



Georg Martin Richter

Development and Application of a Method for Quantitative Metabolome Analysis of Various Production Strains

Hochschulschriften

Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes

Herausgegeben von Prof. Dr. Christoph Wittmann

Band 5

**Cuvillier-Verlag
Göttingen, Deutschland**

Herausgeber
Univ.-Prof. Dr. Christoph Wittmann
Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes
Campus A1.5, 66123 Saarbrücken
www.iSBio.de

Hinweis: Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2019

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2019
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2019

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9971-8
eISBN 978-3-7369-8971-9
ISSN 2199-7756

Development and Application of a Method for Quantitative Metabolome Analysis of Various Production Strains

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Ingenieurwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

von

Georg Martin Richter

Saarbrücken

2018

Tag des Kolloquiums:

28.09.2018

Dekan:

Prof. Dr. G. Kickelbick

Vorsitz:

Prof. Dr. G.-W. Kohring

Berichterstatter:

Prof. Dr. C. Wittmann

Prof. Dr. E. Heinzle

Akademischer Mitarbeiter:

Dr. J. Neunzig

Participants – Colleagues

Partial results were determined in collaboration with colleagues as referred to in this thesis.

Cultivations of *Y. pseudotuberculosis* were performed in collaboration with Dr.-Ing. René Bücken, Institute of Systems Biotechnology, Universität des Saarlandes.

Cultivations of *B. megaterium* were conducted in collaboration with Dr.-Ing. Thibault Godard, Institute of Biochemical Engineering, TU Braunschweig.

Cultivations of *D. shibae* were performed in collaboration with Dr.-Ing. Annekathrin Bartsch, Institute of Systems Biotechnology, Universität des Saarlandes.

Participants – Bachelor students

Partial results published in this work were determined in collaboration with M. Sc. Biotech. Christina Engel. During her bachelor thesis at the Institute of Biochemical Engineering, TU Braunschweig, Ms. Engel compared the extraction efficiency of boiling ethanol and cold acidic acetonitrile methanol mixture. Furthermore, she produced the U¹³C labeled internal standard, which was used for precise quantitative measurements.

Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit war eine Vielzahl an Menschen direkt und indirekt beteiligt, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Wittmann für die Bereitstellung des spannenden Themas und die stets gute Betreuung der Arbeit, auch unter widrigsten Bedingungen. Die entspannte Atmosphäre bei den gemeinsamen Besprechungen und die konstruktiven Anregungen haben diese Arbeit in vielerlei Hinsicht bereichert. Vielen Dank auch für das Vertrauen das du mir entgegengebracht hast in dem du mich meine Arbeit in Braunschweig hast zu Ende bringen lassen. Ich weiß, dass die Betreuung meiner Arbeit dadurch nicht einfacher geworden ist!

Mein Dank gilt weiterhin den Professoren Elmar Heinzle und Gert-Wieland Kohring für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes. Vielen Dank auch an Herrn Dr. Björn Becker für den Prüfungsbeisitz als akademischer Mitarbeiter.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer Krull bedanken, der bedingungslos den letzten verbliebenen Saarbrückener Exilanten im Institut in Braunschweig Unterschlupf gewährt hat und immer ein offenes Ohr für die alltäglichen Probleme eines Doktoranden hatte.

Danken möchte ich auch Annetrin Bartsch, Rene Bücken und Thibault Godard, deren Wissen über die Eigenheiten von *D. shibae*, *Y. pseudotuberculosis* und *B. megaterium* erst ermöglicht haben, dass diese Arbeit einen ausführlichen Überblick über das mikrobielle Metabolom verschiedenster Stämme geben kann.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Institutes für Bioverfahrenstechnik der TU Braunschweig und den Mitarbeitern des Institutes für Systembiotechnologie der Universität des Saarlandes. Die angenehme Arbeitsatmosphäre hat es immer leicht gemacht am morgen früh im Labor zu erscheinen um es abends erschöpft wieder zu verlassen. Es gab kein Problem, dass nicht mit Hilfe der Schwarmintelligenz angegangen werden konnte, keine Nachtschicht, die nicht bei Computerspielen kürzer wurde (Danke, André) und keinen Frust, der nicht beim gemeinsamen Feierabendbier oder Sport kleiner wurde. Vielen Dank euch allen, ihr habt die gemeinsame Zeit unvergesslich werden lassen. Ein spezieller Dank hier noch an meinen Bürokollegen Arne, der alle meine Macken im Büro mit stoischer Ruhe ertragen hat um sie dann auch noch im gemeinsamen USA-Urlaub zu genießen.

Außerdem möchte ich mich bei „meiner“ Studentin Christina Engel bedanken, die sich selbst durch den eigenen Geburtstag nicht von einer Nachtschicht mit mir und *C. glutamicum* abhalten ließ. Deine Arbeit und die vielen lustigen gemeinsamen Stunden im Labor haben diese Arbeit maßgeblich bereichert.

Allen Freunden, die mich immer wieder aus dem Doktorandenalltag geholt haben möchte ich für die vielen netten gemeinsamen Stunden danken. Die gemeinsamen Urlaube in Dänemark, die vielen gemeinsamen Spieleabende, Videoabende am Dienstag bei uns auf dem Sofa und die Zockrunde am Donnerstag haben dafür gesorgt, dass ich immer wieder ausgeglichen ins Labor zurückkehren konnte.

Ganz besonders möchte ich Sarah danken, die mich immer voll und ganz unterstützt hat und ohne die diese Arbeit mit Sicherheit ganz anders ausgesehen hätte. Vielen Dank für dafür, dass du jeden Tag für mich da bist und es einfach immer schaffst mich zum Lachen zu bringen.

Ein letzter Dank geht an meine Familie, die mich bis hierher gebracht hat und mich in Studium und Promotion immer unterstützt hat. An meinen Vater der mich immer wieder angetrieben hat. An meine Mutter für ihr offenes Ohr, ihre Anregungen und die vielen Stunden zwischendurch, wenn es mal nicht um die Dissertation ging. Danke auch an Björn, ohne deine Hilfe bei Simulationen und Grafiken säße ich wahrscheinlich immer noch vor dem Rechner.

Vielen Dank euch allen!

Table of Contents

I. Summary	VI
II. Zusammenfassung.....	VII
1 Introduction	1
2 Objectives	3
3 Theoretical Background.....	4
3.1 Quantitative Measurements in Microbial Metabolomics	4
3.2 Tandem Mass Spectrometry hyphenated with Liquid Chromatography.....	7
3.2.1 Liquid Chromatography for Metabolite Separation	7
3.2.2 Mass Spectrometry for Metabolite Detection.....	8
3.2.3 Application of LC-MS/MS for Microbial Metabolomics.....	12
3.3 Sample Processing for Metabolite Quantification.....	13
3.3.1 Quenching of the Metabolome during Sampling	14
3.3.2 Metabolite Extraction.....	15
3.4 Fundamentals of Metabolism	16
3.4.1 Central Carbon Metabolic Pathways.....	16
3.4.2 Regulation of Metabolism by the Intracellular Energy Level	19
3.4.3 Thermodynamic Constraints.....	21
3.5 Pathway repertoire of microorganisms	22
3.5.1 <i>Escherichia coli</i>	23
3.5.2 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	24
3.5.3 <i>Pseudomonas putida</i>	25
3.5.4 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	26
3.5.5 <i>Bacillus megaterium</i>	26
3.5.6 <i>Rhodospseudomonas palustris</i>	27
3.5.7 <i>Dinoroseobacter shibae</i>	28
4 Material and Methods.....	29
4.1 Strains.....	29
4.2 Chemicals.....	30
4.3 Growth Media	30
4.3.1 Complex Media.....	30
4.3.2 Minimal Media.....	31
4.4 Cultivation	35
4.4.1 Shake Flask Cultivation.....	35
4.4.2 Fed-batch and Chemostat Cultivations in Bioreactors.....	35
4.5 Analytical Techniques	36
4.5.1 Cell concentration	36

4.5.2	Glucose concentration	38
4.6	Metabolomics Workflow	38
4.6.1	Sampling.....	38
4.6.2	Metabolite Extraction.....	38
4.6.3	Generation of an U ¹³ C-labeled Internal Standard.....	39
4.6.4	LC-MS/MS Measurement.....	39
4.7	Limits of Detection and Quantitation.....	40
4.8	Validation of Metabolic Datasets by Energetic Constraints	41
5	Results and Discussion	42
5.1	Method Development and Optimization.....	42
5.1.1	Improvement of the Mass Spectrometric Set-Up for Metabolite Analysis.....	42
5.1.2	Chromatographic Separation of Standard Mixtures.....	44
5.1.3	Chromatographic Separation of Cellular Extracts.....	50
5.1.4	Verification of Ion Fragmentation Patterns	54
5.1.5	Detection and Quantification Limits	56
5.1.6	Optimization of Sample Pretreatment	58
5.1.7	Validation by thermodynamic constraints.....	62
5.2	Quantitative Analysis of the Energy Metabolism of <i>E. coli</i>	66
5.2.1	Dynamics of the Energy Level during Carbon Deprivation	66
5.2.2	Dynamics of Energy Metabolism during Chemostat Experiments.....	69
5.2.3	Inhibition of the Respiratory Chain and Impact on the Energy Charge.....	72
5.2.4	Adenylate Energy Charge during Fed-batch Cultivations	74
5.3	Central Carbon Metabolism of <i>Y. pseudotuberculosis</i>	84
5.3.1	Generation and Validation of Metabolic Profiles of <i>Y. pseudotuberculosis</i>	84
5.3.2	Comparison of the Core Metabolism of <i>Y. pseudotuberculosis</i> and <i>E. coli</i>	88
5.4	Stress Induced Changes in the Metabolome of <i>B. megaterium</i>	95
5.4.1	Generation and Validation of Metabolic Profiles of <i>B. megaterium</i>	95
5.4.2	Response of <i>B. megaterium</i> to Temperature Induced Stress	100
5.4.3	Response of <i>B. megaterium</i> to Salt Induced Stress.....	103
5.5	Impact of Nutrient Levels on the Central Carbon Metabolism of <i>D. shibae</i>	107
5.6	Integrated Analysis of Metabolic Datasets of Different Microbial Strains	113
6	Conclusions and Outlook.....	118
7	Abbreviations and Symbols	123
8	References.....	126
9	Appendix.....	145

I. Summary

Recent technical improvements in the area of mass spectrometry enabled quantitative measurements of small molecules. The present work used these advancements to develop a method for the quantification of metabolites of the central carbon metabolism in the nanomolar range. Sample analysis by tandem mass spectrometry hyphenated with liquid chromatography enabled measurements of 33 metabolites in 25 min. Performed measurements were validated by thermodynamic and energetic constraints, which proved that datasets were of high quality. Combination of metabolomics and fluxomics approaches enabled a holistic and systems-oriented view during analysis of the metabolic datasets. The new method was first applied to identify changes in the energy charge of *E. coli* during different cultivation modes. Analysis showed that the adenylate energy charge was actively controlled by secretion or synthesis of adenylate phosphates. Thus, a strong imbalance between energy generation and consumption was necessary to distort the energy charge permanently. The novel technique was further used to identify changes in the central carbon metabolism of microorganisms as a consequence of genetic modifications, stress inducing cultivation conditions and changes in carbon source. Surprisingly, genetic modifications and stress inducing cultivation conditions resulted only in minor changes of intracellular metabolite levels. Hence, it seems that microorganisms put great efforts into the homeostasis of metabolite ratios and fluxes.

II. Zusammenfassung

Neue Entwicklungen im Bereich der Massenspektroskopie ermöglichen quantitative Messungen von Molekülen mit sehr kleinen Massen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Neuentwicklungen genutzt um Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels im nanomolaren Bereich nachzuweisen. Die Kopplung von Tandem-Massenspektroskopie und Flüssigchromatographie ermöglichte den Nachweis von 33 Metaboliten in 25 min. So gewonnene Datensätze wurden anschließend mittels Thermodynamik validiert, wodurch die hohe Qualität der Datensätze deutlich wurde. Bei der Analyse der Datensätze wurden dann Ergebnisse aus Metabolom- und Fluxomforschung kombiniert um einen ganzheitlichen Ansatz zu schaffen. Die neue Technik wurde zuerst angewandt um den Einfluss verschiedener Kultivierungsverfahren auf das Energielevel von *E. coli* zu untersuchen. Die Untersuchungen zeigten, dass *E. coli* seinen Energielevel aktiv durch die Sekretion und Synthese von Energiemetaboliten steuern kann. Nur extreme Ungleichgewichte bei Verbrauch und Generierung von Energie konnten den Energiehaushalt nachhaltig stören. Weitere Messungen untersuchten den Einfluss von genetischen Veränderungen, Stress und unterschiedlichen C-Quellen auf den zentralen Kohlenstoffwechsel von Mikroorganismen. Überraschenderweise führten weder genetische Veränderungen noch Stress zu starken Veränderungen der Metabolitkonzentrationen. Dies zeigt das Mikroorganismen viel Aufwand in die Homöostase von Metabolit-Verhältnissen und intrazellulären Flüsse stecken.

1 Introduction

Metabolic pathways are the very essence of life and the understanding of their functioning and their regulation has been a major goal of the natural sciences, since the discovery of metabolism itself. Interestingly, central carbon metabolism is highly conserved in most living organisms due to its efficiency (Smith & Morowitz 2004; Ebenhöf & Heinrich 2001). It channels various nutrients through pathways to provide energy and reducing power for cell maintenance and reproduction as well as precursor metabolites for biomass formation (Noor et al. 2010). As such, this core piece of metabolism is in the heart of biotechnology. Elucidation of central carbon metabolism during the past decades (Entner & Doudoroff 1952; Gunsalus et al. 1955; Krebs & Johnson 1980; Barnett 2003) laid the foundation for modern biotechnology. The meanwhile even deeper understanding of metabolism and its regulatory elements is a valuable knowledge base to enhance bio-production processes, as it enables the rational design of metabolic pathways towards high titers and yields of desired products of choice (Akinterinwa et al. 2008; Buchinger et al. 2009; Becker et al. 2011; Becker & Wittmann 2012b). Particularly, sophisticated methods, which allow the detection of imbalances in levels of energy or precursor metabolites and the identification of even unknown cellular intermediates, appear most useful to identify genetic targets for tailor-made modifications of microorganisms towards improved performance (Lee et al. 2005; Wendisch et al. 2006; Becker et al. 2007).

More fundamentally, the exact quantification of intracellular metabolites allows describing and modeling of the complex underlying metabolic pathway networks. Such systems-oriented approaches heavily rely on suitable technologies, which provide accurate data of the studied system. Experimental techniques that provide such systems wide insights are therefore well suited to collect quantitative data to construct, adjust and validate systems biology models. These techniques are referred to as “omics” and involve genomics, transcriptomics, proteomics, fluxomics and metabolomics according to their target analytes (Romualdi & Gerolamo 2009). Hence, the field of metabolomics intends to study the profiles of metabolites, which are products of specific cellular processes (Jordan et al. 2009) and thereby provides a snapshot of cellular physiology at a certain point of time. As a subcategory, metabonomics is by definition “the quantitative measurement of the dynamic multiparametric metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli or genetic modifications” (Nicholson 2006).

The recent decades have seen a tremendous progress in the field of metabolite analysis. In the pioneering days, colorimetric, manometric and enzymatic assays were employed for identification and quantification of metabolites (Entner & Doudoroff 1952; Krebs & Johnson 1980). The elucidation of the central pathways of metabolism by utilization of these methods took an enormous effort, as such techniques required large amounts of the analytes of interest and

multiple steps of purification prior to the actual measurement. The coupling of metabolite analysis to chromatographic separation processes, such as thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), led to drastically lowered detection limits, thus displaying a milestone in the analysis of sample mixtures (Touchstone 1993). This was even improved by coupling of mass spectrometry (MS) to chromatographic separation processes. The use of highly sensitive tandem mass spectrometry for detection led to a further decrease of detection limits, while simultaneously allowing quantification of complex metabolite mixtures, due to the identification of specific metabolite fragments by their mass to charge ratio (Luo et al. 2007; Balcke et al. 2011). In addition, mass spectrometry allows distinguishing between different isotopically labeled versions of a metabolite, as a consequence of the change in mass, thereby enabling approaches like ^{13}C metabolic flux analysis (Wittmann & Heinzle 1999; Dauner & Sauer 2000). Most recently, the utilization of ion mobility mass spectrometry enables the determination the ratios of isomers, which are inseparable by chromatography (Far et al. 2014). These recent instrumental developments now provide an excellent basis to perform metabolite analysis.

Basically, it has become relatively easy to generate larger datasets of intracellular metabolite concentrations. However, remaining questions revolve around the challenge that the measured levels indeed reflect the studied *in vivo* system (Bolten et al. 2007). Particularly, the quality of metabolic datasets is strongly dependent on the preceding steps of sampling, sample treatment and processing. It is crucial to stop the metabolism instantaneously due to high turnover rates and small pool sizes of the metabolites of interest, which might otherwise be distorted (Wittmann et al. 2005). Furthermore, the avoidance of potential unwanted side effects of the sample treatment, such as metabolite leakage (Bolten et al. 2007), co-precipitation (Zakhartsev et al. 2015) and the degradation or interconversion of metabolites during the extraction, has to be considered. Combined with the largely varying physico-chemical properties of metabolites and differences in concentrations of several orders of magnitudes these problems still pose as a serious challenge when developing a reliable quantitative method for metabolite analysis.

2 Objectives

The aim of the present study was to develop a method for the quantification of intermediates from central carbon metabolism via liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, suitable to be applied to a variety of different microorganisms. Among the analytes of interest were metabolites of the glycolysis, the Entner-Doudoroff (ED) pathway, the pentose phosphate (PP) pathway and the tricarboxylic acid (TCA) cycle, as well as energy metabolites and redox equivalents. Preferably, the analysis of cellular extracts should be faster as commonly reported time periods of up to 90 minutes and exhibit a high-resolution capacity for the complex cellular extracts of interest, which should be aimed for by optimization of the liquid chromatography and the coupling to mass spectrometric detection. The developed method should generate reproducible results and combine high separation efficiency with high sensitivity and short analysis times. Starting initially with standard mixtures from synthetic compounds the approach should be transferred to living cells. This should involve the estimation of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in the presence of relevant biological matrices. Additionally, different protocols for sampling and metabolite extraction should be applied and validated. Careful inspection of the obtained datasets from thermodynamic and energetic perspective should then provide a clear basis for validation.

Finally, the novel quantitative method should be applied to address relevant biological questions. Hence, the central carbon metabolome of seven biotechnological relevant Gram-negative and Gram-positive microbial strains should be studied under different growth conditions. The gained insight should then be combined with results from metabolic flux analysis to investigate the impact of genetic modifications, environmental stress or changes of substrate on selected strains.

3 Theoretical Background

3.1 Quantitative Measurements in Microbial Metabolomics

Generally, metabolomics investigates the endo- and exo-metabolome by qualitative, semi-quantitative and quantitative approaches respectively. Hereby, quantitative analysis gives the most accurate picture. In contrast to semi-quantitative approaches (Zamboni et al. 2008), quantitative datasets can be validated by thermodynamic inspection and used for kinetic and metabolic modeling (de Jonge et al. 2014; Wiechert & Noack 2011). Metabolomics itself is a relatively young component in the field of systems biology. Since the year 2000 more and more studies involve metabolomic measurements, indicating a fast-growing interest in this field (Figure 3.1). Obviously, metabolomics is becoming a valuable tool of research in the fields of metabolic engineering (Trethewey 2004; Toya & Shimizu 2013) and bioprocess optimization (Sonntag et al. 2011) over the last decade. However, compared to e.g. transcriptomics, genomics and proteomics, the number of metabolomic studies seems still rather low (Kohlstedt et al. 2010). Particularly, open questions remain and involve suitable protocols for sampling, quenching and extraction procedures as well as analytical methods to guarantee validity and comparability of metabolic datasets. Without doubt, metabolome analysis remains an analytical challenge (van der Werf et al. 2007).

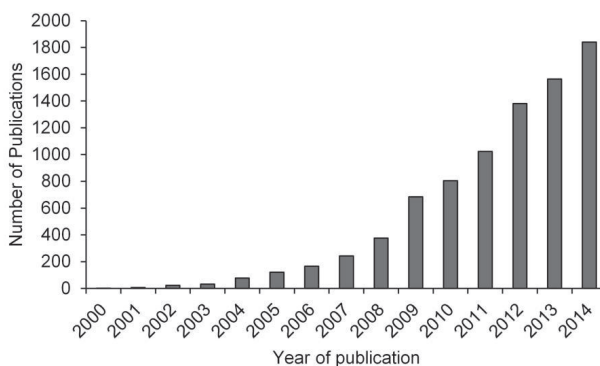


Figure 3.1: Increase in the number of publications in the field of metabolomics over the past 14 years according to the PubMed database (2015).

A powerful and robust quantitative method for the measurement of intracellular metabolites has to meet several key criteria. The method should provide high resolution, short measurement time and high reproducibility. The first challenge, which has to be overcome to achieve this goal, is the complexity of biological samples, which comprise multiple compounds with great variance in concentration and chemical properties. As example, the metabolome of