

INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. MED. MARKUS TIEDGE

CHARAKTERISIERUNG DER GKRP MUTATIONEN
P446L, H438Y, M344I UND M344I-P446L IM
HEPATISCHEN GLUCOSE- UND LIPIDMETABOLISMUS

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

DAVID JAGDHUHN | GEB. AM 08.12.1989 IN BRANDENBURG AN DER HAVEL

AUS POTSDAM

ROSTOCK | 20.02.2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004702

ERSTGUTACHTER: FRAU PROF. DR. RER. NAT. S. E. BALTRUSCH

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE –
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: HERR PROF. DR. MED. I. RUSTENBECK

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE, TOXIKOLOGIE UND KLINISCHE PHARMAZIE –
TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. HOLGER S. WILLENBERG

EINRICHTUNG: SEKTION ENDOKRINOLOGIE UND STOFFWECHSELKRANKHEITEN -
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

JAHR DER EINREICHUNG: 2023

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2024

Teile, der in dieser Dissertation erhobenen Daten, wurden bereits publiziert:

Rees, M. G., Raimondo, A., Wang, J., Ban, M. R., Davis, M. I., Barrett, A., Ranft, J., Jagdhuhn, D., Waterstradt, R., Baltrusch, S., Simeonov, A., Collins, F. S., Hegele, R. A., & Gloyn, A. L. (2014). **Inheritance of rare functional GCKR variants and their contribution to triglyceride levels in families.** *Human molecular genetics*, 23(20), 5570–5578. DOI:10.1093/hmg/ddu269

Jagdhuhn, D., Ranft, J., Waterstradt, R., Rees, M. G., Gloyn, A.L., & Baltrusch, S. (2014). **Einfluss von Mutationen im Glucokinase Regulatorprotein auf den Glukosestoffwechsel der Leber.** *Diabetologie und Stoffwechsel*; 9 - P245. DOI: 10.1055/s-0034-1375102

Jagdhuhn, D. (2016). **Kasuistik: Variante im hepatischen Glukokinase-Regulatorprotein – Glukose und Lipide.** DDG Kongress 2016, Berlin. <http://react-profile.org/ebook/DDG2016/Final%20Programm/files/assets/common/downloads/DDG%2016%20Hauptprogramm.pdf>

Langer, S., Jagdhuhn, D., Gromoll, J., Waterstradt, R., & Baltrusch, S. (2022). **Einfluss von Mutationen des Glucokinase Regulatorproteins auf den Fettstoffwechsel der Leber.** *Diabetologie und Stoffwechsel*; 17(S 01): S51. DOI: 10.1055/s-0042-1746349

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
1. Einleitung.....	1
1.1. Glucosehomöostase.....	1
1.2. Glucosehomöostase der Leber	1
1.3. Glucokinase.....	2
1.3.1. Glucokinasegenstruktur.....	3
1.3.2. Glucokinaseprotein und -molekülstruktur	3
1.3.3. Regulation der Glucokinase Enzymaktivität.....	5
1.4. Glucokinase-Regulatorprotein	6
1.4.1. Die Genstruktur des Glucokinase-Regulatorproteins.....	8
1.4.2. Glucokinase-Regulatorprotein und -molekülstruktur	8
1.4.3. Molekülstruktur von GKRP und GK im Komplex.....	10
1.4.4. Regulation der GK/GKRP-Bindung und des Kern-In- und Exportes.....	11
1.4.5. Einfluss von exogenen Regulatoren auf die GKRP Aktivität	13
1.4.6. Mutationen des humanen GKRP	15
1.4.7. Übersicht GKRP Interaktionsbereiche	17
1.5 Fragestellung.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Material	21
2.1.1. Zellkulturen.....	21
2.1.2. Kulturmedium	21
2.1.3. Transfektionsreagenzien.....	22
2.1.4. Antikörper	22
2.1.5. Testkits.....	22
2.1.6. Molekulargewichtsmarker	22
2.1.7. Vektoren	22
2.1.8. Puffer	22
2.1.9. Software und Datenbank.....	23

2.1.10. Geräte und Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.11. Chemikalien.....	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Zelllinien	26
2.2.2. Transfektion	28
2.2.3. Vektoren	29
2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie	29
2.2.5. Proteinanalyse	31
2.2.6. Stoffwechselanalyse	34
2.2.7. Auswertung, Statistik, Visualisierung	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Zellmodelle	39
3.2. Lokalisation des GGRP Fluoreszenzproteins in HeLa Zellen	40
3.3. Lokalisation des GGRP-Fluoreszenzproteins in Hepa 1-6 Zellen.....	41
3.4. Lokalisation des GGRP und des GK Fluoreszenzproteins in Hepa 1-6 Zellen	42
3.4.1. Lokalisation des GK Fluoreszenzproteins in Anwesenheit der Variante H438Y in Hepa 1-6 Zellen	44
3.5. Lokalisation des GK Fluoreszenzproteins in primären Hepatozyten.....	45
3.6. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Effizienz (FRETN).....	48
3.7. Proteinexpressionsanalyse der GGRP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp.....	50
3.8. Stoffwechsel-Analyse in GGRP-Varianten im Vergleich zum WT	50
3.8.1. Glucose-Verbrauch im Vergleich zum Wildtyp.....	51
3.8.2. Triglycerid-Synthese im Vergleich zum Wildtyp.....	52
3.9. PyMOL-Darstellung der GGRP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp.....	53
3.9.1. Mutationslokalisierung im GGRP.....	53
3.9.2. Kollisionssimulation der GGRP Varianten	54
3.9.3. Mutationen im GGRP-GK-Komplex	60
3.10. Analyse der GGRP Proteinstruktur und –funktion via I-TASSER-Simulation.....	61
3.10.1. Die Stabilität des GGRP	61
3.10.2. Vorhersage der katalytischen Aktivität des GGRP	62
3.10.3. Strukturvorhersage für EYFP-GGRP	62
4. Diskussion.....	63
4.1. Kern/Plasma-Ratio von GGRP M344I, H438Y, P446L und der GK.....	65

4.2. Proteinexpression von GKRP P446L und H438Y im Vergleich zum Wildtyp	70
4.3. Kurzfristige Änderung des Zellstoffwechsels durch GKRP P446L und H438Y	70
4.4. Ausblick	72
5. Zusammenfassung.....	73
6. Thesen	74
7. Literaturverzeichnis	76
8. Abbildungsverzeichnis.....	89
9. Eidesstattliche Versicherung	94
10. Lebenslauf.....	95
11. Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen
°	Grad
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol/l	Mikromol je Liter
Å	Ångström
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS/HIV	acquired immune deficiency syndrome/Human immunodeficiency virus
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
BFP	B-factor der thermischen Stabilität
BSA	Bovines Serumalbumin
bsw.	beispielsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBBG	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
cDNA	Komplementäre DNA
CFP	cyan fluorescent protein
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COS-7-Zellen	Zelllinie aus immortalisierten CV-1-Zellen einer afrikanischen grünen Meerkatze
CpdA	Compound A
db/db Mäusen	Diabetes Mäuse (homozygot)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission Number
ECFP	Enhanced Cyan Fluorescent Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
F1P	Fructose-1-phosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
FCS	fetal calf serum
FRETn	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Effizienz
g	Gramm
G6P	Glucose-6-phosphat
GCK	Glucokinase Gen

Abkürzungsverzeichnis

<i>GCKR</i>	Glucokinase-Regulatorprotein-Gen
GFP	green fluorescent protein
GK	Glucokinase
GKAs	Glucokinase-Aktivatoren
GKRP	Glucokinase-Regulatorprotein
Glc	Glucose
GLUT2	Glucosetransporter 2
GPI	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
h	Stunde
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
Hepa 1-6	Subklon des BW7756 Hepatom der C57BL/6 Maus
hGKRP	humanes GKRP
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
I.U.	Internationale Einheiten
K/P-Ratio	Nucleus/Zytoplasma-Ratio
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
k_{off}	Dissoziationsratenkonstante
k_{on}	Assoziationsratenkonstante
mA	Milliampere
Malonyl-CoA	Malonyl-Coenzym A
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol/l	Millimol pro Liter
mRNA	messenger-RNA
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localisation signal
nm	Nonometer
nmol	Nanomol
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pECFP-N1	Enhanced Cyan Fluorescent Protein codierendes Plasmid
PEI	Polyethylenimin
pEYFP-C1	Enhanced Yellow Fluorescent Protein codierendes Plasmid
PFK2/FBPase2	6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen

Abkürzungsverzeichnis

PKB	Proteinkinasen B
pmol	Pikomol
Pos.	Position
PVDF	Polyvinylidendifluorid
p-Wert	Signifikanzwert
rGKRP	Ratten-GKRP
RIPA-Lysepuffer	Radioimmunoprecipitation assay Lysepuffer
RMSD	root-mean-square deviation of atomic positions
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
rpm	Umdrehungen je Minute
s	Sekunde
s. u.	siehe unten
s.o.	siehe oben
S1P	Sorbitol-1-phosphat
S6P	Sorbitol-6-phosphat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sirt2	Sirtuin 2
SIS	Sugar isomerase
SNP	single nucleotide polymorphism
β	beta
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp
xGKRP	Xenopus laevis GKRP
YFP	yellow fluorescent protein
ZDF-Ratten	Zucker diabetic fatty Ratten
α	alpha
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase

Einleitung

1.1. Glucosehomöostase

Glucose ist einer der essenziellen Metaboliten des menschlichen Körpers und notwendiger Energieträger zum Erhalt des Zellstoffwechsels in verschiedenen Geweben wie z.B. Herz und Gehirn. Sowohl durch aerobe als auch anaerobe Glykolyse wird ATP freigesetzt, um so verschiedene anabole Funktionen im Organismus zu ermöglichen (Irwan & Tan, 2014; Wasserman, 2009). Dabei wird die Glucosekonzentration im Körper in physiologisch engen Grenzen von 4,0 – 7,0 mmol/l gehalten (Matschinsky 1990), wobei zu beachten ist, dass eine Nüchternglucose zwischen 5,6 – 7,0 mmol/l als abnorm angesehen wird (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft et al. 2013). Um dies zu gewährleisten, zirkulieren in einer 70 kg schweren Person ca. 4 g Glucose im Blut. Unterschiedliche Hormone und neurologische Regulationssysteme sorgen für eine bedarfsgerechte Anpassung des Blutglucosespiegels, so steigert Insulin die Aufnahme von Glucose in unterschiedlichen Geweben während Glukagon die Gluconeogenese in der Leber stimuliert und dadurch vermehrt Glucose in das Blut freisetzt (Bansal und Wang 2008; Thorens 2011; Wasserman 2009). Kommt es zu einem Abfall deutlich unterhalb der physiologischen Glucosekonzentration folgen metabolische Dysfunktion und ein Mangel an Energieträgern in Neuronen, dies führt unter anderem zu schweren neurologischen Störungen wie einer Minderung der Vigilanz und Krampfanfällen, bis hin zum Tod des Patienten. Eine wesentliche Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut führt zur Glucose-Toxizität und leistet so einen Beitrag bei verschiedenen Erkrankungen welche für das metabolische Syndrom typisch sind (Wasserman 2009).

1.2. Glucosehomöostase der Leber

Die Leber verfügt über eine spezifische Enzym- und Transporter-Ausstattung, welche für die Regulation unterschiedlicher Stoffwechselprozesse von entscheidender Bedeutung ist. So verfügen Hepatozyten über GLUT2 Glucosetransporter, welche durch ihre Insulinunabhängigkeit sowie niedrige Affinität für Glucose (ca. 17 mM) bei einer gleichzeitig hohen Transportleistung für eine rasche Gleichgewichtseinstellung der Glucosekonzentration zwischen Interstitium und Zytoplasma sorgen. Zusammen mit den im Folgenden beschriebenen

kinetischen Eigenschaften der Glucokinase (GK) wird so eine rasche Phosphorylierung der Glucose ermöglicht und somit die weiteren Stoffwechselwege selbstständig reguliert. Beispielsweise wird durch eine Überexpression der GK eine deutliche Steigerung der Glykogensynthese via Glucose-6-phosphat bewirkt (Iynedjian 2009; Seoane, Joan et al. 1996). Weiter konnte eine Steigerung der Glykolyse und der Glucoseoxidation gezeigt werden (Iynedjian 2009; Takeuchi et al. 1996). Die Bedeutung der GK für die Glucosehomöostase des Organismus konnte an zahlreichen Mausmodellen dargestellt werden. In Mäusen mit einem leberspezifischen Knockout des *GCK* und folglich der GK wurde eine geringere Hyperglykämieresistenz bei verringerter Glycogensynthese sowie vermindertem Glucoseumsatz festgestellt. Weiter konnte durch den moderat erhöhten Glucosespiegel eine leichte Hyperinsulinämie abgebildet werden (Iynedjian 2009; Postic et al. 1999).

1.3. Glucokinase

Nach dem initialen Import von Glucose in die eukaryote Zelle ist der erste Schritt der Metabolisierung die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf die 6-Hydroxylgruppe des Glucosemoleküls. Dadurch wird verhindert, dass die Glucose die Zelle wieder verlässt und zudem ein Konzentrationsgefälle zwischen Interstitium und Zelle aufrechterhalten.

Dieser Vorgang wird durch eine Gruppe verwandter Enzyme gesteuert, den Hexokinasen. Vier unterschiedliche Hexokinasen wurden beschrieben, welche sich sowohl in ihren kinetischen Eigenschaften, im Molekulargewicht, als auch in der gewebsspezifischen Lokalisation unterscheiden. Auf Grund der Ähnlichkeit Ihrer Eigenschaften lassen sich zudem zwei Untergruppen subsumieren: Zum einen die Hexokinase Isoenzyme I-III (bzw. A,B,C), welche bei einem Molekulargewicht von ~100 kDa eine vergleichbar hohe Affinität zum Substrat Glucose haben (K_m -Wert von 0.02- 0.13 mM). Hinzu kommt, dass diese Isoenzyme in einem physiologischen Bereich von ihrem Produkt Glucose-6-phosphat gehemmt werden sowie die Fähigkeit besitzen, auch andere Hexosen zu phosphorylieren (Weinhouse 1976; Ureta 1982; Printz et al. 1993; Middleton 1990).

Dazu im Vergleich weist die zweite Gruppe, bestehend aus der Hexokinase Typ IV (D) oder Glucokinase, eine deutlich geringere Affinität zum Substrat Glucose auf (K_m -Wert von ~7 mM) (Heredia et al. 2006; Matschinsky 1996). Zudem wird das ca. 52 kDa schwere Protein nicht im physiologischen Bereich durch eine Feedback-Regulation via Glucose-6-phosphat inhibiert. Zwar phosphoryliert die Glucokinase trotz ihres Namens auch andere Hexosen, jedoch mit

erheblich geringerer Affinität im Vergleich zu den Isoenzymen I-III (Printz et al. 1993; Ureta 1982; Weinhouse 1976). Weiter ist eine kooperative Reaktionskinetik mit dem Substrat Glucose beschrieben mit einem Hill-Koeffizienten von $\sim 1,7$ bei einem Wendepunkt der sigmoidalen Reaktionskurve von 4-5 mM Glucose (Heredia et al. 2006). Diese kinetischen Eigenschaften erlauben es der Glucokinase sehr sensibel auf Blut-Glucoseschwankungen im physiologischen Bereich zu reagieren, was sowohl für metabolische Prozesse in der Leber, als auch für die bedarfsgerechte Freisetzung von Insulin in den β -Zellen des Pankreas von Bedeutung ist (Heredia et al. 2006; Matschinsky 1996).

Neben Pankreas und Leber wurde die Glucokinase auch in Neuronen des zentralen Nervensystems sowie in endokrinen Zellen des Darms beschrieben (Jetton et al. 1994; Salgado et al. 2014). Die für den Darm angenommene Bedeutung in der Regulation der GLP-I Freisetzung konnte jedoch nicht bestätigt werden (Murphy et al. 2009).

Mit der ADP-abhängigen Glucokinase wurde eine weitere Hexokinase beschrieben, welche vermutlich eine besondere Rolle in hypoxischen Zellen, wie sie in Tumorgewebe vorkommen, spielt (Richter et al. 2012; Ronimus und Morgan 2004).

1.3.1. *Glucokinasegenstruktur*

Das Glucokinasegen besteht aus zehn Exons deren Transkription von zwei gewebsabhängigen Kontrollregionen gesteuert wird, welche ca. 30 kbp entfernt voneinander liegen. So befindet sich der Promotor für Gewebe wie Nervensystem, Pankreas und endokrine Zellen des Darms im upstream-Bereich, während die GK-Expression der Leber über den Promotor im downstream-Bereich erfolgt. Für beide Gewebstypen bildet der Promotor zusammen mit dem ersten Exon die Kontrollregion, welche im Gegensatz zum restlichen Abschnitt der codierenden DNA sich je nach Expressionsort unterscheiden. Dabei ist interessant, dass die Induktion der Transkription des Glucokinasegens in der Leber im hohen Maße von Insulin abhängig ist. Hierbei soll der Proteinkinase B eine besondere Bedeutung in der Regulation zufallen (Iynedjian 1993, 2009; Iynedjian et al. 2000; Jetton et al. 1994; Magnuson 1990).

1.3.2. *Glucokinaseprotein und -molekülstruktur*

Die menschliche Glucokinase der Leber, ebenso wie die des Pankreas umfasst 465 Aminosäuren und ist zu 54 % mit der Hexokinase I identisch (Mahalingham et. al, 1999). Analysen der Kristallstruktur (hierbei wurde die GK zur Stabilisierung am N-Terminus um 11-15 Aminosäuren gekürzt und teils mit Glucose und dem Aktivator Compound A stabilisiert,

wobei die kinetischen Eigenschaften mit der Wildtyp-GK identisch blieben) zeigten, dass die Glucokinase aus zwei unterschiedlich großen Domänen („small“ und „large“ Domäne) besteht, die durch eine tiefe Spalte getrennt sind. Diese stellt das aktive Zentrum für die Bindung und Phosphorylierung von Glucose dar und wird von Aminosäuren der „large“ (Glu256 und Glu290), bzw. der „small“ Domäne (Thr168 und Lys169) als auch der Verbindungsregion II (Asn204 und Asp205) gebildet. Die beiden Domänen sind durch drei flexible „Loops“ verbunden, was die im Folgenden beschriebenen unterschiedlichen Konformationen ermöglicht (Iynedjian 2009; Kamata et al. 2004).

In der „closed“ Form liegen die beiden Domänen dicht beieinander und es besteht eine hohe Affinität zur Bindung von Glucose sowie ATP. Dem gegenüber steht die „super-open“ Konformation in Abwesenheit von Substrat und Aktivator. Während hier die große Domäne weitestgehend identisch bleibt, rotiert die kleine Domäne um 99° und der Spalt zwischen den beiden Domänen gewinnt an Größe. Weiter verliert der C-Terminus (α -13 Helix) der GK die direkte räumliche Beziehung zur kleinen Domäne und liegt in der „super-open“-Form zwischen den Domänen. Des Weiteren wurden unterschiedliche Zwischenzustände beschrieben, welche den Wechsel zwischen der „super-open“ und der „closed“ Konformation energetisch günstiger gestalten (Huang et al. 2013; Kamata et al. 2004; Liu et al. 2012).

Für die Regulation der GK ist das Glucokinase-Regulatorprotein (GKRP) von herausragender Bedeutung. Dabei beschrieben Baltrusch et al. 2005 Abschnitte der Glucokinase mit einem Asparagin-Leucin Motiv als für die Bindung zwischen GK und GKRP entscheidend. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Mutationen L58R/N204Y sowie L309R/N313Y zu einer signifikanten Senkung in der Interaktion mit dem Glucokinase-Regulatorprotein führen. Weiter konnte in fluoreszenzoptischen Analysen für L58R/N204Y ein Verlust der Glucose-abhängigen Translokation durch GKRP ermittelt werden. Die Mutation L355R/N350Y steigerte die Interaktion und führt so zu einer Fesselung im Nucleus. Dabei ist interessant, dass diese Mutation, welche sowohl in der „super-open“ als auch in der „closed“ Konfiguration für GKRP erreichbar ist, auf der α -10 Helix der Glucokinase liegt und somit auf einem gering konservierten Bereich im Vergleich zu anderen Enzymen der Hexokinase-Familie (Kuser et al. 2000).

Frühere Untersuchungen an der *Xenopus*-GK und eine spätere Darstellung der Kristallstruktur wiesen hingegen die Region His141 bis Leu144 als bedeutend für die Bildung eines Komplexes mit GKRP aus (Veiga-da-Cunha et al. 1996; Beck und Miller 2013). Weiter sollen die Aminosäuren Leu47, Leu58, Pro59, Tyr61, Met238, Leu243, Val244 und Met251, sowie

Val199 und Val200 an der Bildung von Strukturen beteiligt sein, welche für hydrophobische Wechselwirkung mit dem GGRP sorgen. Dahingegen sind Glu245, Asp247 vermutlich für elektrostatische Kräfte notwendig (Beck und Miller 2013).

Für den molekularen Shuttle der Glucokinase zwischen Nucleus und Zytoplasma ist neben dem Bindungsmotiv zum GGRP die Regulation des Exportes von Bedeutung. Da die im Folgenden beschriebene (Seite 11) Restriktion der Kernmembran eine passive Ausschleusung der GK aufgrund der Molekülgröße unwahrscheinlich macht, wurde ein Export mittels „nuclear export signal“ (NES) beschrieben. So konnte das Team um Shiota et al. 1999 mittels Mutation in Leucin-reichen Bereichen der GK zeigen, dass die Aminosäuren 300-310 von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Kern/Plasma-Ratio sind.

1.3.3. Regulation der Glucokinase Enzymaktivität

Neben der unten beschriebenen Regulation durch GGRP wird die Enzymaktivität der Glucokinase in der Leber durch unterschiedliche Hormone gesteuert. Herausragende Bedeutung kommt dabei dem Hormon Insulin zu. So steigert sich der Gehalt an GK mRNA und folglich auch an Protein in kultivierten Maus-Hepatozyten um das 15- bis 30-fache innerhalb von drei Stunden nach der Substitution von Insulin, sowohl in An- als auch Abwesenheit von Glucose. Hierbei werden unterschiedliche Signalwege postuliert, wie über den PI3-Kinase/PKB-Weg oder via HIF-1 α . Weiter zeigte sich im Insulinmangel-Mausmodell ein kompletter Glucokinase-Verlust welcher durch die Therapie mit Insulin vollständig reversibel war. Glucagon als physiologischer Gegenspieler von Insulin zeigte eine Verringerung des Glucokinasegehalts über eine intrazelluläre Steigerung des cAMP Gehalts (Iynedjian 2009; Printz et al. 1993).

Zudem wird die Glucokinase in der Leber durch langkettiges Acyl-CoA, Glucosamin, N-Acetyl-Glucosamin, Mannoheptulose und Perseitol inhibiert (van Schaftingen et al. 1994; Baltrusch et al. 2012).

Ferner hemmen Alloxan, Ninhydrin und Maleimid die Glucokinase durch eine Interaktion mit SH-Gruppen. Diese Bindung kann durch Dithiole ebenso wie Cystein aufgehoben werden (American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 1988).

Weiter ist für die Regulation der Glucokinase das bifunktionelle Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (PFK2/FBPase2) von Bedeutung. So ist die Bindung der PFK2/FBPase2 an die Glucokinase beschrieben worden mit prädominierender Lokalisation im Zytoplasma und einem im Vergleich zum GGRP inversen (siehe unten) Verhalten (Bindung

speziell in der „closed“-Konformation bei hohen Glucosespiegeln) (Baltrusch et al. 2001; Cullen et al. 2014).

1.4. Glucokinase-Regulatorprotein

Im Vergleich zu den Inselzellen des Pankreas wird die Aktivität der Glucokinase in der Leber nicht nur durch die Konzentration von Glucose reguliert, sondern auch durch das 68 kDa schwere Glucokinase-Regulatorprotein (GKRP). Dieses hauptsächlich in Hepatozyten exprimierte Protein hat einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivität der Glucokinase indem es abhängig von Glucose die GK bindet und auf diese Weise hemmt (Pautsch et al. 2013; Schhaftingen 1989; Beer et al. 2009; Casey und Miller 2016).

Unter Bedingung eines niedrigen Glucosespiegels bindet GKRP, durch hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen die Glucokinase, in ihrer inaktiven „super-open“-Konformation und der Komplex transloziert in den Zellkern (Choi et al. 2013). Auf diese Weise wird die GK im Zellkern zurückgehalten und steht nicht mehr als aktives Enzym für die Phosphorylierung von Glucose zur Verfügung. Im Gegensatz dazu führt ein steigender Glucosespiegel zur Dissoziation dieses Komplexes und die GK gelangt wieder zurück in das Zytoplasma und steht als aktives Enzym zur Verfügung (*Abbildung 1*).

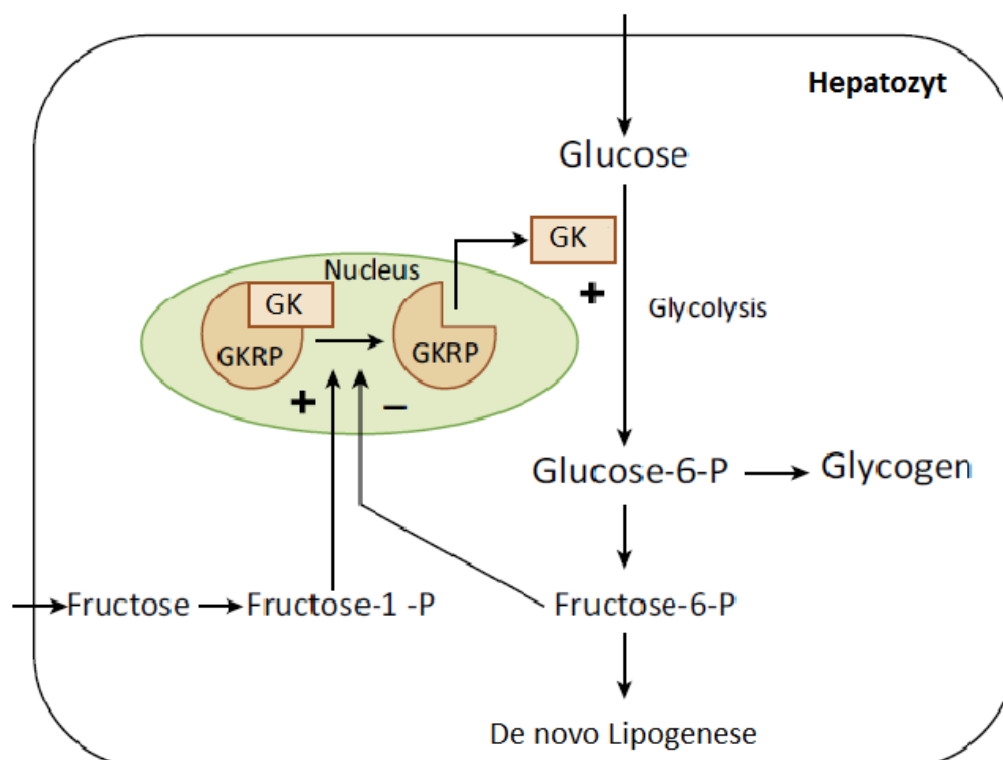


Abbildung 1 Wechselwirkung zwischen Glucokinase (GK) und Glucokinase-Regulatorprotein (GKRP) in Hepatozyten. Glucose-6-phosphat (Glucose-6-P) kann sowohl in Glycogen eingebaut, als auch in Fructose-6-phosphat (Fructose-6-P) umgewandelt werden. Fructose-1-phosphat (Fructose-1-P) hemmt, Fructose-6-P stimuliert die Bildung des GKRP-GK Komplexes. Nach Brouwers, Martijn C G J et al. 2015.

Diese Regulation via Glucose wird ergänzt durch den Einfluss von Fructosephosphaten auf die Bildung und Dissoziation des GK-GKRP-Komplexes. So konnte gezeigt werden, dass Fructose-6-phosphat (F6P) die Bindung von GKRP begünstigt und so unter den Bedingungen der Glykogenolyse bzw. Gluconeogenese bei denen F6P physiologisch erhöht ist (durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase wird F6P ins Gleichgewicht zu Glucose-6-phosphat [G6P] gebracht) den entgegengesetzten Glucoseflux minimiert. Dahingegen fördert Fructose-1-phosphat (F1P) bzw. Sorbitol-1-phosphat (S1P) die Dissoziation und steigert so die Konzentration der Glucokinase im Zytosol (Veiga-da-Cunha und van Schaftingen 2002). Dies bewirkt in einer kohlehydratreichen, postprandialen Situation die Förderung der Glykogensynthese (Brown et al. 1997; Iynedjian 2009; Pautsch et al. 2013; van Schaftingen et al. 1994; Veiga-da-Cunha und van Schaftingen 2002).

Ferner wird dem GKRP eine Regulation und Stabilisierung der GK durch den Schutz vor einem proteolytischen Abbau zugeschrieben. Dementsprechend konnte an *GCKR*-Knockout-Mäusen

und Katzen welchen die endogene Expression fehlt, gezeigt werden, dass ein Mangel an GKRK zu einem signifikanten Verlust in der Aktivität bzw. zu geringeren Proteinspiegeln (bei Mäusen) der Glucokinase führt (Grimsby 2000; Farrelly et al. 1999; Hiskett et al. 2009).

1.4.1. Die Genstruktur des Glucokinase-Regulatorproteins

GCKR ist das für das Glucokinase-Regulatorprotein codierende Gen. Es liegt auf dem kurzen Arm des 2. Chromosoms (2p23). Das humane *GCKR*-Gen ist zu 88% identisch mit Ratten-*GCKR* und codiert ein 625 Aminosäuren umfassendes Protein (Warner et al. 1995).

1.4.2. Glucokinase-Regulatorprotein und -molekülstruktur

Pautsch et al. 2013 gelang die Beschreibung der Kristallstruktur des humanen GKRK mit Hilfe unterschiedlichen Modifikationen des GKRK (GKRK_{WT-His} [His-Tag am C-Terminus] und WT_{K326} [Doppelmutante an den Aminosäuren Positionen 326 und 327]) im Komplex mit Fructose-1-Phosphat (Abbildung 2). Diese modifizierte GKRK-Variante wies bei biochemischer Charakterisierung nahezu identische Eigenschaften (Regulation der GK-Aktivität) wie das Wildtyp-GKRK auf und kann daher als Modell für das Wildtyp-GKRK genutzt werden.

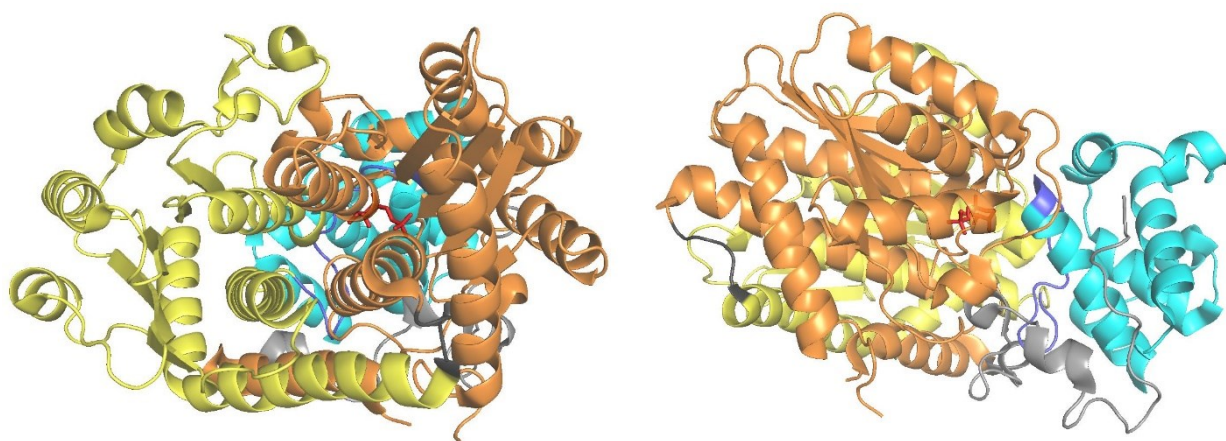


Abbildung 2 zeigt die Struktur des GKRK jeweils um 90° rotiert. Die SIS-1 ist orange, SIS-2 gelb, der „Linker“ blau, die Lid (cap) Domäne türkis und Fructose-1-phosphat rot dargestellt (nach Pautsch et al. 2013).

Demnach besteht GKRK aus zwei topologisch identischen und gleich großen „sugar isomerase“ Domänen (SIS-1 und SIS-2) und einer α -Helix Domäne – „Lid“ oder „Cap“ genannt – am C-

Terminus. Die SIS-Domänen werden von einem durch zwei α -Helices gerahmten fünfsträngigen β -Faltblatt dominiert. Zusammen bilden diese Strukturen ein dreischichtiges $\alpha\beta\alpha$ -Sandwich. Am N-Terminus jeder Domäne befindet sich eine ca. 20 Aminosäuren lange α -Helix, welche aus dem Ursprungsmotiv heraus in das der jeweils anderen Domäne ragt.

Die C-terminale-Domäne besteht aus sieben α -Helices, von denen drei den Kern bilden. Die SIS- und die C-terminale-Domäne sind über einen 14 Aminosäuren langen „Linker“, welcher direkt in eine Kern-Helix übergeht, verbunden.

Für die Steuerung des Glucokinase-Regulatorproteins ist die Analyse der Bindungsstellen für F1P und F6P von entscheidender Bedeutung. So konnten Pautsch et al. zeigen, dass F1P in einer Bindungstasche im Verbindungsbereich von SIS-1 und dem „Linker“ bindet. Dabei bilden die Aminosäuren 107-110 (α A3 Helix), 258/259 (α A7 Helix) sowie 150/153 (α A4') das Fach für den Fructose-Rest. Die Phosphatgruppe wird von einer Schleife aus den Aminosäuren 179-184 gerahmt, welche vor der α -Helix A5 liegt. Ergänzend stellt die SIS-2 Domäne in Position 348/351 (α B3 Helix), ebenso wie die N-terminale-Domäne in Position 512-518, Bindungspartner zur Verfügung.

Hierbei zeigen sich auch Übereinstimmungen zu Strukturanalysen an *Xenopus laevis* GKRP, wobei die Aminosäuren 179, 258, 347 und 513, welche Wasserstoffbrückenbindungen zu F6P ausbilden, als bedeutend beschrieben wurden (Choi et al. 2013).

Daneben zeigten Choi et al. am Komplex von xGk/xGKRP die für die hauptsächlich hydrophoben Wechselwirkungen entscheidenden Strukturen und Aminosäuren an beiden Proteinen. Für die Verbindung beider Enzyme sind beim xGKRP besonders die Aminosäuren 440, 441, 443 der Schleife L1 und 461-464 der Schleife 2 von Bedeutung, was für Val441 und Gly442 im rGKRP bestätigt wurde (Beck und Miller 2013). Dem gegenüber spielen auf der xGK die Aminosäuren 40, 49, 51, 52, 54, 56, 136, 231, 236, 237, 238, 244 der „large“ Domäne sowie 191-193 der „small“ Domäne eine entscheidende Rolle. Um diese Befunde am hGKRP zu bestätigen, erzeugten Choi et al. eine Mutante hGKRP^{L463A/F465A} welche den Aminosäuren 462 und 464 in xGKRP entsprechen und stellten dabei fest, dass durch den Verlust der hydrophoben Eigenschaften dieser Aminosäuren die Ausbildung des hGKRP/hGK-Komplexes gestört ist. In biophysikalischen Analysen konnte unter anderem von Anderka et al. 2008 die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen für die Bindung von GK und GKRP bestätigt werden.

Auch Analysen von komplexiertem rGKRP stützen diese Befunde um die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonyl Gruppe von Leu464 auf dem rGKRP und Lys143, sowie bezüglich der van-der-Waals-Bindungen im Bereich der Aminosäuren 462-470 des rGKRP (Beck und Miller 2013).

Weiter beschrieb die Arbeitsgruppe um Choi Ionenbindungen zwischen Glu238 und Arg179 der xGK mit Arg300 und Asp412 des xGKRP (Arg301 und Asp413 in hGKRP) sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ile462 und Leu463 des xGKRP mit Leu236, Glu238 und Lys136. Für Arg301 wurden die Befunde von Beck und Miller 2013 bestätigt und zusätzlich Arg297 als bedeutsam für elektrostatische Wechselwirkungen beschrieben. Insbesondere zeigte auch die Mutation von Asp413 des hGKRP (entspricht Asp412 des xGKRP) eine signifikante Verringerung der Inhibition der hGK im Vergleich zum Wildtyp bei vergleichbarer Bindungsaffinität. Dies würde eine Restriktion der Konformation durch diese Ionenpaarbindung mit der „small“ Domäne der GK nahelegen.

Als eine mögliche Bindungsstelle für synthetische Moleküle (s. u.), welche die Bindung von GK an GKRP regulieren können, ist eine Region des hGKRP beschrieben, die von den Aminosäuren Val28, Glu32, Arg215, Asp217, Ala521 und Arg525 bzw. Ile11, Gly181, Met213, Arg525 gerahmt wird (Ashton et al. 2014; St. Jean et al. 2014).

1.4.3. Molekülstruktur von GKRP und GK im Komplex

Wertvolle Erkenntnisse über die Interaktion der Glucokinase mit ihrem Regulatorprotein lassen sich auch aus den Untersuchungen der Kristallstruktur dieser Proteine im Komplex gewinnen (Beck und Miller 2013). Zwar nutzte die Gruppe Ratten-GKRP und pankreatische Glucokinase, jedoch lassen sich aus den Ergebnissen nützliche Erkenntnisse auch für die Funktion des humanen GKRP gewinnen.

So konnte beispielsweise der Befund von Pautsch et al. 2013 sowie Veiga-da-Cunha und van Schaftingen 2002 bestätigt werden, dass F1P und F6P dieselbe Bindungsstelle besitzen. Außerdem konnte die Bindung des GKRP mit der GK in einer „super-open“ Konfiguration und damit unter Abwesenheit eines Bindungsbereiches für Glucose beschrieben werden. Damit entsprechen die Ergebnisse weitestgehend denen von Kamata et al. 2004 für die Glucokinase allein.

Der interessante Befund, dass Ser481, welches posttranslational von der AMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert wird, 12 Å außerhalb des Interaktionsbereichs von GK und GKRP

liegt, weist auf offene Fragen in der Regulation der Komplexbildung durch GGRP-Phosphorylierung hin (Beck und Miller 2013; Mukhtar et al. 2008).

1.4.4. Regulation der GK/GGRP-Bindung und des Kern-In- und Exportes

Für das Verständnis der Regulation der Glucokinase ist das Wissen um die Verteilung zwischen Kern und Zytoplasma von großer Bedeutung. Ein Schlüsselement ist dabei der selektive bidirektionale Transport von GK und GGRP durch Kernporen. Während Moleküle mit einer Masse unter ~40 kDa frei durch Kernporen diffundieren können, bedarf die Glucokinase auf Grund der Größe von 52 kDa eines gesonderten Import- und Exportmechanismus (Marfori et al. 2010; Shiota et al. 1999). Der Export der GK wird putativ über ein NES innerhalb der Proteinstruktur (siehe oben) geregelt und ist auf diese Weise unabhängig von GGRP. Anders verhält es sich beim Import der GK. So fehlt der Glucokinase ein „nuclear localisation signal“ (NLS) welches den Import an der Kernpore reguliert. Weiter konnte mit Hilfe der Exportsuppression der NES via Leptomycin B gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von GGRP zu keiner Translokation der Glucokinase in den Zellkern kommt (Shiota et al. 1999).

Mittels Photokonversion von Fluoreszenzfusionsproteinen konnte in zweikernigen Ratten-Hepatozyten gezeigt werden, dass das GGRP-Fusionsprotein in der Lage ist, zwischen unterschiedlichen Zellkernen zu wechseln. Jedoch weist die Translokationsrate im Gegensatz zum GK-Fusionsprotein keine wesentliche Abhängigkeit von der Glucosekonzentration auf. Dieser Befund könnte zeigen, dass hohe Glucosekonzentrationen zwar den Export der GK steigern, nicht jedoch von GGRP bzw. einem GGRP/GK-Komplex was einen GGRP unabhängigen Export der GK wahrscheinlich macht und die Dissoziation des GGRP/GK-Komplexes im Zellkern als regulatives Moment erkennen lässt (Kaminski et al. 2014).

Hierbei soll noch einmal die Abhängigkeit der Bindung von GGRP mit der GK von unterschiedlichen Glucosekonzentrationen verdeutlicht werden. So zeigt sich bei einer Änderung der Glucosekonzentration von 5 mmol/l zu 20 mmol/l eine signifikante Verringerung der Nucleus/Zytoplasma-Ratio (K/P-Ratio) des GK-Fusionsproteins in Maus- und Ratten-Hepatozyten, was einer deutlichen Erhöhung der Glucokinasekonzentration im Zytoplasma entspricht. Verstärkt gilt ähnliches auch für eine Kombination aus 5 mmol/l Glucose und 0,2 mmol/l Fructose, bzw. 30 µmol/l Compound A (Kaminski et al. 2014). Vergleichbare Befunde ließen sich unter anderem bei Jetton et al. 2001 und Postic et al. 1999 sowie Fernández-Novell et al. 1999 finden. Passend dazu beschrieben Anderka et al. 2008 die Dynamik der Dissoziation

bei steigender Glucosekonzentration. Dabei zeigten sie, dass der K_d -Wert der GK-GKRP Interaktion proportional zur umgebenden Glucose steigt.

Für die weiteren Betrachtungen soll auf die funktionalen Unterschiede zwischen humanem und Ratten-GKRP (rGKRP) hingewiesen sein. Bei Abwesenheit von F6P und Sorbitol-6-phosphat (S6P) inhibiert das humane Glucokinase-Regulatorprotein die Glucokinase stärker als das GKRP welches in Ratten exprimiert wird. Gleichzeitig besteht eine höhere Affinität des hGKRP zu ebendiesen Substraten. Ferner ist für rGKRP eine signifikante Verringerung der Kern/Plasma Ratio sowohl in HeLa Zellen als auch in primären Hepatozyten beschrieben (Brocklehurst et al. 2004a; Rees et al. 2012a).

Zum strukturellen Verständnis der Regulation des GKRP durch Fructose-Phosphate haben die Ergebnisse von Beck und Miller 2013 beigetragen. Sie zeigten, dass die Fructose-Phosphat-Bindungstasche mehr als 30 Å vom GK-GKRP-Interaktionsbereich entfernt ist und trotzdem durch die Bindung von F1P/F6P entscheidende Veränderungen im Interaktionsbereich verursacht werden. Außerdem nutzten sie ein Alignment von GKRP-F1P (Pautsch et al. 2013) und GKRP-F6P, welches eine RMSD von 0,72 Å ergab. Mit diesem konnte weiterhin gezeigt werden, dass unter Bindung von F6P die „cap“ und SIS-Domäne auseinander weichen (bei F1P Bindung sind 930 Å² der GKRP-Oberfläche durch den Kontakt verborgen, bei F6P Bindung 770 Å²), da die Wasserstoffbrückenbindung von Arg509 mit His351 gestört und so diese Region für das Solvens besser zugänglich wird. Weiter soll die Konfiguration der GKRP-Schleife der Aminosäuren 462-470, welche für hydrophobe Wechselwirkung zur Glucokinase bedeutsam ist, maßgeblich von dem jeweilig gebundenen Fructose-Phosphat abhängig sein.

Untersuchungen der Kinetik in der GK-GKRP-Interaktion erweitern die beschriebenen Darstellungen. So wurde ein Modell postuliert, bei welchem die Glucokinase in ihrer „super-open“ Konformation an das GKRP bindet und einen initialen Komplex formt. In einem zweiten, komplizierteren Schritt ändert sich die Konformation der GK dahingehend, dass der Öffnungswinkel der großen und kleinen Domäne der GK sich ein wenig verringert und sich so das subsequeunte Konformations-Gleichgewicht bildet.

Hier konnte zudem gezeigt werden, dass F6P die Assoziationsratenkonstante (k_{on}) der Bildung des initialen GK-GKRP-Komplexes um das 2,6-fache erhöht und die Dissoziationsratenkonstante (k_{off}) dieses Komplexes um das 60-fache verringert und so diesen letztlich stabilisiert (Casey und Miller 2016).

Neuere Untersuchungen konnten einen weiteren wesentlichen Regulator für die GK/GKRP-Interaktion finden. So konnten Watanabe et al. 2018 die Bedeutung von Sirtuin 2 (Sirt2) in der

Deacetylierung von GKRP zeigen. In Abhängigkeit der zellulären NAD^+ Konzentration deacetyliert Sirt2 das GKRP an der Position 126. Dadurch wird die von Glucose abhängige Dissoziation von GK und GKRP ermöglicht und folglich die hepatische Glucoseaufnahme gesteigert. Unklar bleibt weiterhin, wie die Acetylierung an Position K126 gesteuert wird und welche strukturellen Änderungen im GKRP für die Funktionsvariabilität verantwortlich sind.

1.4.5. Einfluss von exogenen Regulatoren auf die GKRP-Aktivität

Neuere Untersuchungen befassen sich immer wieder mit der Wirkung von synthetischen Aktivatoren auf die Aktivität der Glucokinase und des Glucokinase-Regulatorproteins, auch im Hinblick auf einem etwaigen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 und des Metabolischen Syndroms.

So sind Glucokinase-Aktivatoren (GKAs) beschrieben, welche sowohl die Affinität der GK zu ihrem Substrat als auch die V_{\max} signifikant erhöhen und daher im gewissen Maße eine gain-of-function Mutation imitieren. Diese Mutation führt in Patienten zu einer persistenten Hyperinsulinämie bei gleichzeitiger Hypoglykämie. Eine Arbeitsgruppe um Grimsby et al. 2003, beschrieb das Molekül RO-28-1675 welches im Zellmodell in der Lage war, die Aktivität der Glucokinase signifikant zu steigern. Zudem konnte unter anderem im Mausmodell gezeigt werden, dass sich durch diesen GKA die Insulinproduktion in den β -Zellen des Pankreas und auch die Glucoseutilisation in Hepatozyten steigern ließ. Biophysikalisch lässt sich letztere Eigenschaft durch die Glucose-abhängige Schwächung der GK-GKRP-Assoziation erklären (Anderka et al. 2008). Darauf wurden eine Vielzahl von weiteren GKAs veröffentlicht, welche sich insgesamt in vier Gruppen einteilen lassen: jene mit Kohlenstoff-Kern, mit einem aromatischen Ringsystem im Zentrum, mit Aminosäure-Kern oder jene mit anderen strukturbildenden Elementen. Diese Zentren sind im Allgemeinen mit drei Substituenten verbunden, wovon zwei hydrophobe Gruppen sind und die andere ein Wasserstoff-Empfänger-Akzeptor-System darstellt (Matschinsky 2009).

Neben den für eine Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 günstig erscheinenden Effekten wie der Senkung der postprandialen Blutglucosekonzentration, der Steigerung der Insulinsekretion und der Erniedrigung des HbA_{1c} im Zell- und Tiermodell weisen neuere Untersuchungen auf das möglicherweise erhöhte Risiko für Veränderungen im Lipidstoffwechsel hin. Demzufolge besteht bei der Behandlung von ZDF-Ratten und db/db Mäusen mit unterschiedlichen Glucokinaseaktivatoren die Gefahr der Akkumulation von Triglyceriden in der Leber und damit der Ausbildung einer Steatosis hepatis. Hierbei lassen sich interessante Verbindungen zu den

im Folgenden beschriebenen Phänotypen der GKRP-Mutationen finden (Ceuninck et al. 2013). Zu diesen Befunden lassen sich möglicherweise auch Ergebnisse einer klinischen Studie zur Therapie mit dem GKA MK-0941 bei Insulin geführten Typ 2 Diabetikern in Verbindung bringen. Dabei kam es neben der steigenden Gefahr von Hypoglykämien zu signifikant erhöhten Triglyceridspiegeln im Blut der Probanden (Meininger et al. 2011).

Auch Moleküle, welche die Funktion des Glucokinase-Regulatorproteins beeinflussen, nehmen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel der Leber. Der Wirkstoff AMG-1694 (Abbildung 3) zeigte beispielsweise in Hepatozyten von ZDF- und Wistar-Ratten eine deutliche Verschiebung der GK Kern-Plasma-Relation hin zum Zytoplasma. Weiter ließ sich eine signifikante Senkung des Blutglucosespiegels nach Applikation von AMG-1694 in ZDF-, nicht aber in Wistar-Ratten beobachten. Dies weist auf eine Änderung des Blutglucosepiegels ausschließlich im Zustand der Hyperglykämie hin, bei Vermeidung von Hypoglykämien im Norm- als auch Hyperglykämien-Mausmodell.

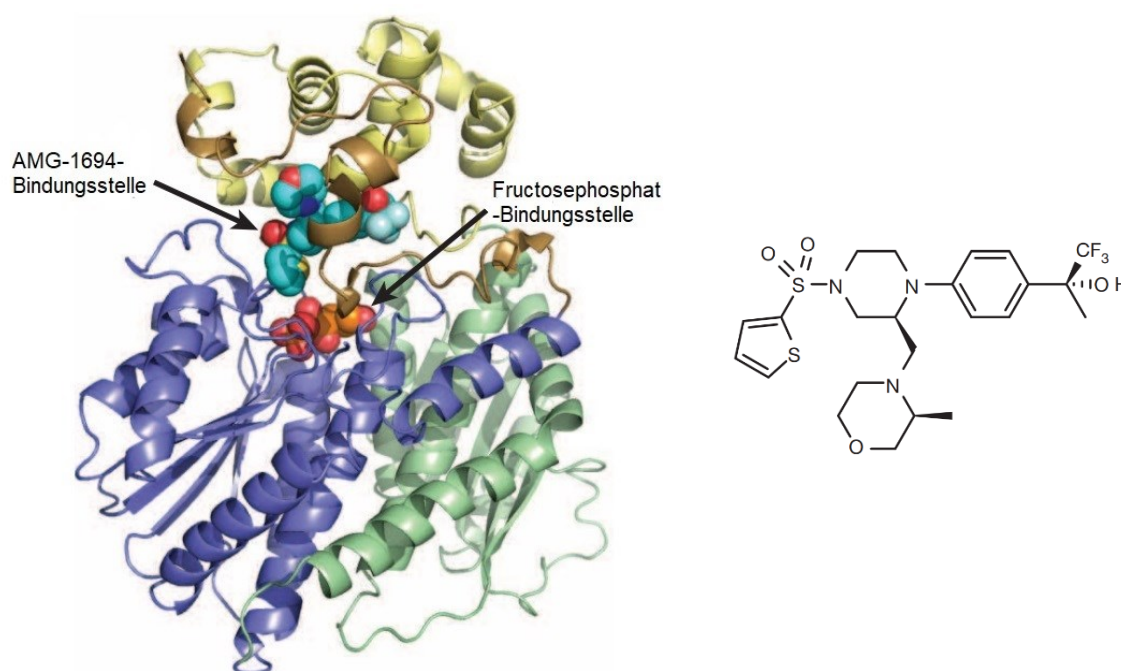


Abbildung 3 Struktur des Komplexes aus humanen GKRP, AMG-1694 und S6P (links) und die Strukturformel von AMG-1694 (Lloyd et al. 2013, bearbeitet).

AMG-1694 ist durch direkte Bindung an GKRP in der Lage die Dissoziation der GK vom Regulatorprotein zu fördern und so die Glucokinaseaktivität zu steigern. Dabei wird im Gegensatz zur Aktivitätssteigerung mittels GKAs der Effekt durch indirekte Bereitstellung der GK erreicht und nicht durch einen direkten Mechanismus, welcher unter anderem die Kooperativität mit Glucose ändert. Wobei interessanterweise zu beachten ist, dass AMG-1694

zwar an einer Tasche in der Nähe, aber nicht direkt im Fructose-Phosphat-Bindungsereich bindet. Auch scheint der Wirkstoff keinen direkten Einfluss auf den GKRP-GK-Bindungsereich zu haben und führt im GKRP nur zu geringen Strukturänderungen (Lloyd et al. 2013; Ashton et al. 2014).

1.4.6. Mutationen des humanen GKRP

1.4.6.1. hP446L

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Untersuchungen zu unterschiedlichen Genloci und deren Bedeutungen für das Risiko zur Ausbildung eines Typ 2 Diabetes und anderen Stoffwechselerkrankungen untersucht.

Genomweite Assoziationsstudien zeigten, dass *GCKR* ein relevantes Ziel für veränderte Triglyceridplasmaspiegel darstellt (Saxena et al. 2007; Teslovich et al. 2010). Bei einer Metauntersuchung an über 45.000 Probanden aus unterschiedlichen Studien/Monitorprogrammen konnte der nicht synonyme, häufige Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. single nucleotide polymorphism) rs1260326 (c.1337 C>T) entdeckt werden. Dieser codiert die GKRP-Variante Pro446Leu (P446L/hP446L) bei welcher die Aminosäure Prolin-446 in der Polypeptidkette des Glucokinase-Regulatorproteins durch Leucin ersetzt ist. Die Mutation sorgt für eine deutlich signifikante Erhöhung des Nüchtern-Serumtriglyceridspiegels sowie für eine Senkung des Nüchtern-Blutglucosespiegels. Ferner lässt sich im Vergleich zur Wildtypgruppe ein im Verlauf deutlich stärkerer Zuwachs der Triglyceridspiegel bei der Variante Pro446Leu erkennen (*Abbildung 4*). Auch zeigen sich bei den Probanden erhöhte

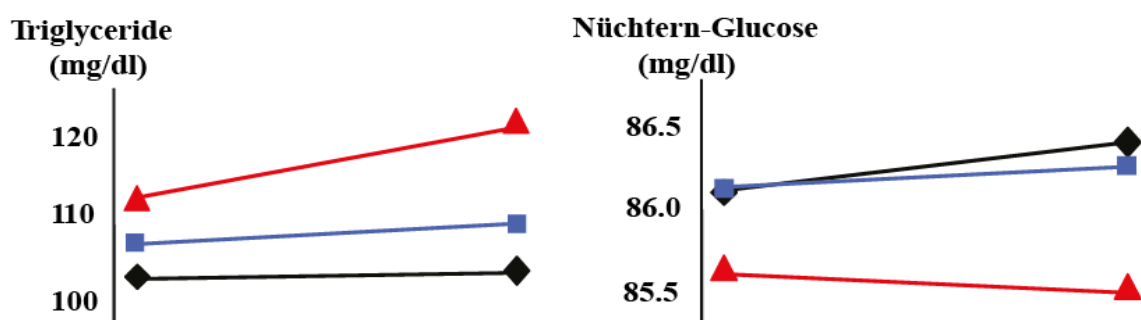


Abbildung 4 nüchtern Triglycerid- und Blutglucosespiegel bei Probanden der MPP-Studie vor und nach einer mittleren Beobachtungszeit von 23,4 Jahren. Schwarz: homozygote Träger von Pro446, blau: heterozygote SNP Leu446, rot: homozygote Variante Pro446Leu (Orho-Melander et al. 2008, bearbeitet).

CRP-Spiegel bei jedoch nicht signifikant gesteigerter kardiovaskulärer Morbidität (Orholm et al. 2008).

Außerdem wird ein verringerter Nüchtern-Insulinspiegel, sowie eine gesenkte HOMA-Insulinresistenz bei einer gleichzeitigen Reduktion des Risikos für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes beschrieben (Dupuis et al. 2010; Rees et al. 2012a; Vaxillaire et al. 2008).

In einer weiteren multiethnischen Studie konnte der Effekt von P446L auf den Triglyceridspiegel bestätigt und zudem gezeigt werden, dass eine intensive Lebensstiländerung (Gewichtsreduktion, erhöhte körperliche Aktivität sowie veränderte Ernährungsgewohnheiten) bei Mutationsträgern zu einer deutlicheren Reduktion der TG-Spiegel im Vergleich zu Nicht-Trägern führte. Dieser Beobachtung lässt sich mutmaßlich auf die abgeschwächte Wirkung der im Folgenden beschriebenen Effekte zurückführen (Pollin et al. 2011).

In-vitro-Untersuchungen konnten zeigen, dass P446L ein funktionales Enzym darstellt, welches in der Lage ist, die Glucokinaseaktivität in einer Dosis-abhängigen Weise zu inhibieren. Wobei im Vergleich zum Wildtyp (WT) die Fructose-6-phosphat abhängige Regulation, jedoch nicht die Steuerung durch Fructose-1-phosphat relevant verringert ist. Dies führt schließlich zu einer signifikanten Verringerung der GK-Inhibition. So lässt sich vermuten, dass so der Glucoseflux in die Hepatozyten erhöht und die Glykolyse in der Leber gesteigert wird. Dies könnte die Bereitstellung anderer Metabolite wie Malonyl-CoA erhöhen und somit möglicherweise über eine Steigerung der de novo Lipogenese bzw. einer Hemmung der Carnitin-Palmityltransferase-1 auch die Triglyceridspiegel im Blut beeinflussen (Beer et al. 2009; McGarry und Brown 1997; Santoro et al. 2015). Mit Veränderungen des Triglyceridspiegels können auch abgeänderte Lipoproteinkonzentrationen im Blut einhergehen wie sie für andere SNPs der *GCKR* beschrieben wurden (Stančáková et al. 2011).

Untersuchungen an Fluoreszenz-Fusionsproteinen konnten die zelluläre Lokalisation von P446L im Vergleich zum Wildtyp darstellen. Beispielsweise ist die Signalstärke von P446L im Kern von HeLa-Zellen sowie von primären Hepatozyten signifikant geringer als die des WT-GKRP unabhängig von der umgebenden Glucosekonzentration. Vergleichbare Befunde ließen sich für die Lokalisation der Glucokinase in Abhängigkeit von der Variante des GKRP in HeLa-Zellen sowohl bei 5,5 mmol/l als auch bei 25 mmol/l finden. So war sie bei der transienten Co-Expression mit GKRP-P446L deutlich geringer im Kern lokalisiert als beim WT-GKRP.

Dazu ließ sich mit einer FRET Analyse eine signifikant geringere Interaktion der Glucokinase mit GKRP-P446L in Gegenüberstellung zum WT-GKRP, bei ergänzend aufgehobener Glucoseabhängigkeit (bei 5,5 mmol/l bzw. 25 mmol/l) in HeLa-Zellen feststellen. In

Maushepatozyten konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von GKRP-P446L eine Glucose-abhängige Translokation der Glucokinase trotz der endogenen Expression von GKRP verhindert (Rees et al. 2012a).

Strukturelle Untersuchungen am GKRP-GK Komplex zeigten, dass die in unmittelbarer Nachbarschaft zu P446 liegenden Aminosäuren an der Gestaltung der Interaktion maßgeblich beteiligt sind. Gln443 bildet dabei mutmaßlich eine Wasserstoffbrückenbildung mit Arg186 der Glucokinase und Val441 sowie Gly442 sorgen für hydrophobe Wechselwirkungen mit Val199 bzw. Val200 der GK. Daher wird eine Schwächung der Bindung von GKRP und GK durch die Mutation P446L mittels struktureller Veränderungen vermutet (Beck und Miller 2013).

1.4.6.2. *hH438Y und hM344I*

Zur Untersuchung der Bedeutung seltener Varianten des humanen GKRP bei der komplexen Entstehung von multimodalen Stoffwechselerkrankungen wurden 458 Probanden mit Hypertriglyceridämie und 333 Kontrollpersonen mit normalen Blutlipid-Werten klinisch untersucht und auf Mutationen im *GCKR* gescreent. Dabei wurden 18 nicht synonyme Varianten detektiert, von denen 11 Missense-Mutationen entsprechen. Darunter befanden sich p.H438Y und p.M344I., welche im Folgenden näher beschrieben werden (Rees et al. 2014).

1.4.7. *Übersicht GKRP Interaktionsbereiche*

Basierend auf den Proteinsequenzen, welche auf dem UniProt-Server hinterlegt sind (humanes, Ratten-, Maus- und Frosch-GKRP) bzw. den entsprechenden FASTA-Sequenzen von Pautsch et al. 2013 und Beck und Miller 2013 der PDB-Datenbank (*Abbildung 5*) wurde mit dem Programm UniProt Clustal Omega ein multiples Alignment erstellt (McWilliam et al. 2013). Zusätzlich wurden die von den oben genannten Autoren ermittelten Bindungsstellen bzw. -bereiche für die Glucokinase sowie die Fructose-Phosphate markiert und zusätzlich die von Choi et al. 2013 im Supplement beschriebenen Alignment-Ergebnisse eingetragen. Zudem sind die Bereiche prominenter „Loss-of-Function-Mutationen“ hervorgehoben.

Species	10	20	30	40	50	60
SP Q14971 GCIR_HUMAN	MPGTKR YQH	VIETPE PGKWE	LSGYEA AVPI	TEKSNPLT QD	LDKADA ENIV	RLLGQCDA EI
SP Q07071 GCIR_RAT	MPGTKR YQH	VIETPE PGGEWE	LSGYEA AVPI	TEKSNPLTRN	LDKADA EKIV	KLLGQCDA EI
SP Q93444 GCIR_MOUSE	MPSTKR YQH	VIETPE PGGEWE	LSGYEA AVPI	TEKSNPLTRN	LDKADA EKIV	QLLGQCDA EI
SP Q92754 GCIR_XENLA	MRGTRK YQH	VIETPD PGKWE	LAGEYE ASLP	SEKSNPMTR E	LDKADP SQLV	QLLRDQDA EI
Beck u. Miller (Rat)	MPGTKR YQH	VIETPE PGGEWE	LSGYEA AVPI	TEKSNPLTRN	LDKADA EKIV	KLLGQCDA EI
Reusch (Human)	MPGTKR YQH	VIETPE PGKWE	LSGYEA AVPI	TEKSNPLT QD	LDKADA ENIV	RLLGQCDA EI
SP Q14971 GCIR_HUMAN	FQEE GQAL S	TYQR LYS ESI	LT M VQVAG K	VQEVLKEP DGG	LVVLSGGG TS	GRMAFLMS V S
SP Q07071 GCIR_RAT	FQEE GQIV P	TYQR LYS ESI	LT M LQVAG K	VQEVLKEP DGG	LVVLSGGG TS	GRMAFLMS V S
SP Q93444 GCIR_MOUSE	FQEE GQIM P	TYQR LYS ESI	LT M LQVAG K	VQEVLKEP DGG	LVVLSGGG TS	GRMAFLMS V S
SP Q92754 GCIR_XENLA	FQEE DENI H	YHRLYS ESI	LT M GDVAK R	VQEVLK NP DGG	LVVLSGCG TS	GRLALLAN S
Beck u. Miller (Rat)	FQEE GQIV P	TYQR LYS ESI	LT M LQVAG K	VQEVLKEP DGG	LVVLSGGG TS	GRMAFLMS V S
Reusch (Human)	FQEE GQAL S	TYQR LYS ESI	LT M VQVAG K	VQEVLKEP DGG	LVVLSGGG TS	GRMAFLMS V S
SP Q14971 GCIR_HUMAN	FNQLMKGLG	QKPLYTYL IAG	GDRSVVAS RE	GTEDSALHG I	EELKKVA AGK	KRVIVIGI S V
SP Q07071 GCIR_RAT	FNQLMKGLG	QKPLYTYL IAG	GDRSVVAS RE	GTEDSALHG I	EELKKVA AGK	KRVIVIGI S V
SP Q93444 GCIR_MOUSE	FNQLMKGLG	QKPLYTYL IAG	GDRSVVAS RE	GTEDSALHG I	EELKKVA AGK	KRVIVIGI S V
SP Q92754 GCIR_XENLA	FNGLLKGLH K	TPCYCYIMS G	GDRSIVT SQE	SS EDN PQLGA	QELEKVC EGK	KNVLF IGI S
Beck u. Miller (Rat)	FNQLMKGLG	QKPLYTYL IAG	GDRSVVAS RE	GTEDSALHG I	EELKKVA AGK	KRVIVIGI S V
Reusch (Human)	FNQLMKGLG	QKPLYTYL IAG	GDRSVVAS RE	GTEDSALHG I	EELKKVA AGK	KRVIVIGI S V
SP Q14971 GCIR_HUMAN	GLSAPF VAG	QMDCCMN TAV	FLPVLVGF NP	VSMARN DPI	EDWS S TFRQV A	ERM Q KMQ EK Q
SP Q07071 GCIR_RAT	GLSAPF VAG	QMDYCMD N TAV	FLPVLVGF NP	VSMARN DPI	EDWR S TFRQV A	ERM Q KMQ EK Q
SP Q93444 GCIR_MOUSE	GLSAPF VAG	QMDYCMD N TAV	FLPVLVGF NP	VSMARN DPI	EDWR S TFRQV A	ERM Q KMQ EK Q
SP Q92754 GCIR_XENLA	GLSAPF IAG	QLDFCMR HLDV	FLPVLVGF NP	VSMARN R I	EDWHS S TFRQV A	ERL Q T LHS D Q
Beck u. Miller (Rat)	GLSAPF VAG	QMDYCMD N TAV	FLPVLVGF NP	VSMARN DPI	EDWR S TFRQV A	ERM Q KMQ EK Q
Reusch (Human)	GLSAPF VAG	QMDCCMN TAV	FLPVLVGF NP	VSMARN DPI	EDWS S TFRQV A	ERM Q KMQ EK Q
SP Q14971 GCIR_HUMAN	KAFV LNP AI	GPEGLSG S R	MKGG SATKI L	LETLL LA AHKT	VDD QG IA ASQR	CLEEL R TFE
SP Q07071 GCIR_RAT	EAFV LNP AI	GPEGLSG S R	MKGG SATKI L	LETLL LA AHKT	VDD QG VV SS QR	CLEEL R TFE
SP Q93444 GCIR_MOUSE	EAFV LNP AI	GPEGLSG S R	MKGG SATKI L	LETLL LA AHKT	VDD QG VV SS QR	CLEEL R TFE
SP Q92754 GCIR_XENLA	KGFV LNP AV	GPEGLSG S R	MKGG SATKI L	LETLL LA AHKT	VDD QG VV SS QR	CLEEL R TFE
Beck u. Miller (Rat)	EAFV LNP AI	GPEGLSG S R	MKGG SATKI L	LETLL LA AHKT	VDD QG VV SS QR	CLEEL R TFE
Reusch (Human)	KAFV LNP AI	GPEGLSG S R	MKGG SATKI L	LETLL LA AHKT	VDD QG IA ASQR	CLEEL R TFE
SP Q14971 GCIR_HUMAN	AHQV TYS Q	SPKIAT LMK QV	GISLEKK GRV	HLVGV Q T LGI	IAIM DGV VC	CIHTFGA DFRD V
SP Q07071 GCIR_RAT	AHQV TYS Q	SPKIAT LMK QV	GISLEKK GRV	HLVGV Q T LGI	IAIM DGV VC	CIHTFGA DFRD I
SP Q93444 GCIR_MOUSE	AHQV TYS Q	SPKIAT LTK QV	GISLEKK GRV	HLVGV Q T LGI	IAIM DGV VC	CIHTFGA DFRD I
SP Q92754 GCIR_XENLA	AHQV TYS Q	SPKIAT LMK QV	GISLEKK GRV	HLVGV Q T LGI	IAIM DGV VC	CIHTFGA DFRD V
Beck u. Miller (Rat)	AHQV TYS Q	SPKIAT LMK QV	GISLEKK GRV	HLVGV Q T LGI	IAIM DGV VC	CIHTFGA DFRD V
Reusch (Human)	AHQV TYS Q	SPKIAT LMK QV	GISLETTGH V	HLVGV Q T LGI	IAIM DGV VC	CIHTFGA DFRD V
SP Q14971 GCIR_HUMAN	RGFL IGD HS	D MFNQK AELT N	QGGPQFT FS Q	DFLTSILP S	LTEIDT V VFI	FLLD DNLTEV Q
SP Q07071 GCIR_RAT	RGFL IGD HS	D MFNQKDEL T N	QGGPQFT FS Q	DFLTSILP S	LTEIDT V VFI	FLLD DNLTEV Q
SP Q93444 GCIR_MOUSE	RGFL IGD HS	D MFNQKDEL S N	QGGPQFT FS Q	DFLTSVLP S	LTEIDT V VFI	FLLD DNLAEV Q
SP Q92754 GCIR_XENLA	RGFITGGY H S	DIENK EG DLS S	LGPQF SISH E	DFVKNVLP S	VSETD T VLLI	FLLD DNLNQ I E
Beck u. Miller (Rat)	RGFL IGD HS	D MFNQKDEL T N	QGGPQFT FS Q	DFLTSILP S	LTEIDT V VFI	FLLD DNLTEV Q
Reusch (Human)	RGFL IGD HS	D MFNQK AELT N	QGGPQFT FS Q	DFLTSILP S	LTEIDT V VFI	FLLD DNLTEV Q
SP Q14971 GCIR_HUMAN	TIVEQV KEK	NHIQAL AHS T	VGGQLL P I P L	KLFP S L I S I T	WP L L F F D Y E G	NTYV QK F Q R E L
SP Q07071 GCIR_RAT	ALAE R V R E K	CNIQAL VHS T	VGGQLL P I P L	KLFP S L I S I T	WP L L F F D Y E G	NTYV QK F Q R E L
SP Q93444 GCIR_MOUSE	ALAE R V R E K	WNIQAL VHS T	VGGQLL P I P L	KLFP S L I S I T	WP L L F F D Y E G	S Y V Q K F Q R E L
SP Q92754 GCIR_XENLA	KLVAV R K E K	SNIQV ICH A T	AGQY L L P S L	KKT I P S I I G L T	WP L L F L D Y E G	G A Y I Q K F Q R E L
Beck u. Miller (Rat)	ALAE R V R E K	CNIQAL VHS T	VGGQLL P I P L	KLFP S L I S I T	WP L L F F D Y E G	NTYV QK F Q R E L
Reusch (Human)	TIVEQV KEK	NHIQAL AHS T	VGGQLL P I P L	KLFP S I I S I T	WP L L F F E Y E G	NFI QK F Q R E L
SP Q14971 GCIR_HUMAN	STK WVLNT V	TGAHV L L GKI	LQNHMLD LR I	ANS LFW RA	AMLQR FSG Q	S KARC IES LL R
SP Q07071 GCIR_RAT	STK WVLNT V	TGAHV L L GKI	LQNHMLD LR I	ANS LFW RA	AMLQR FSG Q	S KARC IES LL Q
SP Q93444 GCIR_MOUSE	STK WVLNT V	TGAHV L L GKI	LQNHMLD LR I	ANS LFW RA	AMLQR FSG Q	S KARC IES LL Q
SP Q92754 GCIR_XENLA	STK WILD T V	TSGAY TLRGKI	FRNF MVD FK I	NN S L FHR AT	SV LQR L T G Q	SHQRCTE V L L Q
Beck u. Miller (Rat)	STK WVLNT V	TGAHV L L GKI	LQNHMLD LR I	ANS K LFW RA	AMLQR FSG Q	S KARC IES LL Q
Reusch (Human)	STK WVLNT V	TGAHV L L GKI	LQNHMLD LR I	ANS KLFW RA	AMLQR FSG Q	S KARC IES LL R
SP Q14971 GCIR_HUMAN	AIHFP QP L S	DVIRAAP I S C H	VQVAHEKE QV	I P I A L L S L L	F R C S I T E A Q A	H L A A A P S V C E A
SP Q07071 GCIR_RAT	AIHFP QP L S	DVIRAAP I S C H	VQVAHEKE QV	I P T A L L S L L	F R C S I S E A K A R	L S A A S S V C E V
SP Q93444 GCIR_MOUSE	VHFP QP L S	NVIRAAP I S C H	VQVAHEKE QV	I P T A L L S L L	F R C S I T E A K E R	L A A A S S V C E V
SP Q92754 GCIR_XENLA	SIYG EQ T L S	EQIRNTT IAGH	VEAAAS QDKV	LPVA I V S L R	S C T I Q D S R S R	R I N S S L S I R S A
Beck u. Miller (Rat)	AIHFP QP L S	DVIRAAP I S C H	VQVAHEKE QV	I P T A L L S L L	F R C S I S E A K A R	L S A A S S V C E V
Reusch (Human)	AIHFP QP L S	DVIRAAP I S C H	VQVAHEKE QV	I P I A L L S L L	F R C S I T E A Q A	H L A A A P S V C E A
SP Q14971 GCIR_HUMAN	VRSALAGPG	QKRTAD PLE I L	E P - - D V Q	- - - - -	6 2 5	
SP Q07071 GCIR_RAT	VRSALS GPG	QKRSTQAL EDP	PACG T L N	- - - - -	6 2 7	
SP Q93444 GCIR_MOUSE	VRSALS GPG	QKRSIQAF G D P	VVP - - - - -	- - - - -	5 8 7	
SP Q92754 GCIR_XENLA	IESSMNVPG	QKRGAE D S E S R	- - - - -	- - - - -	6 1 9	
Beck u. Miller (Rat)	VRSALS GPG	QKRSTQAL EDP	PACG T L N S L E	H H H H H H	6 3 6	
Reusch (Human)	VRSALAGPG	QKRTAD PLE I L	E P - - D V Q L E	H H H H H H	6 3 3	

Einleitung

Abbildung 5 Alignment des UniProt Clustal Omega (McWilliam et al. 2013). Die ersten vier Zeilen nach Supplement von Choi et al. 2013; Zeile fünf und sechs nach FASTA-Daten von Beck und Miller 2013 und Pautsch et al. 2013 (zum Vergleich der Sequenzähnlichkeit und zur Einordnung der Datengrundlage für die dargestellten Funktionsbereiche). Gelb hinterlegter Abschnitt: GK-GKRP-Bindungsregion (hydrophobe Bindung); rot hinterlegter Abschnitt: GK-GKRP-Bindungsregion (Ionen-Paarbindung); dunkelgrün hinterlegter Abschnitt: Bindungsstelle F6P (nach Choi et al. 2013 und Beck und Miller 2013); hellgrün hinterlegter Abschnitt: Regulationsbereich für die Bindung von Fructosephosphaten (nach Beck und Miller 2013); orange hinterlegter Abschnitt: Bindungsstelle Fructosephosphat (am Komplex mit F1P nach Pautsch et al.)- hell: Bereich Phosphatinteraktion, dunkel: Bereich Fructoseinteraktion; rote Umrandung: Wasserstoffbrücken; rote Schrift: erweiterte Bindungsstelle der Fructose Phosphate (H-D Mapping); violett hinterlegter Abschnitt: Bindungsbereich Fructosephosphate via Dipol-Dipol-Wechselwirkung; blau hinterlegter Abschnitt: Lage Doppelmutation K450T/K451T (Reduktion der Bindungsaffinität zwischen GK und GKRP); doppelgestrichelte Box: Aminosäuren P446, H438, M344 und Q234.

1.5 Fragestellung

Das Enzym Glucokinase (GK), welches hauptsächlich in den Beta-Zellen des Pankreas und der Leber exprimiert wird, ist für die Glucose Homöostase im Organismus essenziell. In der Leber wird das Enzym neben genregulatorischen Effekten vor allem auf Proteinebene moduliert. Hier spielt das Glucokinase-Regulatorprotein (GKRP), welches die GK bei niedriger Glucosekonzentration hemmt und in den Zellkern importiert, eine wichtige Rolle. Mutationen des GKRP wurden bei Patienten nicht nur mit Veränderungen der Nüchtern-Blutglucose, sondern auch der Serum-Triglyceride assoziiert. Der zugrundeliegende Regulationsmechanismus ist bislang unzureichend verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es daher,

- (1) durch Expression von fluoreszierenden Fusionsproteinen die zelluläre Lokalisation der GKRP Mutationen H438Y, M344I, P446L und M344I-P446L im Vergleich zum WT-Protein in HeLa und Hepa 1-6 Zellen sowie in primären Hepatozyten der Maus zu beschreiben.
- (2) den Einfluss der GKRP Mutationen H438Y und P446L im Vergleich zum WT in Hepa 1-6 Zellen und in primären Hepatozyten der Maus auf die Lokalisation der GK durch Co-Expression von fluoreszierenden Fusionsproteinen zu charakterisieren.
- (3) die GK Interaktionsstärke der GKRP Mutationen H438Y, M344I und M344I-P446L im Vergleich zum WT in primären Hepatozyten der Maus durch Co-Expression von fluoreszierenden Fusionsproteinen zu bestimmen.
- (4) in Hepa 1-6 Zellen mit Co-Expression der GK und der GKRP Mutationen H438Y oder P446L im Vergleich zum WT die Glucoseaufnahme und den Triglyceridgehalt zu analysieren.
- (5) die durch die Aminosäureaustausche Histidin zu Tyrosin (438), Methionin zu Isoleucin (344) und Prolin zu Leucin (446) induzierten Strukturänderungen im GKRP Protein mithilfe der Software PyMOL zu simulieren.

Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturen

Bezeichnung	Art	Gewebeursprung	Hersteller
Zelllinie			
HeLa	Mensch	Zervixkarzinom	DSZM, Braunschweig, Deutschland
Hepa 1-6	C57L/J Mäuse	Hepatom	DSZM, Braunschweig, Deutschland
Primäre Zellen			
Hepatozyten	C57BL/6 Mäuse	Leber	

2.1.2. Kulturmedium

Medium	Komponente	Konzentration/Menge
HeLa Komplettmedium	DMEM mit Natriumpyruvat	
	L-Glutamin	2 mmol/l
	Glucose	25 mmol/l bzw.
	Niedrige Glucosekonzentration	5,5 mmol/l
	Hitze-inaktiviertes FCS	10 % (v/v)
	Streptomycin	10 µg/ml
	Penicillin	10 U/ml
Hepa 1-6 Komplettmedium	DMEM mit Natriumpyruvat	
	L-Glutamin	2 mmol/l
	Glucose	25 mmol/l bzw.
	Niedrige Glucosekonzentration	5,5 mmol/l
	Hitze-inaktiviertes FCS	10 % (v/v)
	Penicillin	10 U/ml
Komplettmedium für primäre Hepatozyten	Williams Medium E ohne Phenolrot	
	Glucose	10 mmol/l
	NaHCO ₃	2,2 g/l
	L-Glutamin	2,5 %
	Hitze-inaktiviertes FCS	5 % (v/v)
	Insulin	10 nmol/l
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	Dexamethason	0,01 %

2.1.3. Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenzien	Hersteller
jetPEI	Polyplus Transfection SA, Illkirch, Frankreich
PromoFectine Hepatocyte	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

2.1.4. Antikörper

Antikörper	Art	Hersteller
GKRP (sc-11416)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β-Actin		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

2.1.5. Testkits

Bezeichnung	Hersteller
Glucose Aufnahme (K686)	BioVision, Milpitas, CA, USA
Triglyceride (K622)	BioVision, Milpitas, CA, USA

2.1.6. Molekulargewichtsmarker

Marker	Hersteller
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad, München, Deutschland

2.1.7. Vektoren

Vektor	Hersteller
pECFP-C1	Clontech, Mountain View, CA, USA
pEYFP-N1	Clontech, Mountain View, CA, USA

2.1.8. Puffer

Lösung	Komponente	Konzentration/Menge
PBS (10x), pH 7,2	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
SDS-PAGE Trenngel 12,5 %	Acrylamid/Bisacrylamid	30 % / 0,8 %
	Tris/HCl pH 8,8/8,9	1 M
	SDS	10 %
	APS	10 %
	TEMED	9,9 mM
SDS-PAGE Sammelgel 5 %	Acrylamid/Bisacrylamid	30 % / 0,8 %
	Tris/HCl pH 6,8	1 M
	SDS	10 %
	APS	10 %

Material und Methoden

	TEMED	4,6 mM
SDS Laufpuffer	Tris Base	250 mM
	SDS	1 % (w/v)
	Glycerin	1,92 M
	TEMED	9,9 mM
5x SDS Probenpuffer	Tris/HCl pH 6,8	312,5 mM
	SDS	10 % (w/v)
	DTT	325 mM
	Bromphenolblau	0,04 g
	Glycerin	50 %
Anodenpuffer 1	Tris	300 mM
	Natriumazid	0,01 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer 2	Tris	250 mM
	Natriumazid	0,01 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Kathodenpuffer	SDS	0,01 % (w/v)
	Natriumazid	0,01 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Waschpuffer	PBS, pH 7,2	
	Tween 20	0,1 % (v/v)

2.1.9. Software und Datenbank

Bezeichnung	Entwickler
Software	
PyMOL 1.7.4	Schrödinger, LLC, New York, NY, USA
I-Tasser	Department of Computational Medicine and Bioinformatics, Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA
Prism 5.0	GraphPad Inc., San Diego, CA, USA
UniProt Clustal Omega	European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridge, United Kingdom
Datenbank	
RCSB PDB	Brookhaven National Laboratory, Upton, NY, USA

2.1.10. Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
505 dcxr Strahlteiler + Emissionsfilter	AHF Analystechnik, Tübingen, Deutschland
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Material und Methoden

CCD-Kamera	Olympus BioSystems, Planegg, Deutschland
cell ^R MT20 Illuminationssystem	Olympus BioSystems, Planegg, Deutschland
DV-CC Dual View Simultaneous Imaging System	Optical Insights, Tucson, AZ, USA
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mikroskopisch	Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
Multilabel Plate Reader VICTOR X3	PerkinElmer, Waltham, USA
Odyssey Infrared Imager	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
Olympus CK2	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
Olympus/cell ^R IX81 mit Zellinkubator	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
Pipetten (1-1000 µl)	Gilson International, Limburg, Deutschland
SDS-PAGE Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spannungsgerät Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spektralphotometer Ultrospec 2100	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Trans-Blot Semi-Dry, Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
UPlanSApo 60 x 1,35 – Ölimmersionsobjektiv	Olympus Optical, Tokio, Japan
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Mikro 20	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Material	Hersteller
6-well Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Einwegpipetten, steril	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
ELISA-Microtiter Plate	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen (kollagenbeschichtete MatTek-Dishes)	MatTek Corporation, Ashland, MA, USA
PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach am Taunus
Rotilabo Blotting Paper	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
X-well-Zellkultur Kammer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer „Bürker“	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugen Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.11. Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ratiphorese Gel 30	
Albumin - BSA	PAA, Cölbe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dexamethason	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	PAA, Cölbe, Deutschland
Ethanol, >99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum - FCS	PAA, Cölbe, Deutschland
Glucose	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Insulin (human)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Roti Block	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Quant (Bradford-Reagenz)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Tetramethylethyldiamin – TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, Nuklease frei	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Williams Medium E	Biochrom, Berlin, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Zelllinien

2.2.1.1. HeLa Zellen

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, welche effizient Glucose aufnehmen kann. Sie verfügt über keine endogene Expression an GK und GKRP und ist als Zellmodell für die Untersuchung der GK-GKRP-Interaktion etabliert (Rees et al. 2012a; Shiota et al. 1999).

2.2.1.2. Hepa 1-6

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein Subklon welcher aus dem BW7756 Hepatom der C57BL/6 Maus gewonnen wurde. Dieser insulinsensitive Subklon verfügt im Vergleich zu primären Hepatozyten über einen verminderten Stoffwechsel, welcher mit einer niedrigeren Expression der GK und des GKRP einhergeht (Darlington 1987; Darlington et al. 1980).

2.2.1.3. Primäre Hepatozyten

Die primären Hepatozyten wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und zeigen daher eine physiologische Expression an Leberfunktionsproteinen. Die Mäuse wurden in dem Core Facility - Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock gezüchtet und gehalten, sowie alle Experimente entsprechend dem Deutschen Tierschutzgesetz von 2006 (in der Version von 2010) durchgeführt.

2.1.1.4. Zellkultur

Unter sterilen Kautelen wurden die Hepa 1-6 Zellen, als auch die HeLa Zellen in 250 ml Kulturflaschen kultiviert. Dabei wurden durch einen Begasungsbrutschrank atmosphärische Bedingungen von 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% und einem CO₂-Anteil von 5% kontinuierlich gehalten. Als Kulturmedium diente vorgewärmtes DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) unter Zusatz von 25 mmol/l Glucose, 10% (v/v) FCS (Fetales Kälberserum), 10 µg/ml Streptomycin, 10 I.U./ml Penicillin sowie 2 mmol/l Glutamin. Nach 3-4 Tagen Inkubation hatte die Kultur eine Flächenzelldichte von ca. 80% erreicht, sodass eine Passagierung in einer sterilen Werkbank durchgeführt wurde. Dabei wurde das überschüssige Kulturmedium abgesaugt und die Zellkultur mit 2 ml Trypsin/EDTA gewaschen und der Überstand wieder entfernt. Anschließend wurde der Kulturflasche 1 ml Trypsin/EDTA hinzugefügt und die Zellen im Begasungsschrank für 3 min bebrütet. Dadurch, sowie durch

leichtes Klopfen wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst und in 7 ml DMEM resuspendiert. Darauf wurde die Lösung in Tubes für 5 min, bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abermals entfernt. Nach wiederholtem Zusatz des Nährmediums wurden die Zellen entsprechend ihrer Konzentration geteilt und erneut wie oben beschrieben kultiviert. Für die Analysen der Zellfunktionen wurden die Zellen in 6-well Zellkulturplatten oder in Kollagen beschichteten 35 mm MatTek-Dishes inkubiert.

2.2.1.5. Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätstestung

Die, wie oben beschrieben, in DMEM-Medium resuspendierten Zellen wurden mit Trypanblaulösung (zur Ermittlung der nicht vitalen Zellen) in einem Verhältnis 1:2 versetzt und darauf 10 µl der Suspension an den mit einem Deckgläschen versehenen Rand einer „Bürker“-Zählkammer (Abbildung 6) pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Zählung der vitalen Zellen. Dies erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \bar{n} \times Vf \times 10^4$$

Dabei steht Vf für den Verdünnungsfaktor, \bar{n} für die gemittelte Zellzahl in 25 Untereinheiten und der Faktor 10 leitet sich aus der Kammerkonstante (Schichtdicke von 0,1 mm) ab.

Die 25 Untereinheiten ergeben sich aus der Ortsauflösung der „Bürker“-Zählkammer. Diese ist in neun Quadrate mit einer Kantenlänge von je 1 mm unterteilt. Weiter lässt sich jedes Quadrat in 16 Untereinheiten teilen, mit Kantenlängen von 0,2 mm. Daraus ergibt sich für jede Untereinheit eine Fläche von 0,04 mm² und somit für 25 Untereinheiten eine Fläche von 1 mm².

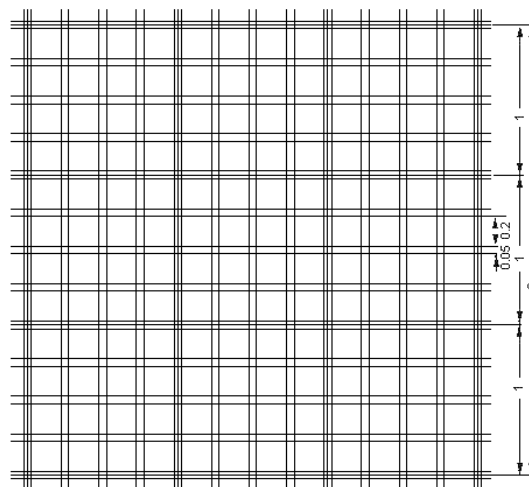


Abbildung 6 Maße der Zählkammer in mm (Zählkammer "Bürker"- <http://laboroptik.de/deutsch/info/buerker.gif>).

2.2.2. Transfektion

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA vektorgesteuert in eukaryote Zellen verbracht.

Zu diesem Zweck wurden Hepa 1-6 bzw. HeLa-Zellen mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ in oben beschriebenen Wells oder Dishes ausgesät und 24 h lang, bei Zusatz von 2 ml DMEM Kulturmedium, inkubiert. Vor der Transfektion wurde das suffiziente Zellwachstum lichtmikroskopisch überprüft und das Kulturmedium erneut gewechselt.

2.2.2.1. Transiente Transfektion von EYFP-GKRP und ECFP-GK Plasmiden

Zur Untersuchung der Genprodukte von *GCK* und *GCKR* wurde die Transfektion an den permanenten Zelllinien Hepa 1-6 und HeLa mit jetPEI[®] durchgeführt. Dabei erlaubt das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) die negative Ladung der DNA-Plasmide zu binden und dadurch einen Komplex mit den Nucleinsäuren zu bilden (Brissault et al. 2003). Dieser Komplex ermöglicht die elektrostatische Interaktion mit den Proteoglycanen der Zellmembran, sodass sich die DNA-PEI Partikel an die Zelle anlagern und endozytotisch aufgenommen werden. Dabei fungiert PEI als Puffer und schützt die DNA vor der Denaturierung. Ein Protonen-Influx sorgt für das osmotische Schwellen des Endosoms und führt so zur Freisetzung der Plasmide in das Zytoplasma der Zielzellen (Boussif et al. 1995; Mislick und Baldeschwieler 1996; Jin et al. 2014).

Entsprechend der Herstellerinformationen wurden pro Transfektion zu 2 µl jetPEI[®]-Reagenz bzw. 1 µg DNA (bei Doppeltransfektion 0,5 µg ECFP-GK und 0,5 µg EYFP-GKRP der entsprechenden Mutante), 150 mM NaCl bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl gegeben und anschließend gevortext. Darauf wurde die jetPEI[®] Lösung zur Plasmid-Lösung gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Lösung	Volumen/Menge
DNA der Plasmide	1 µg bzw. 2 · 0,5 µg
jetPEI [®]	2 µl
150 mM NaCl	97 µl

Anschließend wurden 100 µl der jetPEI[®]/DNA-Lösung zu den mit 1 ml Nährmedium präparierten Zellen gegeben und die Kultur für 24 h inkubiert.

Zur Bestimmung der K/P-Ratio bei unterschiedlicher Stoffwechsellage wurde 2 h vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung das Kulturmedium erneut entfernt und durch 2 ml DMEM-Lösung mit hoher (25 mmol/l) bzw. niedriger (5,5 mmol/l) Glucosekonzentration ersetzt.

2.2.3. Vektoren

Für die Versuche wurden die rekombinanten Plasmide vom Kooperationspartner am Oxford Center for Diabetes in Oxford, UK synthetisiert und kloniert. Die Verifizierung der Plasmide fand sowohl in Oxford als auch in Rostock statt. Bei der Erstellung der rekombinanten Plasmide kamen pECFP-C1- und pEYFP-N1-Vektoren der Firma Clontech zu Einsatz. Dabei wurde die cDNA des *GCK* amplifiziert und in den pECFP-C1-Vektor (SmaI und BamHI Restriktionsschnittstellen) subkloniert, gleiches fand für das *GCKR*-Gen mit dem pEYFP-N1-Vektor (Eco47III und EcoRI Restriktionsschnittstellen) statt (Rees et al. 2012a; Baltrusch et al. 2005). Zur Analyse der zuvor am Patienten isolierten GGRP-Mutationen, wurden diese via ortsgerichteter PCR Mutagenese in den pEYFP-N1-Vektor, wie von Rees et al. 2014 beschrieben, installiert (Mutationssequenz siehe Supplement von Rees et al. 2012b). Die Trennung des Fluoreszenzproteins und der Funktionsproteine wird durch einen Spacer ermöglicht.

Zur Bestätigung der erfolgreichen Synthetisierung wurde eine Sequenzierung von zwei unabhängigen Proben durchgeführt.

2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Kern/Plasma Lokalisation der GK und des GGRP wurden die fluoreszierenden Eigenschaften des EYFP und ECFP genutzt. Die Analyse erfolgte dabei mit dem Inversmikroskop IX81 der Firma Olympus, in Ausstattung mit einem UPlanSApo 60 x 1,35 – Ölimmersionsobjektiv, sowie einem YFP/CFP Dual-Band Strahlenteiler und Emitter (AHF Analysetechnik). Um möglichst physiologische Stoffwechselbedingungen zu erreichen, wurden die Zellkulturen während der Versuche in einem Zellinkubator bei 37°C, 60% Luftfeuchte und bei 5% CO₂-Anteil der Umgebungsluft gelagert. Zur Ortsfixierung der Zellen bei der Fluoreszenzanalyse kamen ein Märzhäuser Motortisch und kollagenbeschichtete Dishes zur Anwendung (Baltrusch et al. 2005). Um Interferenzen mit der Umgebungsbeleuchtung möglichst gering zu halten, wurde das Mikroskop abgedunkelt.

2.2.4.1. Bildgewinnung

Zur Anregung der Fluoreszenzproteine EYFP und ECFP wurde Licht vom cell^R MT20 Illuminationssystem (Olympus) erzeugt und die Beleuchtungsintensität dementsprechend angepasst, sodass ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzproteine verhindert werden konnte. Um eine spezifische Wellenlänge zu selektieren, kamen HQ500/20 (EYFP) und

D436/10 (ECFP) Bandpassfilter (AHF Analystechnik) zur Anwendung. Zur Bildgewinnung kamen die Emissionsfilter HQ535/30 (EYFP) und D465/30 (ECFP), sowie eine charge-coupled device camera (CCD-Kamera), mit einer Ortsauflösung von $6,45 \cdot 6,45 \mu\text{m}$ per Pixel, der Firma Olympus BioSystems zum Einsatz.

Die Funktion der einzelnen Komponenten wurde mittels der cell^R Hardware und xcellence rt Software (Olympus) gesteuert (Baltrusch et al. 2005).

2.2.4.2. Fluoreszenzproteine EYFP und ECFP

In der Fluoreszenzmikroskopie haben sich das yellow fluorescent protein (YFP) und das cyan fluorescent protein (CFP) bewährt. Beide leiten sich als Mutante aus dem green fluorescent protein (GFP) der Quallenart *Aequorea victoria* ab (Nagai et al. 2002). Das Extinktionsmaximum (*Abbildung 7*) von EYFP liegt bei einer Wellenlänge von 514 nm und das Emissionsmaximum bei 527 nm (Meulenaere et al. 2013). Für ECFP gelten Werte von 435 nm und 474 nm (Lelimosin et al. 2009). Die unterschiedlichen Extinktions- und Emissionsspektren ermöglichen außerhalb der FRET-Analyse eine separate Betrachtung von GK und GKRP.

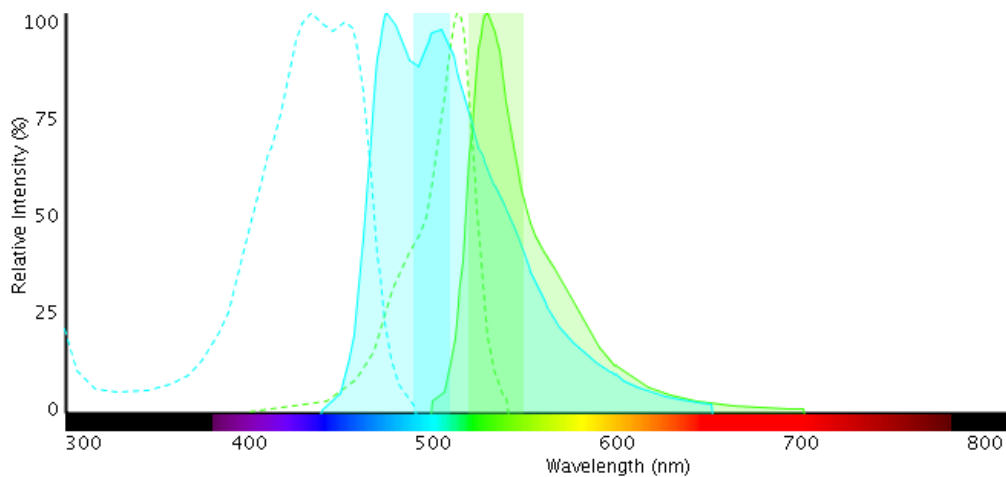


Abbildung 7 Extinktions- (gestrichelt) und Emissionsspektren (flächig) von ECFP (cyan) und EYFP (grün). Der linke Vertikalbalken stellt Anregungsfilter bei 500 nm (Bandbreite 20 nm) und der rechte Vertikalbalken Detektionsfilter bei 535 nm (Bandbreite 30 nm) Wellenlänge dar (Thermo Fisher Scientific).

2.2.4.3. FRET

Für den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer wurden HC436/24-458BS-HC483/32 und HQ500/24-520BS-D542/27 Einzel-Band Filter genutzt (AHF Analystechnik). Die

Emissionen wurden gleichzeitig mit einem DV-CC Dual View Simultaneous Imaging System (Optical Insights) detektiert. Dabei wurden ein 505 dcmr Strahlteiler, sowie D472/30 und HQ542/27 Emissionsfilter genutzt (AHF Analysetechnik). Die FRET-Effizienz wurde mittels der Emissionen von ECFP bei einer Anregungswellenlänge von 436 nm und für EYFP von 436 nm und 500 nm ermittelt (Rees et al. 2012a).

2.2.4.4. Bildauswertung

Die Experimentdurchführung und Bildauswertung wurde mittels der Software xcellence rt gesteuert. Bei der Analyse der mit EYFP und ECFP cotransfizierten Zelllinien wurde aus den Einzelaufnahmen durch das Programm ein Fusionsbild erstellt.

Die Auswertung der Fluoreszenzintensität im Nucleus und Zytoplasma fand manuell statt. Hierbei wurde die Probe nach effizient transfizierten Zellen gerastert und der entsprechende Grauwert einer vergleichbaren ROI im Zellkern, Zytoplasma und im Hintergrund ermittelt. Da der Grauwert in Relation zur relativen Menge an Fluoreszenzprotein steht, konnte nach Korrektur um den Hintergrundwert, eine K/P-Ratio – also das Verhältnis der Konzentrationen der Fusionsproteine im Nucleus und Zytoplasma – ermittelt werden.

2.2.4.5. GK Aktivator Compound A

Um den Einfluss von Compound A (CpdA) auf die Kern-Plasma-Relation der Glucokinase genauer zu untersuchen, wurden 10-20 Zellen selektiert und deren Position mittels xcellence rt bestimmt. Nach Zufügen von CpdA in einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ und 45 min Inkubationszeit wurden die Positionen der entsprechenden Zellen erneut eingestellt. Dadurch konnten ein weiteres Mal Aufnahmen mit gleicher Beleuchtungsintensität erstellt werden.

2.2.5. Proteinanalyse

2.2.5.1. Proteinpräparation

Zur Analyse der Proteineigenschaften des GKRP wurden Hepa 1-6 Zellen in 6-well Kulturplatten kultiviert. Bei einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen wurde eine Einfach- bzw. Doppeltransfektion, wie in 2.2.2. beschrieben, durchgeführt und die Zellen für 48 h im Kulturmedium inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturplatten mit PBS gewaschen und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS gelöst, in ein 1,5 ml PCR-Gefäß überführt und bei 1.200 rpm 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen unter der Zugabe von 5 μl RIPA-Lysepuffer 30 min auf Eis inkubiert. Die anschließende 10-minütige

Zentrifugation bei 10000 rpm diente zur Abtrennung des Überstandes. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2. Konzentrationsbestimmung der Proteine

Um die Konzentration der unterschiedlichen Varianten des GGRP zu analysieren, wurde der Bradford-Test angewandt. Mit dieser photometrischen Methode lassen sich Proteine einer Lösung unter Ausnutzung unterschiedlicher Absorptionsspektren quantifizieren (Bradford 1976). Dabei bindet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) in saurer Lösung die kationischen und unpolaren Aminosäurereste von Proteinen. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf eine Wellenlänge von 595 nm, da CBBG als Sulfonat unprotoniert und anionisch vorliegt. Dagegen absorbiert der nicht komplexierte, kationische Farbstoff bei 470 nm (Compton und Jones 1985). Zur Standardisierung der Messwerte wurde eine Eichkurve mit BSA (1-30 µg) erstellt und der Lysepuffer als Leerwert genutzt. Zur Analyse wurden 1-2 µl der entsprechenden Proteinpräparation 799 µl Aqua dest. und 200 µl Bradford-Reagenz zugefügt. Nach kurzem Schwenken und 5 min Inkubationszeit wurde die Lösung in Einmalküvetten übertragen und in das Photospektrometer überführt. Die Konzentration der Proteine errechnet sich dabei wie folgt (Ab_{595} bezeichnet die Absorption bei 595 nm):

$$\text{Proteinkonzentration} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Protein } Ab_{595} + 0,0652}{0,0898}$$

2.2.5.3. SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse kam die vertikale und diskontinuierliche SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) zur Anwendung.

Dabei wird die Eigenladung der denaturierten Proteine (s.u.) mittels dem anionischen Tensid SDS überdeckt. Es entstehen gestreckte Komplexe aus Protein und SDS bei welchen ein konstantes Verhältnis aus Ladung und Molekülgröße besteht, sodass im elektrischen Feld nur eine Trennung der Proteine nach Größe, nicht aber nach Eigenladung erfolgt. In der diskontinuierlichen SDS-Page erfolgt die Trennung mittels zweier unterschiedlicher Gele, dem Trenn- und Sammelgel. Für die Auftrennung ist dabei neben dem pH-Wert die Porengröße des Polyacrylamid entscheidend.

Zur Anwendung kamen Bio-Rad mini Gel-Systeme. Die Polymerisation erfolgt hierbei mit Hilfe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED). Dabei ist Ammoniumperoxodisulfat entscheidend für die Vernetzung des Polymers. Die Porengröße folgt der Gesamtkonzentration an Acrylamiden. Nach dem Gießen des Gels zwischen zwei Glasplatten und Überführen in die Elektrophoresekammer wurde diese mit einem SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden in die zuvor vorbereiteten Slots je 5 µl Proteinprobe gegeben. Zuvor musste dafür 40 µl Protein und 5 µl Laufpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert werden. Als Referenzmarker wurde Precision Plus Protein All Blue Standard ebenfalls von Bio-Rad genutzt.

2.2.5.3.1. Proteinpräparation für die SDS-PAGE

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE erfolgte die Denaturierung der zu analysierenden Proteine zur Auflösung der Quartär- und Tertiärstruktur.

Nach der Zugabe von 400 µl 2-Mercaptoethanol (Spaltung durch Reduktion der Disulfidbrücken in den zu analysierenden Proteinen) zu der zu analysierenden Probe (100 µl) erfolgte die Vermischung mittels Vortexer und anschließend die Zentrifugierung (14.000 rpm für 30 s). Im Anschluss wurde dieser Vorgang nach Zugabe von 100 µl Chloroform (Lösung der Wasserstoffbrücken und Interaktion mit den hydrophoben Proteinstrukturen) wiederholt. In weiterer Folge wurde nach Dilution mit 300 µl Aqua dest. und erneuter Zentrifugierung der Überstand verworfen (10.000 rpm für 1 min). Anschließend erfolgte die erneute Lösung in 2-Mercaptoethanol (300 µl) und die Zentrifugierung bei 10.000 rpm für 2 min. Nach erneuter Entfernung des Überstandes wurden das Pellet in SDS-Probenpuffer (s.o.) gelöst.

2.2.5.4. Western Blot

Das Western Blot ist ein weit verbreitetes Verfahren zur weiteren Proteinanalyse. Dabei werden die in der SDS-Page getrennten Proteine auf eine Trägerfolie bzw. Trägermembran geblottet (übertragen) (Yang und Mahmood 2012) (*Abbildung 8*).

Zur Anwendung kam ein diskontinuierliches Semi-Dry Verfahren. Dabei wurde mittels einem zur Laufrichtung der Proteine im SDS-Gel vertikal angelegten, elektrischen Feld (16 V und 140 mA) eine Migration der Probe auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) erwirkt und diese dort fixiert. Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der transferierten Proteine wiederzuerlangen, muss das SDS aus der Bindung an den Proteinen gelöst werden. Dafür wird

mittels PBS die PVDF-Membran für 5 min gewaschen und im Anschluss in Odyssey Blocking Puffer (verdünnt in PBS 1:3) für 1 h inkubiert. In weiterer Folge der Aufbereitung werden zudem die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine blockiert und die Bindung der primären Antikörper verbessert.

Die in Odyssey Blocking Puffer (verdünnt in PBS 1:3 [v/v]) und 0,1% Tween-20 gelösten primären Antikörper gegen GGRP und β -Actin wurden im Anschluss über Nacht der PVDF-Membran zugeführt und unter konstanter Bewegung inkubiert. Die weitere Aufbereitung der Membran erfolgte dann in vier Runden bei Raumtemperatur für jeweils 5 Minuten mittels in PBS gelösten 0,1% Tween-20.

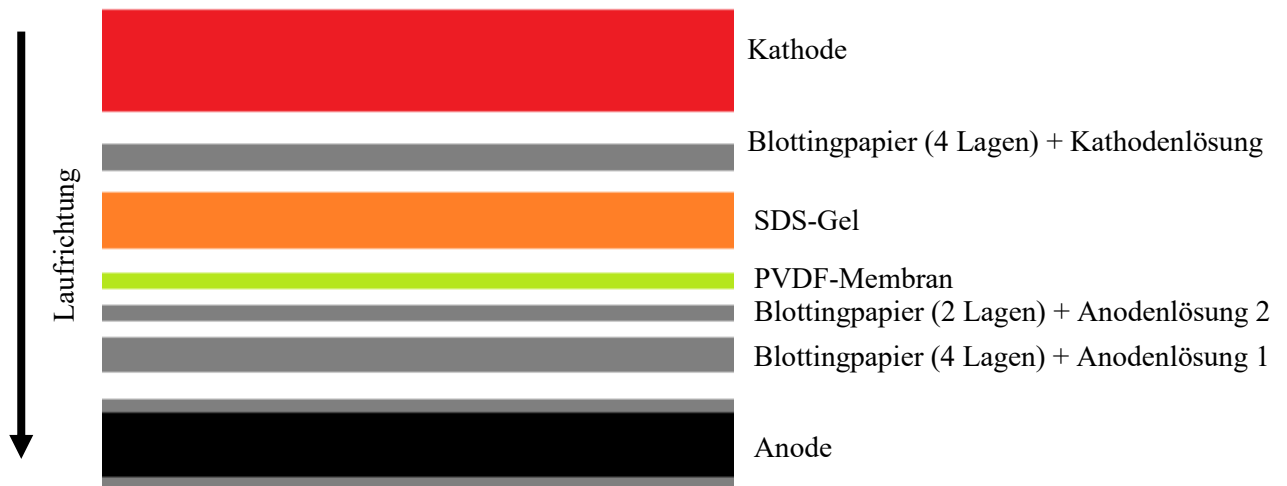


Abbildung 8 Schematischer Aufbau einer Western-Blot Kammer.

Zur optischen Detektion der primären Antikörper wurden diese in einem zweiten Schritt mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern besetzt. Dafür wurden letztere in Odyssey Blocking Puffer (Verdünnung mit PBS 7:10 [v/v]) und 0,1% Tween-20 gelöst und die präparierte PVDF-Membran darin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Weiterhin erfolgt erneut eine Aufbereitung wie oben beschrieben mit 0,1% PBS und 0,1% Tween-20 und zum Abschluss die Entfernung von Tween-20 mit PBS. Das Fluoreszenzsignal der sekundären Antikörper wurde mittels Odyssey Infrared Imaging System der Firma LI-COR erfasst.

2.2.6. Stoffwechselanalyse

Um die Variationen im Stoffwechsel der einzelnen Mutanten zu analysieren, erfolgte eine kolorimetrische Bestimmung der Konzentration von Glucose und Triglyceriden in den humanen GGRP Varianten hP446L und hH438Y im Vergleich zum Wildtyp.

Dafür wurden, wie unter 2.2.2. beschrieben, Hepa 1-6 Zellen auf einer 6-Well Platte mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ ausgesät und mit den Vektoren EYFP-hGKRP-H438Y, EYFP-hGKRP-P446L und EYFP-hGKRP-WT, sowie ECFP-GK cotransfiziert. Als Vergleich dienten Zellen mit einer Singletransfektion mit ECFP-GK. Inkubiert wurden die Zellen jeweils in einem Kulturmedium mit einer Konzentration von Glucose von 5,5 mmol/l bzw. 25 mmol/l. Die Versuche wurden in vier bis fünf separaten Ansätzen wiederholt.

2.2.6.1. Kolorimetrische Analyse der Glucosekonzentration

Mittels des Glucose Colorimetric Assay Kit II von BioVision (Milpitas, CA, USA) erfolgte die Analyse der Glucosekonzentration in den präparierten Hepa 1-6 Zellen. Das Assay bewirkt über die Oxidation der Glucose eine Interaktion mit einem Farbstoff. Das Produkt erzeugt dann bei einer Wellenlänge von 450 nm ein messbares Signal. Die Intensität des erzeugten Signals ist direkt proportional zur der zu ermittelnden Glucosekonzentration; dabei hat das Kit eine Sensitivität im Bereich zwischen 20 $\mu\text{mol/l}$ und 10 mmol/l.

2.2.6.1.1. Zellpräparation und Kalibrierung

Zur Zuordnung einer relativen Signalintensität zu einer Glucosekonzentration ist die Erstellung einer Standardkurve mit fixen Konzentrationen notwendig. Dafür wurden zu 990 μl Glucose Assay Puffer 10 μmol einer mit 100 mmol/l konzentrierten Glucosestandardlösung gegeben. Die entstehende Lösung wurde mit aufsteigendem Volumen auf eine 96-Well-Platte übertragen (0, 2, 4, 6, 8 oder 10 μl) und erneut auf ein Volumen von 50 μl verdünnt. Folglich entstand ein Konzentrationsstandard von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 nmol/Well.

Zur Vorbereitung der Zellkulturen wurden 1000 μl des DMEM-Kulturmediums der transfizierten Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Analysat (Mediumprobe) wurde anschließend im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und dann 1 μl der entstehenden Probe mit 49 μl in Glucose Assay Puffer in einer 96-Well-Platte gelöst. Zur Aktivierung der Reaktion wurde zur Medium- und Standardprobe 46 μl Glucose Assay Puffer und 4 μl Glucose Reaktion Mix (bestehend aus 2 μl Glucose Enzym-Mix und 2 μl Substrat-Mix) gegeben. Die Inkubation erfolgte unter Lichtschutz für 30 min bei Raumtemperatur.

2.2.6.1.2. Messung

Mittels Mikroplattenleser (VICTOR X3, PerkinElmer, Waltham, USA) erfolgte die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm. Unter Berücksichtigung einer Anpassung an einen Hintergrundeffekt (mittels Nullprobe der Standardkurve) erfolgte die Konzentrationsmessung mit Hilfe der Standardkurve für den Glucosegehalt. Die Konzentration (C) der Probe wurde berechnet als $C = S_a / S_v$, wobei S_a der über die Standardkurve (Abbildung 9) ermittelte Glucosegehalt (in nmol) ist und S_v das Probenvolumen (in μl). Der ermittelte Wert wurde abschließend noch auf den für den gleichen Ansatz bestimmten Proteingehalt ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) der Zellen (vgl. Kapitel 2.2.5.2.) korreliert und der Glucoseverbrauch in $\text{nmol}/\mu\text{g}$ Protein angegeben.

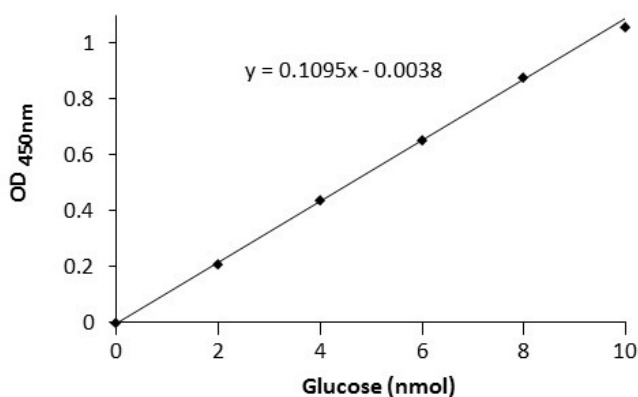


Abbildung 9 Standardkurve zur Ermittlung der Glucosekonzentration entsprechend des Kit-Protokolls (Glucose Colorimetric Assay Kit II, BioVision, Milpitas, CA, USA), <https://www.biovision.com/glucose-colorimetric-assay-kit-ii.html>.

2.2.6.2. Kolorimetrische Bestimmung des Triglyceridgehalts

Um eine Auswertung des Gehalts an Triglyceriden in entsprechend transfizierten Hepa 1-6 Zellen zur ermöglichen, kam analog zu den oben beschriebenen Verfahren das Triglycerid Quantification Colorimetric Kit der Firma BioVison (Milpitas, CA, USA) zur Anwendung. Dabei werden in dem Versuchsansatz die Triglyceride in Glycerol und freie Fettsäuren aufgespalten. Anschließend wird das Glycerol oxidiert und das Produkt reagiert mit einem Farbstoff. Letztlich findet dann bei einer Wellenlänge von 570 nm eine kolorimetrische Analyse via Mikroplattenleser (VICTOR X3, PerkinElmer, Waltham, USA) statt. Das System kann Triglyceride (ebenso wie Mono- und Diglyceride) in eine Konzentration von 2 pmol bis 10 nmol nachweisen.

2.2.6.2.1. Zellpräparation und Kalibrierung

Nach dem Waschen mit 1 ml einer 5 %igen NP-40 Lösung wurden die bereits für die Glucosekonzentrationsanalyse transfizierten Zellen aus den Kultur-Well-Platten gelöst und mittels QIAGEN Shredder System (QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande) homogenisiert. Dabei wurden die Proben in den Shredder überführt und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, anschließend dann mittels Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 5 min auf 90 °C erhitzt. Ein Teil dieses Homogenats diente dabei zur Proteinkonzentrationsbestimmung. Nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur wurde der Vorgang des Erhitzens wiederholt und anschließend das Analysat für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde die Probe mit aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

25 µl der vorbereiteten Probe wurden daraufhin auf eine 96-Well-Platte überführt und mittels Triglycerid Assay Puffer auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. Die Konversion der Triglyceride zu freien Fettsäuren und Glycerol wurde durch die Zugabe von 2 µl Lipase (Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur) erzielt. Sowohl zu den Proben als auch zum Standard wurden anschließend 50 µl Reaction Mix (46 µl Triglycerid Assay Puffer, 2 µl Triglycerid Enzyme Mix und 2 µl Triglycerid Probe) hinzugegeben und für 60 min unter Lichtabschluss bei Zimmertemperatur inkubiert.

Zur Erstellung eines 0,2 mM Triglycerid-Standards wurden 40 µl einer 1 mM Triglycerid-Lösung mit 160 µl Triglycerid Assay Puffer verdünnt und anschließend im aufsteigenden Volumen (0, 10, 20, 30, 40 und 50 µl) auf die Well-Platte verteilt. Im Anschluss wurde der Triglyceridstandard mit Triglycerid Assay Puffer auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt, sodass eine Konzentrationsreihe von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 nmol/Well entstand.

2.2.6.2.2. Messung

Nach einer Hintergrundkorrektur wurde die kolorimetrische Absorption mittels Mikroplattenleser (VICTOR X3, PerkinElmer, Waltham, USA) bei 570 nm erfasst. Zur Korrektur des Hintergrundrauschens wurde zudem das Signal eines Hintergrundstandards (hier wurde die Lipase durch Triglycerid Assay Puffer ersetzt) subtrahiert. Zur Bestimmung des Triglyceridgehalts erfolgte die Kalkulation mittels Standardkurve (*Abbildung 10*).

Die Triglyceridkonzentration (C) der Probe in nmol/µl ergibt sich entsprechend aus der Gleichung: $B/V \times D$. Wobei B dem Triglyceridgehalt entsprechend der Standardkurve, V dem

Probenvolumen je Well und D dem Verdünnungsfaktor der Probe entspricht. Das Ergebnis wurde anschließend in das Verhältnis zur Proteinmenge der Probe gesetzt.

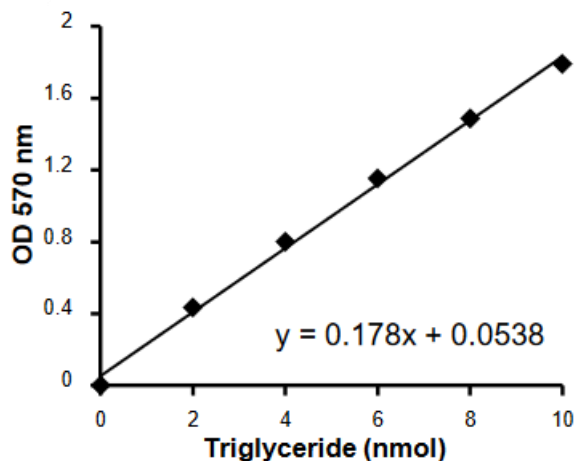


Abbildung 10 Standardkurve zur Ermittlung der Triglyceridkonzentration entsprechend des Kit-Protokolls (Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit, BioVision, Milpitas, CA, USA), <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K622.pdf>

2.2.7. Auswertung, Statistik, Visualisierung

Die erfassten Daten aller unabhängig durchgeführten Versuche wurden als Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler des Mittelwerts ausgegeben. Als statistisch relevant wurde dabei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % gewertet (p-Wert < 0,05).

Die statistische Analyse erfolgte via GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Inc, San Diego, CA, USA). Dabei kam für multiple Analysen von unabhängigen Variablen die einfaktorielle ANOVA (analysis of variance) mit Bonferroni-Korrektur oder der Student's t-test zur Anwendung. Die graphische Darstellung der Strukturmodelle erfolgte mittels PyMOL (Schrödinger, LLC, New York, NY, USA) Version 1.7.4. Zur Analyse der Proteinstabilität kam die webbasierte Lösung I-TASSER (Department of Computational Medicine and Bioinformatics, Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA) der Universität von Michigan zum Einsatz. Mittels der ebenfalls webbasierten Anwendung UniProt Clustal Omega (European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridge, United Kingdom) erfolgte ein Sequenz Alignment der unterschiedlichen Spezies.

Ergebnisse

Ziel dieser Studie war es, die Veränderung der zellulären Funktion der GGRP-Varianten hP446L, hH438Y und hM344I mit Hilfe fluoreszenzoptischer Methoden, sowie Stoffwechsellassays vergleichend zum Wildtyp zu analysieren. Dabei lag der Fokus der Arbeit auf der Darstellung der Kern/Plasma-Ratio der Fluoreszenzfusionsproteine EYFP-GGRP in verschiedenen Zellmodellen nach transients Transfektion des *GCKR* Fusionsplasmids – sowohl als Single-Transfektion, als auch in Anwesenheit von ECFP-GK.

3.1. Zellmodelle

Um die Funktion der transfizierten GGRP-Varianten in verschiedenen zellphysiologischen Zuständen zu analysieren, kamen mehrere Zelltypen als Modell zum Einsatz.

HeLa Zellen (*Abbildung 11*) sind als etabliertes Modell zur Analyse der GGRP-Kern/Plasma-Relation beschrieben. Sie besitzen die Eigenschaft bei einer guten Glucoseaufnahmekapazität endogen GGRP und GK nicht zu exprimieren (Rees et al. 2012a; Shiota et al. 1999).

Epitheliale, immortale Hepa 1-6 Zellen (*Abbildung 11*) sind eine Zelllinie, welche dem BW7756 Hepatom männlicher C57L/J Mäuse entstammt und sich im Vergleich zu Maushepatozyten, neben einer allgemein niedrigeren Aktivität leberspezifischer Enzyme, durch eine geringe Expression von GGRP und GK auszeichnen (Darlington 1987; Darlington et al. 1980).

Die primären Hepatozyten (*Abbildung 11*) entstammen von C57BL/6 Mäusen, spiegeln am deutlichsten die physiologischen Bedingungen im lebenden Organismus wieder und haben daher auch eine relevante Expression von Wildtyp GK und GGRP, was unter anderem im Vergleich mit HeLa und Hepa 1-6 Zellen zu einer geringeren Wirkstärke der beobachteten Mutationen führt.

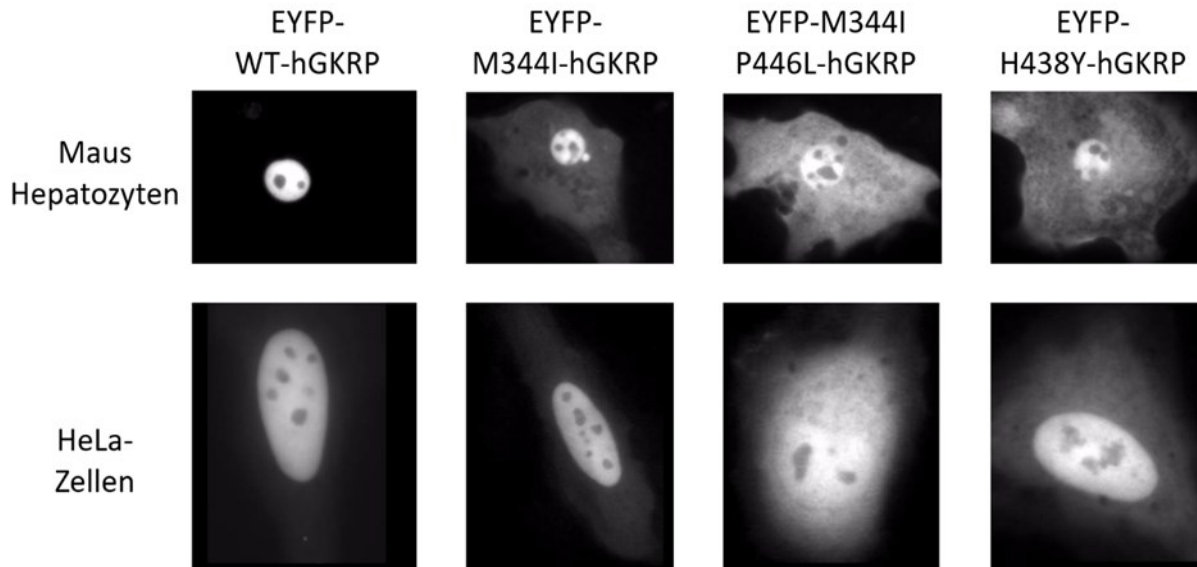


Abbildung 11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen und primären Maus Hepatozyten mit Expression EYFP-GKRP und dessen unterschiedliche Lokalisation zwischen Zellkern und Zytoplasma.

3.2. Lokalisation des GKRP Fluoreszenzproteins in HeLa Zellen

Als Zellmodell welches endogen weder GK noch GKRP exprimiert eignen sich HeLa Zellen zur unbeeinflussten Analyse der GKRP-Funktion, mittels Analyse der Kern/Plasma-Ratio (K/P-Ratio) von mutierten humanen EYFP-GKRP im Vergleich zum EYFP-WT-GKRP. Wie in den folgenden Modellen wurden hohe (25 mmol/l) und niedrige (5,5 mmol/l) Glucose-Spiegel eingestellt.

Bei der Auswertung zeigte sich für alle drei Mutanten eine erheblich verringerte nukleäre Lokalisation des EYFP-GKRP im Vergleich zum WT (*Abbildung 12*); wobei zusätzlich die Abhängigkeit von der Glucosekonzentration aufgehoben war (so lässt sich auch für M344I bei 25 mmol/l Glucose keine Signifikanz ermitteln). Dementsprechend zeigte die Doppelmutation M344I-P446L eine nur minimale Anreicherung im Zellkern (K/P-Ratio bei 5,5 mmol/l Glucose: M344I-P446L $1,3 \pm 0,05$ versus WT $5,5 \pm 0,5$). Weiter ließ sich bei hohen Glucosespiegeln die physiologische Verschiebung des Wildtyp-GKRP in das Zytoplasma zeigen (K/P-Ratio des WT: 5,5 mmol/l Glucose $5,5 \pm 0,5$ versus 25 mmol/l Glucose $4,4 \pm 0,5$).

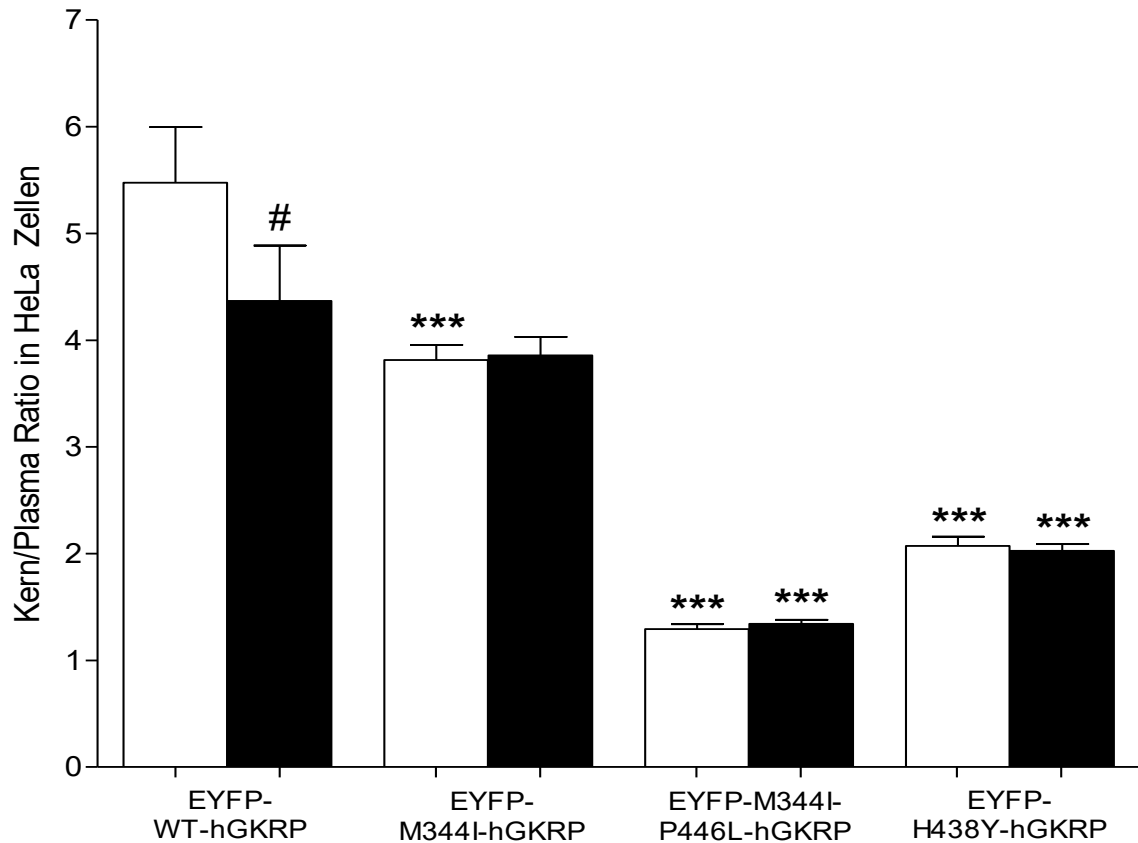


Abbildung 12 Quantifizierung der EYFP-GKRP Kern/Plasma-Ratio in HeLa Zellen. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 25-79 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle bei entsprechenden Glucosespiegeln mit *** für $p < 0,001$ und mit # für $p < 0,05$ innerhalb des WT-GKRP angegeben.

3.3. Lokalisation des GKRP-Fluoreszenzproteins in Hepa 1-6 Zellen

Um die Kern/Plasma-Relation der fluoreszenzmarkierten humanen GKRP Varianten zu analysieren, wurden die transfizierten Hepa 1-6 Zellen unter einer hohen (25 mmol/l) und einer geringen (5,5 mmol/l) Glucoseumgebung inkubiert und mit dem Wildtyp GKRP verglichen. Dabei ist im Vergleich zu primären Hepatozyten und zur Doppeltransfektion die weitestgehende Abwesenheit der Glucokinase zu beachten.

So zeigte sich, dass ausschließlich das humane Wildtyp GKRP eine signifikante Änderung der Kern/Plasma-Relation (*Abbildung 13*) bei erhöhtem Glucosespiegel aufweist (K/P-Ratio des WT: $5,8 \pm 0,4$ bei 5,5 mmol/l Glucose versus $4,6 \pm 0,3$ bei 25 mmol/l Glucose). Diese, den physiologischen Bedingungen ähnliche Reaktion, findet sich bei keiner der untersuchten

Mutationen, welche eine von der Glucosekonzentration unabhängige Lokalisation des GKRP aufweisen. Die Einzelmutation H438Y sowie die Doppelmutation M344I-P446L führen zudem zu einer signifikant geringeren Lokalisation des GKRP im Kern der Hepa 1-6 Zellen (K/P-Ratio bei 5,5 mmol/l Glucose: H438Y $3,5 \pm 0,2$ versus WT $5,8 \pm 0,4$; K/P-Ratio bei 25 mmol/l Glucose: M344I-P446L $2,8 \pm 0,14$ versus WT $5,8 \pm 0,4$). In abgeschwächter Intensität findet sich dieser Effekt auch für die Variante P446L. Interessanterweise ergibt sich jedoch bei hohen Glucosekonzentrationen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp GKRP und P446L.

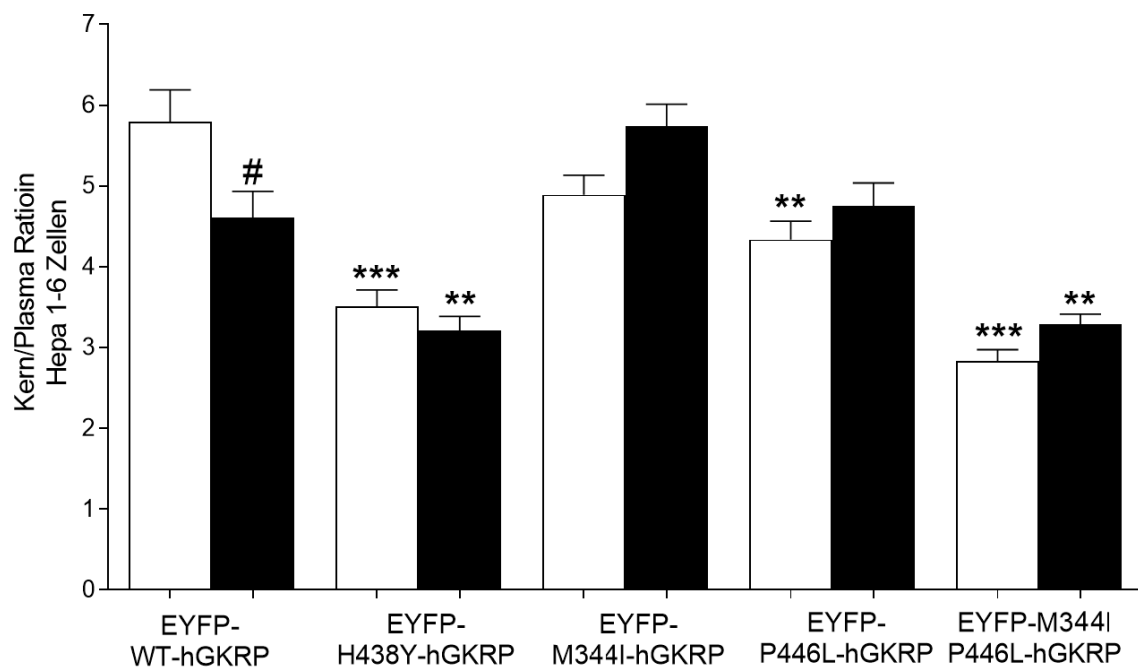


Abbildung 13 Quantifizierung der EYFP-GKRP Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 35-66 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$; mit # für $p < 0,05$ innerhalb des WT angegeben.

3.4. Lokalisation des GKRP und des GK Fluoreszenzproteins in Hepa 1-6 Zellen

Zur Betrachtung möglicher Interaktionen zwischen Glucokinase und GKRP, sowie zur Untersuchung der GK und GKRP-Kern/Plasma-Ratios wurden die jeweiligen Varianten der Fluoreszenzproteine in Hepa 1-6 transfiziert und bei den entsprechenden Glucosewerten mikroskopiert und mit dem Wildtyp verglichen. Die Glucokinase wurde mit ECFP markiert

und das GKRK mit EYFP, wobei die jeweilige Fluoreszenz-Ratio nur gemeinsam erhoben wurde. Analysiert wurden dabei neben dem Wildtyp die Varianten P446L und H438Y.

Im Vergleich zur singulären Expression des GKRK zeigte sich bei der Doppeltransfektion ein geringeres Signifikanzniveau für beide Mutationen (*Abbildung 14*). Hierbei ist jedoch auch die geringere Anzahl der analysierten Zellen zu beachten (Bsp.: für P446L bei 5,5 mmol Glucose: 34 bei GKRK/GK zu 58 bei GKRK). Für beide Mutationen galt eine aufgehobene Reaktion auf veränderte Glucosekonzentrationen. Die deutlichste Verringerung in der nukleären Lokalisation des hGKRK zeigte die Mutante P446L bei 5,5 mmol/l Glucose (K/P-Ratio: P446L $4,6 \pm 0,4$ versus WT $6,8 \pm 0,6$).

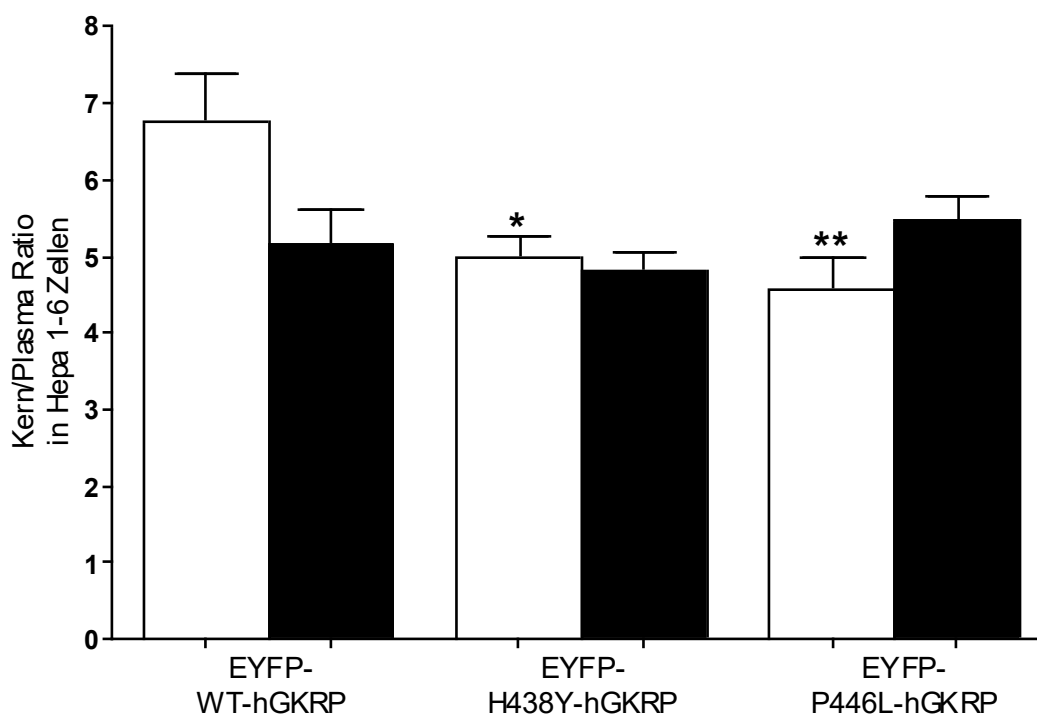


Abbildung 14 Quantifizierung der EYFP-GKRK Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit der Glucokinase. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 21-43 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle mit * für $p < 0,05$ und mit ** für $p < 0,01$ angegeben.

Im Allgemeinen zeigte sich im Kontrast zum GKRK eine deutlich geringere Akkumulation der Glucokinase im Kern (*Abbildung 15*). Die Betrachtung der Kern/Plasma-Ratio der Glucokinase zeigte zudem, mit Ausnahme von P446L, eine signifikante Abhängigkeit der Lokalisation von

Ergebnisse

den Glucose-Konzentrationen (K/P-Ratio von H438Y: 5,5 mmol/l Glucose $1,6 \pm 0,06$ versus 25 mmol/l Glucose $1,3 \pm 0,04$). Weiter ließ sich in Gegenwart von GKRP P446L feststellen, dass es im Gegensatz zur Expression von Wildtyp-GKRP, nahezu zur keiner Veränderung in der Lokalisation der GK kam (K/P-Ratio bei 5,5 mmol/l Glucose: P446L $1,06 \pm 0,29$ versus WT $1,71 \pm 0,11$).

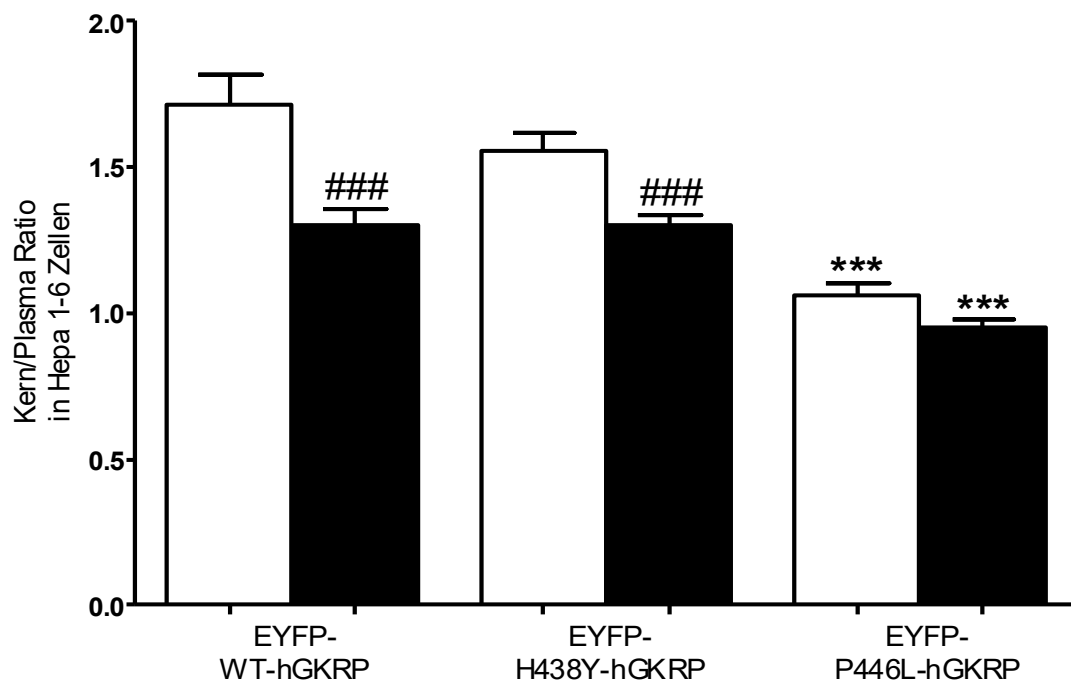


Abbildung 15 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit des Wildtyp bzw. mutierten GKRP. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 25-57 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zum Wildtyp ist mit *** für $p < 0,001$ angegeben und innerhalb des Typs bei unterschiedlichen Glucose-Spiegeln mit ### für $p < 0,001$.

3.4.1. Lokalisation des GK Fluoreszenzproteins in Anwesenheit der Variante H438Y in Hepa 1-6 Zellen

Bei der gemeinsamen Expression der Glucokinase mit der GKRP-Variante H438Y lässt sich bei 25 mmol/l Glucose (wie oben beschrieben) eine signifikante Verlagerung der GK in das Zytoplasma erkennen (Abbildung 16). Gleiches gilt bei niedrigem Glucosespiegel unter Zufuhr von Fructose (K/P-Ratio: 5,5 mmol/l Glucose + Fructose $1,28 \pm 0,05$ versus 5,5 mmol/l Glucose $1,57 \pm 0,07$). Der Glucokinase-Aktivator CpdA (Compound A – 2-amino-5-(4-methyl-4H-

(1,2,4)triazol-3-yl-sulfanyl)-N-(4-methyl-thiazol-2-yl)benzamid [Futamura et al. 2006]) führte im Vergleich hingegen zu keiner Reduktion der Kern/Plasma-Ratio.

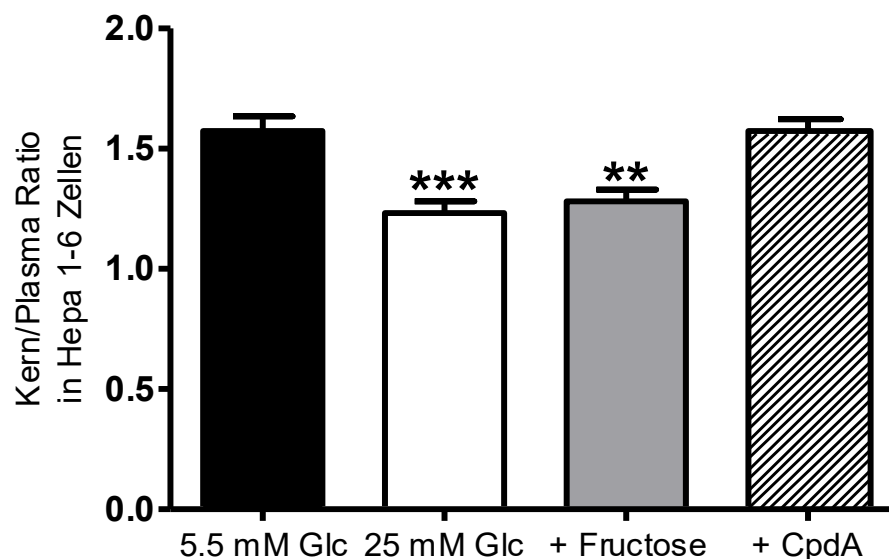


Abbildung 16 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit von GKR H438Y. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 18-24 analysierte Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30 µmol/l CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$ angegeben.

3.5. Lokalisation des GK Fluoreszenzproteins in primären Hepatozyten

Um die Lokalisation der Glucokinase in Abhängigkeit von der humanen GKR- Variante (die EYFP-GKR Varianten wurden cotransfiziert) unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, wurde ECFP-GK in primären Maus-Hepatozyten exprimiert und die Kern/Plasma-Ratio bestimmt. Dabei ist die endogene Expression von GKR und GK zu beachten.

Für das Wildtyp-GKR zeigte sich bei erhöhtem Glucosespiegel (K/P-Ratio: 5,5 mmol/l Glucose $3,3 \pm 0,2$ versus 25 mmol/l Glucose $2,2 \pm 0,2$) sowie bei Behandlung mit Fructose (K/P-Ratio: 5,5 mmol/l Glucose $3,3 \pm 0,2$ versus 5,5 mmol/l Glucose + Fructose $1,5 \pm 0,2$) eine deutliche, der physiologischen Reaktion ähnliche, Translokation der Glucokinase in das Zytoplasma (Abbildung 17). Die stärkste Wirkung zeigte dabei Compound A, welches

Ergebnisse

signifikant stärker wirkte als 25 mmol/l Glucose (K/P-Ratio: 5,5 mmol/l Glucose $3,3 \pm 0,2$ versus 5,5 mmol/l Glucose + CpdA $1,3 \pm 0,2$).

Diese hoch signifikanten Unterschiede spiegeln sich in Anwesenheit der Variante H438Y nicht wider. Zwar wies die GK-Ratio unter CpdA- bzw. Fructose-Umgebung eine Tendenz zur Translokation ins Zytoplasma auf (*Abbildung 18*), jedoch sind die Ergebnisse einzig für 25 mmol/l Glucose signifikant (K/P-Ratio: 5,5 mmol/l Glucose $3,2 \pm 0,2$ versus 25 mmol/l Glucose $2,2 \pm 0,2$).

Ähnliches gilt auch für die häufige GKRP-Variante P446L. Jedoch war hier nicht die hohe Glucose-Konzentration wirksam, sondern CpdA (

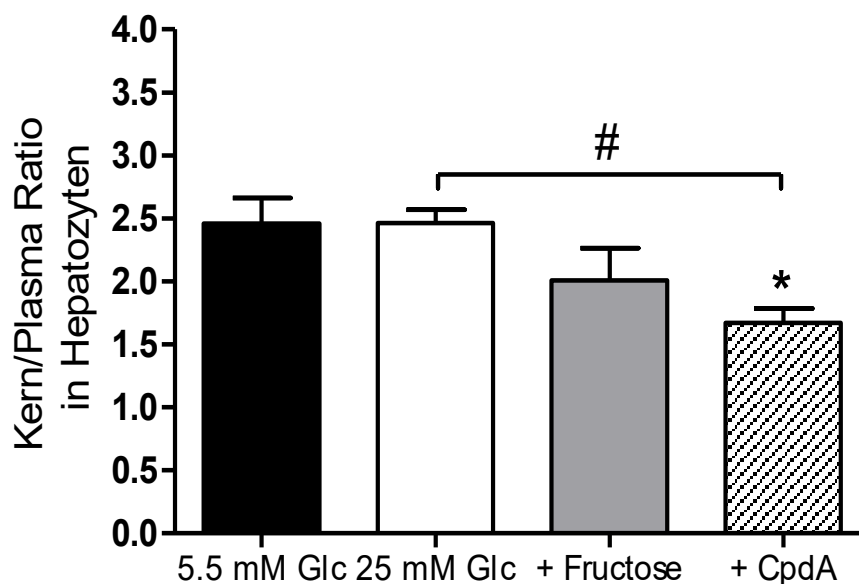


Abbildung 19).

Diese Wirkung zeigte sich sowohl im Vergleich zu 5,5 mmol/l, als auch zu 25 mmol/l Glucose (K/P-Ratio: 5,5 mmol/l Glucose $2,5 \pm 0,2$ versus 5,5 mmol/l Glucose + CpdA $1,7 \pm 0,1$).

Ergebnisse

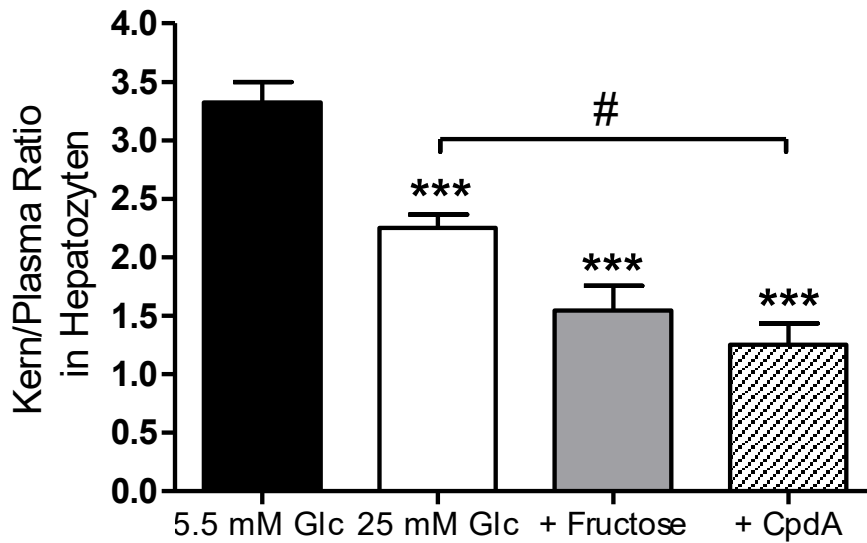


Abbildung 17 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in primären Hepatozyten bei Anwesenheit von GKR Wildtyp. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 8-32 analysierte Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30 µmol/l CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit *** für $p < 0,001$, sowie mit # für $p < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

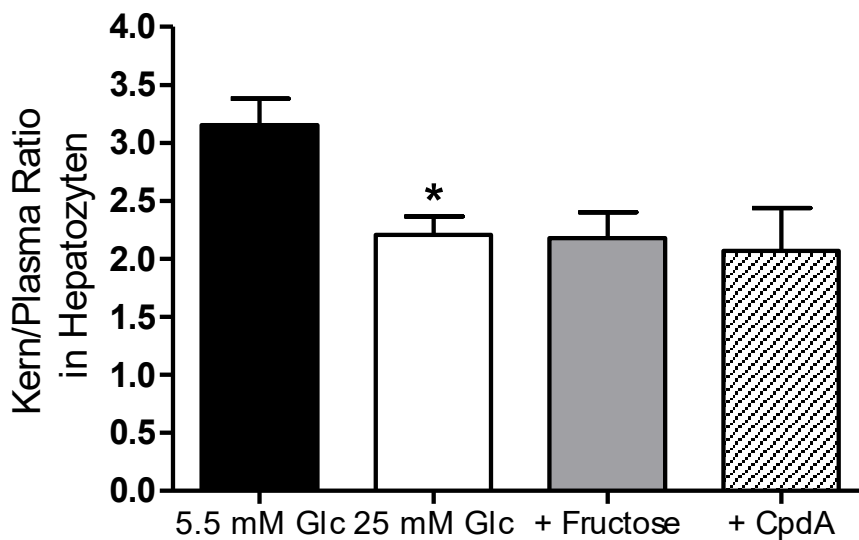


Abbildung 18 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in primären Hepatozyten bei Anwesenheit von GKR H438Y. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 5-33 analysierte Zellen)

Ergebnisse

sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30 µmol/l CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit * für $p < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

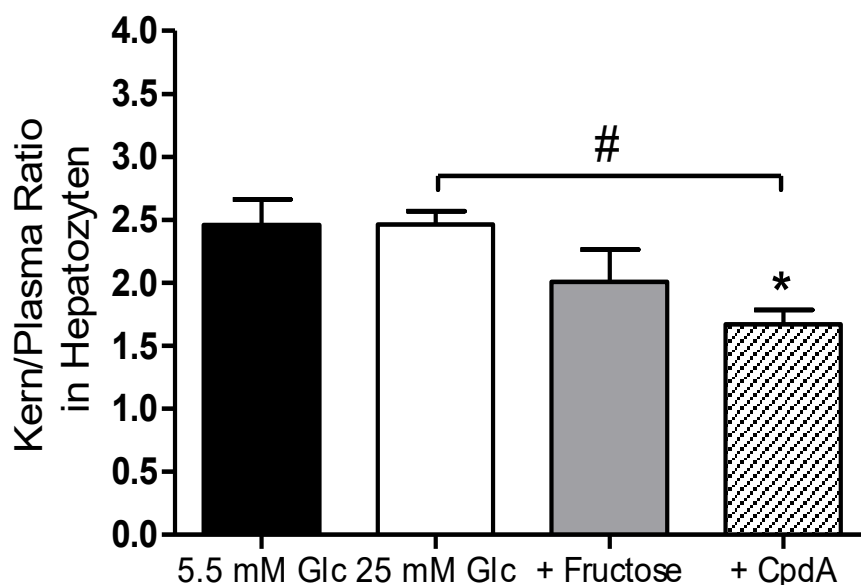


Abbildung 19 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in primären Hepatozyten bei Anwesenheit von GKRP P446L. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 8-32 analysierte Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30 µmol/l CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit * für $p < 0,05$, sowie mit # für $p < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

3.6. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Effizienz (FRET)

Um die direkte Interaktion zwischen der Glucokinase und dem GKRP zu bestimmen, eignet sich die Analyse der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Effizienz in primären Hepatozyten. Dabei wird die Übertragung von Energie vom ECFP auf das EYFP, also von dem GK- auf das GKRP-Fusionsprotein genutzt, welche bei unmittelbarer Nähe (< 10 nm) der beiden Proteine möglich ist. So wird ECFP angeregt und überträgt die Energie durch eine strahlungslose Dipol-Dipol Wechselwirkung auf EYFP (was zu einer geringeren direkt

messbaren Signalstärke von ECFP führt), dessen Emissionen abschließend quantifiziert werden können (Rees et al. 2012a; Vanderklish et al. 2000).

In der Untersuchung zeigte sich für alle untersuchten Varianten eine deutlich verringerte Interaktion von GK und GKRPs-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (*Abbildung 20*), wobei ein Signifikanzniveau nur für 5,5 mmol/l Glucose erreicht wurde. Besonders für GKRPs-M344I erwies sich die Wechselwirkung bei niedrigen Glucosespiegeln als besonders geschwächt (FRET-Effizienz bei 5,5 mmol/l Glucose: $0,3178 \pm 0,0059$ für WT versus $0,2407 \pm 0,0058$ für M344I). Zudem wies GKRPs-H438Y bei hohen Glucosespiegeln einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf ($p < 0,05$). Innerhalb der Mutation bzw. des WT, ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede bei entsprechender Glucosestimulation nachweisen. Für den Wildtyp sowie die Varianten M344I-P446L und H438Y ließ sich weiter, in abnehmender Tendenz, eine Steigerung der Signalstärke im Vergleich zur alleinigen Expression von EYFP und ECFP-GK feststellen.

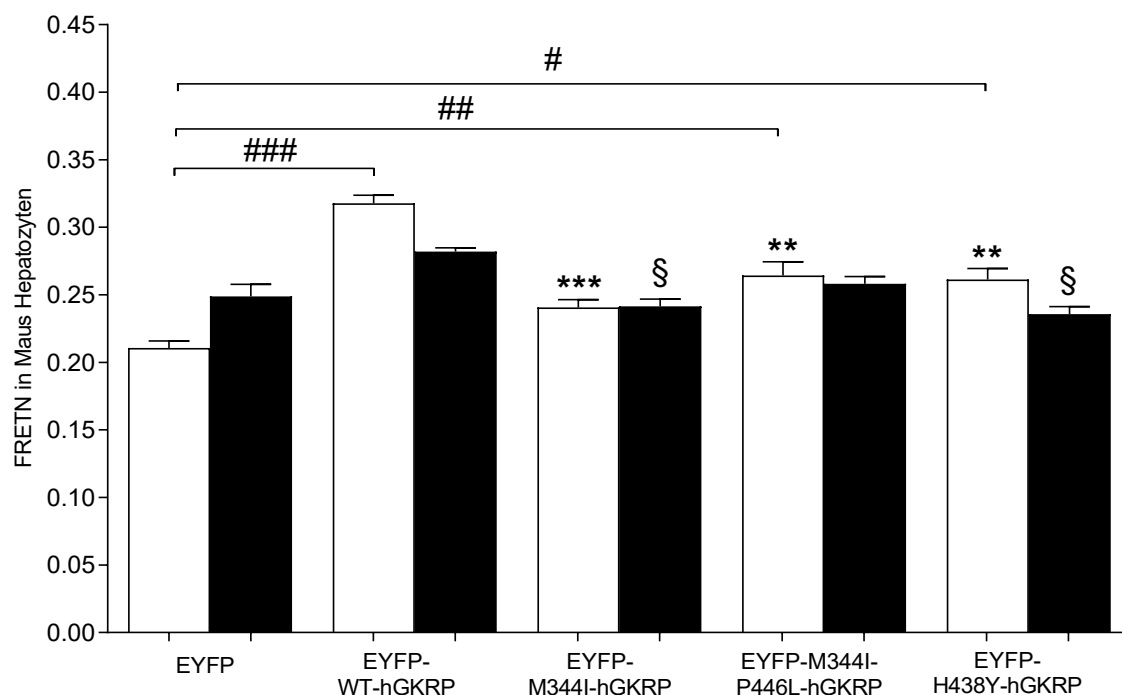


Abbildung 20 Die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Effizienz zeigt die Interaktion zwischen der Glucokinase (ECFP-Fusionsprotein) und dem GKRPs (EYFP-Fusionsprotein) in Maus Hepatozyten. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 9-60 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zum Wildtyp, bei 5,5 mmol/l Glucose, mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$; vergleichend zur Kontrolle EYFP mit # für $p < 0,05$, ## für $p < 0,01$ und mit

für $p < 0,001$, sowie bei 25 mmol/ Glucose mit § für $p < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

3.7. Proteinexpressionsanalyse der GGRP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp

Die Proteinexpression der humanen EYFP-GGRP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp wurde mit dem Referenzprotein Actin, unter gleichzeitiger Expression der WT-GK, im Western Blot ermittelt. Actin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts eukaryonter Zellen (Johnson 2012) und wird daher auch in Leberzellen bzw. in Hepa 1-6 exprimiert.

Bei dieser Untersuchung zeigte sich kein signifikanter Unterschied (*Abbildung 21*) in der Proteinexpression der Varianten - sowohl untereinander als auch im Vergleich zum Wildtyp ($0,002208 \pm 0,001334$ für WT versus $0,002448 \pm 0,001565$ für P446L).

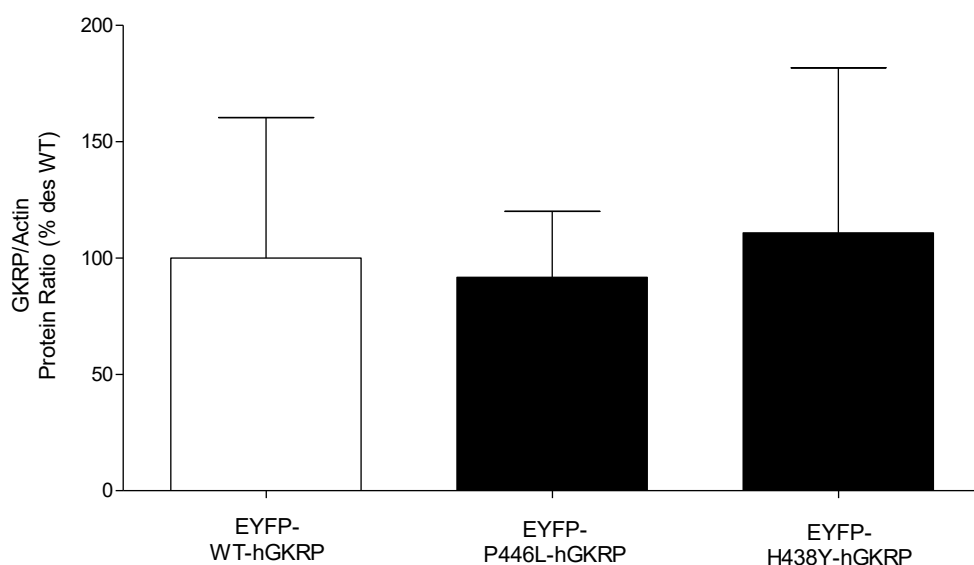


Abbildung 21 Proteinexpression von humanen EYFP-GGRP-Varianten und Wildtyp in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit von Wildtyp GK. Die Protein-Ratios (im Bezug zu Actin) sind als prozentualer Anteil des WT-GGRP als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt (One-way ANOVA).

3.8. Stoffwechsel-Analyse in GGRP-Varianten im Vergleich zum WT

Um die kurzfristigen metabolischen Konsequenzen der GGRP-Varianten auf den Zellstoffwechsel zu analysieren, wurden die Mutanten in Hepa 1-6 Zellen transient transfiziert und mittels kolorimetrischen Assays mit dem Wildtyp verglichen. Da aber die Transfektions-

Effizienz bei durchschnittlich 50 % lag, ist zu beachten, dass der metabolische Einfluss der Mutationen durch nicht transfizierte Zellen gedämpft wurde. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Metabolite in das Verhältnis zum Proteingehalt gesetzt.

3.8.1. Glucose-Verbrauch im Vergleich zum Wildtyp

Da der Glucoseverbrauch der zentrale Indikator für die Funktion der Glucokinase und damit auch des GKRP ist (Abbildung 1), liegt es nahe, diesen im „Fastenzustand“ (5,5 mmol/l Glucose), als auch unter hoher Glucosekonzentration (25 mmol/l) zu ermitteln.

Dabei zeigte sich, dass sowohl bei geringer als auch bei hoher Glucosekonzentration P446L und H438Y einen erheblich höheren Glucoseumsatz aufweisen als das Wildtyp-GKRP und vergleichbare Werte mit der Singletransfektion der Glucokinase zeigen (

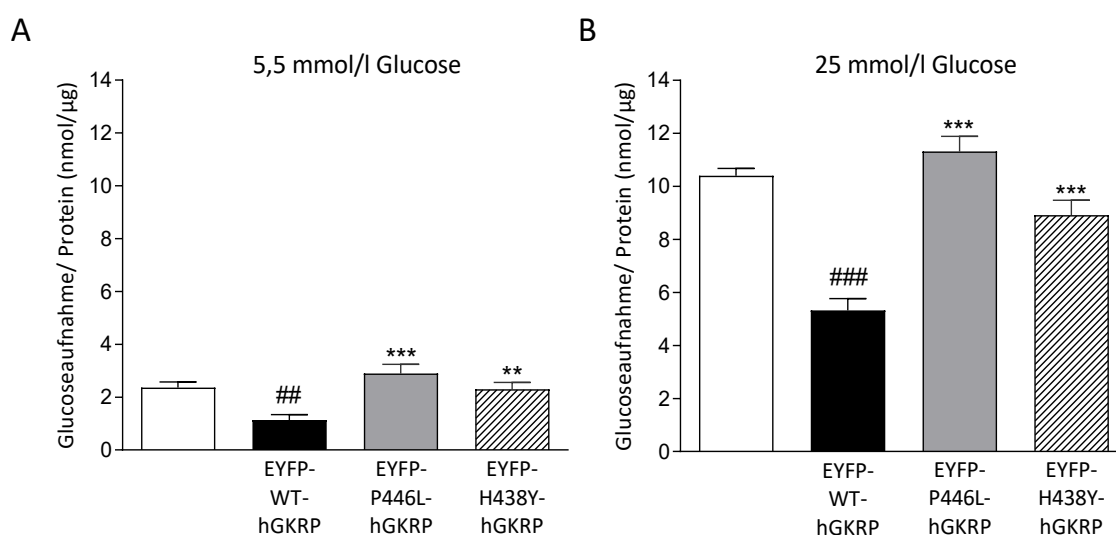


Abbildung 22). Besonders das GKRP-P446L sorgte für einen hoch signifikanten Mehrverbrauch an Glucose (Glucoseumsatz bei 25 mmol/l Glucose: $5,3 \pm 0,4$ nmol/µg für WT versus $11,3 \pm 0,6$ nmol/µg für P446L). Auch ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Expression der GK mit und ohne WT-GKRP feststellen (Glucose-Umsatz bei 25 mmol/l Glucose: $10,1 \pm 0,4$ nmol/µg für GK versus $5,3 \pm 0,4$ nmol/µg für GK+GKRP-WT).

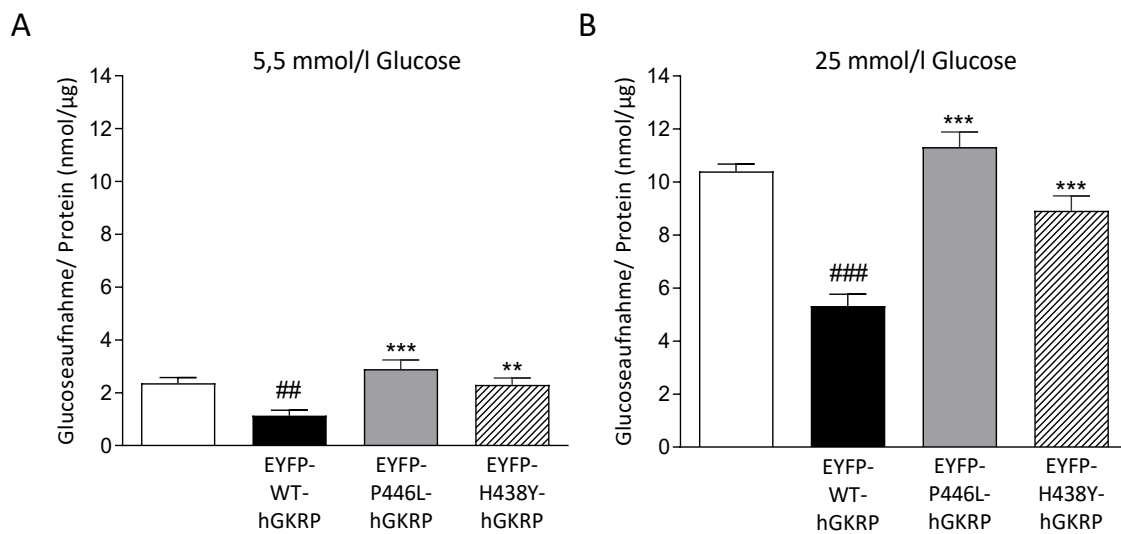


Abbildung 22 Quantifizierung des Glucose-Verbrauchs in nmol je µg Protein in Hepa 1-6 Zellen bei 5,5 (A) bzw. 25 mmol/l Glucose (B). Die Zellen welche nur ECFP-GK exprimieren sind mit weißen Balken dargestellt; die übrigen Balken stehen für die Expression der EYFP-GKRPs-Variante bzw. des WT. Die Ergebnisse aus unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 11-14 analysierten Proben) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur GK mit ## für $p < 0,01$ und ### für $p < 0,001$; im Vergleich zum WT-GKRPs mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

3.8.2. Triglycerid-Synthese im Vergleich zum Wildtyp

Da für viele GKRPs-Varianten, insbesondere P446L, eine Korrelation zu erhöhten Triglyceridwerten beschrieben wurde, liegt die Untersuchung der veränderten Syntheseleistung in Hepa 1-6 Zellen nahe. Zudem ergeben sich aus den transfizierten Zellmodellen ggf. auch Ableitungen über den klinisch prädikativen Wert von GKRPs-Mutanten.

Entsprechend ließ sich auch für die häufige GKRPs-Variante P446L eine deutlich erhöhte Triglycerid-Synthese, sowohl im Fastenzustand als auch unter 25 mmol/l Glucose, ermitteln (Abbildung 23) (Triglycerid-Synthese bei 5,5 mmol/l Glucose: $0,053 \pm 0,011$ nmol/µg für WT versus $0,1267 \pm 0,016$ nmol/µg für P446L). Für EYFP-GKRPs-H438Y zeigte sich die sichtbare Tendenz unter Fasten-Bedingungen nur bei 25 mmol/l Glucose auf einem signifikanten Niveau (Triglycerid-Synthese bei 25 mmol/l Glucose: $0,133 \pm 0,021$ nmol/µg für WT versus $0,306 \pm 0,024$ nmol/µg für H438Y). Dem gegenüber war die Syntheseleistung bei der Doppeltransfektion von WT-GKRPs und der Glucokinase bei beiden Glucosekonzentrationen signifikant verringert im Vergleich zur Einzeltransfektion der GK (Triglycerid-Synthese bei 25 mmol/l Glucose: $0,241 \pm 0,018$ nmol/µg für GK versus $0,133 \pm 0,021$ nmol/µg für GK+GKRPs-

WT).

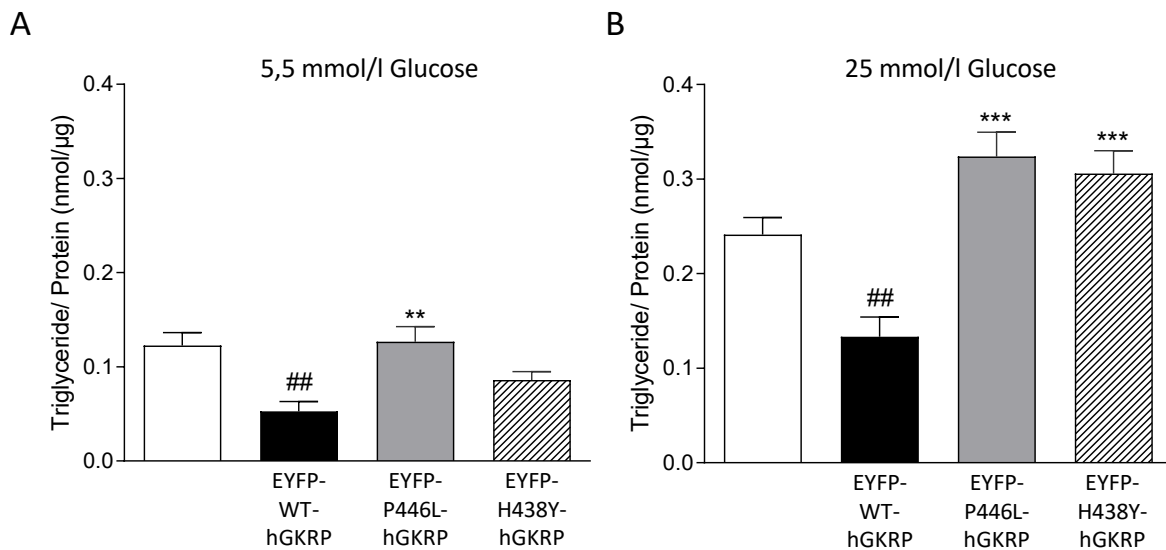


Abbildung 23 Quantifizierung der Triglycerid-Synthese in nmol je μg Protein in Hepa 1-6 Zellen bei 5,5 (A) bzw. 25 mmol/l Glucose (B). Die Zellen welche nur ECFP-GK exprimieren sind mit weißen Balken dargestellt; die übrigen Balken stehen für die Expression der EYFP-GKRP-Variante bzw. des WT. Die Ergebnisse aus unabhängigen Versuchen (mit jeweils 9-18 analysierten Proben) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur GK mit ## für $p < 0,01$; im Vergleich zum WT-GKRP mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

3.9. PyMOL-Darstellung der GKRP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp

Mit Hilfe des Open Source Molekül-Grafikprogramms PyMOL der Firma Schrödinger wurden 3D Simulationen des GKRP erstellt und die einzelnen Mutationen simuliert. Dabei wurden die Kalkulationen der Software zu den Mutationen auf Basis der Van-der-Waals-Radien durchgeführt. Als strukturelle Grundlagen dienen die Daten der Protein-Datenbank RCSB PDB des Brookhaven National Laboratory, im Speziellen die kristallografischen Daten des humanen GKRP (PDB ID: 4bb9) (Pautsch et al. 2013).

3.9.1. Mutationslokalisierung im GKRP

Zur Betrachtung der Lokalisation der Mutation und möglichen Exposition der Mutationen an der Oberfläche bzw. der Fructosephosphat-Bindungstasche ist eine Übersicht hilfreich (Abbildung 24). Da die Kristallstruktur des humanen GKRP nur im Komplex mit F1P zur

Verfügung steht, bezieht sich die Beschreibung der Bindungstasche für die Fructosephosphate auch auf F6P, basierend auf der Annahme, dass sowohl F1P als auch F6P im selben Bereich binden (Pautsch et al. 2013; Veiga-da-Cunha und van Schaftingen 2002; Beck und Miller 2013).

Die Mutation M344I liegt im Zentrum einer α -Helix, welche maßgeblich an der Bildung der Bindungstasche von F1P beteiligt ist und im Kern des GGRP liegt.

Die Aminosäure H438 hingegen liegt im C-terminalen Bereich eines β -Faltblattes, deutlich außerhalb des Proteinzentrums und ist an der Oberflächenbildung im Bereich einer kleinen Tasche beteiligt.

P446 liegt am N-terminalen Ende in Position 1 einer α -Helix und ist deutlich oberflächenbildend.

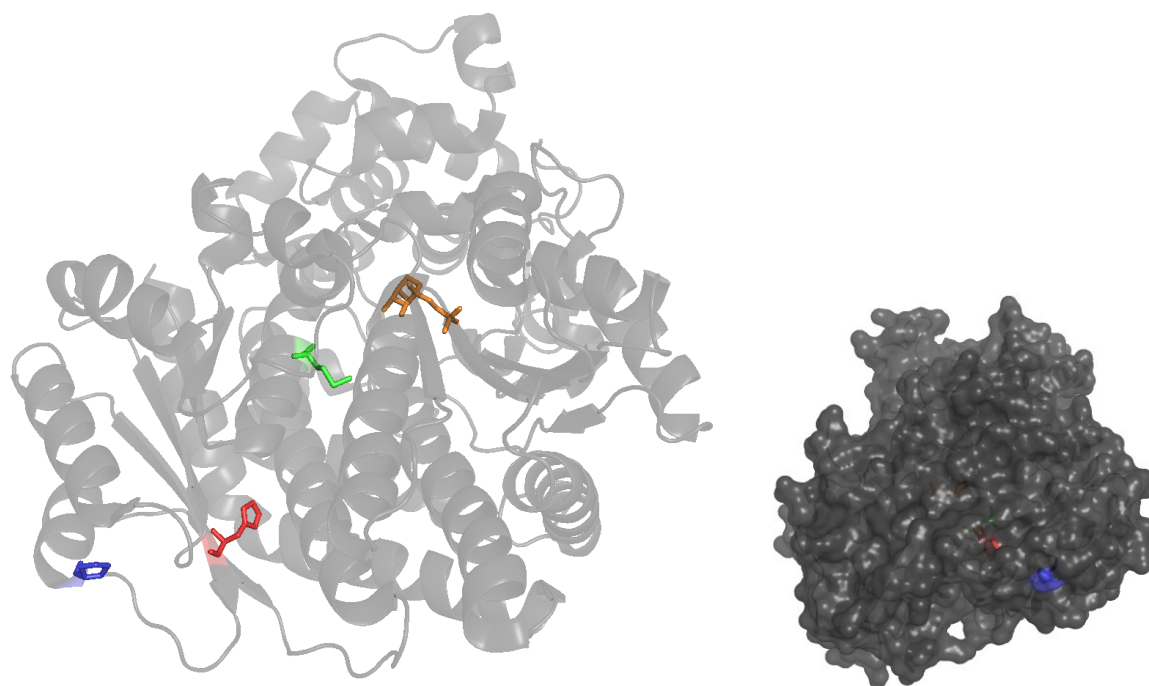


Abbildung 24 Lokalisation der GGRP-Varianten im Molekül komplexiert mit Fructose-1-Phosphat. Orange: F1P, Grün: M344, Blau: P446, Rot: H438 (links); Lokalisation der GGRP-Varianten im Molekül komplexiert mit Fructose-1-Phosphat bei Betrachtung der Oberfläche. Flächige Färbung demonstriert Oberflächenkontakt. Orange: F1P, Grün: M344, Blau: P446, Rot: H438 (rechts) PyMOL 1.7.4.

3.9.2. Kollisionssimulation der GGRP Varianten

Mit Hilfe der „Mutagenesis Wizard“ konnten die Variationen des GGRP simuliert werden und mögliche Konflikte der Sekundär- und Tertiärstruktur betrachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass PyMOL (in der Version 1.7.4) nur die Primärstruktur ändert und Analysen auf Basis der

Van-der-Waals-Radien (Darstellung über Kollisionsscheiben) durchführt, wobei der Anwender die Auswahl aus Rotameren verschiedener Prävalenz hat. Im Folgenden ist immer die wahrscheinlichste gezeigt. Aussagen über polare Bindungen und elektrostatische Wechselwirkungen sind dabei nur eingeschränkt möglich und bedürfen zumindest einer Augenschein-Validierung.

Zum besseren Verständnis sind die Nachbar-Aminosäuren der mutierten Variante, sowie die Aminosäuren gesondert dargestellt, welche mit jener ggf. interagieren.

3.9.2.1. Mutationsdarstellung von GKR-P446L

Die Abbildungen zeigen eine mutmaßliche Kollision (*Abbildung 26*) des Leucins an Position 446 der häufigen Mutante GKR-P446L mit Aminosäuren am N-Terminus einer benachbarten α -Helix (*Abbildung 25*)(Pos. 415-428). Diese Struktur ist maßgeblich oberflächenbildend.

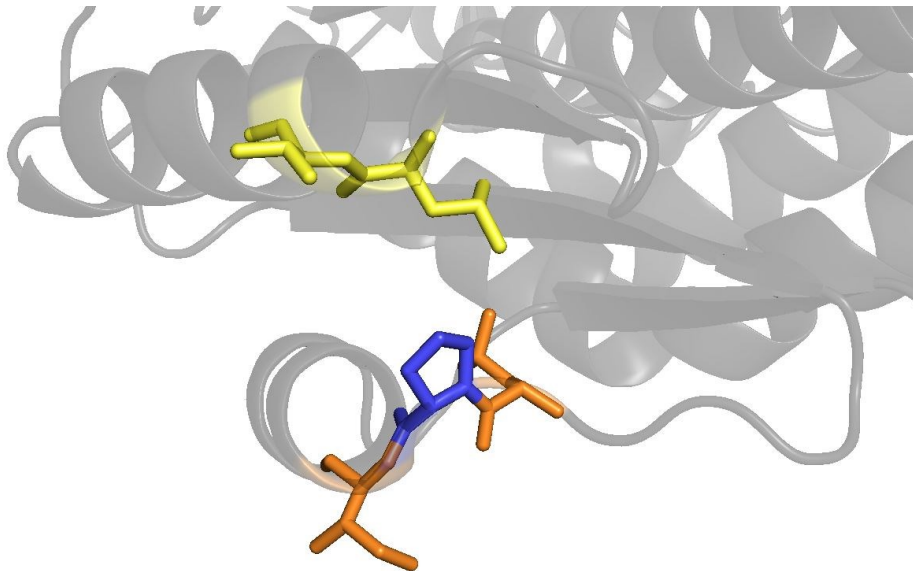


Abbildung 25 Ausschnitt aus dem humanen WT GKR. Die Aminosäure Prolin an Position 446 ist blau, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 416 und 417 gelb abgebildet. PyMOL 1.7.4.

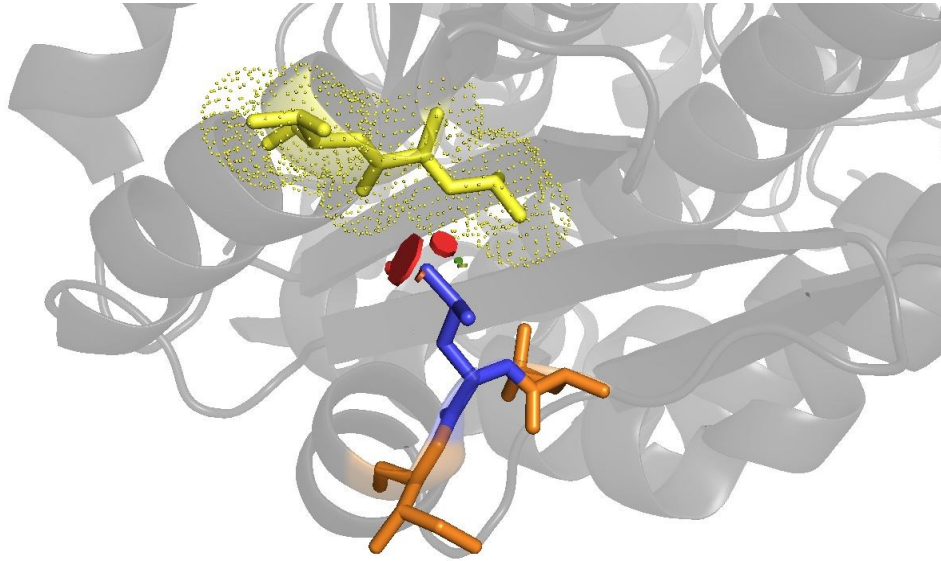


Abbildung 26 Ausschnitt aus der GGRP-Variante P446L. Die Aminosäure Leucin an Position 446 ist blau, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 416 und 417 gelb (mit Punktsphären für die Atomradien) abgebildet. Die roten Scheiben zeigen signifikante Überlappungen der Atomradien an. PyMOL 1.7.4.

3.9.2.2. Mutationsdarstellung von GGRP-H438Y

Anhand der PyMOL-Darstellung lässt sich eine Kollision (*Abbildung 28*) von Tyrosin mit Strukturen in zwei Bereichen von GGRP-H438Y vermuten. Zum einen mit Ser481 und Thr482 (*Abbildung 27*) im Zentrum einer α -Helix (Pos. 469-496), zum anderen Trp461 am C-Terminal eines oberflächlichen β -Faltblattes (Pos. 457-461).

Ergebnisse

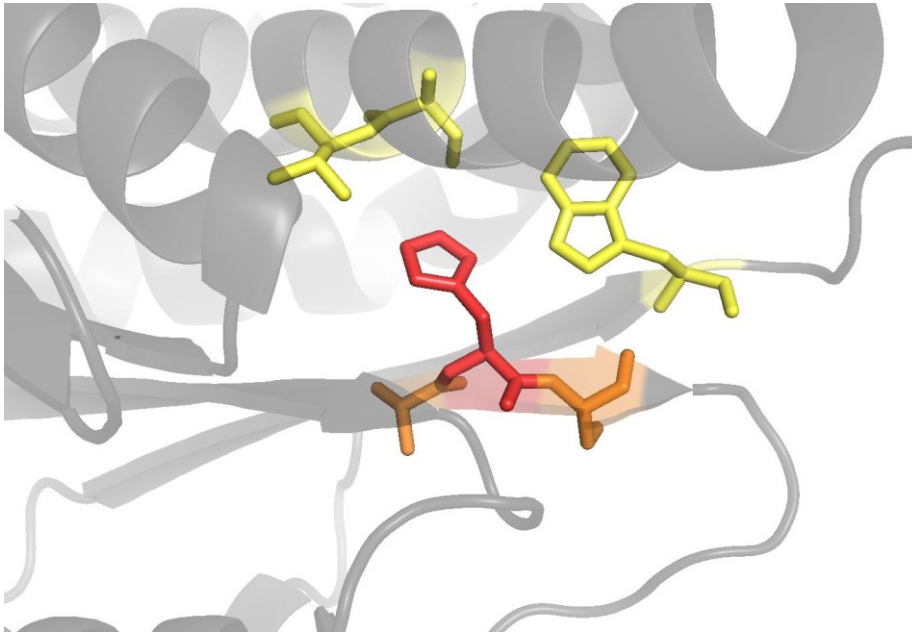


Abbildung 27 Ausschnitt aus dem humanen WT GKR. Die Aminosäure Histidin an Position 438 ist rot, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 461, sowie 481 und 482 gelb abgebildet. PyMOL 1.7.4.

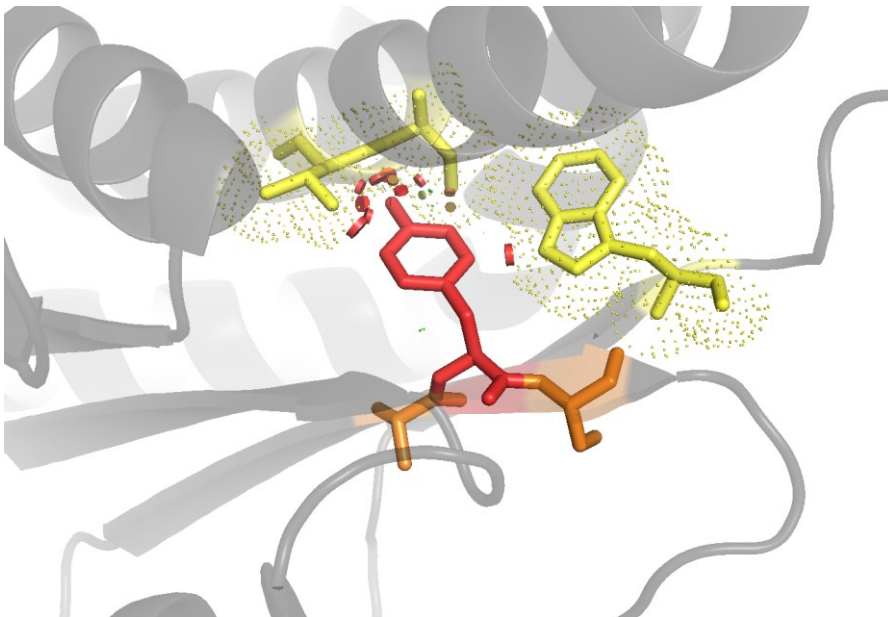


Abbildung 28 Ausschnitt aus der GKR Variante H438Y. Die Aminosäure Tyrosin an Position 438 ist rot, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 461, sowie 481 und 482 gelb (mit Punktspähren für die Atomradien) abgebildet. Die roten Scheiben zeigen signifikante, die grünen mäßige Überlappungen der Atomradien an. PyMOL 1.7.4.

3.9.2.3. Mutationsdarstellung von GKR_P-M344I

Die PyMOL-Simulation zeigt, dass Isoleucin potenziell mit zwei Aminosäuren in einer zentralen Struktur von GKR_P-M344I interagiert (*Abbildung 30*). Besagte Aminosäuren Thr109 und Arg112 sind dabei Teil einer α -Helix (Pos. 107-128) und grenzen, insbesondere Thr109, unmittelbar an F1P (*Abbildung 29*). Dahingegen ist Lys483 auch Teil einer α -Helix (Pos.469-496), jedoch mit größerem Abstand zum Fructosephosphat. Dessen ungeachtet ist die Kollisionsstärke für beide Helices eher schwach.

Zudem ist auffällig, dass die α -Helix (*Abbildung 31*) (Pos. 336-354) von I344 entscheidend die Bindungsstelle der Fructosephosphate mit formt.

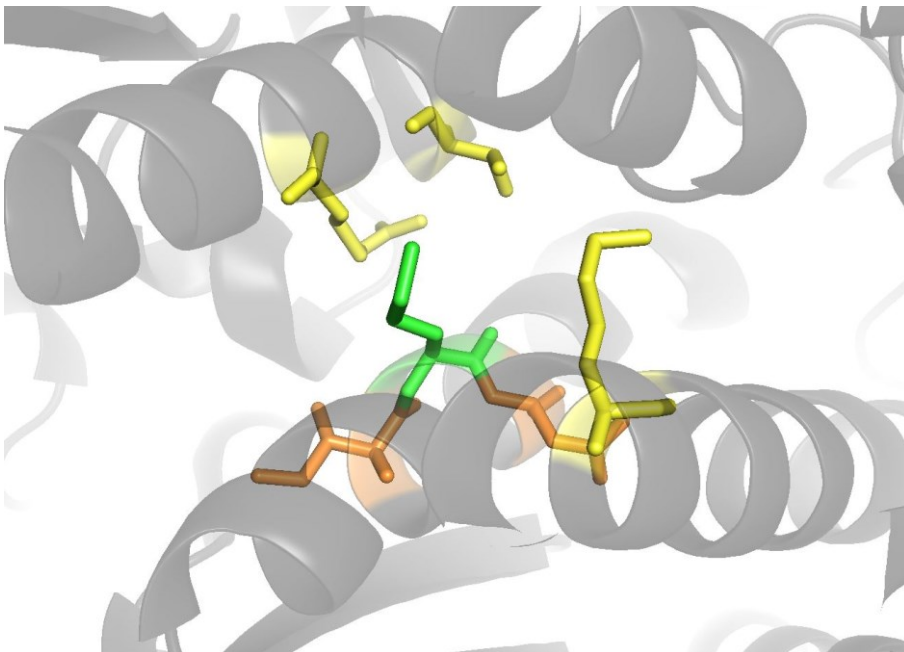


Abbildung 29 Ausschnitt aus dem humanen WT GKR_P. Die Aminosäure Methionin an Position 344 ist grün, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 483, sowie 109 und 112 gelb abgebildet. PyMOL 1.7.4.

Ergebnisse

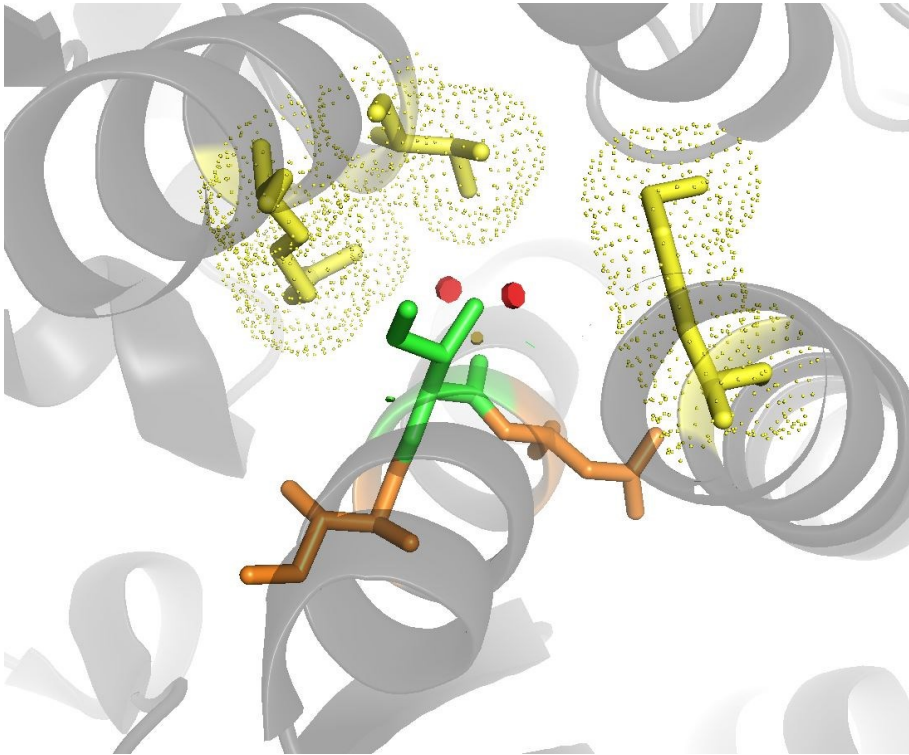


Abbildung 30 Ausschnitt aus der GKR Variante M344I. Die Aminosäure Isoleucin an Position 344 ist grün, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 483, sowie 109 und 112 gelb (mit Punktsphären für die Atomradien) abgebildet. Die roten Scheiben zeigen signifikante, die grünen leichte Überlappungen der Atomradien an. PyMOL 1.7.4.

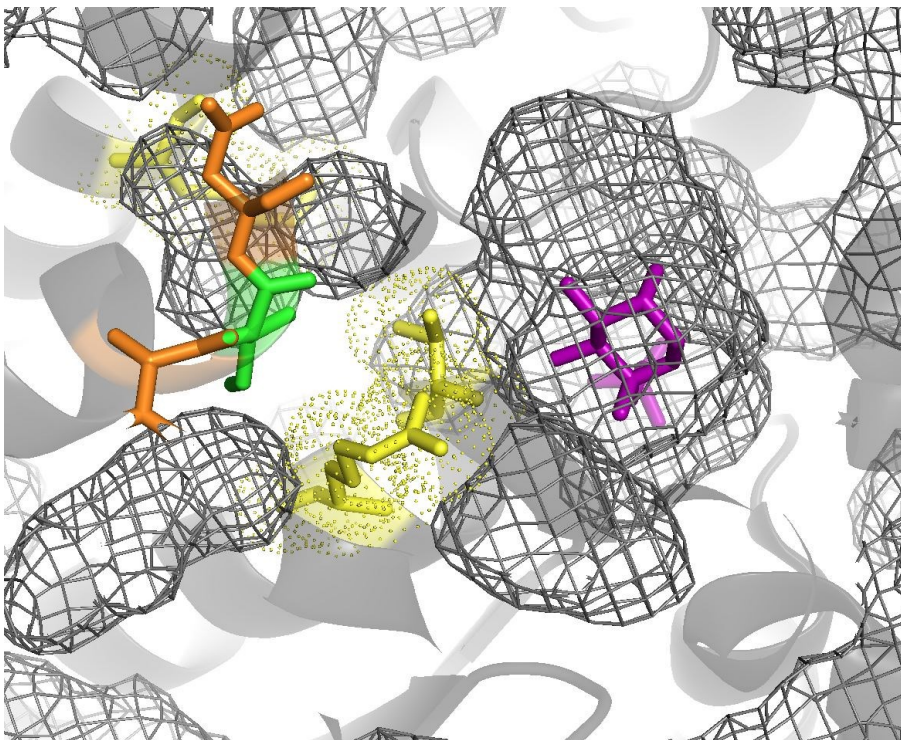


Abbildung 31 Ausschnitt aus der GKR- Variante M344I. Die Aminosäure Isoleucin an Position 344 ist grün, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 483, sowie 109 und 112 gelb (mit Punktsphären für die Atomradien) abgebildet. Die Simulation zeigt zudem die mit einem grauen Netz verdeutlichte Bindungstasche, in deren Zentrum F1P (violett) liegt. PyMOL 1.7.4.

Weiterhin zeigt sich ein möglicher Einfluss von M344I auf eine für die Sirt2-GKR- Interaktion relevante α -Helix, innerhalb welcher sich die regulatorisch entscheidende Aminosäure Lysin an Position 126 befindet (*Abbildung 32*).

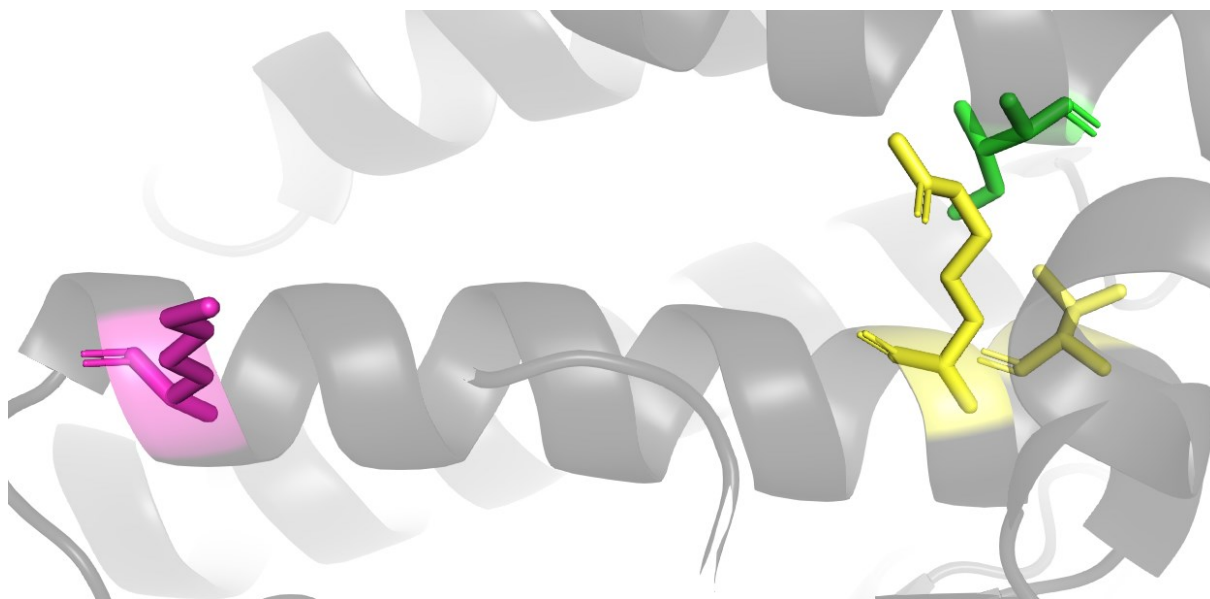


Abbildung 32 Ausschnitt aus der GKR- Variante M344I. Die Aminosäure Isoleucin an Position 344 ist grün und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in 109 und 112 sind gelb abgebildet. Das auf der gleichen α -Helix liegende Lys126 wird violett dargestellt. PyMOL 1.7.4.

3.9.3. Mutationen im GKR- GK-Komplex

Beck und Miller haben mit ihrer Kristallstrukturanalyse von GK und GKR- im Komplex (PDB ID: 4LC9) wertvolle Hinweise auf mögliche Veränderungen in der Funktion dieses Systems durch Mutationen im GKR- gegeben (Seite 17). Mit PyMOL lässt sich dies auch für H438Y anschaulich darstellen. Dabei wird deutlich, dass nicht nur P446, sondern auch H438 in unmittelbarer Nähe, der für die Bindung zur Glucokinase mutmaßlich bedeutenden Schleife liegt (*Abbildung 33*).

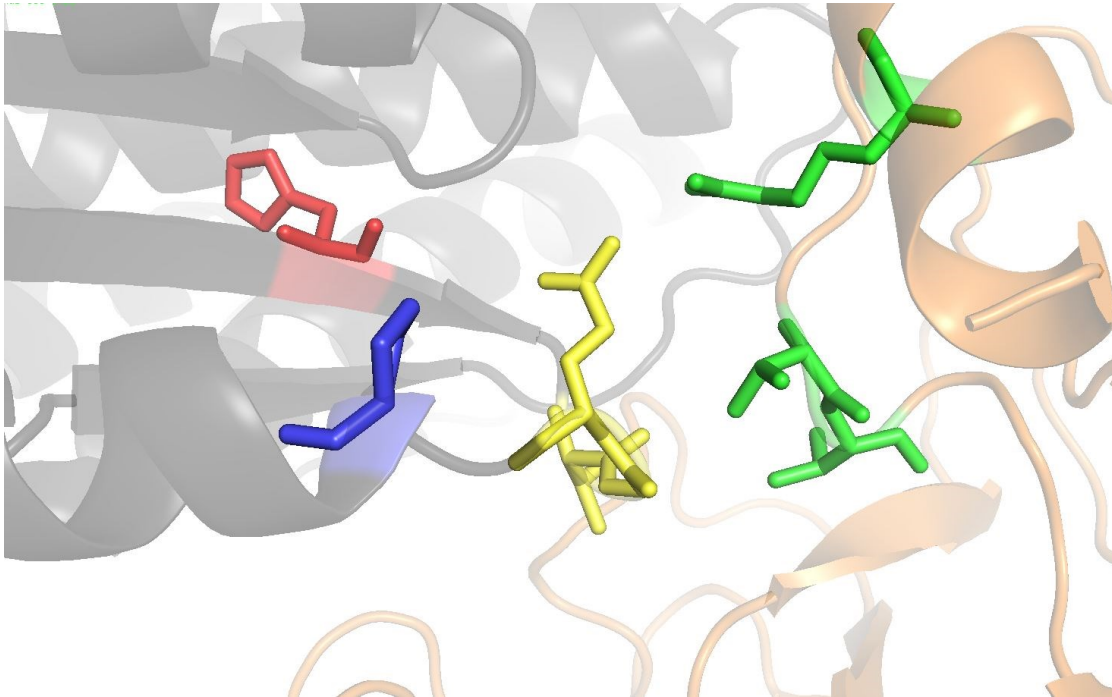


Abbildung 33 Ausschnitt aus dem GGRP-GK Komplex. Prolin an Position 446 ist blau; Histidin an Position 438 ist rot; Val441, Gly442, Gln443 in GGRP gelb; Arg186, Val199, Val200 in GK grün; GGRP blass-grau und GK blass-orange dargestellt. PyMOL 1.7.4.

3.10. Analyse der GGRP Proteinstruktur und –funktion via I-TASSER-Simulation

Der I-TASSER Server ist ein Online-Medium der Yang Zhang Forschungs-Gruppe der Universität Michigan. Er ermöglicht automatische Proteinstruktur-Vorhersagen auf Basis von Multiple Alignment mit bekannten Strukturen der PDB. Des Weiteren berechnet er Aussagen über mögliche Funktionen des Moleküls, wie beispielsweise über Liganden-Bindungsstellen, enzymatisch relevante Strukturbereiche oder über die Stabilität innerhalb des Proteins (Yang und Zhang 2015; Yang et al. 2015b).

3.10.1. Die Stabilität des GGRP

Bei der Analyse der normalisierten thermischen Stabilität (B-factor) des GGRP zeigte sich für die unterschiedlichen Bereiche, in denen die jeweiligen Mutationen auftreten, verschiedene Werte. So befinden sich P446 (BFP: 0,17) und H438 in einem mäßig stabilen Bereich, während M344 (BFP: -0,17) in einer stabileren Region liegt (Abbildung 34).

Ergebnisse

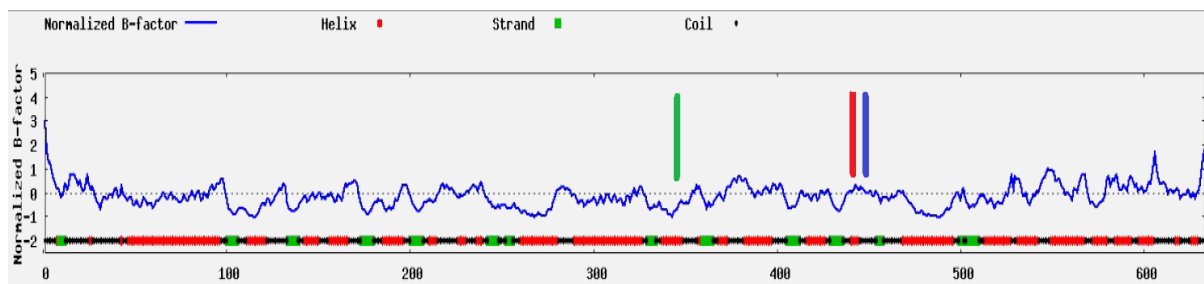


Abbildung 34 zeigt die I-TASSER-Vorhersage über die thermische Stabilität (B-factor) der einzelnen Bereiche im GGRP-WT. Die vertikalen Striche stellen den Bereich der Varianten dar. Grün steht für M344, Rot für H438 und Blau für P446. Negative Werte weisen Gebiete hoher Stabilität aus (Yang et al. 2015a).

3.10.2. Vorhersage der katalytischen Aktivität des GGRP

Da für das GGRP bisher keine eigene enzymatische Aktivität beschrieben wurde, kann es von Interesse sein (auch unter Beachtung des, wenn auch geringen, extrahepatischen Vorkommens) nach Analogien zu anderen Enzymen zu suchen.

Mit Hilfe der Programmfunktion COACH, welche mehrere Algorithmen zur Vorhersage der Enzymaktivität verbindet, konnte über Vergleich mit bekannten Strukturen in der PDB die Enzyme Commission Number (EC) des GGRP mutmaßlich vorhergesagt und somit entsprechende Funktionen vermutet werden.

Im Fall vom Wildtyp GGRP handelt es sich bei den PDB Strukturen um die Glucose-6-Phosphat-Isomerase (GPI) von *Trypanosoma brucei* (PDB ID: 2O2D), *Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID: 2WU8) und *Vibrio cholerae* (PDB ID: 3HJB), sodass die zugehörige EC-Nummer 5.3.1.9 entspricht. Jedoch sei auf den niedrigen Konfidenzwert (0,23) und auf den Aufbau des GGRP aus zwei SIS, welche bei der Interpretation des Alignments bedacht werden sollten, verwiesen (Pautsch et al. 2013; Bateman 1999; Veiga-da-Cunha et al. 2009).

3.10.3. Strukturvorhersage für EYFP-GGRP

Zum besseren Verständnis des Fusionsproteins EYFP-GGRP wurde mit Hilfe von I-TASSER und PyMOL eine Strukturvorhersage erstellt. Dabei stammen die FASTA Daten für das GGRP vom UniProt-Server (Q14397) und die des GFP von der PDB-Datenbank (ID: 1GFL) (Yang et al. 1996) (Abbildung 35). Die Aminosäuresequenz des GFP wurde mit den fünf Mutationen S65G, V68L, Q69K, S72A, und T203Y versehen, sodass sie dem EYFP entspricht (Perez-Jimenez et al. 2006). Der Linker (Aminosäuren Sequenz: RILQSTVPRARDPPVAT) stammt

aus vorhergehenden Studien (Baltrusch et al. 2005). Bei der Auswahl der errechneten Modelle wurde der höchste C-score (-2.22) berücksichtigt, welcher ebenso eine für die Fluoreszenz des EYFP notwendige Struktur wiedergibt. Außerdem wurden mit PyMOL die Bereiche im GKRK grün markiert, welche für die Bindung zur Glucokinase als möglicherweise entscheidend beschrieben wurden (siehe Kapitel 1.4.7.).

Dabei zeigte sich, dass das EYFP-Konstrukt deutlich abseits der Glucokinase-Bindungsstelle liegt und auch kein Kontakt zum Interaktionsbereich der Fructosephosphate besteht (im Zentrum des GKRK). Außerdem wurde der große Abstand, mittels des Linkers, zwischen EYFP und GKRK ersichtlich, welcher eine direkte Beeinflussung dieser beiden Proteinbereiche weniger wahrscheinlich macht.

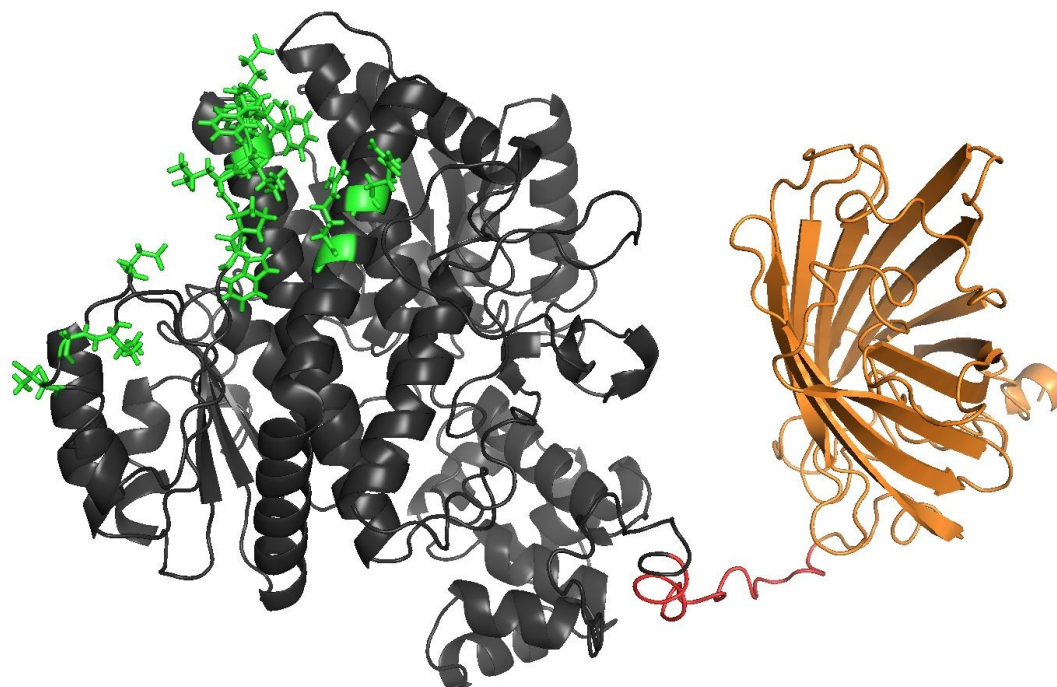


Abbildung 35 zeigt die Struktur des humanen Wildtyp EYFP-GKRK. Grau wird das GKRK und darin in Grün die Bindungsbereiche zur Glucokinase gezeigt; der Linker ist rot und das EYFP orange abgebildet. PyMOL 1.7.4.

Diskussion

Die überragende medizinische und ökonomische Bedeutung von Stoffwechselerkrankungen, hat in den vergangenen Jahren zu enormen Anstrengungen sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Entwicklung von Arzneimitteln und neuen Therapiekonzepten geführt. Dabei stehen komplexe Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ II und das Metabolische Syndrom, mit

ihren vielfältigen Folgeerkrankungen, vom diabetischen Fußsyndrom bis zum Obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom, im Zentrum der Betrachtung (Heidemann et al. 2013; Kaur 2014).

So ist die Bedeutung von Diabetes Mellitus kaum zu überschätzen. Denn es wird vermutet, dass im Jahr 2040 ca. 642 Millionen Menschen und damit jeder 10. an Diabetes mellitus leiden. Bereits heute sterben mehr Menschen an den Folgen von Diabetes mellitus als an Tuberkulose, AIDS/HIV sowie Malaria zusammen und jedes 7. Neugeborene ist vom Gestationsdiabetes der Mutter betroffen (International Diabetes Federation 2015).

Deshalb liegt es nahe, dass auch erhebliche Ressourcen in die Untersuchung der am Stoffwechsel maßgeblich beteiligten Regulatoren investiert wurden. Die Glucokinase und deren Regulatorprotein stellen dabei ein mögliches Ziel, auch für etwaige medikamentöse Therapien dar. So wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Wirkstoffe, mit der Hoffnung auf eine therapeutische Anwendung beschrieben (*Abbildung 3*). Jene aktivieren entweder die Glucokinase direkt, oder interferieren maßgeblich mit der Bindung zwischen GK und GKR (Grimsby et al. 2003; Brocklehurst et al. 2004b; Matschinsky 2009; Anderka et al. 2008; Ashton et al. 2014; Lloyd et al. 2013).

Untersuchungen zur Sicherheit einiger dieser Präparate aber zeigten, dass ein besseres Verständnis der komplexen Steuerung und Funktionsweise der Interaktion zwischen Glucokinase und dessen Regulatorprotein notwendig ist (Ceuninck et al. 2013). So konnte beispielsweise am Glucokinase-Aktivatoren MK-0941 in einer randomisierten, doppelt verblindeten Studie an 587 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus gezeigt werden, dass es durch die Einnahme des Aktivators zu einer signifikanten Häufung von Hypoglykämien kam. Weiterhin stellte sich bei vielen Probanden eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks und der Serum-Triglycerid-Spiegel ein (Meininger et al. 2011).

Um diesen Umstand zu adressieren sind in der Vergangenheit unterschiedliche Strategien zum Einsatz gekommen. So wurde die Kristallstruktur von humanem GKR beschrieben (Pautsch et al. 2013), *GCKR*-Knock-Out-Mäuse gezüchtet (Farrelly et al. 1999; Grimsby 2000) oder die Bindungsmotive der regulatorischen Fructosephosphate dargestellt (Veiga-da-Cunha und van Schaftingen 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur Entwicklung eines besseren Verständnisses der Interaktion von GK und GKR und der damit verbundenen komplexen Änderungen im Stoffwechsel, stellt die Analyse des Genproduktes von humanen Variationen im *GCKR* dar (van de Bunt, Martijn und Gloyn 2010). Als Prototyp kann hier die häufige Mutation P446L gelten. Bei dieser konnte eine Vielzahl von Studien zeigen, dass sie mit einer signifikant verringerten Nüchtern-Glucose

einhergeht (Alfred et al. 2013; Orho-Melander et al. 2008; Perez-Martinez et al. 2011; Rees et al. 2012a; Shen et al. 2009; Vaxillaire et al. 2008) und dabei zu einer deutlichen Erhöhung der Triglyceridspiegel im Blut der Probanden führt (Alfred et al. 2013; Orho-Melander et al. 2008; Shen et al. 2009; Sotos-Prieto et al. 2013; Vaxillaire et al. 2008) und auf diese Weise auch das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöht (Johansen et al. 2010; Saxena et al. 2007).

Daher war es Ziel dieser Arbeit, aufbauend auf den Erfahrungen mit der häufigen GGRP-Variante P446L, Aussagen über Funktionsveränderungen von M344I und H438Y in HeLa bzw. Hepa 1-6 Zellen sowie primären Hepatozyten zu treffen und diese im Zusammenhang mit möglichen Strukturveränderungen zu betrachten.

4.1. Kern/Plasma-Ratio von GGRP M344I, H438Y, P446L und der GK

Aufgrund von Voruntersuchungen der Variante P446L und der hohen Datendichte bezüglich der Stoffwechselveränderungen in Probanden, lassen sich die Ergebnisse in dieser Arbeit besonders gut vergleichend einordnen und zudem zusätzliche Sicherheit bei der Interpretation der weniger untersuchten Mutation gewinnen.

So zeigte die Kern-Plasma-Ratio von P446L bei niedriger Glucosekonzentration in Hepa 1-6 Zellen eine signifikant höhere Lokalisation des GGRP im Zytoplasma. Gleichzeitig ist die Glucose-Abhängigkeit der Mutante aufgehoben. Beides galt auch in Anwesenheit der GK, welche im Gegensatz dazu bei H438Y für eine deutliche Verschiebung des Verhaltens hin zum WT sorgte. Für die ECFP-GK Ratio bei P446L ergaben sich in Hepa 1-6 noch ausgeprägtere Effekte. Dabei befinden sich die Befunde für P446L in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Rees et al. 2012a in HeLa Zellen. Demgemäß war die Glucokinase im Vergleich zum Wildtyp deutlich signifikant zytoplasmatischer lokalisiert und zeigte auch keine Reaktion auf eine veränderte Glucose-Umgebung.

Demgegenüber schwächte sich der bei der Singletransfektion für H438Y beobachtete Effekt auf die reduzierte Kernlokalisierung des Varianten-GGRP im Vergleich zum Wildtyp durch die zusätzliche Expression der Glucokinase deutlich ab. Dabei zeigte Kern/Plasma-Ratio der GK sogar ein nahezu WT-gleiches Verhalten.

Die Ergebnisse für die GK-Lokalisation von humanen P446L finden sich auch in vorherigen Arbeiten wieder und lassen sich gut in Einklang mit der bereits beschriebenen deutlich geringeren GK-GGRP-Interaktion in der FRET-Analyse bringen (Rees et al. 2012a; Rees et al. 2014; Rees et al. 2012b). Interessanterweise ließen sich die Unterschiede für die GK-

Lokalisation unter Expression von Ratten-GKRP nicht zeigen (Rees et al. 2012b). Zudem sei auf die bei hohen Proteinkonzentrationen von P446L-GKRP (bei 25 mmol/l Glucose), im Vergleich zum Wildtyp, verstärkte GK-Aktivität hingewiesen (Beer et al. 2009). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die höhere Verfügbarkeit der katalytischen Aktivität der Glucokinase zu einem gesteigerten glykolytischen Fluss führt und damit den Blutglucosespiegel im hyper- und normoglykämien Zustand senkt, sowie die Lipogenese in der Leber fördert (Raimondo et al. 2015; Santoro et al. 2015).

Auch die Ergebnisse für P446L in primären Hepatozyten, welche durch ihre physiologische Enzymausstattung als besonders aussagekräftiges Modell gelten können, spiegeln den Befund der erhöhten Verfügbarkeit von GK im Zytoplasma im Vergleich zum Wildtyp (bei 5,5 mmol/l Glucose $p < 0,01$ [t-Test]) wider und lassen sich so auch in Einklang mit beschriebenen Untersuchungen bringen (Rees et al. 2012a).

Bei der Interpretation der Untersuchungen muss jedoch der Mischeffekt aus endogener Expression von GK und GKRP in den primären Hepatozyten und der zusätzlich transfizierten Proteine bedacht werden (Publikation in Vorbereitung).

Trotzdem lässt sich in der Lokalisation von ECFP-GK in Anwesenheit von GKRP-P446L keine signifikante Abhängigkeit von der Glucosekonzentration erkennen. Dies könnte durch die verstärkte zytoplasmatische Lokalisation der GK bei bereits geringen Glucosespiegeln erklärt werden. Da sich in Hepa 1-6 Zellen ein verstärkter Glucoseumsatz für P446L und zudem ebenfalls eine verstärkte Lokalisation der GK im Zytoplasma zeigen ließ, lässt sich vermuten, dass sich die Ergebnisse der Stoffwechselanalysen auch auf das physiologischere Modell der Hepatozyten übertragen lassen.

Betrachtet man die Überstimulation mit dem Aktivator Compound A wird deutlich, dass unter Anwesenheit von EYFP-P446L-hGKRP eine noch stärkere Verschiebung der GK - als unter der hohen Glucosekonzentration - zum Zytoplasma hin erfolgt, dieser Effekt lässt sich jedoch nur in der Tendenz für Fructose zeigen.

Dabei ist es schwierig zu ermitteln, ob es sich bei der Wirkung von CpdA auf die K/P-Ratio der GK um einen durch endogenes GKRP vermittelten Effekt handelt, oder ob auch die Variante einen Einfluss ausübt. Für eine verstärkte GK-GKRP Interaktion der Varianten H438Y und P446L in Anwesenheit von CpdA spricht jedoch der deutlich reduzierte Effekt des Aktivators auf die zytoplasmatische Lokalisation der GK im Vergleich zum WT. Bedenkt man, dass CpdA die Glucokinase in die „closed“ Konfiguration zwingt und so für eine Unterbrechung der

Interaktion von GK und GKRP sorgt (Futamura et al. 2006; Kaminski et al. 2014), liegt es nahe, dass dieser Effekt für P446L und insbesondere H438Y reduziert ist.

Unter Einbeziehung dieser Überlegungen, würde die Mutation P446L die Bindung zur Glucokinase abhängig von der GK-Konfiguration modulieren. Demgemäß würde die von der Glucosekonzentration abhängige Konformationsänderung der GK an Bedeutung verlieren, da bereits im Zustand niedriger Glucose und damit eigentlich hoher Affinität der GK zum GKRP die Interaktion nachhaltig geschwächt wäre. Dazu passen Untersuchungen an primären Maushepatozyten, welche unter anderem in der FRET-Analyse eine deutlich geringere GK-GKRP Interaktion für P446L zeigen konnten (Rees et al. 2012a).

Für Fructose-1-Phosphat konnte im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen (Beer et al. 2009) für P446L zwar kein signifikanter Effekt herausgearbeitet werden, jedoch würde ggf. eine höhere Anzahl an untersuchten Zellen die sichtbare Tendenz untermauern und die Befunde von Beck und Miller 2013 insoweit stützen, dass die Störung der GKRP/GK-Interaktion direkt im GK-GKRP-Interface stattfindet. Was eine mögliche Regulation durch Fructosephosphate offen lassen könnte. Dem gegenüber steht jedoch die geringere Aktivierung der GK-GKRP-P446L-Interaktion durch F6P (Beer et al. 2009), bei unveränderter Affinität für Fructosephosphat (Rees et al. 2014).

So wird ersichtlich, dass anscheinend ein komplexer Mechanismus in der Funktionsregulierung von GKRP bestehen könnte, für den die ausschließliche Betrachtung der Interaktionsstrukturen nicht ausreichen könnte. Unter diesen Umständen würde sich ggf. ein Ansatz ergeben, Korrelation von anderen Varianten mit erhöhten Triglyceridwerten zu erklären (Beck und Miller 2013). Obwohl diese weder im Fructosephosphat-, noch im GK-Bindungsbereich liegen und normale Proteinkonzentrationen aufweisen. Dabei sollten ein nicht identifizierter Mechanismus für den Kern-Import (Rees et al. 2012b), komplexe Strukturänderungen im GKRP und die Phosphorylierung durch die AMP-abhängige Proteinkinase in die Überlegungen mit einbezogen werden (Beck und Miller 2013; Mukhtar et al. 2008). Auch gibt es Befunde bezüglich der Evolution des GKRP, welche Fragen zu möglichen zusätzlichen regulatorischen Funktionen auf andere Enzyme aufwerfen (Veiga-da-Cunha et al. 2009).

Betrachtet man die Position 438Y im GKRP, wird deutlich, dass bei dieser Mutation der Vergleich mit Funktionsveränderungen in P446L aufgrund der benachbarten Lage nahe liegt (*Abbildung 33*). Jedoch ist auffällig, dass sowohl ECFP-GK als auch EYFP-H438Y-GKRP im Rahmen der Doppelexpression verstärkt im Kern lokalisieren. Dies entspricht eher einem Wildtyp ähnlichen Verhalten (*Abbildung 15*). Und dies, obwohl für H438Y eine deutlich

geringere direkte Interaktion von GK und GKRP im Vergleich zum Wildtyp gefunden wurde (Rees et al. 2014 Suppl.). Außerdem lässt sich in Hepa 1-6 Zellen, verglichen mit der Wirkung von 25 mmol/l Glucose, keine signifikante zusätzliche Freisetzung der GK durch Fructose zeigen. Dies steht mit Befunden einer leicht geringeren Affinität zu F1P im Einklang (Rees et al. 2014). Besonders deutlich wird weiterhin der Wirkungsverlust von CpdA, welcher sich auch in primären Hepatozyten klar zeigt.

So lässt sich konkludieren, dass trotz der ähnlichen Lage von H438Y und P446L, es bei ersterer nicht allgemein zur geringeren Interaktion von GK und GKRP kommt, sondern vielmehr die Regulation über F1P gestört ist. Auch verliert die von Fructose-Phosphaten unabhängige Stimulation zur „closed“ Konformation der GK durch CpdA ihre Wirkung. So lassen sich Vermutungen über die Strukturveränderung der Mutation stellen. Verursacht das Tyrosin in Position 438 möglicherweise eine gesteigerte Bindungsfähigkeit des GKRP zur GK auch in der „closed“ Konformation oder erschwert H438Y die Bindung von CpdA an bereits komplexierte Glucokinase? Gegen die erste These spricht, dass eine Hemmung der GK-GKRP-Interaktion, wenn auch im abgeschwächten Maße, durch hohe Konzentrationen an Glucose möglich ist. Dennoch fehlt dieser Effekt für CpdA und die gezeigte Verschiebung der GK in primären Hepatozyten in Richtung Zytoplasma mag von dem nivellierenden Effekt des endogenen GKRP stammen. Gegen die Möglichkeit einer für die beiden Thesen notwendigen Strukturveränderung spricht ein Alignment aus Wildtyp und der I-TASSER Strukturvorhersage für H438Y (Daten nicht gezeigt). Hier lassen sich keine wesentlichen Veränderungen der Konformation finden (bis auf ein etwas kürzeres β -Faltblatt im Bereich Y438). Bedenkt man aber, dass der Vorhersagealgorithmus von I-TASSER auf ähnlichen in der PDB hinterlegten Daten beruht, ist dies nicht weiter verwunderlich. So sollte die erste These, gerade bei Betrachtung der Sekundärstruktur (*Abbildung 28*), nicht ausgeschlossen werden.

Daraus ergeben sich interessante Fragen für die medikamentöse Beeinflussung des GK-GKRP-Interface. Denn obwohl Y438 nicht in einem bekannten Bereich für die Bindung von Fructose-Phosphaten liegt (Seite 9), ergeben sich doch Veränderungen in deren Steuerungswirkung. Dies würde bedeuten, dass die Wirkung von Molekülen, welche die GK-GKRP-Interaktion stören, putativ über eine simple Erhöhung der GK-Konzentration im Zytoplasma hinausgehen könnte und ggf. die physiologische Regulation, auf noch nicht ausreichend geklärte, tiefgreifende Art beeinflussen. Hier ist auch der von Casey und Miller 2016 beschriebene zweistufige Mechanismus interessant: Wie und in welcher Konstellation beeinflusst ein Wirkstoff, bzw. eine Mutation die GK-GKRP Interaktion?

Dies bekäme gerade dadurch zusätzliche Bedeutung, da der erhöhte Glucose-Flux, welcher zur Senkung des Blutglucosespiegels in der Therapie des Typ 2 Diabetes gewünscht ist (Lloyd et al. 2013), über die Synthese von Glucose-6-phosphat auch die Lipogenese steigern könnte. Ist nun die regulatorische Funktion der Fructosephosphate verändert, könnte sich eine Aggravation der Hypertriglyceridämie einstellen.

Dennoch weisen erste Untersuchungen an dem GKRP-modulierenden Wirkstoff AMG-1694 (Seite 14), anders als erwartet, bei ZDF-Ratten keine Erhöhung der Triglyceridwerte auf (Lloyd et al. 2013). Da aber auch hier noch der genaue Wirkmechanismus offenbleibt, scheint es lohnend, sich auch in Bezug auf die Vielzahl neuer GKRP-Modulatoren, mit der Wirkung von GKRP-Varianten auseinanderzusetzen. Dabei kann man jene mit bekannten Strukturmodellen von Pautsch et al. 2013 bzw. Beck und Miller 2013, ähnlich wie es für die Entwicklung neuer GKRP-Wirkstoffe als ratsam beschrieben wurde (Raimondo et al. 2015), vergleichen. Besonders nützlich wäre hierbei die kristallografische Darstellung von gut beschriebenen Varianten wie P446L. Dies wäre auch hilfreich für eine Vorhersage möglicher Interaktionen von neuen Wirkstoffkandidaten mit häufigen Mutationen des GKRP, welche die Sicherheit des Modulators in großen Stichproben beeinflussen könnten. Wie verhalten sich also GKRP Mutationen wie P446L unter einer Therapie mit GK-Aktivatoren (Santoro et al. 2015) und könnte eine Genotyp-abhängige Therapie nützlich sein (Raimondo et al. 2015)?

Um für die Vielzahl an neu beschriebenen Mutationen valide Aussagen bezüglich Risiko und Therapieanpassung zu treffen, sind folglich noch viele Fragen offen und es wird nicht einfach werden, eine Brücke von der Genom-Sequenzierung zur Funktion, sowie medizinischen Relevanz zu schlagen (Rees et al. 2012b). Jedoch zeigt sich für das Leitmodell P446L bereits heute, dass beispielsweise eine Risikostratifizierung für die Entwicklung einer nicht alkoholischen Fettleber-Erkrankung (NAFLD) bei Typ 2 Diabetes Patienten, mittels Genotypisierung, durchaus sinnvoll sein könnte (Petit et al. 2015).

Für die Variante M344I lassen sich weniger schlüssige Erkenntnisse aus den gewonnenen Daten ziehen. Jedoch könnte diese Mutation auch auf die NAD^+ abhängige Regulation der GKRP Bindungseigenschaften über Sirt2 indirekt Einfluss nehmen (*Abbildung 32*). Eine gestörte Acetylierung oder eine Förderung der Deacetylierung an Position K126 könnte die bei 5,5 mmol/l Glucose reduzierte GK-GKRP-Interaktion in der FRETN-Analyse erklären. Dies würde wiederum eine gesteigerte hepatische Glucoseaufnahme begründen (Watanabe et al. 2018).

4.2. Proteinexpression von GKR P446L und H438Y im Vergleich zum Wildtyp

Um die Bedeutung der oben genannten Veränderung der Kern/Plasma-Ratio und des Glucose- bzw. Triglyceridstoffwechsels richtig einordnen zu können, ist eine Untersuchung der Proteinexpression der humanen GKR-Varianten im Vergleich zum Wildtyp notwendig.

Eine durch die SNPs gesteigerte oder gehemmte Transkription des *GCKR*-Gens könnte schon allein für die Stoffwechsellafälligkeiten in den betroffenen Patienten verantwortlich sein. Wird eine Mutante weniger transkribiert, würde wahrscheinlich auch die Proteinkonzentration des GKR niedriger ausfallen. Folglich ist die Glucokinase verstärkt im Zytoplasma vorhanden und kann aufgrund der verringerten physiologischen Inhibierung für einen gesteigerten Glucoseflux sorgen. Demnach sind die K/P-Ratios, ebenso wie die Metabolite betroffen. Ebensoes gilt auch für einen gesteigerten oder verlangsamten Proteinumsatz, welcher unter anderem durch eine veränderte Acetylierung, Ubiquitinierung oder subzelluläre Lokalisation des GKR erklärt werden könnte (Park et al. 2015). Dabei muss zusätzlich bedacht werden, dass eine wechselseitige Interaktion bzw. Stabilisierung von GK und GKR auch auf die Glucokinase wirken könnte.

Die funktionellen Thesen stützend, zeigten sich im Western Blot mit dem Strukturprotein Actin im Vergleich keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression von EYFP-WT-hGKR, EYFP-P446L-hGKR und EYFP-H438Y-hGKR. Dies steht im Kontrast zu vorherigen Befunden (Rees et al. 2014). So ist für H438Y und P466L, jedoch in COS-7-Zellen, eine geringere Proteinexpression beschrieben. Dies ist auch dadurch nicht irrelevant, da sich auch die Vergleichsproteine zur Normalisierung durchaus ähnlich sind. Alpha-Tubulin und Actin sind beides Strukturproteine der eukaryontischen Zelle und in ihrer Expression weniger abhängig von kurzfristigen Stoffwechseländerungen (Johnson 2013).

4.3. Kurzfristige Änderung des Zellstoffwechsels durch GKR P446L und H438Y

Um eine Verbindung zwischen den Lokalisationen von GKR-Varianten und deren metabolischen Veränderungen zu untersuchen, bietet es sich an, die kurzfristigen Veränderungen im Zellstoffwechsel von mit entsprechenden GKR-Mutanten transfizierten Hepa 1-6 Zellen näher zu beschreiben. So lässt sich das gemeinsame Auftreten von verschiedenen Krankheitsentitäten und den entsprechenden metabolischen Veränderungen

mithilfe der GKR-Mutationen besser einordnen und ein Bild von der Interaktion zwischen Struktur und Funktion des GKR zeichnen.

Der Einfluss von *GCKR* P446L auf die Nüchtern-glucose und den Triglyceridspiegel ist vielfältig belegt (Seite 64), die Steigerung der de novo Lipogenese nachgewiesen (Santoro et al. 2015) (*Abbildung 36*) und sollte als unabhängiger Risikofaktor für Hypertriglyceridämie bei homozygoten Genträgern beachtet werden (Castro-Orós et al. 2014). Entsprechend konnte auch im Hepa 1-6 Zellmodell eine gesteigerte Triglyceridsynthese für mit EYFP-P446L-hGKR transfizierten Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 23*).

Weiter ließ sich bei Typ 2 Diabetes Patienten zeigen, dass ein von BMI, Triglyceridwerten und Alter unabhängiger Zusammenhang zwischen der *GCKR* Variante P446L und dem Fettgehalt der Leber besteht (Petit et al. 2015). Dies ließe sich gut mit dem im Zellmodell gesteigerten Glucoseumsatz in Einklang bringen (*Abbildung 22*).

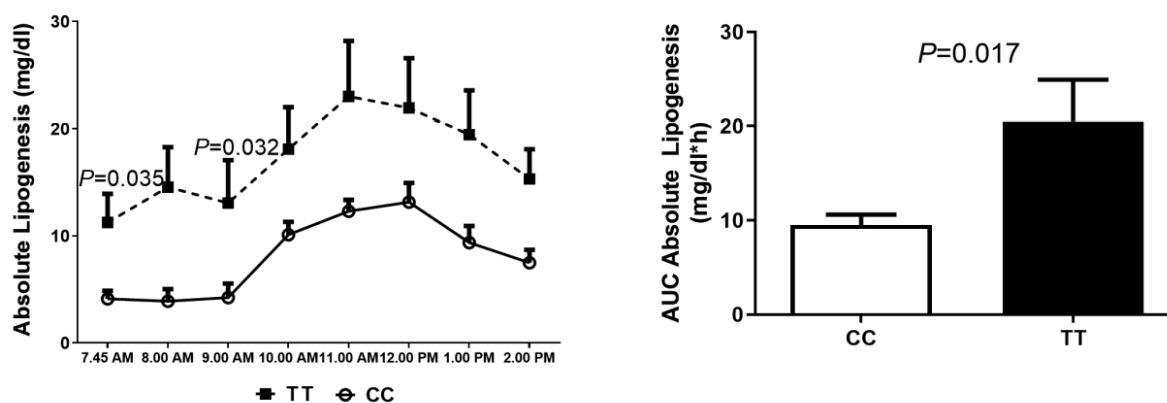


Abbildung 36 Absolute Lipogenese in homozygoten Trägern der Mutation P446L (TT) und in der Vergleichsgruppe (CC) im Verlauf des Tages bzw. als area under the curve (AUC), nachgewiesen in vivo mittels stabiler Isotope. Die gestrichelte Linie stellt P446L, die durchgezogene die Kontrollgruppe dar (Santoro et al. 2015).

Aber auch weniger naheliegende Metabolite sind in Patienten mit dieser Mutation signifikant verändert. Beispielsweise wurde beschrieben, dass die *GCKR*-Variante P446L auch mit einer Erhöhung der Serumurat-Werte (teils widersprüchliche Bewertung - Chambers et al. 2011; Brouwers et al. 2015), sowie mit einem gesteigerten Risiko Gicht zu entwickeln, einhergeht (Köttgen et al. 2013; Matsuo et al. 2015). Auch ließ sich eine Korrelation zu erhöhten γ -GT Plasmawerten und gesteigerten Pyruvatkonzentrationen ermitteln (Chambers et al. 2011). Pyruvat wird dadurch besonders interessant, da es am Ende der Glykolyse steht bzw. Substrat für den Citrat-Zyklus ist und so auch als Zwischenschritt zur Lipogenese betrachtet werden kann. Außerdem kann es unter Sauerstoffmangel zu Laktat reduziert werden, welches

wiederum bei der leitliniengerechten und noch weit verbreiteten Therapie des Typ 2 Diabetes mit Metformin, auf Grund der Gefahr von Laktatazidosen, von Bedeutung für die Patientensicherheit ist (Brouwers et al. 2015; Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft et al. 2013).

4.4. Ausblick

Struktur- und Stoffwechsellanalysen von GKRP-Mutationen können wertvolle Einblicke in die komplexe Interaktion der Glucokinase mit dem GKRP und damit in einen wichtigen Teil des Stoffwechsels der Leber liefern. So verdeutlichen Erkenntnisse zur komplexen Regulierung dieser Interaktion, beispielsweise NAD⁺-abhängig mittels Sirtuin 2 (Watanabe et al. 2018; Park et al. 2015), dass noch Forschungsbedarf zum besseren Verständnis des hepatischen Glucose-Metabolismus besteht. Hier könnten auch in Zukunft, neben kristallografischen Analysen entsprechender Proteininteraktionen oder gezielten Modulationen mittels GKRP/GK-Aktivatoren, Funktionsanalysen neuer GKRP-Varianten von Nutzen sein. So könnten insbesondere Mutationen im Bereich der α -Helix um die Position K126 nützliche Erkenntnisse zur endogenen Regulation liefern, welche schließlich auch in die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze des Diabetes mellitus münden könnten.

Zusammenfassung

Die Inzidenz von Stoffwechselerkrankungen und insbesondere des Diabetes mellitus Typ 2 steigt seit Jahren kontinuierlich. Neue medikamentöse Therapieansätze stehen daher im Fokus der Forschung. Die Modulation der Aktivität der Glucokinase (GK), des Glucokinase-Regulatorproteins (GKRP) oder deren Interaktion könnte ein möglicher Weg sein. Das hauptsächlich in den Beta-Zellen des Pankreas und in der Leber exprimierte Enzym GK ist für die Glucose Homöostase im menschlichen Organismus essenziell. Neben genregulatorischen Effekten erfolgt die Modulation der GK-Aktivität maßgeblich auf Proteinebene. Dabei ist das GKRP, welches in Hepatozyten bei niedriger Glucosekonzentration die GK hemmt und in den Zellkern importiert, von entscheidender Bedeutung. Die Eigenschaften des GKRP zu verändern könnte aber auch Risiken bergen, da Mutationen des Proteins beim Menschen nicht nur zu Änderungen der Nüchtern-Glucose, sondern auch der Triglycerid-Spiegel im Serum führen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die ausgewählten GKRP-Varianten H438Y, M344I, P446L und M344I-P446L näher zu beschreiben. Dabei wurde die zelluläre Lokalisation von GKRP-Fluoreszenzfusionsproteinen in HeLa bzw. Hepa 1-6 Zellen vergleichend zum WT betrachtet und die Interaktionsstärke zur GK in primären Hepatozyten untersucht. In Hepa 1-6 Zellen wurde weiterhin die veränderte Glucoseaufnahme und Triglycerid-Synthese von P446L und H438Y analysiert und der Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der GK beschrieben. Abschließend erfolgte mittels der Software PyMOL die Simulation von Strukturänderungen der Varianten. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum WT die Mutationen H438Y, M344I und M344I-P446L zu einer geringeren Interaktion mit der GK führen. Die GKRP-Lokalisation war nicht nur vom untersuchten Zelltyp, sondern auch von der Co-Expression der GK abhängig. Für P446L und H438Y ließ sich eine gesteigerte Glucoseaufnahme und Triglycerid-Synthese ermitteln. Damit korrelierte das *in vitro* Verhalten mit den klinischen Befunden der Patienten mit der GKRP-Mutation P446L. Fructose oder ein synthetischer GK-Aktivator wirkten auf die GK Lokalisation in Hepatozyten je nach exprimierter GKRP Variante unterschiedlich. In Gegenwart von P446L und insbesondere H438Y wurde hierbei deutlich weniger GK ins Zytoplasma transloziert als mit WT-GKRP.

Bei der Entwicklung von neuen Antidiabetika hilft das Wissen um den Einfluss von Varianten auf das Verhalten des GKRP Proteins. Hierdurch können Moleküldatenbanken zweistufig nach der gewünschten Modulation auf die Glucose Homöostase unter Ausschluss von Kandidaten mit negativem Verhalten auf den Triglyceridhaushalt durchsucht werden.

Thesen

Das Glucokinase-Regulatorprotein (GKRP) moduliert durch Interaktion mit dem Enzym Glucokinase (GK) nicht nur den Glucose-Stoffwechsel in der Leber, sondern ebenfalls die Triglycerid Homöostase.

Die beim Menschen identifizierten GKRP Mutationen H438Y, M344I und M344I-P446L weisen in Hepatozyten insbesondere bei niedriger Glucosekonzentration eine im Vergleich zum WT geringere Interaktion zur GK auf.

Die Verteilung des GKRP Proteins zwischen Kern und Zytoplasma ist bei den Mutationen vom Zelltyp und der gleichzeitigen Expression der GK abhängig.

Der Aminosäureaustausch zum Isoleucin an Position 344 könnte strukturell zu einem Verlust der Fructosephosphat Regulation des GKRP führen. Hierdurch lässt sich die invers zum WT stärkere Kernlokalisation bei hoher Glucosekonzentration bei sonst kaum verändertem Verhalten erklären.

Die Doppelmutation M344I-P446L besitzt dahingehend ein ähnliches Verhalten wie die häufige GKRP P446L Mutation.

Die GKRP P446L Mutation zeigt eine geringere Kernlokalisation als der WT. Bedingt durch die Leucin-induzierte Strukturveränderung im GKRP, wird die GK nur noch abhängig von Fructosephosphat und einem chemischen Aktivator in ihrem Translokationsverhalten zwischen Kern und Zytoplasma beeinflusst, aber nicht mehr abhängig von Glucose.

Die GKRP P446L Mutation führt zu einer erhöhten Glucoseaufnahme und Triglycerid-Synthese in den Hepatom-Zellen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Hypertriglyceridämie und erniedrigter Nüchtern-Blutglucose in GKRP P446L Mutationsträgern.

Die GKRP H483Y Mutation zeigt eine der P446L Mutation ähnliche geringere Kernlokalisation im Vergleich zum WT. Kollisionen durch die Aminosäure Tyrosin bedingen hier aber einen Verlust der Fructosephosphat- und Aktivator-abhängigen Translokation der GK ins Zytoplasma. Die Abhängigkeit von Glucose bleibt dagegen bestehen.

Die GKRP H438Y Mutation induziert insbesondere bei hoher Glucosekonzentration ebenfalls eine erhöhte Glucoseaufnahme und Triglycerid-Synthese in den Hepatom-Zellen.

Das Wissen um die Auswirkung von GGRP Mutationen auf die GK-GGRP Interaktion ist essentiell, um leberspezifische Therapeutika weiterzuentwickeln, die den Blutglucosespiegel senken, ohne den Triglycerid-Stoffwechsel negativ zu beeinflussen.

Literaturverzeichnis

Alfred, Tamuno; Ben-Shlomo, Yoav; Cooper, Rachel; Hardy, Rebecca; Deary, Ian J.; Elliott, Jane et al. (2013): Associations between a polymorphism in the pleiotropic GCKR and Age-related phenotypes: the HALCyon programme. In: *PloS one* 8 (7), S. e70045. DOI: 10.1371/journal.pone.0070045.

American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (1988): Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. Unter Mitarbeit von S. Lenzen, S. Freytag und U. Panten. Online verfügbar unter <http://molpharm.aspetjournals.org/content/34/3/395.abstract>, zuletzt aktualisiert am 01.09.1988, zuletzt geprüft am 26.07.2014.

Anderka, Oliver; Boyken, Janina; Aschenbach, Ursula; Batzer, Andreas; Boscheinen, Oliver; Schmoll, Dieter (2008): Biophysical characterization of the interaction between hepatic glucokinase and its regulatory protein: impact of physiological and pharmacological effectors. In: *J. Biol. Chem.* 283 (46), S. 31333–31340. DOI: 10.1074/jbc.M805434200.

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft; Deutsche Diabetes Gesellschaft; Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin; Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin; Verband der Diabetesberatungs- und Schulungsberufe Deutschland; Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (2013): Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes - Langfassung, 1. Auflage: Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), zuletzt geprüft am 10.11.2015.

Ashton, Kate S.; Andrews, Kristin L.; Bryan, Marion C.; Chen, Jie; Chen, Kui; Chen, Michelle et al. (2014): Small Molecule Disruptors of the Glucokinase–Glucokinase Regulatory Protein Interaction: 1. Discovery of a Novel Tool Compound for in Vivo Proof-of-Concept. In: *J. Med. Chem.* 57 (2), S. 309–324. DOI: 10.1021/jm4016735.

Baltrusch, S.; Francini, F.; Lenzen, S.; Tiedge, M. (2005): Interaction of Glucokinase With the Liver Regulatory Protein Is Conferred by Leucine-Asparagine Motifs of the Enzyme. In: *Diabetes* 54 (10), S. 2829–2837. DOI: 10.2337/diabetes.54.10.2829.

- Baltrusch, S.; Lenzen, S.; Okar, D. A.; Lange, A. J.; Tiedge, M. (2001): Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. In: *J. Biol. Chem.* 276 (47), S. 43915–43923. DOI: 10.1074/jbc.M105470200.
- Bansal, Pritpal; Wang, Qinghua (2008): Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (4), S. 61. DOI: 10.1152/ajpendo.90295.2008.
- Bateman, Alex (1999): The SIS domain. A phosphosugar-binding domain. In: *Trends in Biochemical Sciences* 24 (3), S. 94–95. DOI: 10.1016/S0968-0004(99)01357-2.
- Beck, Tobias; Miller, Brian G. (2013): Structural basis for regulation of human glucokinase by glucokinase regulatory protein. In: *Biochemistry* 52 (36), S. 6232–6239. DOI: 10.1021/bi400838t.
- Beer, Nicola L.; Tribble, Nicholas D.; McCulloch, Laura J.; Roos, Charlotta; Johnson, Paul R V; Orho-Melander, Marju; Gloyn, Anna L. (2009): The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. In: *Hum. Mol. Genet.* 18 (21), S. 4081–4088. DOI: 10.1093/hmg/ddp357.
- Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. (1995): A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo. Polyethylenimine. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (16), S. 7297–7301.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* 72, S. 248–254.
- Brissault, Blandine; Kichler, Antoine; Guis, Christine; Leborgne, Christian; Danos, Olivier; Cheradame, Hervé (2003): Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. In: *Bioconjugate chemistry* 14 (3), S. 581–587. DOI: 10.1021/bc0200529.
- Brocklehurst, Katy J.; Davies, Rick A.; Agius, Lorraine (2004a): Differences in regulatory properties between human and rat glucokinase regulatory protein. In: *Biochem. J.* 378 (Pt 2), S. 693–697. DOI: 10.1042/BJ20031414.

Brocklehurst, Katy J.; Payne, Victoria A.; Davies, Rick A.; Carroll, Debra; Vertigan, Helen L.; Wightman, Heather J. et al. (2004b): Stimulation of Hepatocyte Glucose Metabolism by Novel Small Molecule Glucokinase Activators. In: *Diabetes* 53 (3), S. 535–541. DOI: 10.2337/diabetes.53.3.535.

Brouwers, Martijn C G J; Jacobs, Chantal; Bast, Aalt; Stehouwer, Coen D. A.; Schaper, Nicolaas C. (2015): Modulation of Glucokinase Regulatory Protein: A Double-Edged Sword? In: *Trends in molecular medicine* 21 (10), S. 583–594. DOI: 10.1016/j.molmed.2015.08.004.

Brown, K. S.; Kalinowski, S. S.; Megill, J. R.; Durham, S. K.; Mookhtiar, K. A. (1997): Glucokinase Regulatory Protein May Interact With Glucokinase in the Hepatocyte Nucleus. In: *Diabetes* 46 (2), S. 179–186. DOI: 10.2337/diab.46.2.179.

Casey, Ashley K.; Miller, Brian G. (2016): Kinetic Basis of Carbohydrate-Mediated Inhibition of Human Glucokinase by the Glucokinase Regulatory Protein. In: *Biochemistry* 55 (21), S. 2899–2902. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00349.

Castro-Orós, Isabel de; Cenarro, Ana; Tejedor, María Teresa; Baila-Rueda, Lucía; Mateo-Gallego, Rocío; Lamiquiz-Moneo, Itziar et al. (2014): Common genetic variants contribute to primary hypertriglyceridemia without differences between familial combined hyperlipidemia and isolated hypertriglyceridemia. In: *Circulation. Cardiovascular genetics* 7 (6), S. 814–821. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000522.

Ceuninck, Frédéric de; Kargar, Catherine; Ilic, Catherine; Caliez, Audrey; Rolin, Jean-Olivier; Umbdenstock, Thierry et al. (2013): Small molecule glucokinase activators disturb lipid homeostasis and induce fatty liver in rodents: a warning for therapeutic applications in humans. In: *British journal of pharmacology* 168 (2), S. 339–353. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02184.x.

Chambers, John C.; Zhang, Weihua; Sehmi, Joban; Li, Xinzhong; Wass, Mark N.; van der Harst, Pim et al. (2011): Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. In: *Nature genetics* 43 (11), S. 1131–1138. DOI: 10.1038/ng.970.

Choi, Jung Min; Seo, Moon-Hyeong; Kyeong, Hyun-Ho; Kim, Eunkyung; Kim, Hak-Sung (2013): Molecular basis for the role of glucokinase regulatory protein as the allosteric switch for glucokinase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (25), S. 10171–10176. DOI: 10.1073/pnas.1300457110.

- Compton, Steve J.; Jones, Clive G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. In: *Analytical Biochemistry* 151 (2), S. 369–374. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90190-3.
- Cullen, Kirsty S.; Al-Oanzi, Ziad H.; O'Harte, Finbarr P M; Agius, Lorraine; Arden, Catherine (2014): Glucagon induces translocation of glucokinase from the cytoplasm to the nucleus of hepatocytes by transfer between 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-2 and the glucokinase regulatory protein. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (6), S. 1123–1134. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.02.006.
- Darlington, G. J. (1987): Liver cell lines. In: *Methods in enzymology* 151, S. 19–38.
- Darlington, G. J.; Bernhard, H. P.; Miller, R. A.; Ruddle, F. H. (1980): Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. In: *Journal of the National Cancer Institute* 64 (4), S. 809–819.
- Dupuis, Josée; Langenberg, Claudia; Prokopenko, Inga; Saxena, Richa; Soranzo, Nicole; Jackson, Anne U. et al. (2010): New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. In: *Nature genetics* 42 (2), S. 105–116. DOI: 10.1038/ng.520.
- Farrelly, D.; Brown, K. S.; Tieman, A.; Ren, J.; Lira, S. A.; Hagan, D. et al. (1999): Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25), S. 14511–14516.
- Fernández-Novell, J. M.; Castel, S.; Bellido, D.; Ferrer, J. C.; Vilaró, S.; Guinovart, J. J. (1999): Intracellular distribution of hepatic glucokinase and glucokinase regulatory protein during the fasted to refeed transition in rats. In: *FEBS Lett.* 459 (2), S. 211–214.
- Futamura, Mayumi; Hosaka, Hideka; Kadotani, Akito; Shimazaki, Hiroko; Sasaki, Kaori; Ohyama, Sumika et al. (2006): An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (49), S. 37668–37674. DOI: 10.1074/jbc.M605186200.
- Grimsby, J. (2000): Characterization of Glucokinase Regulatory Protein-deficient Mice. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (11), S. 7826–7831. DOI: 10.1074/jbc.275.11.7826.

- Grimsby, Joseph; Sarabu, Ramakanth; Corbett, Wendy L.; Haynes, Nancy-Ellen; Bizzarro, Fred T.; Coffey, John W. et al. (2003): Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. In: *Science* 301 (5631), S. 370–373. DOI: 10.1126/science.1084073.
- Heidemann, C.; Du, Y.; Schubert, I.; Rathmann, W.; Scheidt-Nave, C. (2013): Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56 (5-6), S. 668–677. DOI: 10.1007/s00103-012-1662-5.
- Heredia, Vladi V.; Thomson, Jim; Nettleton, David; Sun, Shaoxian (2006): Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: transient kinetic analysis. In: *Biochemistry* 45 (24), S. 7553–7562. DOI: 10.1021/bi060253q.
- Hiskett, Erin K.; Suwitheecon, Orn-Usa; Lindbloom-Hawley, Sara; Boyle, Daniel L.; Schermerhorn, Thomas (2009): Lack of glucokinase regulatory protein expression may contribute to low glucokinase activity in feline liver. In: *Veterinary research communications* 33 (3), S. 227–240. DOI: 10.1007/s11259-008-9171-6.
- Huang, Min; Lu, Shaoyong; Shi, Ting; Zhao, Yaxue; Chen, Yingyi; Li, Xiaobai et al. (2013): Conformational transition pathway in the activation process of allosteric glucokinase. In: *PLoS ONE* 8 (2), S. e55857. DOI: 10.1371/journal.pone.0055857.
- International Diabetes Federation (2015): IDF Diabetes Atlas, 7th edn. International Diabetes Federation. Brussels, Belgium. Online verfügbar unter <http://www.diabetesatlas.org/>, zuletzt geprüft am 01.12.15.
- Iynedjian, P. B. (1993): Mammalian glucokinase and its gene. In: *Biochem. J.* 293 (Pt 1), S. 1–13.
- Iynedjian, P. B. (2009): Molecular physiology of mammalian glucokinase. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (1), S. 27–42. DOI: 10.1007/s00018-008-8322-9.
- Iynedjian, P. B.; Roth, R. A.; Fleischmann, M.; Gjinovci, A. (2000): Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. In: *Biochem. J.* 351 Pt 3, S. 621–627.
- Jetton, T. L.; Liang, Y.; Pettepher, C. C.; Zimmerman, E. C.; Cox, F. G.; Horvath, K. et al. (1994): Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and

identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. In: *J. Biol. Chem.* 269 (5), S. 3641–3654.

Jetton, T. L.; Shiota, M.; Knobel, S. M.; Piston, D. W.; Cherrington, A. D.; Magnuson, M. A. (2001): Substrate-induced nuclear export and peripheral compartmentalization of hepatic glucokinase correlates with glycogen deposition. In: *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 2 (3), S. 173–186.

Jin, Lian; Zeng, Xin; Liu, Ming; Deng, Yan; He, Nongyue (2014): Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers. In: *Theranostics* 4 (3), S. 240–255. DOI: 10.7150/thno.6914.

Johansen, Christopher T.; Wang, Jian; Lanktree, Matthew B.; Cao, Henian; McIntyre, Adam D.; Ban, Matthew R. et al. (2010): Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. In: *Nature genetics* 42 (8), S. 684–687. DOI: 10.1038/ng.628.

Johnson, Mary (2012): Loading Controls for Western Blots. In: *MATER METHODS* 2. DOI: 10.13070/mm.en.2.114.

Johnson, Mary (2013): Beta Actin Antibody Review and FAQs. In: *MATER METHODS* 3. DOI: 10.13070/mm.en.3.179.

Kamata, Kenji; Mitsuya, Morihiro; Nishimura, Teruyuki; Eiki, Jun-Ichi; Nagata, Yasufumi (2004): Structural Basis for Allosteric Regulation of the Monomeric Allosteric Enzyme Human Glucokinase. In: *Structure* 12 (3), S. 429–438. DOI: 10.1016/j.str.2004.02.005.

Kaminski, Martin Tobias; Schultz, Julia; Waterstradt, Rica; Tiedge, Markus; Lenzen, Sigurd; Baltrusch, Simone (2014): Glucose-induced dissociation of glucokinase from its regulatory protein in the nucleus of hepatocytes prior to nuclear export. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (3), S. 554–564. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.002.

Kaur, Jaspinder (2014): A comprehensive review on metabolic syndrome. In: *Cardiology research and practice* 2014, S. 943162. DOI: 10.1155/2014/943162.

Köttgen, Anna; Albrecht, Eva; Teumer, Alexander; Vitart, Veronique; Krumsiek, Jan; Hundertmark, Claudia et al. (2013): Genome-wide association analyses identify 18 new loci

associated with serum urate concentrations. In: *Nature genetics* 45 (2), S. 145–154. DOI: 10.1038/ng.2500.

Lelimosin, Mickaël; Noirclerc-Savoie, Marjolaine; Lazareno-Saez, Christelle; Paetzold, Bernhard; Le Vot, Sophie; Chazal, Richard et al. (2009): Intrinsic dynamics in ECFP and Cerulean control fluorescence quantum yield. In: *Biochemistry* 48 (42), S. 10038–10046. DOI: 10.1021/bi901093w.

Liu, Shenping; Ammirati, Mark J.; Song, Xi; Knafels, John D.; Zhang, Jeff; Greasley, Samantha E. et al. (2012): Insights into mechanism of glucokinase activation: observation of multiple distinct protein conformations. In: *J. Biol. Chem.* 287 (17), S. 13598–13610. DOI: 10.1074/jbc.M111.274126.

Lloyd, David J.; St Jean, David J.; Kurzeja, Robert J M; Wahl, Robert C.; Michelsen, Klaus; Cupples, Rod et al. (2013): Antidiabetic effects of glucokinase regulatory protein small-molecule disruptors. In: *Nature* 504 (7480), S. 437–440. DOI: 10.1038/nature12724.

Magnuson, M. A. (1990): Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. In: *Diabetes* 39 (5), S. 523–527.

Marfori, Mary; Mynott, Andrew; Ellis, Jonathan J.; Mehdi, Ahmed M.; Saunders, Neil F W; Curmi, Paul M. et al. (2010): Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (9), S. 1562–1577. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.013.

Matschinsky, F. M. (1990): Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. In: *Diabetes* 39 (6), S. 647–652.

Matschinsky, F. M. (1996): Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. In: *Diabetes* 45 (2), S. 223–241.

Matschinsky, Franz M. (2009): Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. In: *Nat Rev Drug Discov* 8 (5), S. 399–416. DOI: 10.1038/nrd2850.

Matsuo, Hiroataka; Yamamoto, Ken; Nakaoka, Hirofumi; Nakayama, Akiyoshi; Sakiyama, Masayuki; Chiba, Toshinori et al. (2015): Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. In: *Annals of the rheumatic diseases*. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206191.

McGarry, J. D.; Brown, N. F. (1997): The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system - From concept to molecular analysis. In: *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* 244 (1), S. 1–14.

McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N. et al. (2013): Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. In: *Nucleic acids research* 41 (W1), W597-W600. DOI: 10.1093/nar/gkt376.

Meininger, Gary E.; Scott, Russell; Alba, Maria; Shentu, Yue; Luo, Edmund; Amin, Himal et al. (2011): Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes. In: *Diabetes Care* 34 (12), S. 2560–2566. DOI: 10.2337/dc11-1200.

Meulenaere, Evelien de; Nguyen Bich, Ngan; Wergifosse, Marc de; van Hecke, Kristof; van Meervelt, Luc; Vanderleyden, Jozef et al. (2013): Improving the second-order nonlinear optical response of fluorescent proteins: the symmetry argument. In: *Journal of the American Chemical Society* 135 (10), S. 4061–4069. DOI: 10.1021/ja400098b.

Middleton, R. J. (1990): Hexokinases and glucokinases. In: *Biochem. Soc. Trans.* 18 (2), S. 180–183.

Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D. (1996): Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (22), S. 12349–12354.

Mukhtar, Mohammed H.; Payne, Victoria A.; Arden, Catherine; Harbottle, Andrew; Khan, Salmaan; Lange, Alex J.; Agius, Lorraine (2008): Inhibition of glucokinase translocation by AMP-activated protein kinase is associated with phosphorylation of both GKRP and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294 (3), S. 74. DOI: 10.1152/ajpregu.00593.2007.

Murphy, R.; Tura, A.; Clark, P. M.; Holst, J. J.; Mari, A.; Hattersley, A. T. (2009): Glucokinase, the pancreatic glucose sensor, is not the gut glucose sensor. In: *Diabetologia* 52 (1), S. 154–159. DOI: 10.1007/s00125-008-1183-9.

Nagai, Takeharu; Ibata, Keiji; Park, Eun Sun; Kubota, Mie; Mikoshiba, Katsuhiko; Miyawaki, Atsushi (2002): A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. In: *Nature biotechnology* 20 (1), S. 87–90. DOI: 10.1038/nbt0102-87.

Orho-Melander, Marju; Melander, Olle; Guiducci, Candace; Perez-Martinez, Pablo; Corella, Dolores; Roos, Charlotta et al. (2008): Common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. In: *Diabetes* 57 (11), S. 3112–3121. DOI: 10.2337/db08-0516.

Pautsch, Alexander; Stadler, Nadja; Löhle, Adelheid; Rist, Wolfgang; Berg, Adina; Glocker, Lucia et al. (2013): Crystal Structure of Glucokinase Regulatory Protein. In: *Biochemistry* 52 (20), S. 3523–3531. DOI: 10.1021/bi4000782.

Perez-Jimenez, R.; Garcia-Manyes, S.; Ainarvarapu, S. R. K.; Fernandez, J. M. (2006): Mechanical Unfolding Pathways of the Enhanced Yellow Fluorescent Protein Revealed by Single Molecule Force Spectroscopy. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (52), S. 40010–40014. DOI: 10.1074/jbc.M609890200.

Perez-Martinez, Pablo; Delgado-Lista, Javier; Garcia-Rios, Antonio; Mc Monagle, Jolene; Gulseth, Hanne L.; Ordovas, Jose M. et al. (2011): Glucokinase regulatory protein genetic variant interacts with omega-3 PUFA to influence insulin resistance and inflammation in metabolic syndrome. In: *PloS one* 6 (6), S. e20555. DOI: 10.1371/journal.pone.0020555.

Petit, Jean-Michel; Masson, David; Guiu, Boris; Rollot, Fabien; Duvillard, Laurence; Bouillet, Benjamin et al. (2015): GCKR polymorphism influences liver fat content in patients with type 2 diabetes. In: *Acta diabetologica*. DOI: 10.1007/s00592-015-0766-4.

Pollin, Toni I.; Jablonski, Kathleen A.; McAteer, Jarred B.; Saxena, Richa; Kathiresan, Sekar; Kahn, Steven E. et al. (2011): Triglyceride response to an intensive lifestyle intervention is enhanced in carriers of the GCKR Pro446Leu polymorphism. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96 (7), S. 7. DOI: 10.1210/jc.2010-2324.

Postic, C.; Shiota, M.; Niswender, K. D.; Jetton, T. L.; Chen, Y.; Moates, J. M. et al. (1999): Dual Roles for Glucokinase in Glucose Homeostasis as Determined by Liver and Pancreatic Cell-specific Gene Knock-outs Using Cre Recombinase. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1), S. 305–315. DOI: 10.1074/jbc.274.1.305.

Printz, R. L.; Magnuson, M. A.; Granner, D. K. (1993): Mammalian glucokinase. In: *Annu. Rev. Nutr.* 13, S. 463–496. DOI: 10.1146/annurev.nu.13.070193.002335.

- Raimondo, Anne; Rees, Matthew G.; Gloyn, Anna L. (2015): Glucokinase regulatory protein: complexity at the crossroads of triglyceride and glucose metabolism. In: *Current opinion in lipidology* 26 (2), S. 88–95. DOI: 10.1097/MOL.000000000000155.
- Rees, M. G.; Wincovitch, S.; Schultz, J.; Waterstradt, R.; Beer, N. L.; Baltrusch, S. et al. (2012a): Cellular characterisation of the GCKR P446L variant associated with type 2 diabetes risk. In: *Diabetologia* 55 (1), S. 114–122. DOI: 10.1007/s00125-011-2348-5.
- Rees, Matthew G.; Ng, David; Ruppert, Sarah; Turner, Clesson; Beer, Nicola L.; Swift, Amy J. et al. (2012b): Correlation of rare coding variants in the gene encoding human glucokinase regulatory protein with phenotypic, cellular, and kinetic outcomes. In: *J. Clin. Invest.* 122 (1), S. 205–217. DOI: 10.1172/JCI46425.
- Rees, Matthew G.; Raimondo, Anne; Wang, Jian; Ban, Matthew R.; Davis, Mindy I.; Barrett, Amy et al. (2014): Inheritance of Rare Functional GCKR Variants and Their Contribution to Triglyceride Levels in Families. In: *Hum. Mol. Genet.* DOI: 10.1093/hmg/ddu269.
- Richter, Susan; Richter, Jan P.; Mehta, Sunali Y.; Gribble, Amanda M.; Sutherland-Smith, Andrew J.; Stowell, Kathryn M. et al. (2012): Expression and role in glycolysis of human ADP-dependent glucokinase. In: *Mol. Cell. Biochem.* 364 (1-2), S. 131–145. DOI: 10.1007/s11010-011-1212-8.
- Ronimus, Ron S.; Morgan, Hugh W. (2004): Cloning and biochemical characterization of a novel mouse ADP-dependent glucokinase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (3), S. 652–658. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.01.103.
- Salgado, Magdiel; Tarifeño-Saldivia, Estefanía; Ordenes, Patricio; Millán, Carola; Yañez, María José; Llanos, Paula et al. (2014): Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanocytes. In: *PLoS ONE* 9 (4), S. e94035. DOI: 10.1371/journal.pone.0094035.
- Santoro, Nicola; Caprio, Sonia; Pierpont, Bridget; van Name, Michelle; Savoye, Mary; Parks, Elizabeth J. (2015): Hepatic De Novo Lipogenesis in Obese Youth Is Modulated by a Common Variant in the GCKR Gene. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (8), S. 32. DOI: 10.1210/jc.2015-1587.
- Saxena, Richa; Voight, Benjamin F.; Lyssenko, Valeriya; Burt, Noël P.; de Bakker, Paul I W; Chen, Hong et al. (2007): Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. In: *Science* 316 (5829), S. 1331–1336. DOI: 10.1126/science.1142358.

Schaftingen, Emile (1989): A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. In: *Eur J Biochem* 179 (1), S. 179–184. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14538.x.

Seoane, Joan et al. (1996): Glucose 6-Phosphate Produced by Glucokinase, but Not Hexokinase I, Promotes the Activation of Hepatic Glycogen Synthase. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (39), S. 23756–23760. DOI: 10.1074/jbc.271.39.23756.

Shen, Haiqing; Pollin, Toni I.; Damcott, Coleen M.; McLenithan, John C.; Mitchell, Braxton D.; Shuldiner, Alan R. (2009): Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects postprandial lipemic response in a dietary intervention study. In: *Human genetics* 126 (4), S. 567–574. DOI: 10.1007/s00439-009-0700-3.

Shiota, C.; Coffey, J.; Grimsby, J.; Grippo, J. F.; Magnuson, M. A. (1999): Nuclear Import of Hepatic Glucokinase Depends upon Glucokinase Regulatory Protein, whereas Export Is Due to a Nuclear Export Signal Sequence in Glucokinase. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (52), S. 37125–37130. DOI: 10.1074/jbc.274.52.37125.

Sotos-Prieto, Mercedes; Guillén, Marisa; Vicente Sorli, Jose; Portolés, Olga; Guillem-Saiz, Patricia; Ignacio Gonzalez, Jose et al. (2013): Relevant associations of the glucokinase regulatory protein/glucokinase gene variation with TAG concentrations in a high-cardiovascular risk population: modulation by the Mediterranean diet. In: *The British journal of nutrition* 109 (2), S. 193–201. DOI: 10.1017/S0007114512000918.

St. Jean, David J.; Ashton, Kate S.; Bartberger, Michael D.; Chen, Jie; Chmait, Samer; Cupples, Rod et al. (2014): Small Molecule Disruptors of the Glucokinase–Glucokinase Regulatory Protein Interaction: 2. Leveraging Structure-Based Drug Design to Identify Analogues with Improved Pharmacokinetic Profiles. In: *J. Med. Chem.* 57 (2), S. 325–338. DOI: 10.1021/jm4016747.

Stančáková, Alena; Paananen, Jussi; Soininen, Pasi; Kangas, Antti J.; Bonnycastle, Lori L.; Morken, Mario A. et al. (2011): Effects of 34 risk loci for type 2 diabetes or hyperglycemia on lipoprotein subclasses and their composition in 6,580 nondiabetic Finnish men. In: *Diabetes* 60 (5), S. 1608–1616. DOI: 10.2337/db10-1655.

Takeuchi, Hideo; Inoue, Yasushi; Ishihara, Hisamitsu; Oka, Yoshitomo (1996): Overexpression of either liver type or pancreatic β cell type glucokinase via recombinant

adenovirus enhances glucose oxidation in isolated rat hepatocytes. In: *FEBS Lett.* 393 (1), S. 60–64. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00833-2.

Teslovich, Tanya M.; Musunuru, Kiran; Smith, Albert V.; Edmondson, Andrew C.; Stylianou, Ioannis M.; Koseki, Masahiro et al. (2010): Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. In: *Nature* 466 (7307), S. 707–713. DOI: 10.1038/nature09270.

Thermo Fisher Scientific: Spectral Viewer EYFP. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, zuletzt geprüft am 12.07.2017.

Thorens, B. (2011): Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. In: *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1, S. 82–88. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2011.01453.x.

Ureta, Tito (1982): The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 71 (4), S. 549–555. DOI: 10.1016/0305-0491(82)90461-8.

van de Bunt, Martijn; Gloyn, Anna L. (2010): From genetic association to molecular mechanism. In: *Curr. Diab. Rep.* 10 (6), S. 452–466. DOI: 10.1007/s11892-010-0150-2.

van Schaftingen, E.; Detheux, M.; Veiga da Cunha, M (1994): Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. In: *FASEB J.* 8 (6), S. 414–419.

Vanderklish, P. W.; Krushel, L. A.; Holst, B. H.; Gally, J. A.; Crossin, K. L.; Edelman, G. M. (2000): Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (5), S. 2253–2258. DOI: 10.1073/pnas.040565597.

Vaxillaire, Martine; Cavalcanti-Proença, Christine; Dechaume, Aurélie; Tichet, Jean; Marre, Michel; Balkau, Beverley; Froguel, Philippe (2008): The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population. In: *Diabetes* 57 (8), S. 2253–2257. DOI: 10.2337/db07-1807.

Veiga-da-Cunha, M.; Courtois, S.; Michel, A.; Gosselain, E.; van Schaftingen, E. (1996): Amino acid conservation in animal glucokinases. Identification of residues implicated in the

interaction with the regulatory protein. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (11), S. 6292–6297.

Veiga-da-Cunha, Maria; Sokolova, Tatiana; Opperdoes, Fred; van Schaftingen, Emile (2009): Evolution of vertebrate glucokinase regulatory protein from a bacterial N-acetylmuramate 6-phosphate etherase. In: *The Biochemical journal* 423 (3), S. 323–332. DOI: 10.1042/BJ20090986.

Veiga-da-Cunha, Maria; van Schaftingen, Emile (2002): Identification of fructose 6-phosphate- and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase. In: *J. Biol. Chem.* 277 (10), S. 8466–8473. DOI: 10.1074/jbc.M105984200.

Warner, J. P.; Leek, J. P.; Intody, S.; Markham, A. F.; Bonthron, D. T. (1995): Human glucokinase regulatory protein (GCKR): cDNA and genomic cloning, complete primary structure, and chromosomal localization. In: *Mammalian Genome* 6 (8), S. 532–536. DOI: 10.1007/BF00356171.

Wasserman, David H. (2009): Four grams of glucose. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296 (1), S. 21. DOI: 10.1152/ajpendo.90563.2008.

Weinhouse, S. (1976): Regulation of glucokinase in liver. In: *Curr. Top. Cell. Regul.* 11, S. 1–50.

Yang, Jianyi; Wang, Yan; Zhang, Yang (2015a): ResQ: An Approach to Unified Estimation of B-Factor and Residue-Specific Error in Protein Structure Prediction. In: *Journal of molecular biology*. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.09.024.

Yang, Jianyi; Yan, Renxiang; Roy, Ambrish; Xu, Dong; Poisson, Jonathan; Zhang, Yang (2015b): The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. In: *Nature methods* 12 (1), S. 7–8. DOI: 10.1038/nmeth.3213.

Yang, Jianyi; Zhang, Yang (2015): I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. In: *Nucleic acids research* 43 (W1), S. 81. DOI: 10.1093/nar/gkv342.

Yang, Ping-Chang; Mahmood, Tahrin (2012): Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. In: *North American Journal of Medical Sciences*. 4 (9), S: 429–434. DOI:10.4103/1947-2714.100998

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Wechselwirkung zwischen Glucokinase (GK) und Glucokinase-Regulatorprotein (GKRP) in Hepatozyten. Glucose-6-phosphat (Glucose-6-P) kann sowohl in Glycogen eingebaut, als auch in Fructose-6-phosphat (Fructose-6-P) umgewandelt werden. Fructose-1-phosphat (Fructose-1-P) hemmt, Fructose-6-P stimuliert die Bildung des GKRP-GK Komplexes. Nach Brouwers, Martijn C G J et al. 2015.

Abbildung 2 zeigt die Struktur des GKRP jeweils um 90° rotiert. Die SIS-1 ist orange, SIS-2 gelb, der „Linker“ blau, die Lid (cap) Domäne türkis und Fructose-1-phosphat rot dargestellt (nach Pautsch et al. 2013).

Abbildung 34 Struktur des Komplexes aus humanen GKRP, AMG-1694 und S6P (links) und die Strukturformel von AMG-1694 (Lloyd et al. 2013, bearbeitet).

Abbildung 4 nüchtern Triglycerid- und Blutglucosespiegel bei Probanden der MPP-Studie bevor und nach einem mittleren Beobachtungszeit von 23,4 Jahren. Schwarz: homozygote Träger von Pro446, blau: heterozygote SNP Leu446, rot: homozygote Variante Pro446Leu (Orho-Melander et al. 2008, bearbeitet).

Abbildung 5 Alignment des UniProt Clustal Omega (McWilliam et al. 2013). Ersten vier Zeilen nach Supplement von Choi et al. 2013; Zeile fünf und sechs nach FASTA-Daten von Beck und Miller 2013 und Pautsch et al. 2013 (zum Vergleich der Sequenzähnlichkeit und zur Einordnung der Datengrundlage für die dargestellten Funktionsbereiche). Gelb hinterlegter Abschnitt: GK-GKRP-Bindungsregion (hydrophobe Bindung); rot hinterlegter Abschnitt: GK-GKRP-Bindungsregion (Ionen-Paarbindung); dunkelgrün hinterlegter Abschnitt: Bindungsstelle F6P (nach Choi et al. 2013 und Beck und Miller 2013); hellgrün hinterlegter Abschnitt: Regulationsbereich für die Bindung von Fructosephosphaten (nach Beck und Miller 2013); orange hinterlegter Abschnitt: Bindungsstelle Fructosephosphat (am Komplex mit F1P nach Pautsch et al.) - hell: Bereich Phosphatinteraktion, dunkel: Bereich Fructoseinteraktion; rote Umrandung: Wasserstoffbrücken; rote Schrift: erweiterte Bindungsstelle der Fructose Phosphate (H-D Mapping); violett hinterlegter Abschnitt: Bindungsbereich Fructosephosphate via Dipol-Dipol-Wechselwirkung; blau hinterlegter Abschnitt: Lage Doppelmutation K450T/K451T (Reduktion der Bindungsaffinität zwischen GK und GKRP); doppelgestrichelte Box: Aminosäuren P446, H438, M344 und Q234.

Abbildung 6 Maße der Zählkammer in mm (Zählkammer "Bürker" - <http://laboroptik.de/deutsch/info/buerker.gif>).

Abbildung 7 Extinktions- (gestrichelt) und Emissionsspektren (flächig) von CFP (cyan) und EYFP (grün). Der linke Vertikalbalken stellt Anregungsfilter bei 500 nm (Bandbreite 20 nm) und der rechte Vertikalbalken Detektionsfilter bei 535 nm (Bandbreite 30 nm) Wellenlänge dar (Thermo Fisher Scientific).

Abbildung 8 Schematischer Aufbau einer Western-Blot Kammer.

Abbildung 9 Standardkurve zur Ermittlung der Glucosekonzentration entsprechend des Kit-Protokolls (Glucose Colorimetric Assay Kit II, BioVision, Milpitas, CA, USA), <https://www.biovision.com/glucose-colorimetric-assay-kit-ii.html>.

Abbildung 10 Standardkurve zur Ermittlung der Triglyceridkonzentration entsprechend des Kit-Protokolls (Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit, BioVison, Milpitas, CA, USA), <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K622.pdf>.

Abbildung 11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen und primären Maus Hepatozyten mit Expression EYFP-GKRP und dessen unterschiedliche Lokalisation zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Abbildung 12 Quantifizierung der EYFP-GKRP Kern/Plasma-Ratio in HeLa Zellen. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 25-79 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle bei entsprechenden Glucose-Spiegeln mit *** für $p < 0,001$ und mit # für $p < 0,05$ innerhalb des WT-GKRP angegeben.

Abbildung 13 Quantifizierung der EYFP-GKRP Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 35-66 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$; mit # für $p < 0,05$ innerhalb des WT angegeben.

Abbildung 14 Quantifizierung der EYFP-GKRP Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit der Glucokinase. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 21-43 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle mit * für $p < 0,05$ und mit ** für $p < 0,01$ angegeben.

Abbildung 15 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit des Wildtyp bzw. mutierten GKRP. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 25-57 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zum Wildtyp mit mit *** für $p < 0,001$ angegeben und innerhalb des Typs bei unterschiedlichen Glucose-Spiegeln mit ### für $p < 0,001$.

Abbildung 16 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit von GKRP H438Y. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 18-24 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30

$\mu\text{mol/l}$ CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$ angegeben.

Abbildung 17 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in primären Hepatozyten bei Anwesenheit von GKRP Wildtyp. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 8-32 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30 $\mu\text{mol/l}$ CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit *** für $p < 0,001$, sowie mit # für $p < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

Abbildung 18 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in primären Hepatozyten bei Anwesenheit von GKRP H438Y. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 5-33 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30 $\mu\text{mol/l}$ CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit * für $P < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

Abbildung 19 Quantifizierung der ECFP-GK Kern/Plasma-Ratio in primären Hepatozyten bei Anwesenheit von GKRP P446L. Die Ergebnisse (für jeweils zwischen 8-32 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Der schwarze Balken steht für 5,5 mmol/l Glucose, der weiße für 25 mmol/l Glucose, der graue für 5,5 mmol/l Glucose + 0,2 mmol/l Fructose und der weiß schraffierte für 5,5 mmol/l Glucose + 30 $\mu\text{mol/l}$ CpdA. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur Kontrolle (5,5 mmol/l Glc) mit * für $p < 0,05$, sowie mit # für $p < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

Abbildung 20 Die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Effizienz zeigt die Interaktion zwischen der Glucokinase (ECFP-Fusionsprotein) und dem GKRP (EYFP-Fusionsprotein) in Maus Hepatozyten. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 9-60 analysierten Zellen) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken stehen für 5,5 mmol/l Glucose, die schwarzen für 25 mmol/l. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zum Wildtyp, bei 5,5 mmol/l Glucose, mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$; vergleichend zur Kontrolle EYFP mit # für $p < 0,05$, ## für $p < 0,01$ und mit ### für $p < 0,001$, sowie bei 25 mmol/ Glucose mit § für $p < 0,05$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

Abbildung 21 Proteinexpression von humanen EYFP-GKRP-Varianten und Wildtyp in Hepa 1-6 Zellen in Anwesenheit von Wildtyp GK. Die Protein-Ratios (im Bezug zu Actin) sind als prozentualer Anteil des WT-GKRP als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt (One-way ANOVA).

Abbildung 22 Quantifizierung des Glucose-Verbrauchs in nmol je μg Protein in Hepa 1-6 Zellen bei 5,5 (A) bzw. 25 mmol/l Glucose (B). Die Zellen welche nur ECFP-GK exprimieren sind mit weißen Balken dargestellt; die übrigen Balken stehen für die Expression der EYFP-

GKRP-Variante bzw. des WT. Die Ergebnisse aus unabhängigen Versuchen (mit jeweils zwischen 11-14 analysierten Proben) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur GK mit ## für $p < 0,01$ und ### für $p < 0,001$; im Vergleich zum WT-GKRP mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

Abbildung 23 Quantifizierung der Triglycerid-Synthese in nmol je μg Protein in Hepa 1-6 Zellen bei 5,5 (A) bzw. 25 mmol/l Glucose (B). Die Zellen welche nur ECFP-GK exprimieren sind mit weißen Balken dargestellt; die übrigen Balken stehen für die Expression der EYFP-GKRP-Variante bzw. des WT. Die Ergebnisse aus unabhängigen Versuchen (mit jeweils 9-18 analysierten Proben) sind als Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler dargestellt. Das Signifikanzniveau ist im Vergleich zur GK mit ## für $p < 0,01$; im Vergleich zum WT-GKRP mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ angegeben (One-way ANOVA und Bonferroni Test).

Abbildung 24 Lokalisation der GKRP-Varianten im Molekül komplexiert mit Fructose-1-Phosphat. Orange: F1P, Grün: M344, Blau: P446, Rot: H438 (links); Lokalisation der GKRP-Varianten im Molekül komplexiert mit Fructose-1-Phosphat bei Betrachtung der Oberfläche. Flächige Färbung demonstriert Oberflächenkontakt. Orange: F1P, Grün: M344, Blau: P446, Rot: H438 (rechts) PyMOL 1.7.4.

Abbildung 25 Ausschnitt aus dem humanen WT GKRP. Die Aminosäure Prolin an Position 446 ist blau, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 416 und 417 gelb abgebildet. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 26 Ausschnitt aus der GKRP-Variante P446L. Die Aminosäure Leucin an Position 446 ist blau, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 416 und 417 gelb (mit Punktsphären für die Atomradien) abgebildet. Die roten Scheiben zeigen annähernde Überlappungen der Atomradien an. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 27 Ausschnitt aus dem humanen WT GKRP. Die Aminosäure Histidin an Position 438 ist rot, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 461, sowie 481 und 482 gelb abgebildet. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 28 Ausschnitt aus der GKRP Variante H438Y. Die Aminosäure Tyrosin an Position 438 ist rot, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 461, sowie 481 und 482 gelb (mit Punktsphären für die Atomradien) abgebildet. Die roten Scheiben zeigen signifikante, die grünen mäßige Überlappungen der Atomradien an. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 29 Ausschnitt aus dem humanen WT GKRP. Die Aminosäure Methionin an Position 344 ist grün, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 483, sowie 109 und 112 gelb abgebildet. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 30 Ausschnitt aus der GKRP Variante M344I. Die Aminosäure Isoleucin an Position 344 ist grün, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten

Aminosäuren in Position 483, sowie 109 und 112 gelb (mit Punktsphären für die Atomradien) abgebildet. Die roten Scheiben zeigen signifikante, die grünen leichte Überlappungen der Atomradien an. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 31 Ausschnitt aus der GKRP Variante M344I. Die Aminosäure Isoleucin an Position 344 ist grün, die Nachbarn sind orange und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in Position 483, sowie 109 und 112 gelb (mit Punktsphären für die Atomradien) abgebildet. Die Simulation zeigt zudem die mit einem grauen Netz verdeutlichte Bindungstasche, in deren Zentrum F1P (violett) liegt. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 32 Ausschnitt aus der GKRP Variante M344I. Die Aminosäure Isoleucin an Position 344 ist grün und die für eine Kollisionsanalyse relevanten Aminosäuren in 109 und 112 sind gelb abgebildet. Das auf der gleichen α -Helix liegende Lys126 wird violett dargestellt. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 33 Ausschnitt aus dem GKRP-GK Komplex. Prolin an Position 446 ist blau; Histidin an Position 438 ist rot; Val441, Gly442, Gln443 in GKRP gelb; Arg186, Val199, Val200 in GK grün; GKRP blass-grau und GK blass-orange dargestellt. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 34 zeigt die I-TASSER-Vorhersage über die thermische Stabilität (B-factor) der einzelnen Bereiche im GKRP-WT. Die vertikalen Striche stellen den Bereich der Varianten dar. Grün steht für M344, Rot für H438 und Blau für P446. Negative Werte weisen Gebiete hoher Stabilität aus (Yang et al. 2015a).

Abbildung 35 zeigt die Struktur des humanen Wildtyp EYFP-GKRP. Grau wird das GKRP und darin in Grün die Bindungsbereiche zur Glucokinase gezeigt; der Linker ist rot und das EYFP orange abgebildet. PyMOL 1.7.4.

Abbildung 36 Absolute Lipogenese in homozygoten Trägern der Mutation P446L (TT) und in der Vergleichsgruppe (CC) im Verlauf des Tages bzw. als area under the curve (AUC), nachgewiesen in vivo mittels stabiler Isotope. Die gestrichelte Linie stellt P446L, die durchgezogene die Kontrollgruppe dar (Santoro et al. 2015).

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, 14.02.2023

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: David Jagdhuhn
Geburtstag: 08.12.1989
Geburtsort: Brandenburg an der Havel

Studium

10/2010 – 05/2017 Humanmedizin an der Universität Rostock
Abschluss: 1. Staatsexamen im September 2012
2. Staatsexamen im Oktober 2015
3. Staatsexamen im Mai 2017

Beruf

Seit 08/2017 Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin
08/2017-07/2022 Universitätsklinikum Brandenburg an der Havel
Seit 09/2022 Alexianer St. Josef Krankenhaus Potsdam

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Baltrusch für die großartige Unterstützung und Betreuung.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Rica Waterstradt für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor bedanken und bei Frau Dr. Langer für die herausragende Hilfe und die fördernden Diskussionen.

Ich danke zudem Frau Jessica Gromoll für die Zusammenarbeit und den guten Start in diese Promotion.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Frau Maria Jagdhuhn für die andauernde Motivation danken.