

Abstract

The protein homeostasis comprises all coordinated processes that help to maintain a functional proteome by regulating synthesis, folding, modification, transport, and degradation of proteins. During aging, the protein homeostasis declines, leading to increased risk for proteotoxic diseases. Previously, we showed that elevated hexosamine pathway (HP) flux by gain-of-function mutations in glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (GFAT-1) counters toxic protein aggregation, extending life span in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Recently, we identified mutations in the enzyme amidohydrolase domain-containing protein 2 (AMDHD2) that could also increase the flux in the HP. Given the salutary effects of HP activation, we consider GFAT and AMDHD2 as promising targets for the treatment of proteotoxic diseases. In this thesis, the structure-function relationships of human GFAT-1, GFAT-2, and AMDHD2 were studied.

For human GFAT-1, a crystallization condition was identified and activity assays enabling the determination of kinetic parameters were established. I solved the first full-length structure of human GFAT-1 using X-ray crystallography and analyzed the organization of the glutaminase and isomerase domains, as well as the structures with substrates, products, and inhibitors. Structural analysis has provided valuable insights into a specific interaction relevant for the interdomain communication between both active sites. The activity of eukaryotic GFAT-1 is inhibited by the HP's end product uridine 5'-diphospho-N-acetyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc), but the inhibitory mechanism remained unclear so far. Analyses of GFAT-1 inhibition with UDP-GlcNAc, its epimer UDP-GalNAc, and several mutants revealed a crucial role of the interdomain linker in inhibition and allowed to propose a mechanistic model for the UDP-GlcNAc induced inhibition. Moreover, I could decipher the protein kinase A (PKA)-dependent effect of phosphorylation at Ser205 and propose a structural model for a phosphorylation-induced domain movement. Phosphorylation at Ser205 reduced the activity of GFAT-1 and abolished UDP-GlcNAc inhibition. Thereby the UDP-GlcNAc concentration in a cell determines whether the PKA phosphorylation is inhibiting or activating. Furthermore, I characterized structural and functional differences between wild type GFAT-1 and four gain-of-function mutants. While the L442F gain-of-function mutant was a *C. elegans*-specific mutant, the F670Q mutant had an elevated GlcN6P production in the presence of high substrate concentrations.

The G451E mutant lost UDP-GlcNAc feedback regulation and the R203H mutant had two gain-of-function mechanisms: (1) a strongly reduced PKA-dependent phosphorylation at Ser205 and (2) a weaker sensitivity to UDP-GlcNAc inhibition.

Only few studies are available on GFAT-2, whose tissue distribution differs from GFAT-1, and no full kinetic characterization compared to human GFAT-1 was available so far. First, I performed an *in silico* analysis including a structural model built by the modeling server Phyre2 comparing human GFAT-1 with human GFAT-2, revealing differences in the surface charges. Next, I generated an internally His₆-tagged human GFAT-2 and optimized the GFAT-1 purification protocol for GFAT-2. In activity assays, we found that human GFAT-2 possess altered substrate affinities and a different sensitivity to UDP-GlcNAc, indicating an adaption to tissue-specific requirements. Finally, we identified initial crystallization conditions for GFAT-2.

Given that studies about eukaryotic AMDHD2 are rare, we aimed at a first structural and biochemical characterization of human AMDHD2 in this thesis. Protocols for the expression of AMDHD2, an efficient two-step purification, and an activity assay were established. A crystallization condition was identified and I solved the first structure of any eukaryotic AMDHD2. Structural analysis revealed a dimeric assembly and a mononuclear metal center in the active site. Finally, we confirmed that the identified AMDHD2 mutations cause a loss-of-function through alterations of the protein fold or interference with the catalytic activity.

In summary, this thesis provided a detailed mechanistic understanding of key enzymes of the HP and revealed target sites for pharmacological modulation of the HP. Hopefully, this can contribute to the treatment of age-related proteotoxic diseases.

Zusammenfassung

Die Proteinhomöostase umfasst alle fein aufeinander abgestimmten zellulären Prozesse, welche die Biosynthese, Faltung, Modifikation, Transport und Abbau aller Proteine gewährleisten. Mit zunehmendem Alter nimmt die Proteinhomöostase ab, was zu einem erhöhten Risiko für proteotoxische Erkrankungen führt. Zuvor hatten wir gezeigt, dass erhöhte Aktivität des Hexosamin-Biosyntheseweges (HP) durch funktionsverstärkende Mutationen im Enzym Glutamin Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase-1 (GFAT-1) der toxischen Proteinaggregation entgegenwirkt und die Lebensspanne des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* verlängert. Kürzlich haben wir Mutationen im Enzym Amidohydrolase Domäne-haltiges Protein 2 (AMDHD2) identifiziert, die ebenfalls die Aktivität des HP erhöhen. Angesichts der positiven Auswirkungen der HP-Aktivierung betrachten wir GFAT und AMDHD2 als vielversprechende therapeutische Ansatzpunkte für die Behandlung proteotoxischer Erkrankungen. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die Struktur-Funktions-Beziehungen von humanem GFAT-1, GFAT-2 und AMDHD2 untersucht.

Für humanes GFAT-1 wurde eine Kristallisationsbedingung identifiziert und Aktivitätstests für die Bestimmung kinetischer Parameter etabliert. Ich löste die erste volllängige Struktur von humanem GFAT-1 durch Röntgenkristallographie und analysierte die Organisation der Glutaminase- und Isomerase-Domänen, sowie die Strukturen mit Substrat-, Produkt- und Inhibitormolekülen. Die Strukturanalyse hat wertvolle Einblicke in eine spezifische Interaktion geliefert, die für die Kommunikation zwischen den aktiven Zentren beider Domänen relevant ist. Die Aktivität von eukaryotischem GFAT wird durch das HP Endprodukt Uridin 5'-Diphospho N-Acetyl-D-Glucosamin (UDP-GlcNAc) gehemmt, aber der Mechanismus war bisher nicht geklärt. Analysen der inhibierenden Wirkung von UDP-GlcNAc und seinem Epimer UDP-GalNAc gegenüber GFAT-1, sowie mehreren GFAT-1 Mutanten zeigten eine entscheidende Rolle der Aminosäurekette zwischen den beiden Domänen (interdomain linker) in der enzymatischen Hemmung. Auf der Basis dieser Experimente konnte ich ein mechanistisches Modell für die UDP-GlcNAc-induzierte Inhibierung aufzustellen. Des Weiteren konnte ich den Proteinkinase A (PKA)-abhängigen Effekt der Phosphorylierung an Ser205 entschlüsseln und ein Modell für eine phosphorylierungs-induzierte Domänenbewegung vorschlagen. Die Phosphorylierung an Ser205 reduzierte die Aktivität von GFAT-1 und hob die

Inhibierung von UDP-GlcNAc auf. Daher bestimmt die UDP-GlcNAc-Konzentration in einer Zelle, ob die PKA-Phosphorylierung inhibierend oder aktivierend wirkt. Darüber hinaus charakterisierte ich strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen Wildtyp-GFAT-1 und vier funktionsverstärkende Mutanten. Während die L442F Mutante scheinbar nur in *C. elegans* wirksam war, wies die F670Q Mutante eine erhöhte GlcN6P-Produktion in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen auf. Die G451E Mutante verlor die UDP-GlcNAc-Inhibierung und die R203H Mutante hatte zwei separate funktionsverstärkende Mechanismen: (1) eine stark reduzierte PKA-abhängige Phosphorylierung an Ser205 und (2) eine abgeschwächte Inhibierung durch UDP-GlcNAc.

Zu GFAT-2, dessen Vorkommen sich im Gewebe von GFAT-1 unterscheidet, lag bisher keine vollständige kinetische Charakterisierung im Vergleich zu GFAT-1 vor. Zunächst führte ich eine *in silico*-Analyse durch, einschließlich eines Strukturmodells, das mit dem Modellierungsserver Phyre2 erstellt wurde. Ein Vergleich zwischen humanem GFAT-1 mit humanem GFAT-2 zeigte Unterschiede in den Oberflächenladungen. Als nächstes generierte ich humanes GFAT-2 mit interner hexa-Histidin Markierung und optimierte das GFAT-1 Aufreinigungsprotokoll für GFAT-2. Aktivitätstests zeigten, dass humanes GFAT-2 veränderte Substrataffinitäten und eine andere Empfindlichkeit gegenüber UDP-GlcNAc besitzt, was auf eine Anpassung an gewebespezifische Anforderungen hinweist. Außerdem identifizierten wir erste, zu optimierende Kristallisationsbedingungen.

Ziel dieser Arbeit war eine erste strukturelle und biochemische Charakterisierung von humanem AMDHD2. Es wurden Protokolle für die Expression von AMDHD2, eine effiziente zweistufige Aufreinigung und ein Aktivitätstest etabliert. Eine Kristallisationsbedingung wurde identifiziert und ich konnte die erste Struktur eines eukaryotischen AMDHD2 lösen. Die Strukturanalyse ergab eine dimere Anordnung und ein mononukleäres Metallzentrum im aktiven Zentrum. Abschließend bestätigten wir, dass die identifizierten AMDHD2 Mutationen einen Funktionsverlust durch Veränderungen der Proteinfaltung oder Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität verursachen.

Zusammengefasst hat diese Arbeit zu einem detaillierten mechanistischen Verständnis von Knotenpunkten im HP geführt und Schlüsselstellen für eine pharmakologische Manipulation des HP aufgezeigt. Dies kann hoffentlich zur Behandlung von altersbedingten proteotoxischen Erkrankungen beitragen.