

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

**Mikrobielle Nutzung von C1-Verbindungen für die Wertstoffproduktion
durch integrierte System- und synthetische Biologie**

Zuwendungsempfänger:

Universität Bielefeld (Prof. Dr. Volker F. Wendisch)

Förderkennzeichen:

22023617

Laufzeit:

01.10.2018 bis 31.09.2021

Monat der Erstellung:

10/2021

Veröffentlichungsdatum:

5.5.2022

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

INHALTSVERZEICHNIS SCHLUSSBERICHT

1. ZIELE	2
DAS C1PRO-PROJEKT ZIELTE DARAUF AB, EINE NACHHALTIGE PLATTFORM FÜR DIE METHANOL-BASIERTE PRODUKTION VON WERTVOLLEN ZIELPRODUKTEN MIT BEWÄHRTEN INDUSTRIELLEN ANWENDUNGEN ZU SCHAFFEN.	2
1.1 Fachlicher Hintergrund	2
1.2 Aufgabenstellung	3
1.3 Stand der Technik	5
1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	8
1.4.1 Partner UNIBI	8
1.4.2 Partner BASF	9
1.4.3 Partner NTNU (Koordinator)	10
1.4.4 Partner INSA	11
1.4.5 Partner SINTEF	12
1.4.6 Partner Acies	13
2. ERGEBNISSE	15
2.1 Erzielte Ergebnisse	15
2.2 Verwertung	20
2.3 Erkenntnisse von Dritten	21
2.4 Veröffentlichungen	21
2.5 Erreichungsstand und Verwertungsabsichten	22
3. ANHANG ZUR AUSFÜHRLICHEN DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER UNIBI	25

Schlussbericht

1. Ziele

Das C1Pro-Projekt zielte darauf ab, eine nachhaltige Plattform für die Methanol-basierte Produktion von wertvollen Zielprodukten mit bewährten industriellen Anwendungen zu schaffen.

1.1 Fachlicher Hintergrund

Angesichts der Ressourcenknappheit benötigt die Gesellschaft dringend nachhaltige Produktionsverfahren für wichtige Plattformchemikalien, die in verschiedenen Branchen Anwendung finden. Die Entwicklung einer Bioökonomie ist ein Eckpfeiler zur Bewältigung dieser großen Herausforderung. Die Bioökonomie kann einen wichtigen sozioökonomischen Beitrag leisten, die Gesundheit verbessern, die Produktivität von Landwirtschaft und Industrieprozessen steigern und die ökologische Nachhaltigkeit verbessern.

Das C1Pro-Projekt zielte darauf ab, eine nachhaltige Plattform für die Methanol-basierte Produktion von wertvollen Zielprodukten mit bewährten industriellen Anwendungen zu schaffen. Methanol ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften, seines niedrigen Preises und seiner Verfügbarkeit sowohl aus fossilen als auch aus erneuerbaren Quellen ein attraktiver alternativer Rohstoff für biotechnologische Prozesse. Das Gram-positive, methylophile und thermophile Bakterium *Bacillus methanolicus* wurde aus mehreren Gründen als Modellorganismus für dieses Projekt ausgewählt: Es nutzt Methanol als Rohstoff für Wachstum und Energie, wächst bei erhöhten Temperaturen (50 - 55 °C), produziert von Natur aus L-Glutamat, und ein hohes Potenzial zur Überproduktion von L-Lysin konnte für klassische Mutanten gezeigt werden. Daher wurden innovative Technologien in den Bereichen Modellierung, Entwicklung von genetischen Werkzeugen, Stammeszüchtung, Fermentationstechnologie und nachgelagerte Verarbeitung angewendet, um eine Methanol-basierte Produktion aufzubauen und zu entwickeln.

Vier verschiedene Produkte, γ -Aminobuttersäure (GABA), 5-Aminovalerat (5AVA), L-Prolin (L-pro) und L-Pipecolinsäure (L-PA), wurden bewusst ausgewählt, da sie a) Biosynthesewege, b) funktionelle Eigenschaften und c) industrielle Anwendungen gemeinsam haben. Die ω -Aminosäuren GABA und 5AVA können durch Lactamisierung cyclisiert werden, während L-Pro und L-PA cyclische Aminosäuren sind. Die Biosynthese von L-Pro und GABA beginnt mit L-Glutamat, während L-PA und 5AVA von L-Lysin abstammen. Die Zielprodukte dienen als Bausteine für Polymere oder Vorstufen von Arzneimitteln und anderen biologisch aktiven Substanzen. Die Gemeinsamkeiten der gewählten Produktpaare GABA/5AVA und L-Pro/L-PA ermöglichen eine Übertragbarkeit: Die Prozessintensivierung und die Entwicklung des nachgeschalteten Prozesses (DSP) für ein Beispiel (GABA) kann parallel zur Entwicklung des Ausgangsstamms und der Fermentation für die anderen Produkte durchgeführt werden.

Systembiologische und synthetisch-biologische Ansätze sind der Schlüssel für die vorgeschlagene Stamm- und Prozessentwicklung, die durch gemeinsame Biosynthesewege erleichtert wird.

Neuartige genetische Werkzeuge werden die regulierte Genexpression auf verschiedenen Ebenen durch CRISPR/Cas9 für Genomveränderungen und Riboswitche für Regelkreise vereinfachen. Das Design der Stoffwechselwege wurde durch das genomweite Stoffwechselmodell geleitet, das auf der Grundlage experimenteller Testergebnisse iterativ fein abgestimmt wird. Die Leistung der Stämme in Methanol basierten Fermentationen wurden durch RNAseq-, Metabolom- und/oder Flux-Analysen eingehend charakterisiert werden.

Alle Daten wurden auf eine LCA-konforme Weise gesammelt und zur Auswahl der vielversprechendsten Produkte für eine Hochskalierung verwendet. Aufgrund der gemeinsamen funktionellen Eigenschaften und Anwendungen der beiden komplementären Paare GABA/5AVA und L-Pro/L-PA ist es denkbar, dass die entwickelten Fermentations- und nachgeschalteten Prozessstrategien (DSP) verallgemeinert und auf die Produktion der verwandten Produkte übertragen werden können.

1.2 Aufgabenstellung

Folgende Ergebnisse und Nebenergebnisse sowie wesentliche Erfahrungen wurden gewonnen.

Im Rahmen des WP1 wurde für die Produktion von GABA die Glutamatdecarboxylase von *Sulfobacillus thermosulfidooxydans* (*gadSt*) ausgewählt und anschließend von slowenischen Projektpartnern in einem vorläufigen Experiment hinsichtlich der GABA Produktion getestet und erreichte einen Titer von 8.5 g/L GABA. Die Versorgung durch den Vorläufermetaboliten Glutamat, wurde zudem durch klassische Mutagenese und Medienoptimierung gesteigert (WP6). Eine dieser Mutanten wurde für eine genomische, transkriptomische und metabolomische Analyse ausgewählt (WP5). Eine genomische Analyse ergab im Vergleich zum Wildtypstamm unter anderem eine hohe Anzahl an Mutationen, die im Zusammenhang mit der Zellwandsynthese stehen.

Im Zuge der Stammentwicklung für die Produktion der Lysinderivate 5-aminovaleriansäure (5AVA) und L-Pipecolinsäure (L-PA) (WP2, WP4) hat das Bielefelder Team Plasmide basierend auf dem Vektor pBV2xp konstruiert (s. Anhang), diese an die Projektpartner versendet und getestet. Dieses Plasmid wurde von norwegischen Projektpartnern der NTNU für die 5AVA Produktion vorläufig getestet. Alternativ hierzu wurden Plasmide mit Lysin- und Putrescin Oxidasen konstruiert. Die Funktion der Putrescin Oxidasen in einem 3-schrittigen Stoffwechselweg wurden vorab in dem Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum* in Bielefeld bestätigt. Die Putrescin Oxidase aus *Rhodococcus qingshengii* erreichte durch Stammmodifikation und ausreichende Sauerstoffversorgung einen Titer von 3.7 g/L 5AVA (WP2). Zudem wurden von dem Projektpartner NTNU durch heterologe Expression von Lysin-Oxidasen, Piperidein 2-carboxylat Reduktasen und der homologen Expression der nativen Katalase 0.5 mg/L Pipecolinsäure produziert (WP4).

In Bielefeld konnte bereits das genetische Tool CRISPR interference in *B. methanolicus* zusammen mit norwegischen Projektpartnern entwickelt und etabliert werden (WP3). Neben den bereits erfolgreich getesteten Zielgenen *spo0A*, *mtlD* und *kataA*, wurden auch die für *B. methanolicus* relevanten Gene *fbaC/P*, *hps*, *phi*, *glpXC/P* und *tktC/P* untersucht, welche bei der Methanol Verstoffwechselung im Ribulose-Monophosphat-Pathway (RumP) eine große Rolle spielen (s. Anhang). Zudem konnte durch gezielte Herunterregulierung der *odhA* Genexpression der metabolische Fluss im Tricarbonsäurezyklus umgelenkt werden, und so eine erhöhte Glutamatproduktion (3.7 ± 0.4 mg g⁻¹) erzielt werden (s. Anhang).

Da dCas9 bisher durch einen metabolisierbaren Induktor (Mannitol) induziert wurde, wurden Optimierungen an dem piCas Plasmid durchgeführt und das Plasmid pxiCas konstruiert (s. Anhang). Die Mannitol-induzierbaren Promotoren wurden zum einen durch den Xylose-induzierbaren Promoter *xp* von *Bacillus megaterium* ersetzt, welche nun die Expression von dCas9 induziert. Zum anderen befindet sich vor der single guide RNA nun ein konstitutiver, endogener Methanol-Promoter (*mdh*).

Mittels Python wurde eine CRISPR Bibliothek bereitgestellt, die eine benutzerdefinierte Auswahl an sgRNAs für ca. 95% der Gene des Stammes *B. methanolicus* MGA3 bietet.

Nachdem die Toleranz von *B. methanolicus* für 5AVA durch ein adaptives laboratives Evolutionsexperiment von 10 mM auf 400 mM erhöht wurde (WP5), wurden die evolvierten Mutanten sequenziert. Es wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) beobachtet und drei dieser Mutationen im Vergleich zum Ausgangsstamm für die weitere Analyse ausgewählt (s. Anhang). Diese kommen teilweise in Genen vor, welche im Zuge einer vorhergegangenen differentiellen RNA-Seq Analyse eine signifikant verstärkte oder verminderte Expression aufwiesen. Es wurden Plasmide basierend auf pBV2xp konstruiert, welche die drei Zielgene inklusive SNPs beinhalten. Die homologe Überexpression des Gens, das für das Eisensiderophor-bindende Protein kodiert, in Kombination mit erhöhten Eisenspiegeln ergab eine spezifische Änderung der Toleranz gegenüber 5AVA.

Die Bielefelder Kommunikations- und Disseminationsaktivitäten wurden fortgesetzt (WP7). Aufgrund der derzeitigen Covid-19 Situation fand im Jahr 2020 keine „teutolab-Akademie Systembiologie“-Woche für naturwissenschaftlich-begeisterte Schüler statt. Allerdings wurde in Zusammenarbeit mit dem Bielefelder Teutolab Team und in Kooperation mit dem ERA CoBioTech Projekt „Indie“ ein interaktives Lernvideo für die Schüler gedreht. Kerstin Schultenkämper stellte in diesem Video unter

anderem die Methanol-basierte und nachhaltige Produktion von Aminosäuren, sowie die Entwicklung von CRISPR interference vor (s. Angang).

Des Weiteren sind die wichtigsten Ergebnisse des Konsortiums kurz gelistet:

Im Förderzeitraum gelang es allen Projektpartnern des Konsortiums, neue und verbesserte Protokolle für die Kultivierung und genetische Manipulation von *B. methanolicus* erfolgreich einzuführen, was aufgrund der komplexen Physiologie dieses Organismus eine relativ schwierige Aufgabe war. Darüber hinaus wurde eine enge Zusammenarbeit zwischen den Partnern erreicht, die sich in einer gemeinsamen Veröffentlichung, aber auch in einem effizienten wissenschaftlichen Austausch von Protokollen, Erfahrungen und Ideen widerspiegelt. Speziell:

- Der SME-Partner Acies Bio kam ohne vorherige Erfahrung mit methylotrophen Organismen oder *B. methanolicus* zu C1Pro. In der kurzen Anfangsphase des Projekts hat Acies Bio einen sehr effizienten Technologietransferprozess dieses Stammes erreicht, einschließlich allgemeiner Manipulationsverfahren mit hoher Durchsatztechniken der Mikrobiologie, Kultivierung im Bioreaktor-Maßstab, sowie Ansätze zur genetischen Manipulation. Dies zeigt ein sehr hohes Potenzial von *B. methanolicus* im industriellen Maßstab.

- INSA hat ein Genom-Modell in einem Standarddatenformat (SBML) und Flusskarten von *B. methanolicus* unter drei verschiedenen Bedingungen erstellt. Die biologischen Experimente wurden durchgeführt, um mutmaßliche Kohlenstoffquellen für *B. methanolicus* weiter zu charakterisieren. INSA hat auch eine Biomassenbestimmung durchgeführt.

- NTNU etablierte erstmals ein Konjugationsprotokoll für *B. methanolicus*. Genom-Engineering ist entscheidend für die Stammentwicklung. Trotz jahrelanger Versuche verschiedener Arbeitsgruppen fehlt für *B. methanolicus* jedoch immer noch ein gezieltes Ausschalten der chromosomalen Gene. Die in diesem Projekt erzielte erfolgreiche Konjugationsmethode ist ein großer Schritt in Richtung Genombearbeitung in *B. methanolicus*.

- NTNU erreichte zudem das Proof-of-Concept für die Produktion von 5AVA und L-Pipecolinsäure.

- UNIBI entwickelte einen 5AVA-resistenten Evolutionsstamm von *B. methanolicus*.

- UNIBI etablierte ein Gene-Silencing-System, CRISPR interference, das ein wichtiger erster Schritt in Richtung genomischer Modifikationen ist.

Planung und Ablauf des Vorhabens: Das Projekt wurde in sieben WPs unterteilt, von denen jeder Projektpartner eines leitete. Die WPs stützten sich auf die Expertise des leitenden Partners. Die sechs Forschungs-WPs (WP1-6) konzentrierten sich auf die Etablierung der Produktion verschiedener industriell relevanter Verbindungen ausgehend von Methanol und deren Optimierung auf der Basis eines iterativen Design-Build-Testzyklus und eines (WP7) zu Management, Dissemination und Responsible Research und Innovation (RRI). Die vier akademischen Partner und ein Unterauftragnehmer der BASF (NTNU, SINTEF, INSA, UNIBI, Universität Marburg) haben sich hauptsächlich mit den rationalen Stammdesign- und Proof-of-Concept-Experimenten befasst, während die beiden Industriepartner (BASF, ACES BIO) sich auf Fermentations- und Downstream-Processing-Strategien konzentrierten. Jeder Partner verfügt über Expertise in verschiedenen Bereichen der System- und synthetischen Biologie sowie der Bioprozesstechnologie. INSA bietet Expertise in metabolischer Modellierung und Funktionsanalyse (Fluxomics, Metabolomics), unterstützt durch frühere Beteiligung an Projekten zum C1-Stoffwechsel von Mikroorganismen. NTNU bringt Fachwissen über Stoffwechsel und Genetik von *B. methanolicus* ein. SINTEF verfügt über Erfahrung in Fed-Batch-Methanol-Fermentationen, in der Herstellung genetischer Werkzeuge sowie in der Entwicklung und Charakterisierung von Prozessen. UNIBI mit seiner großen Erfahrung im Metabolic Engineering des industriell relevanten *C. glutamicum*, in der Transkriptomik und zum C1-Metabolismus wendete modernste Technologien in der Stammentwicklung an. Die Universität Marburg, die im Unterauftrag von BASF tätig war, bietet spezifisches Know-how in der Molekularbiologie und den genetischen Instrumenten von Bacilli sowie Expertise in der mikrobiellen Stressantwort und Biosynthese von Osmolyten (wie L-Pro). Die Industriepartner (BASF und ACIES BIO) verfügen über umfangreiche Erfahrungen entlang der gesamten Prozesskette von der Entwicklung von Tensiden über Fermentationen, die Weiterverarbeitung, die chemische Nachfolgekonzentrierung bis hin zum Scale-up. Die Erreichung der Projektziele erforderte daher einen Beitrag aller Partner.

Das Projekt konnte durch den sehr großen Einsatz der Partner trotz der Pandemie im geplanten Zeitraum mit den geplanten Zielen erfolgreich bearbeitet werden.

1.3 Stand der Technik

In der industriellen Biotechnologie werden traditionell Rohrzucker, Melasse oder Glukosesirup als Rohstoffe für die Herstellung verschiedener Massen- und Spezialchemikalien eingesetzt. Aufgrund der Konkurrenz mit der Nahrungsmittelindustrie um Ressourcen wie Anbauflächen und Wasser steigt der Bedarf an alternativen Rohstoffen, die für die biotechnologische Industrie geeignet sind. Ein-Kohlenstoff (C1) -Verbindungen wie Methan und Methanol gewinnen an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit, weil sie als Kohlenstoff- und Energiequellen für bestimmte spezialisierte Mikroorganismen, die Methylolepten, dienen können. So kann Methanol potenziell als alternativer Rohstoff in biotechnologischen Prozessen eingesetzt werden.

Methanol ist eine Massenchemikalie mit einer jährlichen Produktion von mehreren Millionen Tonnen und ein wesentlicher Bestandteil der chemischen Wertschöpfungskette. Es wird industriell aus Synthesegas hergestellt, einem Gasgemisch aus Wasserstoff und Kohlendioxid, das üblicherweise aus Erdgas gewonnen wird. Es wurden bereits alternative Wege für die (Bio-) Methanolsynthese aus nachwachsenden Rohstoffen wie Biomasse, Biogas aus Deponien, festen organischen Abfällen (Holz und landwirtschaftliche Reststoffe), Bagasse (gemahlene Zuckerrohrfaser) sowie Klärschlamm entwickelt. Desweiteren kann (Bio-) Methanol aus Abfall- und Nebenproduktströmen der Biodieselproduktion (Rohglycerin) und der Papier- und Zellstoffindustrie (Schwarzlauge) hergestellt werden. So wird in den Niederlanden bereits ein Werk, das (Bio-) Methanol aus Glycerin herstellt, kommerziell betrieben. Darüber hinaus wurde kürzlich eine neuartige Technologie entwickelt, bei der Methanol durch katalytische Hydrierung von CO₂ mit H₂ aus der Wasserelektrolyse erzeugt werden. Der für den Prozess benötigte Wasserstoff kann mit Wasser-, Erdwärme-, Atom-, Wind- und Sonnenenergie erzeugt werden. Im Jahr 2012 wurde eine erste kommerzielle Methanolproduktionsanlage eröffnet, in der Methanol mit dieser Technologie synthetisiert und mit Erdwärme versorgt wird. Der Fortschritt bei der Entwicklung alternativer Methoden für die Methanolsynthese könnte in naher Zukunft zu einem Preiserückgang führen, der die Rolle von Methanol als Rohstoff noch weiter stärkt. Methanol ist aufgrund seiner Verfügbarkeit, seines niedrigen Preises und des fehlenden Wettbewerbs mit der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie ein ausgezeichnete Kandidat für biotechnologische Prozesse. Methanol ist ein reiner Rohstoff, der während der Fermentation vollständig verwertet werden kann und damit ein ausgezeichnetes Merkmal, das die Weiterverarbeitung von Bioprodukten erleichtert und es dadurch von Hydrolysaten unterscheidet.

Auf Methanol basierende Fermentationsprozesse können in kleineren Fermentationsbehältern durchgeführt werden, da die Löslichkeit der Substrate weitgehend unproblematisch ist. Methanol ist leicht zu transportieren und zu lagern, und aufgrund seiner Toxizität gegenüber den meisten Mikroorganismen verringert seine Verwendung das Kontaminationsrisiko. *Bacillus methanolicus* ist ein methyloleptes Bakterium, das mit Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Dieser fakultativ methyloleptische Mikroorganismus assimiliert Methanol über den Ribulose-Monophosphat-Weg (RuMP). In den letzten zwei Jahrzehnten wurden bedeutende Fortschritte beim Verständnis des metabolischen Hintergrunds der Methanolnutzung in *B. methanolicus* erzielt. So konnte u.a. gezeigt werden, dass Methanol in einer durch Methanol-Dehydrogenase (Mdh) katalysierten Reaktion zu Formaldehyd oxidiert wird. Es gibt drei Genkopien für Mdh im Genom von *B. methanolicus* und bei Wachstum auf Methanol ist es eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in diesem Organismus auf Transkriptom- und Proteom-Ebene. Das bei der Reaktion der Methanoloxidation gebildete Formaldehyd wird anschließend in zwei Stufen, katalysiert durch 3-Hexulose-6-phosphatsynthase und 6-Phosphohexuloisomerase, mit Ribulose-5-phosphat (Ru5P) zu Fructose-6-phosphat (F6P) kondensiert.

An die Formaldehydfixierung schließt sich die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) an, das durch Triosephosphatisomerase zu GAP umgewandelt werden kann. Das GAP-Molekül wird entweder in

einem 5-stufigen Prozess zu Pyruvat umgewandelt und tritt dann in den Tricarbonsäure (TCA) - Zyklus ein oder wird im Regenerationsteil des RuMP-Stoffwechselwegs wieder zu Ru5P, das für die Formaldehydassimilation verwendet wird, umgesetzt. Darüber hinaus sind in *B. methanolicus* ein zyklischer und zwei lineare Formaldehyd-Dissimilationswege aktiv, um die schädliche Wirkung von Formaldehyd auf den Zellstoffwechsel zu verhindern. Das Wissen über Biochemie, Genetik und Regulation der methylotrophen Stoffwechselwege in *B. methanolicus* hat das Bakterium zu einem wichtigen Modellorganismus für synthetische Methylotrophie gemacht. *B. methanolicus* ist in der Lage, auf Mannitol, Glucose und Arabitol zu wachsen, jedoch mit geringeren spezifischen Wachstumsraten (μ) im Vergleich zu Methanol. Das Wachstum auf Arabitol wurde von UNIBI im Rahmen des ERASysAPP-Projekts MetAPP (Gil-Lopez, unveröffentlicht) entdeckt und charakterisiert. Ein bemerkenswertes Merkmal des am besten untersuchten Stammes, *B. methanolicus* MGA3, ist die natürliche Überproduktion von L-Glutamat in Methanol-kontrollierten Fed-Batch-Fermentationen mit Titern von bis zu 60 g/L. Die L-Glutamat-Biosynthese kann im Wildtyp von *B. methanolicus* durch mehrere Faktoren ausgelöst und beeinflusst werden, wie hohe Zelldichte, Supplementierung mit Spurenmetallen, Oxygenierung oder pH-Werten zwischen 6,3 und 7,0. In *B. methanolicus* wird L-Glutamat in einer durch Glutamatdehydrogenase (Gdh) katalysierten Reaktion aus 2-Oxoglutarat synthetisiert. Interessanterweise hat SINTEF kürzlich gezeigt, dass *B. methanolicus* zwei funktionelle Glutamatsynthasen (GOGAT) besitzt, die die Umwandlung von L-Glutamin und 2-Oxoglutarat in zwei Moleküle L-Glutamat katalysieren. Es ist allgemein bekannt, dass methylotrophe Bakterien Energie und Reduktionsäquivalente aus dissimilatorischen Stoffwechselwegen erzeugen (siehe oben) und nur in einem geringeren Maße über den TCA-Zyklus. Darüber hinaus fehlt einigen Spezies ein vollständiger TCA-Zyklus.

In *B. methanolicus* MGA3 führt das Wachstum auf Methanol als Kohlenstoffquelle zu einem erniedrigten Expressionslevel einiger TCA-Zyklusgene, einschließlich 2-Oxoglutaratdehydrogenase (Odh) Gen, im Vergleich zu nicht-methylotrophem Wachstum auf Mannitol. Das Enzym Odh stellt einen entscheidenden Kontrollpunkt für den Fluss zwischen dem L-Glutamat-Biosyntheseweg und dem TCA-Zyklus dar, und eine niedrige Odh-Aktivität führt zu einer hohen L-Glutamat-Akkumulation. Der Wildtyp *B. methanolicus* MGA3 produziert nur 0,4 g/L L-Lysin in Fed-Batch-Fermentationen mit hoher Zelldichte. Plasmid-basierte Überexpression des Gens, das für die Aspartatkinase, dem Schlüsselenzym der Synthese von Aspartat-abgeleiteten Aminosäuren kodieren, führte zu einem fast 30-fachen Anstieg der L-Lysin-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp unter gleichen Bedingungen mit einem finalen Titer von 11 g/L. Während der Schüttelkolbenkultivierung führte die Überexpression des für die Diaminopimelatdecarboxylase kodierenden Gens, dem letzten Enzym des L-Lysinbiosynthesewegs, zu einer 20-fachen Zunahme der L-Lysin-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp. Die kombinierte Überexpression von Genen, die für Aspartatkinase, 4-Hydroxy-tetrahydrodipicolinat-Synthase und Diaminopimelat-Decarboxylase kodieren, führte zu einer 83-fachen Erhöhung der L-Lysin-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp.

In der Summe haben solche Studien gezeigt, dass *B. methanolicus* MGA3 L-Glutamat überproduziert und ein großes Potenzial für die Konstruktion von Stämmen zur Überproduktion von L-Lysin aufweist. Darüber hinaus können die klassischen *B. methanolicus* Mutantenstämme M168-20 (basierend auf Wildtyp-MGA3) und NOA2 # 13A52-8A66 (basierend auf dem Wildtyp-Stamm NOA2) bis zu 11 bzw. 65 g/L L- Lysin in Methanol-kontrollierten Fed-Batch-Fermentationen mit hoher Zelldichte erreichen. Es wurde kürzlich durch Genomsequenzierung gezeigt, dass es sich bei den *B. methanolicus* Stämmen NOA2 und MGA3 um identische Stämme handelt. Daher wurden die Genome beider Stämme M168-20 und NOA2 # 13A52-8A66 sequenziert und ihre Mutationen auf das Genom des gut untersuchten Elternstamms MGA3 kartiert. Dabei wurden im Wesentlichen Mutationen im hom-1-Gen, das in beiden Stämmen für Homoserin-Dehydrogenase (Hom) kodiert, sowie eine Mutation im dapG, das für die Aspartatkinase I (AKI) in NOA2 # 13A52-8A66 kodiert, entdeckt. Die Mutationen in Hom führten zum Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms und damit zur Umleitung des Stoffwechselflusses in Richtung L-Lysin, und die dapG-Mutation hebt die Feedback-Hemmung der AKI durch meso-DAP auf. Die Mutation in der Region stromaufwärts des Diaminopimelat-Decarboxylase-Gens (lysA) im Stamm NOA2 # 13A52-8A66 führte im Vergleich zum Wildtyp MGA3 zu einem 5-fach erhöhten LysA-Expressionslevel und trug zu einer erhöhten L-Lysin-Akkumulation bei. Diese Studien

zeigen, dass *B. methanolicus* ein hohes Potential für die Überproduktion von L-Lysin aus Methanol hat, und darüber hinaus lieferten sie vertiefende Kenntnisse über die Gene, Enzyme und die Regulation des L-Lysin-Biosynthesewegs, die für das hier vorgeschlagene C1Pro-Projekt von großer Bedeutung sind.

In den letzten Jahren wurden beträchtliche Fortschritte hinsichtlich der Etablierung und Verbesserung von Genexpressionssystemen für *B. methanolicus* MGA3 22 erzielt. Genomische und RNAseq-Daten wurden für die Entwicklung des Mannitol-induzierbaren Promotors und die Identifizierung eines putativen Mannitol-Aktivatorgens *mtlR* verwendet. Darüber hinaus wurde das heterologe Xylose-induzierbare Promotorsystem von *B. megaterium* eingesetzt, um eine stoffwechselneutrale Induktion der Genexpression in *B. methanolicus* zu ermöglichen. Insgesamt wurden vier verschiedene Replikons zur Konstruktion von Expressionsvektoren etabliert und hinsichtlich ihrer Kopienzahl und Segregationsstabilität verglichen und für die Entwicklung eines Zwei-Plasmid-Genexpressionssystems angewendet. Dennoch ist der Mangel an Werkzeugen, die homologe Rekombination und/oder Genomeditierung ermöglichen, eine wesentliche noch zu überwindende Einschränkung des Metabolic Engineering von *B. methanolicus*.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Charakterisierung und Anwendung von Lysin-Riboswitches zur Etablierung von regulatorischen Schaltkreisen in *B. methanolicus*. Riboswitches sind genetische Kontrollelemente, die in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) einiger Messenger-RNAs liegen und die kleine Moleküle als Liganden binden. Ein Beispiel für einen Metaboliten, der an Aptamerdomänen bestimmter Riboswitches binden kann, ist L-Lysin. Ein mutmaßlicher Lysin-Riboswitch wurde im Transkriptom von *B. methanolicus* MGA3 gefunden, und im Rahmen dieses Projekts soll seine Funktionalität zur Regulation der Genexpression analysiert werden. Riboswitches scheinen ein hohes Potential zu haben, sehr robuste regulatorische Elemente zu werden, die in der synthetischen Biologie als Kontrollelemente bei der Regulierung der Genexpression verwendet werden, da sie genau auf die gewünschten Eigenschaften abgestimmt werden können. Der Ansatz der Synthetischen Biologie in seiner Grunddefinition verwendet De-novo-Engineering von genetischen Schaltkreisen, biologischen Modulen und Synthesewegen, um den bakteriellen Stoffwechsel zu rekonstruieren, weshalb die Entwicklung geeigneter Werkzeuge wichtig ist. Ein prominentes Beispiel für die Anwendung eines Lysin-Riboswitches für das metabolische Engineering wurde für *Corynebacterium glutamicum* vorgestellt, wo es zur Kontrolle von konkurrierenden aber essentiellen metabolischen Nebenwegen der L-Lysin-Biosynthese verwendet wurde.

Das C1Pro-Projekt zielt darauf ab, *B. methanolicus* zu einem Plattform-Wirt für die Herstellung von Wertstoffen aus Methanol zu machen. Die als beispielhafte Produkte gewählten Wertstoffe stellen aufgrund ihrer chemischen Struktur und Eigenschaften Paare dar. GABA und 5AVA sind lineare Aminosäuren mit einer zur Carboxylfunktion distalen Aminogruppe, die sich an der γ - bzw. δ -Position befindet. Das andere komplementäre Paar umfaßt die cyclischen Aminosäuren L-Pro und L-PA, die beide als mikrobielle Osmoprotektoren aktiv sind (Figur 2). Bislang wurde die methanolbasierte Produktion dieser Chemikalien im industriellen Maßstab nicht erreicht, und daher ist der vom C1Pro-Konsortium vorgestellte Ansatz wegweisend.

GABA wird durch Decarboxylierung von L-Glutamat synthetisiert. Diese nicht-proteinogene Aminosäure mit vier Kohlenstoffatomen ist an der mikrobiellen Säure-Stressantwort und der Sporulation der beteiligt. GABA wird auf natürliche Weise von Milchsäurebakterien in Gegenwart von L-Glutamat produziert. Die gebräuchlichsten Strategien zur Etablierung der GABA-Produktion aus Glukose sind die Vorläuferversorgung, die (heterologe) Überexpression des Glutamat-Decarboxylase-Gens und das Engineering von Transportproteinen. Die Anwendung dieser Strategien in *C. glutamicum* führte bereits zu einem Stamm, der 70,6 g/L GABA bei 30 ° C während 70 h Fed-Batch-Fermentation mit Glucose als Substrat akkumuliert. Kürzlich wurde vom Projektpartner UNIBI ein neuer Ansatz für die GABA-Produktion in *C. glutamicum* durch Abbau von Putrescin vorgestellt, wobei GABA-Titer von 63,2 g/l aus Glucose in einer Fed-Batch-Kultivierung und einer maximalen volumetrischen Produktivität von 1,34 g/L/h erreicht wurde. Die nachgeschaltete Verarbeitung von GABA beginnt typischerweise mit der Trennung der Biomasse vom Überstand, gefolgt von Filtration, Entfärbung, Entsalzung und Proteinfällung und einer chromatographischen Reinigung.

5AVA leitet sich von L-Lysin ab und entsteht in einem zweistufigen Prozess, katalysiert durch Lysin-Monooxygenase (DavB) und δ -Aminovaleramid-Amidohydrolase (DavA). Die biotechnologische Produktion von 5AVA wurde in *Escherichia coli* und *C. glutamicum* durch heterologe Überexpression von davB und davA etabliert. In einer Fed-Batch-Fermentation in einem komplexen auf Melasse basierenden Medium konnte für einen entsprechend gentechnisch veränderten *C. glutamicum*-Stamm ein Titer von 28 g/L erreicht werden. Kürzlich hat der Partner UNIBI einen Patentantrag für die 5AVA-Produktion in *C. glutamicum* über einen neuen Weg mit einem Titer von 5,1 g/L in Schüttelkolbenkultivierungen für gentechnisch veränderte Stämme eingereicht.

L-Pro ist eine proteinogene, zyklische Aminosäure, die bei vielen Bakterien an der Reaktion auf osmotischen Stress beteiligt ist. L-Pro wird üblicherweise aus L-Glutamat in einem dreistufigen Weg synthetisiert. Einige Spezies synthetisieren L-Pro dagegen aus L-Ornithin. Dieser Weg wurde von UNIBI zur Etablierung einer L-Pro-Überproduktion in *C. glutamicum* verwendet, und es konnte in Schüttelkolbenkultivierung eine Ausbeute von 0,36 g L-Pro /g Glukose erzielt werden. Bisher basiert die biotechnologische Produktion von L-Pro auf D-Glukose als Ausgangsmaterial. Zum Beispiel wurde die L-Pro-Produktion von D-Glukose als Ausgangsmaterial durch eine *Serratia marcescens* Mutante mit defektem L-Pro-Abbaupfad durch die Einführung eines Prolin-Biobricks auf Plasmidbasis mit einem Endtiter von 75 g/l bei der Batch-Kultivierung verbessert. Die Umstellung auf *B. methanolicus* als Produktionswirt mit Methanol als Rohstoff wird die Produktionskosten senken und als Plattform für die Produktion anderer L-Pro-Derivate dienen können.

L-PA ist eine nicht-proteinogene, zyklische Aminosäure und ein Vorläufer vieler Sekundärmetabolite in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren. L-PA ist ein Zwischenprodukt beim DL-Lysin-Abbau, und mehrere verschiedene Wege seiner Biosynthese wurden in Mikroorganismen beschrieben. Die Produktion von L-PA aus L-Lysin wurde kürzlich von dem Partner UNIBI in *C. glutamicum* auf einen Titer von 14,4 g/l in einer Fed-Batch-Fermentation auf Glucose/Saccharose-Basis etabliert. Die im Rahmen dieses Antrags entwickelten Produktionsstämme werden in einem iterativen Design-Build-Test-Zyklus basierend auf genomweiten Modellierungsansätzen optimiert, in dem die Stammeistung im systembiologischen Ansatz durch RNAseq-, Metabolom- und / oder Flussanalysen eingehend charakterisiert wird. Ziel des systembiologischen Ansatzes in diesem Projekt ist es, ein umfassendes und quantitatives Verständnis des Metabolismus ausgewählter Produktionsstämme zu erlangen, was die Vorhersage der nächsten Ziele für das Metabolic Engineering vereinfachen wird. Die breite Charakterisierung der Produktion von Stämmen auf verschiedenen Omics-Ebenen kann das Metabolic Engineering systematisch und global erleichtern und zu effizienteren Engineering-Prozessen führen. Insgesamt werden die Errungenschaften der Synthetischen und Systembiologie, die in der Metabolic Engineering Strategie umgesetzt werden, für die Entwicklung von Stämmen genutzt, um aus Methanol Wertstoffe herzustellen.

1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

C1Pro ist ein internationales wissenschaftliches Konsortium, das von EraCoBiotech Cofund Action finanziert wird. Wir sind sechs Projektpartner aus vier verschiedenen Ländern. Dazu gehören NTNU (Norwegen), die Universität Bielefeld (Deutschland), die Universität Marburg (Deutschland), die Forschungsinstitute INSA (Frankreich) und SINTEF (Norwegen) sowie die Unternehmen BASF (Deutschland) und Acies Bio (Slowenien).

1.4.1 Partner UNIBI

UNIBI mit Prof. Dr. Volker F. Wendisch wird das WP 4 (Entwicklung von L-PA Produktionsstämmen und Anwendung von synthetischen Regelkreisen) leiten und Partner in den anderen WPs sein. UNIBI wird in erster Linie zu Metabolic Engineering und Systembiologie (Transkriptomik) beitragen. Wendisch verfügt über mehr als 20 Jahre Erfahrung im Bereich Metabolic Engineering (> 100 Arbeiten), hat Erfahrung mit *B. methanolicus*-Stämmen und synthetischer Biologie (12 Arbeiten zu *B. methanolicus* seit 2010, meist mit SINTEF / Brautaset und / oder INSA) und Erfahrungen mit Systembiologie insbesondere mit Transkriptomik (seit 2000) einschließlich RNAseq-Analyse von *B. methanolicus* (mit SINTEF / Brautaset). Wendisch betreut(e) 40 Doktoranden. Wendisch arbeitete zuvor mit SINTEF / Brautaset, INSA und BASF an

Methylotrophy (ESF-Projekt SynMet von 2010 bis 2012, FP7-Projekt PROMYSE von 2012 bis 2014 und ERASysAPP-Projekt MetAPP seit 2014) zusammen. Wendisch ist FAIRDOM-Datenverwalter im Projekt MetAPP.

Rolle von UNIBI im Projekt C1Pro

In WP1 (unter der Leitung von ACIES BIO) wird UNIBI zur Verbesserung der GABA-Produktion beitragen, indem RNAseq-Analysen durchgeführt werden, um Ziele für eine weitere rationale Stammverbesserung zu identifizieren. In WP2 (unter Leitung von SINTEF) wird UNIBI eng mit SINTEF und NTNU zusammenarbeiten, um die 5AVA-Biosynthese von L-Lysin auf zwei alternativen Wegen zu etablieren, von denen einer kürzlich von UNIBI patentiert wurde. Transcriptomics werden durchgeführt, um die 5AVA produzierenden Stämme iterativ zu verbessern. WP4 (geleitet von UNIBI) wird sich auf die Stammentwicklung konzentrieren, um L-Lysin produzierende *B. methanolicus*-Stämme für die Produktion von L-PA aus Methanol zu konstruieren. Kürzlich hat UNIBI einen solchen Weg in einem anderen Bakterium realisiert und zusammen mit der metabolischen Modellierung von INSA wird der beste Weg für die Methanol-basierte L-PA-Produktion ausgewählt und implementiert. Mithilfe der Transcriptomics werden L-PA produzierende Stämme iterativ verbessert.

1.4.2 Partner BASF

BASF ist eines der größten Chemieunternehmen. Prof. Dr. Oskar Zelder wird WP3 leiten. Er hat einschlägige Industrieerfahrung als Leiter der Fermentation Products Research bei der BASF. Zelder und sein Team haben eine Reihe von Produktionsorganismen (Bakterien und Pilze) zur Produktion von Chemikalien und Enzymen entwickelt und erfolgreich in den industriellen Maßstab übertragen. Er hat als WP-Manager an einem früheren FP7-Projekt (PROMYSE, 2012 - 2014) teilgenommen, das sich mit *B. methanolicus* und Methanol als Fermentationsrohstoff befasste und baut daher auf solider Erfahrung in diesem Bereich auf.

Rolle von BASF im Projekt C1Pro

In WP3 wird eine Fermentationsroute von Methanol zu L-Pro entwickelt. Molekularbiologische Aufgaben werden von BASF an Prof. Dr. Erhard Bremer und Dr. Tamara Hoffmann (beide Philipps Universität Marburg) vergeben, die über wesentliche Expertise in der Gentechnik von Bacilli sowie Know-how in der Biosynthese kompatibler gelöster Stoffe wie L-Pro verfügen. Die Entwicklung eines auf diesen neuartigen Stämmen basierenden Fermentationsprozesses wird in den Laboren der BASF stattfinden. Das WP3-Programm konzentriert sich auf die Konstruktion eines *B. methanolicus*-Produktionsstamms, der den B.-licheniformis-L-Pro-Biobrick (*proHJAA_Bli*) exprimiert. Um eine optimale Leistung zu erreichen, wird die Expression unter transkriptioneller Kontrolle mehrerer Promotoren analysiert. Darüber hinaus werden konkurrierende Stoffwechselwege wie der Prolinkatabolismus herunterreguliert. Die Arbeit geht einher mit der Optimierung der genetischen Toolbox. Es ist ein besonderes Ziel, Hochleistungsstämme zu erzeugen, die genomische Integrationen und Deletionen beherbergen, ohne Marker und Restvektorsequenzen im Genom zu hinterlassen, anstatt Plasmide zu verwenden. Dies wird zu einer verbesserten Stabilität führen und alle regulatorischen Anforderungen für die biotechnologische Produktion und Produktregistrierung erfüllen. Wachstumsmedien, die für die Prolin produzierenden Organismen maßgeschneidert sind, sowie Fermentationsprotokolle werden entwickelt, um industriell relevante Produkttiter und Ausbeuten zu erreichen. Oskar Zelder wird dafür sorgen, dass es regelmäßig zu Austausch, Interaktion und Zusammenarbeit mit allen anderen WPs kommt. Die BASF will das Know-how von INSA (WP5) nutzen, um Ziele für die weitere Stammoptimierung zu identifizieren. Beiträge werden an WP1, WP2 und WP4 gemacht, da Oskar Zelder und sein Team eine Fermentationsroute von Zucker zu GABA mit anschließender chemischer Umwandlung zu 2-Pyrrolidon entwickelt haben und auch ihre umfangreiche Erfahrung in der L-Lysin Stammentwicklung und Fermentation einbringen werden. Ein weiterer Schwerpunkt wird auf WP6 liegen, um die erwarteten *B. methanolicus*-Produktionsstämme vom Labormaßstab in den Pilotmaßstab bis zu 75 Liter Fermentationsvolumen zu vergrößern. Die

BASF übernimmt alle Kosten für ihren Beitrag zum Projekt, ohne dass eine öffentliche Finanzierung erforderlich ist.

1.4.3 Partner NTNU (Koordinator)

Professor Brautaset begann 2015 als Professor an der NTNU und war zuvor 10 Jahre Senior Researcher bei SINTEF Materialien und Chemie; die letzten 2 Jahre davon als Forschungsdirektor für das Department of Molecular Biology. Brautaset verfügt über eine breite Erfahrung in der industriellen Biotechnologie mikrobieller Spezies (einschließlich grampositive und gramnegative Bakterien; methylotherme Bakterien und Hefe). Eine wichtige Forschungsaktivität ist seit 2001 die Methylothermie; insbesondere Metabolic Engineering, Systembiologie und synthetische Biologie des thermotoleranten Bakteriums *Bacillus methanolicus*

für die Herstellung von Fein- und Massenchemikalien aus Methanol. Gegenwärtig arbeiten ein Doktorand und zwei Postdocs an *B. methanolicus* und dies in enger Zusammenarbeit mit Ingemar Nærdal und anderen Forschern von SINTEF. Brautaset war Koordinator mehrerer internationaler Projekte in der System- und Synthetischen Biologie methylothermer Bakterien, z. B. das EuroSynbio-Projekt SynMet (2010 - 2012), das FP7-Projekt Promyse (2012 - 2015), das ERA_SysAPP-Projekt MetAPP (2015 - 2017) und ThermoFactories (2015 - 2018). Einige dieser Projekte umfassten Partner aus diesem vorgeschlagenen Projekt, insbesondere BASF (Oskar Zelder), INSA (Stephanie Heux und Jean-Charles Portais), SINTEF (Ingemar Nærdal) und UNIBI (Volker Wendisch). Brautaset war Mitglied des ESF-EuroSynBio-Beirats und des ERASynbio-Beirats. Brautaset hat 60 begutachtete Publikationen veröffentlicht, ist Erfinder von 6 Patenten und hat mehrere Buchkapitel und populärwissenschaftliche Publikationen mitverfasst. Brautaset ist Direktor des Centre for Digital Life Norway (<https://digitallifenorway.org/>), das ein nationales Zentrum für digitale Biotechnologie ist und die größte Einzelinvestition für Biotechnologie des norwegischen Forschungsrats (aktuelles Budget ca. 350 MNOK). In diesem Zentrum geht es um transdisziplinäre und digitale Biotechnologie, die auf wissenschaftliche Exzellenz und verantwortungsvoller Forschung und Innovation (RRI) ausgerichtet ist und die Karriereentwicklung junger Wissenschaftler fördert. Das Zentrum hat eine klare internationale Perspektive und wird das Projekt C1Pro als Partnerprojekt implementieren.

Rolle von NTNU im Projekt C1Pro

Als Koordinator übernimmt Prof. T. Brautaset die allgemeine wissenschaftliche und administrative Verantwortung für dieses Verbundprojekt, wie in WP7 Management, Verbreitung und verantwortungsvolle Forschung und Innovation (RRI) spezifiziert. Brautaset verfügt über die relevante Erfahrung als Koordinator aus einem früheren RP7-Projekt (PROMYSE, 2012 - 2014) sowie zwei laufenden ERA-Projekten (MetAPP, 2014 - 2016 und ThermoFactories, 2016 - 2018). Dazu gehören die Verbreitung, Projektberichte, die Organisation von Projektsitzungen und die Verwaltung von relevanten Webseiten-Inhalten und die Kommunikation von Ergebnissen an die Öffentlichkeit. Dank seiner Funktion als Koordinator des Zentrums für digitales Leben Norwegen hat Brautaset einen Einblick in die Umsetzung von RRI in wissenschaftlichen Aktivitäten. Brautaset arbeitete für 10 Jahre als Research Director/Manager bei SINTEF und hat ca. 10 Doktoranden und viele Masterstudenten betreut. Brautaset verfügt über mehr als 15 Jahre Erfahrung in Metabolic Engineering und Systembiologie des C1Pro Modellorganismus *Bacillus methanolicus*. Brautaset war an der Aufklärung des Methanolverwertungsweges in *B. methanolicus*, der Etablierung und Entwicklung genetischer Werkzeuge und der Erzeugung von Produktionsstämmen beteiligt. Darüber hinaus war er an genomweiten Forschungen auf den Ebenen von Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom beteiligt. Dr. Marta Irla - ein Postdoc, die 2017 mit einem 4-Jahres-Vertrag angestellt wurde – übernimmt eine Schlüsselposition. In ihrer Doktorarbeit wandte Irla eine genomweite Transkriptomanalyse von *B. methanolicus* für die Entwicklung von genetischen Werkzeugen und GABA-produzierenden Stämmen dieses Bakteriums an. Darüber hinaus verfügt Irla über Erfahrungen als FAIRDOM PAL

(Projekt MetAPP), wo sie für Fragen des Datenmanagements zuständig war. Zu den Hauptaufgaben von NTNU im Konsortium gehören insbesondere die Stammentwicklung in enger Zusammenarbeit mit UNIBI und SINTEF. In WP2 werden die zuvor entwickelten L-Lysin-produzierenden Stämme als eine Plattform zur Etablierung der 5-Aminovalerat (5AVA)-Produktion verwendet. Die 5AVA-produzierenden Stämme werden in Zusammenarbeit mit INSA optimiert. Zwei alternative Wege werden in Zusammenarbeit mit SINTEF getestet: ein zweistufiger Biosyntheseweg über 5-Aminovaleramid und ein dreistufiger Biosyntheseweg ausgehend von L-Lysin über Cadaverin und 5-Aminopentanal. Letzteres ist besonders interessant, da es kürzlich von UNIBI patentiert wurde. Die wissenschaftliche Arbeit umfasst auch die Charakterisierung und Anwendung von Lysin-Riboswitchen als regulatorische Schaltkreise zur Kontrolle der Genexpression. NTNU wird mit der BASF und der Universität Marburg (WP3) sowie mit UNIBI (WP4) zusammenarbeiten, um die Produktion von L-Prolin (L-Pro) und L-Pipecolinsäure (L-PA), z. durch die Entwicklung von Werkzeugen für Gendelektionen (CRISPR / Cas9) und für regulatorische Schaltungen (Riboswitches) zu verbessern. In WP5 wird NTNU an der omics-Charakterisierung der erzeugten Stämme mitarbeiten, und in WP6 wird NTNU an den Fed-Batch-Fermentationen beteiligt sein, die von ACIES BIO und BASF durchgeführt werden.

1.4.4 Partner INSA

Dr. Stephanie Heux hat 14 Jahre Erfahrung mit Mikroorganismen in der Modellierung, Metabolic Engineering und NMR- und MS-basierte Metabolomik und Fluxomik. Nach einem zweijährigen Marie-Curie-Stipendium an der ETH Zürich, wo sie Sie fortgeschrittene Metabolomics Methoden und Data Mining Ansätze entwickelte, trat dem LISBP als INRA-Forscher bei, um systembiotechnologische Forschung zu betreiben. Heux interessiert sich für den mikrobiellen Stoffwechsel und insbesondere seine Organisation, seine Funktionsweise und seine Anpassung. Sie wandte systemisch, iterativ, integrativ Ansätze an, um das Verhalten von natürlichen und synthetischen metabolischen Systemen zu verstehen und Veränderungen von Mikroorganismen für biotechnologische Anwendungen vorherzusagen. Um das zu erreichen, entwickelte sie in silico (Rekonstruktion und Modellierung des Stoffwechsels) und experimentelle Methoden (Metabolomics, Fluxomics). Bisher betreute sie 3 Postdocs, 8 Diplom- / Masterstudenten und 2 Doktoranden. Sie ist die PI des iGEM - Teams von Toulouse. Vor kurzem übernahm sie die Leitung des MetaSys-Teams, das aus 3 Forschern, 2 Postdocs und 2 PhDs besteht. Sie war an zahlreichen Projekten im Zusammenhang mit Methyлотrophie beteiligt (ESF-Projekt SynMet von 2010) bis 2012, FP7 Projekt PROMYSE von 2012 bis 2014 und ERASysAPP Projekt MetAPP seit 2014, ANR-Projekt ECOMUT seit 2016) und hat in einigen Fällen mit SINTEF / Brautaset, UNIBI und BASF zusammengearbeitet. S. Heux arbeitet als FAIRDOM PAL Manager im Projekt MetAPP. Heux hat 16 Publikationen veröffentlicht und ist Erfinderin von 3 Patenten. In diesem Projekt wird Heux WP5 leiten und an allen WPs beteiligt sein.

Rolle von INSA im Projekt C1Pro

INSA mit Dr. Stephanie Heux wird WP5 leiten und an allen anderen WPs beteiligt sein. In WP5 wird ein metabolisches Modell im Genom-Maßstab (GSM) von *B. methanolicus* verwendet werden, um die Integration des neuen Produktionsweges und dessen Optimierung im Kontext des metabolischen Wirtsnetzwerkes zu steuern. Ein GSM von *B. methanolicus*, das 2032 Reaktionen und 1638 Metaboliten enthält, wurde kürzlich von INSA sowohl aus Sequenzannotationsdaten als auch aus biochemischen Daten (S. Heux, J.C. Portais, unveröffentlichte Daten) während des MetAPP-Projekts erzeugt. Hier wird das aktuelle Modell zuerst verwendet, um die beste Kombination von Reaktionen zu identifizieren, um die maximale Produktion von GABA, 5AVA, L-Pro oder L-PA zu ermöglichen. Dies schließt auch die Identifizierung der am besten passenden heterologen Gene in Bezug auf die methyлотrophen und thermophilen Eigenschaften des Wirtes ein. Als nächstes wird das erweiterte GSM (mit Produktionsstoffwechselwegen) verwendet, um Knock-outs auszuwählen, die die Produktion der Zielprodukte maximieren, während die Biomasseproduktion erhalten wird und die Produktion unerwünschter Produkte minimiert wird. Schließlich werden in WP1-4 entwickelte Stämme in einem iterativen Prozess der Stammanalyse

optimiert, wobei Omics (Transkriptomik, Metabolomik und Fluxomik) und Modellierungsansätze für die Identifizierung von Engpässen hilfreich sein werden. Wir werden die Metabolomanalyse verwenden, um die Poolgrößen der zentralen Metaboliten und die Fluxomanalyse mittels dynamischer ¹³C-Markierungsexperimente zu bestimmen. Zusammen werden diese Daten eine umfassende Grundlage für die rationale "Gestaltung" des metabolischen Netzwerks von *B. methanolicus* liefern, die die Produktion von Zielprodukten aus Methanol maximieren und gleichzeitig die Produktion von Biomasse sicherstellen und die Produktion unerwünschter Produkte minimieren wird. Diese iterative Integration von Nasslabor- und In-Silico-Experimenten wird die funktionelle Integration von Target-Produktionsmodulen in den Wirtsmetabolismus beschleunigen. Im WP5 wird die Datenverwaltung nach den Prinzipien von FAIR Data durchgeführt. Alle Partner werden LCA-konforme Daten für Fermentations-, physiologische und Omics-Daten zur Verfügung stellen, um den iterativen Hypothesen-Experiment-Datenintegrations-Modellierungs-Vorhersagezyklus zu gewährleisten. Schließlich wird WP5 für die Einstufung und Auswahl der Stämme zuständig sein, die in WP6 im industriellen Maßstab getestet werden sollen.

1.4.5 Partner SINTEF

SINTEF ist eine der größten unabhängigen Forschungsorganisationen in Skandinavien. Mit mehr als 2000 Mitarbeitern aus mehr als 70 Ländern will es Technologie für eine bessere Gesellschaft an der Schnittstelle zwischen Wissenschaft und Industrie entwickeln. Das Institut Materials and Chemistry ist das größte Institut der SINTEF-Stiftung und die Abteilung für Biotechnologie und Nanomedizin verfügt über umfangreiche Erfahrung und modernste Infrastruktur für mikrobielle Stammentwicklung, Fermentation, Hochdurchsatzscreening und MS-basierte chemische Analyse. Die Erforschung der Methylophorie und insbesondere des Modellorganismus *Bacillus methanolicus* findet seit 2002 bei SINTEF statt und ist weiterhin ein wichtiges Forschungsthema. Im Laufe der Jahre wurden wichtige Infrastrukturen und Kompetenzen auf nationaler Ebene generiert und drittmittelfinanzierte Projekte mit Schwerpunkt auf Methanol-basierte L-Lysin und L-Glutamat Produktion (2002-2011) und multinationale (FP7 und ERA) Projekte wie SynMet, PROMYSE und MetAPP (2010-2017) eingeworben. Die letzteren Projekte wurden von SINTEF geleitet, koordiniert von Dr. Trygve Brautaset. Der Forscher und PI Ingemar Nærdal von SINTEF arbeitet seit 8 Jahren mit *B. methanolicus* und konzentriert sich auf die Entwicklung von L-Lysin, L-Glutamat, Cadaverin und GABA produzierenden Stämmen, die Entwicklung von genetischen Werkzeugen und das Verständnis der Methylophorie. Diese Arbeiten haben zu 7 Peer-Review-Publikationen geführt. Er verfügt über Schlüsselkompetenzen bei der Durchführung von Fed-Batch-Methanolfermentationen und Chemostat-Kultivierungen von *B. methanolicus*. Wichtige Infrastrukturplattformen bei SINTEF, die für das Projekt verfügbar sein werden, sind die Bioprozesstechnologieplattform, die Möglichkeit zur Kultivierung vom Mikrowell-Maßstab bis zu vollständig kontrollierten 3 L-Fermentern mit In-Line-MS-Analyse für die Methanolzuführung bereitstellt. Ebenfalls relevant ist die robotische HT-Screening-Infrastruktur, z.B. für die Stammentwicklung und -testung, eine umfassende LC-MS-Plattform sowie eine hochmoderne molekularbiologische Plattform, einschließlich hauseigener Next-Generation-Sequenziergeräte und Bioinformatik-Tools.

Rolle von SINTEF im Projekt C1Pro

SINTEF wird das WP2 leiten und zu WP1, WP4, WP5, WP6 und WP7 des Projekts beitragen. Kurz gesagt, SINTEF wird mit NTNU und UNIBI bei der Entwicklung neuer rekombinanter *B. methanolicus*-Stämme, die 5-AVA produzieren, zusammenarbeiten. Zwei biosynthetische Routen ausgehend von L-Lysin werden erforscht und verglichen. Ausgewählte Stämme werden basierend auf dem Modellierungs- und Systembiologieansatz (INSA) optimiert. Diese Arbeit umfasst das Strain-Engineering, die Entwicklung genetischer Werkzeuge, kleinskalige Kultivierungen und Fed-Batch-Methanol-Fermentation zur Validierung. In WP1 und WP4 führt SINTEF kontrollierte Fed-Batch-Fermentationen von GABA (WP1) und L-PA (WP4) Produktionsstämmen durch. Aus diesen Kultivierungen wird Material für die RNAseq-Analyse (durchgeführt bei UNIBI) geerntet,

Biomasse und Respiration überwacht und relevante Produkte / Zwischenprodukte (GABA, L-Glutamat, L-Lysin, L-PA etc.) analysiert und quantifiziert. Eine spezialisierte Kultivierungs-Infrastruktur wird eingesetzt, in Haus HPLC / LC-MS analytische Methoden verwendet, und NG-Sequenzierung Ausrüstung und Bioinformatik-Tools und Kompetenz werden zur Verfügung gestellt, um die Analyse von neuen rekombinanten und klassischen Mutantenstämmen zu stärken. Der Beitrag von SINTEF in WP5 wird darin bestehen, notwendige physiologische Daten zusammen mit anderen Projektpartnern in das *B. methanolicus*-Genomskalenmodell zu integrieren. Zusammen mit Omics-Daten wird dies die Grundlage für die modellgestützte Identifizierung von Zielen / Engpässen liefern, die für die Optimierung von Produktionsstämmen wichtig sind. Die Rolle von SINTEF in WP6 wird die Beratung bei der Vergrößerung des ausgewählten Produktionsprozesses im Pilotmaßstab sein. SINTEF wird in WP7 zur geplanten Kommunikation und Verbreitung beitragen.

1.4.6 Partner Acies

Dr. Kosec ist Direktor für Forschung und Entwicklung bei Acies Bio, einem jungen slowenischen Biotech-Unternehmen. Er ist verantwortlich für die Leitung und Koordinierung der Forschungsaktivitäten des Unternehmens, vor allem in den Bereichen innovative Bioprozesslösungen und Entdeckung neuartiger Verbindungen mit pharmazeutischem Potenzial. Neben internen Forschungsprojekten betreut Dr. Kosec zahlreiche industrielle Kooperationsprojekte von Acies Bio mit einigen der größten internationalen Pharma-, Agrochemie- und Biotech-Unternehmen. In Zusammenarbeit mit IP-Spezialisten managt er das IP-Portfolio von Acies Bio, bestehend aus mehreren Patentanmeldungen und erteilten Patenten, an denen er auch als Erfinder aktiv teilnahm. Seine wissenschaftlichen Interessen konzentrieren sich auf die Verbesserung des Verständnisses metabolischer, biosynthetischer und regulatorischer Signalwege in mikrobiellen Zellen und die Nutzung dieser Erkenntnisse zur Entwicklung neuer Lösungen für die mikrobielle Produktion von hochwertigen Verbindungen. Darüber hinaus ermöglicht ihm ein solches Verständnis die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit pharmazeutischem Potenzial, wobei sich Acies Bio und Dr. Kosec auf die Behandlung seltener Krankheiten (Orphan Drugs) und neuer antibakterieller Wirkstoffe konzentrieren. Jüngste Errungenschaften des Acies Bio Forschungsteams sind die Erteilung des "Orphan Status" für Acies Bio proprietäre Verbindung CAB1803 durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) im Jahr 2016 und die Gründung eines Joint Ventures mit einem großen Industriepartner basierend auf Acies Bio proprietärer Technologie für mit Abfallsäuremolke zur fermentativen Herstellung von Vitamin B12 (EP 2942397).

Rolle von Acies im Projekt C1Pro

Dr. Gregor Kosec wird für die WP1-Projektaufgaben beim KMU-Partner ACIES BIO verantwortlich sein. Als F & E-Direktor von ACIES BIO, einem der führenden europäischen KMU auf dem Gebiet der mikrobiellen Stamm- und Bioprozessentwicklung, verfügt er über umfangreiche Erfahrung in der Entwicklung, Industrialisierung und Kommerzialisierung verschiedener auf mikrobiellen Bioprocessen basierender Technologien. Zuvor war er bei ACIES BIO für Auftragsforschung für große globale Pharma- / Chemieunternehmen oder am firmeneigenen Forschungsprogramm an komplexen Projekten beteiligt, die die Stammentwicklung, die Bioprozessentwicklung sowie die Aufarbeitung beinhalteten. Dr. Kosec hat auch bereits Erfahrung mit FP7-Projekten (Tircon, 2011 - 2015) und beteiligt sich derzeit am H2020-Projekt Topcapi (2016 - 2020) mit dem Ziel, einen starken, robusten und vielseitigen *Streptomyces*-Chassisstamm zu entwickeln. Im Rahmen von WP1 werden Dr. Kosec und ACIES BIO hauptsächlich für die Entwicklung von fortgeschrittenen Stamm-, Bioprozess- und DSP-Entwicklungsschritten zuständig sein, um den GABA-Produktions-Bioprozess von *B. methanolicus* unter industriell relevanten Bedingungen zu demonstrieren. Die Stammentwicklung umfasst eine zufällige Mutagenese und eine intelligente Stammselektion, um höhere Ausbeuten von GABA zu erreichen sowie die Entwicklung von 5AVA produzierenden Stämmen in WP2. Unter Verwendung optimierter Stämme aus WP1 wird mit der Bioprozessentwicklung und -intensivierung für GABA im 5-l-Bioreaktormaßstab begonnen und

später mit Isolierungs- / nachgeschalteten Prozessentwicklungsaufgaben fortfahren, um die industrielle Relevanz der auf *B. methanolicus* basierenden GABA-Technologie zu demonstrieren. Die Entwicklung der Downstream-Entwicklung wird verschiedene Techniken wie Zentrifugation, Filtration, Entfärbung und Entsalzung umfassen. Zur Reinigung von GABA wurde die Ionenaustauschchromatographie in der Vergangenheit erfolgreich verwendet. Als letzter Schritt wird die chemische Umsetzung von GABA zu 2-Pyrrolidon in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oskar Zelder bei der BASF auf Basis der verfügbaren GABA-Fraktionen unterschiedlicher Reinheit evaluiert. Die Teilnahme an diesem Projekt bestätigt das besondere Interesse und Engagement des KMU-Partners ACIES BIO, die vielversprechendsten umweltfreundlichen Bioökonomie-Lösungen für die Kreislaufwirtschaft in die industrielle Anwendung zu bringen. Acies Bio wird das WP6 leiten, in dem vielversprechendste Bioprozess auf Bioreaktoren im Pilotmaßstab (20 - 150 L) erweitert wird.

2. Ergebnisse

Eingehende Darstellung der Punkte II.1 bis II.4

2.1 Erzielte Ergebnisse

Arbeitspakete (AP) bzw. Meilenstein (M)	Bearbeitungsstand
Arbeitspaket 1: Aufbau einer technologischen Plattform für die GABA-Produktion (Leitung: Acies Bio)	Für die Produktion von GABA wurde die Glutamatdecarboxylase von <i>Sulfobacillus thermosulfidooxydans</i> (GadSt) ausgewählt und diese wurde anschließend von slowenischen Projektpartnern in einem vorläufigen Experiment hinsichtlich der GABA Produktion getestet und erreichte einen Titer von 8.5 g/L GABA. Die Versorgung durch den Vorläufermetaboliten Glutamat, wurde zudem durch klassische Mutagenese und Medienoptimierung gesteigert.
M1.1 Verbesserte <i>B. methanolicus</i> GABA-Produktionsstämme	UNIBI hat zu diesem Meilenstein nicht direkt beigetragen. Das Hochdurchsatz-Screening von <i>B. methanolicus</i> -Stämmen wurde erfolgreich zur Identifizierung von Glutamat-überproduzierenden, sowie GABA-überproduzierenden, Stämmen entwickelt. Es wurden mehrere Mutanten identifiziert, die bis zu 600% mehr Glutamat produzieren als bei Verwendung des ursprünglichen Wirtsstamms MGA3 im Shaker-Maßstab. Zudem wurde gezeigt, dass eine dieser Mutanten, ABBM4307, ein 5-9x höheres Potenzial zur Produktion von GABA als MGA3 aufweist. Die Produktion von Biomasse und Glutamat in diesem Mutantenstamm ist jedoch noch nicht optimal und ist Gegenstand aktueller Arbeiten. Darüber hinaus wird derzeit an der Erstellung vollständigerer Charakterisierungen von Stämmen der zweiten Generation im Shaker-Maßstab gearbeitet, die das Plasmid pBV2xp-GADst im Vergleich zu MGA3-pBV2xp-GADst tragen. Parallel dazu werden verschiedene Varianten des GADst-Enzyms auf eine ursprünglich nicht geplante verbesserte Glutamat-GABA-Umwandlung getestet. Acies Bio hat das WP abgeschlossen. Fälliger Monat M18; Status: abgeschlossen
M1.2 Entwicklung des GABA Bioprozesses	UNIBI hat zu diesem Meilenstein nicht direkt beigetragen. Ein Referenz-Bioprozess für den natürlichen MGA3-Glutamat-produzierenden Stamm wurde erstmals in der Acies Bio-Pilotanlage etabliert. Die erhaltenen Ergebnisse sind mit der veröffentlichten Literatur vergleichbar. Vorläufige Verfahren für die GABA-Produktion unter Verwendung von MGA3 und eines Mutantenstamms der zweiten Generation, ABBM4307, wurden ebenfalls mit relativ hohen Titern etabliert und werden derzeit optimiert. Durch Prozessführung wurde das Biomassewachstum und die Umwandlung von Glutamat in GABA verbessert.

	Fälliger Monat M26; Status: abgeschlossen.
M1.3 Prozesse der GABA Weiterverarbeitung	UNIBI hat zu diesem Meilenstein nicht direkt beigetragen. Die Arbeiten an diesem Meilenstein beginnen derzeit. Da jetzt Fermentationsbrühe mit einem GABA-Titer von mehreren g/l verfügbar ist, wird sie bei -20 ° C gelagert und für die DSP-Entwicklung verwendet, sobald genügend Material erhalten wurde. Acies Bio hat den meilenstein erreicht. Fälliger Monat M26; Status: abgeschlossen.
Arbeitspaket 2: Entwicklung von 5AVA-Produktionsstämmen und Anwendung synthetischer Regelkreise (Leitung: SINTEF)	Das Plasmid pBV2xp wurde für die Produktion mittels Drei-Schritt Stoffwechselweg getestet. Alternativ hierzu wurden Plasmide mit Lysin- und Putrescin Oxidasen getestet. Die Funktion der Putrescinoxidasen in einem 3-schrittigen Stoffwechselweg wurden vorab in dem Modellorganismus <i>Corynebacterium glutamicum</i> in Bielefeld bestätigt. Die Putrescin Oxidase aus <i>Rhodococcus qingshengii</i> erreichte einen Titer von 3.7 g/L 5AVA (Hauptka et al. 2020, DOI: 10.3390/catal10091065) (siehe Anhang).
M2.1 Proof-of-Concept für die Herstellung von 5AVA auf Methanolbasis	UNIBI hat zu diesem Meilenstein beigetragen, indem es das Plasmid pBV2xp den norwegischen Projektpartnern bereitstellte. Es wurden 5AVA-Produktionsstämme der ersten Generation auf einem Weg ausgehend von L-Lysin erreicht. Das produzierte 5AVA wurde im extrazellulären Medium gemessen, was bedeutet, dass das Molekül aus den Zellen exportiert wird. Das wurde von NTNU SINTEF und Toulouse publiziert (10.3389/fbioe.2021.686319). Fälliger Monat M9; Status: Abgeschlossen.
M2.2 Lysin-Riboschalter-Regelkreise erfolgreich eingerichtet	UNIBI hat zu diesem Meilenstein nicht direkt beigetragen. Ein Satz von 3 verschiedenen Riboschaltern wurde verwendet, um die Expression des Reporterproteins sfGFP in <i>B. methanolicus</i> zu kontrollieren. Es wurde gezeigt, dass der von <i>B. methanolicus</i> abgeleitete Riboschalter in <i>B. methanolicus</i> (aber auch bei einem Verwandten <i>B. licheniformis</i> , der die Übertragbarkeit des Systems beweist) funktionsfähig ist. Der Lysin-Riboschalter wurde weiter charakterisiert (Einfluss der Lysinkonzentration auf den Silencing-Effekt, Einfluss der RBS-Sequenz). Das Xylose-Repressor-Gen <i>xyIR</i> wurde unter Kontrolle des Lysin-Riboschalters exprimiert. Die Ergebnisse hat NTNU publiziert (10.3390/ijms22094686). Fälliger Monat M15; Status: abgeschlossen.
M2.3 Charakterisierung der neuen Lysin-Riboswitches in Bezug auf die Genexpressionskontrolle	UNIBI hat zu diesem Meilenstein nicht direkt beigetragen. Der Lysin Riboswitch wurde von NTNU charakterisiert und trägt zur Genexpressionskontrolle bei (10.3390/ijms22094686). Status: abgeschlossen.
Arbeitspaket 3: Entwicklung von L-Prolin-Produktionsstämmen und genetischen Werkzeugen für die Entwicklung industrieller Produktionsstämme (Leitung: BASF)	In Bielefeld konnte das genetische Tool CRISPR interference in <i>B. methanolicus</i> zusammen mit norwegischen Projektpartnern entwickelt und etabliert werden. Neben den bereits erfolgreich getesteten Zielgenen <i>spoOA</i> , <i>mtlD</i> und <i>katA</i> , wurden auch die für <i>B. methanolicus</i> relevanten Gene <i>fba^{C/P}</i> , <i>hps</i> , <i>phi</i> , <i>glpX^{C/P}</i> und <i>tkt^{C/P}</i> untersucht, welche bei der Methanol

	Verstoffwechselung im Ribolose-Monophosphat-Pathway (RumP) eine große Rolle spielen (s. Anhang). Da dCas9 bisher durch einen metabolisierbaren Induktor (Mannitol) induziert wurde, wurden Optimierungen an dem piCas Plasmid durchgeführt und das Plasmid pxiCas konstruiert (s. Anhang). Die Mannitol-induzierbaren Promotoren wurden zum einen durch den Xylose-induzierbaren Promoter xp von <i>Bacillus megaterium</i> ersetzt, welche nun die Expression von dCas9 induziert. Zum anderen befindet sich vor der single guide RNA nun ein konstitutiver, endogener Methanol-Promoter (<i>mdh</i>). Des Weiteren wurde die Genexpression des Gens Oxoglutarat Dehydrogenase (<i>odhA</i>) mit der entwickelten CRISPRi Technik zu reprimiert, um den Stoffwechselfluss zu dem GABA-Vorläufer Glutamat zu steigern und somit dann höhere Mengen an GABA zu erzielen (Bezug zu AP1).
M3.1 Proof-of-Concept für die L-Prolin-Produktion auf Methanolbasis durch einen Plasmid-basierten <i>B. methanolicus</i>-Stamm	UNIBI hat zu diesem Meilenstein beigetragen. Durch CRISPR interference von <i>odhA</i> konnte erstmals in <i>B. methanolicus</i> der metabolische Fluss im Tricarbonsäure-Zyklus zu Glutamat umgeleitet werden und so die Glutamat-Produktion ($3.7 \pm 0.4 \text{ mg g}^{-1}$) steigern. Glutamat ist eine wichtige Vorläufer-Aminosäure für die Produktion von GABA oder Prolin. UNIBI konnte für die Prolinproduktion in <i>B. methanolicus</i> keine geeignete Ornithinecyclodeaminase finden. Fälliger Monat M6; Status: abgeschlossen.
M3.2 Funktionale Knock-Out- und Knock-In-Techniken	UNIBI hat zu diesem Meilenstein direkt beigetragen. Das piCas-Plasmidsystem für CRISPR / dCas9 wurde entwickelt und etabliert. Ein Proof of Concept wurde durchgeführt, indem 3 verschiedene Gene mit unterschiedlichen Expressionsstärken, die regulatorische Gene (<i>spo0A</i>), katabolische Gene (<i>mtlD</i>) und ein an einem Entgiftungsprozess (<i>kataA</i>) beteiligtes Gen repräsentieren, untersucht wurden. Da die dCas9-Expression von einem Mannitol-induzierbaren Promotor gesteuert wird, der ein metabolisierbarer Induktor ist, musste das piCas-Plasmidsystem optimiert werden. (Schultenkämper et al. 2019, DOI: 10.1007 / s00253-019-09907-8). Daher wurden in der Universität Bielefeld Optimierungsarbeiten an dem Plasmid vorgenommen (siehe AP3). Gleichzeitig wurden erhebliche Fortschritte bei der Entwicklung von Knock-out- und Knock-in-Techniken erzielt, einschließlich der Erstellung eines Konjugationsprotokolls und der Entwicklung funktioneller Counterselection Marker (NTNU). Des Weiteren wurde das piCas CRISPRi Plasmidsystem optimiert, indem die ursprünglichen Mannitol induzierbaren Promotoren ausgetauscht worden sind für nicht-metabolisierbare Induktoren (Xylose). Zudem die die Xylose-induzierbaren Promotoren stärker, sodass das dCas9 jetzt stärker exprimiert ist und somit eine stärkere Repression der Transkription von den Zielgenen erzeugen kann. Eine CRISPR Bibliothek wurde mittels Python entwickelt, um eine Auswahl an sgRNAs

	für ca. 95% der Gene des Stammes <i>B. methanolicus</i> MGA3 bereitzustellen (Hauptka 2020, DOI: 10.5281/ZENODO.4063436). Fälliger Monat M18; Status: abgeschlossen.
Arbeitspaket 4: Entwicklung von L-PA-Produktionsstämmen und Anwendung synthetischer Regelkreise (Leitung: UNIBI)	Nach der Konstruktion von Plasmiden basierend auf dem Vektor pBV2xp wurden diese für die Produktion des Lysinderivates L-Pipecolinsäure (L-PA) getestet. Zudem wurden von dem Projektpartner NTNU durch heterologe Expression von Lysin-Oxidasen, Piperidein 2-carboxylat Reduktasen und der homologen Expression der nativen Katalase 0.5 mg/L Pipecolinsäure produziert.
M4.1 Proof-of-Concept für die Herstellung von L-PA auf Methanolbasis	UNIBI hat zu diesem Meilenstein beigetragen, indem es das Plasmid pBV2xp den norwegischen Projektpartnern bereitstellte. Um die Produktion von L-Pipecolinsäure (L-PA) aus Methanol zu erreichen, entwickelte NTNU Plasmide für die heterologe Genexpression in <i>B. methanolicus</i>. Der gewählte Stoffwechselweg ist gut charakterisiert und umfasst eine L-Lysin-α-Oxidase aus <i>Bacillus simplex</i> (aipBs) oder <i>Scomber japonicus</i> (aipSj) und eine Δ1-Piperidein-2-carboxylatreduktase (dpkA) aus <i>Pseudomonas putida</i>. Der Vektor pBV2xp (UniBi) wurde zur Xylose-induzierbaren Promotor-gesteuerten Expression der Kombination der Gene aipBs-dpkA oder aipSj-dpkA verwendet. Die in NTNU durchgeführten Arbeiten führten zu AipBs-, AipSj- und DpkA-Aktivitäten, die in Rohextrakten von <i>B. methanolicus</i> nachgewiesen wurden, und zu einem Proof-of-Concept für die Herstellung von L-PA aus Methanol, wobei ungefähr 8 μM L-PA durch HPLC in Überständen von <i>B. methanolicus</i> MGA3 (pBV2xp-aipBs-dpkA) nachgewiesen wurden, kultiviert in Schüttelkolben. Fälliger Monat: M9; Status: Abgeschlossen.
M4.2 L-PA-Produktion von hochproduzierenden in optimierten Fed-Batch-Fermentationen	Eine Konstruktion der zweiten Generation L-PA produzierender Stämme mit verbesserter L-PA-Produktion und Bewertung der fedbatch-Methanol-Fermentation wurde noch nicht begonnen. UNIBI hat Transkriptomanalysen bezüglich der Toleranz gegenüber L-PA durchgeführt. Weil der Titer zu gering war, wurde nach geplantem Abbruchkriterium keine Fed-Batch-Fermentation durchgeführt. Fälliger Monat: M36; Status: Abgeschlossen.
Arbeitspaket 5: Systembasierte Analyse für Stammdesign und -optimierung (Leitung: INSA)	UNIBI hat zu diesem Arbeitspaket direkt beigetragen. Nachdem die Toleranz von <i>B. methanolicus</i> für 5AVA durch ein adaptives laboratives Evolutionsexperiment von 10 mM auf 400 mM erhöht wurde, wurden die evolvierten Mutanten sequenziert. Es wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) beobachtet und drei dieser Mutationen im Vergleich zum Ausgangsstamm für die weitere Analyse ausgewählt (s. Anhang). Diese kommen teilweise in Genen vor, welche im Zuge einer vorhergegangenen differentiellen RNA-Seq Analyse eine signifikant verstärkte oder verminderte Expression

	aufwiesen. Es wurden Plasmide basierend auf pBV2xp konstruiert, welche die drei Zielgene inklusive SNPs beinhalten. Die homologe Überexpression des Gens, das für das Eisensiderophor-bindende Protein kodiert, in Kombination mit erhöhten Eisenspiegeln ergab eine spezifische Änderung der Toleranz gegenüber 5AVA (siehe Anhang).
M5.1 Erweitertes Genom-Modell mit enthaltenden Produktionswegen	UNIBI hat zu diesem Meilenstein nicht direkt beigetragen. Die verschiedenen betrachteten Pfade wurden in das In-Silico-Genom-Scale-Modell (GSM) eingefügt und zur Berechnung klassischer Statistiken, wie maximaler theoretischer Ausbeuten, verwendet. Das GSM ist auf FAIRDOMhub/SEEK hinterlegt und wird unter Federführung von Toulouse in einem Peer-Review-Journal veröffentlicht. Fälliger Monat: M4; Status: Abgeschlossen.
M5.2 Genom-Modell, das Gen-Protein-Reaktions-Verbindungen und Genregulations-Interaktionen integriert	UNIBI hat zu diesem Meilenstein nicht direkt beigetragen. Die Gen-Protein-Reaktions-Links wurden in das Modell integriert. Die hochkomplexen Regulierungsnetzwerke bleiben jedoch angesichts des Zeitplans eine Herausforderung für die vollständige Integration. Unsere Ressourcen fließen in die Veröffentlichung des GSM. Fälliger Monat: M16; Status: Abgeschlossen.
M5.3 MCA etabliert.	Ein durch Mutagenese erhaltener Glutamat-Überproduzent als Grundlage für die GABA-Synthese wurde einer Multikriterienanalyse unterzogen. Eine genomische Analyse der Mutante vor und nach Induktion sowie mit und ohne Produktionsvektor wurde im Vergleich zum Ausgangsstamm durchgeführt und ergab unter anderem eine hohe Anzahl an Mutationen, die im Zusammenhang zur Zellwandsynthese stehen (siehe Anhang). Weitere Analysen des Transkriptoms und des Metaboloms stehen noch aus. Fälliger Monat: M23; Status: Abgeschlossen.
Arbeitspaket 6 Optimierung und Erhöhung der Fermentationsprozesse (Leitung: Acies)	Das AP wurde von den slowenischen Projektpartnern von Acies Bio bearbeitet. Durch Medienoptimierung, klassische Mutagenese und dem Bedarf an Vorläufermetaboliten wurde der Glutamat- und GABA-Titer erhöht und die Produktaufreinigung etabliert. Status: Abgeschlossen.
Arbeitspaket 7 Kommunikations- und Disseminationsaktivitäten (alle Partner)	Es gab eine Vielzahl an Aktivitäten. Hervorzuheben ist die Teilnahme aller C1Pro Partner an der 9ten internationalen Bielefeld-CeBiTec Research Konferenz 2019 vom 23. bis 25. September 2019 teil. Dort hielt Kerstin Schultenkämper (UNIBI) einen Vortrag über CRISPRi von <i>B. methanolicus</i> und Gregor Kosec (AciesBio, SL) nahm mit weiteren Industrievertretern an einer Podiumsdiskussion über weiße Biotechnologie teil. Aufgrund der derzeitigen Covid-19 Situation fand im Jahr 2020 keine „teutolab-Akademie Systembiologie“-Woche für naturwissenschaftlich-begeisterte Schüler statt. Allerdings wurde in Zusammenarbeit mit dem Bielefelder

	Teutolab Team und in Kooperation mit dem ERA CoBioTech Projekt „Indie“ ein interaktives Lernvideo für die Schüler gedreht. Kerstin Schultenkämper stellte in diesem Video unter anderem die Methanol-basierte und nachhaltige Produktion von Aminosäuren, sowie die Entwicklung von CRISPR interference vor (s. Angang). Prof. Volker F. Wendisch, Kerstin Schultenkämper und Carsten Haupka nahmen zudem online an den Webinar-Progress-Meetings des C1Pro Projektes teil.
--	---

2.2 Verwertung

Ein IP-Verwertungsplan wurde im ersten Förderhalbjahr erstellt. UNIBI hat keine Erfindungsmeldung getätigt. Durch regelmäßige Recherchen wurden der Stand der Technik und der Fortschritt im Projekt auf mögliche Erfindungsmeldungen hin überprüft.

Das Projekt verfolgte über mögliche Patentanmeldungen hinaus keine wirtschaftliche Ergebnisverwertung. Das erarbeitete Knowhow kann jedoch potentiell für die Einwerbung von Kooperationen wesentlich sein. So wurde das ERA-CoBiotech-Projekt MCM4SB gemeinsam mit NTNU Trondheim und Acies sowie als neuer Partnerin der Marmara Universität eingeworben werden. Unsere Disseminationen umfassten wissenschaftliche Vorträge und Poster sowie darauf aufbauende Sekundärbeiträge, z.B. in CeBiTec Quaterly. Fünfzehn Fachveröffentlichungen der UNIBI dokumentieren den wissenschaftlichen Erfolg des Projektes. Kurz- und mittelfristig sind weitere Veröffentlichungen und Vorträge geplant. Neben dem eingeworbenen ERA-CoBiotech-Projekt, bei dem UNIBI nicht finanzierter, assoziierter Partner ist, suchen wir weiter kurz- und mittelfristig Förderformate für auf den hier erzielten Ergebnissen aufbauende weiterführende Projekte. Kerstin Schultenkämper und Carsten Haupka promovierten an der UNIBI, was die erfolgreiche Qualifizierung des wissenschaftlichen Nachwuchses dokumentiert. Volkswirtschaftlich kann von Bedeutung sein, dass das Projekt von den Promovenden Schülern und Lehrern näher gebracht wurde und somit die Bedeutung der Biotechnologie gestärkt wurde.

2.3 Erkenntnisse von Dritten

Während der Durchführung des Vorhabens wurden keine wesentlichen Erkenntnisse Dritter bekannt, die den Fortschritt des Vorhabens beeinträchtigt hätten.

2.4 Veröffentlichungen

Fünfzehn Fachveröffentlichungen der UNIBI dokumentieren den wissenschaftlichen Erfolg des Projektes und legen den Grundstein für weitergehende Zusammenarbeiten. Dabei soll insbesondere auf bilaterale Förderformate Wert gelegt werden. Die Fachveröffentlichungen sind:

- Brito LF, Schultenkämper K, Passaglia L, Wendisch VF (2020) CRISPR interference-based gene repression in the plant growth promoter *Paenibacillus sonchi* genomovar *Riograndensis* SBR5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104: 5095-5106. doi: 10.1007/s00253-020-10571-6
- Delépine B, López MG, Carnicer M, Vicente CM, Wendisch VF, Heux S (2020) Charting the metabolic landscape of the facultative methylotroph *Bacillus methanolicus*. *mSystems* 5:e00745-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00745-20>
- Drejer EB, Chan D, Haupka C, Wendisch VF, Brautaset T and Irla M (2019) Methanol-based acetoin production by genetically engineered *Bacillus methanolicus*. *Green Chem.* 22:788-802. doi: 10.1039/C9GC03950C
- Haupka C, Délepine B, Irla M, Heux S, Wendisch VF (2020) Flux enforcement for fermentative production of 5-aminovalerate and glutarate by *Corynebacterium glutamicum*. *Catalysts* 10: 1065. doi: <https://doi.org/10.3390/catal10091065>
- Haupka, C, Brito LF, Busche T, Wibberg D, Wendisch VF (2021) Genomic and transcriptomic investigation of the physiological response of the methylotroph *Bacillus methanolicus* to 5-aminovalerate. *Front. Microbiol.* 12: 664598. doi: 10.3389/fmicb.2021.664598
- Hennig G, Haupka C, Brito LF, Rücker C, Cahorea E, Heux S and Wendisch VF (2020) Methanol-essential growth of *Corynebacterium glutamicum*: Adaptive Laboratory Evolution overcomes limitation due to methanethiol assimilation pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3617. doi: 10.1186/s12866-020-01750-6
- López MG, Irla M, Brito LF and Wendisch VF (2019) Characterization of D-Arabitol as Newly Discovered Carbon Source of *Bacillus methanolicus*. *Front. Microbiol.* 10:1725. doi: 10.3389/fmicb.2019.01725
- Mindt M, Walter T, Kugler P and Wendisch VF (2020) Microbial engineering for production of N-functionalized amino acids and amines. *Biotechnol. J.* 15, 1900451. doi: <https://doi.org/10.1002/biot.201900451>
- Pfeifenschneider J, Markert B, Stolzenberger J, Brautaset T, Wendisch VF (2020) Transaldolase in *Bacillus methanolicus*: biochemical characterization and biological role in ribulose monophosphate cycle. *BMC Microbiology* 20: 63. doi: 10.1186/s12866-020-01750-6
- Schultenkämper K, Brito LF and Wendisch VF (2020) Impact of CRISPR interference on strain development in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 67: 7-21. doi: <https://doi.org/10.1002/bab.1901>
- Schultenkämper K, Brito LF, López MG, Brautaset T, Wendisch VF (2019) Establishment and application of CRISPR interference to affect sporulation, hydrogen peroxide detoxification, and mannitol catabolism in the methylotrophic thermophile *Bacillus methanolicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:5879-5889. doi: 10.1007/s00253-019-09907-8
- Schultenkämper K, Gütle DD, Lopez MG, Keller LB, Zhang L, Einsle O, Jacquot J-P, Wendisch VF (2021) Interrogating the role of the two distinct fructose-bisphosphate aldolases of *Bacillus methanolicus* by site-directed mutagenesis of key amino acids and gene repression by CRISPRi. *Front. Microbiol.* 12: 669220. doi: 10.3389/fmicb.2021.669220
- Sgobba E and Wendisch VF (2020) Synthetic microbial consortia for small molecule production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 62:72-79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.011>
- Wendisch VF (2020) Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production. *Metab. Eng.* 58:17-34. doi: 10.1016/j.ymben.2019.03.008

Wendisch VF, Kosec G, Heux S, Brautaset T (2021) Aerobic utilization of methanol for microbial growth and production. In: One-carbon Feedstocks for Sustainable Bioproduction. Zeng A-P, Claassens N (Eds); Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Cham: Springer Nature.

2.5 Erreichungsstand und Verwertungsabsichten

Die Produktion von GABA unter Hochdurchsatzbedingungen erwies sich selbst nach umfassender Optimierung als uneinheitlich. Da L-Glutamat ein direkter Vorläufer der Zielverbindung GABA ist, wurde die L-Glutamat-Produktion als Ersatz verwendet, um die Robustheit des Screening-Ansatzes zu erhöhen. Etwa 2000 Mutanten Kolonien wurden auf ihre L-Glutamat-Produktion hin untersucht, und eine Teilmenge der Mutanten mit der höchsten Produktion wurde einem zusätzlichen Mutageneseschritt unterzogen, um eine Mutante der zweiten Generation zu erzeugen, wobei die Spitzenmutante im Vergleich zum Wildtyp eine um 400 % erhöhte L-Glutamat-Produktion aufwies. Parallel dazu wurde in Zusammenarbeit mit SINTEF ein Fed-Batch-Bioprozessprotokoll im 5-Liter-Bioreaktormaßstab erstellt. Das etablierte Bioprozessprotokoll wurde zum Screening der besten Stämme der zweiten Generation auf L-Glutamat-Produktion verwendet. Die verbesserten Mutanten erreichten keine signifikant höheren Titer von L-Glutamat als der Wildtyp, obwohl die Ausbeute im Verhältnis zur Biomasse und zur Einheit des verbrauchten Methanols bei der Top-Mutante ABBM4307 signifikant (~40%) anstieg. Die Produkthemmung wurde als Problem identifiziert und experimentell bestätigt.

Die Umwandlung von L-Glutamat in GABA wurde durch die Expression eines Glutamatdexarboxylase (GAD)-Enzyms aus einem Plasmidvektor unter einem starken induzierbaren Promotor erreicht. Das beste molare Umwandlungsverhältnis von L-Glutamat zu GABA lag bei 50 %, mit einem Endtiter von 13 g/L, was eine Verbesserung von 47 % gegenüber früher berichteten Titern darstellt.

Um eine methanolbasierte 5AVA-Produktion zu etablieren, wurde ein breites Screening verschiedener Produktionswege durchgeführt. Es wurden neue Stoffwechselwege identifiziert. Es wurden zwei Wege ausgewählt, die L-Lysin direkt in 5AVA umwandeln: der DavBA-Weg und der RaiP-Weg sowie drei Wege, die Cadaverin als Zwischenprodukt verwenden: der Spul-Weg, der PatA-Weg und der Puo-Weg.

Die Methanol-basierte 5AVA-Biosynthese in *B. methanolicus* MGA3 wurde durch heterologe Expression des Gens *raiP* untersucht, das entweder aus dem Bakterium *P. simplex* oder aus *raiP*-Genen mit kodon-optimierten Sequenzen aus den eukaryotischen Spendern *S. japonicus* und *T. viride* stammt. In allen konstruierten Stämmen wurde RaiP-Aktivität nachgewiesen, und in dem Stamm, der das von *T. viride* abgeleitete *raiP*-Gen enthielt, wurde eine 5AVA-Akkumulation bis zu einem Endtiter von 16 mg L⁻¹ erreicht.

Der dreistufige PatA-Weg für die 5AVA-Produktion auf der Grundlage von Lysindecaboxylase (*CadA*), Putrescin-Transaminase (*PatA*) und γ -Aminobutyraldehyd-Dehydrogenase (*PatD*) wurde getestet, und 5AVA-Produktionsstämme der ersten Generation wurden fertiggestellt, was zu einer Akkumulation von 24 mg L⁻¹ 5AVA führte, die Produktion siteg auf 32 mg L⁻¹ an, wenn das Wachstumsmedium mit dem Vorläufer Cadaverin ergänzt wurde.

Darüber hinaus identifizierte das NTNU einen mutmaßlichen Lysin-Riboswitch in *B. methanolicus* und testete und charakterisierte ihn. Von der NTNU wurden 10 mutmaßliche Promotoren aus *B. methanolicus* ausgewählt und experimentell verifiziert und ihre Funktionalität in Kombination mit dem Lysin-Riboschalter vorgestellt. Außerdem wurde das Potenzial eines Purin-Riboschalters aus *B. subtilis* für die Regulierung der Genexpression im thermophilen *B. methanolicus* untersucht, wodurch ein neuartiges Werkzeug für die induzierbare Genexpression in diesem Bakterium geschaffen wurde.

Die genomische Charakterisierung ergab keine spezifischen Gencluster für die Synthese von Osmoprotektoren, außer für die L-Glutamat-Produktion. Die molekulare Analyse ergab, dass die Expression von zwei L-Glutamat-Synthetasen (*gltAB* und *gltA2*) zusammen mit ihrem Regulatorgen *gltC* bei erhöhtem Salzgehalt hochreguliert wurde. Dementsprechend stieg der zelluläre Pool des kompatiblen Lösungsmittels L-Glutamat mit dem Anstieg des externen Salzgehalts an. Die weitere

physiologische Charakterisierung ergab, dass *B. methanolicus* nicht in der Lage ist, bekannte Osmoprotektiva wie Cholin, Glycin-Betain, Ectoin, Carnitin aufzunehmen, wenn sie unter Wachstumsbedingungen mit hohem Salzgehalt von außen zugeführt werden.

Für die Umwandlung von L-Glutamate in Prolin wurden die endogenen *proBA*- und *proI*-Gene von *B. methanolicus* verwendet, wobei die natürliche Prolin-Rückkopplungshemmung des ProB-Enzyms durch Glutamat durch Einführung einer E142R-Mutation aufgehoben wurde. Darüber hinaus wurde die T-Box für die Translationsregulation entfernt, um die translatorische Rückkopplungshemmung des *proBAI*-Genclusters aufzuheben. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass Prolin von *B. methanolicus* synthetisiert und ausgeschieden wird, wenn es auf Methanol wächst. In Zusammenarbeit mit Acies Bio wurden Fermentationen der modifizierten *B. methanolicus*-Stämme in Methanol-basierten Minimalmedien durchgeführt, die zu einer Prolin-Produktion mit einem Titer von 262 mg/L führte.

Das genetische Werkzeug CRISPR Interference in *B. methanolicus* wurde von der UNIBI zusammen mit der NTNU entwickelt und etabliert und an den Zielgenen *spo0A*, *mtlD* und *kata* getestet. Die für *B. methanolicus* relevanten Gene *fbaC/P*, *hps*, *phi*, *glpXC/P* und *tktC/P*, die eine wichtige Rolle im Methanol-Stoffwechsel im Ribolosemonophosphat-Weg (RumP) spielen, wurden ebenfalls untersucht. Das CRISPRi-gesteuerte Silencing von *odhA* führte zu einer Umleitung des Stoffwechselstroms im Tricarbonsäurezyklus zu Glutamat in *B. methanolicus*, wodurch die Glutamatproduktion ($3,7 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$) erhöht wurde. Mit Hilfe von Python wurde eine CRISPR-Bibliothek entwickelt, die eine Auswahl an sgRNAs für etwa 95 % der Gene im Stamm *B. methanolicus* MGA3 bereitstellt.

Nach der Konstruktion von Plasmiden, die auf dem Vektor pBV2xp basieren, wurden diese auf die Produktion des Lysinderivats L-Pipecolsäure (L-PA) getestet. Der gewählte Stoffwechselweg ist gut charakterisiert und umfasst eine L-Lysin- α -Oxidase aus *Bacillus simplex* (*aipBs*) oder *Scomber japonicus* (*aipSj*) und eine $\Delta 1$ -Piperidein-2-Carboxylat-Reduktase (*dpkA*) aus *Pseudomonas putida*. Darüber hinaus wurden 0,5 mg/L Pipecolsäure vom Projektpartner NTNU durch heterologe Expression von Lysinoxidasen, Piperidein-2-Carboxylat-Reduktasen und homologe Expression von nativer Katalase hergestellt.

Im Rahmen von WP5 wurde das zuvor erstellte Genom-Skalen-Modell (GSM) des Wildtyp-Stammes *B. methanolicus* MGA3 mit Hilfe phänotypischer Microarray-Daten verfeinert. Insgesamt wurden 30 Bedingungen in den Phänotyp-Assays durchweg als positiv erkannt. Zur Bestätigung wurden 11 dieser Kohlenstoffquellen für weitere Tests ausgewählt. Drei alternative Kohlenstoffquellen wurden bestätigt: D-Fructose, D-Ribose und D-Gluconsäure. Obwohl *B. methanolicus* in der Lage ist, auf diesen neuen Nährstoffen aktiv zu wachsen, sind die Wachstumsraten im Vergleich zum Methanol-Wachstum niedrig (d. h. $0,03\text{h}^{-1}$, $0,02\text{h}^{-1}$, $0,09\text{h}^{-1}$ bzw. $0,41\text{h}^{-1}$). Diese experimentellen Ergebnisse wurden in das GSM eingearbeitet, um dessen Vorhersagefähigkeit zu verbessern.

Gemeinsam mit dem UNBI führte das INSA eine Charakterisierung des methylo-trophen und nicht-methylo-trophen (Mannitol- und Arabitol-Wachstum) Stoffwechsels von *B. methanolicus* MGA3 mit Hilfe von Omics-Ansätzen durch. Die erhaltenen Fluxomkarten zeigen, dass die spezifischen Assimilationswege jeder Kohlenstoffquelle sehr aktiv sind. Allerdings ist der Fluss durch den Pentosephosphatweg (PPP) unter methylo-trophen Bedingungen höher als unter nicht-methylo-trophen Bedingungen. Im Gegensatz dazu wird der Tricarbonsäurezyklus (TCA) bei Methanol gerade ausreichend genutzt, um die Synthese von Biomassevorläufern zu unterstützen, während der TCA bei Mannitol und Arabitol intensiv genutzt wird.

Die leistungsstärksten GABA-produzierenden Stämme wurden mit einer Multi-omics-Analyse untersucht, insbesondere ABBM4307 und eine Version von ABBM4307, die das pBV2xp-GADst-Plasmid enthält, wurden für die systembasierte Analyse ausgewählt. Die Plasmid-tragende Version des Stammes produzierte mehr L-Glutamat als der Elternstamm, unabhängig von der Induktion oder GABA-Produktion. SINTEF trug mit Fermentationen im Labormaßstab der ausgewählten Glutamat- und GABA-produzierenden Stämme mit den Namen ABBM4307, ABBM4307 pBV2xp-gadSt und MGA3 pBV2xp-gadSt bei.

Die drei Stämme haben ähnliche Wachstumsraten und Methanol-Aufnahmeraten ($0,31\text{h}^{-1}$ bzw. 23mmol/gDCW/h). Die L-Glutamat-Produktionsrate des Stamms ABBMgadSt ist jedoch fast fünfmal höher als die des Stamms MGA3gadSt ($0,809\text{ mmol/gDCW/h}$ bzw. $0,167\text{ mmol/gCDW/h}$) und erreicht 550 mg/L des gesamten produzierten L-Glutamats im Vergleich zu 140 mg/L . Trotz der signifikanten Unterschiede in der L-Glutamat-Produktion ist die GABA-Produktion in beiden Stämmen ähnlich: 160 mg/L in ABBMgadSt und 120 mg/L in MGA3gadSt. Die Analyse der Genomikdaten zeigt, dass der Stamm ABBMgadSt im Vergleich zum Wildtyp-Stamm MGA3gadSt 141 Mutationen aufweist, und bis zu 10 SNPs wurden in Genen identifiziert, die mit dem Fettsäurestoffwechsel zusammenhängen.

Die gesammelten Ergebnisse und Erkenntnisse werden von einem neu gegründeten Konsortium, an dem drei der C1-Pro Partner beteiligt sind (Acies Bio, NTNU und UniBi), genutzt und weiter untersucht. Das neue Projekt MCM4SB beschäftigt sich ebenfalls mit dem C1-Substrat Methanol und hat das Ziel konkurrierende Lebensmittelrohstoffe durch Methanol, CO_2 und Methylamin für eine nachhaltige Bioökonomie zu ersetzen und seine Bemühungen um die Einführung einer Methanol basierten Bioökonomie fortsetzen.

3. Anhang zur ausführlichen Darstellung der Ergebnisse der UNIBI

Weitergehende Informationen zu den Arbeiten von UNIBI sind hier aufgeführt.

Arbeitspaket 2: Entwicklung von 5AVA-Produktionsstämmen und Anwendung synthetischer Regelkreise (Leitung: SINTEF) & **Arbeitspaket 4:** Entwicklung von L-PA-Produktionsstämmen und Anwendung synthetischer Regelkreise (Leitung: UNIBI)

Produktion von 5AVA und L-PA

Nachdem für die Produktion der Lysin-derivate 5-Aminovaleriansäure (5AVA) und L-Pipecolinsäure (L-PA) Plasmide basierend auf pBV2xp, dem theta-replizierenden Vektor mit Kanamycin- und Ampicillinresistenz und Xylose induzierbaren Expressionssystem, konstruiert wurden (Abbildung 1), wurden diese Plasmide den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

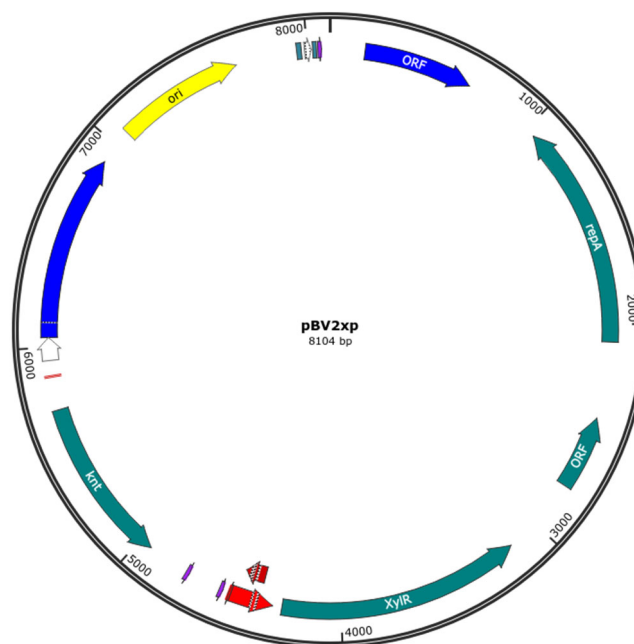


Abbildung 1: Entwickeltes pBV2xp Plasmid. Dieser theta-replizierende *E. coli*-*B. methanolicus* Shuttle Vektor besitzt einen Xylose-induzierbaren Promotor und eine Ampicillin- sowie Kanamycinresistenz.

Arbeitspaket 2: Entwicklung von 5AVA-Produktionsstämmen und Anwendung synthetischer Regelkreise (Leitung: SINTEF)

Es wurde der Drei-Schritt-Pathway für die 5AVA Produktion basierend auf Lysindecaboxylase (LdcC), Putrescintransaminase (PatA) und γ -Aminobutyraldehyd-Dehydrogenase (PatD) von NTNU vorläufig getestet und es wurden 5AVA-Produktionsstämmen der ersten Generation fertiggestellt. Alternativ hierzu wurden Plasmide mit Lysin- und Putrescinoxidasen konstruiert.

Plasmid für 5AVA Production: pBV2xp-cadA-patDA

Plasmide für L-PA Production: pBV2xp-lysDHGi-proC

pBV2xp-lysDHGi-proI

pBV2xp-lysDHSp-proC

pBV2xp-lysDHSp-proI

pBV2xp-lat-proC

pBV2xp-lat-proI

Die Plasmide enthalten Gene für Lysindecaboxylase (*cadA*), Putrescinaminotransferase und Dehydrogenase (*patDA*) aus *E. coli*, Lysindehydrogenase (*lysDH*) aus *Geobacillus icigianus* oder *Silicibacter pomeroyi*, Lysinaminotransferase (*lat*) *Stenotrophomonas* sp., Pyrrolin-5-Carboxylatreductase (*proC*; *proI*) aus *Corynebacterium glutamicum* oder *Bacillus methanolicus*.

Die Funktion der Putrescinoxidasen als Alternative zur Putrescintransaminase im drei-schrittigen Stoffwechselweg (Abbildung 2) wurde vorab in dem Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum* in Bielefeld experimentell bewertet.

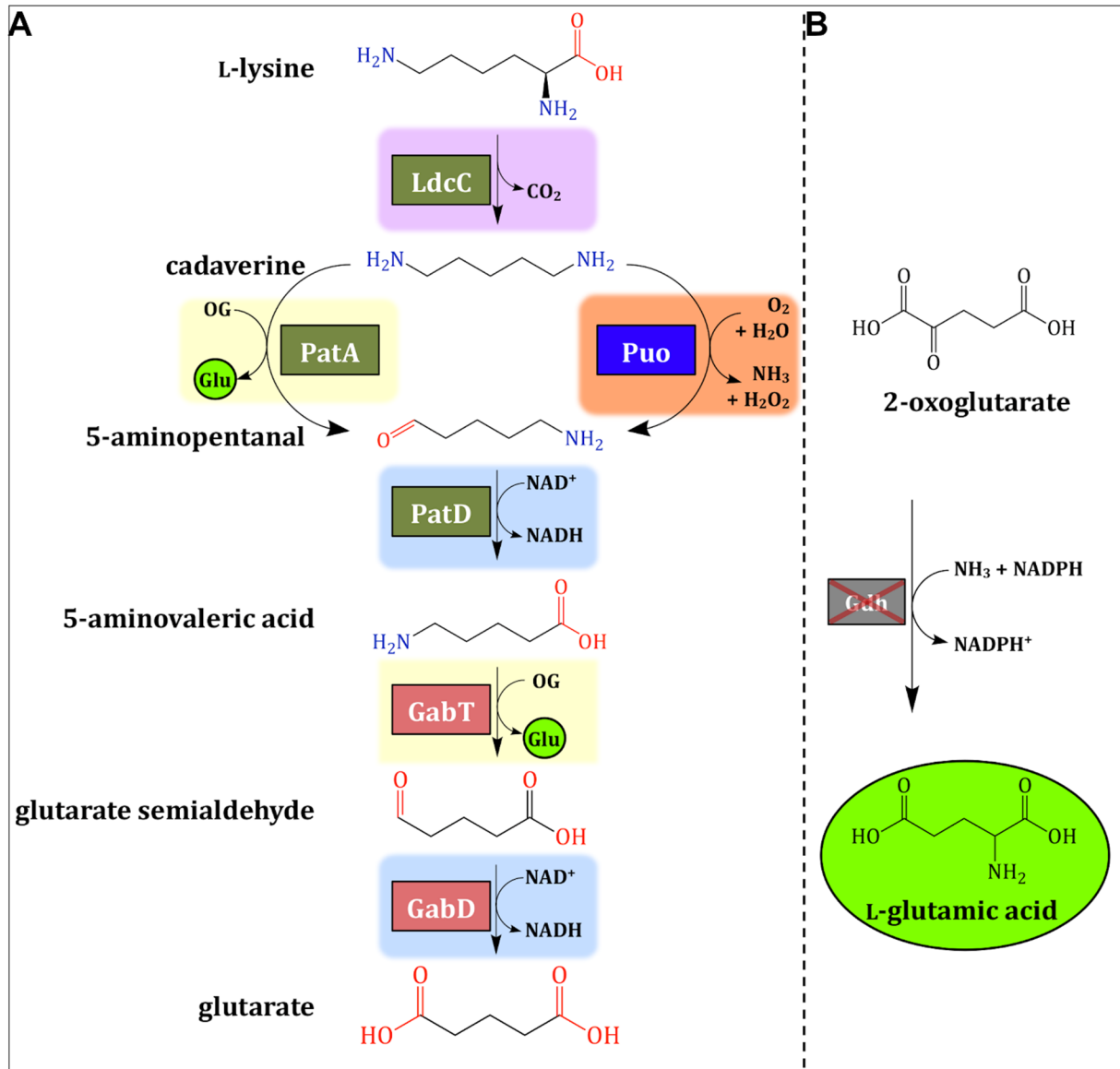


Abbildung 2: Fermentative Produktion von 5-aminovalerat (5AVA) und Glutarat.

(A) Ein neuer dreistufiger Stoffwechselweg zur Herstellung von 5AVA und Glutarat wurde durch Austausch einer Transaminase eines bestehenden dreistufigen Weges (*PatA*) gegen eine Oxidase (*Puo*) etabliert. Der erwarteten Verschiebung der Netto-Stickstoffassimilation in Form von L-Glutaminsäure wird durch (B) endogene L-Glutaminsynthese durch L-Glutaminsäuredehydrogenase (*Gdh*) entgegengewirkt, die deletiert wurde, um den Fluss in Richtung Glutarat zu verstärken. Rosa Bereiche zeigen Decarboxylierungsreaktionen. Gelbe Bereiche zeigen Transaminierungsschritte. Orangefarbene Bereiche zeigen Desaminierungsschritte. Blaue Bereiche zeigen Oxidationen. Rotschattierte Gene (*gabT*, γ -Aminobutyrat (GABA) / 5AVA-Aminotransferase; *gabD* und Succinat / Glutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase) sind native Gene von *Corynebacterium glutamicum*. Zusätzlich wurden Kopien von *gabTD* von *Pseudomonas stutzeri* durch heterologe Überexpression hinzugefügt. Das grau schattierte

Gen (*gdh*, L-Glutaminsäuredehydrogenase) ist in *C. glutamicum* heimisch. Die dunkelgrün schattierten Gene (*ldcC*, L-Lysin-Decarboxylase, *patA*, Putrescin-Transaminase und *patD*, γ -Aminobutyraldehyd-Dehydrogenase) stammen ursprünglich aus *Escherichia coli* und wurden durch heterologe Überexpression hinzugefügt. Das blau schattierte Gen (*puo*, Putrescinoxidase; EC 1.4.3.10) stammt ursprünglich von *Rhodococcus qingshengii* und *Paenarthrobacter aurescens* und wurde heterolog in *C. glutamicum* exprimiert. L-Glutaminsäure ist hellgrün hervorgehoben. OG: 2-Oxoglutarat, Glu: 1-Glutaminsäure.

Für die Produktion wurde ein Lysin-produzierender Stamm *C. glutamicum* (GSLA2 Δ *gabTDP*) mit Plasmiden transformiert, die die Gene des synthetischen Drei-Schritt-Stoffwechselweges tragen. Der Stamm wurde im Biolector (Mikrotiterplatten, 800 μ L – 1200 μ L je Well) kultiviert und der Überstand wurde mittels HPLC hinsichtlich Lysin, Cadaverin, 5AVA und das Nebenprodukt Glutarat quantifiziert. Der Stamm, der die Putrescinoxidase aus *Rhodococcus qingshengii* exprimiert, sezernierte 5AVA bis zu einem Titer von 3.7 g/L (Abbildung 3). Dies belegte die Funktion der Putrescinoxidase, sowie des synthetischen Drei-Schritt-Stoffwechselweges und eine erhöhte Produktion bei erhöhter Sauerstoffversorgung. Eine Überexpression der Putrescinoxidase in *B. methanolicus* auf dem Plasmid pBV2xp wurde von dem Projektpartner NTNU vorgenommen.

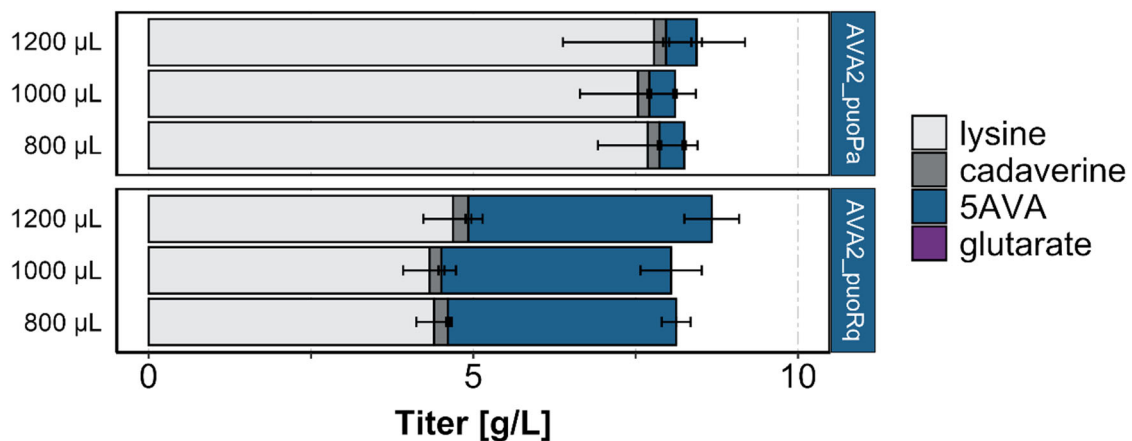


Abbildung 3: Produktionstiter von 5AVA und Nebenprodukten von Stämmen, die von *C. glutamicum* GSLA2 Δ *gabTDP* (pVWEx1-*ldcC*) abgeleitet sind. Die Zellen wurden in einem Biolector unter Verwendung verschiedener Kulturvolumina (800–1200 μ L) eines 4%-igen Glucose-Minimalmediums, ergänzt mit 1 mM IPTG, gezüchtet und nach 48 h geerntet. Werte und Fehlerbalken repräsentieren Mittel- und Standardabweichungen (n = 3 Kultivierungen).

Arbeitspaket 3: Entwicklung von L-Prolin-Produktionsstämmen und genetischen Werkzeugen für die Entwicklung industrieller Produktionsstämmen (Leitung: BASF)

CRISPRi in *B. methanolicus*

In Bielefeld konnte das genetische Tool CRISPR interference in *B. methanolicus* zusammen mit norwegischen Projektpartnern entwickelt und etabliert werden. Dazu wurde das Plasmid-System piCas entwickelt, um wichtige Zielgene zu reprimieren (Abbildung 4). Die Ergebnisse markieren einen wissenschaftlichen und technologischen Durchbruch, das erstmals *gene knockdowns* durchgeführt werden können (Schultenkämper et al., 2019).

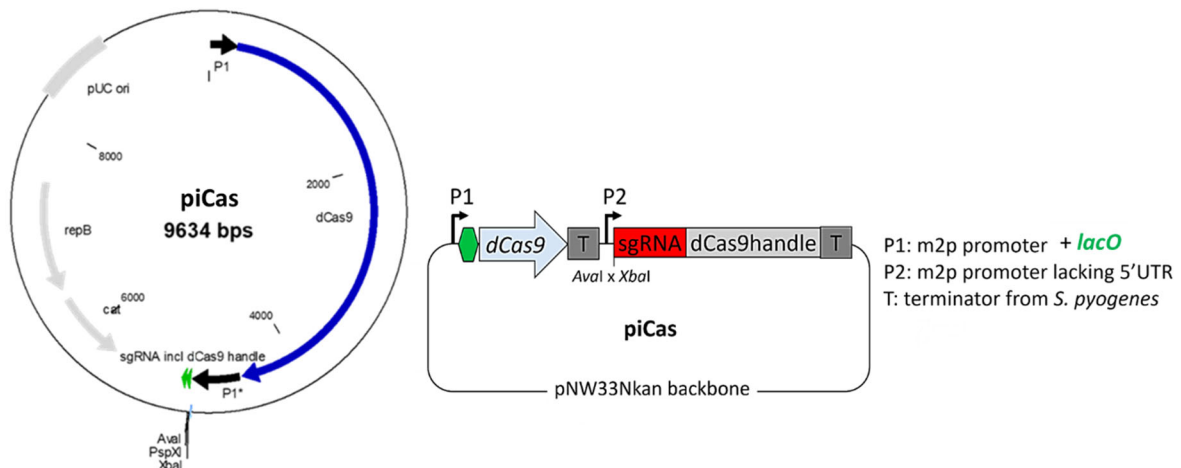


Abbildung 4: Entwickeltes piCas Plasmid. Mit P1 und P2 sind Mannitol-induzierbare Promoter von *B. methanolicus* dargestellt, die die Expression von *dCas9* kontrollieren und die guide RNA (sgRNA)-Synthese.

Als *Proof of Concept* wurde die Genexpression von *spo0A* mit dem piCas System reprimiert. Weitere Targets auf dem Chromosom von *B. methanolicus* stellen die Gene für die Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase sowie die Katalase dar (Abbildung 5).

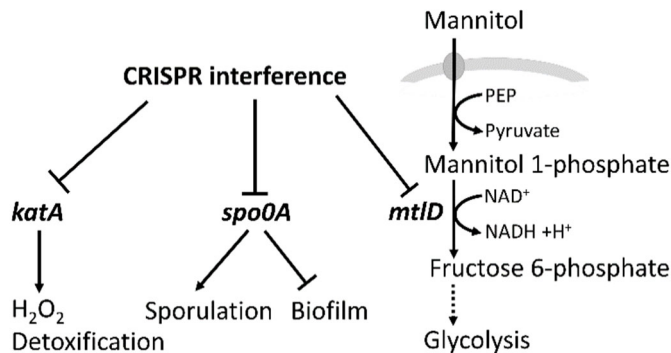


Abbildung 5: Übersicht der Target-Gene für CRISPRi.

Mithilfe von *dCas9* wurde zunächst die Sporenbildung des *B. methanolicus* Stammes piCas-tspo0A während eines Wachstumsexperimentes untersucht. Unter induzierenden Wachstumsbedingungen (200 mM Methanol + 12.5 mM Mannitol) konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm im Vergleich zu den Leervektor-Stämmen kaum Sporen bildet und zu 90 % den vegetativen Phänotyp beibehält (Abbildung 6).

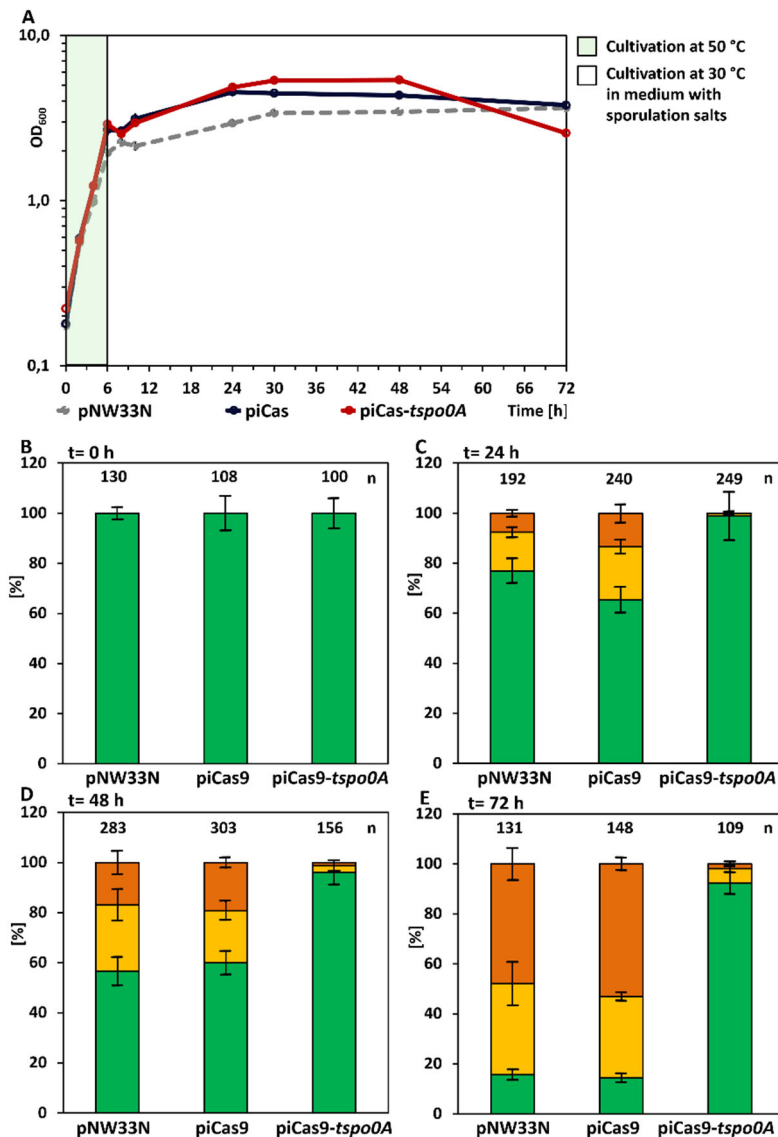


Abbildung 6: Wachstumsexperiment (A) und Untersuchung der Sporenbildung (B) von *B. methanolicus* pNW33N, piCas, sowie piCas-*tspo0A*. In Grün sind vegetative Zellen, in Gelb Mittelstufen-Sporen und in Orange voll entwickelte Endosporen, dargestellt.

Da *spo0A* auch die Biofilm- Bildung reguliert, wurde die Biofilmbildung der *B. methanolicus* Stämme nach Kristallviolett-färbung untersucht. Unter induzierenden Wachstumsbedingungen konnte gezeigt werden, dass piCas-*tspo0A* signifikant mehr Biofilm bildete als die nicht-induzierte Kontrolle, aber auch im Vergleich zu den Leervektor-Stämmen (Abbildung 7).

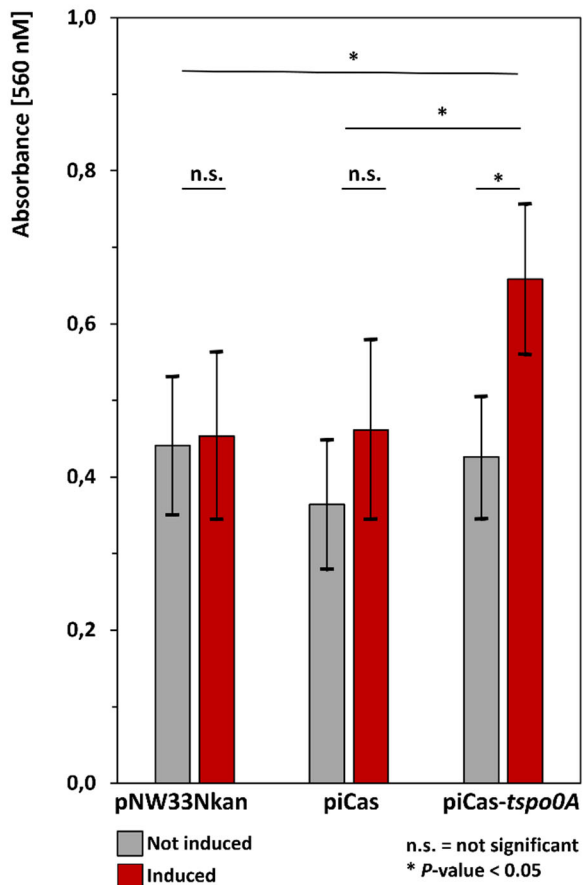


Abbildung 7: Biofilm Formation von *B. methanolicus* pNW33Nkan, piCas, sowie piCas-tspo0A unter induzierten (rot), sowie nicht-induzierten (grau) Wachstumsbedingungen.

Durch Repression der Genexpression des Regulatorgens *spo0A* mittels dCas9 konnte gezeigt werden, dass das genetische Tool CRISPRi in *B. methanolicus* zum Knock-down verwendet werden kann. Doch darüber hinaus wurde mit dem Target *mtlD* (Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase) gezeigt, dass auch ein kataboles Gen reprimiert werden kann. Dieses wurde zunächst in Wachstumsexperimenten genauer analysiert. Bei Wachstum auf Methanol zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Leervektoren pNW33N und piCas (Abbildung 8A-B). Bei Wachstum auf Mannitol als einziger Kohlenstoffquelle konnte aber ein signifikanter Unterschied der Biomasse festgestellt werden. Die Biomasse-Bildung von piCas-*tmtD* war signifikant reduziert (Abbildung 8C). Des Weiteren wurde in einem Enzymtest nachgewiesen, dass die Aktivität von MtlD unter induzierenden Bedingungen und mit Mannitol als einziger Kohlenstoffquelle signifikant und den Faktor zwei reduziert war (Abbildung 8D). Um diese Ergebnisse unabhängig zu bestätigen, wurden mit genspezifischen Primern für *mtlD* qRT-PCRs durchgeführt, welche zeigten, dass erwartungsgemäß die mRNA Expression fünffach verringert war (Abbildung 8E).

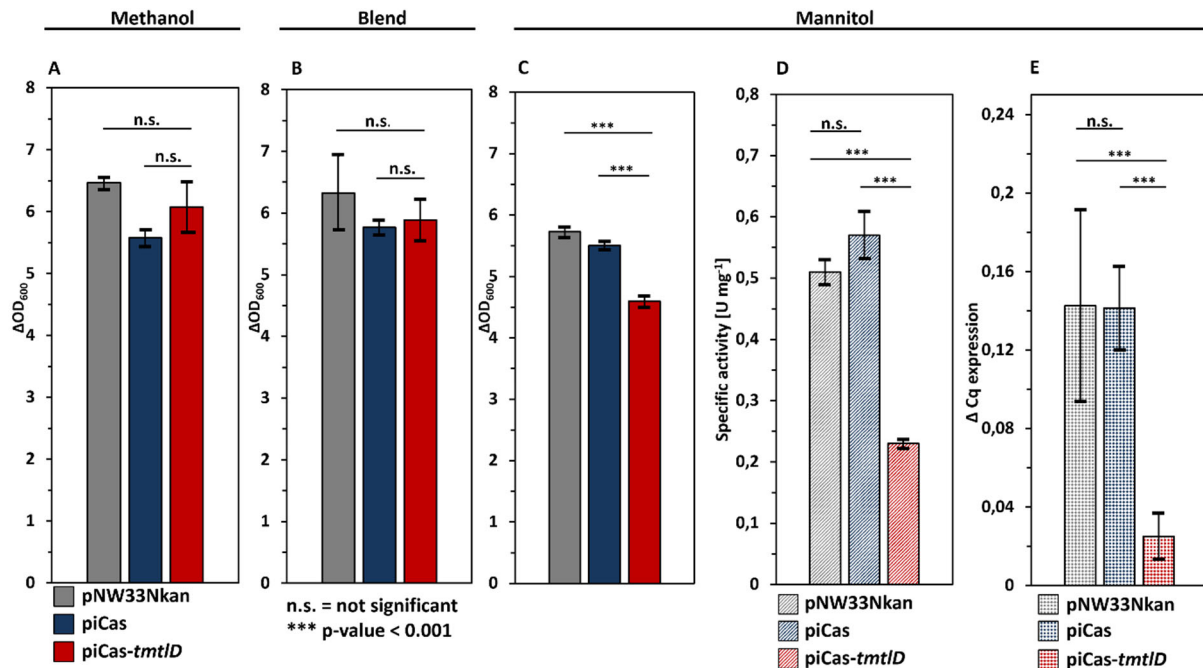


Abbildung 8: CRISPR Interference des Mannitol-1phosphate-Dehydrogenase Gens *mtlD* reduzierte das Endwachstum (A-C) von *B. methanolicus*-Stämmen mit Mannitol als Kohlenstoffquelle und verringerte die spezifische Aktivität (D) und die Expression (E) von *mtlD* als Target mit dCas9.

Darüber hinaus wurde die Katalase *kataA* von *B. methanolicus* mit dCas reprimiert. In einem H₂O₂ Tropf-Test konnte gezeigt werden, dass piCas-tkataA unter induzierenden Bedingungen kein Wasserstoffperoxid zu molekularem Sauerstoff und Wasser mehr umsetzen konnte (Abbildung 9A). In einem Enzymtest konnte zudem gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität der Katalase vierfach verringert war (Abbildung 9B).

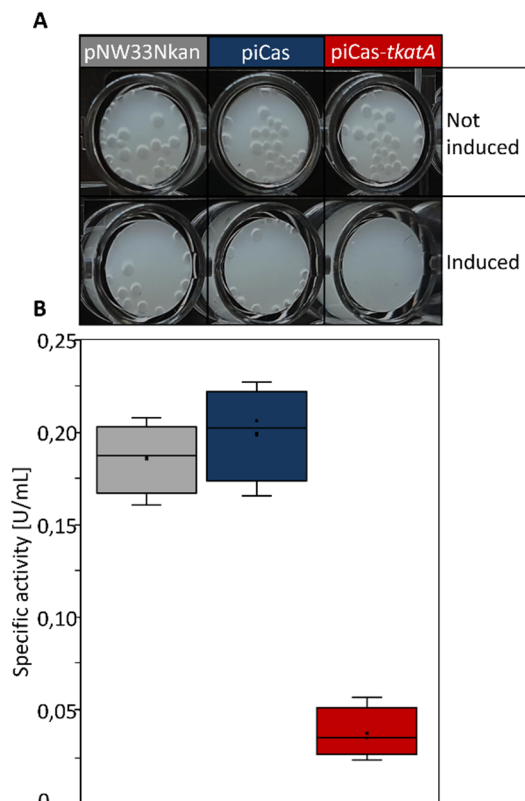


Abbildung 9: Wasserstoffperoxid Tropf-Test (A) und Enzymassay zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der endogenen Katalase (B).

Mithilfe des CRISPRi Tools konnte also das erste Mal in *B. methanolicus* gezeigt werden, dass es möglich ist, gezielt Gene zu reprimieren und, dass das entwickelte Tool nützlich ist, um den Organismus besser analysieren zu können. Zudem können nun Knock-downs durchgeführt werden, die für die Entwicklung neuer Produktionsstämme ausgehend von Methanol als Kohlenstoffquelle vorteilhaft sein könnten.

Analyse des Methanol-Stoffwechsels von *B. methanolicus* mithilfe von CRISPRi

Neben der bereits gezeigten und publizierten Repression der Genexpressionen des Sporulationsregulator-Gens *spo0A*, des Mannitol Dehydrogenase-Gens *mtlD* und des Katalase-Gens *katA* (Schultenkämper et al., 2019), konnte weiterführend gezeigt werden, dass mit dem entwickelten piCas Plasmid System auch die Genexpression vom Genen der Methanol-Verstoffwechselung und des Ribulose-Monophosphat-Stoffwechselweges (RuMP) reprimiert werden konnte. Dazu gehörten *fba^{C/P}* (Fructose 1,6-bisphosphate aldolase), *glpX^{C/P}* (Fructose-1,6-bisphosphatase), *tkt^{C/P}* (Transketolase), *hps* (3-Hexulose-6-phosphat synthase) und *phi* (6-Phospho-3-Hexuloisomerase) (Abbildung 10, grün markierte Gene). Damit konnten erstmals *loss-of-function*-Analysen in *B. methanolicus* durchgeführt werden. Die CRISPR interference Technologie ermöglicht *knockdowns* und damit Einblicke in die Physiologie von *B. methanolicus*, sowie Erkenntnisse für die Methanol-basierte Produktion von Wertstoffen.

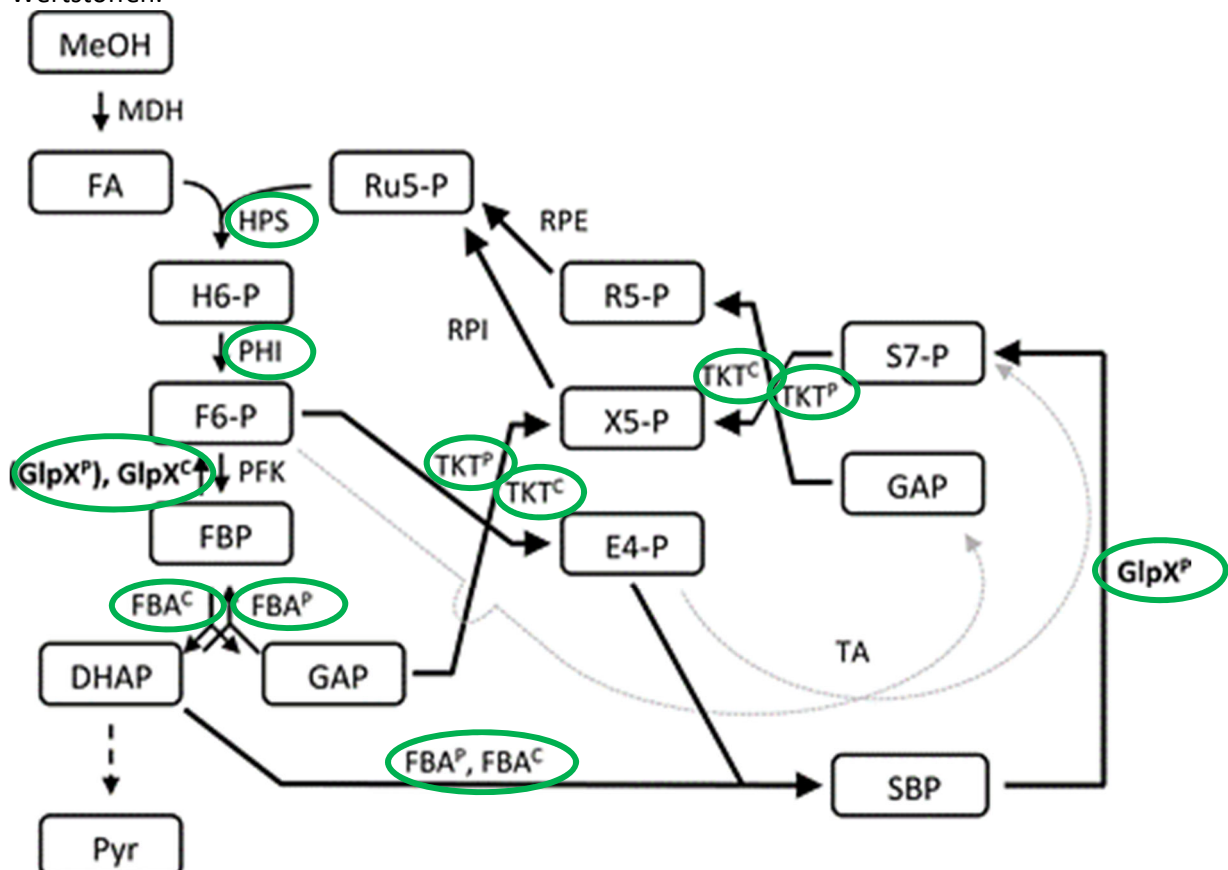


Abbildung 10: Darstellung der biochemischen Reaktionen des Methanolstoffwechsels von *B. methanolicus*. Sowohl die TA-Variante (gestrichelte Pfeile) als auch die SBPase-Variante (durchgezogene Pfeile) des RuMP (Ribulose-Monophosphat-Pathway)-Zyklus sind dargestellt. In grünen Kreisen sind die Gene markiert, die mit CRISPR interference mithilfe des entwickelten piCas Plasmides reprimiert wurden. Plasmid-kodierte Gene sind mit ^P, chromosomale Gene mit ^C markiert. Abkürzungen: Hexulose-6-Phosphatase (HPS), Hexulose 6-Phosphat (H6-P), 6-Phospho-3-Hexuloisomerase (PHI), Fructose-6-Phosphat (F6-P), Phosphofruktokinase (PFK), Fructose

Bisphosphatase (GlpX), Fruktose-1,6-Bisphosphat (FBP), Fruktose-1,6-Bisphosphat Aldolase (FBA), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), Pyruvat (Pyr), Sedoheptulose 1,7-Bisphosphatase (SBP), Erythrose-4-phosphat (E4-P), Sedoheptulose-7-Phosphat (S7-P), Xylose 5-Phosphat (X5-P), Ribose-5-Phosphat (R5-P), Ribulose-5-Phosphat (Ru5-P), Transketolase (TKT), Ribulose-5-Phosphat-3-Epimerase (RPE), Ribose-5-Phosphat-Isomerase (RPI), Transaldolase (TA). (Modifiziert nach Stolzenberger et al., 2013).

Für die Gene *fba^{C/P}*, *glpX^{C/P}* und *tkt^{C/P}* gibt es jeweils 2 Kopien, eine auf dem Chromosom (C) von *B. methanolicus* und eine Kopie auf dem natürlich vorkommenden Plasmid pBM19 (P). CRISPR interference mithilfe des entwickelten piCas Plasmids wurde durch qRT-PCR auf RNA-Ebene und durch Enzymaktivitätstests nachgewiesen. Dabei wurde ein Kompensationseffekt entdeckt: wurde *fba^P* reprimiert, kompensierte *fba^C* und umgekehrt (qRT-PCR Daten und Enzymassays, Abbildung 11). Bisher war bekannt, dass durch Methanol die Expression der plasmidären Gene wie *fba^P* induziert wurde, eine Regulation in Abhängigkeit der jeweils anderen Genkopie war unbekannt. Dies lieferte wichtige Hinweise auf die Stoffwechselregulation in *B. methanolicus* und dient als Ausgangspunkt für zukünftiges *Metabolic Engineering* zur Verbesserung der Methanol-basierten Wertstoffproduktion.

A

Crude extract:	Activity [U mg ⁻¹]	K _m [mM, FBP]
FBA^C +	0.26	1.99 ↑
FBA^C -	0.14	0.14
FBA^P +	0.09	0.15
FBA^P -	0.13	0.22
FBA^C purified*	5.20	0.20
FBA^P purified*	2.50	2.00

+ = induced with mannitol (12.5 mM)
- = not induced

*Stolzenberger et al., 2013

Similar

B

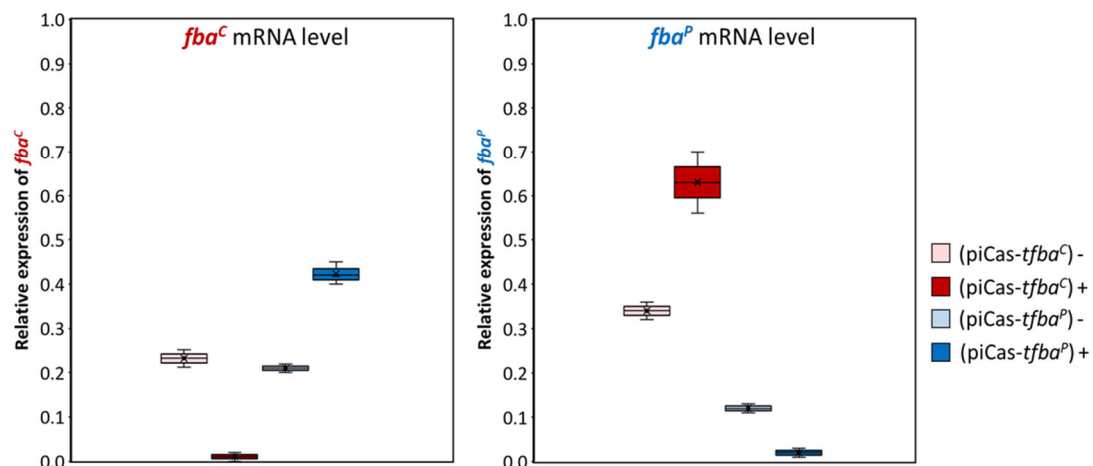


Abbildung 11: CRISPR interference von *fba^{C/P}*. **A)** Kinetische Parameter des durchgeführten Enzymassays zeigen, dass wenn die Genexpression von *fba^C* mit dCas9 herunterreguliert wird, dies auch Auswirkungen auf den K_m-Wert hat. Der K_m-Wert von FBA^C stieg auf 1.99 mM Fruktosebisphosphat (FBP) und somit verschlechterte sich die Bindungsaffinität des Substrates in dem Maße des Literatur-Km-Wertes von FBA^P. **B)** Auswirkungen des dCas9 auf die Genexpression von *fba^{C/P}* wurden mittels qRT-PCRs untersucht. Das *fba^C* mRNA Level sank, da *fba^C* durch dCas9 erfolgreich reprimiert wurde, während das *fba^C* mRNA Level in der *fba^P* Probe anstieg, welches eine Kompensation der *fba* Genexpression indiziert (B, links). Derselbe Effekt wurde verzeichnet, als *fba^P* durch dCas9 reprimiert wurde, das *fba^P* Expressionslevel sank, während es in der *fba^C* Probe stieg (B, rechts).

Insgesamt kann gefolgert werden, dass eine stärkere Repression der chromosomalen Gene durch das entwickelte CRISPRi System erzielt wurde (Abbildung 12).

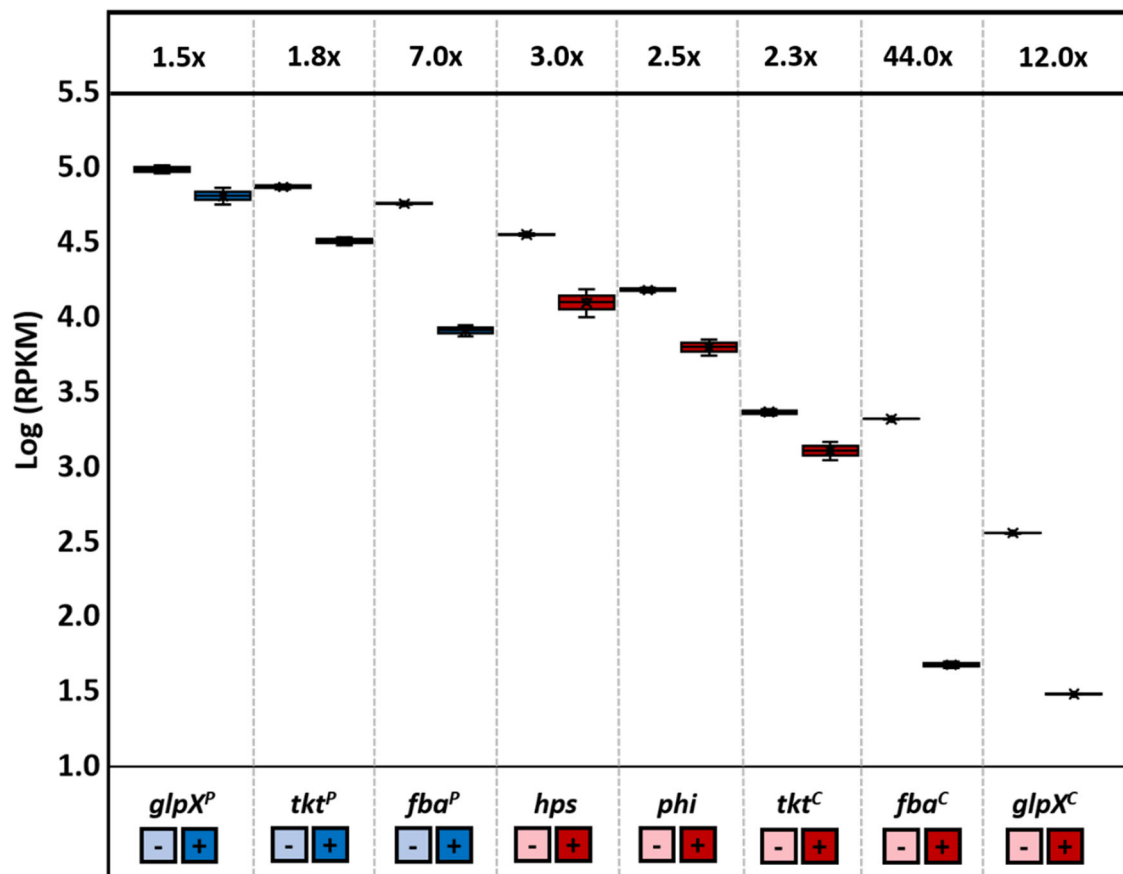


Abbildung 12: Vergleich der CRISPRi unterdrückten Zielgene, die am RuMP-Zyklus beteiligt sind. RPKM-Werte der genomweiten Transkriptomanalyse von *B. methanolicus* (Irla et al., 2015) wurden auf die Expressionsdaten der qRT-PCR-Analysen normiert und anschließend logarithmiert. Die log(RPKM)-Werte sind auf der Ordinatenachse aufgetragen. Die untersuchten RuMP-Zielgene von *B. methanolicus* sind auf der Abszissenachse dargestellt. Die Zielgene sind von links nach rechts aufgelistet: *glpX^p*, *tkt^P*, *fba^P*, *hps*, *phi*, *tkt^C*, *fba^C*, und *glpX^C*. Die entsprechenden log(RPKM)-Werte der Gene sind in Box- und Whisker-Plots ohne (-, links, hellere Farbe) bzw. mit *dcas9*-Induktion (+, rechts, dunklere Farbe) dargestellt. Oberhalb der Balken-Whisker-Boxen ist für jedes Target der Herunterregulierungsfaktor der Genexpression dargestellt.

Umlenken des metabolischen Flusses durch CRISPRi für eine verbesserte L-Glutamat Produktion

Neben den bereits untersuchten Zielgenen, welche für die Methanol Assimilation relevant sind, konnte erstmals ein Zielgen in dem Tricarbonsäure (TCA) Zyklus mit CRISPRi untersucht werden. Das Zielgen *odhA* kodiert für die 2-Oxoglutarat Dehydrogenase (E1 Untereinheit) und setzt 2-Oxoglutarat nach Succinyl-CoA um (Abbildung 13).

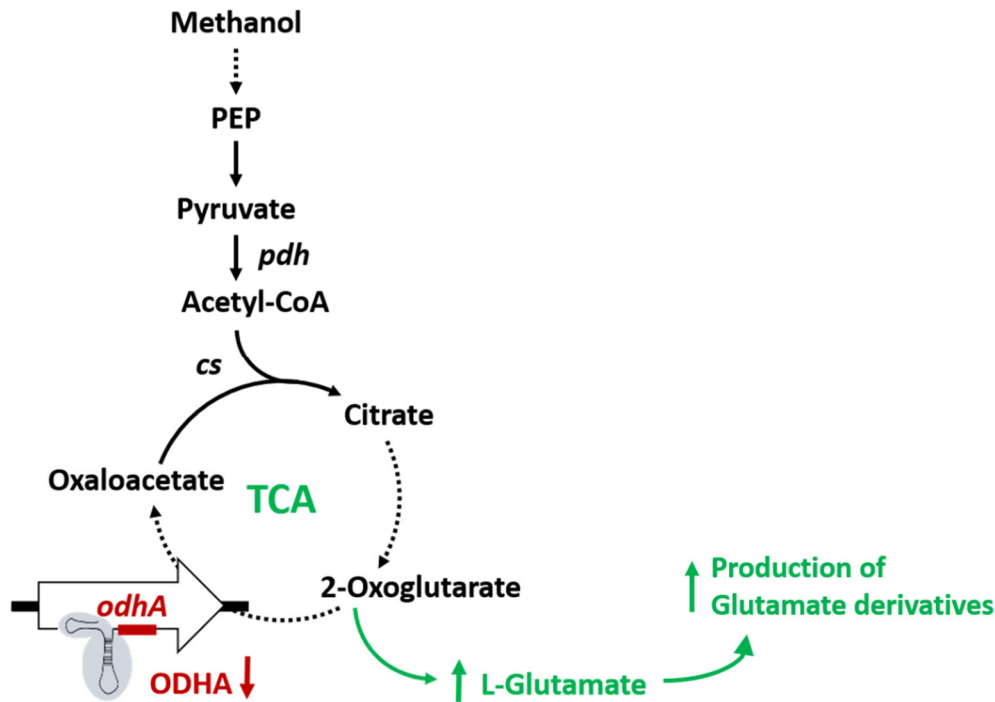


Abbildung 13: Umlenkung des metabolischen Flusses im TCA Zyklus zu Glutamat.

Durch die Repression der *odhA* Genexpression durch dCas9 soll der metabolische Fluss im TCA Zyklus so zu Glutamat umgelenkt werden, welches somit verstärkt produziert wird und wiederum die Produktion von Glutamat aufbauenden Produkten, wie z.B. GABA, steigern soll.

Zunächst wurde das *odhA* Genexpressionsniveau durch qRT-PCR Analysen untersucht, welche zeigten das *odhA* 5.5-fach weniger exprimiert wurde (Abbildung 14A). Daraufhin wurde die OdhA spezifische Aktivität in einem Enzym Assay mit *B. methanolicus* Rohextrakten bestimmt, welche eine 3.5-fach schlechtere spezifische OdhA Aktivität in dem Stamm aufdeckte, in welchem das *dCas9* induziert wurde (Abbildung 14B). Schließlich führten die verringerte *odhA* Genexpression und reduzierte spezifische OdhA Aktivität zu einer gesteigerten L-Glutamat Ausbeute mit $3.7 \pm 0.4 \text{ mg g}^{-1}$ Glutamat (Abbildung 14C).

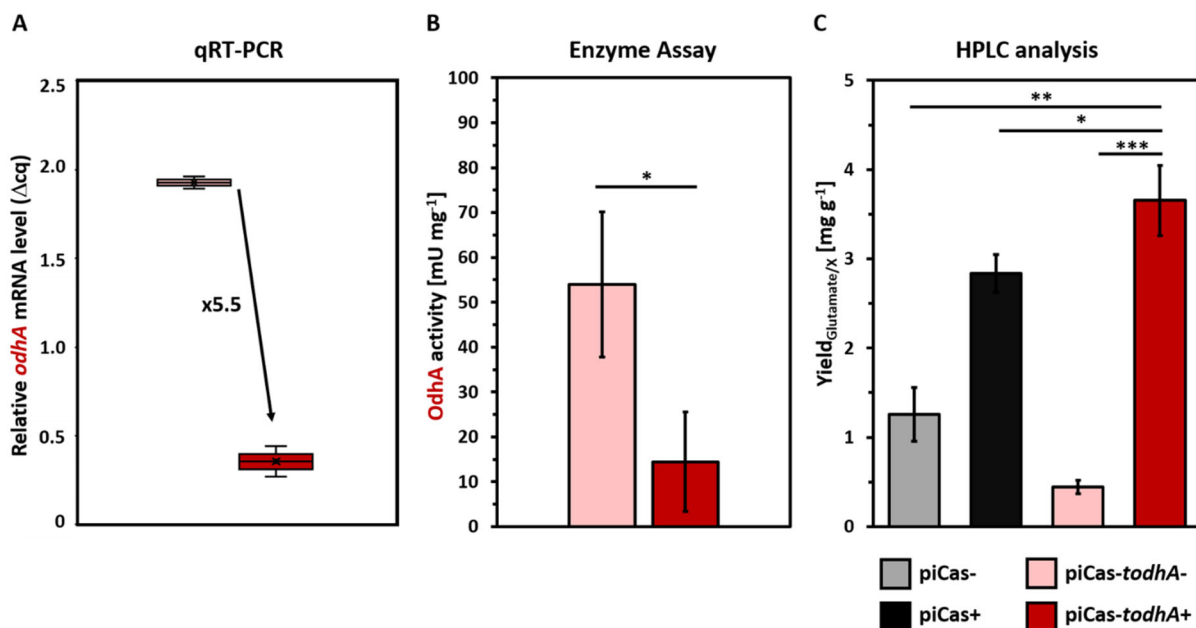


Abbildung 14: CRISPRi von *odhA* führt zu verminderter *odhA* Genexpression (A), reduzierter OdhA Aktivität (B) und gesteigerter Glutamat Ausbeute (C). Das Minus symbolisiert jeweils den *B. methanolicus* Stamm ohne *dCas9* Induktion, während das Plus die Induktion des CRISPRi Systems

verdeutlicht. Fehlerwerte (p values) des studentischen t -tests sind als Sterne angegeben: ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. A) Das relative *odhA* mRNA-Niveau von in MGA3(piCas-*todhA*-) (links) und MGA3(piCas-*todhA*+) (rechts) wird durch Box- und Whisker-Plots gezeigt, die durch qRT-PCR nachgewiesen wurden. Die schwarzen Pfeile mit neben liegenden Zahlen zeigen die Abwärtsregulierung der *odhA* Genexpression, ohne (links) und mit CRISPRi-Induktion (rechts), an. B) Die spezifische OdhA Aktivität wird in Säulendiagramm dargestellt mit Standardabweichungen aus 3 Replikaten. In Rosa ist der Stamm MGA3(piCas-*todhA*-), in Rot MGA3(piCas-*todhA*+) dargestellt. C) Die Glutamat Ausbeute (Glutamat Produktion/Biomasse), welche durch HPLC Analysen bestimmt wurde, ist in Säulendiagrammen abgebildet. Zu dem Stamm MGA3(piCas-*todhA*) mit induziertem (rot) und nicht induziertem (rosa) *dcas9*, ist auch die Leervektorkontrolle, ohne Targetsequenz für *odhA*, MGA3(piCas) mit induziertem (schwarz) und nicht induziertem *dCas9* (grau) dargestellt. Standardabweichungen wurden aus 3 Replikaten ermittelt.

Dies demonstriert das Umlenken des metabolischen Flusses und die erfolgreich erhöhte L-Glutamat Produktion durch CRISPRi zum ersten Mal in *B. methanolicus*.

Weiterentwicklung der CRISPRi-Technologie für *B. methanolicus*

Das entwickelte Plasmid piCas nutzt Mannitol als Induktor für die Geneexpression von *dCas9*. Mannitol wird durch *B. methanolicus* metabolisiert, für die Genregulation ist jedoch ein nicht-metabolisierbarer Induktor ideal (*gratuitous inducer*). Daher wurde der Mannitol-induzierbare Promotor zur Induktion von *dCas9* gegen einen Xylose-induzierbaren Promotor ausgetauscht. Dieser stammt aus *Bacillus megaterium* und Xylose wird von *B. methanolicus* nicht metabolisiert. Weiterhin wurde der Mannitol-induzierbare Promoter für die Expression der *single guide* RNA (sgRNA) gegen den endogenen, konstitutiven Methanol-Promoter ausgetauscht. Das resultierende Plasmid wurde pxiCas genannt (Abbildung 15).

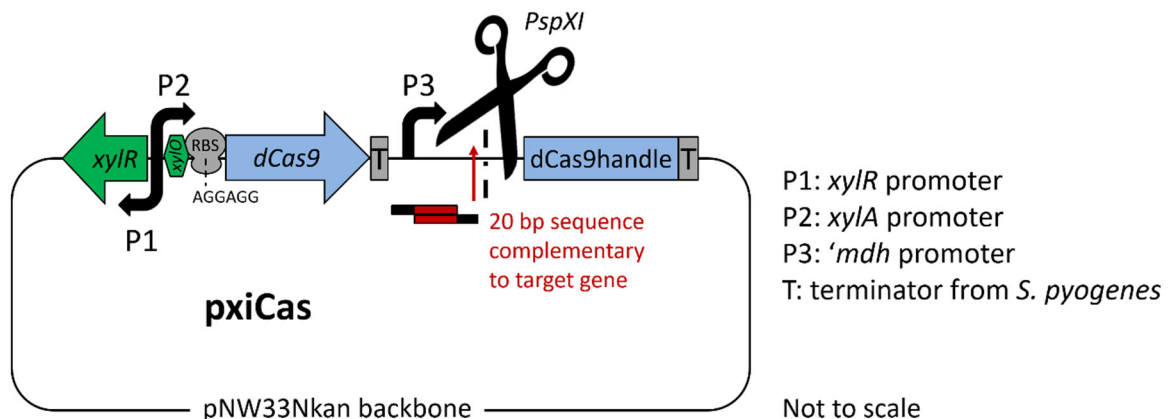


Abbildung 15: Darstellung des Xylose-induzierbaren CRISPRi-Plasmids pxiCas. P1 stellt den mit Xylose induzierbaren Promoter (xp) aus *Bacillus megaterium* dar. P2 stellt den endogenen, konstitutiven Promotor des plasmidären Gens für die Methanoldehydrogenase (*mdh*) von *B. methanolicus* dar. Das Plasmid pxiCas basiert auf dem in Abb. 4 dargestellten Plasmid piCas.

Zudem wurde das weiterentwickelte pxiCas CRISPRi System hinsichtlich seiner *dCas9* Expression untersucht. In ersten qRT-PCR Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *dCas9* Expression um 8.4-fach erhöht ist und somit 6-mal stärker als bei dem Vorläuferplasmid piCas (Abbildung 16).

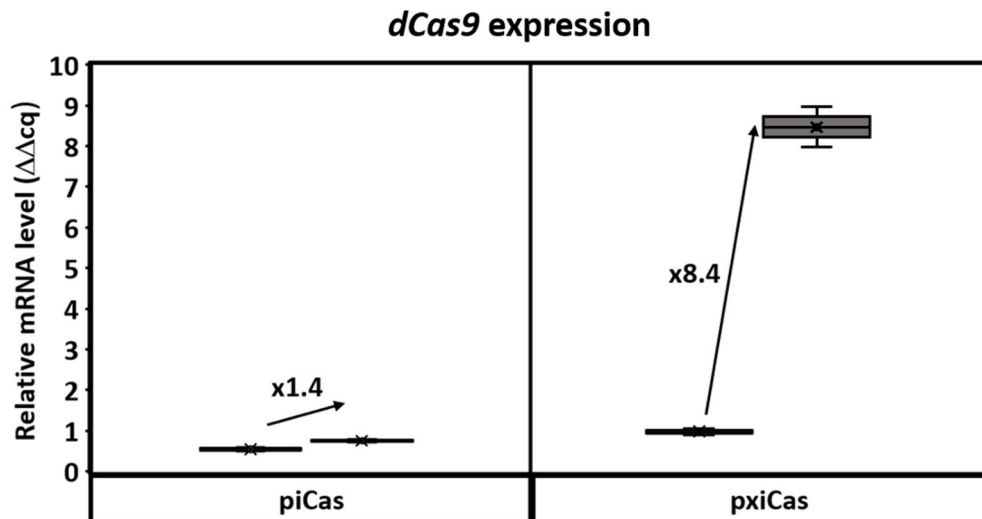


Abbildung 16: Verändertes Genexpressionsniveau von *dCas9*. Das relative mRNA-Niveau von *dCas9* in MGA3(piCas) (links), und MGA3(pxiCas) (rechts) wird durch Box- und Whisker-Plots gezeigt, die durch qRT-PCR nachgewiesen wurden. Die schwarzen Pfeile mit neben liegenden Zahlen zeigen die Aufwärtsregulierung der Stämme ohne (links) und mit CRISPRi-Induktion (rechts) an.

Um in Zukunft die Suche nach funktionalen sgRNAs zu vereinfachen, wurden in Python drei CRISPR Bibliotheken mit unterschiedlich starken Filtern für den Stamm *Bacillus methanolicus* MGA3 erstellt. Der Anteil an Genen, für welche sgRNAs ohne *offtargets* gefunden werden konnten, beträgt ca. 95% der Gene des genannten Stammes *B. methanolicus* (Abbildung 17).

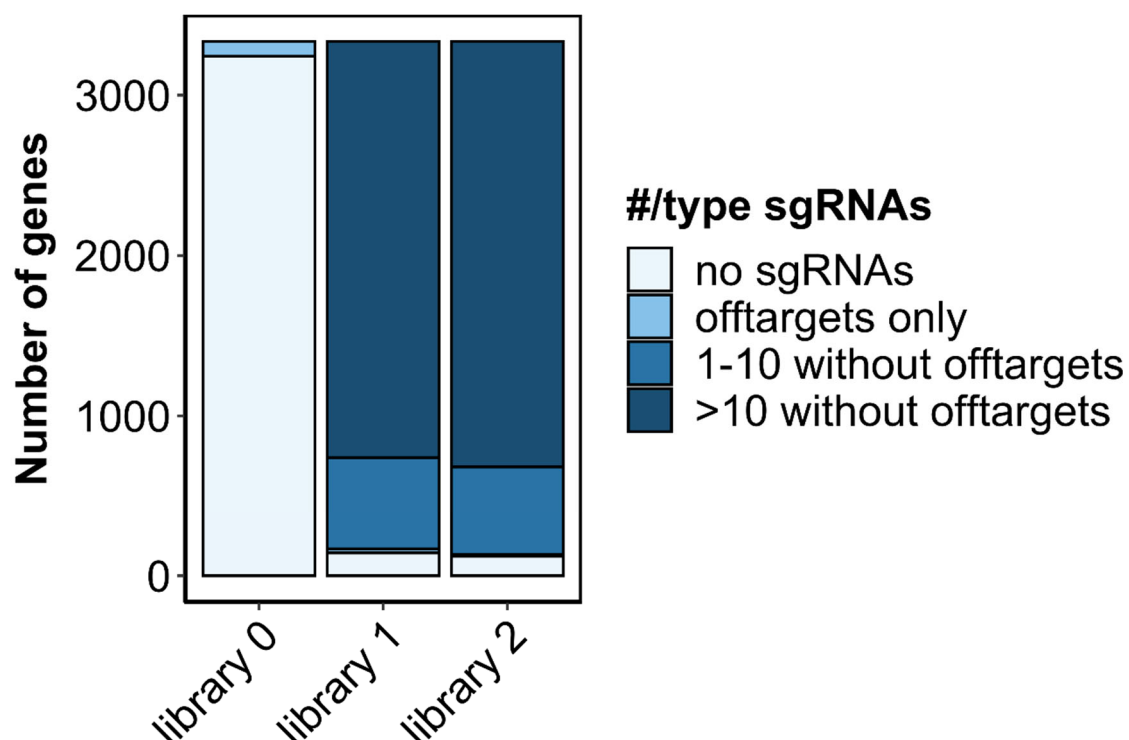


Abbildung 17: CRISPR-Bibliothek für *Bacillus methanolicus*. Drei CRISPR-Bibliotheken mit unterschiedlichen Filterstärken (library 0 > library 1 > library 2) wurden konstruiert und anhand einer Kombination der Anzahl an sgRNAs mit der Anzahl an *offtargets* kategorisiert (hellblau bis dunkelblau).

Toleranz gegenüber 5AVA

Die Auswirkungen von L-PA und 5AVA als C/N-Quelle wurden untersucht (Abbildung 18). Die Kulturen wurden in Minimalmedium gezüchtet und mit äquimolaren Mengen von 200 mM Kohlenstoff und 32 mM Stickstoff ergänzt. Keines der Lysin-Derivate konnte das Wachstum von *B. methanolicus* als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle unterstützen.

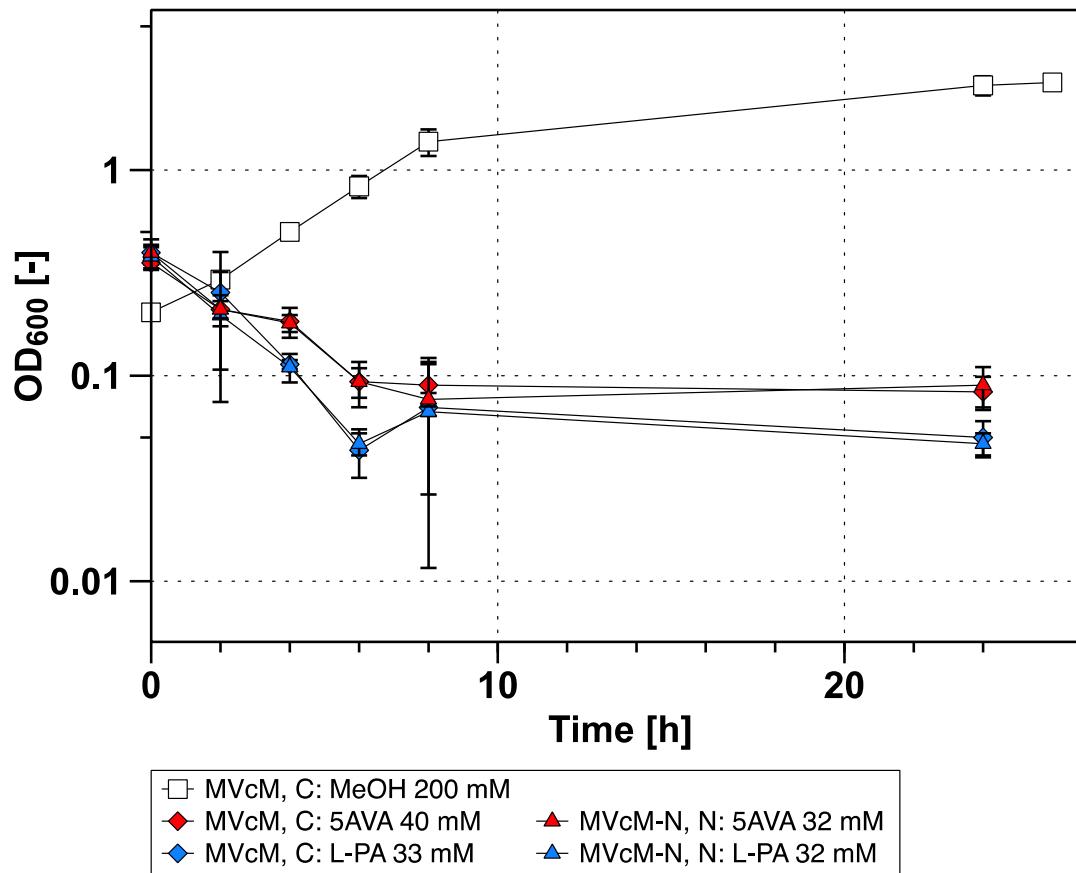


Abbildung 18: Wachstum von *B. methanolicus* verschiedenen Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen

Zudem wurde festgestellt, dass bereits 10 mM 5AVA bzw 200 mM L-PA das Wachstum von *B. methanolicus* hemmten. Eine differentielle RNA-Seq Analyse wurde durchgeführt, um das Transkriptom unter diesen Bedingungen zu untersuchen (Abbildung 19). Bei Anwesenheit von 5AVA gibt es Hinweise auf eine Stressantwort wie die verstärkte Expression von Sporulationsgenen und die verringerte Expression von ribosomalen Genen. Bei Zugabe von L-PA wurden u. a. Gene des Schwefelmetabolismus verstärkt exprimiert.

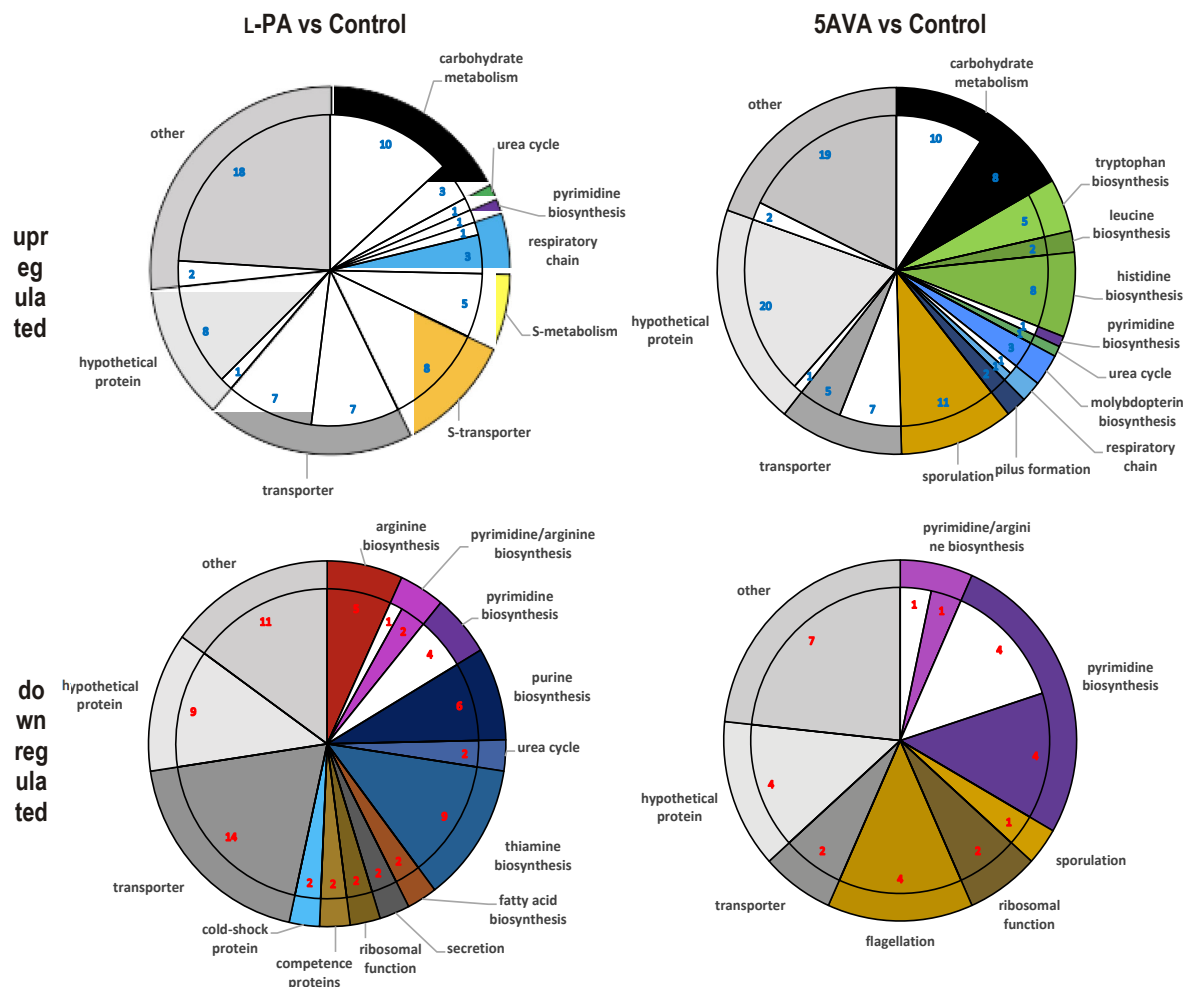


Abbildung 19: Differentielle RNA-Seq Analyse.

Die Zellen wurden in Minimalmedium mit 100 mM L-PA/50 mM 5AVA kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Nach Sequenzierung der RNA-Proben wurde eine differentielle RNA-Seq-Analyse mit dem DESeq2-Algorithmus ($\alpha < 0,05$) durchgeführt und Genloci mit $\log_2$ -Werten $> |1|$ wurden nach Funktion gefiltert und kategorisiert. Weiße Scheiben in Kreisdiagrammen zeigen regulierte Gene in beiden Konditionen an, farbige Scheiben zeigen konditionsspezifische Regulation. Ringteile vereinigen diese.

Die Toleranz von *B. methanolicus* für 5AVA wurde durch adaptive laborative Evolution (ALE) erhöht (Abbildung 20). Wildtyp (e_0) und Mutantenstämme (e_6 , e_{10}) wurden in Minimalmedium mit bis zu 400 mM 5AVA kultiviert. Die ΔOD_{600} -Werte nach 8 Stunden wurden bestimmt, ebenso wie die Wachstumsraten in der logarithmischen Phase (0–4 Stunden). Es wurde ein signifikant höheres Wachstum von e_6 und e_{10} im gesamten analysierten Konzentrationsbereich von 5AVA gezeigt.

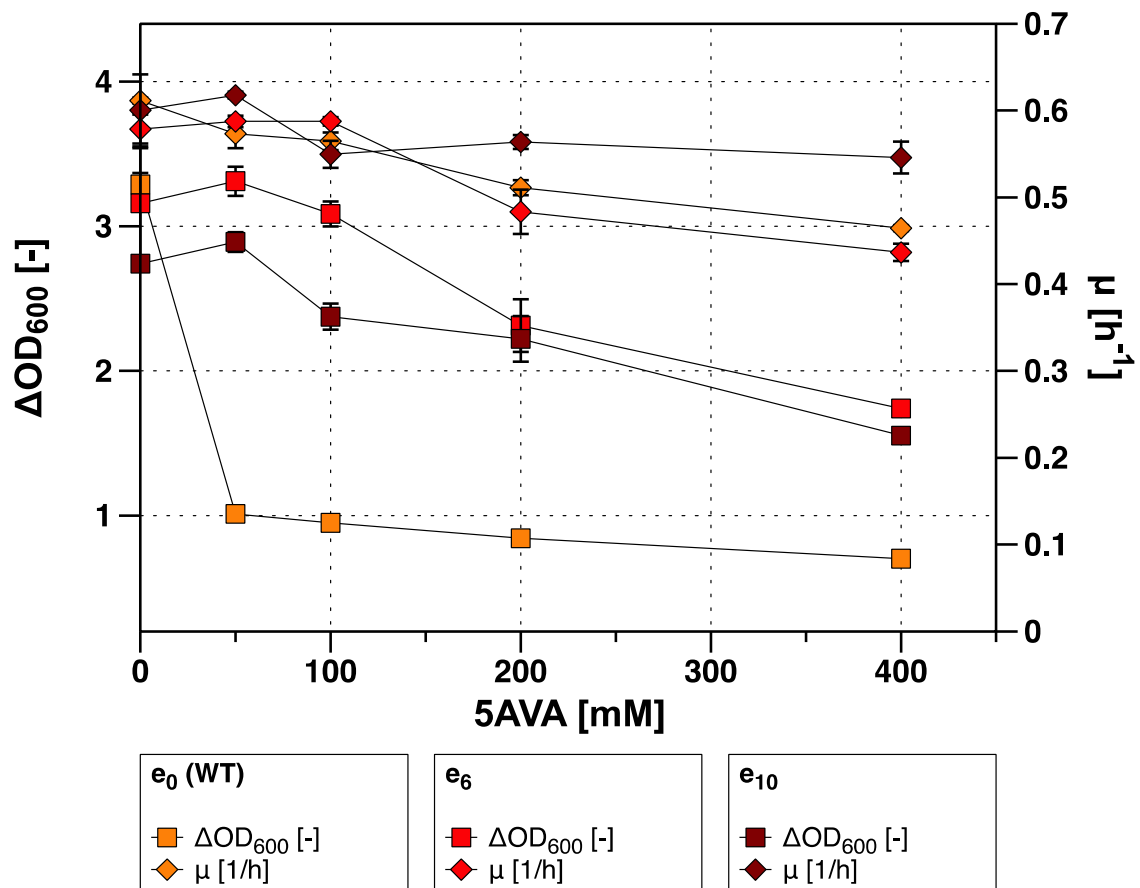


Abbildung 20: Wachstum von evolvierten *B. methanolicus* Mutanten bei bis zu 400 mM 5AVA.

Nachdem die Toleranz von *B. methanolicus* für 5AVA per RNA-Seq untersucht und in einem *adaptive laboratory evolution* (ALE)-Experiment erhöht wurde, wurden die Genome dieser evolvierten Stämme sequenziert und mit dem Genom des Wildstammes von *B. methanolicus* (NZ_CP007739) verglichen. Als Unterschiede wurden nicht-synonyme SNPs mit einer Abdeckung von mindestens 90% in bestimmten *Genloci* gefunden (Abbildung 21, Tabelle 1). Drei Gene mit den Identifikatoren BMMGA3_RS03040/13980/14080) enthielten SNPs im Evolutionsstamm AVA10 und wurden daher für weitergehende experimentelle Analyse ausgewählt. BMMGA3_RS03040 kodiert für einen Peptid MFS Transporter, BMMGA3_RS13980 für ein Eisen-Siderophor-Protein, für das mithilfe des Tools COACH-D Fe²⁺ als Cofaktor vorhergesagt wurde, sowie BMMGA3_RS14080, dass für einen putativen Cu²⁺-abhängigen Transkriptionsregulator der Rrf2-Familie kodiert.

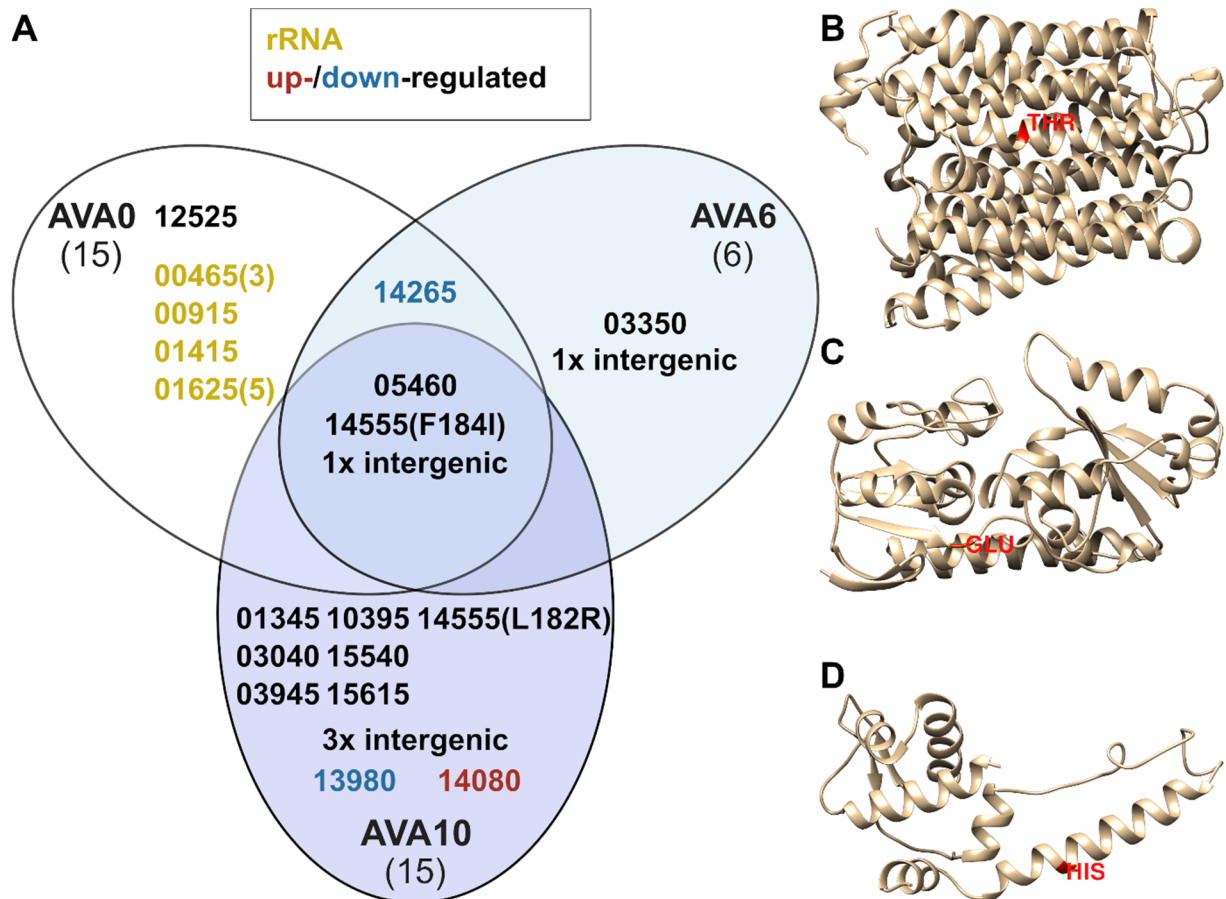


Abbildung 21: Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), bestimmt durch Sequenzierung des Genoms von *B. methanolicus* Evolutionsmutanten AVA0, AVA6 und AVA10 (A) und vorhergesagte Proteinstrukturen von drei Schlüsselzielgenen BMMGA3_RS03040 (B), BMMGA3_RS13980 (C) und BMMGA3_RS14080 (D), die jeweils SNPs in AVA10 umfassen. Isolierte genomische DNA der *B. methanolicus*-Stämme AVA0, AVA6 und AVA10 wurde sequenziert und SNPs in allen CDS von *B. methanolicus* wurden nachgewiesen. (A) Venn-Diagramm für beobachtete SNPs. *Genloci* wurden so abgekürzt, dass das führende „BMMGA3_RS“ abgeschnitten wurde, wobei eine 5-stellige Zifferkennung zurückblieb. Optionale Nummern in Klammern geben mehrere SNPs an. Gelbe Identifikatoren beziehen sich auf SNPs in Genen, die für ribosomale RNA kodieren, blaue und rote Identifikatoren markieren SNPs in hoch- bzw. herunterregulierten Genen gemäß der vorhergegangenen differentiellen RNA-Seq-Analyse. (B, C, D) 3D-Proteinmodelle wurden unter Verwendung der Software Phyre2 vorhergesagt. Ausgewählte SNPs, die zu einem Aminosäureaustausch führen, sind rot hervorgehoben.

Tabelle 1: *Genloci* mit SNPs in *B. methanolicus* AVA0, AVA6 und AVA10 (außer rRNAs).

Locus tag	Strain	Annotation	Amino acid exchange
BMMGA3_RS14265	AVA0	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	V57A
BMMGA3_RS05460		PASTA domain-containing protein	V627L
BMMGA3_RS12525		primosomal protein Dnal	T298M
BMMGA3_RS14555		DNA-binding response regulator	F184I
BMMGA3_RS03550	AVA6	IS21 family transposase	
BMMGA3_RS14265		ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	V57A
BMMGA3_RS05460		PASTA domain-containing protein	V627L
BMMGA3_RS14555		DNA-binding response regulator	F184I

BMMGA3_RS01345	AVA10	phosphoserine phosphatase	G132R
BMMGA3_RS03040		peptide MFS transporter	T132I
BMMGA3_RS10395		group II intron reverse transcriptase/maturase	R219R
BMMGA3_RS15540		stage II sporulation protein R	S15S
BMMGA3_RS15615		methylmalonyl-CoA mutase	D80Y
BMMGA3_RS14080		Rrf2 family transcriptional regulator	H116N
BMMGA3_RS13980		iron siderophore-binding protein	*150E ^a
BMMGA3_RS03945		3'-5' exoribonuclease YhaM	K109Q
BMMGA3_RS05460		PASTA domain-containing protein	V627L
BMMGA3_RS14555		DNA-binding response regulator	F184I, L182R

^a Reverted in-frame stop codon.

Die Gene BMMGA3_RS03040, BMMGA3_RS13980 und BMMGA3_RS14080, die die SNPs T132I, * 150E bzw. H116N umfassen, wurden in das Plasmid pBV2xp kloniert und *B. methanolicus* MGA3 wurde mit den konstruierten Vektoren transformiert. Danach wurde eine homologe Überexpression der Zielgene mit den drei genannten SNPs durchgeführt. Die Überexpressionsanalyse wurde in Gegenwart und Abwesenheit von 50 mM 5AVA durchgeführt (Abb. 22). Eine Ligandenvorhersage mittels COACH-D deutete auf Fe²⁺ und Cu²⁺ als mögliche Cofaktoren für das Eisensiderophor-bindende Protein und den Rrf2-Transkriptionsregulator hin, daher wurden FeSO₄ und CuSO₄, die bereits Bestandteile des MVcM-Mediums sind, titriert. Die Kultivierung von MGA3 (pBV2xp-BMMGA3_RS03040) (Abb. 22B) zeigte ein ähnliches Wachstumsmuster im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 22A), wobei eine erhöhte Toleranz durch Überexpression von BMMGA3_RS03040 ausgeschlossen war. Die Kultivierung von MGA3 (pBV2xp-BMMGA3_RS13980) zeigte eine 126% höhere Wachstumsrate ($0,77 \pm 0,10$ gegenüber $0,34 \pm 0,04$) und eine 123% höhere ΔOD_{600} ($1,7 \pm 0,3$ gegenüber $0,8 \pm 0,0$) bei Zugabe von 1000 μ M FeSO₄ im Vergleich zu 0 μ M (Abb. 13C). Die Überexpression von BMMGA3_RS14080 in Verbindung mit der Titration eines vorhergesagten Cofaktors CuSO₄ verringert die durch 5AVA verursachte Toxizität nicht signifikant (Abb. 22D). Die Überexpression des Gens, das für das Eisensiderophor-bindende Protein kodiert, in Kombination mit erhöhten Eisenspiegeln verändert jedoch spezifisch die Toleranz gegenüber 5AVA. Diese Erkenntnis kann als Grundlage für die 5AVA-Produktion auf Methanolbasis dienen.

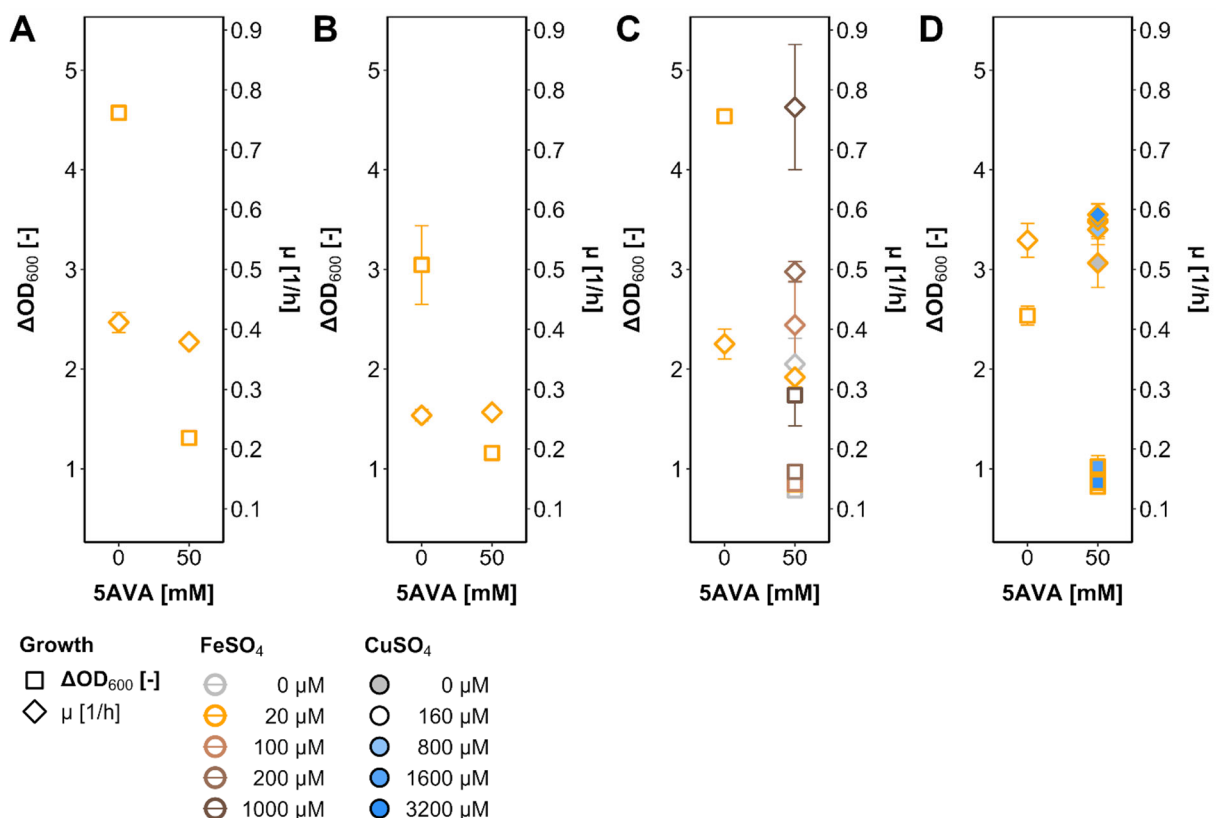


Abbildung 22: Toleranz von *B. methanolicus* MGA3 (pBV2xp) (A), MGA3 (pBV2xp-BMMGA3_RS03040) (B), MGA3 (pBV2xp-BMMGA3_RS13980) (C) und MGA3 (pBV2xp-BMMGA3_RS14080) (D) für 5AVA mit Cofaktortitration. *B. methanolicus*-Zellen wurden in MVcM(Y) Medium in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 50 mM 5AVA kultiviert. Die Wachstumsraten (Diamanten) und ΔOD_{600} (Quadrate) wurden bestimmt. Die Cofaktoren $FeSO_4$ (0-1000 μM ; Formfarben) und $CuSO_4$ (0-3200 μM ; Füllfarben) wurden für die Stämme MGA3 (pBV2xp-BMMGA3_RS13980) (C) bzw. MGA3 (pBV2xp-BMMGA3_RS14080) (D) titriert. Werte und Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung dreifacher Kultivierungen.

Ein durch Mutagenese erhaltener Glutamat-Überproduzent als Grundlage für die Synthese von γ -Aminobutyrat (GABA) wurde einer Multiomics-Analyse unterzogen. Das Genom der Mutante wurde vor und nach Induktion sowie mit und ohne GABA-Produktionsvektor (pBV2xp-*gadB_{St}*) und im Vergleich zum Ausgangsstamm sequenziert. Eine SNP-Analyse ergab unter anderem eine hohe Anzahl an Mutationen, die im Zusammenhang zur Zellwandsynthese stehen (Tabelle 2). Eine nicht-synonyme Mutation konnte auch eine putative Glutamat Dehydrogenase (BMMGA3_RS10455) aufweisen sowie zwei weitere Gene, die im Zuge des ALE-Experimentes mutiert sind (BMMGA3_RS03040/14080). Eine intergene putativ cis-wirkende Deletion von 18 Basenpaaren *upstream* eines Peptid ABC-Transporter-Substrat-bindenden Proteins wurde ebenfalls beobachtet. Weitere Analysen des Transkriptoms und des Metaboloms stehen noch aus.

Tabelle 2: SNPs in *B. methanolicus* ABBM4307 (pBV2xp-*gadB_{St}*) (außer rRNAs).

Locus tag/Position	Annotation	Reference Base	Alternate Base
intergenic, 890948	upstream of peptide ABC transporter substrate-binding protein	TTTTTTTATG TACTTTAAT	TT
BMMGA3_RS10455	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	C	T
BMMGA3_RS05785	ACP S-malonyltransferase	G	A
BMMGA3_RS04410	beta-ketoacyl-ACP synthase II	G	A
BMMGA3_RS04410	beta-ketoacyl-ACP synthase II	G	T
BMMGA3_RS16045	cell wall metabolism sensor histidine kinase Walk	A	G
BMMGA3_RS04535	enoyl-ACP reductase FabI	G	A
BMMGA3_RS16685	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	C	T
BMMGA3_RS14295	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	G	A
BMMGA3_RS14295	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	A	G
BMMGA3_RS09565	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	G	A
BMMGA3_RS14575	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	C	T
BMMGA3_RS03040	peptide MFS transporter	T	A
BMMGA3_RS14080	Rrf2 family transcriptional regulator	ATTTTTTTTGG ATAA	ATTTTTTTTGA TAA

1. Anhang zur Kommunikation und Dissemination

Arbeitspaket 7 Kommunikations- und Disseminationsaktivitäten (alle Partner)
--

Aufgrund aktuellen COVID-19 Situation, fand die „TeutoLab Academy Systembiologie“ für Schüler in dem Jahr 2020 nicht wie üblich statt. Allerdings wurde stattdessen ein interaktives Lernvideo für die Schüler gedreht, um einen ersten Eindruck in die Forschung und die Arbeit im Labor zu erhalten. Kerstin Schultenkämper, zusammen mit dem Teutolab Team und in Kooperation mit dem EraCoBioTech-Projekt INDIE, erklären unter anderem die Vorteile einer nachhaltigen, Methanol-basierten Produktion von Aminosäurederivaten, sowie die Entwicklung von CRISPR Cas und CRISPR interference (Abbildung 23).

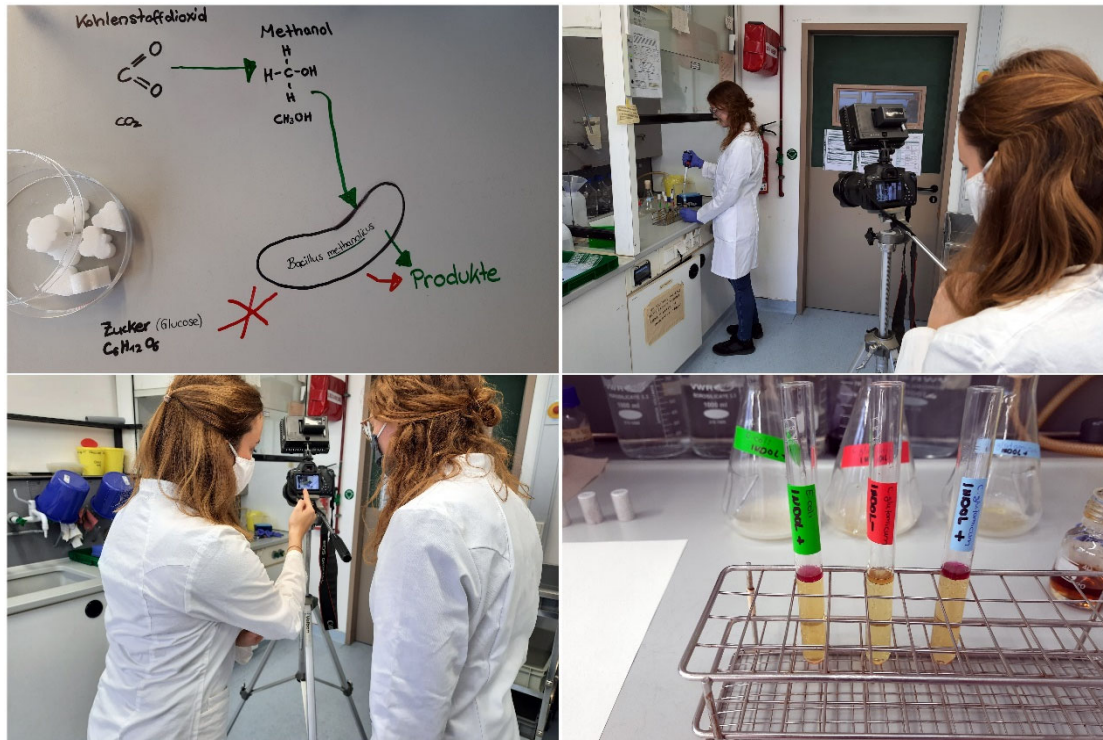


Abbildung 23: Teutolab-Video Dreh.