

DISS. ETH No. 19156

**Development of ^{13}C flux methods
to quantify metabolic responses
in non-growing and mixed populations**

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences ETH Zurich

Presented by

Martin Rühl

Diplom Biologe technisch orientiert (t.o.) Universität Stuttgart

Born February 24th 1978 in Wetzlar

Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Uwe Sauer, ETH Zurich, examiner

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt, ETH Zurich, co-examiner

Dr. Nicola Zamboni, ETH Zurich, co-examiner

Zurich, 2010

Abstract

Cellular metabolism is essential for life and provides the necessary energy, redox factors, and precursors to fuel all vital processes. The metabolic network consists of a large number of enzyme-mediated chemical reactions with metabolites and represents today's best characterized biological network. Beyond the mere metabolic network structure, the combined *in vivo* operation of these reactions in metabolism is of great interest, as it reveals the current metabolic phenotype. The key descriptors of metabolic operation are metabolic fluxes, which represent the *in vivo* time-dependent motion of metabolites through the metabolic network reactions. Most importantly, fluxes in central carbon metabolism are determined, where energy-rich carbon sources are catabolized to gain all necessary material for the anabolic reactions.

Intracellular metabolic fluxes cannot be measured directly but must be estimated from measureable quantities using model-based data interpretation. Most advanced are ^{13}C flux analysis methods that use in addition to extracellular rates of uptake and production also ^{13}C labeling patterns in metabolites. These ^{13}C labeling patterns emerge from feeding microbes with ^{13}C labeled carbon substrate leading to pathway specific carbon distribution and rearrangement. Based on the conventional ^{13}C flux analysis method that uses ^{13}C labeling patterns in protein-bound amino acids, extensive information about *in vivo* metabolic operation has been derived for exponentially growing microbes.

However, microbes in their natural habitats are often confronted with nutritional limitations that restrict growth and force them to slow growth or even entry into stationary phase. Despite their importance and frequent occurrence in nature, the *in vivo* operation of metabolism in stationary phase phenomena is largely uncharacterized. This thesis investigated stationary phase phenomena by ^{13}C flux analysis methods. Therefore, the conventional ^{13}C flux analysis method, isotope tracer and mass spectrometry approaches had to be expanded.

First, we were interested how intracellular metabolic fluxes respond to dynamically increasing glucose limitation that cause a transition from exponential growth near to non-growth. We investigated this question in a glucose-limited fed-batch cultivations with *Bacillus subtilis*. To resolve dynamic flux changes during the occurring slow metabolic shifts, ^{13}C labeling patterns in free intracellular amino acids were accessed. Fluxes were then estimated with stationary ^{13}C flux analysis methods, for which a decomposition of the process into quasi-steady states and estimation of isotopic steady state ^{13}C labeling patterns was

necessary. We achieved a temporal resolution of 30–60 min that allowed us to resolve the slow metabolic transients that typically occur in such cultivations. Surprisingly, *B. subtilis* exhibited at very low growth rates an immense NADPH overproduction that exceeded anabolic demands. Rather hypothetical, NADPH balancing by a transhydrogenase reaction was assumed.

Such NADPH overproduction was even higher in resting *B. subtilis*, i.e. non-growing but metabolically active cells under nitrogen limitation. Nitrogen limitation represents a realistic nutritional limitation for this soil bacterium. In the absence of anabolism as main NADPH sink in resting cells, we focused on alternative, network-wide NADPH balancing mechanisms. Due to hampered *de novo* amino acid and protein biosynthesis caused by nitrogen limitation, the free intracellular amino acid approach could not be used. Thus, to quantify intracellular fluxes in resting cultures by ^{13}C stationary methods, we developed a novel mass spectrometry approach to directly measure information rich ^{13}C labeling patterns in metabolic intermediates. By combining evidence from ^{13}C flux analysis in various metabolic deletion mutants, ^2H labeling experiments, and *in vitro* enzyme assays, we found that part of the excess NADPH is oxidized by two transhydrogenation cycles, i.e. pairs of dehydrogenase isoenzymes with different cofactor specificities that operate in reverse directions. Furthermore, the apparent NADPH overproduction was lowered by simultaneously active NAD^+ -dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase isoenzymes. Overall, these results indicated the yet unknown importance of combined and concerted isoenzymes to counteract NADPH overproduction in N-limited resting *B. subtilis*.

Based on the observations that metabolically specialized subpopulations can emerge from a clonal population during stationary phase, we aimed at subpopulation-specific ^{13}C metabolic flux analysis. Therefore, we devised a subpopulation-specific, affinity-purified reporter protein approach. Since this represents a complete new field for ^{13}C flux analysis, an initial experimental proof-of-principle was necessary. For method validation, different known metabolic phenotypes of *Escherichia coli* metabolic mutants were investigated in batch co-cultivation experiments. Based on this validated reporter protein approach, we specifically investigated the metabolic capacity of natural forming subpopulations in the intracellular pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Surprisingly, the extraordinary metabolic capacity of the host cell invading subpopulation for increased and selective amino acid uptake was in accordance with the amino acid composition of the mammalian intestinal mucosa.

Zusammenfassung

Der zelluläre Stoffwechsel ist eine essentielle Grundlage für alle Lebensprozesse, welcher die benötigte Energie, Redoxfaktoren und Substanzbausteine bereitstellt. Das metabolische Netzwerk besteht aus einer grossen Anzahl Enzym-katalysierter, chemischer Reaktion zwischen Metaboliten und stellt das zur Zeit am besten charakterisierte biologische Netzwerk dar. Über die reine Netzwerkstruktur hinaus, sind die interagierenden und funktionellen Abläufe dieser metabolischen Reaktionen *in vivo* von grossem Interesse, da sie den momentanen metabolischen Phänotyp der Zelle widerspiegeln. Die Schlüsselrolle zur Erfassung des funktionellen Metabolismus kommt dabei den metabolischen Flüssen zu, welche die zeitabhängige Bewegung der Metabolite durch das metabolische Netzwerk wiedergeben. Von grosser Bedeutung sind vor allem die Flüsse durch den zentralen Kohlenstoffwechsel, da hier energiereiche Kohlenstoffquellen zu allen notwendigen Ausgangsstoffen für die anabolischen Reaktionen umgeformt werden.

Intrazelluläre, metabolische Flüsse können nicht direkt gemessen werden, sondern müssen über Modell-basierte Dateninterpretation messbarer Grössen ermittelt werden. Am fortschrittlichsten sind dabei ^{13}C Flussanalysen, die zusätzlich zu Produktions- und Aufnahmeraten, auch ^{13}C Markierungsmuster in Metaboliten einbinden. Diese ^{13}C Markierungsmuster entstehen durch Fütterung des ^{13}C -markierten Kohlenstoffsubstrates und zeigen Stoffwechselweg-spezifische Kohlenstoffgruppierungen und -verteilungen an. Ausgehend von der konventionellen ^{13}C Flussanalyse, welche auf ^{13}C Markierungsmustern in proteingebunden Aminosäuren basiert, wurden umfangreiche Informationen über den funktionellen Metabolismus in exponentiell wachsende Mikroben erhalten.

Häufig ist es jedoch der Fall, dass Mikroben in ihrer natürlichen Umgebung mit Nahrungslimitation konfrontiert werden. Dadurch wird ihr Wachstum gehemmt und ein langsames Wachstum bis hin zum Eintritt in die stationäre Phase forciert. Trotz der Wichtigkeit und Häufigkeit dieser Phänomene, ist der funktionelle Metabolismus in stationären Phasen weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden metabolische Phänomene der stationären Phase mittels ^{13}C Flussanalyse untersucht. Hierzu musste die konventionelle ^{13}C Flussanalyse, die Isotopenmarkierungstechniken und die Analyse mittels Massenspektrometrie erweitert werden.

Zunächst waren wir daran interessiert, wie intrazelluläre Stoffwechselflüsse auf eine dynamisch verschärfte Glukoselimitation reagieren, was einen Wechsel vom exponentiellen Wachstum zu einem beinahe Wachstumsstillstand zur Folge hatte. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde das Verhalten von *Bacillus subtilis* unter Glukose-limitierenden Kultivierungsbedingungen (fed-batch) beobachtet. Um dynamische Flussveränderungen während der langsam ablaufenden metabolischen Veränderungen aufzulösen, wurden die ^{13}C Markierungsmuster in freien intrazelluläre Aminosäuren herangezogen. Anschliessend wurden die Flüsse mittels stationärer ^{13}C Flussmethoden bestimmt. Dazu war eine Aufgliederung des Gesamtprozesses in quasi-stationäre Zustände und eine Abschätzung der stationären ^{13}C Markierungsmuster erforderlich. Diese Methode erzielte eine zeitliche Auflösung von 30 - 60 min und ermöglichte somit die Bestimmung langsam ablaufender Stoffwechselveränderungen, welche typisch für die angewandten Kultivierungsbedingungen sind. Überraschenderweise wies *Bacillus subtilis* trotz langsamem Wachstum eine enorme NADPH Überproduktion auf, welche die anabolische Nachfrage überstieg. Als hypothetischer NADPH-Bilanzierungsmechanismus konnte nur eine Transhydrogenase zugeteilt werden.

Eine höhere NADPH Überproduktion konnte auch in ruhenden *Bacillus subtilis* Zellen unter Stickstofflimitation nachgewiesen werden. Hierbei stellt die Stickstofflimitierung eine realistische Nahrungslimitation für ein Bodenbakterium dar. In Abwesenheit des Anabolismus als NADPH-Hauptverbraucher in ruhenden Zellen, richteten wir unser Augenmerk auf alternative, netzwerkweite NADPH-Bilanzierungsmechanisms. Die Stickstofflimitierung beeinträchtigte die *de novo* Aminosäuren- und Proteinbiosynthese, weshalb die zuvor entwickelte ^{13}C Analytik für freie intrazellulärer Aminosäuren nicht verwendet werden konnte. Um dennoch intrazelluläre, metabolische Flüsse quantifizieren zu können, wurde ein neues massenspektrometrisches Verfahren entwickelt, das eine direkte Bestimmung informationsreicher ^{13}C Markierungsmuster in metabolischen Intermediaten ermöglichte. Durch Kombination von ^{13}C Flussanalysen verschiedener Stoffwechselmutanten, ^2H Markierungsexperimenten und *in vitro* Enzymaktivitätsmessungen fanden wir heraus, dass zwei Transhydrogenasezyklen einen Teil des überschüssigen NADPH *in vivo* oxidieren. Diese Zyklen bestehen jeweils aus einem Paar an Dehydrogenase-Isoenzymen mit unterschiedlicher Kofaktorspezifität und entgegengesetzten Reaktionsrichtungen. Weiterhin wurde die NADPH Überproduktion durch gleichzeitig aktive NAD^+ -abhängige 6-Phosphogluconat Dehydrogenase Isoenzyme verringert. Zusammengefasst deuteten diese Ergebnisse auf eine bis dato unbekannte Bedeutung der konzertierten Nutzung von Isoenzymen zur Vermeidung einer NADPH-Überproduktion in N-limitierten, ruhendem *B. subtilis*.

Basierend auf den Beobachtungen, dass metabolisch spezialisierte Subpopulationen sich aus einer klonalen Population während der stationären Phase entwickeln können, versuchten wir eine populations-spezifische ^{13}C Flussanalysemethode zu entwickeln. Hierzu wurde ein Populations-spezifisches, Affinitätschromatographie-reinigbares Reporterprotein entworfen. Da dies ein neues Einsatzgebiet für ^{13}C Flussanalyse darstellt, mussten erste Pilotexperimente durchgeführt werden. Zur Methodvalidierung wurden bekannte metabolische Phänotypen von *Escherichia coli* Stoffwechselmutanten in Kokultivierungsexperimenten untersucht. Unter Verwendung dieser validierten Methode untersuchten wir gezielt die Stoffwechselkapazität natürlich auftretender Subpopulationen des intrazellulären Pathogens *Salmonella enterica* serovar Typhimurium nachzuweisen. Sehr überraschend war, dass die aussergewöhnliche Stoffwechselkapazität der Wirtszell infizierenden Subpopulation bezüglich der vermehrten Aufnahme bestimmter Aminosäuren mit dem Vorkommen dieser Aminosäuren in der intestinalen Mucosa in Säugetieren übereinstimmte.