nach Koexpression des MC3R mit dem GPR83 steigt die maximale Signalisierung des MC3R nach Ligandenstimulation um das Zweifache (Ergebnis in Abb. 6 zusammengefasst).



**Abbildung 6: Die Interaktion des GHSR und MC3R mit dem orphanen GPR83 beeinflusst deren Signalisierungseigenschaften.**

Die Basalaktivität des GHSR und dessen Signalisierungsfähigkeit nach Ligandenstimulation wird durch die Interaktion mit dem GPR83 inhibiert. Die Signalisierungskapazität des MC3R wird durch die Interaktion mit dem orphanen GPR83 erhöht.

Diese Befunde unterstützen die Vermutung, dass der GPR83 an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt ist, indem er die Fähigkeit des Ghrelins den GHSR zu aktivieren, herabsenkt und die Signalisierungskapazität des MC3R steigert. Diese Annahme wird ebenso durch erhobene *in vivo* Daten bestärkt, da GPR83-Knockout-Mäuse gegen diätinduzierte Glukoseintoleranz und Übergewicht geschützter zu sein scheinen.

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit wurden GPCRs, welche eine entscheidende Rolle in der Energiehomöostase spielen, im Hinblick auf die funktionelle Relevanz von Protein-Protein-Interaktionen untersucht. Im Hypothalamus sind unter anderem der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R), der MC3R, der Ghrelin-Rezeptor (GHSR) und der G-Proteingekoppelte Rezeptor 83 (GPR83) an der Appetitregulation beteiligt. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, für diese bestimmten GPCRs potenzielle gegenseitige Interaktionen zu untersuchen und den Einfluss solcher Proteininteraktionen auf die Signalisierungseigenschaften zu ermitteln.

### 6.1 Identifikation von Interaktionsbereichen des MC4R-Homodimers und erhöhte Signalisierungseigenschaften nach Oligomer-Separierung

Dass MC4R nicht nur als Monomere vorliegen, sondern auch Homodimere bilden können, ist seit einiger Zeit bekannt, jedoch nicht die funktionelle Relevanz dieser Interaktion (Nickolls *et al.*, 2006). Es ist uns gelungen beteiligte Interaktionsbereiche des MC4R-Homodimers zu identifizieren, und es konnte erstmalig gezeigt werden, dass sich die funktionellen Eigenschaften eines MC4R-Dimers von denen eines MC4R-Monomers unterscheiden.

Der Interaktionsbereich zwischen MC4R-Monomeren im Oligomer könnte sich entsprechend der genannten Resultate dieser Arbeit im ICL2 befinden. Es ist von Untersuchungen an anderen GPCRs jedoch bekannt, dass sich auch Oligomerkontaktpunkte an TMH1, TMH2 und TMH5-7 befinden (Lee *et al.*, 2003). Mit der verwendeten Versuchsanordnung können wir diese Bereiche nicht als Kontaktpunkte ausschließen. Beispiele für Oligomerseparierungen an anderen GPCRs sind bisher nur wenige beschrieben worden (Grant *et al.*, 2004, Moreno *et al.*, 2012, Ravindran *et al.*, 2009). Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass aufgereinigte GPCR-Monomere weiterhin funktionsfähig sind (Ernst *et al.*, 2007, White *et al.*, 2007, Whorton *et al.*, 2007).

Durch einzelne und auch mehrere Substitutionen in der ICL2 konnten wir nicht nur eine Dissoziation des MC4R-Dimers erreichen, sondern auch eine Erhöhung der Liganden-unabhängigen als auch der Liganden-induzierten  $G\alpha_s$ -Signalisierung.

Aufgrund von Beobachtungen, in denen die Heterodimerbildung des  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnden CB1R und des  $G\alpha_q$ -koppelnden Dopamin-D2-Rezeptors zu einer  $G\alpha_s$ -abhängigen cAMP-Akkumulation führte (Jarrahian *et al.*, 2004, Kearn *et al.*, 2005), untersuchten wir, ob diese Eigenschaft des CB1R auch bei unseren MC4R/CB1R-Chimären zu der erhöhten  $G\alpha_s$ -Signalisierung führt. Wir konnten diesen Effekt jedoch für unser verwendetes Zellsystem ausschließen, da für die  $G\alpha_s$ -Aktivierung des CB1R bestimmte Adenylylcyclasen (AC)-Subtypen notwendig sind (AC2, 4 und 7) und diese von uns nachgewiesenermaßen nicht in den genutzten COS-7-Zellen exprimiert werden (Rhee *et al.*, 1998). Die Erhöhung der Signalisierungskapazität des MC4R-Monomers könnte stöchiometrisch durch eine Rezeptor/G-Protein Ratio von 1:1 im monomeren Zustand im Gegensatz zu einer Ratio von 2:1 im Dimer zu erklären sein. Das Binden von zwei G-Proteinen scheint im Hinblick auf das angenommene Dimer-Interface nicht möglich (Baneres *et al.*, 2003, Filipek *et al.*, 2004). Mit Hinblick auf die Entwicklung von neuen anorexigenen MC4R-Agonisten für die Behandlung von adipösen Patienten sind die erhaltenen Informationen über eventuelle Dimerkontaktpunkte und die funktionelle Signalisierungspotenzierung durch Dimer-Separierung sehr hilfreich. Durch Binden eines hochspezifischen MC4R-Liganden an den identifizierten Kontaktpunkten könnte eine MC4R-Separierung induziert und dadurch eine verstärkte Funktionalität des MC4R erreicht werden.

## 6.2 Oligomerisierung von GPCRs spielt eine funktionelle Rolle

Bei funktionellen Untersuchungen des MC3R/GHSR-Heterodimers konnte gezeigt werden, dass GPCRs miteinander wechselwirken und sich auf verschiedenste Art und Weise gegenseitig beeinflussen. Sowohl die Homo- als auch die Heterooligomerisierung verändert die funktionellen Eigenschaften von Rezeptoren in hohem Maße (Piechowski *et al.*, 2013, Rediger *et al.*, 2011). Das heißt, dass Rezeptoren nicht nur über Ligandenbindung oder Expressionsrate moduliert werden, sondern auch durch die Interaktion mit anderen GPCRs.

Zusätzlich ist hervorzuheben, dass die basal aktive Konformation des GHSR einen entscheidenden Einfluss auf die Heterooligomer-Funktion hat. Daraus ist zu schlussfolgern, dass basale Signalisierungsaktivität generell einen zusätzlich determinierenden

Einfluss auf das Verhalten von Oligomeren haben könnte.

Es ist auch von anderen GPCRs bekannt, dass durch Homo-, oder Heterooligomerisierung eine Spezifität für bestimmte Funktionen erreicht wird. Zumeist ist hierbei die Ligandenbindungsspezifität betroffen. Beispielsweise beruht die gegensätzliche funktionelle Beeinflussung des Serotonin-2A-Rezeptors und des Glutamate-2-Rezeptors auf reziproker Ligandenbindungsmodifikation, wie auch der inhibitorische Effekt für das GPR50/Melatonin-1-Rezeptor-Heterodimer auf eine verminderte Ligandenbindung zurückzuführen ist (Gonzalez-Maeso *et al.*, 2008, Levoye *et al.*, 2006). In unserem Fall ist die Hyperstimulation des MC3R nach Koexpression mit dem GHSR jedoch nicht durch eine verbesserte Ligandenbindung an dem MC3R begründet, sondern allein durch die aktive Konformation des GHSR.

### **6.3 Die potenzielle Funktion des GPR83 in der Gewichtsregulation konnte durch identifizierte Heterodimere bestärkt werden**

Bereits durch frühere Studien ist der GPR83 mit der Regulation der Energieaufnahme und des Energieumsatzes in Verbindung gebracht worden (Bartfai *et al.*, 2012, Dubins *et al.*, 2012). Durch den Nachweis der Koloalisation des GPR83 mit dem GHSR im *Nucleus arcuatus* und der starken nahrungsabhängigen Expression des GPR83 wird die funktionelle Rolle klarer. Die Interaktion des GPR83 und des GHSR führt *in vitro* zu einer teilweisen Inhibierung der Ghrelin-induzierten GHSR-Signalisierung. Das deutet darauf hin, dass der GPR83 die Signalisierung des GHSR auch *in vivo* hemmt. *In-vivo*-Untersuchungen bestätigen diese Vermutung: GPR83-defiziente Mäuse (GPR83<sup>-/-</sup>) nehmen vermehrt Nahrung auf, da in diesem Fall der GHSR nicht mehr durch einen interagierenden GPR83 in seiner Signalisierungskapazität gehemmt werden kann und durch die GHSR-Aktivierung eine erhöhte Nahrungsaufnahme induziert wird. Die Möglichkeit des GPR83, mit dem GHSR und dem MC3R zu interagieren und diese Rezeptoren in ihrer Funktion zu beeinflussen, deutet auf ein funktionelles Netzwerk dieser drei Rezeptoren hin (dargestellt in Abb. 7). Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden ist es jedoch nicht möglich, den eventuell vorhandenen Komplex des möglichen GHSR/MC3R/GPR83-Oligomers aufzuklären. Wir können daher nicht ausschließen, dass die potenzielle Interaktion dieser drei Rezeptoren die funktionellen Eigenschaften jedes einzelnen Rezeptors in einer anderen Weise beeinflusst und welche funktionellen Konsequenzen sich daraus *in vivo* ergeben könnten.

#### 6.4 Schlussbetrachtungen

Zusammenfassend deuten die hier dargestellten Erkenntnisse insbesondere darauf hin, dass bisherige Modelle unter singulärer Betrachtung der untersuchten Rezeptoren nicht vollständig sind und ein komplexeres Funktions- und Steuerungsbild auch *in vivo* vorliegen könnte. In Abbildung 7 sind schematisch die bisher bekannten Interaktionen aller GPCRs, die mit der Gewichtsregulation in Verbindung gebracht werden, aufgezeichnet und es wird deutlich, dass die Betrachtung einzelner Rezeptoren für das Verständnis der *In-vivo*-Situation nicht ausreichen wird.

Zudem deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die wechselseitigen Beeinflussungen und das Zusammenspiel verschiedener Liganden und Rezeptoren ein genaueres Bild der Feinjustierung von Appetit- und Gewichtsregulation liefern könnte, als es bisher erreicht worden ist. Beispielsweise scheint die orexigene Wirkung des GHSR nicht nur über die Verfügbarkeit des Liganden gesteuert zu werden, sondern ebenfalls über die Interaktion mit dem MC3R und dem GPR83. Denn interessanterweise nimmt sowohl die GPR83- als auch die MC3R-Expression im Hypothalamus nach einer Hungerphase ab und somit kann der GHSR seine notwendige orexigene Wirkung voll entfalten (Gelegen *et al.*, 2006, Müller, T. D. *et al.*, 2013).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden insgesamt auch eine Grundlage dafür, genauere Zielstellungen für die Entwicklung von pharmakologischen Wirkstoffen zu formulieren, welche zum Beispiel auf eine simultane Beeinflussung von interagierenden GPCRs abzielen könnte. Sogenannte bivalente Liganden wären dafür geeignet, da sie simultan beide GPCR-Subtypen innerhalb eines Heterodimers beeinflussen können (Mohr *et al.*, 2013). Bivalente Liganden sind in der Lage, ein Homo- bzw. Heterodimer zu detektieren, weil es nur zu einer Ligandenbindung kommt, wenn sich zwei spezifische Rezeptoren in räumlicher Nähe befinden (Hiller *et al.*, 2013). Perspektivisch könnte damit nicht nur eine erhöhte Effizienz, sondern auch eine verbesserte Selektivität und damit eine Reduzierung von Nebenwirkungen erreicht werden, da bestimmte GPCR-GPCR-Kombinationen nur in spezifischen Geweben vorkommen können. Zusätzlich wäre es auch möglich, einen der beiden Rezeptoren zu aktivieren und die Ligandenbindungstasche des anderen zu blockieren, um dessen Signalisierung zu inhibieren. Ein bivalenter Ligand könnte auch dazu genutzt werden, Heterodimerbildung zu begünstigen, um wie im Falle des MC3R/GHSR-Dimers die verbesserte MC3R-Signalisierungskapazität zu nutzen.

Das hier untersuchte Beispiel des MC4R zeigt auch, dass gegebenenfalls durch die



---

## 7. Literaturverzeichnis

- Abdalla, S., Lother, H., El Massiery, A. and Quitterer, U. (2001). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 7(9): 1003-1009.
- Angers, S., Salahpour, A. and Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 409-435.
- Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., *et al.* (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123(3): 493-505.
- Baneres, J. L. and Parello, J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol* 329(4): 815-829.
- Bartfai, T. and Conti, B. (2012). Molecules affecting hypothalamic control of core body temperature in response to calorie intake. *Front Genet* 3: 184.
- Begrache, K., Girardet, C., McDonald, P. and Butler, A. A. (2013). Melanocortin-3 receptors and metabolic homeostasis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 114: 109-146.
- Biebermann, H., Krude, H., Elsner, A., *et al.* (2003). 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* 52(12): 2984-2988.
- Brezillon, S., Detheux, M., Parmentier, M., Hokfelt, T. and Hurd, Y. L. (2001). Distribution of an orphan G-protein coupled receptor (JP05) mRNA in the human brain. *Brain Res* 921(1-2): 21-30.
- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., *et al.* (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392(6674): 398-401.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., *et al.* (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836): 480-484.

- 
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., *et al.* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37(4): 649-661.
- Donini, L. M., Savina, C., Gennaro, E., *et al.* (2012). A systematic review of the literature concerning the relationship between obesity and mortality in the elderly. *J Nutr Health Aging* 16(1): 89-98.
- Dubins, J. S., Sanchez-Alavez, M., Zhukov, V., *et al.* (2012). Downregulation of GPR83 in the hypothalamic preoptic area reduces core body temperature and elevates circulating levels of adiponectin. *Metabolism* 61(10): 1486-1493.
- Ebbeling, C. B., Pawlak, D. B. and Ludwig, D. S. (2002). Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 360(9331): 473-482.
- Ernst, O. P., Gramse, V., Kolbe, M., Hofmann, K. P. and Heck, M. (2007). Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26): 10859-10864.
- Feneberg, A. and Malfertheiner, P. (2012). Epidemic trends of obesity with impact on metabolism and digestive diseases. *Dig Dis* 30(2): 143-147.
- Filipek, S., Krzysko, K. A., Fotiadis, D., *et al.* (2004). A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem Photobiol Sci* 3(6): 628-638.
- Gelegen, C., Collier, D. A., Campbell, I. C., Oppelaar, H. and Kas, M. J. (2006). Behavioral, physiological, and molecular differences in response to dietary restriction in three inbred mouse strains. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(3): E574-581.
- Gonzalez-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., *et al.* (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452(7183): 93-97.
- Grant, M., Collier, B. and Kumar, U. (2004). Agonist-dependent dissociation of human somatostatin receptor 2 dimers: a role in receptor trafficking. *J Biol Chem* 279(35): 36179-36183.

- Guan, X. M., Yu, H., Palyha, O. C., *et al.* (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48(1): 23-29.
- Hiller, C., Kuhhorn, J. and Gmeiner, P. (2013). Class A G protein-coupled receptor (GPCR) dimers and bivalent ligands. *J Med Chem.*
- Hinney, A., Bettecken, T., Tarnow, P., *et al.* (2006). Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 91(5): 1761-1769.
- Hinney, A., Rosenkranz, K., Roth, H. and Hebebrand, J. (1997). Gene in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen. Adipositas. Springer-Verlag. 3: 6-12.
- Hinney, A., Vogel, C. I. and Hebebrand, J. (2010). From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19(3): 297-310.
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T. H., Ankersen, M. and Schwartz, T. W. (2003). High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 17(11): 2201-2210.
- Jackson, R. S., Creemers, J. W., Ohagi, S., *et al.* (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 16(3): 303-306.
- Jarrahan, A., Watts, V. J. and Barker, E. L. (2004). D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 308(3): 880-886.
- Jiang, H., Betancourt, L. and Smith, R. G. (2006). Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol* 20(8): 1772-1785.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., *et al.* (2000). Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141(12): 4797-4800.

- 
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., *et al.* (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50(11): 2438-2443.
- Kearn, C. S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. and Glass, M. (2005). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 67(5): 1697-1704.
- Kirchner, H., Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., *et al.* (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 15(7): 741-745.
- Kirchner, H., Heppner, K. M. and Tschop, M. H. (2012). The role of ghrelin in the control of energy balance. *Handb Exp Pharmacol* (209): 161-184.
- Kobilka, B. K. and Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28(8): 397-406.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., *et al.* (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762): 656-660.
- Krude, H., Biebermann, H. and Gruters, A. (2003). Mutations in the human proopiomelanocortin gene. *Ann N Y Acad Sci* 994: 233-239.
- Lee, S. P., O'dowd, B. F., Rajaram, R. D., Nguyen, T. and George, S. R. (2003). D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* 42(37): 11023-11031.
- Lefkowitz, R. J. (2007). Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)* 190(1): 9-19.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., *et al.* (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 25(13): 3012-3023.
- Li, Z., Li, Y. and Zhang, W. (2013). Ghrelin receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 114: 45-87.

- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., *et al.* (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1(11): 1155-1161.
- Mandrika, I., Petrovska, R. and Wikberg, J. (2005). Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* 326(2): 349-354.
- Mason, J. S., Bortolato, A., Congreve, M. and Marshall, F. H. (2012). New insights from structural biology into the druggability of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 33(5): 249-260.
- Mohr, K., Schmitz, J., Schrage, R., Trankle, C. and Holzgrabe, U. (2013). Molecular alliance-from orthosteric and allosteric ligands to dualsteric/bitopic agonists at G protein coupled receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* 52(2): 508-516.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., *et al.* (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387(6636): 903-908.
- Moreno, J. L., Muguruza, C., Umali, A., *et al.* (2012). Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT<sub>2A</sub>.mGlu<sub>2</sub>) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function. *J Biol Chem* 287(53): 44301-44319.
- Müller, A., Kleinau, G., Piechowski, C. L., *et al.* (2013). G-Protein Coupled Receptor 83 (GPR83) Signaling Determined by Constitutive and Zinc(II)-Induced Activity. *PLoS One* 8(1): e53347.
- Müller, T. D., Müller, A., Yi, C. X., *et al.* (2013). The orphan receptor Gpr83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms. *Nat Commun* 4: 1968.
- Nickolls, S. A. and Maki, R. A. (2006). Dimerization of the melanocortin 4 receptor: a study using bioluminescence resonance energy transfer. *Peptides* 27(2): 380-387.
- Nijenhuis, W. A., Oosterom, J. and Adan, R. A. (2001). AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol* 15(1): 164-171.

- 
- Pantel, J., Legendre, M., Cabrol, S., *et al.* (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116(3): 760-768.
- Piechowski, C. L., Rediger, A., Lagemann, C., *et al.* (2013). Inhibition of Melanocortin-4 Receptor Dimerization by Substitutions in Intracellular Loop Two. *J Mol Endocrinol*.
- Pulgaron, E. R. (2013). Childhood obesity: a review of increased risk for physical and psychological comorbidities. *Clin Ther* 35(1): A18-32.
- Ravindran, A., Joseph, P. R. and Rajarathnam, K. (2009). Structural basis for differential binding of the interleukin-8 monomer and dimer to the CXCR1 N-domain: role of coupled interactions and dynamics. *Biochemistry* 48(37): 8795-8805.
- Rediger, A., Piechowski, C. L., Yi, C. X., *et al.* (2011). Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem* 286(45): 39623-39631.
- Rediger, A., Tarnow, P., Bickenbach, A., *et al.* (2009). Heterodimerization of hypothalamic G-protein-coupled receptors involved in weight regulation. *Obes Facts* 2(2): 80-86.
- Rhee, M. H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R. and Vogel, Z. (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem* 71(4): 1525-1534.
- Rojas, J., Aguirre, M., Velasco, M. and Bermudez, V. (2012). Obesity Genetics: A Monopoly Game of Genes. *Am J Ther*.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. and Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459(7245): 356-363.
- Rossen, L. M. and Rossen, E. A. (2012). Obesity 101. New York, Springer Publishing Company, LLC.
- S2 Leitlinien (2012). Leitlinien für Diagnostik, Therapie und Prävention der Adipositas im Kindes- und Jugendalter. Definition und Bestimmung des Ausmaßes der Adipositas im Kindes- und Jugendalter, Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter. 11: 18-22.

- 
- Sah, R., Parker, S. L., Sheriff, S., *et al.* (2007). Interaction of NPY compounds with the rat glucocorticoid-induced receptor (GIR) reveals similarity to the NPY-Y2 receptor. *Peptides* 28(2): 302-309.
- Silventoinen, K. and Kaprio, J. (2009). Genetics of tracking of body mass index from birth to late middle age: evidence from twin and family studies. *Obes Facts* 2(3): 196-202.
- Smith, N. J. and Milligan, G. (2010). Allosterity at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol Rev* 62(4): 701-725.
- Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., *et al.* (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 42(11): 937-948.
- Ste Marie, L., Miura, G. I., Marsh, D. J., Yagaloff, K. and Palmiter, R. D. (2000). A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 12339-12344.
- Sutton, G. M., Duos, B., Patterson, L. M. and Berthoud, H. R. (2005). Melanocortinergic modulation of cholecystinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology* 146(9): 3739-3747.
- Taskforce, I. O. (2010). "<http://www.iaso.org/iotf/obesity>."
- Tyndall, J. D. and Sandilya, R. (2005). GPCR agonists and antagonists in the clinic. *Med Chem* 1(4): 405-421.
- Van Der Ploeg, L. H., Martin, W. J., Howard, A. D., *et al.* (2002). A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11381-11386.
- Wang, H. J., Geller, F., Dempfle, A., *et al.* (2004). Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J Clin Endocrinol Metab* 89(1): 157-162.

- 
- White, J. F., Grodnitzky, J., Louis, J. M., *et al.* (2007). Dimerization of the class A G protein-coupled neurotensin receptor NTS1 alters G protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29): 12199-12204.
- Who (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253.
- Whorton, M. R., Bokoch, M. P., Rasmussen, S. G., *et al.* (2007). A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18): 7682-7687.
- Yeo, G. S., Farooqi, I. S., Aminian, S., *et al.* (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20(2): 111-112.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., *et al.* (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425-432.

---

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Carolin Leonie Piechowski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Die funktionelle Relevanz von Oligomerisierung *in vitro* und *in vivo* am Beispiel von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der hypothalamischen Gewichtsregulation

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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der folgenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

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

## 9. Anteilserklärung

Frau Carolin Leonie Piechowski hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### **Publikation 1:**

Piechowski, C. L., 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 two.

*Journal of Molecular Endocrinology* 2013

doi: 10.1530/JME-13-0061 [Epub ahead of print]

(Impact Factor (2011): 3.485; Eigenfactor: 0.00746)

Anteil praktischer Arbeit: 60%

Anteil Schreibaarbeit: 40%

Frau Piechowski hatte den größten Anteil an den experimentellen Arbeiten sowie deren detaillierter Auswertung. Mit Ausnahme der Herstellung der chimären Konstrukte, die Erstellung des Strukturmodells und die funktionellen Untersuchungen der pathogenen MC4R-Mutationen wurden alle experimentellen Daten von Frau Piechowski erhoben. Alle Abbildungen (ausgeschlossen Abb. 6) wurden gänzlich von ihr erstellt. Ein großer Anteil des Manuskripts wurde von ihr verfasst sowie Einreichungs- und Reviewerprozess durchgeführt.

### **Publikation 2:**

Rediger, A.\*, Piechowski, C. L.\*, Yi, C. X.\*, Tarnow, P., Strotmann, R., Grüters, A., Krude, H., Schöneberg, T., Tschöp, M. H., Kleinau, G., Biebermann, H.

Mutually Opposite Signal Modulation by Hypothalamic Heterodimerization of Ghrelin and Melanocortin-3 Receptors.

*The Journal of Biological Chemistry* 2011, 286(45): 39623-31.

doi: 10.1074/jbc.M111.287607. Epub 2011 Sep 22.

(Impact Factor (2011): 4.773; Eigenfactor: 0.74213 )

**\*gleichberechtigte Erstautoren**

---

Anteil praktischer Arbeit: 40%

Anteil Schreibaarbeit: 30%

Frau Piechowski hatte einen großen Anteil an den experimentellen Arbeiten sowie deren detaillierter Auswertung. Die funktionellen Assays zur Bestimmung der Rezeptorsignalisierung wurden größtenteils von Frau Piechowski durchgeführt. Sie hat an der Anfertigung des Manuskriptes mitgewirkt sowie den experimentellen Reviewprozess durchgeführt.

### **Publikation 3:**

Müller, T. D.\*, Müller, A.\*, Yi, C. X.\*, Habegger, K. M., Meyer, C. W., Gaylinn, B. D., Finan, B., Heppner, K., Trivedi, C., Bielohuby, M., Abplanalp, W., Meyer, F., Piechowski, C. L., Pratzka, J., Stemmer, K., Holland, J., Hembree, J., Bhardwaj, N., Raver, C., Ottaway, N., Krishna, R., Sah, R., Sallee, F. R., Woods, S. C., Perez-Tilve, D., Bidlingmaier, M., Thorner, M. O., Krude, H., Smiley, D., Dimarchi, R., Hofmann, S., Pfluger, P. T., Kleinau, G., Biebermann, H., Tschöp, M. H.

The orphan receptor GPR83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms.

*Nature Communications* 2013 Jun 7;4:1968.

doi: 10.1038/ncomms2968.

(Impact Factor (2011): 7.396; Eigenfactor: 0.01222)

### **\*gleichberechtigte Erstautoren**

Anteil praktischer Arbeit: 10%

Anteil Schreibaarbeit: 5%

Frau Piechowski hat bei der Durchführung und Auswertung der funktionellen Charakterisierung der identifizierten Heterodimere sowie an den Revisionsexperimenten mitgewirkt. Zudem war sie am Korrekturprozess des Manuskriptes beteiligt.

---

**10. Druckexemplare der ausgewählten Publikation**

**10.1 Publikation 1:**

**Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop two.**

Piechowski, C. L., Rediger, A., Lagemann, C., Mühlhaus, J., Müller, A., Pratzka, J., Tarnow, P., Grüters, A., Krude, H., Kleinau, G., Biebermann, H.

***Journal of Molecular Endocrinology* 2013**

doi: 10.1530/JME-13-0061 Print 2013

**<http://dx.doi.org/10.1530/JME-13-0061>**

## 10.2 Publikation 2:

### **Mutually Opposite Signal Modulation by Hypothalamic Heterodimerization of Ghrelin and Melanocortin-3 Receptors.**

Rediger, A.\*, Piechowski, C. L.\*, Yi, C. X.\*, Tarnow, P., Strotmann, R., Grüters, A., Krude, H., Schöneberg, T., Tschöp, M. H., Kleinau, G., Biebermann, H.

***The Journal of Biological Chemistry* 2011, 286(45): 39623-31.**

doi: 10.1074/jbc.M111.287607. Epub 2011 Sep 22.

**\*gleichberechtigte Erstautoren**

**<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.287607>**

### 10.3 Publikation 3:

#### **The orphan receptor Gpr83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms.**

Müller, T. D.\*, Müller, A.\*, Yi, C. X.\*, Habegger, K. M., Meyer, C. W., Gaylinn, B. D., Finan, B., Heppner, K., Trivedi, C., Bielohuby, M., Abplanalp, W., Meyer, F., Piechowski, C. L., Pratzka, J., Stemmer, K., Holland, J., Hembree, J., Bhardwaj, N., Raver, C., Ottaway, N., Krishna, R., Sah, R., Sallee, F. R., Woods, S. C., Perez-Tilve, D., Bidlingmaier, M., Thorner, M. O., Krude, H., Smiley, D., Dimarchi, R., Hofmann, S., Pfluger, P. T., Kleinau, G., Biebermann, H., Tschöp, M. H.

***Nature Communications* 2013 Jun 7; 4: 1968.**

doi: 10.1038/ncomms2968.

**\*gleichberechtigte Erstautoren**

**[http://dx.doi.org/ 10.1038/ncomms2968](http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2968)**

---

## **11. Curriculum Vitae**

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

## 12. Publikationsliste

### 12.1 Originalarbeiten:

1. Heppner KM, Piechowski CL, Müller A, Ottaway N, Sisley S, Smiley DL, Habegger KM, Pfluger PT, DiMarchi R, Biebermann H, Tschöp MH, Sandoval DA, Perez-Tilve D.  
**Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via CNS ghrelin receptors.**  
*Diabetes* 2014 Jan;63(1):122-31. doi: 10.2337/db13-0414. Epub 2013 Sep 23
2. Müller TD\*, Müller A\*, Yi CX\*, M Habegger K, Meyer CW, Gaylann BD, Finan B, Heppner K, Trivedi C, Bielohuby M, Abplanalp W, Meyer F, Piechowski CL, Pratzka J, Stemmer K, Holland J, Hembree J, Bhardwaj N, Raver C, Ottaway N, Krishna R, Sah R, Sallee FR, Woods SC, Perez-Tilve D, Bidlingmaier M, Thorner MO, Krude H, Smiley D, DiMarchi R, Hofmann S, Pfluger PT, Kleinau G, Biebermann H, Tschöp MH.  
**The orphan receptor Gpr83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms**  
*Nat Commun.* 2013 Jun 7;4:1968. doi: 10.1038/ncomms2968. [Epub ahead of print]
3. Piechowski CL, Rediger A, Lagemann C, Mühlhaus J, Müller A, Pratzka J, Tarnow P, Grütters A, Krude H, Kleinau G, Biebermann H.  
**Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop two.**  
*J Mol Endocrinol.* 2013 Jun 29;51(1):109-18. doi: 10.1530/JME-13-0061. Print 2013.
4. Müller A\*, Kleinau G\*, Piechowski CL, Müller TD, Finan B, Pratzka J, Grütters A, Krude H, Tschöp M, Biebermann H.  
**G-protein coupled receptor 83 (GPR83) signaling determined by constitutive and zinc(II)-induced activity.**  
*PLoS One.* 2013;8(1):e53347. doi: 10.1371/journal.pone.0053347. Epub 2013 Jan 15.
5. Rediger A\*, Piechowski CL\*, Habegger K, Grütters A, Krude H, Tschöp MH, Kleinau G, Biebermann H.  
**MC4R Dimerization in the Paraventricular Nucleus and GHSR/MC3R Heterodimerization in the Arcuate Nucleus: Is There Relevance for Body Weight Regulation?**  
*Neuroendocrinology.* 2012;95(4):277-88. doi: 10.1159/000334903. Epub 2012 Feb 8. Review.
6. Rediger A\*, Piechowski CL\*, Yi CX\*, Tarnow P, Strotmann R, Grütters A, Krude H, Schöneberg T, Tschöp MH, Kleinau G, Biebermann H.  
**Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors.**  
*J Biol Chem.* 2011;286(45):39623-31. doi: 10.1074/jbc.M111.287607. Epub 2011 Sep 22

\*gleichberechtigte Erstautoren

**12.2 Poster:**

- Sept. 2012 EMBO|EMBL Symposium Diabetes and Obesity (Heidelberg, Deutschland):  
**Melanocortin-4 receptor signaling activity is modulated by oligomerization**
- Mai 2012 15<sup>th</sup> International & 14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (Florenz, Italien):  
**Signaling properties of the Melanocortin-3 Receptor are modified by interaction with different Ghrelin Receptor variants in heterodimers**
- Juli 2010 Annual Summer School on Endocrinology (Bregenz, Österreich):  
**Heterodimerization of the melanocortin 3 receptor and growth hormone secretagogue receptor**

**12.3 Vorträge:**

- Nov. 2012 7th Annual Retreat – Graduate College 1208 (Berlin, Deutschland):  
**Relevance of GPCR interaction in the context of body weight regulation**
- März 2012 55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) (Mannheim, Deutschland): **Identification of a Melanocortin-4 receptor interaction region**
- Nov. 2011 6th Annual Retreat – Graduate College 1208 (Berlin, Deutschland):  
**Identification of potential Melanocortin-4 receptor interaction domains**
- Okt. 2011 13th Annual Meeting Young Active Research (YAR) (Stockholm, Schweden):  
**Identification of potential Melanocortin-4 receptor interaction domains**
- Nov. 2010 5th Annual Retreat – Graduate College 1208 (Berlin, Deutschland):  
**Heterodimerization of the melanocortin 3 and the growth hormone secretagogue receptor**
- Nov. 2010 4. Herbsttagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, 26. Jahrestagung der Deutschen Adipositas-Gesellschaft (Berlin, Deutschland): **Interaktion von Melanocortin-3- und Growth Hormone Secretagogue Rezeptor im Kontext der hypothalamischen Gewichtsregulation**
- Okt. 2010 12th Annual Meeting Young Active Research (YAR) (Düsseldorf, Deutschland):  
**Fluorescent Protein Complementation Assay: Identification of New Hypothalamic MC3R and MC4R Interacting Partners**
- Apr. 2010 Vernetzungstreffen GRK1041 Ulm + internal Retreat GRK 1208 Berlin (Ulm, Deutschland): **Protein complementation assay: A method for detection of new GPCR interaction partner**
- Dez. 2009 25. Arbeitstagung Experimenteller Schilddrüsen-Forschung (AESF) (Bremen, Deutschland): **TSHR-dependent expression of a new gene in thyroid cells**
- Dez. 2008 24. Arbeitstagung für Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF) (Berlin, Deutschland): **Investigation of a new candidate gene for congenital hypothyroidism using homologous expression in thyroid cells**

### 13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen ganz herzlich bedanken, die mich bei meinem Promotionsvorhaben unterstützt und gefördert haben und ohne die es wahrscheinlich nie zur Vollendung dieser Arbeit gekommen wäre.

In erster Linie gilt mein besonderer Dank PD Dr. Heike Biebermann die trotz einiger äußerer Widerstände an mich und meine Fähigkeiten geglaubt und mir die Möglichkeit für diese Doktorarbeit gegeben hat. Ich danke Ihr nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas, sondern auch für Ihre fortwährende Unterstützung und intensive Betreuung.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich und Prof. Dr. Heiko Krude für die Aufnahme in das Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie sowie die bereichernden Anmerkungen von Prof. Dr. Heiko Krude im Rahmen unserer Laborbesprechungen.

Prof. Dr. Josph Kohrle möchte ich für die Aufnahme in das Graduierten Kolleg 1208 „Hormonal Regulation of Energy Metabolism, Body Weight and Growth“ danken, wodurch ich die Möglichkeit erhielt mein endokrinologisches Wissen zu vertiefen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei meinen Co-Mentoren Dr. Petra Wiedmer und Dr. Wenke Jonas für die sehr netten und anregenden Gespräche bedanken.

Dr. Gunnar Kleinau danke ich für die anregenden Diskussionen, die mich fachlich sehr weiter gebracht haben und für die Hilfe bei der Anfertigung der Manuskripte.

Im weiterem möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie für die nette Zusammenarbeit danken. Ich möchte hier besonders Daniela Nürnberg, Juliane Pratzka und Dr. Franziska Winkler erwähnen, die mich sehr Unterstützt haben. Vor allem Franziska hat seit meinem Eintritt in das Institut stets für meine innere Ausgeglichenheit gesorgt und ich bin sehr froh, dass wir uns gefunden haben.

Ein besonders liebevoller Dank geht an die besten Eltern auf dieser Erde, die mich so oft aufgefangen und mir Mut gemacht haben. Nicht zuletzt möchte ich meinem Bruder und Damian Wienchol für so vieles Danken, aber vor allem dafür, dass es sie gibt.

## 14. Anhang

**Tabelle 1: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und bekannte Interaktionen**

Aufgeführt sind bekannte Interaktionen von GPCRs (mit Literaturangabe), der genutzte G-Protein-abhängige Signalweg, sowie deren Lokalisation im Gehirn, mit dem Fokus auf hypothalamische Expression (speziesübergreifend). Mit blauer Schrift sind GPCRs gekennzeichnet, denen eine Rolle in der Gewichtsregulation zugeschrieben wird.

GPCR		Signalweg [1]	Lokalisation im Gehirn [1, 2]	Interaktion	Literatur
Gen	Weitere Namen				
5HTR1B	5-HT1B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	Cerebellum, Brainstem, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PVN, PFA, SCN	5HTR1B + 5HTR1B 5HTR1B + 5HTR1D 5HTR1B + 5HTR1A 5HTR1B + TAAR1 5HTR1B + TAAR5	[3, 4] [5, 6] [5] Pratzka J. Pratzka J.
5HTR1D	5-HT1D	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Midbrain, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus	5HTR1D + 5HTR1A 5HTR1D + 5HTR1B 5HTR1D + 5HTR1D 5HTR1D + LPAR1	[5] [5] [5, 7] [5]
5HTR2C	5-HT2C	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	Amygdala, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum Brainstem, Hypothalamus: DH, LHA, ARC, DMH, TMN, VMH, PO, AH, PH,SO	5HTR2C + 5HTR2C 5HTR2C + GHSR 5HTR2C + DRD2	[8-11] [12] [13]
ADORA1	A1	adenosine A1 receptor	Amygdala, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum Brainstem, Hypothalamus	ADORA1 + DRD1 ADORA1 + ADORA2A ADORA1 + ADRB1 ADORA1 + ADRB2 ADORA1 + mGLU1α	[14] [15] [16] [16] [17]
ADORA2A	A2A	Adenosine A2a-receptor	Amygdala, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum Brainstem, Hypothalamus	ADORA2A + ADORA2A ADORA2A + ADORA1 ADORA2A + DRD2 ADORA2A + CNR1 ADORA2A + CNR1 + DRD2 ADORA2A + mGLU5 + DRD2 ADORA2A + mGLU5	[18-22] [15] [21, 23-28] [24, 29] [24] [23] [23]

ADRA2A	Alpha2A-adrenoreceptor	alpha-2A-adrenergic receptor	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_s$	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Hypothalamus	ADRA2A + ADRB1 ADRA2A + OPRM1	[30] [31, 32]
ADRB1	Beta1-adrenoreceptor	beta-1 adrenergic receptor	G $\alpha_s$ G $\alpha_{i/o}$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hypothalamus, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum	ADRB1 + ADORA1 ADRB1 + ADRB1 ADRB1 + SSTR5 ADRB1 + ADRA2A ADRB1 + ADRB2	[16] [33] [34] [30] [35]
ADRB2	Beta2-adrenoreceptor	beta-2 adrenergic receptor	G $\alpha_s$ G $\alpha_{i/o}$	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hypothalamus, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum	ADRB2 + ADRB2 ADRB2 + ADRB1 ADRB2 + ADRAB3 ADRB2 + OPRD1 ADRB2 + OPRK1 ADRB2 + PTGER1 ADRB2 + TAAR1 ADRB2 + TAAR5 ADRB2 + ADORA1 ADRB2 + ADRB3 ADRB2 + SSTR5	[36-44] [35, 40] [45] [46, 47] [46, 47] [48] Pratzka J. Pratzka J. [16] [45] [49]
ADRB3	Beta3-adrenoreceptor	beta-3 adrenergic receptor	G $\alpha_s$ G $\alpha_{i/o}$	Brainstem, Cerebral Cortex, Hypothalamus, Hippocampus, Striatum	ADRB3 + ADRB3 ADRB3 + ADRB2	[45] [45]
CNR1	CB1R, CB1	cannabinoid receptor 1	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_s$	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Pituitary Gland, Hypothalamus: PVN ARC, DMH	CNR1 + ADORA2A CNR1 + ADORA2A + DRD2 CNR1 + DRD2 CNR1 + OPRD1 CNR1 + OPRK1 CNR1 + OPRM1 CNR1 + AGTR1 CNR1 + HCRTR1	[24, 29] [24] [24, 50] [51] [51] [51] [52] [53]
CXCR2	CXCR2	Chemokine receptor 2	G $\alpha_{i/o}$	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PVN	CXCR2 + CXCR2 CXCR2 + CXCR1 CXCR2 + OPRD1	[54, 55] [55] [56]
CXCR4	CXCR4	Chemokine receptor 4	G $\alpha_{i/o}$	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Hypothalamus	CXCR4 + CXCR4 CXCR4 + CCR2 CXCR4 + CCR5 CXCR4 + OPRD1 CXCR4 + OPRK1	[57-60] [61, 62] [58] [63] [64]

DRD1	D1	dopamine receptor 1	G $\alpha_s$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Hypothalamus	CXCR4 + BLF1 DRD1 + DRD1 DRD1 + GHSR DRD1 + HRH3 DRD1 + DRD3 DRD1 + OPRM1 DRD1 + DRD2 DRD1 + ADORA1	[59] [65-68] [12, 69] [70] [71] [72] [68, 73-77] [14]
DRD2	D2	dopamine receptor 2	G $\alpha_{i/o}$	Brainstem, Cerebral Cortex, Cerebellum, Hypothalamus, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum	DRD2 + DRD2 DRD2 + ADORA2A DRD2 + ADORA2A + mGLU5 DRD2 + ADORA2A + CNR1 DRD2 + DRD1 DRD2 + DRD3 DRD2 + 5HTR2A DRD2 + CNR1 DRD2 + DRD5 DRD2 + mGLU5 DRD2 + HRH3 DRD2 + SSTR5 DRD2 + 5HTR2C DRD2 + TAAR1 DRD2 + 5HTR2A DRD2 + GHSR	[78] [21, 23-28] [23] [24] [68, 73-77] [79] [80] [24, 50] [76] [23] [81] [82] [12] [83] [13] [84]
DRD3	D3	dopamine receptor 3	G $\alpha_{i/o}$	Brainstem, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum, Hypothalamus: MB	DRD3 + DRD1 DRD3 + DRD2 DRD3 + DRD3	[71] [79] [85]
DRD5	D5	dopamine receptor 5	G $\alpha_s$	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: MB, SO	DRD5 + DRD5 DRD5 + DRD2	[6] [76]
HCRTR1	Ox1	orexin receptor type 1	G $\alpha_s$ G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_q$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Thalamus Hypothalamus: PVN, PRN, SO, SCN, ARC, DMH	HCRTR1 + CNR1	[53]
HRH3	H3	histamine receptor H3	G $\alpha_{i/o}$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hypothalamus, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus	HRH3 + DRD1 HRH3 + DRD2	[70] [81]

GHSR	GHSR	growth hormone secretagogue receptor, ghrelin receptor	Gα <sub>q</sub>	Brainstem, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum, Hypothalamus: ARC	GHSR + MC3R GHSR + GHSR GHSR + DRD1 GHSR + 5HTR2C GHSR + SSTR5 GHSR + DRD2 GHSR + MC4R mGhsr + mGhsr mGhsr + mMc3r mGhsr + mGpr83 mGLU1 + ADORA1	[12, 86, 87] [69] [12, 69] [12] [88] [84] Rediger A. [89] [89] [89] [17]
mGLU1	mGLU1	Metabotropic glutamate receptor1	Gα <sub>q</sub> Gα <sub>s</sub> Gα <sub>i/o</sub>	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PVN, PO, SO		
mGLU5	mGLU5	Metabotropic glutamate receptor 5	Gα <sub>q</sub> Gα <sub>s</sub> Gα <sub>i/o</sub>	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pons, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: VMH, SCN, PO, LT, MB	mGLU5 + DRD2 + A2A mGLU5 + A2A mGLU5 + DRD2 mGLU5 + mGLU5 mGLU5 + mGLU2 r[mGlu5] + r[mGlu1]	[23] [23] [23] [90, 91] [92] [93]
mGLU2	mGLU2	Metabotropic glutamate receptor 2	Gα <sub>i/o</sub>	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pons, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: VMH, DMH, LHA, PO, MB	mGLU2 + mGLU2 mGLU2 + mGLU5 mGLU2 + HTR2A mGLU2 + HTR2B	[91] [92] [92, 94] [92]
GPR83		G-protein coupled receptor 83	Gα <sub>q</sub>	Amygdala, Cerebral Cortex, Brainstem, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: ARC, PVN, VMH, DMH	mGpr83 + mGpr83 mGpr83 + mGhsr mGpr83 + mMc3r	[89] [89] [89]
MC3R	MC3	melanocortin 3 receptor	Gα <sub>s</sub>	Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Pituitary Gland, Hypothalamus: ARC, VMH, PH, PVN, AH, SO, LH, DMH	MC3R + MC3R MC3R + GHSR MC3R + NPY2R MC3R + OPRM1 MC3R + 5HTR2C mMc3r + mGpr83	[95] [12, 86, 87] [87] [87] [12] [89]
MC4R		melanocortin 4 receptor	Gα <sub>s</sub>	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pons, Striatum, Hypothalamus: PVN, DMH, LHA, LS, PFA, SO, TMN, VMH, (ARC)	MC4R + MC4R MC4R + NPBWR1 MC4R + 5HTR1B MC4R + GPR7 MC4R + GHSR	[96] [87] [87] [87] Rediger A.

MRGPRX1	SNSR-4	Sensory neuron-specific G-protein coupled receptor 1	G $\alpha_q$	-	MRGPRX1 + MRGPRX1	[97]
					MRGPRX1 + OPRD1	[97]
NPBWR1	GPR7	neuropeptides B/W receptor type 1	G $\alpha_{i/o}$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Midbrain, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: ARC, SCN, PO, PVN, SO, VMH, DMH,	NPBWR1 + MC4R	[87]
NPY2R		Neuropeptide Y receptor Y2	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_q$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pons, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PO, ARC, DM, PFA, PVN, DMH	NPY2R + MC3R	[87]
OPRM1	Mu	Mu opioid receptor	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_q$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PO, LT, DMH, PN, MB, PVN, LH, ARC, VMH	OPRM1 + OPRM1 OPRM1 + ADRA2A OPRM1 + CNR1 OPRM1 + DRD1 OPRM1 + OPRD1 OPRM1 + OPRK1 OPRM1 + SSTR2 OPRM1 + MC3R	[98, 99] [31, 32] [51] [72] [100-104] [99, 101] [105] [87]
OPRD1	Delta	Delta opioid receptor	G $\alpha_{i/o}$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: DMH, VMH, ARC, PH	OPRD1 + OPRD1 OPRD1 + ADRB2 OPRD1 + CNR1 OPRD1 + CXCR2 OPRD1 + CXCR4 OPRD1 + OPRK1 OPRD1 + OPRM1 OPRD1 + MRGPRX1	[46, 97, 98] [46] [51] [56] [63] [46] [100-104] [97]
OPRK1	Kappa	Kapa opioid receptor	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_{12/13}$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PO, SO, DMH, ARC, VMH, DMH, LH, PVN	OPRK1 + OPRK1 OPRK1 + OPRD1 OPRK1 + OPRM1 OPRK1 + ADRB2 OPRK1 + CNR1 OPRK1 + CXCR4	[98, 99] [46] [99, 101] [46, 47] [51] [64]
SSTR1	SST1	somatostatin receptor 1	G $\alpha_{i/o}$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary	SSTR1 + SSTR1	[106]

SSTR2	SST2	somatostatin receptor 2	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_q$	Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: ARC, PVN, PRN	SSTR1 + SSTR5	[82]
				Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PO, SCN, ARC, AH, VMH, DMH	SSTR2 + SSTR2	[107, 108]
					SSTR2 + SSTR5	[108]
					r[Sstr2] + r[Oprm1]	[105]
SSTR5	SST5	somatostatin receptor 5	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_q$	Amygdala, Brainstem, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pituitary Gland, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PO	SSTR5 + SSTR5	[108, 109]
					SSTR5 + SSTR2	[108]
					SSTR5 + GHSR	[88]
					SSTR5 + DRD2	[82]
					SSTR5 + ADRB1	[34]
					SSTR5 + ADRB2	[49]
TAAR1		trace amine associated receptor 1	G $\alpha_s$	Amygdala, Cerebellum, Hippocampus, Pituitary Gland, Hypothalamus: PO	TAAR1+ TAAR1	Pratzka J.
					TAAR1 + ADRB2	Pratzka J.
					TAAR1 + DRD2	[83]
					TAAR1 + 5HTR1B	Pratzka J.
					TAAR1 + TAAR5	Pratzka J.
TAAR5		trace amine associated receptor 5	G $\alpha_q$	Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus	TAAR5 + TAAR5	Pratzka J.
					TAAR5 + ADRB2	Pratzka J.
					TAAR1 + CN1R	Pratzka J.
					TAAR1 + 5HTR1B	Pratzka J.
NPY2R		Neuropeptide Y receptor Y2	G $\alpha_{i/o}$ G $\alpha_q$	Amygdala, Brainstem, Cerebellum, Cerebral Cortex, Hippocampus, Pons, Striatum, Thalamus, Hypothalamus: PO, ARC, DM, PFA, PVN	NPY2R + MC3R	[87]

## Abkürzungsverzeichnis:

AH - anterior hypothalamic nucleus ARC - arcuate nucleus DH - dorsal hypothalamus DMH - dorsomedial hypothalamic nucleus LHA - lateral hypothalamic area LS - lateral septum LT - lateral nucleus MB - mammillary nuclei ME - median eminence PFA - perifornical area PH - posterior hypothalamic area PN - posterior nucleus PO - preoptic nucleus PRN - periventricular nucleus PVN - paraventricular nucleus SCN - suprachiasmatic nucleus SO - supraoptic nucleus TMN - tuberomammillary nucleus VLH - ventrolateral hypothalamus VMH - ventromedial hypothalamus

**Literaturverzeichnis (Anhang Tabelle 1):**

1. Sharman, J.L., Benson, H.E., Pawson, A.J., et al., (2013). IUPHAR-DB: updated database content and new features. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue): p. D1083-8.
2. Bagnol, D., (2004). G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 7(5): p. 665-82.
3. Skrabanek, L., Murcia, M., Bouvier, M., et al., (2007). Requirements and ontology for a G protein-coupled receptor oligomerization knowledge base. *BMC Bioinformatics*, 8: p. 177.
4. Ng, G.Y., George, S.R., Zastawny, R.L., et al., (1993). Human serotonin<sub>1B</sub> receptor expression in Sf9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition. *Biochemistry*, 32(43): p. 11727-33.
5. Salim, K., Fenton, T., Bacha, J., et al., (2002). Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J Biol Chem*, 277(18): p. 15482-5.
6. Lee, S.P., Xie, Z., Varghese, G., et al., (2000). Oligomerization of dopamine and serotonin receptors. *Neuropsychopharmacology*, 23(4 Suppl): p. S32-40.
7. Xie, Z., Lee, S.P., O'Dowd, B.F., et al., (1999). Serotonin 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett*, 456(1): p. 63-7.
8. Herrick-Davis, K., Grinde, E., Harrigan, T.J., et al., (2005). Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine<sub>2c</sub> receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J Biol Chem*, 280(48): p. 40144-51.
9. Herrick-Davis, K., Weaver, B.A., Grinde, E., et al., (2006). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum: real-time visualization with confocal fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 281(37): p. 27109-16.
10. Herrick-Davis, K., Grinde, E., Lindsley, T., et al., (2012). Oligomer size of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2C (5-HT<sub>2C</sub>) receptor revealed by fluorescence correlation spectroscopy with photon counting histogram analysis: evidence for homodimers without monomers or tetramers. *J Biol Chem*, 287(28): p. 23604-14.
11. Mancia, F., Assur, Z., Herman, A.G., et al., (2008). Ligand sensitivity in dimeric associations of the serotonin 5HT<sub>2c</sub> receptor. *EMBO Rep*, 9(4): p. 363-9.
12. Schellekens, H., van Oeffelen, W.E., Dinan, T.G., et al., (2012). Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signalling. *J Biol Chem*.
13. Lukasiewicz, S., Polit, A., Kedracka-Krok, S., et al., (2010). Hetero-dimerization of serotonin 5-HT(2A) and dopamine D(2) receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1803(12): p. 1347-58.
14. Gines, S., Hillion, J., Torvinen, M., et al., (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15): p. 8606-11.
15. Ciruela, F., Casado, V., Rodrigues, R.J., et al., (2006). Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci*, 26(7): p. 2080-7.
16. Chandrasekera, P.C., Wan, T.C., Gizewski, E.T., et al., (2013). Adenosine A(1) receptors heterodimerize with beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors creating novel receptor complexes with altered G protein coupling and signaling. *Cell Signal*.
17. Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., et al., (2001). Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J Biol Chem*, 276(21): p. 18345-51.
18. Fanelli, F. and Felling, A., (2010). Dimerization and ligand binding affect the structure network of A(2A) adenosine receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1808(5): p. 1256-66.
19. Gandia, J., Galino, J., Amaral, O.B., et al., (2008). Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett*, 582(20): p. 2979-84.
20. Lukasiewicz, S., Blasiak, E., Faron-Gorecka, A., et al., (2007). Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A2A and serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol Rep*, 59(4): p. 379-92.
21. Vidi, P.A., Chemel, B.R., Hu, C.D., et al., (2008). Ligand-dependent oligomerization of dopamine D(2) and adenosine A(2A) receptors in living Neuronal cells. *Mol Pharmacol*, 74(3): p. 544-51.
22. Vidi, P.A., Chen, J., Irudayaraj, J.M., et al., (2008). Adenosine A(2A) receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. *FEBS Lett*, 582(29): p. 3985-90.
23. Cabello, N., Gandia, J., Bertarelli, D.C., et al., (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J Neurochem*, 109(5): p. 1497-507.

24. Navarro, G., Carriba, P., Gandia, J., et al., (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal*, 8: p. 1088-97.
25. Diaz-Cabiale, Z., Hurd, Y., Guidolin, D., et al., (2001). Adenosine A2A agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D2 receptors for dopamine in human striatum. *Neuroreport*, 12(9): p. 1831-4.
26. Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., et al., (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem*, 277(20): p. 18091-7.
27. Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., et al., (2003). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*, 278(47): p. 46741-9.
28. Ciruela, F., Burgueno, J., Casado, V., et al., (2004). Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal Chem*, 76(18): p. 5354-63.
29. Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., et al., (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*, 32(11): p. 2249-59.
30. Xu, J., He, J., Castleberry, A.M., et al., (2003). Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *J Biol Chem*, 278(12): p. 10770-7.
31. Vilardaga, J.P., Nikolaev, V.O., Lorenz, K., et al., (2008). Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls *Cell Signaling*. *Nat Chem Biol*, 4(2): p. 126-31.
32. Jordan, B.A., Gomes, I., Rios, C., et al., (2003). Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*, 64(6): p. 1317-24.
33. Xu, J., Paquet, M., Lau, A.G., et al., (2001). beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95. *J Biol Chem*, 276(44): p. 41310-7.
34. Somvanshi, R.K., War, S.A., Chaudhari, N., et al., (2011). Receptor specific crosstalk and modulation of signaling upon heterodimerization between beta1-adrenergic receptor and somatostatin receptor-5. *Cell Signal*, 23(5): p. 794-811.
35. Lavoie, C., Mercier, J.F., Salahpour, A., et al., (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem*, 277(38): p. 35402-10.
36. Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M., (2001). Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci*, 68(19-20): p. 2243-50.
37. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., et al., (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7): p. 3684-9.
38. Dorsch, S., Klotz, K.N., Engelhardt, S., et al., (2009). Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods*, 6(3): p. 225-30.
39. James, J.R., Oliveira, M.I., Carmo, A.M., et al., (2006). A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat Methods*, 3(12): p. 1001-6.
40. Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., et al., (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 277(47): p. 44925-31.
41. Nemoto, W. and Toh, H., (2005). Prediction of interfaces for oligomerizations of G-protein coupled receptors. *Proteins*, 58(3): p. 644-60.
42. Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J.F., et al., (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem*, 279(32): p. 33390-7.
43. Sartania, N., Appelbe, S., Padiani, J.D., et al., (2007). Agonist occupancy of a single monomeric element is sufficient to cause internalization of the dimeric beta2-adrenoceptor. *Cell Signal*, 19(9): p. 1928-38.
44. Hebert, T.E., Moffett, S., Morello, J.P., et al., (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*, 271(27): p. 16384-92.

45. Breit, A., Lagace, M., and Bouvier, M., (2004). Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem*, 279(27): p. 28756-65.
46. Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., et al., (2002). Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem J*, 365(Pt 2): p. 429-40.
47. Jordan, B.A., Trapaidze, N., Gomes, I., et al., (2001). Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(1): p. 343-8.
48. McGraw, D.W., Mihlbachler, K.A., Schwarb, M.R., et al., (2006). Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest*, 116(5): p. 1400-9.
49. Somvanshi, R.K., Chaudhari, N., Qiu, X., et al., (2011). Heterodimerization of beta2 adrenergic receptor and somatostatin receptor 5: Implications in modulation of signaling pathway. *J Mol Signal*, 6: p. 9.
50. Marcellino, D., Carriba, P., Filip, M., et al., (2008). Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology*, 54(5): p. 815-23.
51. Rios, C., Gomes, I., and Devi, L.A., (2006). mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol*, 148(4): p. 387-95.
52. Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., et al., (2011). AT1R-CB(1)R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J*, 30(12): p. 2350-63.
53. Ellis, J., Pediani, J.D., Canals, M., et al., (2006). Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem*, 281(50): p. 38812-24.
54. Trettel, F., Di Bartolomeo, S., Lauro, C., et al., (2003). Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J Biol Chem*, 278(42): p. 40980-8.
55. Wilson, S., Wilkinson, G., and Milligan, G., (2005). The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem*, 280(31): p. 28663-74.
56. Parenty, G., Appelbe, S., and Milligan, G., (2008). CXCR2 chemokine receptor antagonism enhances DOP opioid receptor function via allosteric regulation of the CXCR2-DOP receptor heterodimer. *Biochem J*, 412(2): p. 245-56.
57. Tanaka, T., Nomura, W., Narumi, T., et al., (2010). Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of the dimerization state in cells. *J Am Chem Soc*, 132(45): p. 15899-901.
58. Hammad, M.M., Kuang, Y.Q., Yan, R., et al., (2010). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 is involved in chemokine receptor homodimer CCR5 internalization and signal transduction but does not affect CXCR4 homodimer or CXCR4-CCR5 heterodimer. *J Biol Chem*, 285(45): p. 34653-64.
59. Nijmeijer, S., Leurs, R., Smit, M.J., et al., (2010). The Epstein-Barr virus-encoded G protein-coupled receptor BILF1 hetero-oligomerizes with human CXCR4, scavenges Galphai proteins, and constitutively impairs CXCR4 functioning. *J Biol Chem*, 285(38): p. 29632-41.
60. Rodriguez, D. and Gutierrez-de-Teran, H., (2012). Characterization of the homodimerization interface and functional hotspots of the CXCR4 chemokine receptor. *Proteins*, 80(8): p. 1919-28.
61. See, H.B., Seeber, R.M., Kocan, M., et al., (2010). Application of G protein-coupled receptor-heteromer identification technology to monitor beta-arrestin recruitment to G protein-coupled receptor heteromers. *Assay Drug Dev Technol*, 9(1): p. 21-30.
62. Sohy, D., Parmentier, M., and Springael, J.Y., (2007). Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J Biol Chem*, 282(41): p. 30062-9.
63. Pello, O.M., Martinez-Munoz, L., Parrillas, V., et al., (2008). Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *Eur J Immunol*, 38(2): p. 537-49.
64. Finley, M.J., Chen, X., Bardi, G., et al., (2008). Bi-directional heterologous desensitization between the major HIV-1 co-receptor CXCR4 and the kappa-opioid receptor. *J Neuroimmunol*, 197(2): p. 114-23.
65. Kong, M.M., Fan, T., Varghese, G., et al., (2006). Agonist-induced cell surface trafficking of an intracellularly sequestered D1 dopamine receptor homo-oligomer. *Mol Pharmacol*, 70(1): p. 78-89.

66. Lee, S.P., O'Dowd, B.F., Rajaram, R.D., et al., (2003).D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry*, 42(37): p. 11023-31.
67. O'Dowd, B.F., Ji, X., Alijaniam, M., et al., (2011).Separation and reformation of cell surface dopamine receptor oligomers visualized in cells. *Eur J Pharmacol*, 658(2-3): p. 74-83.
68. Urizar, E., Yano, H., Kolster, R., et al., (2011).CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nat Chem Biol*, 7(9): p. 624-30.
69. Jiang, H., Betancourt, L., and Smith, R.G., (2006).Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol*, 20(8): p. 1772-85.
70. Ferrada, C., Moreno, E., Casado, V., et al., (2009).Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol*, 157(1): p. 64-75.
71. Marcellino, D., Ferre, S., Casado, V., et al., (2008).Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem*, 283(38): p. 26016-25.
72. Juhasz, J.R., Hasbi, A., Rashid, A.J., et al., (2008).Mu-opioid receptor heterooligomer formation with the dopamine D1 receptor as directly visualized in living cells. *Eur J Pharmacol*, 581(3): p. 235-43.
73. Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., et al., (2004).Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem*, 279(34): p. 35671-8.
74. O'Dowd, B.F., Ji, X., Alijaniam, M., et al., Separation and reformation of cell surface dopamine receptor oligomers visualized in cells. *Eur J Pharmacol*, 658(2-3): p. 74-83.
75. Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M., et al., (2007).D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2): p. 654-9.
76. So, C.H., Verma, V., Alijaniam, M., et al., (2009).Calcium signaling by dopamine D5 receptor and D5-D2 receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that for dopamine D1-D2 receptor hetero-oligomers. *Mol Pharmacol*, 75(4): p. 843-54.
77. So, C.H., Verma, V., O'Dowd, B.F., et al., (2007).Desensitization of the dopamine D1 and D2 receptor hetero-oligomer mediated calcium signal by agonist occupancy of either receptor. *Mol Pharmacol*, 72(2): p. 450-62.
78. Ng, G.Y., O'Dowd, B.F., Lee, S.P., et al., (1996).Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 227(1): p. 200-4.
79. Maggio, R. and Millan, M.J., (2010).Dopamine D2-D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance. *Curr Opin Pharmacol*, 10(1): p. 100-7.
80. Albizu, L., Holloway, T., Gonzalez-Maeso, J., et al., (2011).Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT2A and dopamine D2 receptors. *Neuropharmacology*, 61(4): p. 770-7.
81. Ferrada, C., Ferre, S., Casado, V., et al., (2008).Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology*, 55(2): p. 190-7.
82. Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., et al., (2000).Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, 288(5463): p. 154-7.
83. Espinoza, S., Salahpour, A., Masri, B., et al., (2011).Functional interaction between Trace Amine Associated Receptor 1 (TAAR1) and dopamine D2 receptor. *Mol Pharmacol*.
84. Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H.E., et al., (2012).Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic Neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron*, 73(2): p. 317-32.
85. Nimchinsky, E.A., Hof, P.R., Janssen, W.G., et al., (1997).Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J Biol Chem*, 272(46): p. 29229-37.
86. Rediger, A., Piechowski, C.L., Yi, C.X., et al., (2011).Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem*, 286(45): p. 39623-31.
87. Rediger, A., Tarnow, P., Bickenbach, A., et al., (2009).Heterodimerization of hypothalamic G-protein-coupled receptors involved in weight regulation. *Obes Facts*, 2(2): p. 80-6.
88. Park, S., Jiang, H., Zhang, H., et al., (2012).Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(46): p. 19003-8.
89. Müller, T.D., Müller, A., Yi, C.X., et al., (2013).The orphan receptor Gpr83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms. *Nat Commun*, 4: p. 1968.

90. Brock, C., Oueslati, N., Soler, S., et al., (2007). Activation of a dimeric metabotropic glutamate receptor by intersubunit rearrangement. *J Biol Chem*, 282(45): p. 33000-8.
91. Rondard, P., Liu, J., Huang, S., et al., (2006). Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J Biol Chem*, 281(34): p. 24653-61.
92. Delille, H.K., Becker, J.M., Burkhardt, S., et al., (2012). Heterocomplex formation of 5-HT<sub>2A</sub>-mGlu<sub>2</sub> and its relevance for cellular signaling cascades. *Neuropharmacology*, 62(7): p. 2184-91.
93. Goudet, C., Kniazeff, J., Hlavackova, V., et al., (2005). Asymmetric functioning of dimeric metabotropic glutamate receptors disclosed by positive allosteric modulators. *J Biol Chem*, 280(26): p. 24380-5.
94. Gonzalez-Maeso, J., Ang, R.L., Yuen, T., et al., (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 452(7183): p. 93-7.
95. Mandriks, I., Petrovska, R., and Wikberg, J., (2005). Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun*, 326(2): p. 349-54.
96. Biebermann, H., Krude, H., Elsner, A., et al., (2003). 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*, 52(12): p. 2984-8.
97. Breit, A., Gagnidze, K., Devi, L.A., et al., (2006). Simultaneous activation of the delta opioid receptor (deltaOR)/sensory Neuron-specific receptor-4 (SNSR-4) hetero-oligomer by the mixed bivalent agonist bovine adrenal medulla peptide 22 activates SNSR-4 but inhibits deltaOR signaling. *Mol Pharmacol*, 70(2): p. 686-96.
98. Filizola, M. and Weinstein, H., (2002). Structural models for dimerization of G-protein coupled receptors: the opioid receptor homodimers. *Biopolymers*, 66(5): p. 317-25.
99. Wang, D., Sun, X., Bohn, L.M., et al., (2005). Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol*, 67(6): p. 2173-84.
100. Decailot, F.M., Rozenfeld, R., Gupta, A., et al., (2008). Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(41): p. 16045-50.
101. Filizola, M., Olmea, O., and Weinstein, H., (2002). Prediction of heterodimerization interfaces of G-protein coupled receptors with a new subtractive correlated mutation method. *Protein Eng*, 15(11): p. 881-5.
102. Gomes, I., Jordan, B.A., Gupta, A., et al., (2000). Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci*, 20(22): p. RC110.
103. Rozenfeld, R. and Devi, L.A., (2007). Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J*, 21(10): p. 2455-65.
104. Snook, L.A., Milligan, G., Kieffer, B.L., et al., (2006). Mu-delta opioid receptor functional interaction: Insight using receptor-G protein fusions. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(2): p. 683-90.
105. Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., et al., (2002). Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem*, 277(22): p. 19762-72.
106. Woolf, P.J. and Linderman, J.J., (2004). An algebra of dimerization and its implications for G-protein coupled receptor signaling. *J Theor Biol*, 229(2): p. 157-68.
107. Grant, M., Collier, B., and Kumar, U., (2004). Agonist-dependent dissociation of human somatostatin receptor 2 dimers: a role in receptor trafficking. *J Biol Chem*, 279(35): p. 36179-83.
108. Grant, M. and Kumar, U., (2009). The role of G-Proteins in the dimerisation of human somatostatin receptor types 2 and 5. *Regul Pept*, 159(1-3): p. 3-8.
109. Patel, R.C., Lange, D.C., and Patel, Y.C., (2002). Photobleaching fluorescence resonance energy transfer reveals ligand-induced oligomer formation of human somatostatin receptor subtypes. *Methods*, 27(4): p. 340-8.