

DISS. ETH NO. 29427

**Finding new ways of targeting cancer cell metabolism by combining
high-throughput metabolic profiling of chemical and genetic perturbations**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Laurentz Justus Georg Schuhknecht

M.Sc. in Biological Sciences, University of Konstanz, Germany

born on 27th March 1994

accepted on recommendation of

Prof. Dr. Uwe Sauer

Prof. Dr. Mattia Zampieri

Prof. Dr. Paola Picotti

Prof. Dr. Pedro Beltrao

2023

Abstract

Cancer treatment has made significant progresses over the last decades, improving outcomes of medication for many patients. However, the repertoire of drugs that can be used to target selected cancer cell vulnerabilities is often small, non-selective and patients respond only for a limited time to the same drug treatment. Advances in gene editing techniques, such as CRISPR have greatly facilitated target discovery and expanded the space of novel promising gene targets for cancer therapy, which revealed an even more prominent role of cellular/cancer metabolism in mediating processes like drug tolerance, quiescence or metastasis formation. However, the ability to discover novel drugs that target vulnerabilities is lagging behind, progressively moving the bottleneck from target identification to effective drug inhibitors. **Hence there is a need to find innovative experimental designs and novel approaches in drug discovery to expand the drug space with which known and newly identified cancer cell vulnerabilities can be targeted.** New computational and experimental approaches have emerged to characterize broader functional impacts of small molecules that go beyond quantifying their growth inhibitory activity. High-throughput and multi-dimensional profiling technologies, such as molecular profiling or high-content imaging measure features that enable a deeper functional characterization of compound actions. However, despite technological advances in molecular profiling techniques, like transcriptomic or proteomics an approach to directly probe drug-induced metabolic changes at large scale is missing to date. Even though metabolism has proven to be an important regulator for cancer progression and homeostasis and hence a promising target for cancer therapy (i.e. more than 50% of newly identified cancer targets are metabolic). Moreover, what type of information can be extrapolated from the systematic analysis of drug-induced metabolic changes and how metabolic drug signatures relate to other drug molecular signatures (e.g. gene expression signatures) remains an open question. Can one use drug metabolic signatures to improve and speed up the functional characterization of small molecules and identify how such compounds can be used to systematically interfere and modulate cellular function?

In this thesis, we generated an unprecedented resource of metabolic responses of cancer cells to largely diverse chemical and genetic perturbations and developed new tools for the normalization and analysis of large compendia of non-targeted metabolomics profiles. With this, we aimed at comparing chemical versus chemical and chemical versus genetic perturbations to perform drug mode of action annotation and identify drugs interfering with promising gene targets for therapy.

In **chapter two**, we aimed at developing and testing a new framework for drug mode of action prediction. For this, we systematically mapped the metabolic effects of a large space of diverse chemical perturbations in lung cancer cells. We used a high-throughput metabolomics framework to monitor alterations in abundance of 2'296 putatively annotated metabolites caused by 1'520 drugs in A549 lung cancer cells. Surprisingly, although only 27% of the drugs induced measurable growth inhibition, a large majority (87%) resulted in intracellular metabolic changes. With over 3.4 million drug-metabolite dependencies, we produced a functional reference table of drug interference with metabolism, which enabled us to conduct high-throughput characterization of compound libraries across diverse

drug-therapeutic classes in a single-pass screen. The metabolic changes uncovered previously undetected drug effects, broadening drug functional annotations and therapeutic applications. Here we predicted and validated one novel DHODH inhibitor and four glucocorticoid receptor agonists. Overall, we were able to validate six of seven predictions on drug MoA, generated by comparing drug-metabolic fingerprints. Additionally, we demonstrated the complementary nature of metabolome profiling to various phenotypic and molecular profiling approaches, opening up new opportunities to combine molecular profiling technologies with phenotypic screens and enhance the efficiency, scope, and precision of preclinical drug discovery.

In **chapter three**, we aimed at developing and testing a new framework to identify commercially available drugs that interfere with newly identified gene targets in cancer. To this end, by utilizing high-throughput non-targeted metabolomics, we analyzed changes in the abundance of 1'985 putatively annotated metabolites induced by CRISPR Cas-9 mediated knockout of 216 genes, of which more than 50% were identified to be lethal targets in lung adenocarcinoma cells. Notably, although only 36% of genetic perturbations resulted in measurable growth inhibition, the majority caused intracellular metabolic changes within 48- (71%) and 72-hours (76%) post-transfection. We observed significant alterations in the local metabolic networks of 49% of identified enzymatic perturbations, as early as two steps from the target, and could identify specific metabolic changes associated with several knocked out key regulators of cellular function, such as TYMS, GSS, XDH, p53, KRAS, and EGFR. Hence, validating that our profiling method accurately captures metabolic changes relevant to gene perturbation. By comparing metabolic profiles of genetic perturbations with profiles of cells undergoing treatment with 1'520 diverse small compounds collected and discussed in chapter two, we generate a map of drug-gene similarities. Here, we showed that drug-gene pairs with known target correspondence are significantly more similar than drug-gene pairs without target correspondence. Furthermore, we highlighted how one can use this map of drug-gene similarities to mine for chemical and genetic perturbations that elicit similar metabolic responses, which are indicative of similar intracellular effects, ultimately generating testable hypothesis on drugs that interfere with newly identified gene targets in cancer. Additionally, we propose three promising drug-gene associations suggesting for new drugs to interfere with the mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9, dynactin subunit 2, a gene involved in dynein activation and glutathione synthase.

In summary, through our work, we showed that metabolic profiling of treatment effects unraveled a large space of before unknown and unappreciated intracellular drug effects, in particular for drugs that don't induce growth inhibition. Such drugs, even if not inhibiting processes essential for rapid cancer cell growth, could be potentially attractive means to interfere with non-growing or metastatic cancer cells. While a metabolic readout recapitulated local changes of metabolism targeting drugs it also allows to recover molecular patterns of drugs of other therapeutic applications. By metabolic profiling of drug treatment effects, we generated and validated functional annotation of compound effects and highlighted its complementarity with other multi-dimensional profiling techniques opening the door for integration with multiplexed molecular profiling technologies to enhance the efficiency and precision of preclinical drug discovery. Furthermore, we showed that the comparison of chemical and genetic induced metabolic

changes allows to systematically mine for drugs that elicits similar intracellular changes as gene knockouts, allowing to generate hypothesis and predictions on drugs that interfere with newly identified gene targets in cancer.

Overall, we established an effective workflow for metabolic profiling of chemical and genetic perturbations to functionally characterize the MoA of small chemical compounds and we highlight its potential to generate testable hypothesis on drugs interfering with newly identified gene targets in cancer. Hence, our approach opens new opportunities in drug screening to enhance and speed up the discovery of new and potent drugs as well as of drugs that interfere with newly identified gene targets to improve cancer therapy.

Zusammenfassung

Die Krebsbehandlung hat in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte gemacht und die Behandlungsergebnisse vieler Patienten verbessert. Allerdings ist das Repertoire an Medikamenten, die zur gezielten Bekämpfung bestimmter Vulnerabilitäten von Krebszellen eingesetzt werden können, oft begrenzt, nicht selektiv und die Patienten reagieren nur für eine begrenzte Zeit auf die gleiche medikamentöse Behandlung. Fortschritte in der Gentechnik, wie zum Beispiel CRISPR, haben die Entdeckung von neuartigen und vielversprechender Zielgene für die Krebstherapie erweitert. Dadurch wurde aufgedeckt, dass der Stoffwechsel von Krebszellen in Prozessen wie Medikamententoleranz, zellulärem Ruhestadium oder Metastasenbildung eine besonders wichtige Rolle spielt. Die Fähigkeit zur Entdeckung neuer Medikamente, die solche Schwachstellen angreifen, hinkt jedoch hinterher und verlagert das Engpassproblem zunehmend von der Identifizierung von therapeutischen Zielen zu der Entwicklung wirksamer Medikamenten. **Daher besteht die Notwendigkeit, innovative experimentelle Herangehensweisen und neue Ansätze in der Arzneimittelentwicklung zu finden, um das Repertoire an Medikamenten zu erweitern, mit dem bekannte und neu identifizierte Krebszellenschwachstellen angegriffen werden können.** In den letzten Jahrzehnten wurden neue rechnergestützte und experimentelle Ansätze entwickelt, um breitere funktionelle Auswirkungen von Medikamenten zu charakterisieren, die über die Quantifizierung ihrer wachstumshemmenden Aktivität hinausgehen. High-throughput und multi-dimensionale Profiling-Technologien wie molekulares Profiling oder hochauflösende Mikroskopie erfassen Merkmale, die eine vielschichtige funktionelle Charakterisierung von Wirkstoffwirkungen ermöglichen. Trotz technologischer Fortschritte bei molekularen Profiling-Techniken wie Transkriptomik oder Proteomik fehlt bislang jedoch ein Ansatz, um Medikamente induzierte Stoffwechseländerungen in großem Maßstab zu untersuchen. Obwohl sich gezeigt hat, dass der Stoffwechsel ein wichtiger Regulator für den Krebsverlauf und dessen Homöostase ist und daher ein vielversprechendes Ziel für die Krebstherapie darstellt (mehr als 50% der neu identifizierten therapeutischen Ziele sind stoffwechselbedingt), bleibt die Frage offen, welche Art von Informationen aus der systematischen Analyse von Medikamente induzierte Stoffwechseländerungen gewonnen werden können und wie metabolische mit anderen molekularen Medikamentensignaturen in Beziehung stehen. Kann man metabolische Medikamentensignaturen nutzen, um die funktionelle Charakterisierung von Medikamenten zu verbessern und zu beschleunigen und herauszufinden, wie solche Medikamente systematisch in zelluläre Funktion eingreifen und sie modulieren können?

Durch die Generierung einer Ressource metabolischer Reaktionen von Krebszellen auf diverse chemische und genetische Störungen und durch die Entwicklung neuer Herangehensweisen zur Normalisierung und Analyse großer Kompendien nicht gezielter metabolischer Profile hatten wir in dieser Arbeit das Ziel, chemische mit chemischen sowie chemische mit genetischen Störungen zu vergleichen. Ein solcher Vergleich ermöglicht es die Wirkweise von Medikamenten zu annotieren und Medikamente zu identifizieren, die vielversprechende Zielgene für die Krebstherapie in ihrer Funktion beeinflussen.

Im **zweiten Kapitel** wollten wir ein neues Framework zur Vorhersage der chemischen Wirkweise von Medikamenten entwickeln und testen. Dafür haben wir systematisch die metabolischen Effekte einer großen Bandbreite verschiedener chemischer Störungen in Lungenkrebszellen getestet. Wir haben ein High-throughput Metabolomik Framework verwendet, um Veränderungen von 2'296 Metaboliten zu analysieren, die durch 1'520 Medikamente in A549 Zellen verursacht wurden. Überraschenderweise führten, obwohl nur 27% der Medikamente messbare Wachstumshemmung verursachten, eine große Mehrheit (87%) zu metabolischen Veränderungen in den Zellen. Mit über 3.4 Millionen Assoziationen zwischen Medikamenten und Metaboliten haben wir eine funktionale Referenztabelle für den Einfluss von Medikamenten auf den Stoffwechsel erstellt. Diese ermöglichte es uns, in einem einzigen Durchgang eine High-throughput Charakterisierung von Wirkstoffbibliotheken über verschiedene Medikamenten- und Therapieklassen hinweg durchzuführen. Die aufgedeckten metabolischen Veränderungen enthüllten zuvor unentdeckte Wirkungen von Medikamenten, erweiterten die funktionale Annotation von Medikamenten und ihre therapeutischen Anwendungen. Unter anderem haben wir einen neuartigen DHODH-Inhibitor und vier Glukokortikoid-Rezeptor-Agonisten hervorgesagt und validiert. Insgesamt konnten wir sechs von sieben Vorhersagen zur Wirkweise von Medikamenten bestätigen, die durch den Vergleich von Medikamenten-Metabolom-Fingerabdrücken generiert wurden. Zusätzlich haben wir die ergänzende Art des Metabolom-Profilings im Vergleich zu verschiedenen phänotypischen und molekularen Profiling-Technologien aufgezeigt. Dies eröffnet neue Möglichkeiten, molekulare Profiling-Technologien mit phänotypischen Screens zu kombinieren und die Effizienz, Reichweite und Präzision der präklinischen Arzneimittelentwicklung zu erhöhen.

Im **dritten Kapitel** haben wir das Ziel verfolgt, ein neues Framework zur Identifizierung kommerziell erhältlicher Medikamente zu entwickeln und zu testen, die mit neu entdeckten und Krebstherapie relevanten Genen interferieren. Hierzu haben wir mit Hilfe unseres High-throughput Metabolomik Frameworks Veränderungen von 1'985 Metaboliten analysiert, die durch CRISPR Cas-9-vermitteltes Ausschalten von 216 Genen, von denen mehr als 50% essentiell für zelluläres Wachstum in Lungenadenokarzinomzellen sind, induziert wurden. Obwohl nur 36% der genetischen Störungen messbare Wachstumshemmung verursachten, führte die Mehrheit zu intrazellulären metabolischen Veränderungen innerhalb von 48 (71%) und 72 Stunden (76%) nach der Transfektion. Signifikante Veränderungen in den lokalen Stoffwechselnetzwerken bereits zwei Schritte entfernt vom Ziel wurden bei 49% der identifizierten enzymatischen Störungen festgestellt. Zudem konnten spezifische metabolische Veränderungen identifiziert werden, die mit dem Ausschalten mehrerer Schlüsselregulatoren von zellulären Funktionen wie TYMS, GSS, XDH, p53, KRAS und EGFR in Verbindung stehen. Dadurch wurde bestätigt, dass unsere Profiling-Methode Gen spezifische metabolische Veränderungen genau erfasst. Durch den Vergleich metabolischer Profile genetischer Störungen mit Profilen von Zellen, die mit 1'520 diversen Medikamenten behandelt wurden, wie in Kapitel zwei dargestellt, haben wir eine Assoziationskarte zwischen Medikamenten und Genen erstellt. Dabei haben wir gezeigt, dass Medikamenten-Gen-Paare mit bekannter Zielkorrespondenz signifikant ähnlicher sind als Paare ohne Zielkorrespondenz. Zudem zeigen wir auf, wie man diese Assoziationskarte zwischen Medikamenten und Genen nutzen kann, um gezielt nach chemischen und genetischen Störungen zu suchen, die ähnliche metabolische

Reaktionen hervorrufen. Diese Reaktionen deuten auf ähnliche intrazelluläre Effekte hin und ermöglichen letztendlich die Generierung testbarer Hypothesen zu Medikamenten, die mit neu identifizierte Gene interferieren. Zusätzlich schlagen wir drei vielversprechende Medikament-Gen-Assoziationen vor, die eine starke Metabolom-Ähnlichkeit aufweisen und weiter validiert werden sollten.

Zusammenfassend haben wir durch unsere Arbeit gezeigt, dass das metabolische Profiling von Behandlungseffekten einen großen Bereich bisher unbekannter und nicht geschätzter intrazellulärer Medikamenteneffekte aufdeckt, insbesondere bei Medikamenten, die kein Wachstumshemmung verursachen. Solche Medikamente könnten potenziell attraktive Mittel sein, um auf nicht wachsende oder metastasierende Krebszellen einzuwirken, selbst wenn sie Prozesse, die für ein schnelles Wachstum essenziell sind, nicht hemmen. Während ein metabolisches Messergebnis lokale Veränderungen des Stoffwechsels bei Medikamenten, die auf den Stoffwechsel abzielen, widerspiegelt, ermöglicht es auch die Erfassung molekularer Muster von Medikamenten mit anderen therapeutischen Anwendungen. Durch das metabolische Profiling von Medikamentenbehandlungen haben wir eine funktionale Annotation von Wirkungseffekten von Medikamenten erstellt und validiert und die Komplementarität zu anderen multi-dimensionalen Profiling-Techniken hervorgehoben. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit zur Integration mit multiplexen molekularen Profiling-Technologien, um die Effizienz und Präzision der präklinischen Arzneimittelentwicklung zu verbessern. Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass das Vergleichen von chemisch und genetisch induzierten metabolischen Veränderungen systematisch nach Medikamenten suchen lässt, die ähnliche intrazelluläre Veränderungen wie Gen-Knockouts hervorrufen. Dies ermöglicht die Generierung von Hypothesen und Vorhersagen zu Medikamenten, die mit der Funktion neu identifizierter Gene in Krebszellen interferieren.

Insgesamt haben wir einen effektiven Workflow für das metabolische Profiling von chemischen und genetischen Störungen etabliert, um die Wirkungsweise von Medikamenten funktional zu charakterisieren, und wir heben das Potenzial hervor, testbare Hypothesen zu Medikamenten zu generieren, die mit neu identifizierten Genen in der Krebstherapie interferieren. Unsere Vorgehensweise eröffnet somit neue Möglichkeiten in dem Arzneimittelscreening, um die Entdeckung neuer und wirksamer Medikamente zu beschleunigen, sowie für die Entdeckung von Medikamenten, die mit neu identifizierte krebsrelevanten Gengruppen interferieren.