

Nicolas Stützenberger

Dr. med.

## **The adenosine diphosphate-dependent glucokinase is a regulator of metabolism through effects on glycosylation in an immune cell model**

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Kölker

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Funktion der menschlichen Adenosindiphosphat-abhängigen Glukokinase mit CRISPR-Cas9-induzierten Adenosindiphosphat-abhängigen Glukokinase-defizienten Zelllinien als Immunzellmodell zu untersuchen.

Die Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase wandelt Glucose zu Glucose-6-Phosphat um und verwendet dabei Adenosindiphosphat als Phosphatgruppenspende. Thermophile *Archaeen* transferierten das Gen der ADP-abhängigen Glukokinase lateral auf *Eukaryonten*. Die Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase ist evolutionär folglich nicht mit den Hexokinasen 1-4 verwandt. Im Gegensatz zu diesen Hexokinasen ist sie Teil des endoplasmatischen Retikulums. Kürzlich wurde gezeigt, dass sie am Warburg-Effekt beteiligt ist. Dieser beschreibt die aerobe Glykolyse ohne Weiterverarbeitung der energiereichen Substrate mittels oxidativer Phosphorylierung trotz ausreichender Versorgung mit Sauerstoff. In stark proliferierenden Zellen, wie Tumorzellen, embryonalen Zellen und Immunzellen, spielt die aerobe Glykolyse eine wichtige Rolle, um schnell Energie und wichtige Substrate für die Biosynthese von Tochterzellen bereitzustellen. In dieser Arbeit wurde die Hypothese getestet, ob die Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase den Glucosestoffwechsel durch ihre Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum über Einflüsse auf die Glykosylierung von Proteinen regulieren kann.

Vier verschiedene CRISPR-Cas9-induzierte Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase-defiziente Jurkat-Zelllinien wurden charakterisiert. Die Sequenzierung bestätigte homozygote oder compound-heterozygote Mutationen im Gen der Adenosindiphosphat-abhängigen Glukokinase, das Protein wurde reduziert bis gar nicht exprimiert und es war keine residuale Enzymaktivität messbar. Adenosindiphosphat-abhängige-Glukokinase-defiziente Zellen wiesen einen reduzierten Warburg-Metabolismus auf. Die aerobe Glykolyse war mit einer verminderten Aktivität der Hexokinase und Phosphofruktokinase und einem fehlenden Aktivierungs-induzierten Anstieg partiell beeinträchtigt. Es konnte eine Verminderung der Intermediate des Thymidinstoffwechsels beobachtet werden, die wahrscheinlich zur Synthese von Substraten der Glykolyse verwendet wurden. Die Adenosindiphosphat-abhängige-Glukokinase-defiziente Zelle zeigte eine reduzierte Aktivität des Pentosephosphatwegs mit einem verminderten Gehalt an reduziertem Nicotinamidadenindinukleotidphosphat. Außerdem zeigten sie eine beeinträchtigte Lipidsynthese mit reduzierten Cholesterinspiegeln und einer Anhäufung von Malonyl-Coenzym A.

Der Hexosaminstoffwechsel war als Stoffwechselweg, der den Glucose-, Fettsäure-, Protein- und Nukleotid-Stoffwechsel vereint in Adenosindiphosphat-abhängige-Glukokinase-defizienten Zellen vermindert, was in einer reduzierten Konzentration von Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin aufgrund einer verminderten Aufnahme von Glucose resultierte. Dies führte zu einer verminderten O-N-Acetylglucosaminylierung sowie einer verminderten N-

Glykosylierung mit beeinträchtigter Verzweigung der N-Glykane in Adenosindiphosphat-abhängige-Glukokinase-defizienten Zellen. Die Mitochondrien der Adenosindiphosphat-abhängige-Glukokinase-defizienten Zellen waren in ihrer Funktion als weitere Störung des Stoffwechsels beeinträchtigt, was in verstärkter mitochondrialer Fission und verminderter oxidativer Phosphorylierung resultierte. Die Aktivität der Komplexe III und IV der Atmungskette sowie der Elektronentransport vom Komplex I der Atmungskette auf Komplex III und von Komplex II auf Komplex III waren reduziert. Der gestörte Stoffwechsel von Adenosindiphosphat-abhängigen Glukokinase-defizienten Zellen resultierte in einer verringerten Phosphorylierung des Mammalian Target of Rapamycin und einem ausgleichenden Anstieg der Makroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie. In deren Rahmen bildeten sich vermehrt Vesikel in der Elektronenmikroskopie, das Protein Microtubule-associated Protein Light Chain 3B-II erhöhte sich in Immunoblots und es bildeten sich vermehrt saure Kompartimente in mit Acridin-Orange-gefärbten Zellen in der Durchflusszytometrie.

Die Homöostase des endoplasmatischen Retikulums war in Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase-defizienten Zellen eingeschränkt. Dies zeigte sich in einem erweiterten endoplasmatischen Retikulum in der Elektronenmikroskopie und einer dauerhaften Aktivierung der ungefalteten Protein-Antwort in unstimulierten Zellen mit verstärkter Expression des Binding Immunoglobulin Proteins und verstärktem Splicing des X-Box-bindenden Proteins 1. Die pro-apoptotische ungefaltete Protein-Antwort war in Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase-defizienten Zellen vermindert, welche eine verringerte Expression des CCAAT/Enhancer Binding Protein Homologous Proteins zeigten. In der Elektronenmikroskopie und der Durchflusszytometrie zeigten Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase-defiziente Zellen eine eingeschränkte Zellvitalität. Diese zeigte sich in erhöhten Anteilen an apoptotischen und nekrotischen Zellen ohne Stimulation und einem verstärkten Aktivierungs-induzierten Zelltod nach Stimulation mit Phorbolmyristatsäure und Ionomycin, die zur T-Zell-Rezeptoraktivierung eingesetzt wurden. Eine Inhibition mit Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-methyl]-Fluoromethylketon demonstrierte, dass der vorliegende Zelltod abhängig von Caspasen war. Überraschenderweise wurden Caspase-3 in Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase-defizienten Zellen wegen einer gesteigerten Expression des Zellulären Inhibitors der Apoptose Proteins 2 und die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase weniger gespalten. Stattdessen verstärkten metabolische Anpassungsstörungen im Sinne einer metabolischen Katastrophe und eine vermehrte Autophagierate den Aktivierungs-induzierten Zelltod in Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase-defizienten Zellen, was zu einer starken Einschränkung der Zellviabilität führte.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die These formuliert, dass die Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase ein lösliches Protein im Lumen des endoplasmatischen Retikulums ist und neben dem Glukose-6-Phosphat-Transporter und den Isoformen der Glukose-6-Phosphatase Teil des im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Glukosestoffwechsels ist. Als Bestandteil von diesem hilft sie den Glukosestoffwechsel zu regulieren, indem sie den Hexosaminstoffwechsel und die Glykosylierung beeinflusst. Eine gestörte Funktion der Adenosindiphosphat-abhängigen Glukokinase führt zu einer gestörten metabolischen Anpassungsfähigkeit, mitochondrialer Dysfunktion, chronischem Stress des endoplasmatischen Retikulums, einer größeren Rate an Autophagie und eingeschränkter Zellviabilität aufgrund von Aktivierungs-induziertem Zelltod, der durch eine metabolische Katastrophe verstärkt wird.