

Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Induktion von Stoffwechselprozessen in Makrophagen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Maximilian Nickenig

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Eicke Latz
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Walter

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.12.2024

Aus dem Institut für Angeborene Immunität

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	12
1.4	Diskussion	20
1.5	Zusammenfassung	23
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	24
2.	Veröffentlichung	28
	Abstract	29
	Introduction	30
	Materials and Methods	31
	Results	32
	Discussion	33
	References	33

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse, Englisch: <i>Analysis of Variance</i>
ACLY	Englisch: <i>ATP-Citrate Lyase</i>
AKT	Protein Kinase B
BGP	Englisch: <i>Beta-glucan peptide</i>
cGAMP	cyclisches Guanosin-Adenosin-Monophosphat, Englisch: <i>cyclic guanosin.adeonodin monophosphate</i>
cGAS	Englisch: <i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
CXCL10	Englisch: <i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DAP	γ -D-Glu-mDAP (NOD1 Agonist)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
hMDMs	Menschliche monozytenabgeleitete Makrophagen, Englisch: <i>human monocyte-derived macrophages</i>
IL-6	Interleukin-6
IFN-b	Interferon beta
IFN-y	Interferon gamma
IRF3	Englisch: <i>Interferon regulatory factor 3</i>

LPS	Lipopolysaccharide
MDP	Englisch: <i>Muramyl-Dipeptide (NOD2 Agonist)</i>
NFκB	Englisch: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PMA	Englisch: <i>Phorbol myristate acetate</i>
PAMPs	Pathogenassoziierte molekulare Muster, Englisch: <i>Pathogen associated molecular patterns</i>
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, Englisch: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
Poly I:C	Englisch: <i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	Mustererkennungsrezeptoren, Englisch: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
R848	Resiquimod
TLR	Englisch: <i>Toll-like Receptors</i>
TBK1	Englisch: <i>TANK binding kinase 1</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha

THP-1 Zellen	Humane monozytenabgeleitete Zelllinie
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion, Englisch: <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
siRNA	Englisch: <i>small interfering RNA</i>
STING	Stimulator von Interferon Genen, Englisch: <i>Stimulator of IFN Genes</i>

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Einleitung

Das angeborene Immunsystem besteht aus zellulären und molekularen Komponenten, wie zum Beispiel Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, aber auch aus physischen Barrieren, wie zum Beispiel der Haut und den Schleimhäuten. Zusammen erkennen sie Pathogene, ohne dass eine vorherige Exposition notwendig ist. Somit bildet das angeborene Immunsystem die erste Linie der Verteidigung des Organismus und spielt eine entscheidende Rolle bei der Reaktion auf Eindringlinge und Krankheitserreger (Chaplin, 2010).

Einen Teil des angeborenen Immunsystems stellen die *Toll-like Receptors* (TLR) dar. Sie befinden sich auf der Oberfläche von Immunzellen (z. B. Makophagen) und dienen als Erkennungssensoren von Gewebeschäden und mikrobiellen Bestandteilen, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (Englisch: *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Ihre Aktivierung führt zur Bereitstellung von Transkriptionsfaktoren, die eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen initiieren und eine erste Immunantwort einleiten. Neben der pro-inflammatorischen Induktion bewirkt die TLR-Signalgebung metabolische Anpassungen, welche die transkriptionelle Antwort qualitativ und quantitativ anpasst (Chaplin, 2010). Als Beispiel ist hier die TLR-4 Aktivierung durch Lipopolysaccharid (LPS) zu nennen, welche die Glykolyse hochreguliert und das Enzym *ATP Citrat-Lyase* (ACLY) phosphoryliert. Die vermehrte Aktivität des mitochondrial gelegenen Enzyms ACLY führt letztendlich zu einer veränderten Histon-Acetylierung, was die entzündliche Geninduktion verändert (Langston et al., 2019; Lauterbach et al., 2019).

Es wurde zuletzt gezeigt, dass die *TANK binding kinase 1* (TBK1) auch an der Vermittlung der glykolytischen Veränderung beteiligt ist (Everts et al., 2014; Tan et al., 2019). TBK1 ist ein Enzym, welches eine wichtige Rolle im Immunsystem spielt. Es ist unter anderem an der Phosphorylierung und somit Aktivierung von zellulären Prozessen und der Produktion von beispielsweise antiviralen Proteinen oder Einleitung einer Entzündungsreaktion beteiligt (Fritzgerald et al., 2003). Ein wichtiger Signalweg, der durch TBK1 aktiviert wird, ist der sogenannte Stimulator von Interferon Genen (Englisch: *Stimulator of Interferon*

Genes, STING) -Signalweg. Dieser Signalweg kann zum Beispiel zytosolische virale Desoxyribonukleinsäure (DNA) erkennen und somit die Freisetzung von antiviralen Substanzen initiieren (Abe et al., 2014): Bei Bindung des Liganden, zum Beispiel viraler DNA, produziert das Enzym cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) den Dinukleotid Botenstoff cyclisches Guanosin-Adenosin-Monophosphat (Englisch: *cyclic guanosin.adeonosin monophosphate*, cGAMP) der seinen Rezeptor STING aktiviert (Wu et al., 2013; Sun et al., 2013). Der aktivierte STING Rezeptor initiiert die Gen-Transkription über *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) und *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF-κB). Dies führt zur Ausschüttung von Zytokinen und induziert Autophagie (Gui et al., 2019; Tanaka et al., 2012).

1.1.2 Fragestellung

Es ist derzeit unbekannt, ob STING-Aktivierung eine Veränderung im Stoffwechsel von Makrophagen bewirken kann. Es ist auch unklar, ob die Aktivität des Enzyms ACLY zur Geninduktion nach STING-Aktivierung und der Mustererkennungsrezeptoren (Englisch: *Pattern Recognition Receptors*, PRR) Signalgebung beiträgt. Auch ist die Rolle von TBK1 in diesem Bezug derzeit nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Zusammenhänge zu untersuchen.

1.2 Material und Methoden

Zellkultur

Humane TBK1 Knockout monozytenabgeleitete Zelllinie (THP-1) -Zellen (InvivoGen) wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES, 10 % (v/v) *Fetal Bovine Serum* (FBS), 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 100 mg/ml Normocin (InvivoGen) ergänzt wurde. THP-1-Zellen (American Type Culture Collection) wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin ergänzt wurde. Für einige Experimente wurden THP-1-Zellen mit *phorbol myristate acetate* (PMA) (20 ng/ml) für 3 Stunden vorbehandelt.

Differenzierung von Makrophagen und Kultur

Buffy-Coats und Leukozytenreduktionskammern von anonymen Spendern wurden gemäß den Protokollen des Institutional Review Board der Universitätsklinik Bonn (Ethikvotum Lfd. Nr.075/14) und der Landesärztekammer Niedersachsen (Ethikvotum Bo/64/2021) erhalten. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Englisch: *Human peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation in Ficoll-Paque gewonnen. Monozyten wurden unter Verwendung von CD14-Magnetperlen (Miltenyi Biotec) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Menschliche monozytenabgeleitete Makrophagen (Englisch: *human monocyte-derived macrophages*, hMDMs) wurden durch Differenzierung von CD14⁺ Monozyten in 50 U/ml rekombinantem humanem M-CSF (ImmunoTools) in RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1× GlutaMAX und 1× Natriumpyruvat für 3 Tage (Thermo Scientific) gewonnen.

Zellkultur-Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden verwendet: PMA, 20 nM (Sigma-Aldrich); Amlexanox, 50 mM (Selleck Chemicals); GSK8612, 4 mM (MedChemExpress); BMS-303141, 50 mM (Sigma-Aldrich); ultrareines LPS *Escherichia coli* 0111:B4, 100 ng/ml; Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4), 25 ng/ml; Resiquimod (R848), 100 ng/ml; *Polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly I:C) niedriges Molekulargewicht, 50 mg/ml; cGAMP, 10 mg/ml; *beta-glucan-peptide* (BGP), 100 mg/ml; *Muramyl-Dipeptid* (MDP), 10 mg/ml; und γ -D-Glu-mDAP (DAP), 50 ng/ml (alle InvivoGen); Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), 50 ng/ml (PeproTech), Interferon gamma (IFN- γ), 500 U/ml (ImmunoTools); Interferon beta (IFN- β), 500 U/ml (STEMCELL Technologies). Die Zellviabilität wurde unter Verwendung des CellTiter-Blue-Assays (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Elektroporation von *small interfering RNA* (siRNA)

THP-1-Zellen (1×10^6) wurden in 20 ml Puffer P3 (Lonza) suspendiert, mit 2 mM siRNA (Thermo Fisher Scientific) vermischt und mithilfe des CM-137-Programms in einem Lonza 4D-Elektroporator elektroporiert (Lonza).

Jess Immunoassays und Western Blot Analyse

Die Jess Western-Analysen wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers (ProteinSimple, Bio-Techne, Santa Clara, CA) durchgeführt. Zur Quantifizierung der Signalpeaks wurde die Fläche unter der Kurve des jeweiligen Peaks unter Verwendung der Jess-Software und ImageJ bestimmt. Die primären Antikörper waren wie folgt: Phospho-TBK1/NAK (Ser172), TBK1/NAK und Histone H3 Phospho-AKT S473 (D9E), Proteinkinase B (AKT) (pan) (40D4), ACLY (D1X6P), Phospho-ACLY Ab, Citrat-Synthase (D7V8B) (alle von Cell Signaling Technology), und β -Aktin (LI-COR Biosciences).

Messung der NF- κ B-Aktivität

Die NF- κ B-Aktivität in THP-1 Dual-Zellen wurde durch Messung der Aktivität der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase (SEAP) im Überstand bewertet (InvivoGen). Zur Bestimmung des SEAP-Spiegels wurde die QUANTI-Blue-Lösung gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Messen der Zytokin Sekretion

Die Konzentrationen der Zytokine wurden unter Verwendung kommerzieller ELISA Duo-Set (Interleukin-6 (IL-6), *C-X-C motif chemokine ligand 10* (CXCL10), TNF- α und Quantikine (human IFN- γ) Kits (R&D Systems)) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Flusszytometrie

Zur Messung des mitochondrialen Potenzials wurden hMDMs inkubiert mit TMRM (Tetramethylrhodaminmethylester Perchlorat) (100 nM) für 30 Minuten bei 37 °C, einmal gewaschen und dann mit den aufgeführten Liganden bei 37 °C für 4 Stunden stimuliert. Für die Messung der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies wurde MitoSOX für die letzten 30 Minuten der Behandlung hinzugefügt (2 mM, Thermo Fisher Scientific). Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen gesammelt, in FACS-Puffer (PBS mit 0,5 % FBS) mit 1 mg/ml DAPI suspendiert und mit einem FACS Canto-Gerät (BD Biosciences) analysiert. Die CD86-Expression wurde durch Färben von Einzelzellsuspensionen mit Anti-Human CD86 (eBioscience, Katalog-Nr. 12-0869-42) und mit Live/Dead fixable near-infrared (Invitrogen, Katalog-Nr. 247761) für 20 Minuten auf Eis beurteilt. Die Zellen wurden dann in

FACS-Puffer (PBS 1 0,5 % FBS 1 0,2 % Natriumazid) suspendiert und auf einem LSRTessa II erfasst. Alle FACS-Daten wurden in FlowJo (Tree Star) analysiert.

Quantitative Polymerasekettenreaktion (Englisch: *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR)

Ribonukleinsäure (RNA) wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert. Gleichmäßige Mengen RNA aus jeder Probe wurden mit dem SuperScript III Reverse Transkriptase-Kit (Thermo Fisher Scientific) in cDNA umgeschrieben. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung des Maxima SYBR Green/ROX Quantitative PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Expression der Zielgene wurde auf die Expression der Hypoxanthinphosphoribosyltransferase normalisiert.

Sauerstoffverbrauchsrate und extrazelluläre Azidifizierungsrate

Die Sauerstoffverbrauchsrate und die extrazelluläre Azidifizierungsrate wurden unter Verwendung eines XF-96 Extrazellulären Fluxanalysegeräts (Seahorse Bioscience) bestimmt. hMDMs ($0,8 \times 10^5$) wurden ausgesät und für 3 Stunden in Seahorse XF96 Zellkultur-Mikroplatten stimuliert. Eine Stunde vor dem Assay wurde das Medium auf bikarbonatfreies RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) mit 2 mM Glutamin umgestellt. Die Messungen wurden unter basalen Bedingungen und nach der sequentiellen Zugabe von 10 mM Glucose, 1 mM Oligomycin A, 2 mM carbonyl cyanide p-trifluoro methoxyphenylhydrazon (FCCP) und 0,5 mM Rotenon/Antimycin A durchgeführt. Glykolyse, glykolytische Kapazität, basale Atmung und maximale Atmung wurden gemäß den Empfehlungen von Seahorse Bioscience berechnet.

Isotopenverfolgung und Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

hMDMs wurden in RPMI 1640 mit 11 mM [$U^{13}C_6$]-Glukose kultiviert und behandelt. Die Zellen wurden mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, mit 250 ml eiskaltem MeOH und ddH₂O, dass 1 mg/ml Pentandioic-d₆-Säure (als interner Standard) enthielt, abgekühlt und in ein Mikrotube umgefüllt, das mit 250 ml Chloroform vorgefüllt war. Die polare Phase wurde bis zur Trockenheit verdampft. Die Proben wurden unter Verwendung von 15 ml Methoxyaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridin) (Sigma-Aldrich) und 15 ml N-Methyl-N[tert-Butyldimethylsilyl-Trifluoracetamid] (Restek) derivatisiert. Ein Mikroliter wurde in

einen GC 7890A Gaschromatographen (Agilent) im splitless-Modus injiziert und auf einem 5975 Massenspektrometer (Agilent) im selektiven Ionenüberwachungsmodus erfasst. Die Daten wurden mit der Metabolite Detector-Software analysiert.

Statistische Analyse

Die Daten wurden unter Verwendung von Microsoft Excel und GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) analysiert. Sofern nicht anders angegeben, wurde für die statistische Analyse eine Varianzanalyse (Englisch: *Analysis of Variance*, ANOVA) mit einem Bonferroni-Posttest und Korrektur für multiple Tests gegen alle Gruppen verwendet. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und werden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Verschiedene PRR-Liganden aktivieren ACLY und TBK1 in THP1-Zellen

Zunächst wurde die humane Monozytenzelllinie THP-1 mit verschiedenen Liganden der unterschiedlichen TLRs stimuliert. Hier wurde untersucht, welche Liganden eine TBK1- und ACLY-Aktivierung auslösen können. ACLY wurde nach Stimulation mit Pam3CSK4, Poly(I:C), cGAMP, MDP, DAP und TNF- α phosphoryliert (Abb. 1A). TBK1 zeigte eine starke Phosphorylierung nach cGAMP-Stimulation, während TLR4-, TLR3-, IFN α - und IFN β - nur eine geringe Aktivierung bewirkten (Abb. 1B). Als Nächstes wurde die Rolle von TBK1 in der NF- κ B-Signalweg Aktivierung in THP-1-Zellen untersucht. Alle getesteten Liganden zeigten eine verminderte NF- κ B-Aktivierung, mit Ausnahme von R848, DAP, LPS und Pam3CSK4 (Abb. 1C, 1D).

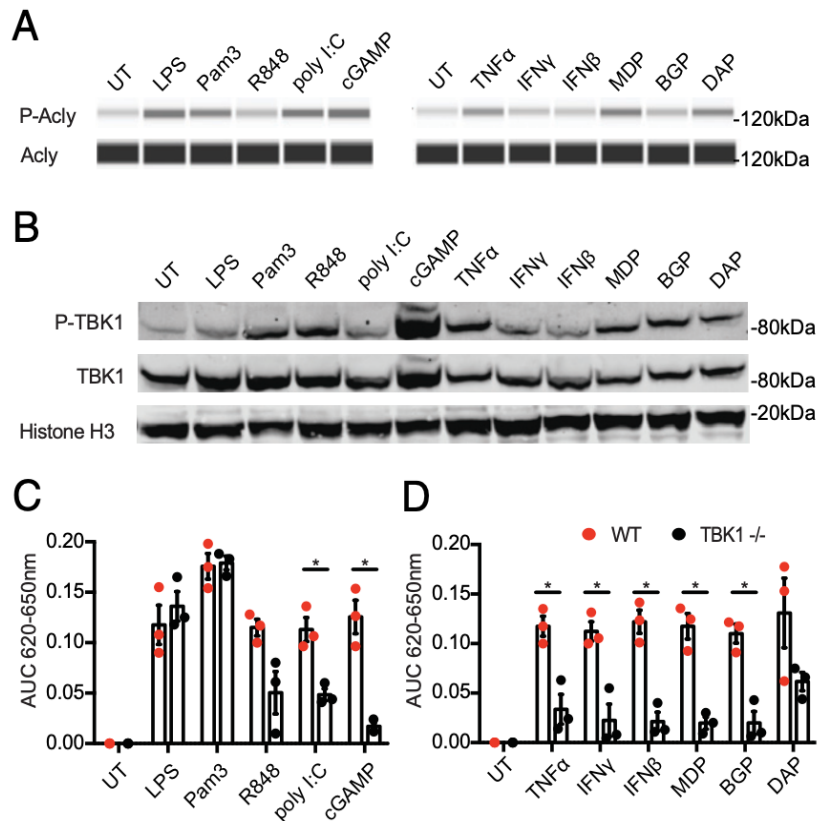


Abb. 1. A: Jess-Immunoassay für ATP Citrate Lyase (ACLY) Ser455-Phosphorylierung und ACLY. THP-1 Zellen wurden 2 Stunden lang mit den angegebenen Liganden stimuliert. LPS: Lipopolysaccharide; Pam3: Pam3CysSerLys4; R848: Resiquimod; poly I:C: Polyinosinic:polycytidylic acid; cGAMP: cyclisches Guanosin-Adenosin-Monophosphat; TNFα: Tumornekrosefaktor alpha, IFNγ: Interferon gamma; IFNβ: Interferon beta; MDP: Muramyl-Dipeptide; BGP: Beta-glucan peptide; DAP: γ-D-Glu-mDAP. B: Immunoblot für TANK binding kinase 1 (TBK1) -Ser172-Phosphorylierung, TBK1 und Histone H3. THP-1 Zellen wurden 2 Stunden mit den angegebenen Liganden stimuliert. Ein Vertreter von drei unabhängigen Experimenten wird gezeigt (A und B). C, D: nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (NF-κB)-Aktivierung in THP-1 Dual Zellen. Zellen wurden 24 Stunden lang mit den angegebenen Liganden stimuliert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus Duplikaten von drei unabhängigen Experimenten. *p < 0,05. Modifiziert nach Nickenig et al., 2024.

1.3.2 TBK1 phosphoryliert ACLY und moduliert die cGAMP induzierte Immunantwort

In murinen Makrophagen kontrolliert AKT die Phosphorylierung von ACLY (Langston et al., 2019; Lauterbach et al., 2019; Covarrubias et al., 2016) und TBK1 phosphoryliert AKT (Everts et al., 2014). Diese Ergebnisse konnten in humanen THP-1 Zellen auch wiederholt und bestätigt werden (Abb. 2A).

Zudem zeigte sich eine verminderte AKT-Phosphorylierung in THP-1 Zellen, die entweder TBK1-knockout Zellen waren oder mit dem TBK1-Inhibitoren Amlexanox behandelt

wurden (Abb. 2A, Abb. 2B). Als Nächstes wurde analysiert, ob TBK1 auch die Phosphorylierung von ACLY vermittelt. Hier zeigte sich eine deutliche Phosphorylierung von ACLY nach cGAMP-Stimulation (Abb. 2C). Die Phosphorylierung von ACLY nach cGAMP-Stimulation war in TBK1-defizienten THP-1-Zellen (Abb. 2C) und in Anwesenheit von Amlexanox (Abb. 2D) vermindert. Dies zeigt, dass TBK1 die Aktivierung von ACLY und AKT in THP-1 Zellen vermittelt und kontrolliert.

Nachdem eine TBK1-abhängige ACLY-Aktivierung als Reaktion auf die STING-Aktivierung in diesen Zellen beobachtet wurde, wurde als Nächstes untersucht, ob ACLY die Ausschüttung von IL-6 und CXCL10 beeinflusst. Dies sind zwei Zytokine, die TBK1-abhängig induziert werden (Abe et al., 2014). Der Knockdown von ACLY mittels siRNA und die pharmakologische Inhibition von ACLY durch BMS-303141 (Li et al., 2007) verringerte die Ausschüttung sowohl von CXCL10 als auch von IL-6 (Abb. 2E, Abb. 2G). Der genetische Knockout und die pharmakologische Inhibition von TBK1 beeinflusste die Ausschüttung der Zytokine in ähnlicher Weise (Abb. 2F, Abb. 2G). Um mögliche nachteilige Auswirkungen durch Amlexanox zu vermeiden, wurde GSK8612, ein selektiver TBK1-Inhibitor, verwendet, da Amlexanox sowohl TBK1 als auch I κ B kinase-epsilon inhibiert (Thomson et al., 2019). Die erfassten Daten zeigen schließlich, dass ACLY eine TBK1-abhängige Immunantwort und Zytokin-Ausschüttung vermittelt.

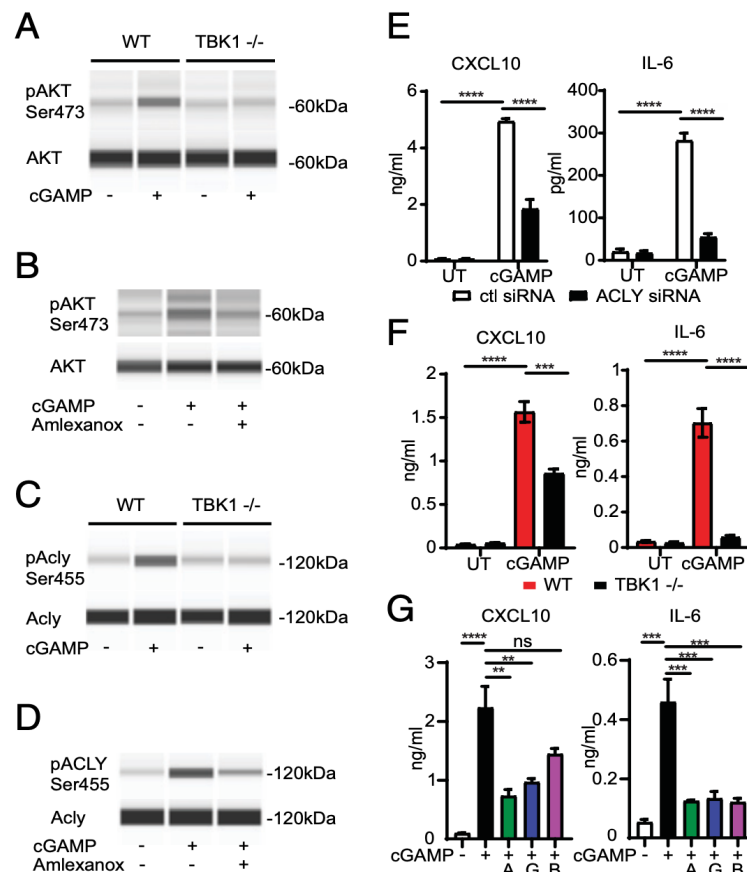


Abb. 2. A, B: Jess-Immunoassay für Proteinkinase B (AKT) Ser473-Phosphorylierung und AKT. THP-1 Zellen der angegebenen Genotypen wurden 2 Stunden lang mit cGAMP stimuliert (A) und THP-1 Zellen wurden 2 Stunden lang mit cGAMP und Amlexanox stimuliert (B). cGAMP: cyclisches Guanosin-Adenosin-Monophosphat. C, D: Jess-Immunoassay für ATP Citrate Lyase (ACLY) Ser455-Phosphorylierung und ACLY. THP-1 Zellen der angegebenen Genotypen wurden 2 Stunden lang mit cGAMP stimuliert (C) und THP-1 Zellen wurden 2 Stunden lang mit cGAMP und Amlexanox stimuliert (D). Ein Vertreter von drei unabhängigen Experimenten wird gezeigt (A-D). E, F, G: IL-6 und CXCL10-Sekretion von THP-1 Zellen. Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs elektroporiert und 24 Stunden lang mit cGAMP stimuliert (E). Zellen der angegebenen Genotypen wurden 24 Stunden lang mit cGAMP stimuliert (F). Zellen wurden mit cGAMP in Anwesenheit oder Abwesenheit der verschiedenen Inhibitoren Amlexanox (A), GSK8612 (G) oder BMS-303141 (B) 24 Stunden lang stimuliert (G). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus Duplikaten von drei unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert nach Nickenig et al., 2024.

1.3.3 TBK1 vermittelt ACLY-Phosphorylierung und Gen-Induktion in Makrophagen

Die Zytokin-Ausschüttung wurde auch in hMDMs untersucht, um nachzuvollziehen, ob die Ergebnisse aus der THP-1 Zelllinie übertragbar sind. IL-6- und CXCL10- Ausschüttung waren wie zuvor durch die Hemmung von TBK1 reduziert (Abb. 3A). Auch die Sekretion von IFN- β und TNF- α wurde untersucht und es wurde festgestellt, dass beide signifikant

verringert wurden (Abb. 3A). ACLY-Inhibition durch BMS-303141 zeigte nur eine leichte Reduktion von CXCL10 und IFN- γ , jedoch eine deutliche Reduktion von IL6 und TNF α (Abb. 3B).

Um festzustellen, ob ACLY für die Makrophagenaktivierung wichtig ist, wurde die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 untersucht und festgestellt, dass es durch die Hemmung von ACLY herunterreguliert wurde (Abb. 5).

Nun wurde die Beteiligung von TBK1 an der Aktivierung von ACLY untersucht. Auch in hMDMs führte die cGAMP-Stimulation zu Phosphorylierung von ACLY und AKT (Abb. 3C) und die Inhibition von TBK1 reduzierte die Phosphorylierung beider Proteine (Abb. 3C).

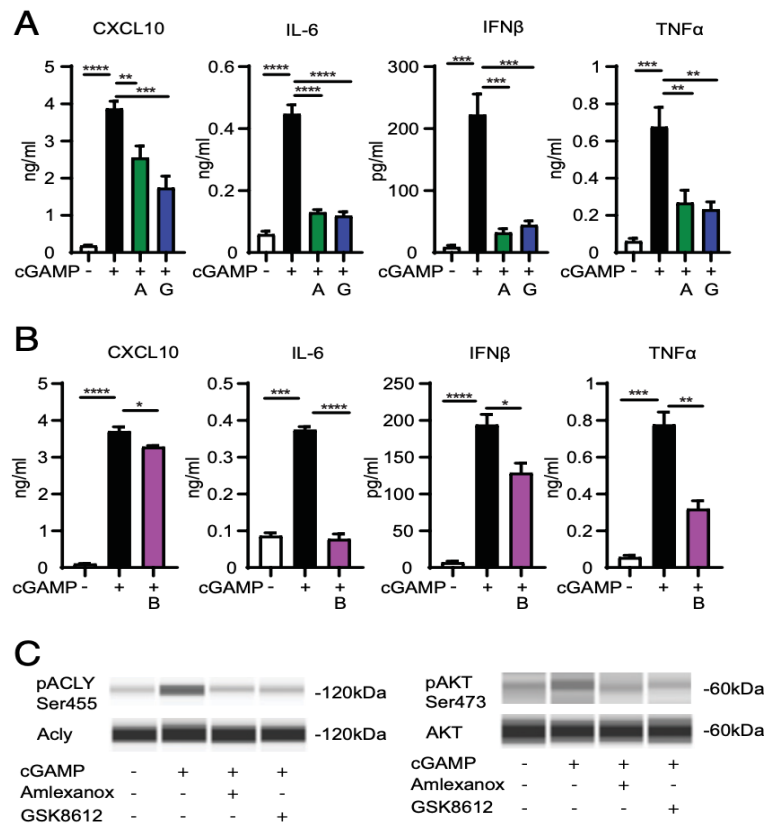


Abb. 3. A: C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10)-, Interleukin-6 (IL-6)-, Interferon beta (IFN- β)- und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-Sekretion von menschlichen monozytenabgeleiteten Makrophagen (hMDMs), stimuliert mit cyclischem Guanosin-Adenosin-Monophosphat (cGAMP) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Amlexanox (A) oder GSK8612 (G) für 24 Stunden, außer IFN- β für 6 Stunden.

B: CXCL10-, IL-6-, IFN- β - und TNF- α -Sekretion durch hMDMs, stimuliert mit cGAMP oder BMS 303141 (B) für 24 Stunden, außer IFN- β für 6 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus Duplikaten von drei Spendern aus einem Vertreter von drei unabhängigen Experimenten (A und B). C: Jess-Immunoassay für ATP Citrate Lyase (ACLY) Ser455-Phosphorylierung (pACLY), ACLY, Proteinkinase B (AKT) Ser473-Phosphorylierung (pAKT) und AKT. hMDMs wurden 2 Stunden lang mit cGAMP in Anwesenheit oder Abwesenheit von Amlexanox oder GSK8612 stimuliert. Gezeigt wird ein Vertreter von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert nach Nickenig et al., 2024.

1.3.4 STING Aktivierung führt zu TBK1-abhängiger Stoffwechsel-Anpassung in Makrophagen

Bisherige Studien konnten bereits zeigen, dass TBK1 die Glykolyse beeinflussen kann (Everts et al., 2014; Tan et al., 2019). Um auch im Rahmen dieser Studie den zellulären Stoffwechsel zu analysieren, wurde die extrazelluläre Azidifizierungsrate und Sauerstoffverbrauchsrate als Messungen für Glykolyse bzw. oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)

bestimmt. Nach STING-Aktivierung zeigte sich eine deutliche TBK1-abhängige Zunahme von Glykolyse, glykolytischer Kapazität, Zellatmung und maximaler Atmung (Abb. 4A, Abb. 4b). Dies spiegelt die entscheidende Rolle von TBK1 in der Vermittlung der metabolischen Umprogrammierung der Immunzelle wider.

Um die Beteiligung der Glykolyse am TCA-Zyklus zu analysieren, wurde auch der Stoffwechselfluss von $[U^{13}C6]$ Glucose gemessen. Hier wurde ein deutlicher TBK1-abhängiger Anstieg der M3-Isotopomere von Pyruvat und Laktat gemessen (Abb. 4C). Diese Ergebnisse stimmen mit der Zunahme der Glykolyse überein und bestätigen dieses Ergebnis. Um nun die Verbindung von Glykolyse und TCA-Zyklus zu untersuchen, wurde die Citrat-M2-Isotopomerhäufigkeit gemessen, da diese sich durch den Fluss von Pyruvat via der Pyruvat Dehydrogenase in den TCA-Zyklus ergibt. Auch diese nahm nach cGAMP-Stimulation tendenziell zu, jedoch nicht signifikant. TBK1 zeigte hier jedoch keinen Einfluss.

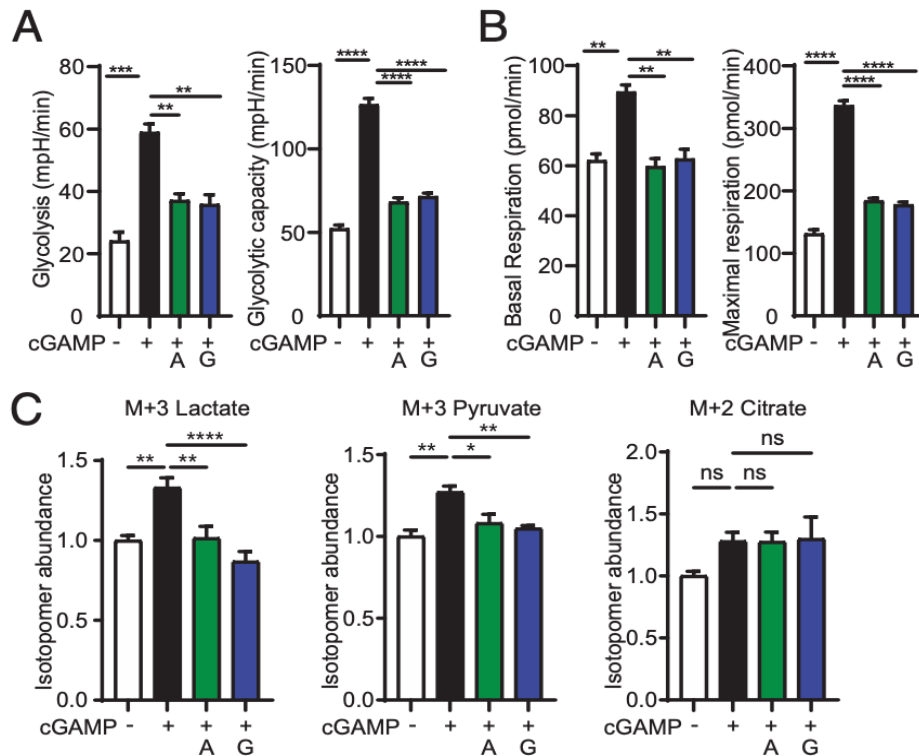


Abb. 4. A: Glykolyse und glykolytische Kapazität von menschlichen monozytenabgeleiteten Makrophagen (hMDMs) stimuliert mit cyclischem Guanotin-Adenosin-Monophosphat (cGAMP) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Amlexanox (A) oder GSK8612 (G) für 3 Stunden. B: Basale und maximale Atmung von hMDMs, welche 3 Stunden lang mit cGAMP in Anwesenheit oder Abwesenheit von Amlexanox (A) oder GSK8612 (G) stimuliert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus Triplikaten von drei Spendern aus einem Vertreter von zwei unabhängigen Experimenten. C: Isotopomerhäufigkeiten von M13-Laktat, M13-Pyruvat und M12-Citrat. hMDMs wurden in ($U^{13}C_6$) Glucose kultiviert und 3 Stunden lang mit cGAMP in Anwesenheit oder Abwesenheit von Amlexanox und GSK8612 stimuliert. Dargestellt sind gepoolte Daten von Vierfachmessungen von zwei Spendern. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert nach Nickenig et al., 2024.

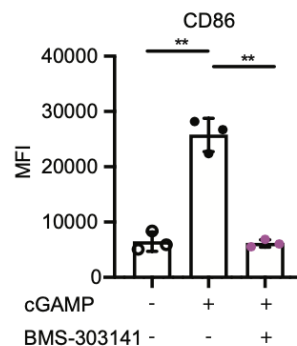


Abb. 5. CD-86 Expression von menschlichen monozytenabgeleiteten Makrophagen (hMDMs), welche mit cyclischem Guanotin-Adenosin-Monophosphat (cGAMP) und BMS 303141 für 3 Stunden stimuliert wurden. $n=3$. Modifiziert nach Nickenig et al., 2024.

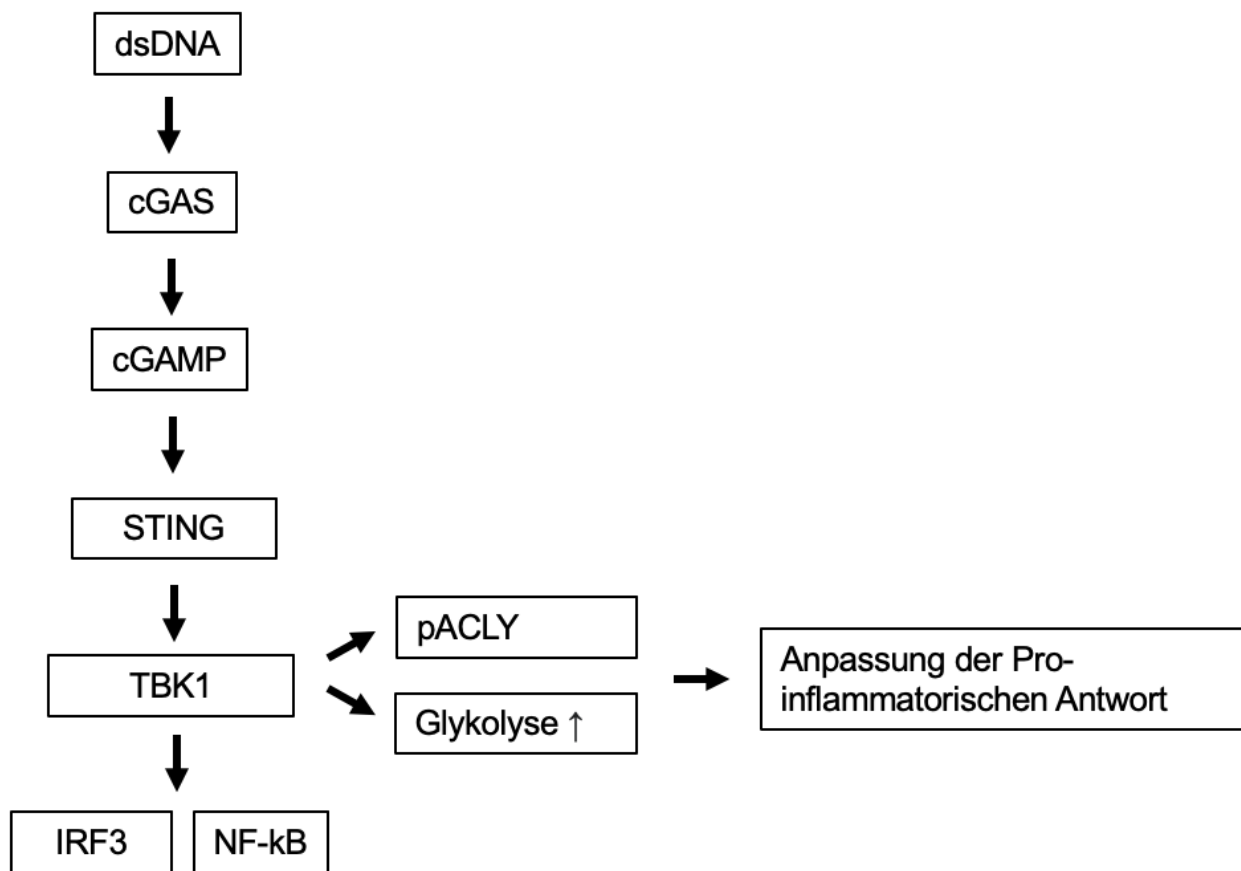


Abb. 6. Schema des Stimulator von Interferon Genen (STING) Signalweg und der TANK binding kinase 1 (TBK1) - abhängigen Beeinflussung der Glykolyse und dem Enzym ATP Citrate Lyase (ACLY). Quelle: Eigene Darstellung.

1.4 Diskussion

Allen biologischen Prozessen liegt der Metabolismus eines Organismus zugrunde, denn ohne verfügbare Energie sind lebenserhaltende Prozesse nicht möglich. Die immunologische Forschung hat sich in den letzten Jahren besonders auf die Integration von Immunität und Stoffwechsel fokussiert, denn die Interaktion zwischen beiden ist von entscheidender Bedeutung für die Gesundheit des Organismus. Auch immunologische Prozesse im Körper benötigen Energie, um funktionieren zu können. Eine effiziente Verteilung dieser Energie stellt sicher, dass die Abwehr von Krankheitserregern und die Aufrechterhaltung der Immunfunktion vorhanden ist. Eine Dysregulation in diesem Gleichgewicht kann zu verschiedenen gesundheitlichen Problemen führen, einschließlich

Autoimmunerkrankungen oder entzündlichen Erkrankungen (Chapman et al., 2022). Als Beispiel sei an dieser Stelle die Volkserkrankung Diabetes Mellitus aufgeführt: Es wird untersucht, wie Immunzellen die Homöostase des Fettgewebes zur Steuerung des Stoffwechsels regulieren, einschließlich der Glukosehomöostase. Die ordnungsgemäße Funktion hängt von der Interaktion von Adipozyten, verschiedenen Immunzellen und Stromazellen ab. Geweberesidente-Immunzellen tragen normalerweise auch zur Homöostase und Insulinsensitivität bei. Es wird jedoch angenommen, dass die Infiltration des entzündeten Fettgewebes, bei zum Beispiel Übergewicht, durch aktivierte Immunzellen dazu führt, dass Immunzellen Insulin konservieren und so eine Insulinresistenz vorantreiben können. Dieser Pathomechanismus kann zu der Entwicklung von Diabetes Mellitus beitragen. Gleichzeitig führt die Entwicklung von Diabetes Mellitus und einer damit verbundenen Hyperglykämie auch zu einer eingeschränkten Abwehr des Wirts gegen Krankheitserreger. Die Regulierung von Entzündung und Immunsystem, die in diesem Beispiel entgleist ist, stellt in Zukunft einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung metabolischer Entzündungen und Insulinresistenz dar (Man et al., 2022; Berbudi et al.; 2020).

Ein entscheidender Zusammenhang zwischen Metabolismus und Immunsystem befindet sich in den Immunzellen. Der Zellstoffwechsel kann den Zustand der Immunzellen beeinflussen und somit Mechanismen zur Verteidigung entfachen. Die durch Metabolite des Stoffwechsels vermittelte dynamische Neuprogrammierung einer Immunzelle, stellt eine der Grundlagen für eine funktionierende Immunabwehr dar. Signale von Oberflächenimmunrezeptoren übertragen Informationen für eine angepasste und spezifische Reaktion der Immunzelle. Dies wird unter anderem über den Stoffwechsel und die Bereitstellung von Energie in Form von beispielsweise Glukose reguliert. Studien zeigen, dass eine frühe Kommunikation zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem stattfindet und somit auch die Reaktion der T- und B-Zellen durch unter anderem Stoffwechselprodukte verändert und angepasst wird (Chapman et al., 2020; Chou et al., 2022).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen zellulären Stoffwechselprozessen und ACLY nach STING-Aktivierung in Immunzellen zu untersuchen.

Der Protein Komplex STING befindet sich im Zytosol. DNA, von zum Beispiel viralem Ursprung, wird erkannt, um dann eine antivirale Reaktion zu induzieren (Ablasser et al., 2019). Das Enzym cGAS wird durch die Bindung von DNA aktiviert und produziert das Second-Messenger-Molekül cGAMP, welches ein starker Agonist des STING-Rezeptors

ist. STING aktiviert Transkriptionsfaktoren, initiiert Autophagie über TBK1 und leitet die Immunreaktion ein (Ishikawa et al., 2009; Ablasser et al 2013).

ACLY ist ein im Zytosol und Zellkern lokalisiertes Enzym, welches die Produktion von zytosolischem Acetyl-CoA katalysiert, wodurch zum Beispiel ein Substrat für die De-novo Biosynthese von Fettsäuren und Cholesterin oder zur Acetylierung von Histonen entsteht (Chypre et al., 2012; Wellen et al., 2009). ACLY verwendet das essentielle Zwischenprodukt des TCA-Zyklus, Citrat, als Substrat, welches es in Anwesenheit von ATP zu Acetyl-CoA und Oxalacetat spaltet (Infantino et al., 2011; Watson et al., 1969).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach STING-Aktivierung, TBK1 die Phosphorylierung von ACLY kontrolliert und auch die Zytokin Ausschüttung maßgeblich verändert. Auch die Expression von CD86, ein Oberflächenprotein zur Aktivierung von T-Zellen im Zuge der Immunantwort, zeigte eine starke Reduktion nach ACLY-Inhibition. Gleiches Ergebnis konnte auch bereits nach TLR4-Aktivierung gezeigt werden (Lauterbach et al., 2019). Auch die Analyse der Glykolyse und der glykolytischen Kapazität zeigte einen deutlichen TBK1-abhängigen Anstieg nach STING-Aktivierung.

Die hier präsentierten Ergebnisse lassen uns zu dem Schluss kommen, dass TBK1 die Phosphorylierung von ACLY und die Hochregulation der Glykolyse vermittelt. Dies führt zu zellulären Anpassungen nach STING-Aktivierung und verändert die direkte Immunantwort. Diese wird TBK1-abhängig modifiziert, da TBK1-Inhibition sowohl Glykolyse als auch ACLY-Phosphorylierung signifikant herunterreguliert.

Auch die OXPHOS-Rate wurde nach STING-Aktivierung signifikant erhöht. Dies konnte bisher nicht in der frühen Immunantwort von anderen TLRs gezeigt werden. Es lässt darauf schließen, dass auch andere Faktoren als TBK1 an der Adaption des Zellstoffwechsels beteiligt sind.

Die Verfügbarkeit des Substrats Citrat bestimmt die Acetyl-CoA-Produktion von ACLY. Citrat kann entweder durch die direkte Bereitstellung von Kohlenstoffen als Substrat oder durch die Verlagerung der ATP-Produktion vom TCA-Zyklus zur Glykolyse bereitgestellt werden. So wird die Entnahme von TCA-Zyklus-Metaboliten für andere Reaktionen ermöglicht. Wir nehmen an, dass die Zunahme der Glykolyse die ATP-Synthese unterstützt und dass Zwischenprodukte des TCA-Zyklus, wie Citrat, dann verwendet werden, um anabole Reaktionen zu erleichtern und weitere Stoffwechselprozesse in Kraft zu setzen.

Wie bereits erwähnt induziert auch LPS über TLR-4 einen erhöhten glykolytischen Fluss via ACLY und trägt zu einer Veränderung der Histon Acetylierung bei. Dies führt letztendlich zu einer angepassten Immunreaktion (Lauterbach et al., 2019). Diese Mechanismen scheinen im angeborenen Immunsystem eine wichtige Rolle zu spielen, um auf Pathogene zu reagieren und Verteidigungsmechanismen einzuleiten. Die pro-inflammatorische Antwort wird modifiziert, Gen-Transkription wird induziert und eine angepasste Reaktion der Zelle initiiert. So wird die Bekämpfung eines Pathogens intensiviert und spezifiziert. Die weitere Erforschung des Immunmetabolismus, insbesondere durch interdisziplinäre Ansätze, verspricht, neue Wege für die Therapie von vielen menschlichen Krankheiten zu finden.

1.5 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem spielt als erste Verteidigungsstufe unseres Organismus eine wichtige Rolle. Das Erkennen und Bekämpfen möglicher Pathogene und Krankheitserreger zählt zu den Hauptaufgaben. Hierzu gehören zum Beispiel Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die Auslösung von Entzündungsreaktionen, das Komplementsystem, natürliche Killerzellen und Barrieren wie Haut und Schleimhäute. In den letzten Jahren wurde versucht zu ergründen, wie das angeborene Immunsystem diesen komplexen Prozess vollzieht und koordiniert. Dabei wurden verschiedene Signalwege untersucht und versucht die Interaktion in diesem System zu verstehen.

In letzter Zeit ist zudem das Feld für Immunmetabolismus immer relevanter geworden. Die Interaktion von Immunsystem und Stoffwechsel spielt eine kritische Rolle in der Homöostase und der Gesundheit des Organismus. Abweichungen und Dysregulation können z. B. Autoimmunerkrankungen oder chronische, entzündliche Erkrankungen verursachen. Jedoch können Anpassungen der Immunantwort auch zu einer spezifischen und effektiven Verteidigung beitragen. Eine erhöhte Bereitstellung von Glukose nach Lipopolysaccharid-Aktivierung bewirkt eine Änderung in der pro-inflammatorischen Antwort durch Beeinflussung der Histon-Acetylierung und führt somit zu einer veränderten Immunantwort.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Aktivierung des Stimulator von Interferon Genen Signalweg (STING) eine Änderung im Stoffwechsel von Makrophagen bewirkt. Das durch STING stimulierte Enzym TANK binding Kinase 1 (TBK1) ist maßgeblich an der

Hochregulation der Glykolyse beteiligt. STING-Aktivierung initiiert die Phosphorylierung von ATP-Citrate Lyase (ACLY) in menschlichen Makrophagen und beeinflusst ACLY über TBK1.

Unsere Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass STING über TBK1 die Aktivität von ACLY und der Glykolyse beeinflusst, und zelluläre Anpassungen an STING vermittelt. STING-Aktivierung vermittelt daraufhin die metabolische Umprogrammierung der Immunantwort und passt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren an.

Es bleibt ein spannendes Forschungsgebiet und es gilt herauszufinden, welche Signalmoleküle und Stoffwechselsubstrate über TBK1 und Glukose hinaus Veränderungen nach STING Aktivierung bewirken.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abe, T., and G. N. Barber. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF- κ B activation through TBK1. *J Virol.* 2014; 88: 5328-5341

Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T. et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 2013; 498, 380–384

Ablasser, A. & Chen, Z. J. cGAS in action: expanding roles in immunity and inflammation. *Science* 2019; 363

Berbudi A, Rahmadika N, Tjahjadi AI, Ruslami R. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Curr Diabetes Rev.* 2020; 442-449

Covarrubias, A. J., H. I. Aksoylar, J. Yu, N. W. Snyder, A. J. Worth, S. S. Iyer, J. Wang, I. Ben-Sahra, V. Byles, T. Polynne-Stapornkul, et al. Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *eLife* 2016; 5: e11612

Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allerg Clin Immunol.* 2010; Feb;125 S3-23

Chapman NM, Boothby MR, Chi H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20:55–70

Chapman NM, Chi H. Metabolic adaptation of lymphocytes in immunity and disease. *Immunity* 2022; 55:14–30

Chou WC, Rampanelli E, Li X, Ting JP. Impact of intracellular innate immune receptors on immunometabolism. *Cell Mol Immunol.* 2022; 19:337–51

Chypre M, Zaidi N, Smans K. ATP-citrate lyase: A mini-review. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 422:1–4

Everts B, Amiel S, C.-C. Huang, A. M. Smith, C.-H. Chang, W. Y. Lam, V. Redmann, T. C. Freitas, J. Blagih, G. J. W. van der Windt, et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKE supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol.* 2014; 15: 323-332

Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S.-M. Liao, and T. Maniatis. IKKe and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003; 4: 491-496

Gui, X., H. Yang, T. Li, X. Tan, P. Shi, M. Li, F. Du, and Z. J. Chen. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature* 2019; 567: 262-266

Hansen, A. L., A. M. Brandtoft, M. Nyegaard, A. L. Thielke, D. Olganier, and C. K. Holm. Global transcriptional changes in response to cGAMP depend on STING in human THP-1 cells. *Cell Mol Immunol.* 2018; 15: 983-985

Infantino V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, Di Noia MA, Calvello R, et al. The mitochondrial citrate carrier: A new player in inflammation. *Biochem J.* 2011; 438:433–6

Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009; 461, 788–792

Langston, P. K., A. Nambu, J. Jung, M. Shibata, H. I. Aksoylar, J. Lei, P. Xu, M. T. Doan, H. Jiang, M. R. MacArthur, et al. Glycerol phosphate shuttle enzyme GPD2 regulates macrophage inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2019; 20: 1186-1195

Lauterbach, M. A., J. E. Hanke, M. Serefidou, M. S. J. Mangan, C.-C. Kolbe, T. Hess, M. Rothe, R. Kaiser, F. Hoss, J. Gehlen, et al. Toll-like receptor signaling rewires macrophage metabolism and promotes histone acetylation via ATP-citrate lyase. *Immunity* 2019; 51: 997-1011

Li, J. J., H. Wang, J. A. Tino, J. A. Robl, T. F. Herpin, R. M. Lawrence, S. Biller, H. Jamil, R. Ponticiello, L. Chen, et al. 2-Hydroxy-N-arylbenzenesulfonamides as ATP-citrate lyase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17: 3208-3211

Man K, Kallies A, Vasanthakumar A. Resident and migratory adipose immune cells control systemic metabolism and thermogenesis. *Cell Mol Immunol.* 2022; 19: 420–30

Nickenig M, Mangan M et al. Cutting Edge: STING induces ACLY activation and metabolic adaptations in human macrophages through TBK1. *J Immunol.* 2024; 212 1: 7-11

Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen, and Z. J. Chen. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013; 339: 786-791

Tan, Y., and J. C. Kagan. Innate immune signaling organelles display natural and programmable signaling flexibility. *Cell* 2019; 177: 384-398

Tanaka, Y., and Z. J. Chen. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal.* 2012; 5: ra20

Thomson, D. W., D. Poeckel, N. Zinn, C. Rau, K. Strohmmer, A. J. Wagner, A. P. Graves, J. Perrin, M. Bantscheff, B. Duempelfeld, et al. Discovery of GSK8612, a highly selective and potent TBK1 inhibitor. *ACS Med Chem Lett.* 2019; 10: 780-785

Watson JA, Fang M, Lowenstein JM. Tricarballoylate and hydroxycitrate: Substrate and inhibitor of ATP: Citrate oxaloacetate lyase. *Arch Biochem Biophys.* 1969; 135:209–17

Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 2009; 324:1076–80

Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, and Z. J. Chen. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013; 339: 826-830

2. Veröffentlichung

The Journal of
Immunology

RESEARCH ARTICLE | DECEMBER 01 2023

Cutting Edge: STING Induces ACLY Activation and Metabolic Adaptations in Human Macrophages through TBK1

Maximilian Nickenig; ... et. al

J Immunol (2024) 212 (1): 7–11.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200835>

Related Content

ACLY regulates CD4 T cell activation and differentiation

J Immunol (May,2020)

Acly Deficiency Enhances Myelopoiesis through Acetyl Coenzyme A and Metabolic–Epigenetic Cross-Talk

Immunohorizons (December,2022)

Cutting Edge: STING Induces ACLY Activation and Metabolic Adaptations in Human Macrophages through TBK1

Maximilian Nickenig,^{*} Matthew S. J. Mangan,^{*} Hye Eun Lee,[†] Konstantinos Symeonidis,[‡] Antonia Henne,[§] Romina Kaiser,^{*} Eike Geißmar,^{*} Hendrikus Garritsen,^{¶,||} Zeinab Abdullah,[‡] Karsten Hiller,[§] Eicke Latz,^{*,#,*,††,1} and Mario A. Lauterbach^{§,1}

The 2'3'-cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS)–stimulator of IFN genes (STING) pathway can sense infection and cellular stress by detecting cytosolic DNA. Upon ligand binding, cGAS produces the cyclic dinucleotide messenger cGAMP, which triggers its receptor STING. Active STING initiates gene transcription through the transcription factors IFN regulatory factor 3 (IRF3) and NF-κB and induces autophagy, but whether STING can cause changes in the metabolism of macrophages is unknown. In this study, we report that STING signaling activates ATP-citrate lyase (ACLY) by phosphorylation in human macrophages. Using genetic and pharmacologic perturbation, we show that STING targets ACLY via its prime downstream signaling effector TANK (TRAF family member–associated NF-κB activator)-binding kinase 1 (TBK1). We further identify that TBK1 alters cellular metabolism upon cGAMP treatment. Our results suggest that STING-mediated metabolic reprogramming adjusts the cellular response to DNA sensing in addition to transcription factor activation and autophagy induction. *The Journal of Immunology*, 2024, 212: 7–11.

Innate immune signaling receptors sense microbial products and recognize sterile tissue damage. TLR signaling leads to the activation of transcription factors that activate the transcription of a range of inflammatory factors, such as cytokines and chemokines. Concomitant to inducing proinflammatory mRNA transcription, TLR signaling elicits metabolic adaptations that enhance and qualitatively shape the

transcriptional response (1, 2). For example, TLR4 activation by LPS induces rapid increases in glycolytic flux via engagement of the glycerol 3-phosphate shuttle and signaling via the kinase AKT, enhancing ATP-citrate lyase (ACLY) activity through phosphorylation. ACLY is a cytosolic enzyme that uses mitochondria-derived citrate to synthesize acetyl-CoA and oxaloacetate. LPS stimulation of macrophages increases substrate availability to ACLY because of increased glycolysis. These changes in the cellular metabolism after TLR4 signaling ultimately enhance histone acetylation, which alters the quality and quantity of inflammatory gene induction (1, 2).

Recently, TANK (TRAF family member–associated NF-κB activator)-binding kinase 1 (TBK1) has been implicated in mediating the glycolytic shift downstream of TLR activation (3, 4). TBK1 is required for IFN regulatory factor 3 (IRF3)–dependent transcription (5), whereas it is dispensable for NF-κB–mediated gene induction downstream of TLRs (6, 7). For other innate immune pathways, such as the 2'3'-cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase–stimulator of IFN genes (STING) pathway, TBK1 transduces ligand binding to the activation of NF-κB (8). The innate sensor cGAMP synthase recognizes cytosolic DNA, triggering synthesis of the cyclic nucleotide cGAMP. cGAMP serves as a second messenger to activate STING (9, 10). Active STING recruits TBK1, which subsequently mediates activation of IRF3 and NF-κB (8, 11) and further initiates noncanonical autophagy (12). Once active, IRF3 and NF-κB translocate to the nucleus to induce gene transcription, including type I IFNs and other cytokines (13).

It is currently unclear whether ACLY activity contributes to gene induction downstream of STING activation and pattern recognition receptor (PRR) signaling in general.

^{*}Institute of Innate Immunity, University Hospital Bonn, University of Bonn, Bonn, Germany; [†]Gachon Biomedical Convergence Institute, Gachon University Gil Medical Center, Incheon, Republic of Korea; [‡]Institute of Molecular Medicine and Experimental Immunology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; [§]Department of Bioinformatics and Biochemistry, Braunschweig Integrated Centre of Systems Biology, Technical University of Braunschweig, Braunschweig, Germany; [¶]Institute of Transfusion Medicine, Braunschweig Clinic, Braunschweig, Germany; ^{||}Fraunhofer Institute for Surface Engineering and Thin Films IST, Braunschweig, Germany; ^{||}German Center for Neurodegenerative Diseases, Bonn, Germany; ^{**}Department of Infectious Diseases and Immunology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA; and ^{††}Deutsches Rheuma Forschungszentrum Berlin, Berlin, Germany

¹E.L. and M.A.L. contributed equally to this work.

ORCID: 0009-0000-4906-5540 (R.K.); 0000-0002-6167-1532 (H.G.); 0000-0003-1647-3710 (M.A.L.).

Received for publication December 13, 2022. Accepted for publication October 15, 2023.

This work was supported by European Union through Horizon 2020 Framework Programme Grant 848146, by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (German Research

Foundation) under Germany's Excellence Strategy (EXC2151) (Grant 390873048) and DFG SFB1454 (Grant 432325352), SFB1402 (Grant 414786233), TRR237 (Grant 369799452), GRK2168 (Grant 272482170), and Sachbeihilfe (Grant 506166706), and by the Helmholtz Association future topic "Immunology and Inflammation" (Grant ZT-0027).

Address correspondence and reprint requests to Eicke Latz, Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. E-mail address: eicke.latz@drfz.de

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ACLY, ATP-citrate lyase; cGAMP, 2'3'-cyclic GMP-AMP; DAP, γ-D-Glu-mDAP; hMDM, human monocyte-derived macrophage; IKKε, inhibitor of NF-κB kinase subunit ε; IRF3, IFN regulatory factor 3; MDP, muramyl dipeptide; OXPHOS, oxidative phosphorylation; Pam3CSK4, Pam3CysSerLys4; PRR, pattern recognition receptor; R848, resiquimod; STING, stimulator of IFN genes; TBK1, TANK-binding kinase 1.

Copyright © 2023 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/23/\$37.50

Materials and Methods

THP-1 cell culture

Human wild-type and TBK1 knockout THP-1 cells (NF- κ B-SEAP and IRF3 reporter cells, InvivoGen) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 100 μ g/ml Normocin (InvivoGen). THP-1 cells (American Type Culture Collection) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. For some experiments, THP-1 cells were pretreated with PMA (20 ng/ml) for 3 h and then left to adhere overnight in medium.

PBMC isolation, macrophage differentiation, and culture

Buffy coats and leukocyte reduction chambers from anonymous donors were obtained according to the protocols accepted by the Institutional Review Board at the University Clinic Bonn (local ethics votes Lfd. Nr. 075/14) and Landesärztekammer Niedersachsen (ethics votes Bo/64/2021).

Human PBMCs were obtained by density gradient centrifugation in Ficoll-Paque. Monocytes were isolated using CD14 magnetic microbeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Human monocyte-derived macrophages (hMDMs) were obtained by differentiating CD14⁺ monocytes in 50 U/ml recombinant human M-CSF (ImmunoTools) in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1 $\times$ GlutaMAX, and 1 $\times$ sodium pyruvate for 3 d (Thermo Scientific).

Cell culture reagents

The following reagents were used: PMA, 20 nM (Sigma-Aldrich); Amlexanox 50 μ M (Selleck Chemicals); GSK8612, 4 μ M (MedChemExpress); BMS-303141, 50 μ M (Sigma-Aldrich); ultrapure LPS *Escherichia coli* 0111:B4, 100 ng/ml; Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4), 25 ng/ml; resiquimod (R848), 100 ng/ml; poly(I:C) low molecular weight, 50 μ g/ml; cGAMP, 10 μ g/ml; β -glucan peptide (BGP), 100 μ g/ml; muramyl dipeptide (MDP), 10 μ g/ml; and γ -D-Glu-mDAP (DAP), 50 ng/ml (all InvivoGen); TNF- α , 50 ng/ml (PeproTech), IFN- γ , 500 U/ml (ImmunoTools); IFN- β , 500 U/ml (STEMCELL Technologies). Cell viability was determined using CellTiter-Blue assay (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Small interfering RNA electroporation

THP-1 cells (1×10^6) were resuspended in 20 μ l of buffer P3 (Lonza), mixed with 2 μ M small interfering RNA (Thermo Fisher Scientific), and electroporated using the CM-137 program in a Lonza 4D electroporator (Lonza).

Immunoblotting and simple Jess Western analyses

Western blotting was performed as described in Lauterbach et al. (2). Jess Western analyses were conducted according to the manufacturer's protocol (ProteinSimple, Bio-Techne, Santa Clara, CA). Images were analyzed and uniformly adjusted in contrast using the LI-COR Empiria Studio Software and Compass for Simple Western Software respectively.

For quantification of signal peaks, the area under the curve of the respective peak was determined using the Compass for simple western software and ImageJ.

Primary Abs were as follows: phospho-TBK1/NAK (Ser¹⁷²), TBK1/NAK, histone H3, phospho-AKT S473 (D9E), AKT (pan) (40D4), ACLY (D1X6P), phospho-ACLY Ab, citrate synthase (D7V8B) (all from Cell Signaling Technology), and β -actin (LI-COR Biosciences).

Measurement of NF- κ B activity

The NF- κ B activity in THP-1 Dual cells was assessed by measuring the secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) activity in the supernatant (InvivoGen). QUANTI-Blue solution was used to detect the level of SEAP according to the manufacturer's instructions.

Measurement of cytokine secretion

Concentrations of cytokines were determined using commercial ELISA DuoSet (human IL-6, human CXCL10, TNF- α , and Quantikine (human IFN- β) kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry

For measurement of mitochondrial potential, hMDMs were incubated with TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate) (100 nM) for 30 min at 37°C, washed once, and stimulated with the listed ligands at 37°C for 4 h. For the mitochondrial reactive oxygen species measurement, MitoSOX was added for the final 30 min of the treatment prior (2 μ M, Thermo Fisher Scientific). Cells were collected into FACS tubes, resuspended in FACS buffer (PBS with 0.5% FBS) containing 1 μ g/ml DAPI, and analyzed using a FACSCanto machine (BD Biosciences).

CD86 expression was assessed by staining single-cell suspensions with anti-human CD86 (eBioscience, catalog no. 12-0869-42) and with Live/Dead fixable near-infrared (Invitrogen, catalog no. 247761) for 20 min on ice. Cells were then resuspended in FACS buffer (PBS + 0.5% FBS + 0.2% sodium azide) and were acquired on an LSRFortessa II. All FACS data were analyzed in FlowJo (Tree Star).

Gene expression analysis by quantitative PCR

RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen). Equal quantities of RNA from each sample were reverse transcribed into cDNA using the SuperScript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Quantitative real-time PCR was performed using the Maxima SYBR Green/ROX quantitative PCR master mix (Thermo Fisher Scientific). The expression of target genes was normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase expression.

Oxygen consumption rate and extracellular acidification rate measurements

Oxygen consumption rate and extracellular acidification rate were determined using an XF-96 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience). hMDMs (0.8×10^5) were plated and stimulated for 3 h in Seahorse XF96 cell culture microplates. One hour before the assay, media were changed to bicarbonate-free RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mM glutamine. Measurements were performed under basal conditions and after the sequential addition of final 10 mM glucose, 1 μ M oligomycin A, 2 μ M FCCP, and 0.5 μ M rotenone/antimycin A. Glycolysis, glycolytic capacity, basal respiration, and maximal respiration were calculated according to Seahorse Bioscience recommendations.

Stable isotope tracing and gas chromatography coupled to mass spectrometry

hMDMs (10^6) were cultured in RPMI 1640 containing 11 mM [U -¹³C₆] glucose and treated. Cells were washed with 0.9% NaCl solution, quenched with 250 μ l of ice-cold MeOH and ddH₂O containing 1 μ g/ml pentanedioic-d₆ acid (as an internal standard), and transferred into a microtube prefilled with 250 μ l of chloroform. The polar phase was evaporated to dryness. Samples were derivatized using 15 μ l of methoxyamine hydrochloride (20 mg/ml in pyridine) (Sigma-Aldrich) and 15 μ l of *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide (Restek). One microliter was injected into a GC 7890A gas chromatograph (Agilent) in the splitless mode and acquired on a 5975 mass spectrometer (Agilent) in the selective ion monitoring mode. Data were analyzed using Metabolite Detector software.

Statistical analysis

Data were analyzed using Microsoft Excel and GraphPad Prism 9 (GraphPad Software). Unless stated otherwise, one-way ANOVA with a Bonferroni posttest and correction for multiple testing against all groups were used for statistical analysis. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant and are shown as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

Results and Discussion

Although TBK1 signaling has been implicated in a broad range of innate immune receptors, only TLR4 and IL-4 receptor activation

have been demonstrated to phosphorylate and activate ACLY via phosphorylation (1, 2, 14). To identify which innate immune activators can trigger TBK1 and ACLY activation, we stimulated the human monocyte cell line THP-1 with ligands of TLRs (LPS, Pam3CSK4, R848, poly(I:C)), STING (cGAMP), cytokine receptors (TNF- α , IFN- β , and IFN- γ), dectin-1 (β -glucan peptide), or nucleotide-oligomerization domain (NOD)1 and NOD2 (MDP and DAP). As previously shown for murine macrophages, LPS treatment of THP-1 cells resulted in phosphorylation of ACLY. Interestingly, ACLY was selectively phosphorylated by some, but not all, of the ligands tested (Pam3CSK4, poly(I:C), cGAMP, MDP, DAP, and TNF- α) (Fig. 1A, Supplemental Fig. 1A). We next investigated TBK1 activation upon treatment with the different ligands by assessing its phosphorylation. Whereas TBK1 activation was low for TLR4, TLR3, and IFNAR signaling, among all other ligands tested, STING activation via cGAMP elicited potent TBK1 phosphorylation (Fig. 1B, Supplemental Fig. 1B). TBK1 is a central signaling hub downstream of many receptors, leading to the activation of transcription factors. We next sought to investigate the role of TBK1 in mediating NF- κ B activation in THP-1 cells expressing an NF- κ B reporter. As shown for TLR4 in the mouse system, NF- κ B activation downstream of TLR4 and TLR2 ligation by LPS and Pam3CSK4 was unaltered in TBK1-deficient THP-1 cells. However, with the exception of R848 and DAP, all other ligands tested exhibited defective NF- κ B activation. (Fig. 1C, 1D).

Given the potent concerted activation of ACLY and TBK1 by cGAMP, we further investigated their interplay in STING signaling. AKT controls ACLY phosphorylation in murine macrophages (1, 2, 14). As TBK1 was shown to phosphorylate Akt

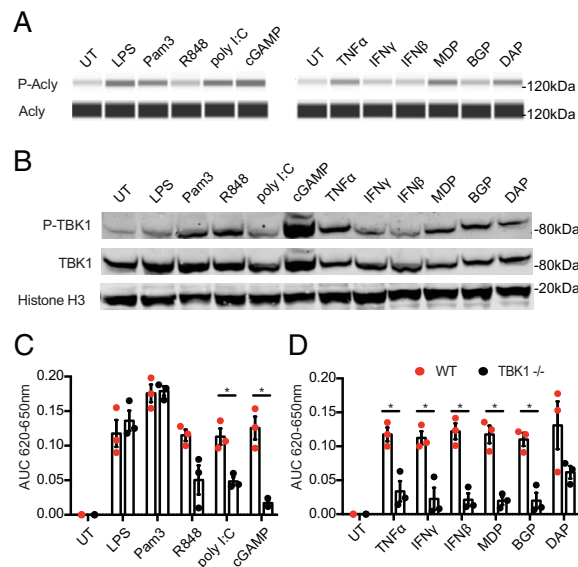


FIGURE 1. Activation of ACLY and TBK1 occurs downstream of several PRRs in THP-1 cells. (A) Jess immunoassay for ACLY Ser⁴⁵⁵ phosphorylation and ACLY. THP-1 cells were stimulated with indicated ligands for 2 h. (B) Immunoblot for TBK1 Ser¹⁷² phosphorylation, TBK1, and histone H3. For Histone H3 samples were run on a new gel. THP-1 cells were stimulated with the indicated ligands for 2 h. (A and B) One representative of three independent experiments is shown. See also Supplemental Fig. 2A and 2B. (C and D) NF- κ B activation in PMA pretreated THP-1 Dual cells. Cells of indicated genotypes were stimulated with indicated ligands for 24 h. Means $\pm$ SEM from three independent experiments are shown. * p < 0.05.

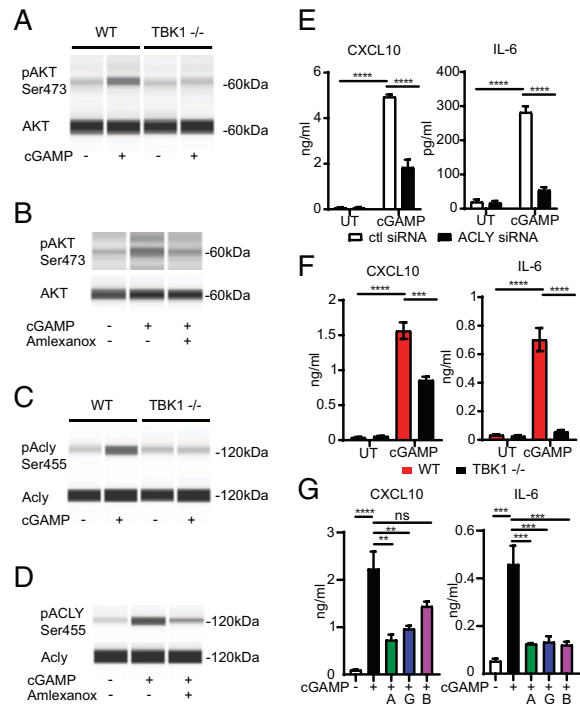


FIGURE 2. TBK1 mediates ACLY phosphorylation to modulate cGAMP-driven gene induction in THP-1 cells. (A and B) Jess immunoassay for AKT Ser⁴⁷³ phosphorylation and AKT. (A) THP-1 cells of indicated genotypes were stimulated with cGAMP for 2 h. (B) THP-1 cells were stimulated with cGAMP with and without Amlexanox for 2 h. (C and D) Jess immunoassay for ACLY Ser⁴⁵⁵ phosphorylation and AKT. (C) THP-1 cells of indicated genotypes were stimulated with cGAMP for 2 h. (D) THP-1 cells were stimulated with cGAMP with and without Amlexanox for 2 h. (A–D) One representative of three independent experiments is shown. See also Supplemental Fig. 2A. (E–G) IL-6 and CXCL10 secretion of PMA-treated THP-1 cells. (E) Cells were electroporated with indicated small interfering RNAs and stimulated with cGAMP for 24 h. (F) Cells of indicated genotypes were stimulated with cGAMP for 24 h. (G) Cells were stimulated with cGAMP with and without Amlexanox (A), GSK8612 (G), or BMS-303141 (B) for 24 h. (E–G) Means $\pm$ SEM from three independent experiments are shown. ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

in murine myeloid cells (3), we hypothesized that TBK1 might also be involved in mediating ACLY activation. We first sought to identify whether STING signaling targets AKT in human macrophages. Indeed, we detected increased phosphorylation of AKT at serine 473 upon STING activation in THP-1 cells (Fig. 2A). In TBK1-deficient cells, cGAMP failed to induce AKT phosphorylation (Fig. 2A). Similar results were obtained using Amlexanox, a small molecule inhibitor of TBK1 and its close homolog inhibitor of NF- κ B kinase subunit ϵ (IKK ϵ) (Fig. 2B). Having established this connection, we next analyzed whether TBK1 also mediates ACLY phosphorylation. ACLY phosphorylation upon cGAMP treatment was diminished in TBK1-deficient THP-1 cells (Fig. 2C) and in the presence of Amlexanox (Fig. 2D). We thus conclude that TBK1 is crucial for AKT and ACLY activation downstream of STING in THP-1 cells.

STING activation elicits broad transcriptional responses in various cell types, including THP-1 cells (15). Having observed TBK1-dependent ACLY activation in response to cGAMP treatment in these cells, we next investigated whether ACLY

affected secretion of IL-6 and CXCL10, two cytokines that are induced in a TBK1-dependent manner in mouse embryonic fibroblasts (8). ACLY knockdown (Supplemental Fig. 2B) diminished secretion of both CXCL10 and IL-6, with the inhibitory effect being more pronounced in IL-6 (Fig. 2E). Genetic TBK1 ablation affected mediator production in a similar manner (Fig. 2F). ACLY inhibition using BMS-303141 (16) significantly reduced cGAMP-elicited IL-6 secretion, whereas CXCL10 only tended to decrease (Fig. 2G). Pharmacological ablation of TBK1 activity potently reduced IL-6 and CXCL10 secretion (Fig. 2G). In addition to Amlexanox, we used GSK8612, a selective TBK1 inhibitor (17). In all cases inhibition was a specific effect, as none of the inhibitors reduced cell viability at the concentrations used (Supplemental Fig. 2C). Taken together, we conclude that ACLY contributes to TBK1-mediated gene induction in response to cGAMP.

To explore whether our findings would translate into primary human cells, we investigated the roles of TBK1 and ACLY in hMDMs. As observed previously in THP-1 cells, IL-6 secretion was reduced by TBK1 inhibition, with CXCL10 secretion having been reduced to a much lesser extent (Fig. 3A). We additionally assessed the effect of TBK1 inhibitors on the secretion of IFN- β and TNF- α and found that both were robustly decreased (Fig. 3A).

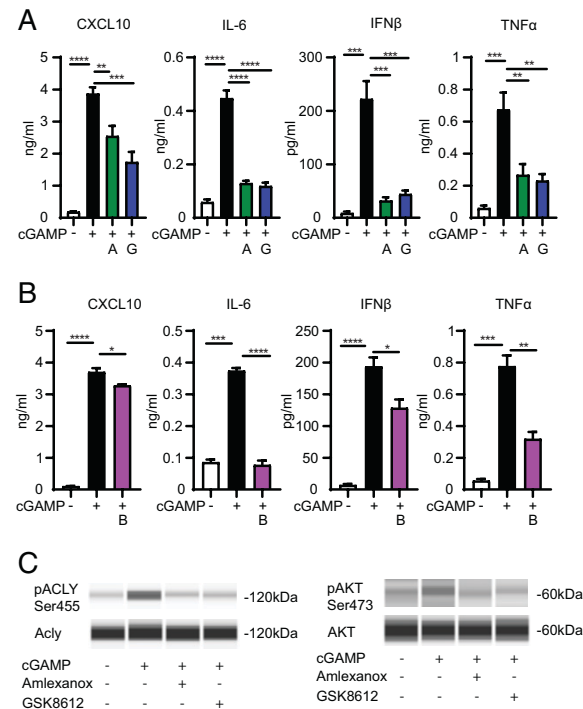


FIGURE 3. TBK1 mediates ACLY phosphorylation to modulate cGAMP-driven gene induction in hMDMs. (A) CXCL10, IL-6, IFN- β , and TNF- α secretion by hMDMs stimulated with cGAMP with and without Amlexanox (A) or GSK8612 (G) for 24 h, except IFN- β for 6 h. (B) CXCL10, IL-6, IFN- β , and TNF- α secretion by hMDMs stimulated with cGAMP with and without BMS 303141 (B) for 24 h, except IFN- β for 6 h. (A and B) Means $\pm$ SEM from three donors from one representative of three independent experiments are shown. (C) Jess immunoassay for ACLY Ser⁴⁵⁵ phosphorylation (pACLY), ACLY, AKT Ser⁴⁷³ phosphorylation (pAKT), and AKT. hMDMs were stimulated with cGAMP with and without Amlexanox or GSK8612 for 2 h. One representative of three independent experiments is shown. See also Supplemental Fig. S3C. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

To assess the involvement of ACLY, we next measured protein mediator secretion by cGAMP-stimulated hMDMs in the presence of BMS-303141. We found only a slight reduction in CXCL10 and IFN- β secretion (Fig. 3B). However, ACLY inhibition markedly decreased the secretion of IL-6 and TNF- α (Fig. 3B). These results were recapitulated on the transcriptional level. Targeting both TBK1 as well as ACLY reduced *IL6* and *TNFA* expression, whereas CXCL10 expression only tended to decrease (Supplemental Fig. 3A). To determine whether ACLY was important for macrophage activation beyond induction of inflammatory cytokines, we assessed expression of the costimulatory molecule CD86 and determined that it was downregulated by ACLY inhibition (Supplemental Fig. 3B), as previously shown for TLR4 activation (2).

Having confirmed that inhibition of TBK1 and ACLY affected cGAMP-driven gene induction in hMDMs, we next tested whether TBK1 was involved in ACLY activation. We observed ACLY and AKT phosphorylation within 2 h upon cGAMP treatment (Fig. 3C). TBK1 inhibition with Amlexanox and GSK8612 blunted stimulus-driven phosphorylation of both proteins (Fig. 3C, Supplemental Fig. 3C). Collectively, TBK1-driven activation of ACLY is required to fully induce inflammatory molecules in hMDMs.

TBK1 was previously shown to transduce the glycolytic shift following TLR activation in murine myeloid cells (3, 4). Similar reports for STING are lacking. To characterize changes in cellular metabolism upon STING activation, we stimulated hMDMs with cGAMP and analyzed their extracellular acidification rate and oxygen consumption rate by extracellular flux analysis as read-outs for glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS), respectively. We observed a prominent TBK1-dependent increase

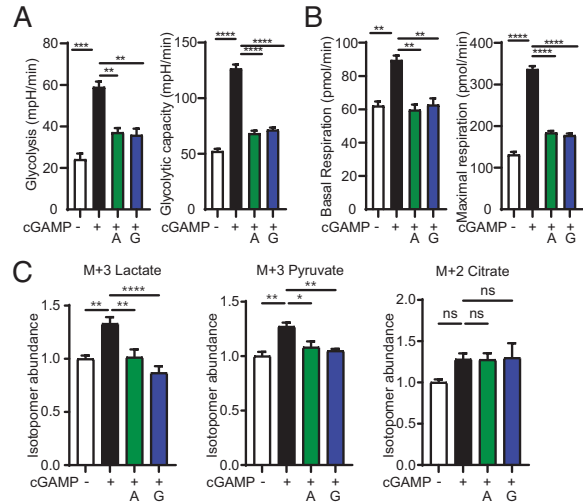


FIGURE 4. STING activation alters macrophage metabolism in a TBK1-dependent manner. (A) Glycolysis and glycolytic capacity of hMDMs stimulated with cGAMP with and without Amlexanox (A) or GSK8612 (G) for 3 h. (B) Basal and maximal respiration of hMDMs stimulated with cGAMP with and without Amlexanox (A) or GSK8612 (G) for 3 h. (A and B) Means $\pm$ SEM from three donors from one representative of two independent experiments are shown. (C) Isotopomer abundances of M+3 lactate, M+3 pyruvate, and M+2 citrate. hMDMs were cultured in [U-¹³C]₆ glucose and stimulated with cGAMP with and without Amlexanox or GSK8612 for 3 h. Pooled data of quadruplicate measurements from two donors are shown (means $\pm$ SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

in glycolysis and glycolytic capacity (Fig. 4A). Similarly cellular respiration and maximal respiration were elevated within 3 h poststimulation in a TBK1-dependent manner (Fig. 4B). Both TBK1 inhibitors did not affect citrate synthase levels, mitochondrial reactive oxygen species, and mitochondrial potential (Supplemental Fig. 4A and 4B). Besides its activation, acetyl-CoA production by ACLY critically depends on the availability of its substrate citrate. This demand can be met by either directly providing carbons as substrate or shifting ATP production from the TCA cycle and OXPHOS to glycolysis, enabling withdrawal of TCA cycle metabolites for reactions other than oxidation in the TCA cycle.

To further characterize changes in glycolytic metabolism upon STING activation, we analyzed the metabolic flux of [U-¹³C₆] glucose by gas chromatography–mass spectrometry (Supplemental Fig. 4D). Consistent with increased glycolytic fluxes, analysis of [¹³C] labeling patterns revealed increases in the M+3 isotopomers of pyruvate and lactate (Fig. 4C). To analyze how glycolysis contributed to the TCA cycle, we analyzed citrate M+2 isotopomer abundance, which results from flux of pyruvate through pyruvate dehydrogenase into the TCA cycle. M+2 isotopomer abundance tended to increase upon cGAMP treatment, but not to a significant level. Also, TBK1 inhibition had no effect on M+2 isotopomer abundance. Based on these findings, we conclude that STING alters glycolysis and OXPHOS, with TBK1 specifically controlling upregulation of glycolysis.

Following activation, STING is known to promote transcription factor activation and autophagy induction via TBK1. The findings presented in the current study lead us to conclude that by transducing changes in ACLY activation status and glycolysis, TBK1 conveys another layer of cellular adaptations to STING activation. Of note, other studies have reported potential redundancy between TBK1 and IKKε (3, 4) in mediating metabolic changes downstream of TLR stimulation. We did not observe such mechanisms in the context of cGAMP-driven ACLY activation in human cells, as TBK1 ablation alone and a compound targeting TBK1 over IKKε by two orders of magnitude were sufficient to blunt STING-driven ACLY phosphorylation and glycolysis.

Besides ACLY phosphorylation and glycolysis, STING activation increased the rates of OXPHOS. These findings highlight that metabolic shifts in response to cGAMP are distinct from the early metabolic response to TLRs (2–4) and indicate that other factors beyond TBK1 are implicated in shaping cellular metabolism in response to PRR activation. Mechanistically, we speculate that the increase in glycolysis supports glycolytic ATP synthesis. Consequently, TCA cycle intermediates, such as citrate, may be used to facilitate anabolic reactions. It remains an exciting area of research to disentangle which signaling modules and metabolic

substrates beyond TBK1 and glucose shape metabolic changes in response to STING activation.

Disclosures

Eicke Latz is cofounder and consultant of IFM Therapeutics, DiosCure Therapeutics, and Odyssey Therapeutics. The other authors have no financial conflicts of interest.

References

- Langston, P. K., A. Nambu, J. Jung, M. Shibata, H. I. Aksoylar, J. Lei, P. Xu, M. T. Doan, H. Jiang, M. R. MacArthur, et al. 2019. Glycerol phosphate shuttle enzyme GPD2 regulates macrophage inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 20: 1186–1195.
- Lauterbach, M. A., J. E. Hanke, M. Serefidou, M. S. J. Mangan, C.-C. Kolbe, T. Hess, M. Rothe, R. Kaiser, F. Hoss, J. Gehlen, et al. 2019. Toll-like receptor signaling rewires macrophage metabolism and promotes histone acetylation via ATP-citrate lyase. *Immunity* 51: 997–1011.e7.
- Everts, B., E. Amiel, S. C.-C. Huang, A. M. Smith, C.-H. Chang, W. Y. Lam, V. Redmann, T. C. Freitas, J. Blagih, G. J. W. van der Windt, et al. 2014. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKε supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 15: 323–332.
- Tan, Y., and J. C. Kagan. 2019. Innate immune signaling organelles display natural and programmable signaling flexibility. *Cell* 177: 384–398.e11.
- Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S.-M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKε and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4: 491–496.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda, and S. Akira. 2004. The roles of two IκB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199: 1641–1650.
- Perry, A. K., E. K. Chow, J. B. Goodnough, W.-C. Yeh, and G. Cheng. 2004. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to Toll-like receptor activation and viral infection. *J. Exp. Med.* 199: 1651–1658.
- Abe, T., and G. N. Barber. 2014. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-κB activation through TBK1. *J. Virol.* 88: 5328–5341.
- Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, and Z. J. Chen. 2013. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339: 826–830.
- Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen, and Z. J. Chen. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339: 786–791.
- Tanaka, Y., and Z. J. Chen. 2012. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci. Signal.* 5: ra20.
- Gui, X., H. Yang, T. Li, X. Tan, P. Shi, M. Li, F. Du, and Z. J. Chen. 2019. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature* 567: 262–266.
- Yum, S., M. Li, Y. Fang, and Z. J. Chen. 2021. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF-κB that mediate immune defense against tumors and viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118: e2100225118.
- Covarrubias, A. J., H. I. Aksoylar, J. Yu, N. W. Snyder, A. J. Worth, S. S. Iyer, J. Wang, I. Ben-Sahra, V. Byles, T. Polynne-Stapornkul, et al. 2016. Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *eLife* 5: e11612.
- Hansen, A. L., A. M. Brandt, M. Nyegaard, A. L. Thielke, D. Olgner, and C. K. Holm. 2018. Global transcriptional changes in response to cGAMP depend on STING in human THP-1 cells. *Cell. Mol. Immunol.* 15: 983–985.
- Li, J. J., H. Wang, J. A. Tino, T. F. Herpin, R. M. Lawrence, S. Biller, H. Jamil, R. Ponticello, L. Chen, et al. 2007. 2-Hydroxy-N-arylbenzenesulfonamides as ATP-citrate lyase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 3208–3211.
- Thomson, D. W., D. Poeckel, N. Zinn, C. Rau, K. Strohmer, A. J. Wagner, A. P. Graves, J. Perrin, M. Bantscheff, B. Duempelfeld, et al. 2019. Discovery of GSK8612, a highly selective and potent TBK1 inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* 10: 780–785.