

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V.**

Prof. Dr. Tobias Erb

**BioBall – SynBioTech – Synergistische Entwicklung
biotechnologischer und chemischer Verfahren zur
Wertschöpfung von dezentralen C1-Stoffströmen**

Fkz.: 031B0904C

**„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln
des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem
Förderkennzeichen ... gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt
dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“**

Teil I - Kurzbericht (Teilvorhaben C, MPI)

Im Rahmen einer nachhaltigen Bioökonomie hat die biotechnologische Nutzung von nachhaltigen C1-Kohlenstoffverbindungen in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. In diesem Konzept werden Methanol und andere C1 (bzw. teilweise auch C2-Verbindungen), die aus nachhaltigen Kohlenstoffquellen gewonnen werden, als Substrat für Mikroorganismen bereitgestellt, die in der Lage sind, auf diesen Verbindungen als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Methanol ist eine besonders attraktive Kohlenstoffquelle, da es nachhaltig aus Holz (Methylalkohol), Syngas (Fischer-Tropsch Verfahren) oder Biogas (durch Hydrierung und/oder elektrokatalytisch) synthetisiert werden kann.

Das Bakterium *Methylobacterium extorquens* (bzw. *Methylorubrum extorquens*) kann auf Methanol und Acetat wachsen und gehört zu den Gram-negativen Alphaproteobakterien (Green et al. 2018). In der Vergangenheit wurde das Bakterium bereits maßgeschneidert, damit es Plattformchemikalien, die von Interesse für die chemische Industrie sind, produzieren kann (Sonntag et al. 2015, Schada von Borzyskowski et al. 2018, Lim et al. 2019). Im Rahmen des Verbundvorhabens SynBioTech sollte ein modifizierter *M. extorquens* Stamm entwickelt werden, der Crotonsäure im industriellen Maßstab produziert und dabei Methanol (und evt. Acetat) als Kohlenstoffquelle nutzt, das aus biogenem CO₂ über Hydrierung gewonnen wurde.

Innerhalb des Teilprojekts wurden Strategien untersucht, den Organismus *M. extorquens* PA1 zur Produktion von Crotonsäure auf Methanol (und alternativ Acetat) als Kohlenstoffquelle zu engineeren. Dazu wurde in einer theoretischen Phase anhand existierender metabolischer Netzwerkkarten (Peyraud et al. 2011; Schneider et al. 2012), verschiedene Strategien entworfen, die darauf beruhen, den Ethylmalonyl-CoA Weg (EMCP), der für das Wachstum auf Methanol und Acetat essentiell ist, zu nutzen. Im EMCP kommt Crotonsäure als Intermediat – in Form von CrotonylCoA – vor und wird dabei im mM Maßstab gebildet (Peyraud et al. 2011; Schneider et al. 2012). Um die Crotonsäure aus dem EMCP abzweigen zu können, sollten alternative Stoffwechselwege für Methanol-Wachstum eingeführt werden. Dabei stellte sich der sogenannte Glyoxylat-Shunt als vielversprechendste Möglichkeit für diesen alternativen Stoffwechsel dar, weil prinzipiell nur zwei Gene (*aceAB*) benötigt werden, um den Zyklus in *M. extorquens* zu realisieren.

In der anschließenden experimentellen Phase wurde in *M. extorquens* eine Deletion des Gens für die Crotonyl-CoA Carboxylase/ Reduktase (*ccr*) eingeführt, die Crotonyl-CoA umsetzt, um den Stoffwechsel auf der Stufe des Crotonyl-CoAs zu stoppen. Zeitgleich wurde der Glyoxylat-Shunt (*aceAB*) über ein Plasmid eingeführt, das auch eine weitere Thioesterase codierte, um das akkumulierte Crotonyl-CoA in freie Crotonsäure, das erwünschte Produkt, umzuwandeln.

Dieses Vorgehen wurde zuerst in dem Laborstamm *M. extorquens* AM1 getestet, wobei die Expressionslevel von *aceA* und *aceB* optimiert wurden, um Wachstum auf Methanol zu ermöglichen. Zugleich wurde neben Methanol auch Acetat gefüttert, um den Kohlenstoff-Fluss in Richtung des EMCPs zu leiten. Hierbei wurden Crotonsäure im µM-Maßstab produziert und Engpässe identifiziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Crotonyl-CoA hauptsächlich in den Speicherstoff Polyhydroxybutyrat (PHB) umgeleitet wurde. Diese Verbindung dient als Kohlenstoff-Speicher in vielen Alphaproteobakterien. Unter Produktionsbedingungen konnte festgestellt werden, dass PHB einen großen Teil der finalen Zelltrockenmasse ausmacht (~15%). Um die Crotonsäure-Produktion zu verbessern wurde die Strategie

Parallel dazu wurde die Strategie vom Laborstamm AM1 auf den industriell besser geeigneten Stamm *M. extorquens* PA1 übertragen, der eine geringere genetische Komplexität und ein schnelleres Wachstum auf Methanol zeigt. Diese Arbeiten geschahen in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Universität Marburg (UMR). Dazu wurde eine *M. extorquens* PA1 Deletionsmutante der Crotonyl-CoA Carboxylase/ Reduktase mit dem Glyoxylat-Shunt (*aceAB*) ausgestattet und für Wachstum auf Methanol optimiert. Über Langzeitevolution konnte die Wachstumsrate auf Methanol gesteigert werden. Die entsprechenden Stämme wurden sequenziert, um die genetischen Ursachen zu identifizieren.

In dem evolvierten *M. extorquens* PA1 Δccr Stamm mit Glyoxylatzyklus wurden anschließend versucht, den Kohlenstofffluss aus dem PHB Stoffwechsel in den EMCP umzuleiten. Dazu wurde versucht, die PHB Synthase (*phaC*) auszuschalten. Diese zeigte sich jedoch in Kombination mit Δccr lethal, weshalb wir uns entschieden den Phänotyp auf eine andere Weise zu erzeugen. Hierfür setzen wir CRISPR interference (CRISPRi) ein (Mo et al. 2020), die wir im Rahmen des Projekt mit Partner UMR etabliert hatten. Beide der CRISPRi Methode handelt es sich um eine inaktive dCas9 Endonuklease, welche mit einer guide RNA an ein Zielgen bindet und mit der Transkription interferiert. So kann ein „Knockdown“ in *phaC* im korrespondierenden Deletionsstamm Δccr kombiniert werden, da ein Knockdown schwächer wirkt als eine Deletion und die zuvor beobachtete Lethalität der doppelten Deletion umgangen wird. Für diesen Knockdown wurden Plasmide konstruiert, auf welchem die dCas9 unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors steht mit guide RNAs gegen *phaC*, welche konstitutiv exprimiert werden. Dieses Konstrukt wurde in den *M. extorquens* PA1 Δccr Stamm mit Glyoxylatzyklus eingeführt. Die beiden Stämme wurden anschließend auf ihr Wachstum auf Methanol charakterisiert.

Bibliografie

- Green, P. N. and J. K. Ardley (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol **68**(9): 2727-2748.
- Lim, C. K., J. C. Villada, A. Chalifour, M. F. Duran, H. Lu and P. K. H. Lee (2019). Designing and Engineering *Methylorubrum extorquens* AM1 for Itaconic Acid Production. Front Microbiol **10**: 1027.
- Marx, C. J. and M. E. Lidstrom (2001). Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. Microbiology (Reading) **147**(Pt 8): 2065-2075.
- Mo, X. H., H. Zhang, T. M. Wang, C. Zhang, C. Zhang, X. H. Xing and S. Yang (2020). Establishment of CRISPR interference in *Methylorubrum extorquens* and application of rapidly mining a new phytoene desaturase involved in carotenoid biosynthesis. Appl Microbiol Biotechnol **104**(10): 4515-4532.
- Peyraud R., K. Schneider, P. Kiefer, S. Massou, J.A. Vorholt and J.C. Portais (2011) Genome-scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1. BMC Syst Biol **5**:189
- Schada von Borzyskowski, L., F. Sonntag, L. Poschel, J. A. Vorholt, J. Schrader, T. J. Erb and M. Buchhaupt (2018). Replacing the ethylmalonyl-CoA pathway with the glyoxylate shunt provides metabolic flexibility in the central carbon metabolism of *methylobacterium extorquens* AM1. ACS Synth Biol **7**(1): 86-97.
- Schneider, K., R. Peyraud, P. Kiefer, P. Christen, N. Delmotte, S. Massou, J.C. Portais and J.A. Vorholt (2012) The ethylmalonyl-CoA pathway is used in place of the glyoxylate cycle by *Methylobacterium extorquens* AM1 during growth on acetate. J Biol Chem **287**(1):757-766.
- Sonntag, F., C. Kroner, P. Lubuta, R. Peyraud, A. Horst, M. Buchhaupt and J. Schrader (2015). Engineering *Methylobacterium extorquens* for de novo synthesis of the sesquiterpenoid alpha-humulene from methanol. Metab Eng **32**: 82-94.

Teil II - durchgeführte Arbeiten (Teilvorhaben C, MPI)

1 Durchgeführte Arbeiten im Rahmen der definierten Arbeitspakete

Im Folgenden werden die in Teilvorhaben C durchgeführten Arbeiten ausführlicher dargestellt.

1.1 Entwurf geeigneter Strategien, über die Produkte aus *Methylobacterium* zu gewinnen sind (A 1.1.1) und Konstruktion von extrachromosomalen Elementen und (A 1.1.2)

Gemäß der Vorhabenbeschreibung sollten Strategien entworfen werden, um Crotonsäure aus dem Zentralstoffwechsel von *Methylobacterium extorquens* (auch *Methylorubrum extorquens* genannt, Green et al. 2018) auf der C1 Kohlenstoffquelle Methanol (und evt. auch der Acetat) zu gewinnen. Hierzu wurden verschiedene Möglichkeiten eruiert. Dabei zeigte sich eine Unterbrechung des Ethylmalonyl-CoA Wegs (EMCP) am Vielversprechendsten. Der EMCP ist ein zentraler Stoffwechselweg in *M. extorquens*, der für das Wachstum von auf Methanol und Acetat essentiell ist und der Crotonsäure in Form des aktivierten CoA Ester „Crotonyl-CoA“ als zentrales Intermediat enthält.

Bei allen Lösungen sollte der EMCP auf dem Level der Crotonyl-CoA Carboxylase/ Reduktase ausgeknockt werden, die das Crotonyl-CoA mit NADPH und CO₂ zu Ethylmalonyl-CoA weiter umsetzt. Das führte zu einer simulierten Akkumulation von Crotonyl-CoA, was durch Hydrolyse als Crotonsäure freigesetzt werden kann (eventuell assistiert durch eine Thioesterase).

Als Herausforderung stellte sich dabei heraus, dass auf diesem Weg zwar Crotonsäure erzeugt werden kann, aber gleichzeitig kein Wachstum auf Methanol durch die essentielle Funktion des EMCP erfolgen kann, weswegen ein alternativer Stoffwechselweg eingeführt werden muss, der diese Funktion gewährleistet. Dabei stellte sich in unserer Analyse der sogenannte Glyoxylatzyklus als beste Möglichkeit dar, da der Zyklus Wachstum auf Methanol (und Acetat) wiederherstellen sollte – und damit gleichzeitig die Crotonsäure-Produktion ermöglichen sollte (Peryraud et al. 2011; Schneider et al. 2012; Schada von Borzyskowski 2018)

Die entsprechenden genetischen Konstrukte zur Expression des Glyoxylatzyklus und der Thioesterase wurden erzeugt, wozu das bekannte Plasmid pCM80 als Expressionsplasmid etabliert wurde (Marx et al. 2001).

1.2 Einbringen von GC in AM1 Wirtsstämme & Charakterisierung der Stämme (2.1.1) Selektion und Evolution der AM1 Stämme & Analyse von Mutationen (2.1.2)

Um Crotonsäure aus *M. extorquens* zu gewinnen, wurde eine Deletion in der Gensequenz der Crotonyl-CoA Carboxylase/ Reduktase (*ccr*) in den Laborstamm *M. extorquens* AM1 eingeführt, welche zur intrazelluläre Akkumulierung von Crotonyl-CoA führen sollte. Der CoA-

Ester sollte anschließend durch Überexpression eines *Escherichia coli* Thioesterase-Gens (*yciA*) in *M. extorquens* AM1 Δccr in freie Crotonsäure umgewandelt werden. Zu Beginn des Projekts wurde die *M. extorquens* AM1 Δccr Mutante erzeugt und evolviert, um einen Wirtstamm für die Produktion von Crotonsäure auf Methanol (bzw. Acetat) zu erhalten.

Damit der Organismus trotz der Deletion in *ccr* auf Methanol wachsen kann, wurde der Glyoxylat-Shunt bestehend aus einer Isocitrat-Lyase (*aceA*) und einer Malat-Synthase (*aceB*) über das Plasmid pCM80 eingeführt, was zunächst in *M. extorquens* AM1 getestet wurde. Ein anschließendes Wachstumsexperiment zeigte, dass die Zellen die Fähigkeit auf Methanol zu wachsen verloren hatten, worauf die Expressionslevel von *aceA* und *aceB* getestet wurden. Dabei wurden native Promotoren verschiedener Stärken (*pfumC*, *pcoxB*, *pmxaF*) vor das *aceA-aceB* Operon kloniert. Es stellte sich heraus, dass sich ein Promotor mittlerer Stärke (*pcoxB*) am besten für die Expression der beiden Gene eignet, um Wachstum auf Methanol zu ermöglichen. Das resultierende Plasmid pCM80 *pcoxB-aceAB pmxaF-yciA* gilt als essentielles genetisches Element, das Wachstum auf Methanol trotz eines disruptiven Ethyl-Malonyl-CoA Pathways (EMCP) ermöglicht. Beim der Kultivierung des Stammes und durch Fütterungsstrategien konnten bis zu 25 μ M Crotonsäure im Überstand gemessen werden.

Im weiteren Verlauf wurden Engpässe festgestellt, die der Synthese von Crotonyl-CoA (und damit der Produktion von Crotonsäure) potentiell hinderlich sein könnten. Einer dieser Engpässe ist die Synthese von Polyhydroxybutyrat (PHB), ein Kohlenstoffspeicherstoff, welcher über eine β -Ketothiolase (Gen *phaA*), eine Acetoacetyl-CoA Reduktase (Gen *phaB*) und eine Polyhydroxybutyrat Synthase (Gen *phaC*) produziert wird. Eine Deletion von *phaC* in Kombination mit Δccr erwies sich jedoch als lethal, weshalb CRISPR interference (CRISPRi) etabliert wurde, um einen ähnlichen Phänotypen über Knockdowns zu erzeugen. Diese Strategie wurde im produktionsrelevanten Wirtstamm PA1 weiterverfolgt (siehe 1.3)

Das Wachstum des *M. extorquens* AM1 Δccr Stammes mit dem zuvor erwähnten pCM80 *pcoxB-aceAB pmxaF-yciA* Plasmid wurde auf Succinat, Methanol und Acetat getestet. Während der Stamm gut auf Succinat und Acetat wuchs, war das Wachstum auf Methanol noch immer sehr schwach. Aus diesem Grund wurde eine adaptive Laborevolution (ALE) auf Methanol durchgeführt. Dabei sollte das Wachstum von *M. extorquens* AM1 auf Methanol über serielle Überführungen in Wachstumskolben mit Minimalmedium, mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle, verbessert werden. Auf diese Weise wurden die Dopplungszeiten von *M. extorquens* AM1 von 108 h auf 8.2 h über 52 serielle Transfers verringert. Eine anschließende Analyse des Genoms von *M. extorquens* AM1 Evo 52 zeigte eine Anhäufung verschiedener Mutationen. Insbesondere Punktmutationen in den Genen für die Phosphoribulokinase (*prk*) und der Isocitratdehydrogenase (*icd*) waren interessant.

Prk ist essentiell für methylotrophes Wachstum, da es 1.5-Bisphosphat produziert. Dies ist ein wichtiger Co-Induzierer für den Serin Cycle Regulator QscR, welcher in der Assimilation von C1 Substraten involviert ist. Die Mutation in *prk* wurden über Enzym-Assays und Proteomics

analysiert, wobei kein signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität und –funktionalität im Vergleich zur Wildtyp-Variante festgestellt wurde. Die Punktmutationen in der Promotorregion und im aktiven Zentrum von *icd* wurden ebenfalls analysiert. Hierbei wurde eine Änderung im Enzymvorkommen und in dessen Aktivität identifiziert. Die Mutation in der Promotorregion bewirkt eine höhere Abundanz des Enzyms, welches jedoch aufgrund der Mutation im aktiven Zentrum eine geringere Aktivität aufweist. Hierbei wird vermutet, dass eine Art Fine-Tuning im Gleichgewicht zwischen dem Citratzyklus und dem Glyoxylat Shunt erreicht wurde, da Isocitrat das gemeinsame Substrat von AceA und Icd ist.

1.3 Konstruktion entsprechender *Methylobacterium* PA1 Wirtsstämme (3.2.1), Selektion und Evolution von PA1 Stämmen & Analyse von Mutationen (2.1.2)

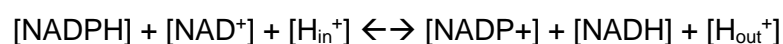
Als zukünftiger Crotonat-Produktionsstamm kamen vier *M. extorquens* PA1 Stämme infrage, welche von UMR bereitgestellt wurden. Diese Stämme wurden von uns zuvor kurz auf Methanol evolviert und besitzen unterschiedliche genetische Hintergründe. So haben Stämme *M. extorquens* PA1 2.11 und 2.21 keine „landing pads“, während 4.11 und 4.21 diese in ihrem Genom integriert haben. Die Integration dieser genetischen Features ermöglicht einfaches Einbringen von Genen über Serin-Integrasen, was die Konstruktion und die Modifikation eines *Methylobacterium* Wirtsstammes deutlich erleichtert. Die Zahlen „11“ und „21“ stellen die Anzahl von Transfers dar, welche während der Evolution durchgeführt wurden. Der Stamm 2.11 ist somit weniger Transfers durchlaufen als 2.21. Die vier Stämme wurden mit der oben beschriebenen *ccr* Deletion (Δccr), sowie einer Deletion des Cellulose Synthase (Δcel) versehen, da die Expression der Cellulose Synthase in Flüssigmedium zu Klumpenbildung führt. In den *M. extorquens* PA1 $\Delta ccr \Delta cel$ Hintergrund wurde dann der Glyoxylatzyklus über das pCM80 Plasmide eingeführt und das Wachstum auf Succinat und Methanol charakterisiert. Hierbei konnte Wildtyp-ähnliches Wachstum auf Succinat beobachtet werden, während das Wachstum auf Methanol sehr schwach war. Stamm 4.21 zeigt das vergleichsweise beste Wachstum auf Methanol, und wurde deshalb für eine adaptive Laborevolution (ALE) ausgewählt, um dieses Wachstum zu verbessern. Er eignet sich aufgrund seiner integrierten landing pads außerdem besonders als Produktions-Wirt, da das Produktionsspektrum über vereinfachte Genetic Engineering Methoden, die von Partner UMR entwickelt wurden potentiell schnell verbessert werden könnte.

Durch die ALE wurde das Wachstum auf Methanol verbessert, wobei eine Verringerung der Dopplungszeiten von über 42.5 h auf 15.5 h erzielt werden konnte (Abbildung 1). Durch die Sequenzierung des Genoms des evolvierten Stammes wurden einige Punktmutationen identifiziert, wobei keine der Mutationen direkt im Kohlenstoff-Metabolismus von *M. extorquens* P1 involviert scheint (Tabelle 1). Es wurde auch eine Stelle im Genom entdeckt, welche im Laufe der ALE in unterschiedlichen Kopienzahlen vorliegt. Während der Wildtyp-Stamm Δcel drei Kopien dieser Region besitzt, besitzt die schnell-wachsende Evolution 17 nur noch eine. Diese Region ist etwa 100 kb groß und wird von identischen Sequenzen flankiert, die diese

Vervielfältigung ermöglicht. Eine genauere Analyse dieser Region zeigte einige Gene, die eine Rolle für das Wachstum des *M. extorquens* Δccr Deletionsstammes auf Methanol spielen könnten. Beispielsweise sind vermehrt Gene für NADH-Dehydrogenasen entdeckt worden, die Einfluss auf die Redox-Balance haben könnten. Außerdem enthält diese Region das Gen für die Methylmalonyl-CoA Epimerase (*mce*), ein Enzym des EMCP. Weitere Analysen (z.B. Enzymassays) der gefundenen Punktmutationen und der multiplizierten Region werden nötig sein, um eine mögliche Verknüpfung zum verbesserten Wachstum auf Methanol festzustellen.

1.4 Optimierung des Produktionsspektrums durch metabolisches Engineering von PA1 Stämmen (4.1.1) Test der Stämme unter Prozessbedingungen (4.2.1)

Um einen geeigneten *Methylobacterium* Wirtsstamm zu erhalten, sollte die die Synthese von PHB verringert werden, damit der Kohlenstoff-Fluss in Richtung EMCP geleitet wird. Wie oben erwähnt (siehe 1.2) konnte das *phaC* Gen im Hintergrund des Δccr Stamms nicht einfach zusätzlich ausgeschaltet werden („Knockout“), weshalb auf eine CRISPR interference Strategie gewechselt wurde, mit deren Hilfe die Expression des *phaC* Gens unterdrückt („Knockdown“) werden sollte (Mo et al. 2020). Hierfür wurden Plasmide mit einer IPTG-induzierbaren dCas9 und einer guide RNA, welche gegen das Zielgen gerichtet ist, gebaut und in *M. extorquens* PA1 Stämme eingeführt. Das *phaC* Knockdown Plasmid wurde in $4.21 \Delta cel \Delta ccr$ PA1 Stamm (und komplementär wurde ein *ccr* Knockdown Plasmid auch in einem $\Delta cel \Delta phaC$ Stamm) getestet. Das Wachstumsexperiment auf Methanol zeigte, dass $\Delta phaC$ Stämme, in denen die dCas9 induziert wurde, schwächer wachsen als die nicht-induzierten Varianten. Wachstum scheint demnach trotz des Knockdowns noch möglich und der erwünschte Effekt wurde scheinbar erzielt. Aktuell wird das Experiment wiederholt und das Proteom und Transkriptom der Kulturen untersucht. Es werden außerdem neue Plasmide konstruiert, in denen die guide RNA ebenfalls unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors liegt, um die Kontrolle der Knockdown-Induktion zu verstärken. Ein zusätzlicher Ansatz einen *Methylobacterium* Wirtsstamm über die doppelte Deletion von *ccr* und *phaC* zu erhalten ist das Verhindern der beobachteten Letalität. Ein Grund für diese Letalität könnte die Akkumulation von NADPH sein, welches durch die Deletion in *ccr* nicht mehr in NADP⁺ umgesetzt wird. Zusätzlich entfällt über die Deletion in *phaC* und die damit verbundene verringerte Synthese von PHB ein „electron sink“, welches ebenfalls die Umwandlung von NADPH in NADP⁺ begünstigt. So wird die intrazelluläre Redox-Balance gestört; ein toxischer Effekt für Zellen, der bereits häufig in der Literatur beschrieben wurde. Um dies zu umgehen, wird eine lösliche Transhydrogenase (*sthA*) über ein Plasmid eingeführt. Dieses Enzym katalysiert die folgende Reaktion:



Organismen, welche keinerlei Transhydrogenasen besitzen, sind nicht in der Lage Dysbalancen zwischen katabolischer NADPH Produktion und anabolischem NADPH Abbau

zu tolerieren. Entsprechende Plasmide für die Expression von *sthA* sind bereits konstruiert worden. Ob so die Letalität von *M. extorquens* PA1 Δ *ccr* Δ *phaC* beseitigt werden kann wird über Experimente aktuell überprüft.

Durch die Interferenz des PHA Stoffwechsels mit der Crotonsäure-Produktion und aufgrund der unerwarteten Letalität des Doppelknockouts, fielen die Arbeiten insgesamt komplexer und zeitaufwendiger aus als ursprünglich angenommen. Insofern konnte die finale Strategie, d.h. die Messung der Crotonsäure Konzentration unter Produktionsbedingungen im zeitlich vorgesehenen Rahmen nicht vorgenommen werden – bzw. machte ohne die oben angesprochenen Verbesserungen im Produktionsstamm (Transhydrogenase, Knockdown anstatt Knockout) keinen Sinn. Allerdings konnten wie im Vorhaben anvisiert, grundsätzlich funktionale Produktionsstämme erzeugt werden und metabolische Engpässe in der Crotonsäure-Produktion, sowie Mitigationsstrategien identifiziert werden.

2 Geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Wir planen gegen Ende des Jahres eine Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse. Dazu zählt zum einen eine gemeinsame Publikation mit Partner UMR (UMR in führender Autorenschaft), die die etablierten genetischen Werkzeuge, sowie den genetisch optimierten *M. extorquens* PA1 Plattformstamm beschreiben und einige Anwendungen aus unseren Versuchen zeigen. Darüber hinaus planen wir eine eigene Veröffentlichung, in der wir das Einbringen und Optimieren des Glyoxylatzyklus in *M. extorquens* beschreiben und verschiedene Strategien zur Gewinnung von Crotonsäure aus Methanol und Acetat-Fütterung beschreiben.

Bibliografie

- Green, P. N. and J. K. Ardley (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol **68**(9): 2727-2748.
- Marx, C. J. and M. E. Lidstrom (2001). Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. Microbiology (Reading) **147**(Pt 8): 2065-2075.
- Mo, X. H., H. Zhang, T. M. Wang, C. Zhang, C. Zhang, X. H. Xing and S. Yang (2020). Establishment of CRISPR interference in *Methylorubrum extorquens* and application of rapidly mining a new phytoene desaturase involved in carotenoid biosynthesis. Appl Microbiol Biotechnol **104**(10): 4515-4532.
- Peyraud R., K. Schneider, P. Kiefer, S. Massou, J.A. Vorholt and J.C. Portais (2011) Genome-scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1. BMC Syst Biol **5**:189
- Schada von Borzyskowski, L., F. Sonntag, L. Poschel, J. A. Vorholt, J. Schrader, T. J. Erb and M. Buchhaupt (2018). Replacing the ethylmalonyl-CoA pathway with the glyoxylate shunt provides metabolic flexibility in the central carbon metabolism of *Methylobacterium extorquens* AM1. ACS Synth Biol **7**(1): 86-97.
- Schneider, K., R. Peyraud, P. Kiefer, P. Christen, N. Delmotte, S. Massou, J.C. Portais and J.A. Vorholt (2012) The ethylmalonyl-CoA pathway is used in place of the glyoxylate cycle by *Methylobacterium extorquens* AM1 during growth on acetate. J Biol Chem **287**(1):757-766.

Appendix:

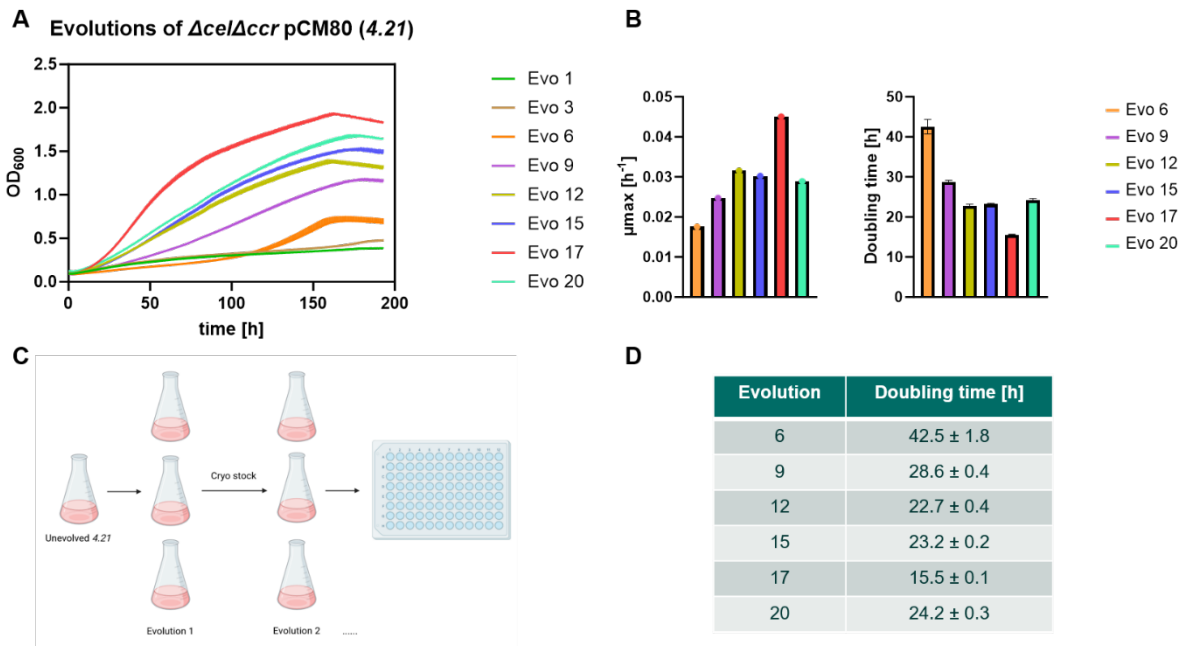


Abbildung 1: Evolution von *M. extorquens* PA1 4.21 $\Delta cel\Delta ccr$ pCM80 *pcoxB-aceAB pmxAf-yciA*. A: Tecan-Wachstumsexperiment, in welchem verschiedene Stellen der Evolutionen auf ihr Wachstum auf Methanol getestet wurden. Zellen wurden mit minimal Medium und Methanol als Kohlenstoffquelle in einer 96-well Plate bei 30°C inkubiert und ihr Wachstum wurde über 196 Stunden aufgezeichnet. B: Wachstumsrate und Verdopplungszeit der verschiedenen Evolutionen. C: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der ALE. Der nicht-evolierte Stamm wurde in einen Kolben mit minimal Medium und Methanol inokuliert. Die wachsende Kultur wurde auf drei weitere Kolben übertragen, wovon anschließend die Kultur ausgewählt wurde, die das schnellste Wachstum zeigte. Von dieser Kultur wurde ein cryo-Stock angesetzt und die nächste Runde der Evolution wurde inokuliert. D: Verdopplungszeiten der Evolutionen.

Tabelle 1: Ergebnisse der Genomsequenzierung von Δcel , 4,21 $\Delta cel\Delta ccr$ und 4.21 $\Delta cel\Delta ccr$ Evolution 3, 9 und 17. Dargestellt ist die genomische Position der Punktmutationen, der Effekt der Mutation auf die betroffene Aminosäure und das betroffene Protein.

Position	Mutation	Strain					Product
		WT	4.21	Evo 3	Evo 9	Evo 17	
1690782	G 1 nt deletion	+	+	+	+	+	type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin
3838945	G 1 nt deletion	+	+	+	+	-	transglycosylase SLT domain-containing protein
192849	G G > A; P > L	+	+	+	+	+	integration host factor subunit beta
286861	G G > A; Gly > Glu	-	+	+	-	-	hypothetical protein
1058171	G C > T; Thr > Ile	-	+	+	+	+	Phosphoribulokinase
3493508	G A > C; His > Gln	-	+	-	+	+	aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme
1001062	G 1 nt insertion	-	-	-	+	+	MarR family transcriptional regulator
342345	G G > A; Ala > Thr	-	-	-	-	+	AAA family ATPase
1610492	G A/G > C; Ile/Thr > Ser	-	-	-	-	+	DUF1772 domain-containing protein
2926856	G C > A; Leu/Phe > Ile	-	-	-	-	+	LUD domain-containing protein
3305989	G G > A; Arg > Cys	-	-	-	-	+	deoxyribose-phosphate aldolase
5107746	G G > T; Gly > Cys	-	-	-	-	+	hypothetical protein
8424	P 17 nt insertion	-	+	+	+	+	Intergenic region of aceA and aceB
9441	P A > G; Val > Ala	-	+	+	+	+	aceB