

Analyzing the role of ciliary cAMP signaling in neurons

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christina Klausen

aus Bonn

Bonn, 2020

Abstract

Primary cilia are membrane protrusions that emanate from the surface of almost every vertebrate cell. Primary cilia function as cellular antenna that receive stimuli from the environment and locally transduce this information into an intracellular response. Ciliary dysfunction causes severe diseases collectively termed ciliopathies. The Bardet-Biedl-Syndrome (BBS) is a ciliopathy that displays obesity as one major symptom, linking primary cilia to the regulation of energy homeostasis.

Mutations causing BBS have been discovered in genes encoding for protein components of the BBSome and the BBS chaperonin-complex. These protein complexes control ciliary protein localization, i.e. the transport of GPCRs, which couple to cAMP signaling pathway. Certain GPCRs and also downstream cAMP signaling components, i.e. AC3, are enriched in primary cilia of neurons regulating food intake, i.e. AgRP/NPY neurons and POMC/CART neurons. However, the role of ciliary cAMP signaling in these neurons and its role in controlling energy homeostasis is ill-defined. In my thesis, I could demonstrate that AC3 and the GPCRs NPY2R and SSTR3 are localized in primary cilia of hypothalamic neurons. In BBS model, i.e. *Bbs8* knockout mice, the ciliary localization of AC3 was reduced and NPY2R was absent from primary cilia of AgRP/POMC neurons. Thus, loss of BBSome proteins seemed to cause BBSome dysfunction and, thereby, alter the ciliary protein repertoire, which might disrupt ciliary cAMP signaling. In turn, *Bbs8* knockout mice were hyperphagic and become heavily overweight. To elucidate whether loss of AC3 is sufficient to cause obesity and whether ciliary cAMP signaling is equally important in AgRP and POMC neurons in controlling energy homeostasis, I generated conditional *Adcy3* knockout mice in AgRP and POMC neurons. I could demonstrate that loss of AC3 in AgRP neurons results in obesity, whereas loss of AC3 in POMC neurons had no effect on body weight.

To shed light on the molecular pathway how ciliary cAMP levels control food intake, I established imaging of ciliary cAMP dynamics in primary hypothalamic neurons and used the photo-activated adenylyl cyclase bPAC to control neuronal cAMP signaling and downstream signaling by light. This will now be combined with measurements in BBS mouse models to understand the molecular mechanisms underlying disease pathology.

Zusammenfassung

Primäre Zilien sind Membranausstülpungen, die auf der Oberfläche von fast jeder Zelle zu finden sind. Primäre Zilien fungieren als Zelluläre Antenne, wobei sie einen Stimulus aus der Umgebung wahrnehmen und diese Information lokal in eine zelluläre Antwort verarbeiten.

Eine Dysfunktion des primären Ziliums führt zu einer Anzahl schwerer Krankheiten, den Ziliopathien. Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) gehört zu dieser Krankheitsgruppe. Eines der stärksten Symptome des BBS ist Adipositas, dies verbindet das primäre Zilium mit der Regulation der Energiehomöostase.

Die Genmutationen die zu dieser Krankheit führen kodieren für Proteinkomponenten im BBSome und BBS Chaperonin Komplex, diese sind verantwortlich für die ziliäre Proteinlokalisierung von z.B. GPCRs, die eine Rolle im cAMP Signalweg spielen.

Einige GPCRs sowie nachgeschaltete Proteine wie AC3, sind in Zilien von Neuronen, wie den AgRP/NPY und POMC/CART Neuronen angereichert und regulieren die Essensaufnahme. Jedoch ist die Rolle des cAMP Signalwegs in diesen Neuronen und die Rolle in der Energiehomöostase unklar.

In meiner These konnte ich zeigen, dass AC3, sowie die GPCRs NPY2R und SSTR3 in primären Zilium hypothalamischer Neurone vorhanden sind. In einem *Bbs8* knockout Maus Modell war die Lokalisierung von AC3 reduziert und NPY2R nicht im Zilium von AgRP/POMC Neuronen vorhanden. Dies weist darauf hin, dass der Verlust von BBSome Proteinen eine Dysfunktion des BBSome verursachen und dadurch die ziliäre Proteinzusammensetzung verändert wird, wodurch es zu einer Störung des ziliären cAMP Signalweges kommen kann.

Zusätzlich waren die *Bbs8* knockout Mäuse hyperphagisch und stark übergewichtig. Um aufzuklären ob ein Verlust von AC3 ausreicht um Adipositas hervorzurufen und ob der ziliäre cAMP Signalweg sowohl in AgRP als auch in POMC Neuronen gleichbedeutend ist, wurden konditionale *Adcy3* knockout Mäuse in AgRP und POMC Neuronen generiert. Ich konnte zeigen, dass der Verlust von AC3 in AgRP Neuronen zu Adipositas führt, wohingegen der Verlust von AC3 in POMC Neuronen keinen Unterschied im Körpergewicht hervorrief.

Um den molekularen Signalweg aufzuklären, wie das ziliäre cAMP Niveau die Nahrungsaufnahme reguliert, etablierte ich die Bildgebung von ziliären cAMP Dynamiken in primären hypothalamischen Neuronen und nutzte die Lichtaktivierte adenylylcyase bPAC um neuronales cAMP, sowie den nachgeschalteten cAMP Signalweg, mit Licht zu kontrollieren. Beide Verfahren werden nun kombiniert um Messungen in BBS Maus Modellen durchzuführen um die molekularen Mechanismen zu verstehen die der Krankheit unterliegen.