



Doctoral Thesis

Systems analysis of metabolic network operation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Author(s):

Fischer, Eliane

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004846589> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH 15616

**Systems analysis of metabolic network operation in
Escherichia coli and *Bacillus subtilis***

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Science

Presented by
Eliane Fischer
Dipl. Natw. ETH
born August 1st, 1976
citizen of Zürich, Switzerland

Accepted on the recommendation of
PD Dr. U. Sauer
Prof. Dr. H. Hennecke
Prof. Dr. N. Amrhein

Zürich, 2004

Summary

Microbial cells have acquired an enormous level of complexity, both in terms of metabolic versatility and physiological adaptation to ever-changing environments. While defined tasks can often be assigned to individual metabolic pathways or reactions, their complex interplay and dynamic adaptability to non-standard conditions is not understood, at least not quantitatively. Direct assessment of the *in vivo* pathway activities using an experimental setup that allows rapid and parallel analysis of many strains or conditions is the key to deeper understanding of metabolism from a holistic perspective.

Over the last decade, methods of metabolic flux analysis based on ^{13}C tracer experiments were established as a valuable tool to gain insight into intracellular metabolism. However, these applications were usually slow, tedious in experimental effort and data evaluation, and rather expensive. Thus, at the start of this thesis, only about 50-100 flux analyses have been performed world-wide because ^{13}C tracer experiments were clearly not a standard analysis. This thesis introduces metabolic flux ratio (METAFor) analysis for mass spectrometry (MS) which is later extended to a simple and robust method for metabolic net flux analysis.

Since MS is far more sensitive than NMR for analysis of labeling patterns, METAFor analysis was developed for MS data, similar to an existing NMR-based method, but now combining a sensitive analytical technique with rapid data evaluation (Chapter 2). In experiments where quantitative physiological measurements are feasible, the flux ratios derived from METAFor analysis can be used in combination with these measurements to assess the absolute intracellular fluxes. This so-called ^{13}C -constrained flux analysis was developed together with statistical treatment that allows appropriate consideration of individual measurement errors and resolutions of the obtained fluxes (Chapter 3).

The novel methods were applied to assess metabolic pathway activities in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* under different environmental conditions. In *E. coli*, growth on limiting glucose revealed the operation of a new catabolic cycle, which involves PEP carboxykinase and the enzymes of the glyoxylate shunt, and allows the complete oxidation of PEP to CO_2 (Chapter 4) - a function that has been considered as the exclusive property of the ubiquitous tricarboxylic acid (TCA) cycle.

Metabolic flux analysis of knockout-mutants provides valuable insight in the response to genetic perturbations. Besides metabolic lesions, where rerouting of carbon flux through alternative pathways is often observed (Chapter 3), knockout of genes of different functions, including for example regulation, signaling, or transport, can indirectly affect metabolic behavior. Basically no quantitative knowledge on how metabolism responds globally to such

perturbations was available at the beginning of this thesis. As a first venture into such metabolic systems analysis, I exploited the power of the developed methods to screen a library of 150 *B. subtilis* mutants for metabolic changes caused by altered regulation, kinetics, or metabolic lesions (Chapter 5). The results revealed that at least *B. subtilis* metabolism was extremely robust against genetic perturbations, and that flexible splitting between alternative reactions was restricted to a single branch-point in metabolism.

The nature and sensitivity of flux ratio analysis enables also, in principle, to quantitatively investigate growth on solid surfaces, about which very little was known physiologically (Chapter 6). In particular, I show here that *E. coli* does not seem to utilize the pentose phosphate (PP) pathway at all on plate, while all other flux ratios were similar to liquid cultures. In *B. subtilis*, all flux ratios were similar to liquid cultures during the initial plate growth phase. Upon initiation of sporulation, however, the TCA cycle activity increased significantly, presumably to provide energy for the conclusion of this developmental program.

Zusammenfassung

Mikroorganismen haben einen hohen Grad an Komplexität erreicht, sowohl bezüglich metabolischer Vielfaltigkeit als auch bezüglich physiologischer Anpassung an eine Umgebung, die sich ständig verändert. Obwohl es oft möglich ist, den einzelnen Stoffwechselwegen und Reaktionen definierte Funktionen zuzuordnen, sind ihre komplizierten Wechselwirkungen und flexiblen Anpassungsmöglichkeiten an weniger gut beschriebene Bedingungen nicht geklärt, jedenfalls nicht quantitativ. Die direkte Messung der *in vivo* Aktivitäten von Stoffwechselwegen mit Hilfe eines Versuchsaufbaus, der schnelle und parallele Analysen von vielen Stämmen oder Bedingungen zulässt, ist der Schlüssel zu besserem und ganzheitlicherem Verständnis über den Stoffwechsel.

In den letzten zehn Jahren wurden verschiedene Methoden für metabolische Flussanalyse mit Markierungsexperimenten etabliert, um Einblick in den intrazellulären Stoffwechsel zu gewinnen. Diese Methoden waren normalerweise langsam, erforderten aufwändige Experimente und Datenauswertung und waren zudem ziemlich teuer. Weil ^{13}C Markierungsexperimente eindeutig keine Routineanalyse waren, wurden zu Beginn dieser Arbeit weltweit nur etwa 50-100 Flussanalysen durchgeführt. Die vorliegende Arbeit führt die metabolische Flussverhältnisanalyse (METAFor) für Massenspektrometrie (MS) ein, welche später zu einer einfachen und robusten Methode für metabolische Nettoflussanalyse erweitert wird.

Weil MS für die Analyse von Markierungsmustern viel sensitiver als NMR ist, wurde im Kapitel 2 die METAFor Analyse für MS entwickelt, die zwar analog zu einer existierenden NMR-basierten Methode ist, aber jetzt eine sensitive Analysetechnik mit schneller Datenauswertung verbindet. Für Experimente, in welchen quantitative physiologische Messungen möglich sind, können die Flussverhältnisse aus der METAFor Analyse mit diesen Messungen kombiniert werden, um intrazelluläre Nettoflüsse abzuschätzen. Diese sogenannte ^{13}C -eingegrenzte Flussanalyse wurde mit einer statistischen Betrachtung entwickelt, welche die angemessene Betrachtung von Messfehlern und die resultierende Auflösung der Flüsse behandelt (Kapitel 3).

Die zwei neuen Methoden wurden angewandt, um die Aktivitäten der Stoffwechselwege in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Während des Wachstums auf Glucose als limitierendem Substrat wurde in *E. coli* ein neuer Stoffwechselweg gefunden, der die Enzyme der Glyoxylatwegs und die PEP-carboxykinase enthält, und der die komplette Oxidation von PEP zu CO_2 ermöglicht (Kapitel 4). Diese Funktion wurde bis jetzt ausschliesslich dem Zitronensäurezyklus zugeschrieben.

Die metabolische Flussanalyse von Knockout-Mutanten gibt einen wertvollen Einblick in die Antwort auf genetische Veränderungen. Neben Mutationen im Stoffwechsel, wo man oft die Umleitung des Kohlenstoffflusses über alternative Stoffwechselwege beobachtet (Kapitel 3), kann auch das Ausschalten von Genen mit anderen Funktionen, wie zum Beispiel Regulation, Transport oder Signalübertragung den Stoffwechsel indirekt beeinflussen. Zu Beginn dieser Arbeit gab es praktisch keine Erkenntnis darüber, wie der Stoffwechsel auf solche Störungen antwortet. Als erster Schritt in Richtung einer solchen metabolischen Systemanalyse wurden die neu entwickelten Methoden angewandt, um eine Sammlung von 150 *B. subtilis* Mutanten auf Stoffwechseleränderungen zu analysieren, welche durch veränderte Regulation oder Kinetik oder durch metabolische Mutation hervorgerufen werden (Kapitel 5). Die Ergebnisse zeigten, dass der Stoffwechsel von *B. subtilis* sehr robust gegenüber Mutationen ist, und dass flexible Aufteilung zwischen alternativen Stoffwechselwegen nur an einem einzigen Verzweigungspunkt im Stoffwechsel vorkommt.

Das Prinzip und die Empfindlichkeit der Flussverhältnisanalyse ermöglichen es auch, das Wachstum von Bakterien auf festen Oberflächen zu studieren, worüber physiologisch sehr wenig bekannt ist (Kapitel 6). Insbesondere wurde gezeigt, dass *E. coli* auf Agarplatte keinen Pentose-phosphatweg verwendet, jedoch die anderen Flussverhältnisse ähnlich wie in Flüssigkultur sind. Im *B. subtilis* sind alle Flussverhältnisse zu Beginn der Wachstumsphase gleich wie in Flüssigkultur. Sobald Sporulation einsetzt steigt jedoch die Aktivität des Zitronensäurezyklus deutlich, wahrscheinlich um Energie für den Sporulationsprozess zu gewinnen.