

Flux-signaling and flux-dependent regulation in *Saccharomyces cerevisiae*

Doctoral Thesis

Author(s):

Schmidt, Anna Mareike

Publication date:

2014

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010160040>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 21691

**FLUX-SIGNALING AND FLUX-DEPENDENT REGULATION IN
*SACCHAROMYCES CEREVISAE***

A thesis submitted to

attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH

(DR. SC. ETH ZURICH)

presented by

Anna Mareike Schmidt

Dipl.Biol.

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau (Germany)

born April 12, 1982

citizen of the Federal Republic of Germany

accepted on the recommendation of

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

Prof. Dr. Matthias Heinemann (University of Groningen), co-examiner

2014

SUMMARY

Cells need to constantly monitor their environment in order to adapt their metabolic operation to the available nutrients. The nutrient supply can either be sensed by specific nutrient receptors or -as recently suggested- by metabolic fluxes. In this thesis we investigate two different aspects of flux-sensing. In the first part, we elucidate how hexokinase 2 (Hxk2) could participate in flux sensing and flux-dependent regulation of glucose repression. In the second part we investigate the effects of the glycolytic flux on different cellular levels to support the principle concept of metabolic flux sensing and flux-dependent regulation.

The glycolytic enzyme hexokinase 2 (Hxk2) has frequently been suggested to play a role in flux-dependent regulation of glucose repression. Since Hxk2 can be present in at least 16 different forms (due to phosphorylation at serine 14 and serine 157, formation of dimers, and nuclear and cytosolic localization; further referred to as “Hxk2 modifications”) it is unclear, which form of Hxk2 and how Hxk2 participates in flux signaling. In CHAPTER 2 we therefore aimed at clarifying how Hxk2 could participate in flux signalling. To control the glycolytic flux we employed yeast strains with different glucose uptake rates, which realize different glycolytic fluxes at an otherwise identical environment. In these strains, we quantified the different Hxk2 modifications, the Hxk2 abundance and the level of glucose repression at different glycolytic fluxes. Using these data in a mathematical modelling approach together with perturbing the system of Hxk2 modifications by deleting the kinase Tda1, which is necessary for the serine 14 phosphorylation of Hxk2, we could derive a hypothesis of how the Hxk2 modifications are influenced by the glycolytic flux: At high glycolytic flux Tda1 activity is inhibited leading to a high proportion of Hxk2, which is not phosphorylated at serine 14. Such unphosphorylated Hxk2 molecules then forms dimers due to the favourable dimerization of the unphosphorylated Hxk2 forms. Eventually because of a lower nuclear transport efficiency of the dimers, the proportion of nuclear Hxk2 is subsequently lower at higher glycolytic fluxes which we additionally found to influence the level of glucose repression. Our hypothesis also indicates that Tda1 could be the sensor of the glycolytic flux regulating the flux-dependent level of glucose repression and the metabolic mode by influencing the flux-dependent Hxk2 modifications.

In CHAPTER 3 we addressed the question whether the flux-dependent Hxk2 modifications, the level of glucose repression and fermentation depend on the flux through glycolysis or through Hxk2. Furthermore, we wanted to know whether the relationships between the different Hxk2 modifications and the importance of Hxk2 localization for glucose repression, which we identified in CHAPTER 2, can also be

found when yeast grows on carbon sources other than glucose, whose metabolism does not require the enzymatic activity of Hxk2. We found, that there is a flux through Hxk2 even on these non-glucose carbon sources. Furthermore, we quantified the Hxk2 modifications and analyzed the relationship between the flux (either through glycolysis or Hxk2) and the three Hxk2 modifications. We found that the modifications are not exclusively flux-dependent (neither through glycolysis nor through Hxk2) but also influenced by substrate-specific signals. Furthermore, the level of glucose repression and fermentation correlate with the Hxk2 localization supporting the finding of CHAPTER 2 that the Hxk2 localization is likely involved in the regulation of glucose repression and the metabolic mode.

To support the concept of metabolite-based flux sensing, we measured in CHAPTER 4 the cellular fluxes, metabolite and protein levels using state-of-the-art omics technologies in the yeast strains already used in CHAPTER 2. To check which of the observed phenotypic characteristics were specific for glucose, we also characterized the phenotype of the wildtype strain during growth on three other carbon sources. We found several metabolites to strongly correlate with the flux through the reaction producing the respective metabolite (e.g. fructose-1,6-bisphosphate, phosphoenolpyruvate and pyruvate) which potentially could transmit the flux signal downstream to the regulatory machinery of the cell. We also found that 63% of the measured metabolic proteins correlate with the glycolytic flux, and identified a number of transcription factors (e.g. the Hap complex, Msn2, Msn4 and Cat8) likely responsible for the flux-dependent expression pattern. The correlations we found were independent from the nature of the used carbon source and seem to exclusively depend on the cellular fluxes through glycolysis, the pentose-phosphate pathway or the tricarboxylic acid cycle. Our findings indicate that the glycolytic flux is a signal for global regulation of the cellular phenotype and support the existence of flux sensing in yeast which is very likely based on the flux-dependent levels of several metabolites.

In CHAPTER 2 and CHAPTER 3 we used the green fluorescent protein (GFP) to determine the cellular localization of Hxk2 and obtained different results when using to different variants of GFP. In CHAPTER 5, we therefore investigated possible reasons why the use of different variants of a fluorescent protein could lead to different outcomes in quantitative localization studies. While we could not find a final explanation for the different outcomes our study clearly demonstrates the importance to carefully choose the fluorescent protein for quantitative localization studies.

This thesis confirms that glycolytic flux-dependent regulation in yeast exists (for example by modifying the activity of cellular enzymes such as Tda1 or Hxk2 or

different transcription factors) and could be mediated by flux-dependent metabolite levels. Further, this thesis reveals that flux-dependent regulation of particular cellular processes can be disturbed by substrate-specific signals.

ZUSAMMENFASSUNG

Zellen müssen ihre Umgebung ununterbrochen überwachen um ihren Stoffwechsel an die verfügbaren Nährstoffe anzupassen. Nährstoffe in der Umgebung können entweder über spezifische Rezeptoren oder – wie kürzlich vorgeschlagen- über metabolische Flüsse detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir zwei verschiedene Aspekte der Detektion von metabolischen Flüssen. Im ersten Teil der Arbeit untersuchen wir, wie Hexokinase 2 (Hxk2) an der Fluss-Detektion und der flussabhängigen Regulation der Glukose-Repression beteiligt sein könnte. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Auswirkung des glykolytischen Flusses auf verschiedene zelluläre Ebenen, um das Konzept der Detektion metabolischer Flüsse und flussabhängiger Regulation in der Zelle zu stützen.

Es wurde schon oft diskutiert, dass das Enzym Hexokinase 2 (Hxk2), das den ersten Schritt in der Glykolyse katalysiert, an der flussabhängigen Regulation der Glukose-Repression beteiligt ist. Da dieses Enzym aber in 16 verschiedenen Formen in der Zelle vorkommen kann (aufgrund der Phosphorylierung an Serin 14 und Serin 157, der Bildung von Dimeren und der Lokalisierung von Hxk2 im Zellkern und im Zytoplasma; im Folgenden werden diese als „Hxk2-Modifikationen“ bezeichnet), ist es noch immer unklar, wie Hxk2 auf molekularer Ebene als Sensor oder Übermittler des Flusssignals funktioniert. In KAPITEL 2 wollten wir daher aufklären, welche Form von Hxk2 und wie Hxk2 an der Übermittlung des Fluss-Signals beteiligt ist. Um verschiedene glykolytische Flüsse bei ansonsten identischen Umweltbedingungen zu erhalten wurden Hefestämme mit verschiedenen Glukoseaufnahmeraten verwendet. In diesen Stämmen quantifizierten wir die verschiedenen Hxk2-Modifikationen, die zelluläre Hxk2-Abundanz und den Grad der Glukose-Repression bei verschiedenen glykolytischen Flüssen. Um die sich gegenseitig beeinflussenden Hxk2-Modifikationen zu perturbieren, wurde das Gen für die Kinase Tda1, welche für die Phosphorylierung des Serin 14 von Hxk2 benötigt wird, ausgeknockt. Diese gewonnenen experimentellen Daten wurden dann in einem mathematischen Modell genutzt, mit welchen wir eine Hypothese aufstellen konnten, wie die verschiedenen Hxk2-Modifikationen durch den glykolytischen Fluss beeinflusst werden: ein hoher glykolytischer Fluss hemmt die Aktivität der Kinase Tda1, was zu einem hohen Anteil an Hxk2 führt, die am Serin 14 nicht phosphoryliert ist. Diese unphosphorylierten Hxk2-Moleküle bilden daraufhin Dimere, da unphosphorylierte Hxk2-Formen bevorzugt Dimere bilden. Aufgrund eines weniger effizienten Transports der Dimere in den Kern führt dies bei hohem glykolytischen Fluss möglicherweise zu einem geringeren Anteil von nukleärer Hxk2. Zusätzlich zeigen unsere Ergebnisse, dass der Anteil der nukleären Hxk2 den Grad der Glukoserepression beeinflusst. Unsere Hypothese weist auch darauf hin, dass die

Kinase Tda1 der Sensor des glykolytischen Flusses sein könnte, welcher den flussabhängigen Grad der Glukoserepression und den metabolischen Mode reguliert, indem sie die flussabhängigen Hxk2-Modifikationen beeinflusst.

In KAPITEL 3 befassten wir uns mit der Frage, ob die flussabhängigen Hxk2-Modifikationen, der Grad der Glukose-Repression und der Fermentation vom Fluss durch die Glykolyse oder durch Hxk2 abhängen. In diesem Zusammenhang prüften wir, ob die zuvor in KAPITEL 2 gemessenen Wechselbeziehungen zwischen den Hxk2-Modifikationen und die Bedeutung von Hxk2 für die Glukose-Repression auch gelten, wenn Hefe auf anderen Substraten als Glukose wächst, deren Stoffwechsel keine Hxk2-Aktivität benötigt. Dabei stellten wir fest, dass selbst auf diesen Nicht-Glukose-Substraten ein Fluss durch Hxk2 fließt. Zudem quantifizierten wir die Hxk2-Modifikationen und analysierten den Zusammenhang zwischen dem Fluss (entweder durch die Glykolyse oder durch Hxk2) und den drei Hxk2-Modifikationen. Wir stellten fest, dass diese Modifikationen nicht ausschliesslich flussabhängig sind, sondern auch von substratspezifischen Signalen beeinflusst werden. Außerdem korrelieren der Grad der Glukose-Repression und der Fermentation mit der Lokalisation von Hxk2, was das Ergebnis aus KAPITEL 2 stützt, dass die Hxk2-Lokalisierung höchstwahrscheinlich an der Regulation der Glukose-Repression und des metabolischen Modes beteiligt ist.

Um zu zeigen, dass eine Hefezelle metabolische Flüsse basierend auf zellulären Metabolitkonzentrationen messen kann, bestimmten wir in KAPITEL 4 mit den neuesten Omics-Technologien die zellulären Flüsse, Metabolit- und Proteinkonzentrationen in den Hefestämmen, die schon in KAPITEL 2 genutzt wurden. Um glukosespezifische Effekte auf den Phänotyp zu identifizieren, kultivierten wir den Wildtyp nicht nur auf Glukose, sondern auch auf drei weiteren Substraten. Wir fanden zahlreiche Metabolite, die mit dem Fluss, der den entsprechenden Metabolit bildet, korreliert (zum Beispiel Fruktose-1,6-bisphosphat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat). Diese Metabolite könnten das Flusssignal zu nachfolgenden regulatorischen Molekülen übermitteln. Zusätzlich fanden wir, dass die Level von 63% der gemessenen metabolischen Proteine mit dem glykolytischen Fluss korrelieren, und identifizierten einige Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel den Hap-Komplex, Msn2, Msn4, Cat8), die für die flussabhängige Proteinexpression verantwortlich sein könnten. Die identifizierten Korrelationen waren unabhängig davon, auf welchen Substraten die Hefezellen wuchsen, und hängen daher höchstwahrscheinlich ausschließlich vom Fluss durch die Glykolyse, den Pentosephosphatweg beziehungsweise durch den Tricarbonsäurezyklus ab. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der glykolytische Fluss den globalen Phänotyp in Hefe reguliert, und stützen die Annahme, dass

metabolische Flüsse als Signal für die Nährstoffversorgung dienen und über zelluläre Metabolitkonzentrationen gemessen werden können.

In KAPITEL 2 und KAPITEL 3 nutzten wir das grüne fluoreszierende Protein (GFP) um die zelluläre Lokalisation von Hxk2 zu bestimmen. Dabei erzielten wir je nach genutzter GFP-Variante unterschiedliche Ergebnisse. In KAPITEL 5 suchten wir deswegen nach möglichen Gründen, warum die Auswahl der Fluoreszenzproteine das Ergebnis quantitativer Lokalisationsstudien beeinflusst. Obwohl wir keine abschließende Erklärung für unsere Beobachtungen finden konnten, zeigt unsere Studie, dass Fluoreszenzproteine für quantitative Lokalisationsstudien sorgfältig ausgewählt werden müssen.

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass flussabhängige Regulation in Hefe vorkommt (zum Beispiel durch Modifikation der Aktivität von Enzymen wie Tda1 und Hxk2 oder verschiedener Transkriptionsfaktoren), und dass diese Regulation durch flussabhängige Metabolitkonzentrationen stattfinden kann. Ausserdem zeigt diese Arbeit, dass die flussabhängige Regulation zellulärer Prozesse durch substratspezifische Signale beeinflusst werden kann.