

DISS. ETH NO. 30107

**Deciphering the role of the glutamine synthetase  
in ribosome biogenesis**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES  
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

MAXIMILIAN ELSLER  
MSc, Molecular Cell and Developmental Biology, University of Innsbruck

born on 18.04.1992

accepted on the recommendation of

Prof. Ulrike Kutay, examiner  
Prof. Uwe Sauer, co-examiner  
Prof. Bernd Bodenmiller, co-examiner  
Prof. Robbie J. Loewith, co-examiner

2024

## Summary

---

The most common amino acid in human serum is glutamine, which can be taken up by cells via glutamine transporters or be *de novo* synthesised by an enzyme called glutamine synthetase (GLUL). GLUL fuses ammonia and the amino acid glutamate in an ATP-dependent reaction to glutamine, which serves as a carbon and nitrogen source for different processes such as synthesis of nucleotides, lipids, but also proteins. Protein synthesis is an essential cellular mechanism that is accomplished by ribosomes, and cells invest a major part of their energy into ribosome biogenesis, the assembly of these large ribonucleoprotein complexes. In a genome-wide screen for human proteins required for 40S ribosomal subunit biogenesis, our lab has previously identified approximately 300 factors involved in the maturation of the 40S precursors. Interestingly, among these hits, GLUL was identified. The depletion of this enzyme led to the mislocalisation of ribosome biogenesis factors, indicating that nuclear 40S biogenesis depends on the presence of GLUL.

Here we present our approaches to reveal the mechanism of how GLUL affects ribosome biogenesis. We show that the origin of bovine serum, used for culturing cells, can affect the maturation defect of the 40S subunit observed upon GLUL depletion, indicating that metabolites in undefined cell culture media can affect experimental results. Furthermore, we found that downregulation of GLUL with a chemical inhibitor did not lead to ribosome biogenesis defect, but induced a strong upregulation of GLUL expression that may compensate for enzyme inhibition. We also show that GLUL depletion neither affects the translation of ribosomal proteins nor of ribosome biogenesis factors related to the ribosome biogenesis step affected by GLUL depletion. In addition, using a pH-sensitive fluorophore we found that in our experimental setup intracellular pH is not to be significantly affected by GLUL depletion. Suggesting that GLUL depletion does not affect ribosome assembly via pH alterations. By exploiting AP-MS, we identified the nucleoside diphosphate kinase 7 (NME7) and the trichoplein keratin filament-binding protein (TCHP) as interactors of wildtype but not of an enzymatically inactivated GLUL mutant. We found that NME7 depletion neither

## Summary

affects the localisation of 40S ribosome biogenesis factors nor the translation of ribosome biogenesis factors or ribosomal proteins. It also does not affect metabolites related to ribosome biogenesis. However, we could show that the GLUL-NME7 interaction is nutrient-dependent, while abolishing ATP synthesis does not affect GLUL-NME7 binding. Finally, we could show that siRNA-mediated depletion of GLUL affects XPO1-mediated nuclear export, but not XPO5-mediated export, indicating that downregulation of GLUL specifically affects nuclear export along the XPO1 export pathway. Thus, the 40S maturation defects observed upon GLUL depletion might be a consequence of defective XPO1-dependent subunit export.

## Zusammenfassung

---

Die häufigste Aminosäure im menschlichen Serum ist Glutamin, das von den Zellen über Glutamintransporter aufgenommen oder durch das Enzym Glutamin Synthetase (GLUL) *de novo* synthetisiert werden kann. GLUL verbindet Ammoniak und die Aminosäure Glutamat in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Glutamin, das als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für verschiedene Prozesse wie die Synthese von Nukleotiden, Lipiden, und Proteinen dient.

Die Proteinbiosynthese ist ein wesentlicher zellulärer Mechanismus, der von Ribosomen ausgeführt wird. Zellen investieren einen Großteil ihrer Energie in die Ribosomenbiogenese, den Aufbau dieser großen Ribonukleoproteinkomplexe. In einem genomweiten Screening nach menschlichen Proteinen, die für die Biogenese der 40S ribosomalen Untereinheiten erforderlich sind, hatte unser Labor zuvor etwa 300 Faktoren identifiziert, die an der Reifung der 40S-Vorstufen beteiligt sind. Unter den Treffern konnten wir interessanterweise auch GLUL identifizieren. Der Verlust dieses Enzyms führte zu einer Fehllokalisierung von Ribosomenbiogenesefaktoren, was darauf hindeutet, dass die nukleare 40S-Biogenese von der Funktion von GLUL abhängt.

Hier stellen wir unsere Ansätze vor, um den Mechanismus aufzudecken, wie GLUL die Ribosomenbiogenese beeinflusst. Wir zeigen, dass die Herkunft des Rinderserums, das für die Kultivierung von Zellen verwendet wird, den Reifungsdefekt der 40S-Untereinheit beeinflussen kann, der nach der Depletion von GLUL beobachtet wird, was darauf hinweist, dass Metaboliten in undefinierten Zellkulturmedien die experimentellen Ergebnisse beeinflussen können. Darüber hinaus haben wir festgestellt, dass die Herunterregulierung von GLUL mit einem chemischen Inhibitor nicht zu einem Defekt der Ribosomenbiogenese führt. Wir konnten zeigen, dass eine GLUL-Depletion weder die Translation der ribosomalen Proteine noch der Ribosomenbiogenesefaktoren beeinflusst, die mit dem von der GLUL-Depletion betroffenen Schritt der Ribosomenbiogenese zusammenhängen. Darüber hinaus haben wir unter Verwendung eines pH-sensitiven Fluorophors festgestellt, dass der intrazelluläre pH-Wert in unserem Versuchsaufbau durch die GLUL-Depletion

## Zusammenfassung

nicht signifikant beeinflusst wird. Dies deutet darauf hin, dass die Depletion von GLUL die Ribosomenbildung nicht durch pH-Veränderungen beeinflusst. Darüber hinaus zeigen wir, dass die beiden Proteine „nucleoside diphosphate kinase 7“ (NME7) und „trichoplein keratin filament-binding protein“ (TCHP) mit dem GLUL-Wildtyp interagieren und dass diese Interaktionen in der GLUL(R324C) Mutante aufgehoben sind.

Wir fanden heraus, dass die Depletion von NME7 weder die Lokalisierung von 40S- Ribosomenbiogenesefaktoren noch die Translation von Ribosomenbiogenesefaktoren oder ribosomalen Proteinen beeinträchtigt und auch keine Auswirkungen auf Metaboliten hat, die mit der Ribosomenbiogenese zusammenhängen. Wir konnten jedoch zeigen, dass die Interaktion zwischen GLUL und NME7 nährstoffabhängig ist, aber das Stoppen der ATP-Synthese in den Zellen keinen Einfluss auf die GLUL-NME7-Bindung hat.

Schließlich konnten wir zeigen, dass eine GLUL Depletion den XPO1-abhängigen Kernexport beeinträchtigt, nicht aber den XPO5-abhängigen Export, was auf einen Einfluss der GLUL-Depletion spezifisch auf den XPO1-abhängigen Kernexport hinweist. Die 40S Ribosomenbiogenesedefekte bei einer GLUL Depletion sind daher wahrscheinlich eine Folge des defekten Exports der Untereinheiten.