

University of Groningen

Intrinsic, periodic and tunable metabolic dynamics: a scaffold for cellular coherence

Papagiannakis, Alexandros

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Papagiannakis, A. (2017). *Intrinsic, periodic and tunable metabolic dynamics: a scaffold for cellular coherence*. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

De celcyclus is een periodieke afwisseling tussen de productie van biomassa en afscheiding. Traditioneel wordt de regulatie van de celcyclus gezien als golven van cyclines. Deze volgen elkaar in temporeel opzicht strak op en reguleren zo de cycline-afhankelijke kinase (CDK), die de verschillende processen van de celdelingscyclus aanstuurt. Er zijn echter aanwijzingen die duiden op regulatoren van de celcyclus buiten de cycline/CDK machinerie om. Allereerst kan de celcyclus ook beginnen in afwezigheid van alle vroege cyclines. Ten tweede houden oscillaties in globale transcriptieniveaus en tijdens de late celcyclus aan, ook zonder periodieke cycline/CDK activiteit. En tot slot wijst een fylogenetische analyse van de celcycluskinasen erop dat CDK's pas laat in de evolutie van eukaryoten zijn ontstaan, en dus moeten vroege eukaryoten andere manieren gehad hebben om de celcyclus te reguleren.

Het beginpunt van dit proefschrift was de hypothese dat er een metabole oscillator bestaat, en dat deze als regulator van de celcyclus fungeert. Metabole oscillatoren zouden controle kunnen uitoefenen op de celcyclus door oscillerende metabolietconcentraties, waarvan bekend is dat deze met de cycline/CDK machinerie interactie aangaan en bovendien de formatie van biomassa reguleren door epigenetische activatie of het silencen van genen die gerelateerd zijn aan groei. Om onze hypothese te testen hebben we eerst uitgezocht of een metabole oscillator bestaat. Door sensors voor metabolieten en reporters voor de celcyclus te combineren met microfluidics en epifluorescence time-lapse microscopie, hebben we metabole oscillaties in ATP en NAD(P)H niveaus gevonden in *Saccharomyces cerevisiae* op cellulaire schaal, in afwezigheid van synchronisatie en intercellulaire communicatie. Oscillerend metabolisme houdt zijn frequentie synchron met de celcyclus in verschillende metabole modi (fermentatie, respiratie of gluconeogenese) en groeisnelheden, maar gaat ook door zonder celdeling. Bij cellen die vastgezet zijn in G1 door behandeling met paarferomoon alpha factor, zijn er cellen die stochastisch de celdeling overslaan bij hoge glucose concentraties, terwijl G0 cellen voorkomen tijdens glucose-gelimiteerde condities. Gebaseerd op wat we gevonden hebben, concluderen we dat metabolisme in gist een oscillator is die autonoom van celcyclus opereert.

De strakke synchronie tussen oscillerende metabolieten en de cycline/CDK machinerie in delende cellen suggereert dat er een systeem van gekoppelde oscillatoren is, bestaande uit de metabole oscillator, de vroege en de late celcyclus. We hebben gevonden dat metabolisme en de celcyclus een aantal eigenschappen vertonen, die representatief zijn voor systemen van gekoppelde oscillatoren, en bovendien lijken op wat verder gevonden is in de natuur (bijv. neurale netwerken of gesynchroniseerde ontlading van cellen in de sinusknop). Eerst waren we getuige van de proportionaliteit tussen de compromis en natuurlijke metabole frequenties. De celcyclus vertraagt de

metabole oscillator na koppeling, mogelijk door zijn biosynthetische behoeftes. Verder vonden we dat koppeling tussen metabolisme en de celcyclus alleen bereikt kan worden als de frequenties dicht bij elkaar liggen. Als metabolisme te snel of te langzaam gaat, kan het geen compromisfrequentie vinden met de celcyclus, en dus zijn deze cellen niet in staat te delen. We hebben een duidelijke drempelwaarde gevonden voor metabole frequenties om robuust delende van niet-delende cellen te kunnen scheiden. Als laatste hebben we gevonden dat de metabole oscillator robuust de fase van de vroege en de late celcyclus bewaakt tijdens stabiele of verstoorde groei. De synchronie tussen de metabole oscillator en de vroege celcyclus (biomassa formatie en DNA replicatie) hield zelfs aan als we de late celcyclus stopzetten, wat suggereert dat er een directe koppeling is tussen metabolisme en de vroege celcyclus.

In dit proefschrift dienden perturbaties als het gereedschap om de interacties tussen periodieke processen te onderzoeken, zoals de metabole oscillator en de hieraan gekoppelde celcyclus. Wisselingen in nutriënten werden gebruikt om de frequentie en de fase van de metabole oscillator te verstoren, en de auxine-induceerbare degron voor de conditionele en dynamische afbraak van celcycluseiwitten. Voordat we het auxine-induceerbare degron systeem konden gebruiken, moesten we het tot stand brengen en grondig karakteriseren op cellulair niveau. We maten de afbraak- en opbouwdynamica van de doeleiwitten voor een breed scala aan auxineconcentraties in microfluidics experimenten. Hoewel de auxine-induceerbare degron snelle eiwitafbraak induceert (ongeveer 20 minuten voor complete eiwitafbraak), duurde het volledige herstel van de doeleiwitten na verwijdering van het planthormoon auxine ten minste enkele generaties. Deze tijd is cruciaal voor de cellen om een evenwicht te bereiken tussen eiwitsynthese en verdunning. We wijzen hier ook op de groeidefecten ten gevolge van de het planthormoon auxine, vooral als het gecombineerd wordt met belichting van blauw licht en GFP metingen. Doordat microfluidics steeds toegankelijker worden en met de ontwikkeling van nieuwe cellulaire reporters, anticiperen we erop dat ons werk zal faciliteren in perturbaties op cellulair niveau, waarbij hun onovertroffen potentiaal in het bestuderen van dynamische processen benut wordt.

Om de mechanismen verantwoordelijk voor metabole oscillaties die autonoom zijn van de celcyclus te onderzoeken, bestudeerden we de rol van de cAMP/PKA pathway op de metabole dynamica met conditionele eiwitafbraak, tezamen met gen knockouts. We vonden dat Rim15, activator van stressrespons en negatief gereguleerd door de cAMP/PKA pathway, als metabole demper fungeert door het afzwakken van de metabole oscillaties in afwezigheid van cAMP signaling. Zo'n metabole demping is nodig voor het robuust tot stilstand brengen van de celcyclus na toevoeging van paarferomoon alpha factor. Onze resultaten duiden erop dat de cAMP/PKA pathway, waarvan bekend is dat deze geactiveerd wordt door flux-afhankelijke metabolietsignalen, positieve terugkoppeling

verschafft aan de metabole dynamica door de inhibitie van stressrespons en mogelijk ook door de afbraak van opgeslagen koolhydraten.

Samenvattend constateert dit werk dat gistmetabolisme autonoom is van de celcyclus en verschafft bovendien bewijs dat controle op celcyclus van een hogere orde is, die pas ontstaat vanuit de collectieve synchronie tussen gekoppelde oscillatoren, waaronder de metabole en cycline/CDK oscillator. Omdat centrale metabole pathways geconserveerd zijn over alle taxa van het leven, zou de metabole oscillator een primitieve regulator voor de celcyclus kunnen vormen, ook aanwezig in de vroege eukaryoten voor de verschijning van de cycline/CDK machinerie. Extra controle, zoals de vroege cyclines en de start van CDK activiteit of signaling van nutriënten, is mogelijk geënt op de metabole oscillator, en nam zo de metabole dynamica mee voor de robuuste scheiding van de fases van de celcyclus, of robuuste initiatie van celcyclus wanneer nutriënten overvloedig aanwezig zijn. Als een soortgelijke metabole oscillator ook bestaat in zoogdiercellen, dan zou het kunnen voorzien in nieuwe therapeutische doelen tegen proliferatieve aandoeningen.

