

Metabolismus

Von der Stöchiometrie zur Kontrolle metabolischer Netzwerke

THORBEN SCHRAMM, HANNES LINK

INTERFAKULTÄRES INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND INFektionsMEDIZIN
TÜBINGEN (IMIT), UNIVERSITÄT TÜBINGEN

Cellular metabolism is very complex and extensively regulated. For many organisms we know almost the complete set of biochemical reactions in their metabolic network. However, it is not well understood how these reactions are regulated and how they interact in order to enable cellular functions. In this review, we describe recent methodological advances to study metabolic networks with a focus on bacterial metabolism.

DOI: 10.1007/s12268-021-1538-0
© Die Autoren 2021

Metabolische Netzwerke gehören zu den komplexesten und zugleich zu den am besten untersuchten biologischen Netzwerken, die

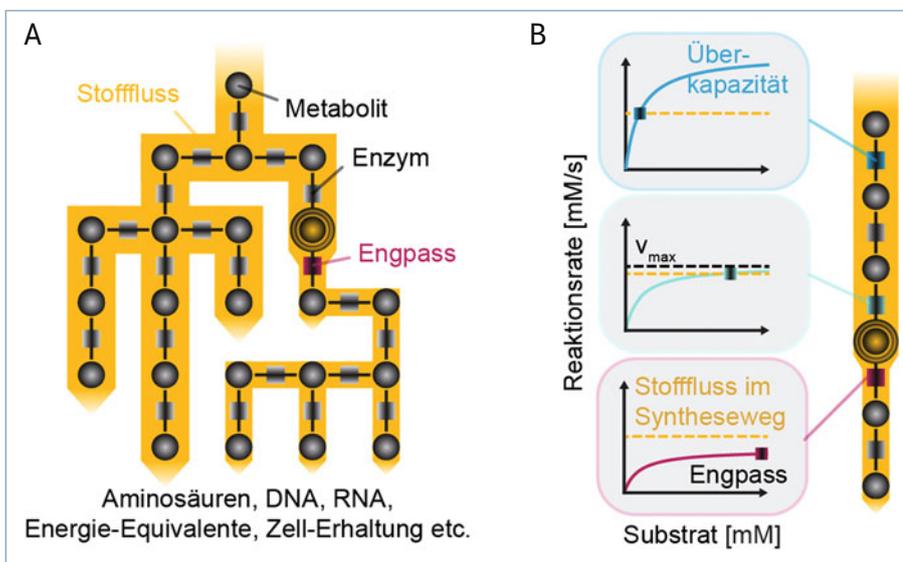
wir kennen. Zum Beispiel sind am metabolischen Netzwerk von *Escherichia coli* 1.192 Metabolite, 1.515 Gene, 1.515 Proteine und

2.719 biochemische Reaktionen beteiligt [1]. Für viele Organismen ist der Aufbau des metabolischen Netzwerks ähnlich gut beschrieben. Allerdings ist unklar, wie metabolische Netzwerke so genau reguliert werden, dass alle Zell- und Energiebausteine kontinuierlich und in der erforderlichen Menge produziert werden. Um diese komplexe Aufgabe zu meistern, haben Zellen Regulationsmechanismen entwickelt, die alle Reaktionen im Netzwerk präzise aufeinander abstimmen. Diese Regulationsmechanismen zu finden und ihre Funktion im Netzwerk zu verstehen, ist ein aktuelles Ziel der Stoffwechselforschung.

Ein umfassendes Verständnis metabolischer Netzwerke und deren Regulation ist besonders für neue biotechnologische Anwendungen wichtig. Die synthetische Biologie entwickelt z. B. bereits sehr effiziente und neuartige Stoffwechselwege und ermöglicht damit komplexe Synthesen von Naturstoffen in Hefen [2] oder CO₂-Fixierung in *E. coli* [3]. Allerdings sind diese synthetischen Stoffwechselwege oft sehr langsam, weil Regulationsmechanismen fehlen, sodass der restliche Stoffwechsel überlastet wird. Doch bevor wir synthetische Regulation entwickeln können, müssen wir das Zusammenspiel aller Reaktionen in natürlichen metabolischen Netzwerken verstehen.

Modelle metabolischer Netzwerke aus Genomen

Die Stöchiometrie metabolischer Netzwerke ist der Ausgangspunkt für fast alle Analysen und Modelle des Stoffwechsels. Dank der biochemischen Erkenntnisse des 20. Jahrhunderts sind die Reaktionen metabolischer Netzwerke und deren Stöchiometrie sehr gut verstanden. Zusammen mit der Sequenzierung ganzer Genome können so großskalige Modelle metabolischer Netzwerke erstellt werden. Solche großen metabolischen Modelle (oder *genome-scale models*) existieren inzwischen für viele Organismen, von Bakterien bis hin zu menschlichen Zellen, und sie verbinden lückenlos alle metabolischen Reaktionen miteinander. Dadurch können



▲ Abb. 1: Fließgleichgewicht in metabolischen Netzwerken. **A**, Metabolische Netzwerke bestehen aus Enzymen (Quadrate) und Metaboliten (Kreise), die durch biochemische Reaktionen miteinander verbunden sind. Das aktuelle Modell des metabolischen Netzwerks von *Escherichia coli* umfasst 1.192 Metabolite, 1.515 Gene, 1.515 Proteine und 2.719 biochemische Reaktionen [1]. **B**, Im Fließgleichgewicht verlaufen alle Reaktionen mit gleicher Rate, die dem Stofffluss durch das Netzwerk (gelb gestrichelt) entspricht. Die Rate einer Reaktion folgt im einfachsten Fall einer Michaelis-Menten-Kinetik und wird durch die Konzentrationen des Substrats und des Enzyms beeinflusst. Die Konzentration des Enzyms entscheidet, ob der Stofffluss in dem Syntheseweg aufrechterhalten werden kann, ob an der Reaktion ein Engpass entsteht oder die Reaktion Überkapazitäten hat. v_{max} gibt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Enzymkonzentration an.

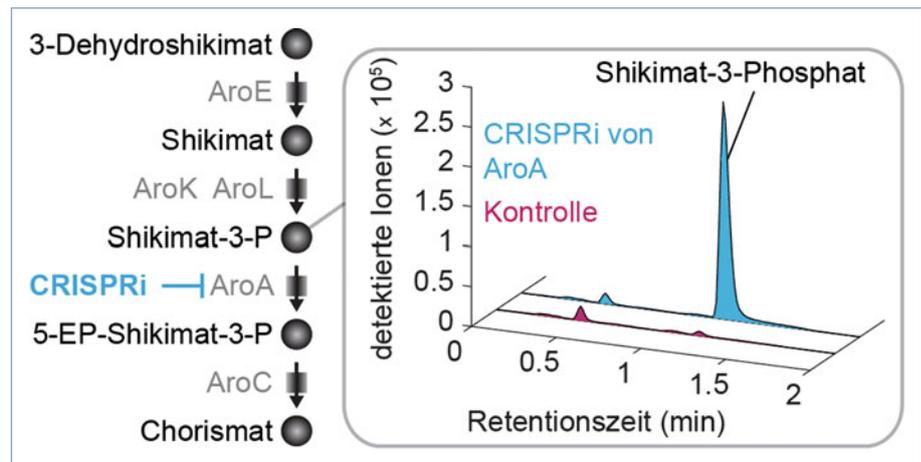
wir geschlossene Massenbilanzen aufstellen und theoretische Stoffflüsse berechnen, beispielsweise für maximales Wachstum oder maximale Produktion eines gewünschten Stoffs [1]. Allerdings sind diese Vorhersagen statisch, und durch die Berechnungen kennen wir zwar die optimalen Stoffflüsse im Netzwerk, leider jedoch nicht, wie diese erreicht und eingestellt werden. Die dazu erforderlichen dynamischen Modelle, die die Regulation und Kinetik aller Enzyme berücksichtigen, können aktuell nur für sehr kleine Netzwerke erstellt werden.

Hunderte Enzyme aufeinander abstimmen

Die Regulation metabolischer Netzwerke stellt sicher, dass die Raten aller Reaktionen genau aufeinander abgestimmt sind. Denn nur, wenn sich alle Reaktionen in einem Fließgleichgewicht befinden, entsteht ein kontinuierlicher Stofffluss durch das Netzwerk, der genau an den Bedarf der Zelle angepasst ist (**Abb. 1A**). Weicht eine Reaktion vom Fließgleichgewicht ab, könnte das zu einem Engpass führen, der schnell das ganze Netzwerk stört. Ein Engpass im Biosyntheseweg einer einzelnen Aminosäure kann z. B. innerhalb kürzester Zeit die gesamte Proteinbiosynthese und damit das Zellwachstum stören. Da Bakterien aber sehr kontinuierlich und konstant wachsen [4], können wir davon ausgehen, dass metabolische Netzwerke sehr gut eingestellt sind und dass die Reaktionsraten aller Enzyme immer wieder in Echtzeit präzise aufeinander abgestimmt werden.

Aber wie gelingt die Abstimmung bei Hunderten von Enzymen? Im einfachsten Fall folgt ein Enzym einer Michaelis-Menten-Kinetik (**Abb. 1B**) und arbeitet mit maximaler Geschwindigkeit (v_{\max}). Dann bestimmt nur die Konzentration des Enzyms die Reaktionsrate. Experimentell lässt sich aber zeigen, dass Enzyme nicht nahe am v_{\max} arbeiten, weil Enzymkonzentrationen relativ stark abfallen können, bevor ein Wachstumsdefekt eintritt [5]. Das deutet darauf hin, dass die meisten Enzyme Überkapazitäten haben, die z. B. durch Änderung der Substratkonzentration sofort abgerufen werden können.

Allerdings ist die Expression von Enzymen auch mit Kosten verbunden, weshalb Enzyme nicht zu weit weg vom v_{\max} arbeiten sollten. Die Konsequenz daraus ist, dass die Expression von Enzymen oft stark reguliert ist. Allosterische Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Metaboliten



▲ **Abb. 2:** Mithilfe von CRISPR-Interferenz (CRISPRi) kann ganz gezielt die Konzentration eines Enzyms und somit auch der Stofffluss gestört werden. Häufig akkumuliert das Substrat einer gestörten Reaktion. Im Biosyntheseweg von aromatischen Aminosäuren konnte z. B. bei der Störung der von AroA-katalysierten Reaktion eine Akkumulation von Shikimat-3-Phosphat gemessen werden [5]. Zum Vergleich wurde in Kontrollproben das CRISPRi-System nicht induziert. Die Messung der Metabolite erfolgte mittels Hochdurchsatz-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie [10].

spielen dabei eine wesentliche Rolle und erlauben komplexe Wechselwirkungen und Rückkopplungen zwischen metabolischen und genetischen Netzwerken. So konnten wir am Beispiel der Aminosäuresynthese von *E. coli* zeigen, dass ein Zusammenspiel mehrerer negativer Rückkopplungen zwischen Aminosäuren und Proteinen die Enzymkonzentrationen so präzise einstellt, dass dies gleichzeitig die Effizienz und die Robustheit der Stoffwechselwege maximiert [6]. Die Konzentrationen von Metaboliten sind also Schlüsselsignale für die Regulation metabolischer Netzwerke.

Metabolite als Informationsträger

Auf das gesamte metabolische Netzwerk bezogen wissen wir nicht, welche Metabolite Schlüsselsignale sind und welche Einfluss auf die Genexpression nehmen. Zurzeit gibt es auch kaum Methoden, um Interaktionen zwischen Metaboliten und der Genexpression systematisch zu finden. Da unser Wissen hauptsächlich auf *in vitro*-Messungen basiert, kennen wir selbst in *E. coli* nur insgesamt 137 Interaktionen zwischen Metaboliten und Transkriptionsfaktoren [7], obwohl tausende solcher Interaktionen möglich wären.

Um Metabolite mit regulatorischer Funktion zu finden, ist es wichtig, intrazelluläre Metabolite mit größtmöglicher Abdeckung und Präzision zu messen. Metabolomik-Methoden, die auf Massenspektrometrie basieren, ermöglichen es heute, hunderte Metabolite in Zellextrakten zu messen, ent-

weder durch ungezielte Analysen [8, 9] oder gezielt [10]. Aber selbst mit modernen Massenspektrometrie-Methoden ist die Anzahl an messbaren Metaboliten bisher limitiert, da die Metabolite einer Zelle chemisch zu divers sind, um sie alle mit einer einzigen chromatographischen Methode aufzutrennen. Eine Lösung dafür könnte die direkte Injektion der Proben in besonders hochauflösende Massenspektrometer sein, ohne eine chromatographische Auftrennung. Ein großer Vorteil dieser Massenspektrometrie-Methoden ist die Geschwindigkeit, mit der Proben prozessiert und gemessen werden können, was es sogar ermöglicht, Metabolite in lebenden Zellen in Echtzeit zu messen [11].

Da wir nun metabolische Netzwerke vermessen können, stellt sich die Frage, welche Experimente geeignet sind, um Regulation nachzuweisen und zu verstehen. Ein klassisches Vorgehen ist, das Netzwerk zu stören und von den gemessenen Veränderungen auf Regulationsmechanismen rückzuschließen. In *stimulus-response*-Experimenten wird ein äußerer Faktor wie die Kohlenstoffquelle verändert, um dann zeitlich aufgelöst Metabolitkonzentrationen zu messen. Mit *stimulus-response*-Experimenten wurden die ersten *in vivo*-Parameter von Enzymen abgeschätzt [12], und vor kurzem konnten wir damit neue Metabolit-Transkriptionsfaktor-Interaktionen identifizieren [7].

Man kann das metabolische Netzwerk aber auch gezielter stören. Beispielsweise wurde

in 4.913 Hefestämmen jeweils ein Gen aus dem Genom entfernt und die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen gemessen. Die Aminosäuren zeigten Signaturen, die so spezifisch waren, dass sie Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Gene zuließen [13]. Zum Beispiel hatten Gene mit ähnlicher Funktion auch ähnliche Aminosäuresignaturen. Solche Experimente lassen erahnen, wieviel Information die Konzentration der Metabolite des gesamten Netzwerks enthalten. Um diese Informationen zu entschlüsseln, sind allerdings sehr große Datensätze notwendig, die möglichst alle Metabolite und tausende Störungen des metabolischen Netzwerks umfassen.

Solche Störungen können mit CRISPR-basierten Methoden präzise und mit massivem Durchsatz erzeugt werden, da Millionen von mit CRISPR modifizierten Stämmen gebündelt in einem Reaktionsgefäß kloniert werden können. Mit CRISPR-Interferenz (CRISPRi) konnten wir die Expression jedes Gens im metabolischen Netzwerk von *E. coli* stören, was sehr spezifische und lokale Veränderungen von Metaboliten erzeugte [5]. Die stärksten Änderungen zeigten Metabolite, die einen direkten Einfluss auf die Aktivität des gestörten Enzyms haben, z. B. Substrate (**Abb. 2**), aber auch allosterische Effektoren. Mit CRISPR-Methoden können auch Punktmutationen präzise erzeugt werden, um allosterische Rückkopplungen zu entfernen und deren regulatorische Rolle zu untersuchen [6].

Design neuer Stoffwechsel-Netzwerke

Nachdem in der Vergangenheit ein Fokus auf der Kartierung von Genen, biochemischen Reaktionen und Transkriptionsfaktoren lag, geht es heute darum, neue metabolische Netzwerke zu designen. Die Erkenntnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass metabolische Netzwerke durch Regulation sowohl effizienter als auch robuster gegenüber Störungen werden. Metabolitkonzentrationen

nehmen dabei als Signale eine zentrale Rolle ein. Um in Zukunft neue und bessere metabolische Netzwerke für medizinische und biotechnologische Anwendungen zu entwerfen, gilt es daher zu verstehen, welche Metabolite regulatorische Aufgaben haben und wie wir diese Regulation nutzen und gezielt verändern können. ■

Literatur

- [1] Monk JM, Lloyd CJ, Brunk E et al. (2017) iML1515, a knowledgebase that computes *Escherichia coli* traits. *Nat Biotechnol* 35: 904–908
- [2] Galanie S, Thodey K, Trenchard JJ et al. (2015) Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science* 349: 1095–1100
- [3] Gleizer S, Ben-Nissan R, Bar-On YM et al. (2019) Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂. *Cell* 179: 1255–1263
- [4] Wang P, Robert L, Pelletier J et al. (2010) Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr Biol* 20: 1099–1103
- [5] Donati S, Kuntz M, Pahl V et al. (2020) Multi-omics analysis of CRISPRi-knockdowns identifies mechanisms that buffer decreases of enzymes in *E. coli* metabolism. *Cell Syst* 12: 56–67
- [6] Sander T, Farke N, Diehl C et al. (2019) Allosteric feedback inhibition enables robust amino acid biosynthesis in *E. coli* by enforcing enzyme overabundance. *Cell Syst* 8: 66–75
- [7] Lempp M, Farke N, Kuntz M et al. (2019) Systematic identification of metabolites controlling gene expression in *E. coli*. *Nat Commun* 10: 4463
- [8] Fuhrer T, Heer D, Begemann B, Zamboni N (2011) High-throughput, accurate mass metabolome profiling of cellular extracts by flow injection-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 83: 7074–7080
- [9] Lu W, Xing X, Wang L et al. (2020) Improved annotation of untargeted metabolomics data through buffer modifica-

tions that shift adduct mass and intensity. *Anal Chem* 92: 11573–11581

[10] Guder JC, Schramm T, Sander T, Link H (2017) Time-optimized isotope ratio LC-MS/MS for high-throughput quantification of primary metabolites. *Anal Chem* 89: 1624–1631

[11] Link H, Fuhrer T, Gerosa L et al. (2015) Real-time metabolome profiling of the metabolic switch between starvation and growth. *Nat Methods* 12: 1091–1097

[12] Wu L, Mashego MR, Proell AM et al. (2006) In vivo kinetics of primary metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* studied through prolonged chemostat cultivation. *Metab Eng* 8: 160–171

[13] Müllerer M, Calvani E, Alam MT et al. (2016) Functional metabolomics describes the yeast biosynthetic regulome. *Cell* 167: 553–565

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Hannes Link
 Bacterial Metabolomics
 Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und
 Infektionsmedizin Tübingen (IMIT)
 Universität Tübingen
 Auf der Morgenstelle 24
 D-72076 Tübingen
hannes.link@cmfi.uni-tuebingen.de
www.linkmetabolism.com

AUTOREN



Thorben Schramm

2011–2017 Bachelor- und Masterstudium Bioverfahrenstechnik an der TU Hamburg. 2016 Auslandssemester an der King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand. 2017–2020 Doktorand am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg, seit 2020 an der Universität Tübingen bei Prof. Dr. H. Link.



Hannes Link

2000–2005 Diplomstudium Chemie-Ingenieurwesen an der TU München. 2005–2010 Doktorand an der TU München bei Prof. Dr. D. Weuster-Botz. 2010–2015 Postdoc an der ETH Zürich, Schweiz, bei Prof. Dr. U. Sauer. 2015–2020 Arbeitsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. Seit 2020 (W3-)Professor an der Universität Tübingen.