

**Mikrobielle Biofabriken: PolyMore – Ein *Paenibacillus Polymyxa*
Chassis für die chemische Produktion und neue Sporenprozesse,
Förderkennzeichen 031B0855A**

GEFÖRDERT VOM



**Bundesministerium
für Bildung
und Forschung**

***Verfasst von Prof. Dr.-Ing. Jochen Schmid, Universität Münster, Institut für Molekulare
Mikrobiologie und Biotechnologie, Corrensstrasse 3, 48149 Münster***

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis - 031B0855A

Teil 1 Kurzbericht; „Mikrobielle Biofabriken: PolyMore – Ein *Paenibacillus Polymyxa* Chassis für die chemische Produktion und neue Sporenprozesse“

Eine Vielzahl der heutzutage bestehenden biotechnologischen Prozesse basiert auf der Verwendung einiger wenigen Modellorganismen wie *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum*. Basierend auf ihren metabolischen Fähigkeiten sind diese aber auf nur für bestimmte Prozesse optimiert. Daher besteht ein grundlegender Bedarf an weiteren mikrobiellen Biofabriken aus dem Bereich der Nicht-Modellorganismen um das Spektrum an zukünftigen biotechnologischen Prozessen zu erweitern (Blombach et al., 2015). Ein vielversprechender Ansatz ist die Genomreduzierung der Wildtyporganismen um höhere Effizienzen in der Produktion von Zielmolekülen zu erhalten (Giulia Ravagnan & Jochen Schmid, 2024). Genau dieser Fragestellung widmete sich das Projekt PolyMore, um den von Natur aus metabolisch äußerst vielfältigen Mikroorganismus *Paenibacillus polymyxa* zu einem industriell nutzbaren, robusten Chassis Organismus zu entwickeln. Zudem ist *P. polymyxa* ein Endosporen bildender Gram-positiver Mikroorganismus, wodurch sich auch neue Prozessvarianten ergeben können, indem zum Beispiel ein Sporendisplay durchgeführt wird, welches den Einsatz der Sporen mit katalytischer (enzymatischer) Aktivität erlaubt.

In einem ersten Schritt wurde das vollständige Genom von *P. polymyxa* DSM 365 sequenziert, um die bestehenden Lücken der bis dahin vorhandenen Genomsequenz zu schließen, und somit eine optimale Grundlage für das Stammengineering zu haben. Dabei konnte das Genom erstmals komplett geschlossen werden und es zeigte sich, dass mehr als 100 kb an neuer genomischer Information gefunden wurde, als bisher bekannt. Diese Region enthielt auch zusätzliche Informationen zu potentiellen neuen Sekundärmetaboliten (Ravagnan, Lesemann, et al., 2024).

Für die Weiterentwicklung zu einem robusten Chassis Organismus wurde eine detaillierte Genomannotation vorgenommen, um Transposasen zu identifizieren, welche die genetische Stabilität während fermentativer Produktionsprozesse beeinflussen kann. Zudem wurden auch Gene und große Gencluster identifiziert welche für nicht essentielle Gene, und hauptsächlich für Sekundärmetaboliten kodieren, und somit zum Zweck einer Genomreduzierung deletiert werden können. Nach Auswahl dieser „nichtessentiellen Gene“ wurden zwei genomreduzierte Stammvarianten (GR1 und GR2) generiert. Zu diesem Zweck wurden die bestehenden molekularbiologischen Werkzeuge für *P. polymyxa* (CRISPR-Cas9 System) weiterentwickelt. Hier konnte final eine gleichzeitige Deletion/Insertion von Genen, und ganzen Genomregionen (Multiplexing) erreicht werden, was auch zur Erzeugung der Stammvarianten herangezogen wurde (Meliawati et al., 2022; Ravagnan, Meliawati, et al., 2024). Zusätzlich wurden Arbeiten zu Promotorstärken und Expressionsplasmiden durchgeführt.

In Stammvariante GR1, wurden möglichst viele Transposasen entfernt, um eine höhere genetische Stabilität zu erhalten. In der Stammvariante GR2 wurde sukzessive eine möglichst hohe Anzahl an nicht essentiellen Genen und Genregionen deletiert, um optimierte metabolische Flüsse für die Zielprodukte zu erreichen. Um negative Effekte auf das Wachstum auszuschließen, wurden alle Stammvarianten mit den Einzeldelationen vergleichend auf Wachstum und Wachstumsgeschwindigkeit hin untersucht. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Jülich (AG Noack). Final wurden alle Deletionen, welche keinen negativen Einfluss zeigten in der Stammvariante GR2 zusammengeführt (Ravagnan, Lesemann, et al., 2024). Somit stehen nun zwei Stammvarianten als mikrobielle Biofabriken zur Verfügung, welche für die Produktion von Zielprodukten eingesetzt werden können. Die Zusammenführung von GR1 und GR2 soll in weiterführenden Arbeiten durchgeführt werden.

Für die optimierte Produktbildung wurden zwei Zielmoleküle ausgewählt, das native vom Wildtyp gebildete 2,3-Butandiol, welches in der Variante GR2 produziert wurde (Ravagnan, Lesemann, et al., 2024), und das nichtnatürliche Isobutanol, welches mittels eines synthetischen Stoffwechselweges in eine Stammvariante von *P. polymyxa* eingebracht wurde (Meliawati et al., 2024). Dabei konnte für das 2,3-Butandiol eine leicht gesteigerte Produktion in Variante GR2 gezeigt werden, sowie die erstmalige Isobutanolproduktion in *P. polymyxa*. Zusätzliche Proteomanalysen in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Dänemark (AG Nickel) erlaubten die Identifizierung von Flaschenhälsen in der Isobutanol Biosynthese, welche nun als Ziele für weitere Arbeiten vorliegen. In enger Zusammenarbeit mit dem Projektpartner, der AG Tobias Erb am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie wurden mehrere Stammvarianten (knock-out Varianten), im Umfeld des 2,3-Butandiolstoffwechsel erstellt. Basierend auf den Genomdaten in Verbindung mit Proteom- und Metabolom-Daten soll hier erstmals ein genomskaliges metabolische Modell von *P. polymyxa* erstellt werden. Die Erstellung dieses Modelles befindet sich momentan noch in der Umsetzung.

Für die Etablierung neuer Sporenprozesse wurde erstmals das Sporendisplay für *P. polymyxa* gezeigt. Hierzu wurden unterschiedliche Peptidlinker von Sporengenen untersucht und erfolgreich zum Display von Enzymen genutzt. Dies konnte anhand der Expression des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) und einer Lipase gezeigt werden (Maximilian Zander et al., 2023). Hierbei zeigte sich auch eine wiederholte Nutzbarkeit und Aktivität bei den verwendeten Sporen über mehrere Zyklen, was die Möglichkeit für neuartige Sporenprozesse eröffnet.

Referenzen:

- Blombach, B., Castiglione, K., Haarmann, T., & Schmid, J. (2015). Trends in genome editing for industrial biotechnology. *BioSpektrum*, 21(7), 788–790. <https://doi.org/10.1007/s12268-015-0645-0>
- Giulia Ravagnan, & Jochen Schmid. (2024). Promising non-model microbial cell factories obtained by genome reduction. *Front. Bioeng. Biotechnol.*
- Maximilian Zander, Jochen Schmid, & Johannes Kabisch. (2023). Implementation of a Lipase A spore display in *Paenibacillus polymyxa*. *Research Square Preprint*.
- Meliawati, M., Teckentrup, C., & Schmid, J. (2022). CRISPR-Cas9-mediated Large Cluster Deletion and Multiplex Genome Editing in *Paenibacillus polymyxa*. *ACS Synthetic Biology*, 11(1), 77–84. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00565>
- Meliawati, M., Volke, D. C., Nickel, P. I., & Schmid, J. (2024). Engineering the carbon and redox metabolism of *Paenibacillus polymyxa* for efficient isobutanol production. *Microbial Biotechnology*, 17(3), e14438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.14438>
- Ravagnan, G., Lesemann, J., Müller, M.-F., Poehlein, A., Daniel, R., Noack, S., Kabisch, J., & Schmid, J. (2024). Genome reduction in *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 for chassis development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12. 10.3389/fbioe.2024.1378873
- Ravagnan, G., Meliawati, M., & Schmid, J. (2024). *CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in Paenibacillus polymyxa BT - Synthetic Biology: Methods and Protocols* (J. C. Braman, Ed.; pp. 267–280). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3658-9_16

**Mikrobielle Biofabriken: PolyMore – Ein *Paenibacillus Polymyxa*
Chassis für die chemische Produktion und neue Sporenprozesse,
Förderkennzeichen 031B0855A**

GEFÖRDERT VOM



**Bundesministerium
für Bildung
und Forschung**

***Verfasst von Prof. Dr.-Ing. Jochen Schmid, Universität Münster, Institut für Molekulare
Mikrobiologie und Biotechnologie, Corrensstrasse 3, 48149 Münster***

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis - 031B0855A

Teil 2 Eingehende Darstellung; „Mikrobielle Biofabriken: PolyMore – Ein *Paenibacillus Polymyxa* Chassis für die chemische Produktion und neue Sporenprozesse“

Die Arbeiten im Projekt PoyMore zielen darauf ab, einen industriell relevanten Produktionsorganismus auf der Basis von *Paenibacillus polymyxa* zu erstellen. Im Vergleich zu vielen etablierten Modellorganismen besitzt das Endosporen bildende Gram-positive Bakterium *P. polymyxa* einen vielfältigen Metabolismus mit dem Potential zur Produktion vieler wertvoller Grundchemikalien und Antibiotika. Basierend auf bereits bestehenden, und im Projekt weiterzuentwickelnden, molekularbiologischen Werkzeugen soll ein Chassisorganismus kreiert werden, und die native Sporenbildung biotechnologisch für das Design von sporenbasierten Prozessvarianten weiterentwickelt werden. In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut Marburg soll ein genomskaliges metabolische Modell entwickelt werden, um gezielt Produktivität und Produkttiter für unterschiedliche Zielmoleküle zu erhöhen. Hierfür wurde in einem ersten Schritt das Genom Sequenziert, um eine lückenlose Genomsequenz für die unterschiedlichen Arbeitspakete zu haben.

Für die Genomsequenzierung wurde eine Nanopore Sequenzierung in Kombination mit einer Illumina Sequenzierung (Illumina MySeq Kit v.3) an der Universität Göttingen durchgeführt. Um eine lückenlose Genomsequenz zu erhalten wurden fehlende Bereiche durch manuelle Kuration identifiziert und mittels PCR Analyse geschlossen. Somit konnte erstmals ein komplett geschlossenes Genom für den Stamm *P. polymyxa* DSM 365 erreicht werden. Diese Daten wurden unter der *Accession number* CP141264 öffentlich zugänglich hinterlegt und in der Publikation Ravagnan et al. veröffentlicht (Ravagnan, Lesemann, et al., 2024).

Tabelle 1. Vergleich der genomischen Charakteristika des *P. polymyxa* DSM 365 Genoms aus dieser Studie zu den Genomdaten welche im Jahr 2022 von Kumar et al. (Kumar & Ujor, 2022) publiziert wurde. Hier zeigt sich, dass ca. 100 000 weitere Basenpaare identifiziert wurden, und die Zahl an tRNAs und rRNAs korrigiert werden konnte (Giulia Ravagnan et al., 2024).

Features	Chromosome	
	<i>P. polymyxa</i> DSM 365 Closed genome this study	<i>P. polymyxa</i> DSM 365 Genome published by Kumar et al
Genome size (bp)	5,889,536	5,788,318
Number of contigs	1	47
G + C content (%)	45.6	45.5
tRNAs	106	104
rRNAs	42	49
ncRNA	3	3
Accession number	CP141264	JAKVDC010000000

Um die bereits bestehenden CRISPR-Cas basierten molekularbiologischen Werkzeuge für *P. polymyxa* (Rütering et al., 2017; Schilling, Koffas, et al., 2020) hinsichtlich der Anvisierung multipler Ziele (Gene und Genom Abschnitte) im Sinne eines *Multiplexings* weiterzuentwickeln wurden unterschiedliche Ansätze durchgeführt. Zuerst wurde versucht das bestehende CRISPRi/a System (AsCas12a) in ein aktiv schneidendes CRISPR Cas12a umzuwandeln und damit mehrere Gene gleichzeitig im Genom von *P. polymyxa* anzuvisieren. Hierfür wurde die notwendige Punktmutation in der katalytisch inaktiven Variante (D908A) rückgängig gemacht. Es zeigte sich allerdings, dass mit diesem System kein Doppelstrangbruch im Genom von *P. polymyxa* erreicht werden konnte. Aus diesem Grund, und der Notwendigkeit für eine zeitgleiche Manipulation mehrerer Ziele im Genom von *P. polymyxa* wurde

das bestehende Cas9 System weiterentwickelt. Im Sinne einer Genomreduktion sollte auch die effiziente Deletion von größeren Genomabschnitten erreicht werden. Um die Konstruktion der Deletionskonstrukte zu vereinfachen wurden größere Genomabschnitte (Gencluster) systematisch mit nur einer sgRNA anvisiert. Dabei wurden die Zielsequenzen der sgRNAs über unterschiedliche Bereiche (5` zum 3`Ende) in den Genclustern verteilt (Abbildung 1).

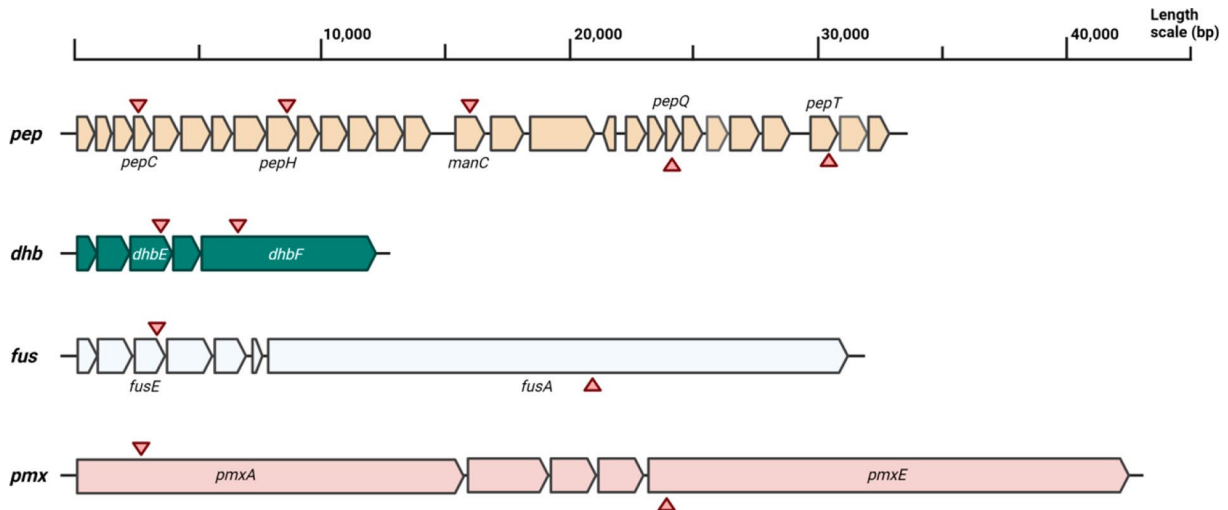


Abbildung 1. Übersicht über die anvisierten Gencluster im Genom von *P. polymyxa* DSM 365. Die dabei kodierten Sekundärmetabolite sind: Paenan (*pep*), Bacillibactin (*dhb*), Fusaricidin (*fus*), und Polymyxin (*pmx*). Die für den aktiv eingeführten Doppelstrangbruch ausgewählten Positionen sind durch Dreiecke markiert (Meliawati et al., 2022).

Hierbei zeigte sich, dass vor allem der Bereich zum 3`-Ende den Genomabschnitts eine sehr hohe Effizienz für die Deletion (*Editing Efficiency*) aufwies (Meliawati et al., 2022). Diese Tendenz konnte in allen untersuchten Genclustern nachgewiesen werden, vor allem wenn die Genomabschnitte deutlich über einer Größe von 10 Kb lagen. Für den relativ kleinen, für Bacillibactin kodierenden Gencluster (*dhb*) mit einer Größe von ca. 12 kb, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abbildung 2).

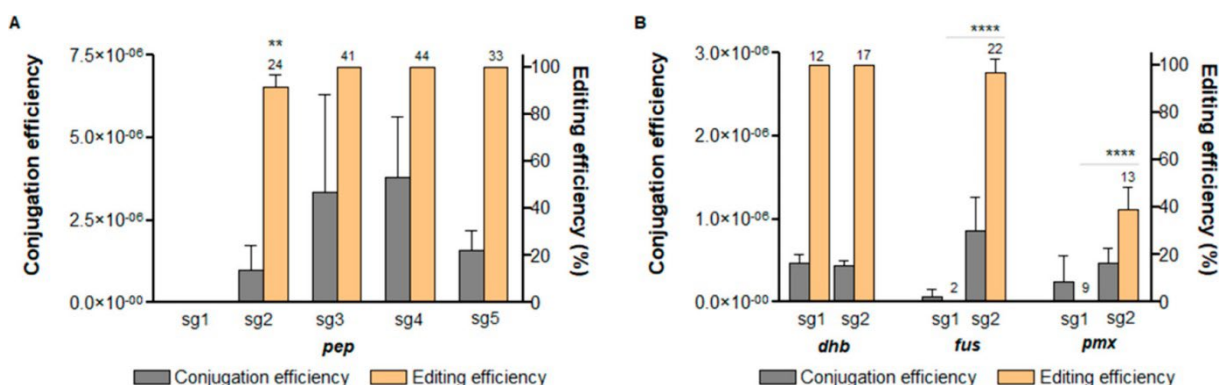


Abbildung 2. Anvisierte Deletionen unterschiedlicher Biosynthesecluster von *P. polymyxa*. Für den *pep* cluster wurden 5 unterschiedliche Zielsequenzen getestet (A) und jeweils zwei für *dhb*, *fus*, und den *pmx* Cluster (B). Dabei wurden die Konjugations-Effizienz (grau) und die Editions-Effizienz (orange) bestimmt und sind auf der Y-Achse angegeben. Die Zahlen über dem Balken der Editions-Effizienz geben die Anzahl an untersuchten Exkonjuganten an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Bei der Bestimmung der signifikanten Unterschiede zwischen den Editier-Effizienzen der verschiedenen Zielorte innerhalb desselben Clusters wurde ein P-Wert < 0,05 berücksichtigt (** p < 0,01; **** p < 0,0001). Signifikante Unterschiede wurden für *pep*-sg2 im Vergleich zu *pep*-sg3, *pep*-sg4, *pep*-sg5; *fus*-sg1 im Vergleich zu *fus*-sg2; und *pmx*-sg1 im Vergleich zu *pmx*-sg2 festgestellt (Meliawati et al., 2022).

Des Weiteren wurde die Möglichkeiten zur gleichzeitigen Gendeletion, Insertion und Deletion größerer Genomabschnitte untersucht. Basierend auf den vorausgegangenen Ergebnissen zur Deletion von größeren Genomabschnitte mit nur einer sgRNA, konnte hierbei der Klonierungsaufwand verringert werden. Als Zielgene für das Multiplexing wurden hier die Gene kodierend für *PepC*, eine sogenannte initiale Glycosyltransferase aus dem Paenan Cluster, und das für *SacB* (Levansucrase) kodierende Gen ausgewählt. Bei Inaktivierung der Gene verschwindet der Phänotyp zur Polysaccharidproduktion auf Glukose (Paenan) oder Saccharose (Levan) (Rütering et al., 2016). Für die Multiple integration wurden die gleichen Loci anvisiert und die entsprechenden Gene durch *mRFP* oder *sfGFP* ersetzt. Somit wurden multiple Geninsertionen oder auch Genaustausche durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass *mRFP* nicht die gewünschte Fluoreszenzbildung zeigte, was ein wenig im Gegensatz zu früheren Ergebnissen steht (C Schilling et al., 2020). ES zeigte sich, dass für die gleichzeitige Deletion (und auch Integration) eine Effizienz zwischen 58 (Integration) und 81 % (Deletion) erreicht werden konnte (Abbildung 3). Die zeigt das Potential für diesen Ansatz und bietet eine hervorragende Ausgangssituation für eine schnelle und effiziente Genomreduktion von *P. polymyxa*. Für die gleichzeitige multiple Deletion größerer Genabschnitte wurden die beiden Gencluster *pep* und *dhb* ausgewählt. Hierbei zeigte sich dass die Effizienz zur gleichzeitigen Deletion dieser beiden Genabschnitte bei 85 % lag, da es nur vereinzelt (5 %) zu der Deletion nur eines einzelnen Genabschnittes kam, oder in 10 % gar keine Deletion erzielt wurde (Abbildung 4).

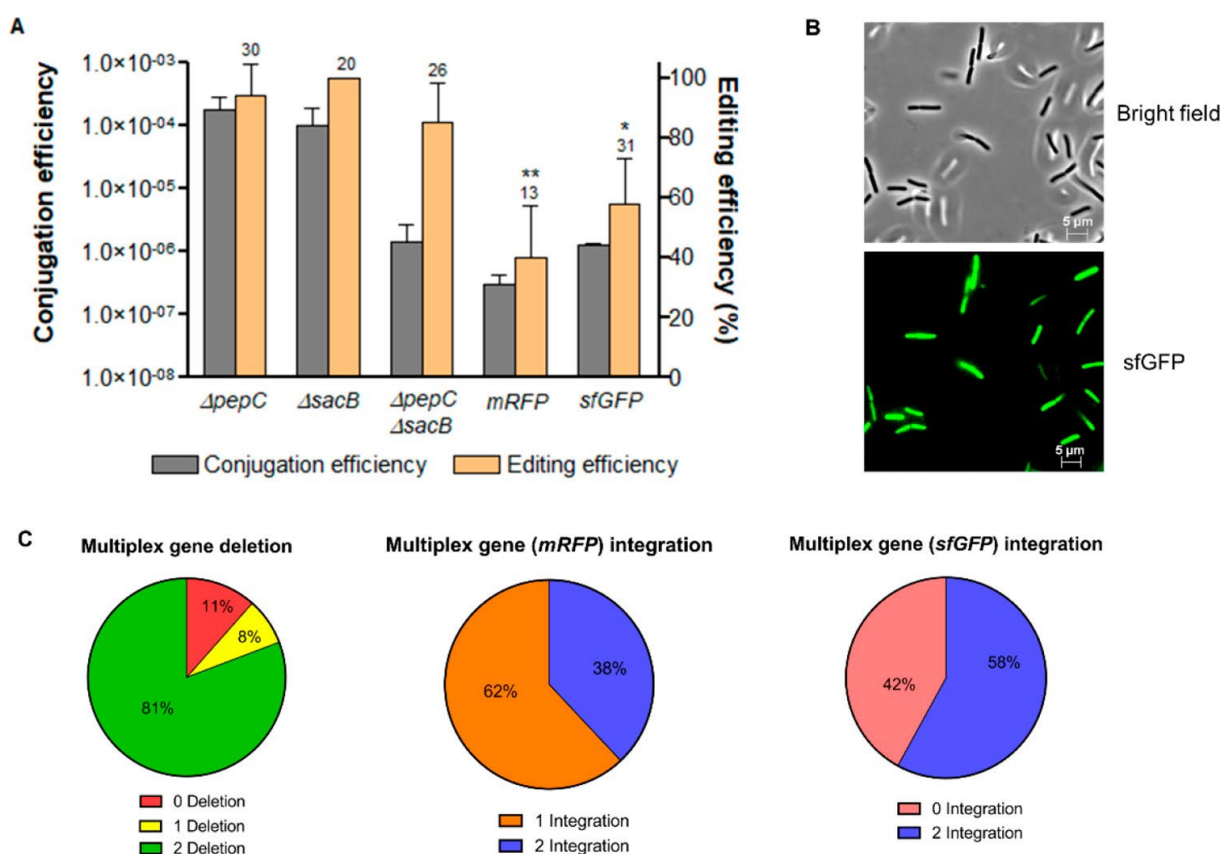


Abbildung 3: CRISPR-Cas9-basierte Multiplex-Genom-Editierung für die *pepC*- und *sacB*-Gene. (A) Konjugations- und Editiereffizienzen der Einzelgen-Deletionen, Multiplex-Deletionen und Multiplex-Integrationen mit *mRFP* oder *sfGFP* als Marker. Die Konjugationseffizienz (grau) und die Editiereffizienz (orange) sind auf den Y-Achsen angegeben. Die Zahlen oberhalb des Balkens für die Editiereffizienz geben die Gesamtzahl der untersuchten Exkonjuganten an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Bei der Bestimmung der signifikanten

Unterschiede zwischen den Editiereffizienzen wurde ein P-Wert < 0,05 berücksichtigt (* p < 0,05; ** p < 0,01). Signifikante Unterschiede wurden für Multiplex-*mRFP*-Integrationen im Vergleich zu den Einzelgen-Deletionen sowie für Multiplex-Deletionen und für Multiplex-*sfGFP*-Integrationen im Vergleich zu den Einzelgen-Deletionen erzielt. (B) Mikroskopische Aufnahmen von *P. polymyxa*-Mutanten mit *sfGFP* als Ersatz für die Gene *pepC* und *sacB*. (oben) Hellfeldbild; (unten) GFP-Kanal. (C) Der Anteil der Wildtyp- und Mutanten aus dem Screening-Verfahren ist als Tortendiagramm dargestellt (Meliawati et al., 2022).

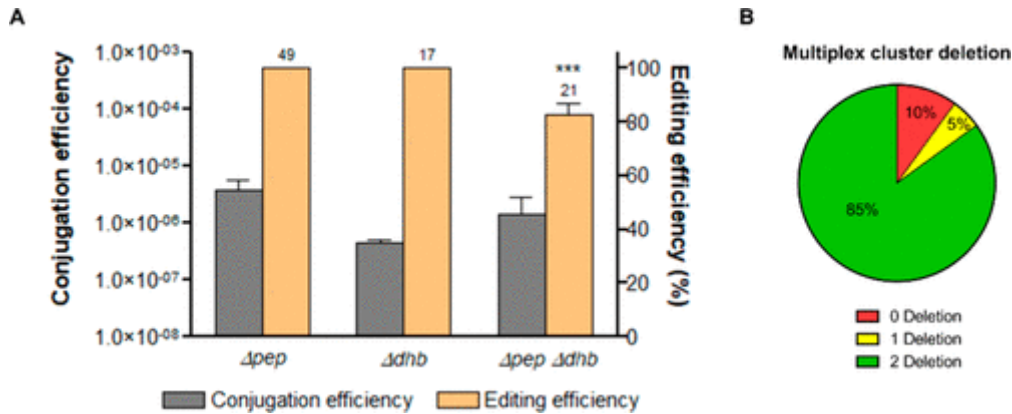


Abbildung 4: CRISPR-Cas9-basierte Multiplex-Genom-Editierung für den *pep*- und *dhb*-Cluster. (A) Konjugations- und Editiereffizienzen der Einzel- und Multiplex-Cluster-Deletionen. Die Konjugationseffizienz (grau) und die Editiereffizienz (orange) sind auf den Y-Achsen angegeben. Die Zahlen oberhalb des Balkens für die Editiereffizienz geben die Gesamtzahl der untersuchten Exkonjuganten an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Bei der Bestimmung der signifikanten Unterschiede zwischen den Editiereffizienzen wurde ein P-Wert < 0,05 berücksichtigt (***) p < 0,001). (B) Der Anteil der Wildtyp- und Mutanten, die aus dem Screening-Prozess hervorgegangen sind, wird ebenfalls in einem Tortendiagramm dargestellt (Meliawati et al., 2022).

Diese Arbeiten haben die Möglichkeiten zur molekularbiologischen Bearbeitung von *P. polymyxa* massiv vorangetrieben, und wurden in der Publikation Meliawati et al. (Meliawati et al., 2022) veröffentlicht. Dies war eine wichtige Grundlage um die Bearbeitung eines Chassisorganismus, besonders hinsichtlich einer Genomreduktion durchzuführen. Zu diesem Zwecke wurden diese Werkzeuge auch in den folgenden Arbeiten eingesetzt, um schnell zu einer Vielzahl an Deletionsmutanten und vor allem der Zusammenführung von Einzelmutationen beizutragen. Für das Design eines Genomreduzierten *P. polymyxa*, wurden zwei Strategien ausgewählt.

- 1) Eine Variante ohne Transposasen, um eine genetisch stabile Variante zu erhalten
- 2) Eine Variante mit starker Reduktion von nicht essentiellen Genomabschnitten, welche hauptsächlich für Sekundärmetabolite kodieren, welche auch im Sinne einer erleichterten Produktabtrennung störend sein können (Giulia Ravagnan & Jochen Schmid, 2024).

Anhand der kompletten Genomsequenz und der durchgeführten Annotation wurden für die erste Variante (RG1) mittels dem onlinetool antiSMASH (Blin et al., 2021) Gencluster identifiziert welche mit hoher Wahrscheinlichkeit für nicht essentielle Sekundärmetabolite kodieren. Variante GR1 soll somit eine Genomreduzierte Variante für die weitere Chassisentwicklung darstellen. Die identifizierten Gencluster, inklusive der damit, kumulativ zu erreichenden Genomreduktion sind im Detail in Tabelle 2 dargestellt. Die Variante GR2 beinhaltet die Deletion einer Großzahl der identifizierten Transposasen, Prophagen und genomische Inseln, ohne essentielle Bedeutung für Wachstum. GR2 stellt damit eine Variante mit erhöhter genomischer Stabilität dar, welche die Neigung zu Spontanmutationen während eines Fermentationsprozesses massiv herabsetzt. Dies ist

eine essentielle Bedingung für industriell eingesetzte Produktionsstämme. Die während der Arbeiten identifizierten und deletierten Transposasen und genomischen Inseln sind ebenfalls im Detail in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Detaillierte Informationen zu den deletierten genomischen Regionen der konstruierten genomreduzierten Mutantenstämme von *P. polymyxa* über die beiden parallel durchgeführten Ansätze (Giulia Ravagnan et al., 2024).

Mutants	Deletion region	Genome size (bp)	Cumulative deletion size (bp)
<i>P. polymyxa</i> wt	-	5,889,536	-
Genome-reduced strain variant 1 (GR1)	Sequential deletions of BGCs		
	Δpep	5,856,690 (99.44%)	32,846
	$\Delta sacB$	5,855,095 (99.42%)	34,441
	$\Delta paen$	5,843,195 (99.22%)	46,341
	Δpni	5,830,722 (99.01%)	58,814
	$\Delta upks2$	5,790,497 (98.32%)	99,039
	$\Delta upks3$	5,765,952 (97.90%)	123,584
	Δfus	5,734,877 (97.37%)	154,619
	Δphl	5,717,489 (97.08%)	172,007
	Δpae	5,711,035 (96.99%)	178,461
Genome-reduced strain variant 2 (GR2)	Sequential deletions of GIs and IS		
	$\Delta GI1$	5,870,461 (99.67%)	19,075
	$\Delta GI2$	5,857,445 (99.46%)	32,091
	$\Delta ISPap1-3$	5,855,857 (99.42%)	33,679
	$\Delta ISPap1-1$	5,854,279 (99.40%)	35,257
	$\Delta ISPap1-5$	5,852,682 (99.37%)	36,854
	$\Delta ISPap1-6$	5,851,005 (99.36%)	38,531

Somit liefern die beiden Varianten eine um ca. 178 000 Basenpaare reduzierte Stammvariante (GR1) und die um die genomische Stabilität verbesserte Variante GR2 mit einer Reduktion um ca. 38 000 Basenpaaren. Die beiden Varianten mit den anvisierten deletierten Bereichen sind auch in Abbildung 5 detailliert dargestellt. Für zukünftige Arbeiten können diese beide Varianten zusammengeführt werden, um beide positive Effekte zu vereinen, was in einer Gesamtreduktion von ca. 3,6 % der genomischen Information von *P. polymyxa* resultiert.

Für die Variante GR1 wurden die Deletionen einzeln durchgeführt, und für jede Variante wurde in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Jülich (AG Noack) eine Untersuchung auf das Wachstumsverhalten durchgeführt, um eventuell das Wachstum negativ beeinflussende Deletionsvarianten auszuschließen (Giulia Ravagnan et al., 2024). Hierbei zeigte sich, dass aufgrund der vorgeleisteten Evaluierung von essentiellen Genen, fast alle ausgewählten Deletionen in keiner Verringerung der Wachstumsraten resultierte. Einzig zwei Varianten zeigten eine signifikante Reduktion der spezifischen Wachstumsrate (Abbildung 6). Hierbei handelt es sich um Deletionen in den für Polymyxin (S45115) und Tridecaptin (S45195) Cluster kodierenden Sequenzen. Alle andere varianten zeigten eine gleiche, oder gar leicht erhöhte Wachstumsrate, was den positiven Effekt der Genomreduktion hervorhebt. Die beiden Varianten (S45115 und S45195) wurden für die kombinatorische Vereinigung der Deletionen ausgeschlossen, und nicht weiter Berücksichtigt.

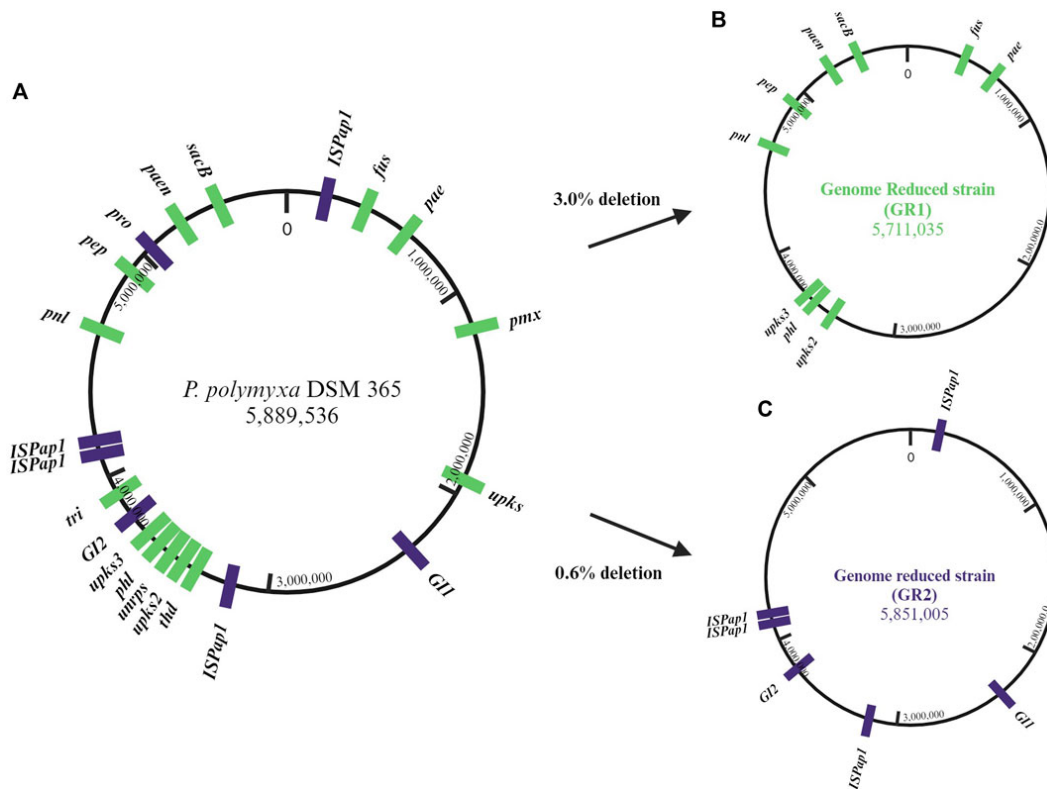


Abbildung 5: (A) Zirkuläre Genomkarte von *P. polymyxa* DSM 365, gezielte Deletionsregionen von Sekundärmetaboliten wurden in grün und gezielte Deletionen von genomischen Inseln (GI), Prophagen und Insertionssequenzen (IS) wurden in violett auf den physischen Lokalisationen des Chromosoms markiert. (B) Der genomreduzierte Stamm GR1 zeigt die sequentielle Deletion mehrerer biosynthetischer Gencluster (BGC). (C) Der genomreduzierte Stamm GR2 zeigt die sequentiellen Zieldelationen von zwei GIs und vier Kopien von ISPap1 (Giulia Ravagnan et al., 2024).

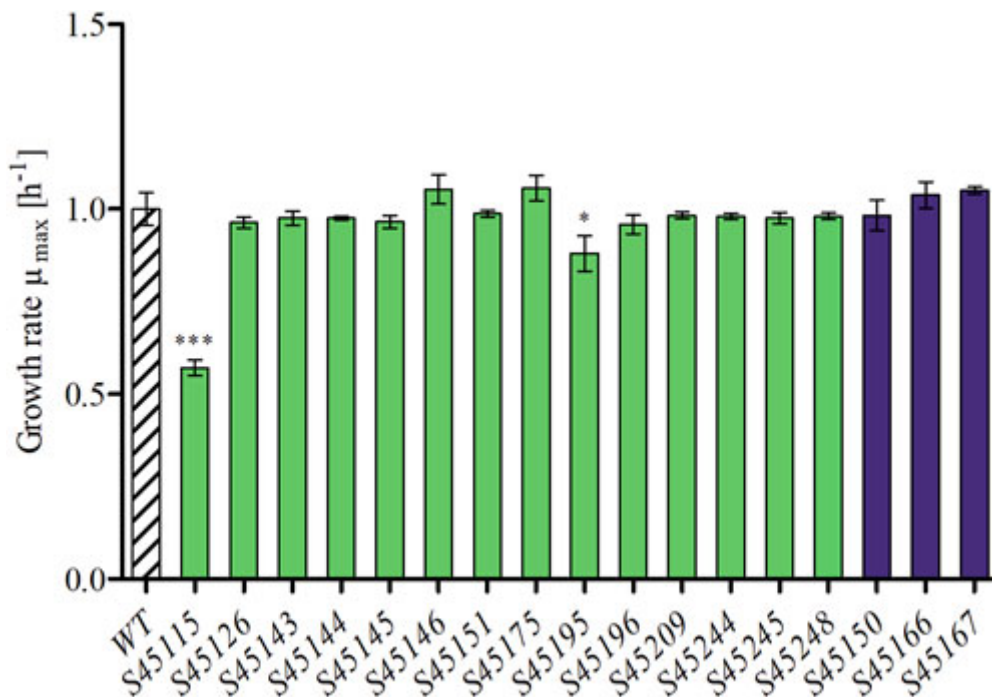


Abbildung 6: Maximale Wachstumsraten (μ_{max}) einzelner Mutanten von *P. polymyxa* in CASO-Bouillonmedium ($n \geq 4$). Stämme mit signifikanten Veränderungen der maximalen Wachstumsrate im Vergleich zur Referenz

(WT) wurden mittels t-Test mit zwei Stichproben ermittelt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) und sind durch Sternchen gekennzeichnet (Giulia Ravagnan et al., 2024).

Bei der Erstellung der Variante GR2, zeigten sich Probleme in der parallelen Anvisierung der Transposase Gene. Dies lag einerseits an der Schwierigkeit die Transposasen aufgrund der Sequenzunterschiede gleichzeitig zu deletieren, und andererseits an der Schwierigkeit der Klonierung der Deletionskonstrukte. Somit war die Erstellung der Stammvariante GR2 mit mehr Problemen verbunden, und es konnten final nicht alle der identifizierten Transposasen deletiert werden. Es zeigte sich auch dass einige der identifizierten Transposasen in mehreren Kopien im Genom vorlagen, was die gleichzeitige CRISPR-Cas basierte Deletion, aufgrund der unterschiedlichen homologen Bereiche erschwerte. Da sich einige Transposase Kopien auch in genomischen Inseln identifizieren ließen, wurde in diesen Fällen die gesamte genomische Insel deletiert. Um aufzuzeigen, dass die Transposaseaktivität in der finalen Stammvariante mit den vereinten Einzeldelationen reduziert oder gar aufgehoben wurde, wurde ein qPCR auf das *tnp*-Gen durchgeführt, welches für die ISPap1-Transposase kodiert. Abbildung 7 zeigt die eindeutige Reduktion in GR2 im Vergleich zum Wildtyp und der Einzeldelation des *tnp* Gens. Somit konnte die erfolgreiche Deletion der Transposaseaktivität aufgezeigt werden.

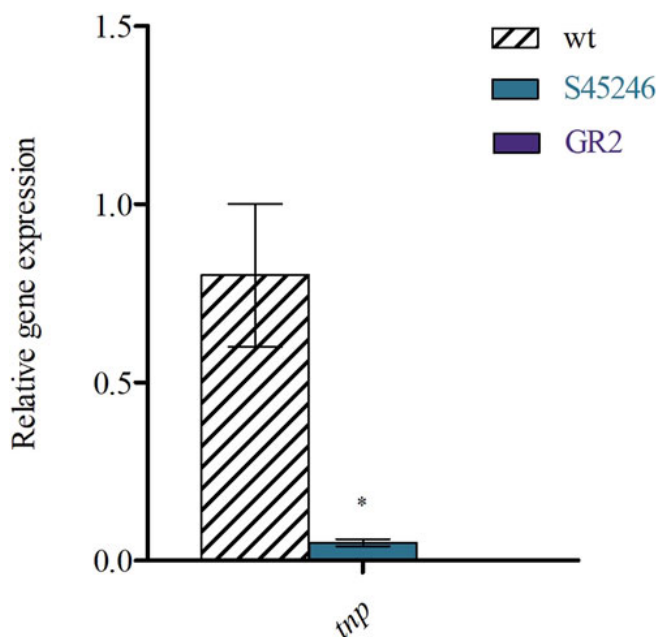


Abbildung 7: RT-qPCR der ISPap1-Transposase (*tnp*)-Gene im Verhältnis zum Hauskeeping-Gen *gyrA* in WT, S45246 und GR2. * $p < 0,05$ wurde durch einen t-Test mit zwei Proben aus drei in CASO-Bouillon gezüchteten biologischen Replikaten ermittelt (Giulia Ravagnan et al., 2024).

Um final Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Genomreduzierten Stammvarianten aufzuzeigen, wurden Versuche zur 2,3-Butandiolproduktion im Vergleich zum Wildtyp vorgenommen. *P. polymyxa* ist ein bekannter Produzent von 2,3-Butandiol (Schilling, Ciccone, et al., 2020). Hierbei zeigte sich, dass das Wachstumsverhalten der beiden Stammvarianten auch unter kontrollierten Bedingungen im Parallelbioreaktorsystem (DasGip) fast identisch zum Wildtyp ist (Abbildung 8). Hinsichtlich der Produktbildung zeigte sich eine Überlegenheit der Stammvariante GR1 (Abbildung 9A), was sich in der besseren Energiebereitstellung aufgrund der Deletion von konkurrierender Sekundärmetabolite begründen lässt. Über den Verlauf der Fermentation (48 Stunden) konnte dies für GR1 klar aufgezeigt werden, und auch die

Produktion von Exopolysacchariden (EPS) war in dieser Variante erwartungsgemäß nicht mehr nachweisbar. Somit konnte die positive Umsetzung der Projektidee am Beispiel von 2,3-Butandiol nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden bereits in der Publikation Ravagnan et al. (Giulia Ravagnan et al., 2024) veröffentlicht.

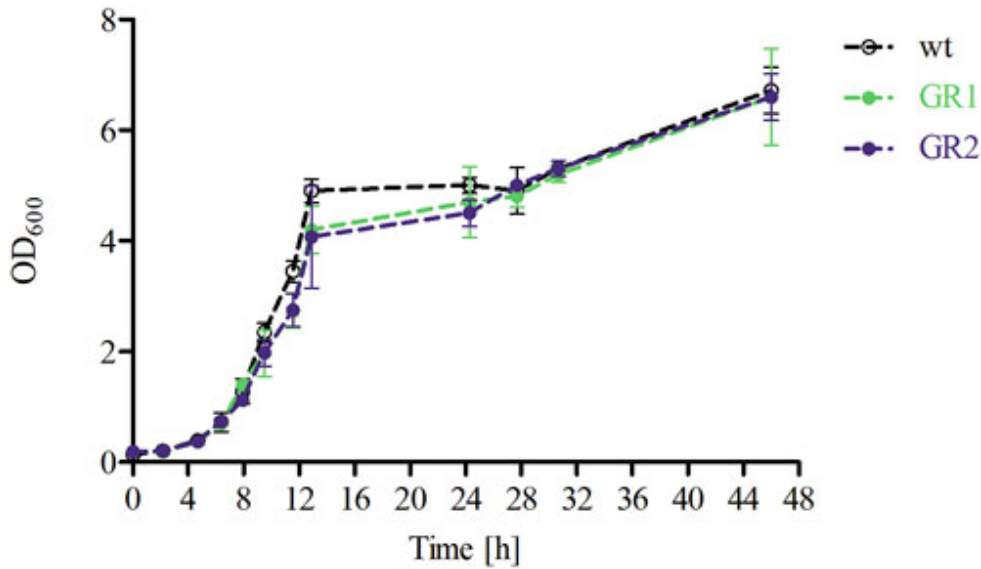


Abbildung 8: Wachstumsprofile von *P. polymyxa* DSM 365 WT und den genomreduzierten Stämmen (GR1 und GR2) im Verlauf der 48-stündigen kontrollierten Batch-Kultivierung in DASGIP-Bioreaktoren unter mikroaeroben Bedingungen (0,5 vvm) (Giulia Ravagnan et al., 2024).

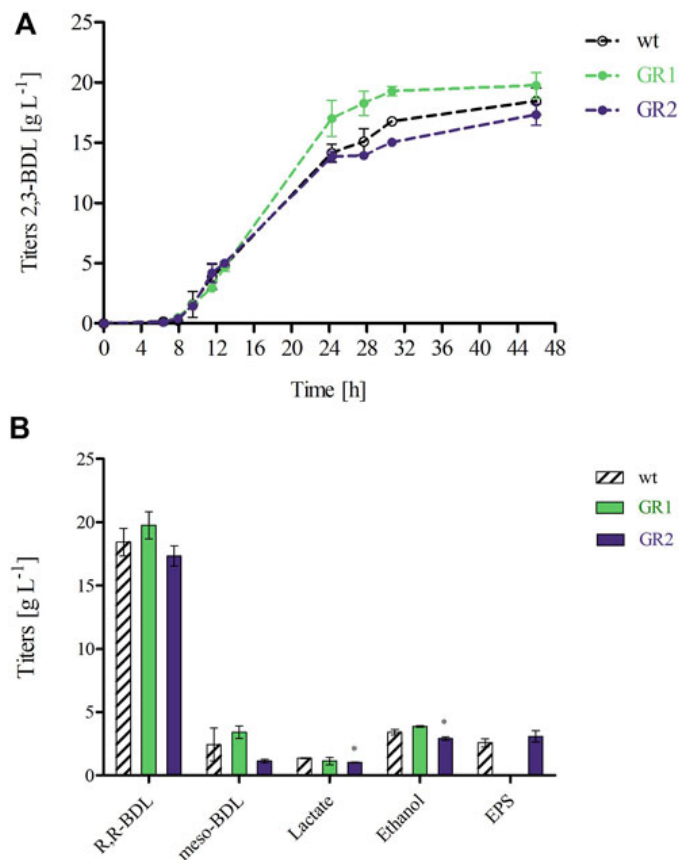


Abbildung 9: (A) 2,3-BDL-Produktion im Verlauf der 48-stündigen Fermentation. (B) Produktprofile von *P. polymyxa* DSM 365 WT und den genomreduzierten Stämmen (GR1 und GR2) nach 48 h kontrollierter Batch-Kultivierung in den parallelen 1-L-DASGIP-Bioreaktoren unter mikroaeroben Bedingungen (0,5 vvm). Die

Produkttitel sind das Ergebnis zweier unabhängiger Fermentationsprozesse, *p < 0,05 wurde mittels t-Test mit zwei Proben ermittelt (Giulia Ravagnan et al., 2024).

Um das Produktspektrum von *P. polymyxa* zu erweitern, und das industrielle Potential weiter aufzuzeigen, wurde der Ansatz verfolgt die nicht native Verbindung Isobutanol in *P. polymyxa* herzustellen. Isobutanol birgt aufgrund seiner Vorzüge im Vergleich zu Ethanol ein sehr hohes Potential für einen Biokraftstoff der 2. Generation. Aufgrund der zeitlich parallelen Durchführung der beiden Ansätze, erfolgten die Arbeiten zur Isobutanolproduktion nicht in einer der beiden Stammvarianten GR1, GR2, sondern im Wildtyp. Hier ging es vorrangig darum, aufzuzeigen dass es molekularbiologisch möglich ist, das Produktspektrum von *P. polymyxa* um synthetische Produkte zu erweitern, was sein Potential als mikrobielle Biofabrik aufzeigt. Auch zeigt sich hier, dass der versatile Metabolismus von *P. polymyxa* bestens geeignet ist um weitere Produkte in solch einem Chassisorganismus herzustellen. So zeigte sich, dass *P. polymyxa* bereits fast alle Gene für die Biosynthese von Isobutanol im Genom kodiert hat, einzig das Gen *kdcA* (verzweigt-kettige Alpha-Ketosäure-Decarboxylase) fehlt in dem in Abbildung 10 dargestellten Syntheseweg zum Isobutanol.

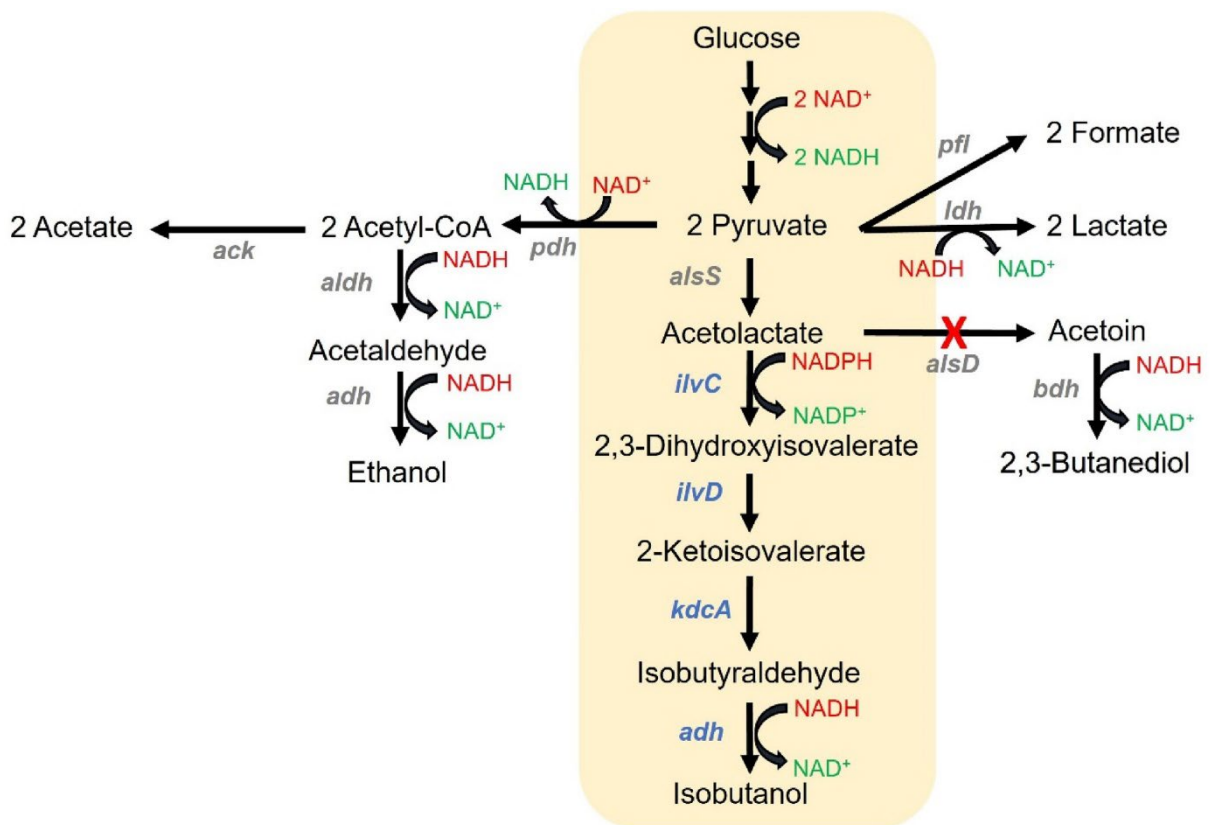


Abbildung 10: Überblick über den gemischten Säureweg in *P. polymyxa* und den manipulierten Isobutanolweg (orangefarbener Kasten). Die blau dargestellten Gene werden von einem synthetischen Operon anstelle von *alsD* überexprimiert, um die Bildung von Isobutanol voranzutreiben und den 2,3-BDO-Weg zu eliminieren. *ilvC*, *ilvD* und *adh* stammen aus *P. polymyxa*, während *kdcA* aus *Lactococcus lactis* heterolog exprimiert wird. Der Zielweg für die Isobutanolproduktion ist grau unterlegt. *ack*, Acetatkinase; *adh*, Alkoholdehydrogenase; *aldh*, Aldehyddehydrogenase; *alsD*, Acetolactatdecarboxylase; *alsS*, Acetolactatsynthase; *bdh*, Butandioldehydrogenase; *ilvC*, Ketolsäure-Reduktoisomerase; *ilvD*, Dihydroxysäure-Dehydratase; *kdcA*, verzweigt-kettige Alpha-Ketosäure-Decarboxylase; *ldh*, Laktatdehydrogenase; *pdh*, Pyruvatdehydrogenase; *pfl*, Pyruvat-Formiat-Lyase (Meliawati et al., 2024).

Daher wurde final ein komplettes Operon designed, welches alle für die Isobutanolproduktion notwendigen Gene beinhaltet (*ilvC*, *ilvD*, *adh*, und *kdcA*). Dieses Operon wurde anstelle des *alsD* Gens (Acetolactat Decarboxylase) im Genom integriert. Durch diesen Ansatz wurde einerseits die konkurrierende Synthese von 2,3-Butandiol eliminiert, und die native Ribosomale Bindestelle und der Promotor beibehalten. Somit folgt die Isobutanolproduktion dem gleichen Verlauf wie die 2,3-Butandiol Produktion. Ein erster Ansatz mit dem einfachen Austausch des *alsD* Gens mit dem *kdcA* Gen, resultierte in einer nur sehr niedrigen Produktion von Isobutanol (0,15 g/L). Die Deletion einer der 4 nativen Lactatdehydrogenasen (*ldh*) wie bereits in Vorarbeiten beschrieben (Schilling, Ciccone, et al., 2020), resultierte in einer Reduktion der Nebenproduktbildung von Lactat und führte zu einer leichten Erhöhung des Isobutanoltiters (0,19 g/L). Die Einführung einer weiteren Kopie anstelle der Butandiol Dehydrogenase (*bdh*) führte nur zu einer vernachlässigbaren Steigerung des Isobutanoltiters. Aufgrund dessen wurde gemutmaßt, dass die Versorgung mit Vorstufen ein Problem darstellen, weswegen das synthetische Operon chromosomal integriert wurde. Hier zeigte sich vor allem, dass die Wahl der zu integrierende Alkohol Dehydrogenase entscheidend ist (Meliawati et al., 2024). Die Integration des beschriebenen Operons (Stammvariante Ppiso-5) zeigte einen Produkttiter von 1,1 g/L, was auf die zusätzlichen Kopien der Vorstufen Gene zurückzuführen ist (Abbildung 11).

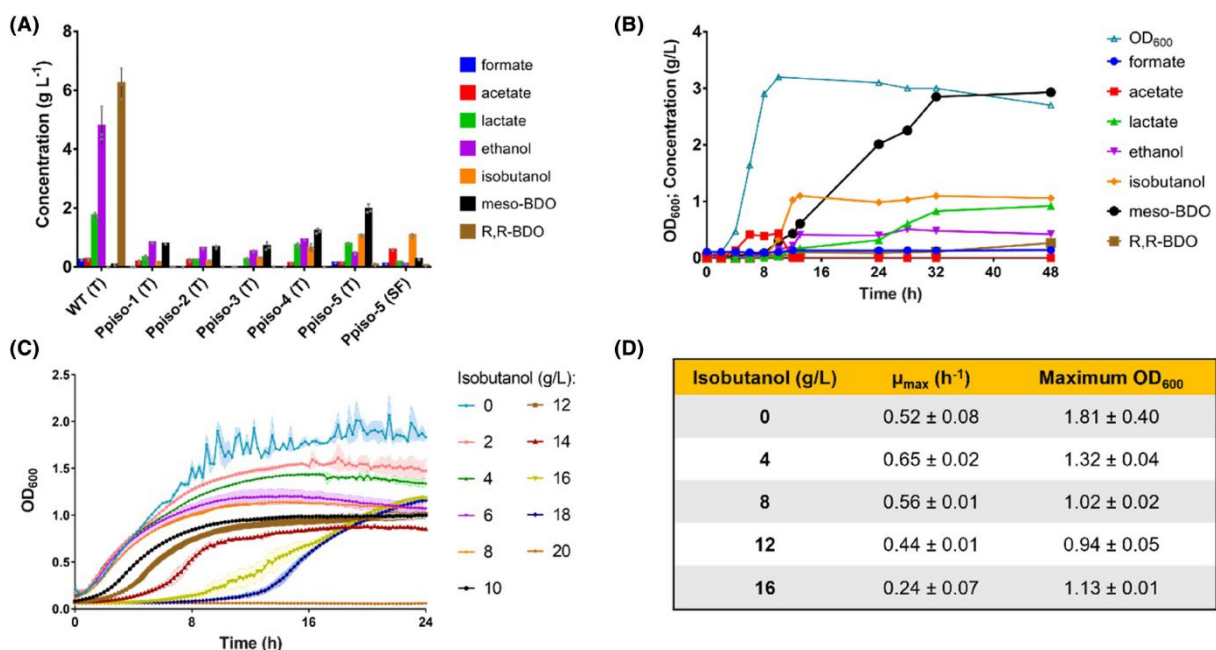


Abbildung 11: (A) Produktprofile von Wildtyp- (WT) und gentechnisch veränderten Isobutanol-produzierenden *P. polymyxa*-Stämmen (Ppiso) nach 48-stündiger Kultivierung in Reagenzglasern (T) oder Schüttelkolben (SF). (B) Biomassedichte (OD₆₀₀) und Produktprofile des Ppiso-5-Stamms während der Kultivierung. (C, D) Wachstumsprofil von *P. polymyxa*, das mit unterschiedlichen Konzentrationen von Isobutanol ergänzt wurde. Die Balken- und Liniendiagramme geben Mittelwerte an, die Fehlerbalken die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (Meliawati et al., 2024).

Zur Evaluierung weiterer Flaschenhalse der Isobutanolproduktion in *P. polymyxa* wurden enzymatische Assays mit Zellysaten der Stammvarianten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Biosyntheseweg in zwei Teile geteilt (Abbildung 12). Es zeigte sich, dass vor allem die Bereitstellung von NADPH ein limitierender Faktor ist, was für ein Redoxungleichgewicht spricht, welches durch den NADP Abhängigen Schritt (katalysiert durch *ilvC*) hervorgerufen wird. Der Ansatz die Co-Faktor Spezifität der von *ilvC* kodierten KARI mittels Enzymengineering, basierend auf beschriebenen Mutationen in homologen Enzymen zu verändern, erwies sich als nicht funktionsfähig und setzte die Produkttiter wieder herab (0,32 g/L). Daher wurde in einem nächsten Schritt die Glukose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*), ein glykolytisches Gen, das für die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat

in Fruktose-6-Phosphat im Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg verantwortlich ist entfernt. Da *P. polymyxa* nicht für einen aktiven Entner-Doudoroff (ED)-Stoffwechselweg kodiert, wird der Kohlenstofffluss über den Pentosephosphat (PP)-Stoffwechselweg umgeleitet. Der PP-Stoffwechselweg nutzt NADP, während der EMP-Stoffwechselweg NAD nutzt. Die Deletion von *pgi* im Ppiso-7-Stamm führte jedoch nicht zu einer Verbesserung des Isobutanol-Titers im Vergleich zu Ppiso-5. Obwohl die Nebenprodukte deutlich reduziert wurden, da der Meso-BDO-, Laktat- und Ethanol titer um mehr als 85 % sank, war der Ppiso-7-Stamm in der Lage, die Nebenprodukte zu reduzieren.

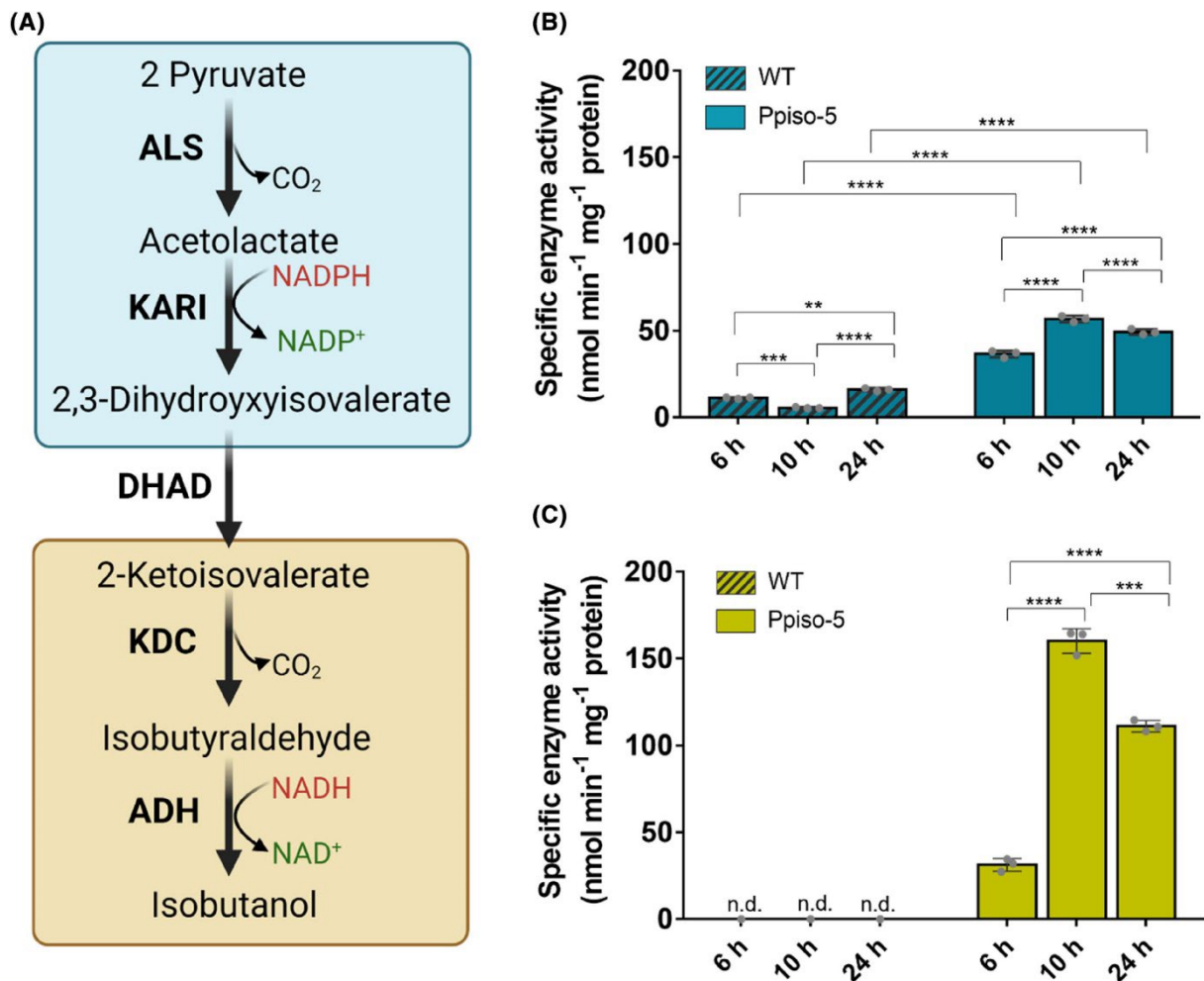


Abbildung 12: Untersuchung der Enzyme des Isobutanolwegs im Zelllysate von *P. polymyxa*. (A) Für die Analyse wurde der Stoffwechselweg in zwei Teile unterteilt: einen oberen, NADPH-abhängigen Teil (in blau) und einen unteren, NADH-abhängigen Teil (in gelb). Die kombinierte Aktivität der Enzyme des oberen Teils wurde mit den Substraten Pyruvat und NADPH gemessen (B), während der untere Teil mit 2-Ketoisovalerat und NADH untersucht wurde (C). Die Zelllysate wurden aus dem Stamm Ppiso-5 gewonnen, der in der frühen exponentiellen (6 h), der späten exponentiellen (10 h) und der stationären Wachstumsphase (24 h) geerntet wurde; n.d., nicht nachgewiesen. Die Balkendiagramme stellen Mittelwerte dar, und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei biologischen Wiederholungen an. Ein $p < 0,05$ wurde bei der Bestimmung der signifikanten Unterschiede zwischen den Proben berücksichtigt (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$) (Meliawati et al., 2024).

Mit dem Ziel, höhere Produkttiters zu erzielen, wurde ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der NADPH-Regeneration erforscht, indem ein NADP-abhängiges Apfelsäureenzym (*maeB*) in das synthetische Operon aufgenommen wurde. Das Apfelsäureenzym ist für die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat und CO_2 verantwortlich, wobei gleichzeitig NADPH entsteht. Neben einer verbesserten NADPH-Regeneration könnte die Überexpression des Apfelsäureenzym auch das

Angebot an Pyruvat erhöhen, das dann für die Isobutanolbildung genutzt werden kann. Diese Strategie führte zu einem Anstieg des Isobutanols um 43 % im Vergleich zum Ppiso-5-Stamm und erreichte einen Endtiter von 1,5 g L⁻¹ (Abbildung 13B). Interessanterweise produzierte der neu entwickelte Stamm (Ppiso-8) auch weniger Nebenprodukte, insbesondere meso-BDO, Laktat und Ethanol.

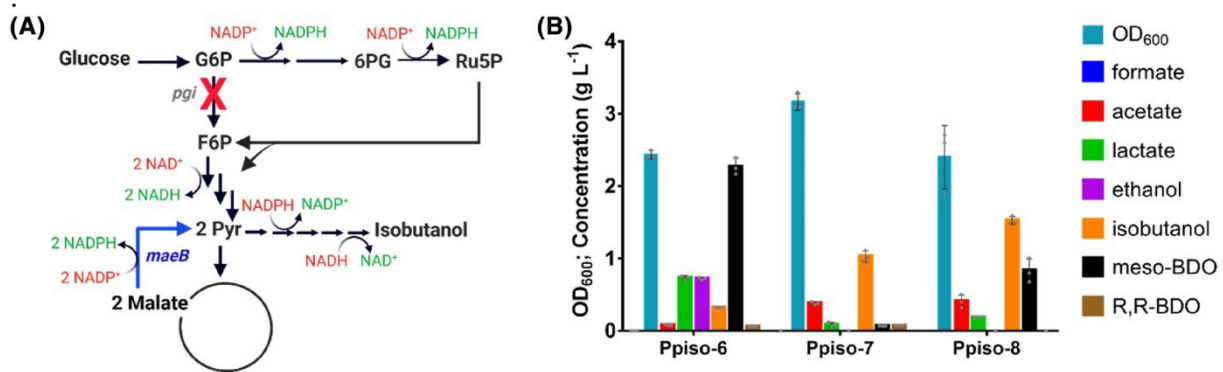


Abbildung 13: Strategien für eine verbesserte NADPH-Regeneration zur Steigerung der Isobutanolproduktion. (A) Überblick über den zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsel und den synthetischen Isobutanol-Weg in *P. polymyxa*. Die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) lenkt den Kohlenstofffluss in den Pentosephosphatweg um, der NADPH erzeugt. Die Überexpression des NADP⁺-abhängigen Apfelsäureenzym (*maeB*) liefert ebenfalls NADPH durch die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat. (B) Produktprofil der gentechnisch veränderten Stämme nach den implementierten NADPH-Regenerationsstrategien. Das Produktprofil wurde nach 48-stündiger Kultivierung gemessen. Die Balkendiagramme geben Mittelwerte an, die Fehlerbalken die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (Meliawati et al., 2024).

Da die Isobutanolproduktion nicht nur von den rational eingeführten Enzymen abhängt, sondern auch von der Glykolyse für die Versorgung mit Vorläufersubstanzen und verschiedene native Alkoholdehydrogenasen an der Reduktion von Isobutyraldehyd zu Isobutanol beteiligt sein könnten, wurde das Proteinexpressionsmuster in *P. polymyxa* in verschiedenen Wachstumsstadien untersucht. Die Proteomanalyse von Ppiso-5 im Vergleich zum parental Stamm Δdh zeigte, dass neben KARI auch die NADPH-verbrauchenden Proteine herunterreguliert wurden, so dass KARI das verfügbare zelluläre NADPH in den Isobutanolweg ziehen kann. Die starke Hochregulierung von KARI wurde jedoch nicht von einer Hochregulierung der NADPH-erzeugenden Enzyme begleitet, was zu einer NADPH-Erschöpfung in den Zellen führen könnte. Die beiden wichtigsten NADPH-regenerierenden Enzyme, die Isocitrat-Dehydrogenase und die Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase (G6PD), wurden nur zu etwa 10 % hochreguliert.

Betrachtet man die Enzyme des Isobutanolwegs, so wird die Expression von KDC, KARI und ADH nach 10 Stunden induziert, was die um diesen Zeitpunkt beginnende effektive Isobutanolproduktion erklärt (Abbildung 14A). Der deutliche Anstieg von KDC und KARI entspricht der Aktivierung des *alsD*-Promotors, der in der postexponentiellen Wachstumsphase aktiviert wird. Während die KARI-Expression im Vergleich zur Δdh um das Achtfache ansteigt, wird die DHAD- und ADH-Expression nur um das Dreifache hochreguliert (Abbildung 14B). Dies ist plausibel, da die Gene im Operon in der Reihenfolge KDC-KARI-DHAD-ADH angeordnet wurden (Abbildung 14C). Folglich könnten die Expressionsniveaus der Gene, die DHAD und ADH kodieren, aufgrund ihrer distalen Position niedriger sein. Während die Menge an ADH im Laufe der Kultivierung anstieg, blieb die Menge an DHAD relativ konstant. Daher ist der maximale Fluss, der durch die DHAD-Aktivität aufrechterhalten werden kann, zehnmal geringer als die vorangehende, von KARI katalysierte Reaktion, was darauf hindeutet, dass DHAD ein potenzieller Engpass des Stoffwechselwegs sein könnte (Abbildung 14D). Im Gegensatz zu

ADH, die zu den fermentativen Stoffwechselwegen gehört, ist DHAD Teil der Biosynthesewege für verzweigt-kettige Aminosäuren. Dies könnte die Induktion von *adh* in der frühen stationären Phase und die konstitutive Expression von *dhad* erklären.

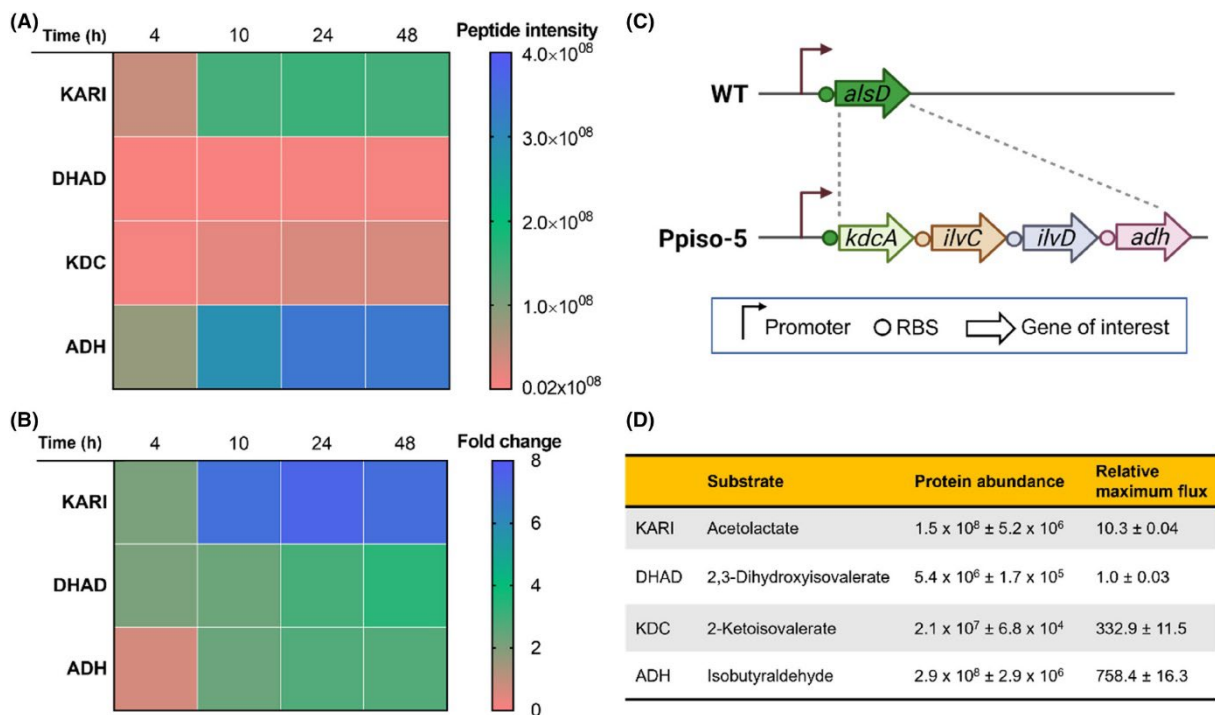


Abbildung 14: A) Proteinhäufigkeit der letzten vier Enzyme des Isobutanolweges und (B) Hochregulierung von KARI, DHAD und ADH im Vergleich zum nicht produzierenden Δdh -Stamm. (C) Die entsprechenden Gene wurden von dem synthetischen Operon, bestehend aus *kdcA-ilvC-ilvD-adh*, exprimiert, das chromosomal in das Genom von *P. polymyxa* integriert wurde und das *alsD* ersetzt und unter der Kontrolle des nativen *alsD*-Promotors exprimiert wird. (D) Der relative maximale Fluss, der von den Enzymen im Isobutanolweg aufrechterhalten werden kann. Der theoretische maximale Fluss wird durch Multiplikation von k_{cat} -Werten aus der Literatur mit der relativen Häufigkeit jedes Enzyms im Verhältnis zum Gesamtprotein im Extrakt geschätzt. Die Flusswerte wurden dann auf den niedrigsten relativen maximalen theoretischen Fluss (DHAD) normiert (Meliawati et al., 2024).

Zusätzlich wurde der Einfluss von Isobutanol auf den Stoffwechsel von *P. polymyxa* hin untersucht und ein Minimalmedium für weitere Kultivierungen entwickelt. Es zeigte sich, dass Isobutanol keine starke Inhibierung auf den Stoffwechsel von *P. polymyxa* aufweist, und somit final auch höhere Produkttiter erzielt werden können. Im Bereich der Medienentwicklung konnte aufgezeigt werden, dass vor allem Vitamine essentiell für ein gutes Wachstum von *P. polymyxa* sind. Diese sehr erfolgsversprechende Ergebnisse zur Nutzung von *P. polymyxa* als mikrobielle Biofabrik, auch zur Herstellung nicht natürlicher Produkte wurden bereits in der Veröffentlichung Meliawati et al. In Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Dänemark (AG Nickel) publiziert (Meliawati et al., 2024).

Im Projektteil zur Etablierung neuartiger Sporenprozesse wurde untersucht inwieweit Enzyme auf der Sporenberfläche von *P. polymyxa* Sporen aufgebracht (Sporendisplay) werden können. Das Display besteht aus einem Verankerungsprotein, das sich in der Hülle der Spore befindet, einem Linker, der für Flexibilität und Abstand sorgt, und dem Protein, das aufgebracht werden soll. CotE ist das entsprechende Verankerungsprotein und spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der äußersten Krustenschicht wie für *B. subtilis* beschrieben. Durch eine blastX-Suche mit den *B. subtilis*-Proteinsequenzen gegen das Genom von *P. polymyxa* DSM 365 wurde festgestellt, dass *cotE* das einzige *cot*-Gen ist, das in *P. polymyxa* vorhanden ist. Das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) wurde für den Funktionsnachweis in *P. polymyxa* gewählt, da es einen leicht messbaren Output liefert. Ein His-

Tag wurde an den N-Terminus des Fusionsproteins angehängt, falls eine spätere Reinigung erforderlich sein sollte. Das Konstrukt wurde mit dem nativen Promotor von *cotE* entworfen um die Sporenbildung mit der Expression des Fusionsproteins zu synchronisieren und damit den Einbau in die Sporenkruste zu realisieren. Neben GFP wurde für den weiteren Proof-of-principle für eine messbare Enzymaktivität die Lipase A aus *P. polymyxa* ausgewählt (Maximilian Zander et al., 2023).

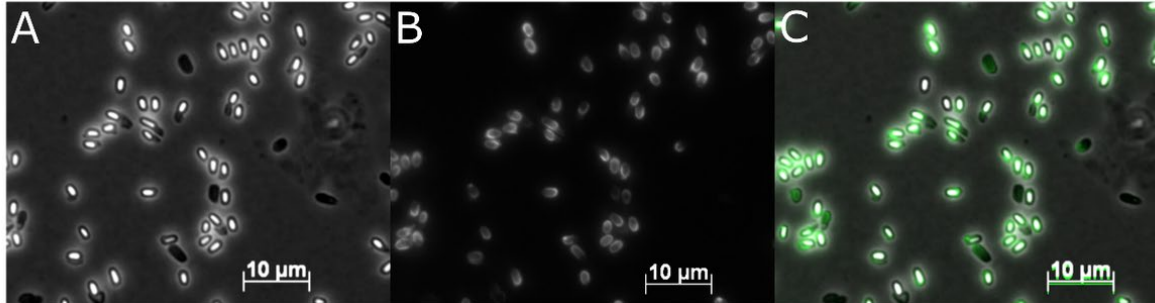


Abbildung 15: Bilder von Sporen im Hellfeld (A), im Fluoreszenzkanal (B) und Überlagerung von Hellfeld und Fluoreszenz. Bild von Sporen mit GFP (C). Die Fluoreszenz (grün) der einzelnen Proben wurde mit einem 488-nm-Laser gemessen (100 ms Belichtungszeit, 3 % Laser).

Wie in Abbildung 15 zu erkennen, konnte GFP erfolgreich auf den Sporen von *P. polymyxa* exprimiert werden. Zur genaueren Untersuchung der Effizienz und Funktionalität des Sporendisplays wurden vegetative Zellen, aufgereinigte Sporen und Sporen mit Expression von GFP in einem Zytometer untersucht.

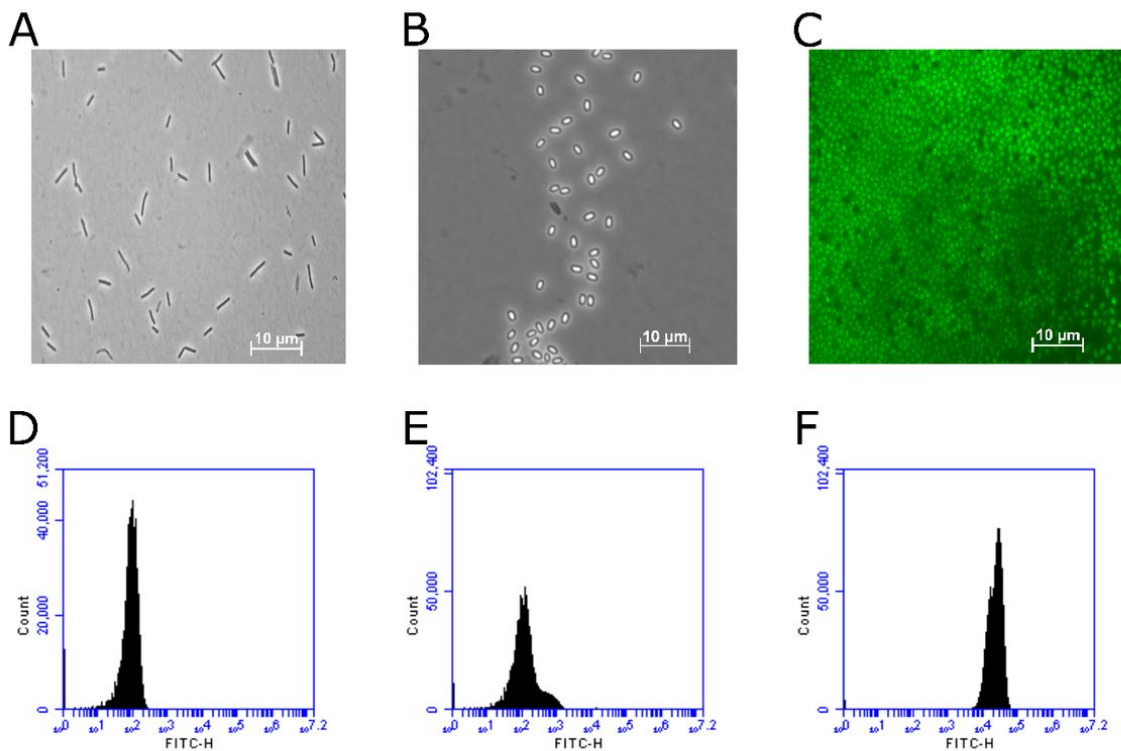


Abbildung 16: Fluoreszenzintensitäten und Streusignale von vegetativen *P. polymyxa*-Zellen, gereinigten Sporen und Sporen die GFP tragen, getrennt gemessen. (A - C) Mikroskopische Aufnahmen von vegetativen Zellen (A), Sporen (B) und der Sporen mit GFP (C). (D - F) Zytometrie der entsprechenden Proben mit Messung der Zellzahl gegen Fluoreszenzintensitäten.

Hierbei zeigte sich, dass, das Sporedisplay erstmals erfolgreich *P. polymyxa* etabliert werden konnte. Zusätzlich wurde ebenfalls erstmals das GFP mit einer TEV Protease Sequenz ausgestattet um die Abspaltung von der Sporenoberfläche aufzuzeigen, was ein eindeutiger Nachweis für die zugängliche Proteinsequenz auf der Sporenoberfläche darstellt, und eine reine Absorption an der Sporenoberfläche ausschließt. Hierbei zeigte sich allerdings eine relativ geringe Effizienz in der Abspaltung, was in zukünftigen Ansätzen weiter untersucht werden muss. Das Display der Lipase A zeigte eine effiziente Umsetzung des gewählten C8 Substrates, auch besonders bei höheren Temperaturen (70 °C). Für diese Ansätze zeigte sich auch eine Recyclierbarkeit der Sporen mit der immobilisierten Lipase A, welche sich über sieben Zyklen hin als stabil bewies, und kaum eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität aufwies. Somit ist auch dieser Projektteil als erfolgreich anzusehen, auch wenn in diesem Bereich nicht so viele Ergebnisse erzielt werden konnten wie im Projektantrag beschrieben. Mit den in der Projektlaufzeit erzielten Einsichten, welche auch bereits vorab publiziert wurden (Maximilian Zander et al., 2023), wurde aber eine Basis für die intensivere weitere Erforschung der Möglichkeit zur Nutzung von *P. polymyxa* Sporen erarbeitet. Vor allem mit den neu erhaltenen Einsichten zur Biosynthese der Endosporen, und der generellen Möglichkeit zur Nutzung von *cotA* für das Sporedisplay, lassen sich zukünftige weitere erfolgreiche Ansätze erwarten.

Des Weiteren wurden im Projektverlauf eine intensive Zusammenarbeit mit dem Projekt Partner am Max-Planck-Institut Marburg (AG Erb) durchgeführt. Ziel dieser Kooperation ist die Erstellung des genomskaligen metabolischen Modells. Dieses beruht auf der nun erstmals vorliegenden geschlossenen Genomsequenz, der Erstellung von mehreren Deletionsvarianten, besonders im Bereich der 2,3-Butandiol Biosynthese und der Auswertung eines großen Datensatzes an Metabolom und Proteom Daten. Zu diesem Zwecke fand eine intensive Zusammenarbeit statt, welche neben der Genomsequenzierung und Annotation auch die Erstellung verschiedenster Deletionsvarianten beinhaltet. In enger Zusammenarbeit wurden diese Varianten zur Herstellung von 2,3-Butandiol in unterschiedlichen Maßstäben (Biolektor, DasGip Bioreaktoren) herangezogen. Die daraus gewonnenen Omics-Daten dienen als Basis für die Erstellung des metabolischen Modells. Die Erstellung des Modells befindet sich gerade in der Finalisierung und wird zukünftig für die weitere Optimierung von *P. polymyxa* zur Verfügung stehen.

Referenzen

- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- C Schilling, MAG Koffas, V Sieber, & J Schmid. (2020). Novel Prokaryotic CRISPR-Cas12a Based Tool for Programmable Transcriptional Activation and Repression. *ACS Synthetic Biology*, *9*(12), 3353–3363.
- Giulia Ravagnan, Janne Lesemann, Moritz-Fabian Müller, Anja Poehlein, Rolf Daniel, Stephan Noack, Johannes Kabisch, & Jochen Schmid. (2024). Genome reduction in *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 for chassis development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2024.1378873>
- Giulia Ravagnan, & Jochen Schmid. (2024). Promising non-model microbial cell factories obtained by genome reduction. *Front. Bioeng. Biotechnol.*
- Kumar, S., & Ujor, V. C. (2022). Complete Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, a Soil Bacterium of Agricultural and Industrial Importance. *Microbiology Resource Announcements*, *11*(6). <https://doi.org/10.1128/mra.00329-22>
- Maximilian Zander, Jochen Schmid, & Johannes Kabisch. (2023). Implementation of a Lipase A spore display in *Paenibacillus polymyxa*. *Research Square Preprint*.
- Meliawati, M., Teckentrup, C., & Schmid, J. (2022). CRISPR-Cas9-mediated Large Cluster Deletion and Multiplex Genome Editing in *Paenibacillus polymyxa*. *ACS Synthetic Biology*, *11*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00565>
- Meliawati, M., Volke, D. C., Nickel, P. I., & Schmid, J. (2024). Engineering the carbon and redox metabolism of *Paenibacillus polymyxa* for efficient isobutanol production. *Microbial Biotechnology*, *17*(3), e14438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.14438>
- Rütering, M., Cress, B. F., Schilling, M., Rühmann, B., Koffas, M. A. G., Sieber, V., & Schmid, J. (2017). Tailor-made exopolysaccharides—CRISPR-Cas9 mediated genome editing in *Paenibacillus polymyxa*. *Synthetic Biology*, *2*(1), ysx007. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysx007>
- Rütering, M., Schmid, J., Rühmann, B., Schilling, M., & Sieber, V. (2016). Controlled production of polysaccharides—exploiting nutrient supply for levan and heteropolysaccharide formation in *Paenibacillus sp.* *Carbohydrate Polymers*, *148*, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.074>
- Schilling, C., Ciccone, R., Sieber, V., & Schmid, J. (2020). Engineering of the 2,3-butanediol pathway of *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Metabolic Engineering*, *61*, 381–388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.07.009>
- Schilling, C., Koffas, M. A. G., Sieber, V., & Schmid, J. (2020). Novel Prokaryotic CRISPR-Cas12a-Based Tool for Programmable Transcriptional Activation and Repression. *ACS Synthetic Biology*, *9*(12), 3353–3363. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00424>