

DISS. ETH NO. 25069

**UNRAVELING THE REGULATORY ROLE OF PROTEIN  
PHOSPHORYLATION IN MICROBIAL METABOLISM VIA  
UNTARGETED METABOLOMICS**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ZRINKA RAGUZ NAKIC

Dipl. Biotech., EUCOR (European Confederation of the Upper Rhine Universities)

born on 22.05.1986

citizen of Stein am Rhein, SH

accepted on the recommendation of

Prof. Uwe Sauer

Prof. Ruedi Aebersold

Prof. Christian von Mering

**2018**

## Abstract

In order to survive, cells constantly need to adapt the proteome to cues from the environment and internal fluctuations. Rapid adjustment of the protein pool to environmental changes is mediated by allosteric regulators and post-translational modifications (PTMs). PTMs are omnipresent in all domains of life and affect virtually all types of proteins by either inducing structural adaptations and/or changes in surface charges. The consequences of such alterations are manifold, including changes in kinetic parameters, signal transduction, compartment localization and the total protein amount. Overall, this diversity of functional impacts allows regulation of essentially all biological processes.

Protein modifications are chemically very diverse and hundreds of different PTM types have been described. Phosphorylation has been historically extensively studied and controls essentially all cellular processes. It holds an exceptional role amongst all types of PTMs since the phosphorylation-state of the proteome is governed by a complex network of kinases and phosphatases, in contrast to all other PTM types that are typically controlled by single regulators. Recent advances in proteomics allow for deep interrogation of phosphoproteomes and generate large catalogues of phosphorylation sites (phosphosites). However, the success in detecting phosphorylation led to a huge discrepancy between identified and functionally characterized phosphosites. Closing this gap is challenging, mostly due to the enormous time effort needed using traditional approaches. While the scarcity in characterized sites is particularly prominent in phosphorylation, similar difficulties in assigning functionalities to modified sites are encountered in other PTM types that are commonly detected by high throughput proteomics techniques, such as ubiquitination and acetylation.

In this PhD thesis, we seek to overcome the technical limitations in characterizing PTM sites by applying mass spectrometry-based untargeted metabolomics. This technique is highly suitable for the detection of subtle perturbations in various protein types due to its sensitivity, high coverage and independency of genetic markers. Moreover, chromatography-free injection allows rapid sample measurement in high throughput. In **chapter 2**, we examine an *S. cerevisiae* mutant panel of 26 phosphosites located on metabolic enzymes or proteins implicated in the TOR or HOG signaling pathway using untargeted metabolomics. To this end, we measure metabolite extracts by direct flow injection on a quadrupole Time-of-Flight mass spectrometer. We thereby demonstrate that untargeted metabolomics is a powerful method for sensitive large-scale PTM-mutant analysis and is superior to growth assays in detecting

functional phosphorylation events. Nevertheless, we observe that mutations of single phosphosites in *S. cerevisiae* often have only mild impact on protein activity. Indeed, analysis of large PTM compendia revealed that a typical eukaryotic protein contains at least 4.5 modifications and that 20% of all proteins are modified by more than one PTM type. Carrying multiple PTM sites in a single protein allows regulation in a combinatorial and integrated manner by PTM crosstalk. We therefore asked whether crosstalk and overlapping functionality of several PTM sites on the same protein might compensate for single mutations and hence explain the often-subtle effects of single phosphosite mutations. To this end, we selected several PTM sites on two exemplary metabolic enzymes in *S. cerevisiae*, the glutamate dehydrogenase Gdh2 and the aspartate kinase Hom3 (**chapter 3**). The selected sites were mutated in different combinations, and PTM-mutants are analyzed by the previously established workflow using untargeted metabolomics (**chapter 2**). We identify novel regulatory PTM sites for both enzymes, for the first time validating regulatory protein modifications in Gdh2 and Hom3. The impact on protein activity of the major regulatory phosphosites S28 in Gdh2 and T333 in Hom3 differ depending on the overall modification state of the protein. Thus, we provide evidence that interaction between different PTM sites is critical for the regulatory impact of individual sites in both enzymes and that differential regulation by PTM crosstalk can optimize enzyme activities to changing physiological requirements.

Historically, S/T/Y phosphorylation was considered a key regulatory mechanism mostly restricted to eukaryotes. Increasing effort in bacterial phosphoproteomic research over the last decade however revealed growing evidence for prokaryotic S/T/Y phosphorylation. Albeit poorly characterized, various studies suggested essential roles for prokaryotic S/T/Y phosphorylation in diverse biological processes. In **chapter 4**, we systematically analyze a comprehensive set of *E. coli* mutants of 37 phosphosite to investigate the biological relevance of phosphorylation in regulating prokaryotic metabolism. By exploring growth phenotypes and metabolic profiles with the approach outlined in **chapter 2**, we recover a large fraction of phosphosites as functional, often with severe effects including lethality. This strong impact of phosphorylation is in remarkable contrast to our results from *S. cerevisiae* where the mutation of single phosphosite mostly causes mild metabolic rearrangements (**chapter 2**), and suggests direct protein regulation by phosphorylation in *E. coli*. We reveal fundamental roles of S/T/Y phosphorylation controlling key metabolic routes in *E. coli*, such as the flux towards acetate in overflow metabolism and towards the TCA cycle for respiration, and show that phosphorylation is an essential regulatory mechanism in *E. coli* core metabolism.

Taken together, we demonstrate the power of untargeted metabolomics in characterizing mild perturbation of PTM site mutants. We show that PTM crosstalk is a significant regulatory principle in controlling enzyme activity and PTM sites ideally should be investigated in the context of the overall chemical modification state of a protein. Finally, we demonstrate that the role of protein phosphorylation in prokaryotes has been largely underestimated and that it plays an indispensable function in regulating *E. coli* metabolism.

## Zusammenfassung

Um zu überleben müssen Zellen das Proteom fortwährend an Signale aus der Umwelt und intrazelluläre Veränderungen anpassen. Eine solche umgehende Anpassung des Proteinpools wird durch allosterische Regulatoren und posttranslationale Modifikationen (PTM) vermittelt. PTM sind bei Organismen aller drei Domänen anzutreffen und beeinflussen Proteine jeglicher Art, indem sie entweder strukturelle Anpassungen und/oder Veränderungen der Oberflächenladungen bewirken. Die Folgen solcher Modifikationen sind vielfältig und führen zu Veränderungen kinetischer Parameter, Signaltransduktion, Kompartimentlokalisierung und der gesamten Proteinmenge. Insgesamt erlaubt diese Vielfalt an funktionellen Einflüssen Regulation verschiedenster biologischer Prozesse.

Proteinmodifikationen sind chemisch sehr vielfältig und hunderte verschiedener Arten posttranslativ Modifikationen sind bisher beschrieben worden. Phosphorylierung wurde bis dato umfangreich untersucht und spielt in praktisch allen zellulären Prozessen eine regulatorische Rolle. Der Phosphorylierung wird aber auch deshalb eine besondere Rolle zugeschrieben, da der Phosphorylierungszustand des Proteomes durch ein komplexes Netzwerk von Kinasen und Phosphatasen reguliert wird, im Gegensatz zu allen anderen Arten von PTM die von einzelnen Regulatoren kontrolliert werden. Jüngste Entwicklungen in der Proteomik erlauben eine ausführliche Erfassung des Phosphoproteomes und eine umfangreiche Auflistungen phosphorylierter Aminosäuren. Das äusserst effektive Detektieren von Phosphorylierung führt jedoch zu einer enormen Diskrepanz zwischen identifizierten und funktionell charakterisierten Phosphorylierungen. Durch den erheblichen zeitlichen Aufwand traditioneller Methoden zur Charakterisierung von Funktionalitäten ist das Schliessen dieser Lücke nicht trivial. Die funktionelle Charakterisierung von Phosphorylierungen stellt eine enorme Herausforderung dar, die Problematik der Zuordnung von Funktionalitäten besteht aber auch bei anderen PTM die durch Hochdurchsatz-Methoden identifiziert werden, wie beispielsweise bei Ubiquitinierung und Acetylierung.

In dieser Dissertation wollen wir die technischen Einschränkungen zur funktionellen Charakterisierung von PTM durch Massenspektrometrie-basierte nicht-zielgerichtete Metabolomik überwinden. Diese Technik eignet sich aufgrund ihrer Sensitivität, umfassender Abdeckung des Metaboloms und Unabhängigkeit von genetischen Markern hervorragend für den Nachweis kleinster Veränderungen der Aktivität verschiedenster Proteinen. Darüber hinaus

ermöglicht die chromatographiefreie Injektion kurze Intervalle in der Probemessung und damit einen hohen Durchsatz. In **Kapitel 2** untersuchen wir mittels nicht-zielgerichteter Metabolomik einen Satz von 26 mutierten Aminosäuren von Stoffwechsellzymen und regulatorischen Proteinen des TOR- oder HOG-Signalweges in *S. cerevisiae*, für welche zuvor Phosphorylierung beschrieben wurde. Dazu messen wir Metabolit-Extrakte anhand von Flow Injection Time-of-Flight (FIA-TOF) Massenspektrometrie. Wir zeigen damit, dass nicht-zielgerichtete Metabolomik eine leistungsstarke und hochempfindliche Methode für die Hochdurchsatzanalyse von Mutanten modifizierter Aminosäuren darstellt und beim Nachweis funktioneller Phosphorylierungsereignisse einer einfachen Wachstumsanalyse überlegen ist. Wir stellen aber auch fest, dass Mutationen von einzelnen Phosphorylierungspositionen in *S. cerevisiae* oft nur geringe Auswirkungen auf die Proteinaktivität haben. Eine Analyse umfangreicher PTM-Kompendia zeigte zuvor, dass ein eukaryotisches Protein mindestens 4,5 Modifikationen aufweist und dass 20% aller Proteine durch mehr als eine Art von PTM verändert sind. Das gleichzeitige Auftreten mehrerer modifizierter Aminosäuren in einem einzelnen Protein ermöglicht eine kombinatorische Regulation durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Modifizierungen, sogenannten PTM-Crosstalk. Wir untersuchten daher, ob PTM-Crosstalk und überlappende Funktionalität verschiedener Modifikationen auf demselben Protein den Effekt der Mutation einzelner Modifizierungspositionen kompensieren und die geringfügigen Auswirkungen erklären könnten. Dazu selektierten wir mehrere Aminosäuren mit bekannten posttranslationalen Modifikationen in zwei exemplarischen *S. cerevisiae* Stoffwechsellzymen, der Glutamatdehydrogenase Gdh2 und der Aspartatkinase Hom3 (**Kapitel 3**). Die ausgewählten Aminosäuren sind in verschiedenen Kombinationen mutiert worden und diese Mutanten wurden durch das zuvor etablierte Verfahren mithilfe nicht-zielgerichteter Metabolomik analysiert (**Kapitel 2**). Wir validieren dabei zum ersten Mal Regulation durch Proteinmodifikationen in Gdh2 und Hom3. Die Auswirkungen auf die Proteinaktivität der bedeutsamsten regulatorischen Phosphorylierungspositionen S28 in Gdh2 und T333 in Hom3 variieren in Abhängigkeit des gesamten Modifikationsstatus des Proteins. Unsere Erkenntnisse zeigen, dass in beiden Enzymen die Interaktion zwischen verschiedenen PTM entscheidend für die regulatorische Wirkung einzelner Modifikationen ist und dass die differenzierte Regulation durch PTM-Crosstalk eine Anpassung der Enzymaktivitäten an wechselnde physiologische Anforderungen ermöglichen kann.

Traditionell wurde S/T/Y-Phosphorylierung vor allem in Eukaryoten als wichtiger regulatorischer Mechanismus angesehen. Die Erforschung prokaryotischer Phosphoproteome während des letzten Jahrzehnts erbrachte jedoch zunehmend Hinweise, dass regulatorische

S/T/Y-Phosphorylierung auch in Prokaryoten eine Rolle spielt. Verschiedene Studien schrieben der prokaryotischen S/T/Y-Phosphorylierung wesentliche, wenngleich kaum charakterisierte, Rollen in verschiedenen biologischen Prozessen zu. In **Kapitel 4** analysieren wir systematisch einen umfassenden Satz von Mutanten von 37 Phosphorylierungspositionen in *E. coli* um die Relevanz von Phosphorylierung in der Regulation des prokaryotischen Stoffwechsels zu untersuchen. Durch die Analyse von Wachstumsphänotypen und metabolischen Profilen mit dem in **Kapitel 2** etablierten Verfahren identifizieren wir einen großen Teil der Phosphorylierungen als funktionell und zeigen dabei, dass Funktionalitäten oft mit schwerwiegenden Auswirkungen – einschließlich Letalität – verbunden sind. Die ausgeprägten Folgen der Phosphorylierung stehen in bemerkenswertem Kontrast zu unseren Ergebnissen in *S. cerevisiae*, wo Mutationen einzelner Phosphorylierungspositionen meist geringfügige Veränderungen im Stoffwechsel verursachen (**Kapitel 2**), und suggerieren eine direkte Regulation von Proteinen durch Phosphorylierung in *E. coli*. Wir demonstrieren eine fundamentale Rolle der S/T/Y-Phosphorylierung in der Steuerung zentraler Stoffwechselwege in *E. coli* wie beispielsweise des Flusses zu Acetat im Überflussmetabolismus oder in den Citratzyklus zur Respiration und zeigen, dass Phosphorylierung von Proteinen einen wesentlichen Regulationsmechanismus im zentralen *E. coli* Stoffwechsel darstellt.

Zusammengefasst demonstrieren wir die Stärke von nicht-zielgerichteter Metabolomik in der Charakterisierung der Konsequenzen von Mutationen posttranslational modifizierter Aminosäuren. Wir zeigen, dass PTM-Crosstalk ein wichtiges regulatorisches Prinzip zur Kontrolle von Enzymaktivität ist und dass Modifikationen idealerweise im Kontext des gesamthaften Modifikationsstatus eines Proteins analysiert werden sollten. Schließlich veranschaulichen wir, dass Proteinphosphorylierung wesentlich zur Regulation des *E. coli* Stoffwechsels beiträgt und deren Rolle in Prokaryoten bisher erheblich unterschätzt wurde.