

DISS. ETH NO. 26899

Systematic identification of regulatory interactions between signaling and metabolic networks in *Saccharomyces cerevisiae*

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

Presented by

**BRENDAN MICHAEL RYBACK**

*Master of Science, Wageningen University*

Born on 26.11.1986

Citizen of The Netherlands & United States of America

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Uwe Sauer  
Prof. Dr. Nicola Zamboni  
Prof. Dr. Robbie Loewith  
Prof. Dr. Ruedi Aebersold

2020

## Abstract

To survive and propagate in inhospitable and unpredictable environments, living systems have evolved mechanisms that enable them to sense their surroundings and respond appropriately. To maintain the balanced, stable physiological state known as homeostasis, multicellular organisms, such as humans, use complex signaling systems based on carefully adjusting the quantities of chemicals their bodily fluids and transmitting electrical impulses through intricate neuronal networks at precise frequencies. What's more, they can use sensory organs to perceive and preempt proximate and distant threats and opportunities. Microorganisms do not possess these luxuries. To withstand environmental insults (such as the disappearance of oxygen), and capitalize on profitable opportunities (such as the appearance of their favorite food), they must rely blindly on the interactions between the proteins, nucleic acids, and other molecules that constitute their cellular makeup. The goal of systems biology is to understand at various levels of detail what these interactions are and how they enable cells to survive and propagate themselves.

The goal of this dissertation is to use methods and concepts from the systems biology toolbox to contribute, to however minor an extent, to the understanding of metabolic regulation. In **chapter 1**, the general introduction, I begin with premise that the existence of living systems is predicated on their need to extract "orderliness" from their environments. From this premise, I introduce the fundamental concepts of metabolism and develop justifications for the existence of the major biochemical mechanisms that govern metabolic regulation. After a survey of historically important discoveries and methodological developments, I introduce the two main subjects that constitute the original research presented in the two subsequent chapters: The target of rapamycin signaling network, and the identification of functional phosphorylation sites regulating metabolic fluxes.

**Chapter 2** describes the results of a collaborative research project that aimed to identify new metabolic regulators of the target of rapamycin complex 1 (TORC1). TORC1 is a large protein complex that is a major hub of cellular decision-making. When eukaryotic cells are exposed to rapamycin, major cellular processes grind to a halt, as if they were suddenly starved for nutrients. This is because TORC1 controls one of the main systems cells use to assess how favorable their nutritional environment is to regulate the optimal allocation of available resources. Cells contain thousands of small molecules that can be transformed by thousands of reactions. One of the enduring questions about TORC1 is which molecules it senses to measure the cell's metabolic state and integrate it with information about the surroundings. We used a systematic approach designed to identify new signal molecules by measuring the activity of TORC1 and changes in the abundances of hundreds of metabolites after making altering the nutrient supply. We integrated this data into mathematical models that predicted which metabolites were most likely to be related to TORC1. This approach recovered the amino acid

glutamine, which is known to regulate TORC1 by a well-understood mechanism, and made predictions for other metabolites. The described method is generalizable to other signaling systems that depend on signals from metabolism to regulate cellular processes.

In **chapter 3**, we approached metabolic regulation from another perspective. Metabolic networks consist of biochemical reactions catalyzed by enzymes that break down nutrients into cellular building blocks and energy. To keep the metabolic network balanced, the cell needs to control the flow through certain pathways by turn specific enzymes on and off. One way cells do this is by making chemical modifications to the enzyme, for example by attaching a phosphate group to an amino acid residue. The goal this chapter was to identify those phosphorylation events that change the rates of reactions by switching enzymes on or off, and differentiate them from the many phosphorylation events that have no biological function. We achieved this using phospho-proteomics technology, which uses mass spectrometry to measure the extent to which thousands of different phosphorylation sites are occupied. We combined this with a method for estimating the rates at which enzymatic reactions occur, known as flux balance analysis. By measuring these different quantities in 18 different growth conditions, we were able to detect statistical correlations between the phosphorylation sites on enzymes, and the rates of the reactions they catalyze. We found that our approach was able to identify many well-characterized functional phosphorylation sites in central metabolism, and make functional predictions for other areas of metabolism that are less well studied.

In **chapter 4**, we summarize the main findings from chapters two and three, and compare the approaches used in them to alternative methods that may be useful when studying similar problems in the future. We conclude that while the method we developed may be useful to identify metabolic regulators in signaling networks about which little information exists, the ability efficiently generate and analyze large numbers of samples is an important pre-requisite for projects aimed at screening for new molecules and their possible functions. We also conclude that using perturbations that cause dynamic, or oscillatory responses, will likely provide more informative datasets that reduce the risk of models being overfit. Finally, we conclude that our ability to identify functional phosphorylation sites is likely to improve as more phospho-proteomics datasets and examples of validated functional phospho-sites become available, and consider how the functions of phospho-sites may be studied at scale using methods other than metabolomics.

## Zusammenfassung

Um in unwirtlichen und unvorhersehbaren Umgebungen zu überleben und sich zu verbreiten, haben Lebewesen Fähigkeiten erworben, die es ihnen ermöglichen, ihre Umgebung wahrzunehmen und angemessen zu reagieren. Um den ausgeglichenen, stabilen physiologischen Zustand aufrechtzuerhalten, der als Homöostase bekannt ist, verwenden mehrzellige Organismen wie der Mensch komplexe Signalsysteme, die darauf basieren, die Menge der Chemikalien in ihren Körperflüssigkeiten sorgfältig anzupassen und elektrische Impulse durch komplizierte neuronale Netzwerke mit präzise modulierten Frequenzen zu übertragen. Darüber hinaus können sie Sinnesorgane verwenden, um Veränderung in ihrer Umgebung über weite Distanzen wahrzunehmen und sich ihnen rechtzeitig und angemessen anzupassen. Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mikroorganismen keine solche Fähigkeiten. Um Umwelteinflüssen standzuhalten müssen sie sich blind auf die Wechselwirkungen zwischen ihren Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Molekülen aus denen sie bestehen verlassen. Das Ziel der Systembiologie ist es, auf verschiedenen Detailebenen zu verstehen, was diese Wechselwirkungen sind und wie sie es den Zellen ermöglichen, zu überleben und sich zu vermehren. Ziel dieser Dissertation ist es, Methoden und Konzepte aus der Systembiologie anzuwenden um einen Beitrag, klein wie er auch sein mag, zum Verständnis der Stoffwechselregulation beizutragen.

In **Kapitel 1**, der allgemeinen Einführung, gehe ich davon aus, dass die Existenz lebender Systeme von ihrer Notwendigkeit abhängt, "Ordnung" aus ihrer Umgebung zu entnehmen. Unter dieser Voraussetzung stelle ich die grundlegenden Konzepte des Stoffwechsels vor und entwickle Rechtfertigungen für die Existenz der wichtigsten biochemischen Mechanismen, die die Stoffwechselregulation steuern. Nach einem Überblick über historisch wichtige Entdeckungen und methodische Entwicklungen stelle ich die beiden Hauptthemen vor, die die ursprüngliche Forschung in den beiden folgenden Kapiteln darstellen: Das „Target of Rapamycin“ Signalnetzwerks und die Identifizierung funktioneller Phosphorylierungsstellen, die Stoffwechsel Flüsse regulieren.

**Kapitel 2** beschreibt die Ergebnisse eines kollaborativen Projects, das darauf abzielte, neue Stoffwechselregulatoren für das Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1) zu identifizieren. TORC1 ist ein großer Proteinkomplex, der einen wichtigen Knotenpunkt für zelluläre Entscheidungen darstellt. Wenn eukaryotische Zellen Rapamycin ausgesetzt sind, kommen wichtige zelluläre Prozesse zum Stillstand, als würden sie plötzlich nach Nährstoffen hungern. Dies liegt daran, dass TORC1 eines der wichtigsten Systeme steuert, die Zellen nutzen, um zu beurteilen, wie günstig ihre Ernährungsumgebung ist, und wie sie die ihnen zur Verfügung stehenden Ressourcen optimal verteilen. Zellen enthalten Tausende kleiner Moleküle, die durch Tausende von Reaktionen umgewandelt werden können. Eine der langanhaltenden Fragen zu TORC1 ist, welche

Moleküle es wahrnimmt, um den Stoffwechselzustand der Zelle zu messen und ihn mit Informationen über die Umgebung zu integrieren. Wir beschreiben einen systematischen Ansatz, um neue Signalmoleküle durch Messung der Aktivität von TORC1, und der Änderungen der Konzentrationen von Hunderten von Metaboliten, nach Änderung der Nährstoffversorgung zu identifizieren. Wir haben diese Daten in mathematische Modelle integriert, die vorhersagten, welche Metaboliten am wahrscheinlichsten mit TORC1 zusammenhängen. Dieser Ansatz zeigte auf die Aminosäure Glutamin, von der bekannt ist, dass sie TORC1 durch einen gut verstandenen Mechanismus reguliert, und machte Vorhersagen für andere Metaboliten. Das beschriebene Verfahren ist auf andere Signalsysteme verallgemeinerbar, die von Stoffwechselsignalen abhängen, um zelluläre Prozesse zu regulieren.

In **Kapitel 3**, betrachten wir die Stoffwechselregulation aus einer anderen Perspektive. Metabolische Netzwerke bestehen aus biochemischen Reaktionen, die durch Enzyme katalysiert werden, die Nährstoffe in zelluläre Bausteine und Energie zerlegen. Um zu versichern, dass der Stoffwechsel ausgeglichen ist, muss die Zelle die Geschwindigkeit der Reaktionen oftmals anpassen. Eine Möglichkeit, wie Zellen dies tun, besteht darin, chemische Modifikationen am Enzym vorzunehmen, beispielsweise indem eine Phosphatgruppe an einen Aminosäurerest gebunden wird. Das Ziel dieses Kapitel war diese Phosphorylierungsereignisse zu identifizieren, welche die Geschwindigkeit der Reaktionen ändern, indem Sie mittel Phosphorylierung Enzyme ein- oder auszuschalten. Es ging auch darum, zwischen solchen Phosphorylierungsereignissen welche eine biologische Funktion haben, und solchen die keine biologische Funktion haben, zu unterscheiden. Dies haben wir mithilfe der Phospho-Proteomics-Technologie erreicht, bei der mithilfe der Massenspektrometrie gemessen wird, inwieweit Tausende verschiedener Phosphorylierungsstellen an Proteinen besetzt sind. Wir haben dies mit einer Methode zur Abschätzung der Geschwindigkeit kombiniert, mit der enzymatische Reaktionen ablaufen, die als Flussausgleichsanalyse bekannt ist. Wir haben die Messungen zu diesem Zweck unter 18 verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt, um statistische Korrelationen zwischen den Phosphorylierungsstellen auf Enzymen und der Geschwindigkeit der von ihnen katalysierten Reaktionen festzustellen. Wir fanden heraus, dass unser Ansatz in der Lage war, viele gut charakterisierte funktionelle Phosphorylierungsstellen im zentralen Stoffwechsel zu identifizieren und funktionelle Vorhersagen für andere Bereiche des Stoffwechsels zu treffen, die weniger gut untersucht sind.

In **Kapitel 4** fassen wir die wichtigsten Erkenntnisse aus den Kapiteln zwei und drei zusammen und vergleichen die darin verwendeten Ansätze mit alternativen Methoden, die bei der Untersuchung ähnlicher Probleme in der Zukunft nützlich sein könnten. Wir schließen daraus, dass die Methode die wir entwickelt haben um metabolische Regulatoren in Signalnetzwerken zu identifizieren vor allem für

unerforschte beziehungsweise wenig erforschte Signalnetzwerke von Nutzen sein kann. Die Fähigkeit, große Mengen von Proben effizient zu erzeugen und zu analysieren ist eine wichtige Voraussetzung für Projekte die darauf absehen neuen Moleküle und deren regulative Funktionen zu identifizieren. Wir behaupten auch, dass die Verwendung von experimentellen Eingriffen, die dynamische oder oszillierende Phänomene verursachen, wahrscheinlich aussagekräftigere Datensätze liefern, als solche, die einfache Reaktionen hervorrufen. Wir vermuten auch, dass sich die Möglichkeiten, funktionelle Phosphorylierungsstellen zu Identifizierung wahrscheinlich weiterhin verbessern werden, da mehr Phospho- Proteomics-Datensätze und validierte funktioneller Phosphorylierungsstellen verfügbar werden. Zuletzt geben wir einen Anstoß zur Überlegung, wie die Erforschung von Phosphorylierungsstellen dessen Funktionen nicht aus dem Stoffwechsel ersichtlich sind verbessert werden könnte.