

Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden die größte Familie membrangebundener Rezeptoren und regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Die Aktivierung von GPCRs induziert intrazelluläre Konzentrationsänderungen von sekundären Botenstoffen, wie z.B. zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) und Calcium (Ca^{2+}). Diese sekundären Effekte werden durch spezifische Signalkaskaden induziert. Stimulierung der Phospholipase C (PLC) führt zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und nachfolgender Aktivierung von ionotropen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) Rezeptoren, die zu einem Ca^{2+} Einstrom aus intrazellulären Speichern in das Cytosol führen. Dahingegen führt die Aktivierung membrangebundener Adenylatzyklasen (ACs) zur Produktion von cAMP.

Es steht eine Vielzahl verschiedener genetisch kodierter Fluoreszenzsensoren zur Verfügung, die eine zeitlich aufgelöste Detektion sekundärer Botenstoffe ermöglichen. Allerdings führt die Expression dieser Sensoren zu einer homogenen Verteilung im Cytosol und verhindert somit eine Aufklärung der räumlichen Dynamik dieser Botenstoffe. In dieser Arbeit wurden verschiedene Lokalisierungssequenzen an den cAMP Sensor Epac1-camps angefügt, die zu einer spezifischen Lokalisation des Sensorproteins in der Plasmamembran und im Kern führten. Als unabhängige Kontrolle wurde eine nicht funktionelle Variante durch Austausch einer einzelnen Aminosäure in der Bindedomäne für cAMP erzeugt. Die Funktionalität der verschiedenen Sensorkonstrukte wurde sowohl *in vitro* als auch in HEK293 Zellen bestätigt. Mittels rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (rAAVs) gelang es die Sensorvarianten in primären hippocampalen Neuronen zu exprimieren.

Um die Zeitabhängigkeit von GPCR-vermittelten Signalkaskaden zu untersuchen, wurde ein experimenteller Ansatz etabliert, der schnelle kinetische Messungen in lebenden Zellen in einem Stopped-Flow System mit der gezielten und zeitlich definierten Aktivierung verschiedener Signalwegkomponenten durch „caged compounds“ verbindet. Untersucht wurden zwei verschiedene HEK293 Zelllinien, die Octopaminrezeptoren aus *Drosophila melanogaster* stabil exprimieren, deren Aktivierung entweder zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP (DmOct β 1) oder Ca^{2+} (DmOct α 1B) Konzentration führt. Die DmOct β 1 Zelllinie exprimiert zusätzlich einen cAMP sensitiven zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNG) Ca^{2+} Kanal (FlpTM-DmOct β 1). Die Zelllinien ermöglichten die Analyse von PLC- und AC-vermittelten Signalwegen sowohl mittels Detektion durch den Ca^{2+} sensitiven Farbstoff Fluo-4 als auch durch den genetisch kodierten Ca^{2+} Sensor GCaMP3.0. In Stopped-Flow Experimenten mit der DmOct α 1B Zelllinie wurde für die gesamte Signalkaskade, von Rezeptoraktivierung bis Einstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und deren Detektion eine Zeit von ~ 350 ms ermittelt. In Experimenten mit Octopamin in FlpTM-

DmOct β 1 Zellen wurde für die gesamte Signalkaskade eine Zeit von ~ 6 s bestimmt. Nach Photolyse von „caged“ cAMP betrug die Zeit von der Aktivierung des CNG Kanals bis zur Detektion des Ca²⁺ Einstroms in FlpTM-DmOct β 1 Zellen ~ 60 ms. Folglich beträgt die Zeit von Rezeptoraktivierung über Stimulation der AC und daraus folgender Produktion von cAMP ~ 5,94 s.

Um eine detailliertere Untersuchung des AC-vermittelten Signalweges zu gewährleisten, wurden Vorstufen von „caged“ Forskolin zur direkten und zeitlich definierten Aktivierung membrangebundener ACs entwickelt. Der in dieser Arbeit beschriebene experimentelle Ansatz ist anwendbar für die Bestimmung der Zeitkonstanten rezeptorvermittelter Signalkaskaden.

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) comprise the largest membrane receptor gene family and are involved in the modulation of a vast number of cellular functions. Downstream effects of GPCR activation culminate in changes of the intracellular concentration of second messengers, e.g. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or Ca^{2+} . These effects are mediated by defined signalling cascades: Phospholipase C (PLC)-mediated cleavage of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) into diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) followed by activation of IP_3 receptors leads to Ca^{2+} release from intracellular stores. The activation of membrane-bound adenylyl cyclases (ACs) results in cAMP production.

In order to monitor the dynamics of second messengers in cells, a wide range of genetically encoded fluorescent sensors has been developed in the last years. However, these sensor constructs are distributed within the cytosol impeding spatially resolved measurements of second messenger dynamics. In this thesis, the cAMP sensor Epac1-camps was modified by addition of short target sequences leading to localization in specific cellular compartments, such as the plasma membrane and the nucleus. A non-functional variant of the sensor protein was generated by the exchange of one single amino acid residue. Functionality of the Epac1-camps constructs was confirmed both *in vitro* and in HEK293 cells. Expression of the sensor variants was also achieved in primary hippocampal neurons (PHNs) by the application of recombinant adeno-associated viruses (rAAVs).

In order to gain further insight into the time constants of GPCR-mediated signalling cascades, an approach combining stopped-flow experiments with living cells and the specific activation of signalling components at defined time points by caged compounds was established. Two different HEK293 cell lines constitutively expressing octopamine receptors from *Drosophila melanogaster* were applied in these stopped-flow experiments. Stimulation of the receptors either results in increased cAMP (DmOct β 1) or Ca^{2+} (DmOct α 1B) levels. DmOct β 1 cells additionally expressed a cAMP-sensitive cyclic nucleotide-gated (CNG) Ca^{2+} channel (FlpTM-DmOct β 1). This setup allowed monitoring of PLC- and AC-mediated signalling cascades via the Ca^{2+} -sensitive dye Fluo-4 or the genetically encoded Ca^{2+} sensor GCaMP3.0. For DmOct α 1B cells, stopped-flow experiments showed that the entire signalling cascade from receptor activation to Ca^{2+} release and its detection took ~ 350 ms. In contrast, signal transduction in FlpTM-DmOct β 1 cells was much longer and took ~ 6 s from receptor activation to CNG channel-mediated Ca^{2+} influx. Photolytic cleavage of caged cAMP and subsequent activation of the CNG channel was very fast and resulted in Ca^{2+} signal detection after ~ 60 ms. Hence, I

determined that the entire signalling cascade from DmOct β 1 activation to AC-mediated cAMP production takes place in ~ 5.94 s.

In order to further investigate the time constants of AC-mediated cAMP production initial steps have been taken to develop a caged derivative of forskolin for fast and specific stimulation of membrane-bound ACs. This approach is highly suitable for detailed investigation of the time-dependence of receptor-mediated signalling pathways.