



Doctoral Thesis

Applications of novel metabolomics approaches to unravel alterations in cancer metabolism

Author(s):

Czernik, Dominika

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006492300> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 19446

Applications of novel metabolomics approaches to unravel alterations in cancer metabolism

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

Dr. sc. ETH Zurich

Presented by

Dominika Czernik

M.Sc., Wrocław University of Technology

Born March 25th 1982 in Brzeg

Citizen of Poland

Accepted on the recommendation of

Prof. Uwe Sauer

Prof. Wilhelm Krek

Dr. Nicola Zamboni

Zürich, 2010

Abstract

Altered metabolism constitutes a nearly ubiquitous property of cancer cells. These metabolic rearrangements originate primarily from the highly proliferating cancer phenotype. Metabolism fuels cancer cells to sustain the high demand of nutrients required for the synthesis of building block of new cells. *In vivo*, uncontrolled proliferation generates stressful environmental conditions with poor oxygen and nutrients supply by aberrant and distant blood vessels. Cancer cells cope with these unnatural conditions remarkably better than normal cell could do. To a large extent, this is achieved by tuning the metabolism to operate in unusual modes, i.e. fermentative metabolism despite the presence of oxygen. Although this phenotype has been described by Otto Warburg in 1924, underlying mechanism and benefits for the cancer remain obscure.

In recent years, cell biologists have become more aware that metabolites and metabolic pathways activity do not only respond to overarching signaling pathways but directly participate to cellular regulation and affect differentiation, cell cycle control, and the interplay between genotype and environment. Driven by this notion, the field of cancer metabolism is experiencing a renaissance with the hope to identify novel targets for the treatment of metabolic processes specific to aberrant cells.

In this thesis we apply a metabolomics data driven approach to investigate metabolic alterations in cancer. Comprehensive quantitative measurement of metabolic intermediates is a prerequisite for understanding the metabolic reaction activities. In the first part we address technical aspects of sample preparation to quantify the intermediates of primary metabolism in adhesive cells based on mass spectrometry analysis. In Chapter 2, we test capillary electrophoresis – mass spectrometry as a potential workhorse for efficient separation, sensitive detection and absolute quantification of polar metabolites of central carbon metabolism, comparing it to the other complementary analytical approaches. In Chapter 3, we optimize the entire workflow for quantitative metabolomics in adhesive mammalian cells, which allows extraction of metabolites in a fast, un-biased manner, potentially and easily adjustable for the high throughput, scaled down format of mammalian cells cultivation.

After optimization and validation of metabolomics analytical platforms we employ them to answer specific biological questions utilizing around metabolic features of cancer using renal cell carcinoma and breast cancer cell line models. In Chapter 4 we applied metabolomics for the screen of potential metabolic drug targets of the hereditary von Hippel-Lindau (VHL) cancer syndrome. We showed that single point mutations of the von Hippel-Lindau protein (pVHL) are propagated on the central carbon

metabolism response. By quantification of primary metabolites and statistical data analysis, we spot a set of potentially regulated enzymes responsible for distinct behavior of metabolic pattern in VHL disease, namely phosphofructokinase, aldolase, pyruvate kinase, aconitase, isocitrate dehydrogenase, glutaminase, transaldolase and transketolase (Chapter 4).

In Chapter 5 we focused on the metabolic reflection of regulatory mechanism between the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) and hypoxia inducible factor (HIF), which is known to be a major transcriptional regulator of oxygen homeostasis in mammalian cells. By exposing the renal cells with lack of pVHL – permanent HIF stabilization, and with present of pVHL – temporary HIF stabilization under hypoxia we investigated the dynamic response of metabolism to oxygen unavailability. We show that in normoxia, the stability of HIF promotes higher reductive power by increase of NADPH. Dynamic metabolic response under changing oxygenation unraveled time dependent rearrangements in glycolysis, pentose phosphate pathway but not TCA cycle, in the two phases separating induction of HIF transcriptional regulation. Complex dynamic response of primary metabolism under environmental stimuli motivated us to expand our study of metabolic rearrangements in cancer beyond the primary metabolism.

In Chapter 6 we set out to screen for intracellular metabolites that are changed upon aerobic glycolysis. Here we focus on a panel of 10 different breast cancer cell lines to capture a possibly general pattern pointing to a metabolic process that accompanies Warburg effect, and thus might be beneficial for cancer survival or proliferation. We analyze the cellular extracts using both targeted metabolomics including metabolites of central carbon metabolism and novel high-throughput non-targeted metabolomics comprising of representatives of entire metabolome, which cannot be yet fully annotated. By correlation analysis of specific breast cancer phenotypes we are able to show clear central carbon metabolism signature of cancer cell shown by induced pentose phosphate pathway and TCA cycle with simultaneous decrease of amino acids levels and match it with relevant pattern of entire metabolome, which is projected as well on the transcriptional level.

This work provides the examples of application of metabolomics to investigate causes and consequences of metabolic disease, based on cancer model showing its potential as a tool for high-throughput screens relevant i.e. for the drug targets. We show variety of data driven approaches to understand metabolic alterations of cancer beyond central carbon metabolism and contribute to understanding possible directions for unraveling their regulatory mechanism.

Sommario

L'alterazione del metabolismo è una caratteristica frequentemente riscontrata nelle cellule cancerogene. Il riarrangiamento metabolico di queste cellule è largamente legato al fenotipo a proliferazione accelerata caratteristico dei tumori. In questo contesto, il metabolismo rifornisce le cellule cancerogene dell'elevato quantitativo di elementi costitutivi di base necessario alla sintesi di nuove cellule. In vivo, questa proliferazione cellulare incontrollata genera una condizione di stress caratterizzata da carenza di ossigeno e da un approvvigionamento di nutrimenti attraverso vasi sanguigni aberranti e distanti. Rimarcabilmente, le cellule cancerogene affrontano queste condizioni innaturali in maniera singolarmente efficiente rispetto alle normali cellule. In larga parte ciò è dovuto a un inusuale riarrangiamento dei loro flussi metabolici, come per esempio attraverso l'instaurazione di un metabolismo fermentativo in presenza di ossigeno. Nonostante questo fenotipo sia stato descritto da Otto Warburg già nel 1924, i meccanismi biologici sottostanti e i benefici che esso conferisce alle cellule cancerogene sono tutt'oggi oscuri.

Recentemente, i biologi cellulari hanno preso maggiore coscienza del fatto che i metaboliti e l'attività metabolica non solo rispondono alle cascate di trasduzione del segnale ma direttamente partecipano alla regolazione cellulare, influenzando processi come la differenziazione, il ciclo cellulare o il rapporto di interscambio tra genotipo e fenotipo. Illuminato da tali principi, il campo di ricerca che investiga il metabolismo delle cellule cancerogene si è recentemente rivitalizzato, con la speranza che nuovi bersagli per efficienti trattamenti farmaceutici possano essere individuati proprio in quei processi metabolici tipici delle cellule aberranti.

In questo lavoro applichiamo un approccio basato e guidato dall'analisi dei dati metabolici, qui usati per investigare le alterazioni metaboliche delle cellule cancerogene. In questo contesto, la possibilità di misurare quantitativamente e esaustivamente i metaboliti intermedi è un prerequisito fondamentale per comprendere l'attività delle reazioni metaboliche. Nella prima parte di questa tesi, esponiamo gli aspetti tecnici riguardanti la preparazione dei campioni biologici e la quantificazione dei metaboliti intermedi del metabolismo centrale in cellule aderenti tramite spettrometro di massa. Nel Capitolo 2, testiamo e compariamo con altri metodi esistenti la potenzialità dell'elettroforesi capillare combinata allo spettrometro di massa nell'ottenere una separazione efficiente, accurata e una quantificazione assoluta dei metaboliti polari nel metabolismo centrale. Nel Capitolo 3, ottimizziamo l'intero processo lavorativo per la quantificazione dei metaboliti in cellule mammifere aderenti. Questo processo permette un'estrazione dei metaboliti rapida, accurata e potenzialmente

facilmente estendibile al formato ridotto ma ad ampia resa tipico delle coltivazione di cellule mammifere.

Dopo aver ottimizzato e validato la piattaforma analitica per la metabolomica, essa viene qui applicata per rispondere a questioni biologiche riguardanti modelli di tumore renale e del seno. Nel Capitolo 4, applichiamo la metabolomica all'individuazione di potenziali bersagli per farmaci legati alla sindrome tumorale ereditaria di von Hippel-Lindau (VHL). Qui mostriamo che una singola mutazione puntiforme nella proteina di von Hippel-Lindau (pVHL) propaga il suo effetto al funzionamento del metabolismo centrale. Dalla quantificazione e analisi statistica dei livelli dei metaboliti primari, identifichiamo una lista di enzimi che sono potenzialmente responsabili del comportamento metabolico tipico nella sindrome di VHL; l'elenco comprende gli enzimi fosfofrutto chinasi, aldolasi, piruvato chinasi, aconitase, isocitrato deidrogenasi, glutaminasi, transaldolasi e transchetolasi.

Basandoci sui questi nostri risultati, abbiamo deciso di investigare i meccanismi di regolazione tra la proteina di soppressione tumorale di von Hippel-Lindau (VHL) e il regolatore principale dell'ipossia (IHF), il quale è il principale regolatore dell'omeostasi dell'ossigeno nelle cellule mammifere. Nel Capitolo 5, ci concentriamo su questi due attori e sul loro ruolo nel rispondere a perturbazioni ambientali che riguardano il livello di ossigenazione. Dall'esposizione di cellule renali private di pVHL – permanente stabilizzazione di HIF e in presenza di pVHL – e stabilizzazione temporaneo di HIF in condizione di ipossia, investighiamo il responso dinamico del metabolismo all'indisponibilità di ossigeno. Qui mostriamo che in condizioni di normossia la stabilità di HIF promuove una maggiore capacità riduttiva ottenuta attraverso l'aumento di NADPH. Il responso dinamico del metabolismo nelle condizione di ossigenazione variante rivela un riarrangiamento temporale della glicolisi, della via dei pentoso fosfati, ma non del ciclo degli acidi tricarbossilici, nelle due fasi che separano l'induzione del fattore della trascrizione IHF. Questa risposta metabolica complessa e dinamica del metabolismo primario in risposta a stimoli esterni ci ha motivato ad estendere i nostri studi al riarrangiamento metabolico in cellule cancerogene aldilà del solo metabolismo centrale.

Nel Capitolo 6, investighiamo sistematicamente i livelli intracellulari di metaboliti che variano in cellule aventi una glicolisi aerobica. Qui, ci concentriamo su un insieme di 10 differenti tipi di tumore del seno in modo da identificare le proprietà essenziali che caratterizzano il processo metabolico dell'effetto di Warburg, il quale può essere di beneficio alla sopravvivenza o proliferazione delle cellule cancerogene. Analizziamo gli estratti usando due metodi differenti: in primis con metabolomica selettiva che include i metaboliti del metabolismo centrale e in secondo luogo con un nuovo approccio non-selettivo con capacità di campionamento di rappresentanti dell'intero metaboloma, il quale però non può essere ancora completamente annotato. Attraverso l'analisi della

correlazione tra fenotipi specifici del cancro al seno, mostriamo che esistono delle chiare caratteristiche comuni alle cellule cancerogene quali un aumento dei livelli nella via dei pentoso fosfati e nel ciclo degli acidi tricarbossilici, associato a un diminuzione simultanea del livello degli amino acidi. Lo stesso trend si osserva al livello dell'intero metaboloma e al livello della trascrizione.

Questo lavoro fornisce molteplici esempi di come l'applicazione di tecniche di metabolomica può risultare vantaggioso nell'investigare le cause e conseguenze di sindromi metaboliche, in questo lavoro in particolare applicato all'analisi di modelli tumorali, mostrando il potenziale dell'approccio come metodo per l'identificazione di bersagli terapeutici per farmaci. In questa tesi, mostriamo come un approccio basato e guidato dall'analisi di dati metabolici possa contribuire a spiegare le alterazioni del metabolismo al di là del solo metabolismo centrale e quindi possa portare a nuove scoperte riguardo ai loro meccanismi di regolazione.