

DISS. ETH NO. 23468

**Development and application of graph-based
computational methods to elucidate the functional role of
metabolism in human skin**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANDREAS KÜHNE

Master of Science, Ruprecht-Karls University of Heidelberg, Germany

born on 05.02.1986

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Uwe Sauer examiner
Dr. Nicola Zamboni co-examiner
Prof. Dr. Manfred Claassen co-examiner

2016

Abstract

The epidermis is the outermost layer of human skin and constitutes the first barrier to prevent body water loss and protect inner tissue against environmental cues like microbes, physical injury or ultraviolet radiation. This barrier function is maintained through the continuous renewal of the epidermis by proliferating and differentiating keratinocyte stem cells in a process called epidermal homeostasis. Importantly, disturbances of the proliferation-differentiation balance of keratinocytes can induce a disrupted epidermal barrier and cause severe skin diseases such as psoriasis or cancer.

The energy and molecular precursors necessary to maintain cellular functions in living organisms are provided by metabolism. In recent years, it became evident that a strong crosstalk exists between metabolism and the cellular signaling processes determining cellular fate including proliferation-differentiation transition of stem cells. In humans, individual cues indicated that metabolism is involved in sustaining and maintaining important skin functions such as epidermal homeostasis. However, to date there is no complete understanding of the detailed metabolic rewiring involved in epidermal homeostasis, maintenance of the epidermal barrier, and protection of keratinocytes against environmental stressors.

The notion that metabolism is involved in important crosstalk with diverse signaling processes supported by technological advances in analytical methods motivated a variety of discovery-driven, large-scale metabolomics studies in fields reaching from biotechnology to human health and disease. Despite the increased availability of large metabolomics datasets, researches often have to rely on simple statistics for data analysis, although the myriad of interconversions between metabolites make manual data interpretation barely feasible. Thus, to date one of the major bottlenecks in the field of metabolomics is the lack of sophisticated metabolic-network driven computational approaches that facilitate data interpretation.

In this thesis, we tackle shortcomings both in the interpretation of large-scale metabolomics data (**chapters 4 to 6**) and in the understanding of the functional role of metabolism in human skin within three processes: epidermal homeostasis (**chapter 3 and 6**), oxidative stress response (**chapter 7**) and skin aging (**chapter 8**).

To set the stage for this work, we review recent achievements of targeted and non-targeted metabolomics studies in **chapter 2** and compare their contribution on generating novel biological insights in the fields of bacterial communication, biotechnology, functional genomics as well as human health and disease. We conclude that non-targeted metabolomics studies rarely provided mechanistic insights and argue that further advanced

computational approaches are necessary to unfold the full potential of information encoded in metabolomics experiments.

To study metabolic adaptations involved in sustaining epidermal homeostasis, we establish in **chapter 3** two *in vitro* keratinocyte differentiation models relying on either autocrine or high calcium conditions. For both models, we elucidate endo- and exometabolic changes using non-targeted metabolomics and classical statistical data analysis. We demonstrate that under autocrine conditions, keratinocytes become rapidly metabolically inactive and die, which is potentially caused by reduced uptake of amino acids and essential carbons due to removal of important serum components. Under high calcium conditions, in contrast, keratinocytes undergo transient and continuous metabolic adaptations in a variety of pathways.

In **chapter 4** we develop a novel algorithm employing probabilistic graphical models to identify sites and sequential order of metabolic regulation by integrating non-targeted metabolomics data with genome-scale metabolic network reconstructions. We demonstrate that our algorithm outperforms current state-of-the-art methods in predicting known sites of metabolic regulation and additionally enables to identify novel regulatory sites, exemplarily shown for *E. coli metR* transcription factor knockout mutants.

For the automated exploration and interpretation of dynamic exometabolome data, we develop in **chapter 5** a novel algorithm that allows to identify patterns of dynamic metabolite changes and predicts active metabolic routes representing likely intracellular conversions from uptaken to secreted metabolites. The approach identified active metabolic routes in *Mycobacterium smegmatis* under hypoxia, which we could demonstrate to be essential for cell survival.

To elucidate the metabolic processes underpinning epidermal homeostasis and, in turn, skin function, we apply in **chapter 6** the advanced computational approaches developed in this thesis on the metabolome data of high calcium induced keratinocyte differentiation from **chapter 3** and a complementary transcriptome dataset. We describe in detail the metabolic rerouting i) at the interface of glycolysis, glycerolipid metabolism and amino sugar metabolism, ii) in the TCA cycle, iii) in serine and folate metabolism and iv) in nucleotide biosynthesis and degradation and discuss their relevance for epidermal homeostasis and skin function.

Since human skin is frequently exposed to UV irradiation, we investigate in **chapter 7** the metabolic response to oxidative stress in human skin cells using a combination of non-targeted metabolomics and ^{13}C -tracer analysis approaches. We show that carbon flux is

immediately rerouted into the oxidative branch of the pentose phosphate pathway to generate NADPH to support clearance of reactive oxygen species. Moreover, we demonstrate that the rerouting is regulated by activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and not as previously suggested by inhibition of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

To elucidate age-related adaptations in skin metabolism, we investigate in **chapter 8** the metabolome and transcriptome of skin samples of young and old human donors. We identify age-dependent metabolic adaptations, which are potentially relevant for altered epidermal homeostasis and epidermal barrier function in aged skin.

In summary, this thesis provides on the one hand novel metabolic network-based computational tools for the analysis of large-scale metabolomics data and on the other hand novel biological insights on the role of metabolism in sustaining essential skin functions. The computational tools are generally applicable. Thus, they will facilitate exploration and interpretation of large-scale metabolomics data and thereby foster understanding of metabolism and its interplay with cellular signaling processes. Moreover, the provided understanding of the functional role of metabolism during epidermal homeostasis, oxidative stress response and skin aging will help to understand how altered metabolism is involved in skin disorders and might lead to potential new therapies for severe skin diseases.

Zusammenfassung

Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut. Sie bildet eine essenzielle Barriere, die einerseits Wasserverlust aus dem Körperinneren verhindert und andererseits das Körperinnere vor gefährlichen Umwelteinflüssen schützt – zum Beispiel Mikroorganismen, mechanische Verletzungen oder UV-Strahlung. Diese Schutzfunktionen werden mit Hilfe der kontinuierlichen Erneuerung der Epidermis durch proliferierende und differenzierende Keratinozyten, aufrechterhalten, die sogenannte epidermale Homöostase. Störungen des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Differenzierung können schwerwiegende Folgen für die Haut haben, beispielsweise eine Beeinträchtigung der epidermalen Barriere oder das Entstehen von Hautkrankheiten wie Psoriasis oder Hautkrebs.

Die Energie und die molekularen Bausteine, die für alle zellulären Funktionen in einem lebenden Organismus benötigt werden, werden durch den Stoffwechsel bereitgestellt – auch bekannt als Metabolismus. In den vergangenen Jahren wurde es zunehmend deutlich, dass eine beidseitige Wechselwirkung zwischen Stoffwechsel und zellulären Signalwegen besteht, die das Schicksal einer Zelle, unter anderem auch den Übergang von Proliferation zu Differenzierung in Stammzellen beeinflussen können. Einzelne Studien deuten darauf hin, dass der Stoffwechsel auch für die Aufrechterhaltung diverser menschlicher Hautfunktionen eine wichtige Rolle spielt. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch kein umfängliches Verständnis von den metabolischen Aktivitäten, die für die epidermale Homöostase, die Erhaltung der epidermalen Barriere oder den Schutz der Keratinozyten vor Umweltstressfaktoren essenziell sind.

Die Erkenntnis, dass der Stoffwechsel mit verschiedensten Signalwegen interagiert, motivierte eine Vielzahl von groß angelegten Metabolismusstudien in verschiedensten Forschungsbereichen – unterstützt von Fortschritten in der Metabolitmesstechnik. Doch in vielen Forschungsprojekten wird das große Potenzial dieser Daten derzeit nicht ausgeschöpft, weil geeignete Werkzeuge zur Datenauswertung fehlen. Obwohl die Zusammenhänge des metabolischen Netzwerks sehr komplex und für den Menschen kaum fassbar sind, müssen Wissenschaftler heutzutage häufig auf einfache statistische Methoden und manuelle Interpretation der Daten zurückgreifen. Deshalb besteht derzeit ein großes Bedürfnis an hochentwickelten Algorithmen, die Metabolitdaten und die Zusammenhänge des metabolischen Netzwerks integrieren und dadurch die Dateninterpretation erheblich vereinfachen.

In dieser Doktorarbeit greifen wir sowohl die beschriebenen technischen als auch biologischen Problemstellungen auf. Zum einen entwickeln wir moderne Methoden für die automatische Interpretation von großen Metabolismusdatensätzen (**Kapitel 4 bis 6**). Zum anderen erforschen wir die Aufgabe des Stoffwechsels in der Aufrechterhaltung von

Hautfunktionen in drei Ansätzen: epidermale Homöostase (**Kapitel 3 und 6**), oxidativer stress (**Kapitel 7**) und Hautalterung (**Kapitel 8**).

Um die Grundlage für diese Arbeit zu legen, fassen wir in **Kapitel 2** die neusten Errungenschaften von zielgerichteten und ungezielten Metabolomikmethoden zusammen und vergleichen die daraus gewonnenen neuen biologischen Erkenntnisse. Es wird deutlich, dass ungezielte Metabolomikstudien nur in seltenen Fällen detaillierte mechanistische Einblicke erzielen konnten. Wir schlussfolgern, dass die existierenden Datenanalyse-Methoden weiterentwickelt werden müssen, um das ganze Potenzial von Metabolomdaten zu nutzen.

Um die metabolischen Anpassungen während der epidermalen Homöostase zu erforschen, etablieren wir in **Kapitel 3** zwei *in vitro* Differenzierungsmodelle für Keratinozyten, die entweder auf autokrinen Bedingungen oder Bedingungen mit hohen Calciumkonzentrationen basieren. Wir nutzen ungezielte Metabolomikmethoden und klassische statistische Ansätze, um die intra- und extrazellulären metabolischen Veränderungen in beiden Differenzierungsmodellen zu erläutern. Wir zeigen, dass Keratinozyten unter autokrinen Bedingungen schnell metabolisch inaktiv werden und sterben, was vermutlich durch niedrigere Aufnahmeraten von Kohlehydraten und Aminosäuren verursacht wird. Im Gegensatz dazu beobachten wir in Keratinozyten, die mit hoher Calciumkonzentration differenziert wurden, transiente und kontinuierliche metabolische Veränderungen.

In **Kapitel 4** entwickeln wir einen neuen Algorithmus basierend auf probabilistischen graphischen Modellen, der Daten von ungezielten Metabolomikmethoden und metabolische Netzwerke integriert, um regulierte Reaktionen und Zeitpunkte von metabolischen Veränderungen automatisch zu identifizieren. Wir zeigen, dass unser Ansatz modernsten Methoden bei der Vorhersage von regulierten Reaktionen überlegen ist und zudem unbekannte Regulationen identifizieren kann, wie wir beispielhaft für *E. coli* Deletionsmutanten des *metR* Transkriptionsfaktors zeigen.

Für die automatisierte Untersuchung und Interpretation von dynamischen extrazellulären Metabolomdaten entwickeln wir in **Kapitel 5** einen speziellen Algorithmus. Er ermöglicht, Muster von dynamischen metabolischen Veränderungen zu erkennen. Darüber hinaus kann er aktive metabolische Reaktionswege vorhersagen, die wahrscheinliche intrazelluläre Umformungen von aufgenommenen Substraten und sekretierten Produkten umfassen. Für extrazellulären Metabolomdaten von *Mycobacterium smegmatis*-Kulturen, die unter sauerstoffarmen Bedingungen kultiviert wurden, identifizierte unsere Methode aktive Reaktionswege, die essenziell für das Überleben der Bakterien bei Sauerstoffarmut sind.

Um die detaillierten metabolischen Prozesse zu erforschen, die für die epidermale Homöostase und demzufolge auch für wichtige Hautfunktionen benötigt werden, wenden wir in **Kapitel 6** die entwickelten Algorithmen auf zwei Datensätze an: Metabolomdaten von Keratinozyten, die mit Hilfe von hohen Calciumkonzentration differenziert wurden (**Kapitel 3**), und komplementären Transkriptdaten. Wir erläutern im Detail die metabolischen Veränderungen i) an der Schnittstelle zwischen Glykolyse, Glycerolipidmetabolismus und Aminozuckermetabolismus, ii) im Citratzyklus, iii) im Serine- und Folatemetabolismus sowie iv) im Nukleotidmetabolismus und diskutieren deren Relevanz für die epidermale Homöostase und für wichtige Hautfunktionen.

Da die menschliche Haut häufig UV-Strahlung ausgesetzt ist, erforschen wir in **Kapitel 7** die metabolische Antwort auf oxidativen Stress in humanen Hautzellen mit Hilfe von ungezielten Metabolomikmethoden und ^{13}C -markierten Substraten. Wir zeigen, dass der Kohlenstoff sofort von der Glykolyse in den oxidativen Pentosephosphatweg umgeleitet wird, um schnell große Mengen an NADPH zu produzieren, das bei der Neutralisierung von Reaktiven Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle spielt. Zudem veranschaulichen wir, dass diese Umleitung nicht durch eine Blockade des glykolytischen Flusses, sondern durch die Aktivierung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase ausgelöst wird.

In **Kapitel 8** erforschen wir altersbedingte Veränderungen des Stoffwechsels in der Haut mit Hilfe von Metabolom- und Transkriptdaten von menschlichen Hautproben junger und alter Spender. Wir finden altersbedingte Veränderungen in der metabolischen Aktivität, die vermutlich einen Einfluss auf die epidermale Homöostase und die Barrierefunktionen der Haut haben.

Zusammengefasst stellt diese Arbeit zum einen neue Netzwerk-basierte Algorithmen für die Analyse von umfangreichen Metabolomdatensätzen zur Verfügung. Zum anderen bietet sie neue mechanistische Erkenntnisse über die Aufgabe des Metabolismus in der Aufrechterhaltung von wichtigen Hautfunktionen. Die Computermethoden können breit gefächert angewendet werden. Aus diesem Grund werden sie in Zukunft die Erforschung und Interpretation von Metabolomdaten deutlich vereinfachen und dadurch das Verständnis des Stoffwechsel und dessen Interaktion mit zellulären Signalwegen erweitern. Zudem wird das neu generierte Wissen über die Funktion des Stoffwechsels in der epidermalen Homöostase, der epidermalen Barriere und der metabolischen Antwort auf oxidativen Stress das Verständnis über die Rolle des Stoffwechsels beim Krankheitsverlauf diverser Hautkrankheiten fördern. Dies könnte zu neuen Therapieansätzen führen.