

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
"CAROL DAVILA" BUCHAREST
DOCTORAL SCHOOL
DOMAIN: MEDICINE**

**Fluorescent Biosensors for G-Protein Signaling:
Applications for Pharmacology, Physiology and
Pathophysiology**

ABSTRACT OF THE HABILITATION THESIS

CANDIDATE:

Rinne, Andreas, PhD;

University of Medicine and Pharmacy "Carol Davila" Bucharest

2024

1 Scientific activities

G protein-coupled receptors (GPCRs) control multiple cellular signaling pathways and cellular functions. When activated chronically, physiological signaling can transform into pathological signaling promoting the development of diseases. GPCRs are expressed in many tissues and represent the major targets of all drugs prescribed today. Understanding the molecular mechanisms of GPCR activation and their signaling properties in pathologies are keys to develop novel drugs to treat diseases. Fluorescent biosensors for GPCR signaling and downstream effectors are versatile tools that allow to visualize and quantify all aspects of GPCR signaling, including active and inactive receptor conformations, efficacy of ligand binding, G protein activation, signaling pathway specificity and regulation of effectors, such as enzymes and ion channels. This thesis highlights three novel aspects of GPCR signaling, which were discovered with optical biosensors in single cell measurements.

(1) The first part describes the regulation of GPCR signaling by the membrane potential. Many GPCRS are expressed in muscle cells or neurons, where they are exposed to frequent depolarizations of the cell membrane. Using biosensors for receptor activation and G protein signaling in voltage-clamped cells, it was shown that alpha- and beta-adrenergic receptors as well as muscarinic receptors for acetylcholine display an intrinsic voltage-sensitivity. The precise control of receptor modulation, whether GPCRs were activated or deactivated by membrane depolarization, was dependent on each specific receptor type. Voltage dependence was also detected in wild type receptors and modulated physiological signaling cascades downstream of the receptor proteins. This novel phenomenon has direct implications on receptor pharmacology and explains why some receptors bind agonists or synthetic drugs with reduced affinity when exposed to strong depolarization of the cell membrane, e.g., as seen under neuronal epilepsies or cardiac arrhythmias.

(2) The second part summarizes a series of studies investigating the desensitization of alpha-adrenergic receptors. Receptor desensitization occurs for some GPCRs and describes the phenomenon that receptor signaling weakens under continuous presence of a stimulating agonist. It can occur as acute desensitization within seconds of receptor stimulation or as receptor internalization, which can last from minutes to hours or longer. The key event to initiate desensitization is phosphorylation of the receptor protein by different cellular kinases. By using fluorescent sensors for receptor signaling (G protein

activation, activation of phospholipase C), receptor phosphorylation (arrestin binding) and internalization (fluorescent receptors) the kinetics of the molecular mechanisms underlying acute desensitization of alpha-adrenergic signaling were uncovered. With phosphorylation-deficient receptor mutants it was discovered that receptor desensitization was dependent on receptor phosphorylation by protein kinase C (PKC), while receptor internalization was dependent on a complex phosphorylation pattern, mediated by the joint activities of PKC and G protein-regulated kinase 2 (GRK2). Dependent on the receptor species, this led either to mild desensitization (strong signaling) or strong desensitization (transient, weaker signaling) of the receptor. It was also demonstrated that the degree of receptor desensitization influenced the signaling properties of downstream effectors, such as ion channels. The observation that receptor desensitization shapes effector responses represents a novel, previously overlooked mechanism to fine-tune spatiotemporal properties of signal cascades.

(3) The third part describes how calcium (Ca) signals control gene transcription in cells of the cardiovascular system. On the cellular level, many diseases, such as hypertrophy or heart failure, are characterized by a change in Ca signaling. The simultaneous use of biosensors for gene transcription (fluorescent nuclear factors of activated T cells (NFAT) transcription factors) and Ca indicator dyes in confocal imaging experiments allowed the correlation of cellular Ca signals with the Ca²⁺-sensitive activation pattern of NFAT. It was discovered that transcription was not simply controlled by a global rise in intracellular Ca irrespective of the Ca source, but rather by specific activities of distinct Ca signaling proteins, a phenomenon that was cell-type specific: in endothelial cells of the vascular system, NFAT was activated by Ca²⁺-influx from the extracellular space, but not via IP₃-mediated Ca release from intracellular Ca stores. In atrial cardiac myocytes NFAT transcription factors were activated by Ca release from internal stores mediated by the neurohumoral receptor stimulation with angiotensin II or endothelin-1. In stark contrast, neurohumoral Ca²⁺ signals did not activate NFAT in ventricular cells. In those cells, only strong pathological Ca signals such as Ca influx during cellular arrhythmias caused activation of NFAT. Given these results, successful therapeutic strategies to target Ca-induced remodeling in the cardiovascular system may differ for each cell type. Taken together, those experimental applications demonstrate that fluorescent biosensors are excellent tools to study dynamic signaling events in many types of living cells.

2 Academic activities

I have gained teaching experience on the academic level by teaching physiology and pharmacology to students of pharmacy (lectures and practical courses) from 2010 to 2013 and by teaching physiology to medical students (lectures, seminars, and practical courses) from 2013-2019, during which I also served as accredited examiner in physiology for the first state examination for medical students. As associate professor, I was an active member of various committees at the medical faculty, including committees for intramural grant applications, PhD fellowships of the university and served as reviewer and examiner for medical doctoral theses. From 2013 to 2019 I was the first supervisor of two PhD students and two master students, who defended their theses with highest grades and successfully published their results.

3 Professional career

I am a trained cell biologist and received my diploma in biology from the Faculty of Biology and Biotechnology, University of Bochum, Germany, in 2002. During my following PhD work at the same place, I received training in molecular biology and ion channel electrophysiology and was awarded with a PhD in neuroscience in 2006. This was followed by two postdoctoral positions in USA and Germany. During the first postdoctoral phase in Chicago IL, USA, from 2006 to 2010, I received state-of-the-art training in dynamic confocal fluorescence microscopy and Ca^{2+} signaling techniques in living cells and continued my training in cellular models for cardiac physiology and pathophysiology. During the second postdoctoral phase in Marburg, Germany, I focused on FRET microscopy and the use of genetically encoded biosensors for Ca^{2+} - and G protein signaling pathways. The scientific activities during my postdoctoral training allowed me to successfully apply for an independent position as an associate professor for molecular cardiology and research group leader in Bochum, Germany from 2013 to 2019. In 2022 I accepted a research position as senior scientist at the Department of Biophysics and Cellular Biotechnology at UMFCB in Bucharest.

4 Outlook

I believe that my previous international scientific and academic experiences will allow me to successfully train and supervise PhD students at UMFCB. Students will receive in-

depth training in molecular biology and cell biology techniques. They will be trained in fluorescence microscopy and in the use of optical biosensors to address physiological and pathological signaling. This represents a novel research direction at the department which will prepare students to successfully continue their career as research scientists following their PhD training.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL: MEDICINĂ**

**Biosenzori fluorescenți pentru semnalizarea proteinei G:
aplicații în farmacologie, fiziologie și patofiziologie**

REZUMATUL TEZEI DE ABILITARE

CANDIDAT:

Rinne, Andreas, PhD;

Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila" din București

1 Activitatea științifică

Receptorii cuplați cu proteina G (GPCR) controlează nenumărate căi de semnalizare și, implicit, diferite funcții ale celulelor. Prin activarea de lungă durată, cronică, căile de semnalizare fiziologic normale se pot transforma în semnalizare patologică, ceea ce promovează apariția și dezvoltarea disfuncțiilor celulare și a bolilor. GPCR sunt exprimați în multe țesuturi și reprezintă una dintre țintele farmacologice majore ale medicamentelor prescrise la ora actuală. De aceea, pentru dezvoltarea unor noi compuși cu eficiență terapeutică crescută, este necesară înțelegerea mecanismelor moleculare prin care GPCR se activează și semnalizează în patologie. Metodele de cercetare modernă au specificitate și sensibilitate crescută și pun în evidență dinamica acestor receptori în timp real. Aceste metode includ utilizarea biosenzorilor fluorescenți specifici pentru investigarea interacțiunii GPCR cu efectorii intracelulari, instrumente extrem de versatile pentru a vizualiza și cuantifica aspecte specifice ale semnalizării prin GPCR, cum ar fi conformațiile activă și inactivă ale receptorului, eficiența de legare a liganzilor, activarea proteinelor G ca primi efectori, specificitatea căilor de semnalizare și reglarea efecturilor finale cum ar fi enzimele și canalele ionice. În această teză am evidențiat trei aspecte noi legate de semnalizarea prin GPCR descoperite prin înregistrări pe celule individuale utilizând biosenzorii optici.

(1) Primul aspect descrie reglarea semnalizării GPCR de către potențialul membranelor. Mulți receptori GPCR sunt exprimați în celule musculare sau neuroni, unde sunt expuși la depolarizări frecvente ale membranei celulare. Folosind biosenzori care au pus în evidență activarea receptorilor și semnalizarea proteinei G în celule al căror potențial membranelor a fost controlat, am demonstrat că receptorii alfa și beta-adrenergici, precum și receptorii muscarinici pentru acetilcolină prezintă o sensibilitate intrinsecă față de evenimentele electrice, și anume variația potențialului membranelor. Modalitatea în care potențialul membranelor a modulat activitatea receptorilor, indiferent dacă GPCR au fost activați sau dezactivați prin depolarizarea membranei, a fost specifică fiecărui tip de receptor. Dependența de voltaj detectată în receptorii de tip sălbatic, exprimați în mod normal în celule, a influențat mai departe cascadele de semnalizare activate intracelular de proteinele receptoare. Aceasta este o observație nouă, ce are implicații directe asupra farmacologiei receptorilor și poate explica de ce unii agoniști sau medicamente sintetice se leagă cu afinitate redusă la receptor atunci când apare o depolarizare puternică a membranei celulare, așa cum se observă, de exemplu, în epilepsiile neuronale sau aritmiile cardiace.

(2) A doua parte prezintă studiile care au investigat desensibilizarea receptorilor alfa-adrenergici. Desensibilizarea receptorilor descrie fenomenul prin care semnalizarea receptorilor se reduce la prezența continuă a unui agonist stimulant. Acest fenomen apare numai pentru unii GPCR și se poate manifesta ca o desensibilizare acută în câteva secunde de la stimularea receptorilor sau ca o internalizare a receptorilor, care poate dura de la minute la ore sau mai mult. S-a demonstrat că evenimentul cheie în inițierea desensibilizării este fosforilarea proteinei receptor de către diferite kinaze celulare. Senzorii fluorescenți utilizați pentru a investiga (a) diferitele etape ale semnalizării dependente de activarea receptorilor: activarea proteinei G, activarea fosfolipazei C, (b) fosforilarea receptorilor evidențiate prin legarea arestinei și (c) internalizarea receptorilor vizualizată prin marcarea fluorescentă a acestora, au permis caracterizarea cinetică a mecanismelor moleculare ce stau la baza desensibilizării acute a receptorilor alfa adrenergici și a semnalizării intracelulare activate de aceștia. Utilizarea unor receptori mutați, cu deficit de fosforilare, a permis evidențierea dependenței desensibilizării receptorilor de fosforilarea receptorilor la situsurile specifice protein kinazei C (PKC), spre deosebire de procesul de internalizare al receptorilor, mai complex, care a depins de fosforilarea simultană a receptorului de către PKC și kinaza de tip 2 reglată de proteina G (GRK2). Acest model de fosforilare a condus la manifestări diferite ale sensibilizării în funcție de speciile de receptori: fie la o desensibilizare ușoară ceea ce a condus la o persistență a activării receptorului și prin urmare la o semnalizare puternică, fie la o desensibilizare puternică, ceea ce a dus la o semnalizare tranzitorie, mai slabă a receptorului. De asemenea, aceste experimente au demonstrat că gradul de desensibilizare a receptorilor a influențat proprietățile de semnalizare ale efectorilor intracelulari, cum ar fi canalele ionice. Observația că desensibilizarea receptorilor modulează răspunsurile efectorilor reprezintă un mecanism nou, neevidențiat anterior, esențial pentru reglajul fin al spațio-temporalității cascadelor de semnalizare.

(3) A treia parte descrie modul în care semnalele de calciu (Ca) controlează transcripția genelor în celulele sistemului cardiovascular. La nivel celular, multe boli printre care hipertrofia sau insuficiența cardiacă, sunt însoțite de schimbarea semnalizării dependente de ionii de Ca. Biosenzorii fluorescenți care exprimă factori de transcripție sensibili la ionii de Ca (TF) au fost utilizați simultan cu coloranți fluorescenți indicatori de Ca în experimentele imagistice confocale pentru investigarea simultană și corelarea transcripției genelor induse de factorul nuclear al activării celulelor T (NFAT) cu variația nivelului intracelular al Ca. Modul de activare al izoformei NFAT care controlează genele de întreținere a celulei a fost

comparat cu modul de activare al altei izoforme a NFAT care este activată numai în timpul hipertrofiei și insuficienței cardiace. Am descoperit că transcripția nu a fost indusă de o creștere globală a Ca intracelular, provenit din orice sursă de Ca, ci are o sursă specifică de calciu ce controlează proteine de semnalizare specifice și diferite în funcție de tipul celular. Astfel, în celulele endoteliale ale sistemului vascular, creșterea susținută a Ca intracelular provenit din mediul extracelular și nu ca urmare a eliberării Ca din sursele intracelulare a activat cele două izoforme ale NFAT. În cardiomiocitele atriale, izoformele relevante patologic ale NFAT au fost activate prin eliberarea Ca din depozitele interne ca urmare a stimulării receptorilor neurohumorali cu angiotensină II sau endotelină-1. Aceste semnale nu au activat aceleași izoforme ale NFAT în celulele ventriculare. În celulele ventriculare, izoformele NFAT au fost activate numai de semnale patologice puternice de Ca, cum ar fi influxul de Ca datorat aritmiilor celulare. Având în vedere aceste rezultate, pentru succesul strategiilor terapeutice trebuie să se ia în considerare mecanismele diferite de remodelare induse de Ca în funcție de tipul de celulă a sistemului cardiovascular. Aceste aplicații experimentale demonstrează că biosenzorii fluorescenți sunt instrumente excelente pentru a studia evenimentele de semnalizare dinamică în multe tipuri de celule vii.

2 Activități academice

Am dobândit experiență didactică la nivel academic prin predarea disciplinelor de Fiziologie și Farmacologie studenților Facultății de Farmacie din Marburg, Germania (cursuri, seminarii și lucrări practice) din 2010 până în 2013 și prin predarea disciplinei de Fiziologie studenților Facultății de medicină, Bochum (cursuri, seminarii și lucrări practice) din 2013-2019, timp în care am îndeplinit și funcția de examinator acreditat în Fiziologie pentru primul examen de stat pentru studenții Facultății de Medicină. În calitate de profesor asociat, am fost membru activ în diferite comisii ale Facultății de Medicină, inclusiv comisii pentru finanțare intramurală a cercetării, burse de doctorat acordate de universitate și am exercitat funcții de referent și examinator pentru teze de doctorat în Medicină. Din 2013 până în 2019 am fost conducătorul principal a doi doctoranzi și doi masteranzi, care și-au susținut tezele cu cele mai mari note și și-au publicat cu succes rezultatele.

3 Cariera profesională

Sunt specializat în biologie celulară. În 2002 am primit diploma în Biologie de la Facultatea de Biologie și Biotehnologie, Universitatea din Bochum, Germania. Studiile doctorale au continuat la aceeași facultate, și au contribuit semnificativ la specializarea mea în biologie celulară și moleculară, electrofiziologia canalelor ionice. Studiile s-au finalizat cu obținerea titlului de doctor *Magna cum laude* în Neuroștiințe în 2006. Această etapă a fost urmată de două posturi postdoctorale în SUA și Germania. În timpul primului stagiul postdoctoral din Chicago IL, SUA, din 2006 până în 2010, m-am specializat în metode și tehnici de ultimă generație, cum ar fi microscopia fluorescentă confocală dinamică și tehnicile de semnalizare dependente de calciu în celulele vii aplicate pe modele celulare utilizate în fiziologia și fiziopatologia cardiacă. În timpul celui de al doilea stagiul postdoctoral din Marburg, Germania, cercetarea s-a axat pe microscopia FRET și utilizarea biosenzorilor codificați genetic pentru căile de semnalizare prin Ca și proteinele G. Activitățile științifice din timpul pregătirii mele postdoctorale mi-au permis să aplic cu succes pentru o poziție independentă de profesor asociat în Cardiologie moleculară și lider de grup de cercetare în Bochum, Germania, din 2013 până în 2019. În 2022 am acceptat poziția de cercetător senior în cadrul Departamentului de Biofizică și Biotehnologie Celulară în cadrul Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila (UMFCD) din București.

4 Perspective

Consider că experiența științifică și academică internațională dobândită îmi va permite să pregătesc și să supraveghez cu succes doctoranzi la UMFCD. Studenții vor primi o pregătire aprofundată în tehnicile de biologie moleculară și celulară. Ei vor fi instruiți în microscopia de fluorescență și în utilizarea biosenzorilor optici pentru a aborda tematici de semnalizare fiziologică și patologică. Aceasta reprezintă o nouă direcție de cercetare în departament, care va pregăti studenții doctoranzi pentru o carieră de succes în cercetare.