

Jana Birkenhagen

Dr. med.

Bedeutung der Adenosindiphosphat-abhängigen Glukokinase für die Adaptation des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien von Jurkat-Zellen

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

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

Die Adenosindiphosphat-abhängige Glukokinase ist eine Hexokinase mit bisher nicht vollständig gekläarter Funktion. Auf ihre Relevanz für die T-Zell-Aktivierung und die damit einhergehende metabolische Umstellung deuten Studien in Jurkat-Zellen hin. Zudem sind unter Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase in Burkitt-Lymphom-Zellen eine verminderte Expression des *MYC*-Protoonkogens, das auch an der Regulation der metabolischen Umstellung nach T-Zell-Aktivierung beteiligt ist, und in Zebrafischlarven eine verstärkte Genexpression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 1A beschrieben. Vorausgehende Untersuchungen von Jurkat-Zelllinien, in denen ein Knockout der ADP-abhängigen Glukokinase mittels CRISPR-Cas9 induziert wurde, weisen strukturelle Hinweise auf ER-Stress sowie ein verändertes metabolisches Profil und vermehrte Apoptose dieser Knockout-Zellen nach. Es werden eine regulatorische Funktion der ADP-abhängigen Glukokinase für den Glukosemetabolismus und die Homöostase des Endoplasmatischen Retikulums sowie eine Einschränkung der Zellviabilität als Folge einer metabolischen Katastrophe unter Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase postuliert. Hieran anknüpfend erfolgte in der vorliegenden Arbeit die experimentelle Untersuchung der Knockout-Zellen im Vergleich zu Zellen einer Transfektionskontrolle vorrangig hinsichtlich ausgewählter Marker der ER-Stress-Antwort und der Expression des *MYC*-Protoonkogens sowie des für den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor 1 A codierenden Gens *CDKN1A*.

Ziel war es zu prüfen, ob in den Jurkat-Zellen mit Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase erstens eine übermäßige ER-Stress-Antwort als mögliche Ursache der erhöhten Apoptoserate vorliegt und zweitens ebenfalls eine verringerte *MYC*-Expression oder erhöhte *CDKN1A*-Expression nachweisbar ist und die eingeschränkte Zellviabilität bedingen könnte. Weiterführend wurde untersucht, ob die Ausprägung nachgewiesener Veränderungen der ER-Stress-Antwort sowie der *MYC*-Expression in den Knockout-Zellen durch veränderte Kulturbedingungen (wie Stimulation mit Tunicamycin und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat oder Nährstoffmangel) zu beeinflussen ist und ob Veränderungen des Gehalts der phosphorylierten AKT Serin/Threonin Kinase 1, der durch die mTOR Kinase oder den NOTCH1-Rezeptor

vermittelten Signale oder der mitochondrialen Struktur vorliegen und mögliche Auslöser einer unter Nährstoffmangel verminderten *MYC*-Expression in den Knockout-Zellen sind.

Die experimentelle Untersuchung ausgewählter ER-Stress-Marker zeigte insgesamt eine sowohl in Kontroll- als auch Knockout-Zellen induzierbare ER-Stress-Antwort. Unter Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase manifestierten sich Veränderungen bereits basal, also in nicht stimulierten Zellen vor Aktivierung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat: Es erfolgte der Nachweis basal vermehrt vorliegender gespleißter mRNA des X-Box-bindenden Proteins 1 und eines erhöhten Gehalts der Protein-Disulfid-Isomerase A1, dem sich der Gehalt in Zellen der Transfektionskontrolle nach Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat oder Tunicamycin annäherte. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat induzierte zudem einen Anstieg des phosphorylierten Inositol-benötigenden Enzyms 1α und des Immunglobulin-bindenden Proteins BiP, der in Knockout-Zellen jedoch geringer war. Stattdessen stieg in diesen die *CDKN1A*-Expression stärker und beschrieb ein Maximum, das dem maximalen Gehalt des Immunglobulin-bindenden Proteins BiP vorausging. Eine geringere *MYC*-Expression in den Knockout-Zellen prägte sich basal und abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit aus und ließ sich durch Glukose- oder L-Glutaminmangel gezielt provozieren. Zudem bestand ebenfalls eine Nährstoffabhängigkeit der Erhöhung des basalen Gehalts der Protein-Disulfid-Isomerase A1 in Knockout-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, wobei sich dieser Unterschied durch Glukosemangel verstärkt ausprägte, unter L-Glutaminmangel hingegen aufgehoben war.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte unter Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase keine übermäßige ER-Stress-Antwort als Auslöser vermehrter Apoptose nachgewiesen werden. Stattdessen deuteten basale Erhöhungen der Protein-Disulfid-Isomerase A1 und der gespleißten mRNA des X-Box-bindenden Proteins 1 auf eine basal verstärkte kompensatorische ER-Stress-Antwort hin. Eine basale Redox-Imbalance wurde als Auslöser diskutiert. Zudem erschien in Knockout-Zellen eine adaptive ER-Stress-Antwort nach Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat eingeschränkt. Eine resultierende inadäquate Anpassung der Zellfunktion stellt eine mögliche Ursache der vermehrten Apoptose in den ADPGK-defizienten Jurkat-Zellen dar.

Die basale Erhöhung der Protein-Disulfid-Isomerase A1 wurde als primärer Effekt der Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase diskutiert. Dabei wurde die Hypothese einer nicht-enzymatischen Funktion der ADP-abhängigen Glukokinase in Form einer inhibitorischen, metabolisch kontrollierten Interaktion mit der Protein-Disulfid-Isomerase A1 aufgestellt. Die Nährstoffabhängigkeit der bereits basal bestehenden Veränderungen des Gehalts der Protein-Disulfid-Isomerase A1 und der *MYC*-Expression lässt auf eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Nährstoffmangel unter Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase schließen. Als mögliche Ursache wurde eine basale Fehlregulation mit initial unreguliert überschießendem Metabolismus und folgender metabolischer Erschöpfung diskutiert. Die bereits postulierte

Hypothese einer metabolischen Katastrophe als Ursache verstärkter Apoptose der Knockout-Zellen wird damit unterstützt. Die in Knockout-Zellen nach Aktivierung erhöhte *CDKN1A*-Expression wurde als verstärkter Kontrollpunkt des Zellzyklus vor einer adaptiven ER-Stress-Antwort eingeordnet. Die unter Defizienz der ADP-abhängigen Glukokinase nährstoffabhängig reduzierte *MYC*-Expression wurde ebenfalls als kompensatorische Reaktion gegen eine metabolische Erschöpfung eingeordnet, wobei der vermittelnde Mechanismus ungeklärt bleibt. Eine Veränderung der mitochondrialen Struktur in Knockout-Zellen, eine Erhöhung der phosphorylierten AKT Serin/Threonin Kinase 1 oder eine Verminderung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen NFAT wurden als potenzielle Mediatoren identifiziert.