



Doctoral Thesis

## **Metabolome Profiling to Study Metabolic Turnover, Regulation, and Cell Cycle Dynamics**

**Author(s):**

Hartl, Johannes

**Publication Date:**

2018

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000335816> →

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

DISS. ETH NO. 25476

**Metabolome profiling to study metabolic turnover,  
regulation, and cell cycle dynamics**

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

presented by

Johannes Hartl

MSc, Universität Wien

born on 08.07.1988

citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia Vorholt  
Prof. Dr. Markus Aebi  
Prof. Dr. Jörn Piel

2018

# Summary

Metabolism is a fundamental feature of life, as it provides the energy harnessing and biosynthetic processes that are required to sustain a cell and drive its division. The architecture of the central metabolic reaction network that underlies the cellular metabolic activity has been largely unraveled. However, metabolism is a dynamic system and metabolic plasticity enables a temporal response to accommodate changes of biological function. Thus, assessing metabolome dynamics is key to understand fundamental properties of cellular metabolism, including metabolic homeostasis and control.

In the first part of this thesis, half-life dynamics of intracellular metabolites were assessed in bacteria. Dynamic stable isotope labeling experiments were performed with a focus on low-flux pathway intermediates or metabolic end-products. Despite their proclaimed notorious instability, coenzymes including pyridoxal 5-phosphat (PLP), flavins, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and coenzyme A (CoA) were found to be essentially only synthesized to compensate for dilution inflicted by cellular growth. Thus, degradation or other means of turnover are no major factor for their maintenance. In conclusion, as irreversible loss is negligible, these coenzymes are stable *in vivo*. This finding was conserved among a Proteobacterium (*Escherichia coli*), a Firmicute (*Bacillus subtilis*) and an Eukaryote (*Saccharomyces cerevisiae*). Moreover, growth dilution correlated with coenzyme *de novo* synthesis under various growth-rates and substrates. An additional finding of this study was that coenzyme levels are kept in excess to actual demand, implying their stoichiometric excess or full saturation of active sites of respective coenzyme dependent enzymes. Overall, coenzyme stability and their excess propagation suggests that they are no global regulators of metabolic flux, but these features effectively prevent potential limitations.

In the second part of this work, metabolome dynamics was investigated during bacterial cell cycle progression. An untargeted, stable isotope assisted metabolomics approach was developed and applied to cell cycle synchronized *Caulobacter crescentus* cultures. While the concentration of most detected intracellular metabolites remained homeostatic as a function of the cell cycle, a discrete metabolic response characterized different cell-cycle stages. Prominent examples include anabolic pathways, including sulfur metabolism and purine *de novo* synthesis. Strikingly, glutathione concentration oscillated throughout the cell cycle, and glutathione deficiency resulted in defects that indicate impairments of coordinated cell cycle progression.

Overall, this thesis highlights the potential of dynamic metabolome profiling approaches, by providing fundamental insights into microbial coenzyme homeostasis, and the impact of bacterial cell cycle progression on metabolism.

# Zusammenfassung

Der Stoffwechsel ist ein grundlegendes Merkmal des Lebens, da er die Energie und Bausteine bereitstellt, um Zellen zu erhalten und ihre Teilung zu ermöglichen. Das zentrale metabolische Reaktionsnetzwerk stellt die benötigte metabolische Aktivität in Zellen und wurde weitgehend bestimmt. Allerdings sind Stoffwechselprozesse intrinsisch dynamisch und können durch die metabolische Plastizität schnell auf zeitabhängige Änderungen reagieren. Dementsprechend ist die Erfassung der Dynamik metabolischer Prozesse ein Schlüssel zum Verständnis grundlegender Eigenschaften des Zellstoffwechsels.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Umsatzraten von intrazellulären Metaboliten in Mikroorganismen untersucht. Dazu wurden dynamische Markierungsexperimente mit stabilen Isotopen durchgeführt, wobei der Fokus auf die Erfassung der Halbwertszeiten von Stoffwechselwegen mit geringem Fluss bzw. metabolischen Endprodukten gelegt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Koenzymen (Pyridoxal 5-Phosphat, Flavine, Nikotinamiddinukleotid sowie Coenzym A) trotz ihrer proklamierten intrazellulären Instabilität lediglich synthetisiert werden, um wachstumsbedingte Verdünnung zu kompensieren. Dementsprechend ist ein irreversibler Verlust dieser Koenzyme vernachlässigbar, woraus sich deren intrazelluläre Stabilität ableiten lässt. Diese Beobachtung konnte in unterschiedlichen Bakterien (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) und einem Eukaryonten (*Saccharomyces cerevisiae*) reproduziert werden. Darüber hinaus korrelierte die Syntheserate von Koenzymen mit der Wachstumsrate unter verschiedenen Bedingungen. Es wurde weiterhin gefunden, dass Koenzyme generell im Überschuss vorhanden sind, also selbst bei einer Reduktion der intrazellulären Vorräte noch exponentielles Wachstum ermöglichen. Dementsprechend werden Koenzyme über dem tatsächlichen Bedarf gehalten, was auf die (Über-) Sättigung Koenzym-abhängiger Enzyme schließen lässt. Zusammengefasst legen die beobachtete Stabilität und der ermittelte Überschuss von Koenzymen in Zellen nahe, dass diese in der Regel keine Regulatoren metabolischer Aktivität sind, aber möglichst effektiv potentielle Wachstumslimitierungen verhindern.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde anhand des Bakteriums *Caulobacter crescentus* untersucht, wie sich der bakterielle Stoffwechsel während des Zellzyklus verändert. Dazu wurde ein massenspektrometrischer Ansatz entwickelt, um ungezielt metabolomweite Konzentrationsänderungen intrazellulärer Metaboliten zeitlich aufzulösen. Während die Konzentration der meisten nachgewiesenen intrazellulären Metaboliten als eine Funktion des Zellzyklus homöostatisch blieb, waren unterschiedliche Zellzyklusstadien durch einen diskreten metabolischen Zustand charakterisiert. Als Beispiele lassen sich hierfür die dynamische Regulation anabolischer Stoffwechselwege, etwa im Schwefelstoffwechsel oder der Purin *de novo* Synthese anführen. Ein besonders auffälliger Metabolit war Glutathione, dessen Konzentration in Abhängigkeit des Zellzyklus oszillierte. Ein Mangel an Glutathione führte zu verschiedenen Defekten, welche auf eine dysregulierte Koordination von Wachstum und Zellzyklus schließen

lässt.

Insgesamt wird in dieser Arbeit das Potenzial von zeitlich aufgelösten, großangelegten Messungen des metabolischen Zustands, aufgezeigt. Es wurden Einblicke in die mikrobielle Koenzym-Homöostase und die Zellzyklus-abhängige Veränderung von Stoffwechselprozessen gewonnen.