

DISS. ETH NO. 27022

**METABOLIC NETWORK ANALYSIS AND ITS
APPLICATION IN UNDERSTANDING THE
BIOLOGY OF AGING**

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

presented by
SUDHARSHAN RAVI

Master of Science
ETH Zurich

Born on 21 March 1991
Citizen of India

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Andrew deMello, examiner
Prof. Dr. Rudyanto Gunawan, co-examiner
Prof. Dr. Paolo Arosio, co-examiner

2020

ABSTRACT

A fundamental aim of life science is to understand the functioning of an organism and draw system-level connections between its genotype and behavior. Among the most significant types of interaction networks, cellular metabolism is a well-established descriptor of the phenotype of an organism. It relies on thousands of enzymatic reactions that are often represented as a dense and enmeshed web of biochemical conversions. Inspecting the metabolic network in its entirety is crucial in attaining a holistic understanding of the underlying biological mechanism. Colossal research efforts in the post-genomic era have enabled the curation of metabolic networks of entire organisms. Concurrently, advancements in computational strategies and algorithms have led to the inception of countless tools that utilize the essential information in genome-scale metabolic models to attain valuable insights into the physiology of an organism.

Constraint-based modeling is a widely used and tested technique to model the metabolic network. Flux balance analysis (FBA) is the most popular constraint-based approach to predict intracellular metabolic flux distributions and network capabilities in genome-scale models. They are modeled on two fundamental assumptions. Firstly, that the cellular metabolism operates at a homeostatic condition, and secondly, that the cell typically organizes its metabolism to optimize a particular cellular objective. However, these assumptions significantly impair the applicability of the traditional flux balance analysis. Where the prediction accuracy is insufficient, additional constraints from omics data sources assist in obtaining biologically relevant inference.

In this work, we showcase the addition of transcriptomic data to gain a profound understanding of the early events in the progression of Alzheimer's disease model *Caenorhabditis elegans*. Transgenically expressing human amyloid-beta recapitulated the phenotypic disease response in the worms. Our analyses of the contextualized genome-scale metabolic network curated with the integration of experimentally derived gene expression data implicated metabolic alterations in Tricarboxylic Acid (TCA) cycle following

low-level amyloid-beta expression. Along with metabolomic and enzymatic assays, we show repression in alpha-Ketoglutarate dehydrogenase. Identification of metabolic dysfunction as an early event is paramount in formulating mitigating efforts.

Formulating a metabolic objective for use in constraint-based modeling is hazy, particularly for complex multicellular organisms. In addressing such concerns, we developed a computational algorithm, Δ FBA (delta-FBA), that focuses on the differences in the metabolic distribution between a pair of conditions. By formulating the mathematical problem to optimize for maximal consistency between the inferred flux alterations and integrated gene expression changes, Δ FBA predicts metabolic rewiring as an effect of genetic or environmental perturbations. We validated our strategy in a wide range of single-gene deletion knockouts and environmental modifications in *Escherichia coli*, where Δ FBA outperforms similar methods. Furthermore, our findings of metabolic changes in human diabetic subjects show the robustness of Δ FBA.

Akin to metabolism, aging is a complex biological process that necessitates a system-level analysis in unraveling its etiology and progression. Despite numerous efforts, the aging process in humans is far from being completely understood. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project represents an invaluable repository of information that is ideal for studying human aging by examining the differences in the gene expression of over seven hundred individuals. Our bioinformatics and metabolic network analysis of the transcriptome associated human aging with evolutionarily conserved hallmarks of aging. Additionally, we show that the temporal changes in gene expression significantly contribute to the aging process. Our findings suggest that persistent moderators of cell fate and early repressors of cellular energetics could play a pivotal role in the progression of the aging process, one that culminates in accelerated decline.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein grundlegendes Ziel der Biowissenschaften ist es, das Funktionieren eines Organismus zu verstehen und auf der Systemebene Verbindungen zwischen seinem Genotyp und seinem Verhalten zu knüpfen. Unter den wichtigsten Arten der Interaktionsnetzwerke ist der Zellstoffwechsel ein gut etablierter Deskriptor für den Phänotyp eines Organismus. Dieser hängt von tausenden von enzymatischen Reaktionen ab, die häufig als dichtes und verwobenes Netz von biochemischen Umwandlungen dargestellt werden. Es ist von besonderer Bedeutung, das metabolische Netzwerk in seiner Gänze zu untersuchen, um ein holistisches Verständnis der zu Grunde liegenden biologischen Mechanismen zu erhalten. Immense Forschungsbemühen in der Post-Genomischen Ära haben die Kuration metabolischer Netzwerke von gesamten Organismen ermöglicht. Gleichzeitig haben Fortschritte rechnerischer Strategien und Algorithmen zur Gründung zahlreicher Werkzeuge geführt, die wiederum von essenziellen Informationen im Genome-Scale Metabolic Model Gebrauch machen mit dem Ziel wertvolle Einsichten in die Physiologie eines Organismus zu gewinnen.

Constraint-Based Modellierung ist eine weitverbreitete und erprobte Technik, um das metabolische Netzwerk abzubilden. Flux Balance Analysis (FBA) ist der beliebteste constraint-based Ansatz, um intrazelluläre metabolische Verteilungsflüsse und Netzwerkfähigkeiten in genome-scale Modellen vorherzusagen. Sie stützen sich auf zwei grundlegende Annahmen: Erstens, dass der zelluläre Stoffwechsel nach homöostatischen Bedingungen agiert und zweitens, dass die Zelle ihren Stoffwechsel typischerweise zur Optimierung eines bestimmten zellulären Zwecks anordnet. Diese Annahmen schränken jedoch die Anwendbarkeit der traditionellen Flux balance Analysen signifikant ein. Dort, wo die Vorhersagegenauigkeit ungenügend ist, helfen zusätzliche Einschränkungen von omics Datenquellen biologisch relevante Rückschlüsse zu erhalten.

In dieser Arbeit präsentieren wir die Ergänzung von transkriptomischen Daten, um ein tiefgreifendes Verständnis der frühen Geschehnisse im Voranschreiten der Alzheimerkrankheit im Modell bei *Caenorhabditis ele-*

gans zu gewinnen. Transgen exprimiertes menschliches Amyloid-Beta führte zu einer phenotypischen Krankheitsantwort in den Würmern. Unsere Analysen des kontextualisierten Genome-Scale Metabolic Network kuratiert mit der Integration von experimentell hergeleiteten Mengenbestimmung der Genexpression wiesen auf Stoffwechseleränderungen im Tricarboxylic Acid (TCA) Zyklus nach niedriger Amyloid-Beta Expression hin. Zusammen mit metabolischen und enzymatischen Proben zeigen wir eine Unterdrückung in Alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase. Die Identifikation der Stoffwechselfunktionsstörung als ein frühes Geschehnis steht an erster Stelle um Abmilderungsbemühungen auszuformulieren.

Einen metabolischen Zweck für den Gebrauch einer constraint-based Modellierung zu formulieren ist vage, besonders für komplexe multizelluläre Organismen. Um uns solchen Bedenken zuzuwenden, haben wir einen Algorithmus namens Δ FBA (delta-FBA) entwickelt, der sich auf die Unterschiede in der metabolischen Verteilung zwischen einem Paar von Bedingungen fokussiert. Indem ein mathematisches Problem formuliert wird, das die maximale Beständigkeit zwischen vermuteter Strömungsveränderung und integrierten Veränderungen in der Genexpression optimiert, sagt Δ FBA metabolische Neuverdrahtung als einen Effekt von genetischen und umgebungsbedingten Störungen voraus. Unsere Strategie haben wir anhand eines breiten Spektrums von Single-Gene-Deletion-Knockouts und Umgebungs-Modifikationen in *Escherichia coli* validiert, bei denen Δ FBA ähnliche Methoden übertrifft. Zudem zeigen unsere Ergebnisse die Robustheit von Δ FBA bei diabetischen Probanden in Bezug auf Stoffwechseleränderungen.

Ähnlich zum Stoffwechsel ist auch das Altern ein komplizierter biologischer Prozess, der eine Analyse auf Systemlevel erfordert, um dessen Ätiologie und Voranschreiten zu entdecken. Trotz zahlreicher Bemühungen ist der menschliche Alterungsprozess noch weit von einem vollständigen Verständnis entfernt. Das Genotype-Tissue Expression (GTEx) Projekt stellt einen wertvollen Informationsspeicher dar, der ideal für das Studium des menschlichen Alterns geeignet ist, indem Unterschiede in der Genexpression von über 700 Individuen untersucht werden. Unsere bioinformatischen und metabolischen Netzwerkanalysen vom Transkriptom brachte das menschliche Altern mit evolutionär konservierten Kennzeichen des Alterns in Verbindung. Darüber hinaus zeigen wir, dass die zeitlichen Veränderungen in der Genexpression signifikant zum Altern beitragen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl anhaltende Moderatoren des Schicksals der Zelle als

auch frühzeitige Repressoren der zellulären Energetik eine entscheidende Rolle im Voranschreiten des Alterungsprozesses spielen, dieser wiederum kulminiert in einem beschleunigten Verfall.