

Diss. ETH No. 18616

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF  
METABOLISM IN BAKER'S YEAST

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Sarah-Maria Fendt

M.Sc.

(Technical University of Munich)

born on July 20, 1980

in Krumbach (Germany)

citizen of

Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Uwe Sauer (ETH Zürich), examiner

Prof. Dr. Matthias Peter (ETH Zürich), co-examiner

Zurich, 2009

# Abstract

To which extent do transcription factors control metabolism in *S. cerevisiae*? This question is the central topic of the here presented thesis. We elucidated this topic from different angles based on metabolic fluxes, metabolite concentrations, protein and transcript abundances.

Firstly, we investigated transcriptional regulation of respiration in a wild-type yeast strain that metabolizes the differently repressive carbon sources, glucose, mannose, galactose and pyruvate. We quantified the degree of respiration and expression of respiratory enzymes on the different carbon sources with  $^{13}\text{C}$  flux analysis and the fluorescence readout of GFP-fusion strains, respectively. For the specific degrees of respiration several transcription factors were predicted that potentially control respiration by linking enzyme abundance alterations to the known gene-transcription factor interaction network with a probabilistic model. The predicted transcription factors were verified by measuring the degree of respiration and the biomass yield in the corresponding deletion strains. Thereby, we revealed an activity pattern for the Hap and Rtg transcription factors, which depends on the degree of respiration.

Secondly, we investigated which level of control individual transcription factors exert on metabolic operation. We investigated 119 transcription factor deletion strains under five growth conditions by measuring six flux ratios as functional readout for metabolic operation with  $^{13}\text{C}$  flux analysis. We unraveled that out of 3570 possible interactions between transcription factors, growth conditions and flux ratios only the limited number of 42 occurred, which were mediated by 23 transcription factors that controlled almost exclusively the respiratory flux. These 23 transcription factors include five completely new interactions between a transcription factor and respiration, 13 partly new interactions in which the transcription factors were only potentially considered to be able to control respiration by their target genes and five known interactions. We further investigated the molecular mechanisms enabling the identified transcription factors to control the respiratory flux in four key transcription factors. For this we used global transcript and central

metabolic enzyme abundance measurements. With the enzyme abundance measurements we revealed that in all four deletion strains the respiratory enzymes citrate synthase and malate dehydrogenase were highly increased. In two of the deletion strains, with greater impact on the respiratory flux than in the other two, additionally iso-citrate dehydrogenase was increased. Thus, we propose that the higher abundance in these enzymes is necessary to enable the increased TCA cycle flux in these deletion strains. Global transcript analysis showed that in three of the four deletion strains many respiratory genes were differentially expressed. We used this information and the known transcription factor–target gene interaction network to predict potential downstream transcription factors between the controlling transcription factor and the altered respiratory genes within a probabilistic framework. In conclusion, we revealed highly condition dependent networks, which in total consist of 23 single transcription factors that control metabolic performance.

Thirdly, we investigated the relationship between the constituents of metabolic networks, namely metabolites and enzymes (transcripts). Based on a model derived hypothesis on their relationship we correlated measured metabolite concentrations with enzyme/ transcript abundances in a wild-type and a deletion strain with altered enzyme capacities. We identified the fundamental principle that educt metabolite fold changes are negatively correlated with enzyme fold changes, which implies a tradeoff between metabolite and enzyme efficiency in metabolic networks.

Finally, we tested a new high-throughput metabolomics method to search for enzyme alterations using the identified relationship between educt metabolite fold changes and enzyme abundance fold changes. We quantified 30 metabolite concentrations for 119 transcription factor deletion strains under three growth conditions with flow injection mass spectrometry. For approximately half of the deletion strains at least one metabolite under at least one growth condition was significantly altered. We further exemplarily demonstrated that eight of ten tested cases followed the proposed relationship between metabolite and enzyme abundance alterations. This leads to almost 70 % probability that a metabolite alteration indicates a converse enzyme abundance alteration.

This thesis reveals highly condition specific transcriptional networks that either control metabolism on the reaction level or more global in its metabolic operation.

# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage zu welchem Anteil der Metabolismus von Hefe durch Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird. Zu diesem Zweck wurden metabolische Flüsse, Metabolitkonzentrationen, Enzym- und Transkriptmengen als massgebliche Parameter, die Aufschluss über die metabolischen Funktionen geben, gemessen.

In einem ersten Projekt wurde untersucht wie der unterschiedliche Anteil an Atmung während des Wachstums von Hefe auf verschiedenen Kohlenstoffquellen transkriptionell reguliert wird. Zu diesem Zweck wurde der Anteil an Atmung mittels  $^{13}\text{C}$  Flussanalyse quantifiziert und es wurde die Menge an atmungsrelevanten Enzymen mittels GFP-Fusionsstämmen quantifiziert. Die Information über unterschiedlich exprimierte Enzyme auf den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wurde genutzt um mittels eines Wahrscheinlichkeitsmodells Transkriptionsfaktoren vorherzusagen, welche die unterschiedlich exprimierten Enzyme und damit den unterschiedlichen Anteil an Atmung regulieren. Die so getroffenen Vorhersagen wurden experimentell anhand von Knockoutstämmen verifiziert. Durch dieses Projekt konnten wir zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren Hap und Rtg abhängig von dem Anteil an Atmung unterschiedlich aktiv sind.

Das zweite Projekt beschäftigt sich mit der Frage inwieweit einzelne Transkriptionsfaktoren die Nutzung der Stoffwechselwege kontrollieren. Zur Beantwortung dieser Frage wurden sechs metabolische Flüsse für 119 Transkriptionsfaktorknockoutstämmen gemessen, wobei die Stämme auf fünf unterschiedlichen Wachstumsbedingungen gezogen wurden. Von 3570 möglichen Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren, Wachstumsbedingungen und metabolischen Flüssen waren nur 42 aktiv und diese wurden durch 23 unterschiedliche Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Die gefundenen Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und metabolischen Flüssen (fünf neue, 13 teilweise neue und fünf bekannte) beeinflussen fast ausschliesslich die Atmung. Für vier Transkriptionsfaktoren, welche die Atmung in vier von fünf Wachstumsbedingungen verändern, wurde nach dazwischen geschalteten Transkriptionsfaktoren

mittels Messung von Transkript- und Enzymmengenänderungen gesucht. Mit Hilfe eines Wahrscheinlichkeitsmodells wurde eine Hypothese für die Verbindungskaskade zwischen dem Transkriptionsfaktor und der metabolischen Veränderung aufgestellt. Zusammenfassend haben wir mit dieser Studie gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren abhängig von der Wachstumsbedingung die Nutzung der Stoffwechselwege kontrollieren.

Das dritte Projekt beschäftigt sich mit der Frage welcher Zusammenhang zwischen Metabolitkonzentrationen und Enzymkapazitäten besteht. Um dieses zu klären wurden zuerst Hypothesen über solche Zusammenhänge aufgestellt und dann die daraus resultierenden Beziehungen zwischen Metaboliten und Enzymen anhand von Konzentrationsmessungen in einem Wildtypstamm und einer Mutante mit veränderten Enzymkapazitäten überprüft. Dabei konnten wir zeigen, dass Veränderungen in der Eduktmetabolitkonzentration gegenläufig mit Veränderungen in der dazugehörigen Enzymmenge korrelieren.

Im letzten Projekt haben wir eine neue Methode zur Identifizierung von Enzymmengenänderungen getestet, welche auf der gefundenen Beziehung zwischen Eduktmetabolitkonzentration und Enzymmenge basiert. Dafür wurden 30 Metabolitkonzentrationen mittels Fliessinjektionsanalyse-Massenspektrometrie in 119 Transkriptionsfaktorknockoutstämme unter drei Wachstumsbedingungen gemessen. Etwa die Hälfte der untersuchten Transkriptionsfaktorknockoutstämme weisen mindestens unter einer Wachstumsbedingung ein verändertes Metabolitkonzentrationsprofil auf. Um zu überprüfen, ob in den Fällen mit veränderter Metabolitkonzentration gegenläufig veränderte Enzymmengen vorliegen, wurden die Enzymmengen in 10 Fälle bestimmt. Dabei zeigten 8 Fälle ein mit der Beziehung zwischen Eduktmetabolitkonzentration und Enzymmenge konsistentes Ergebnis. Daraus schlussfolgern wir, dass Metabolitmessungen zur schnellen Identifizierung von Enzymmengenveränderungen genutzt werden können.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sich das transkriptionelle Netzwerk, welches Metabolitkonzentrationen und/oder die Stoffwechselwege kontrolliert, abhängig von der Wachstumsbedingung verändert.