



Doctoral Thesis

Elucidation of the metabolic network topology in *Methylobacterium extorquens* AM1 and its operation under pure and mixed substrate conditions

Author(s):

Peyraud, Rémi

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007208824> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH N°19955

**ELUCIDATION OF THE METABOLIC NETWORK TOPOLOGY
IN *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS* AM1
AND ITS OPERATION
UNDER PURE AND MIXED SUBSTRATE CONDITIONS**

DISSERTATION

Submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

by

REMI PEYRAUD

Master of Science, Université Paul Sabatier

07 March 1981

French

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia Vorholt

Prof. Dr. Jean-Charles Portais

Prof. Dr. Uwe Sauer

2011

Abstract

In nature, methylotrophy, i.e. the ability of microorganisms to use reduced compounds without carbon-carbon bonds, C1 compounds, such as methane and methanol, is a significant biological and geochemical process involved in the global carbon cycle. The biochemistry of methylotrophic microorganisms was intensively studied in the past. *M. extorquens* AM1, a gram-negative Alphaproteobacterium, abundantly and ubiquitously found on leaf surfaces, has become a model organism to study methylotrophy. Up to now, system level investigations of their methylotrophic capacity were missing. In the following work, the overall network topology of *M. extorquens* AM1 has been elucidated and the physiology of the bacteria under conditions of pure methanol as well as methanol plus succinate growth was investigated.

i) First, the long standing question of the metabolic pathway involved in the regeneration of glyoxylate in the isocitrate lyase negative serine cycle methylotroph *M. extorquens* AM1 was solved using a combination of approaches: Metabolomics was used to identify CoA-ester intermediates involved in the pathway leading to glyoxylate formation, monitoring the ¹³C dynamic labeling incorporation into the CoA-ester intermediates demonstrated the sequence of reactions through the pathway, and a ¹³C steady-state labeling experiment was used to quantify glyoxylate generating fluxes. This combined analysis demonstrated the operation of the ethylmalonyl-CoA pathway (EMCP), an alternative pathway to the glyoxylate cycle for C1 assimilation as well as C2 assimilation as demonstrated in *Rhodobacter sphaeroides* for acetate assimilation.

ii) Genome information is valuable to infer the presence of known metabolic pathway. The genome annotation of two methylotrophs *M. extorquens* AM1 and *M. extorquens* DM4 was performed and revealed that the strain AM1 has a large genome size of 6.88 Mb coding 6759 genes. This high genomes size indicates that the strain required a huge number of genomic traits in its environment in accordance with its free living and facultative methylotrophic life style. In addition, it possesses numbers of insertion element suggesting its potential genomic plasticity and that horizontal gene transfer mechanisms are involved in its evolution. Sequencing and annotation of two *M. extorquens* strains opens the opportunity to reveal the common traits of these bacteria as well as the specific traits of the strain AM1 like the methylamine utilization cluster. The genome sequence provides valuable information to build up systems level investigations of methylotrophy.

iii) A metabolic network reconstruction of *M. extorquens* AM1 was performed. The reconstructed metabolic network is composed of 1139 reactions, 977 metabolites, associated to 911 genes via a gene to protein to reaction association network. Accurate predictions of growth rate under methylotrophy were obtained using Flux Balance Analysis (FBA) validating the reconstruction. Robustness analysis of the network using Minimal Cut Set reveal a high number of fragile points (50% of reactions involved into the central metabolism) under methylotrophic growth conditions. This result predicts that a strong pressure of selection is operating under environmental conditions to keep the methylotrophic capacity. In addition, a metabolic mode in which *M. extorquens* could perform CO₂ fixation using the EMCP was identified providing the proof of principle that the EMCP could be a new strategy for autotrophy. Finally ¹³C Metabolic Flux Analysis (¹³C-MFA) was performed to quantify the *in vivo* metabolic fluxes in *M. extorquens* AM1 growing in the presence of methanol. The flux distribution reveals the operation of substrate cycles around a dense sub-network as potential points of rerouting fluxes during metabolic adaptation to new carbon sources.

iv) The metabolic strategy of facultative microorganism to handle two carbon sources in culture was often reported to result in a diauxic shift. Nonetheless, there is evidence that co-consumption, i.e. simultaneous utilization of substrates, may also occur. *M. extorquens* AM1 was grown with methanol in addition to succinate to assess its metabolic strategy under mixed substrate conditions. A metabolic segregation in term of pathways utilization and metabolic functions supplied was observed. Indeed, methanol was used as energy source and for the biosynthesis of C1-unit whereas succinate was the main carbon sources (97%). The rationale for the observed segregation was investigated by comparing *in silico* prediction and *in vivo* observation. Evidence was obtained for substrate utilization in relation to the most appropriate utilization.

Résumé

Dans la nature, la méthylothrophie, définie comme la capacité d'un microorganisme à utiliser des composés réduits à un seul carbone (C1) comme le méthane ou le méthanol, est un processus biologique et géochimique d'importance en ce qui concerne le cycle du carbone. En conséquence, et avec en plus l'objectif de les utiliser en biotechnologie, la biochimie des organismes méthylothrophes a été étudiée en détail par le passé. Ainsi, *M. extorquens* AM1, une gram-négative Alphaproteobacteria, qui est abondamment et de façon ubiquitaire à la surface des plantes, est devenu un organisme modèle pour étudier la méthylothrophie. Cependant, une étude à l'échelle du système du métabolisme de cette bactérie n'a jusqu'alors pas été réalisée. Lors du travail présenté ci-dessous, l'ensemble de la topologie du réseau métabolique de *M. extorquens* AM1 a été élucidé et la physiologie de la bactérie en condition méthylothrophique pure de croissance ainsi qu'en condition mixte de substrat, méthanol plus succinate, a été étudiée.

i) premièrement, la question, non résolue depuis 50 ans, de qu'elle voie métabolique est impliquée dans la régénération du glyoxylate chez les méthylothrophes tel que *M. extorquens* AM1 possédant le cycle de la serine, mais dépourvu du cycle du glyoxylate, a été résolue en utilisant une combinaison d'approches expérimentales. Ainsi, la métabolomique a été utilisée pour identifier les esters de CoA impliqués comme intermédiaires dans la voie de formation du glyoxylate, ensuite la dynamique d'incorporation de l'isotope du carbone 13 a été suivie à travers ces métabolites pour démontrer leur séquence de formation à travers la voie métabolique, et finalement une expérience de marquage au carbone 13 à l'état stationnaire a permis de quantifier les flux de formation de glyoxylate. Cette analyse combinée démontre l'opération de la voie de l'ethylmalonyl-CoA, une alternative au cycle du glyoxylate pour l'assimilation des composés à un seul carbone mais aussi de l'assimilation des composés à deux carbones comme démontré dans *Rhodobacter sphaeroides* lors de l'assimilation de l'acétate.

ii) L'information contenue dans le génome des organismes vivants permet d'inférer la présence de voies métaboliques connues dont il dispose. L'annotation du génome de deux méthylothrophes, *M. extorquens* AM1 et *M. extorquens* DM4, a été réalisée et révèle que la souche AM1 dispose d'un génome de grande taille composé de 6.88 Mb codant 6759 gènes. Cette grande taille indique que la souche a besoin d'un nombre important de traits génomiques pour s'adapter à son environnement, ce qui est en accord avec son style de vie autonome d'autre forme de vie et de sa méthylothrophie facultative. De plus, il possède un nombre important d'éléments d'insertion suggérant une potentielle plasticité de son génome et que des mécanismes horizontaux de transfert de gènes sont impliqués dans son évolution. Le séquençage et l'annotation des deux souches a permis de mettre en évidence les traits métaboliques communs à la bactérie *M. extorquens* ainsi que les traits spécifiques de la souche AM1, tel qu'un cluster de gènes impliqués dans l'utilisation de la

méthylamine. La séquence du génome est une donnée important pour permettre par la suite de réaliser des études, au niveau du système, de la methylophie.

iii) La reconstruction du réseau métabolique de *M. extorquens* AM1 a été réalisée et décrit dans un modèle formel l'état des connaissances sur le métabolisme de la bactérie. Le model métabolique reconstruit est composée de 1139 réactions, 977 métabolites, qui sont associés avec 911 gènes via un réseau d'association entre gène, protéine, et réaction. Une prédiction fidèle du taux de croissance en condition methylophie a été obtenue par analyse de balance de flux validant la reconstruction du réseau. Par la suite, une analyse de robustesse du réseau par la méthode de rupture de voie minimale a été réalisée et révèle un grand nombre de points fragiles (50% des réactions impliquées dans le métabolisme central) en condition methylophie de croissance. Ce résultat indique qu'une forte pression de sélection doit opérer dans l'environnement pour garder la capacité méthylophie. De plus, un mode métabolique par lequel *M. extorquens* AM1 peut réaliser une fixation de CO₂ en utilisant l'EMCP a été identifié et consiste en une preuve de principe que la voie de l'EMCP peut être une nouvelle stratégie d'autotrophie. Finalement, une analyse des flux métaboliques par carbone 13 a été réalisée pour quantifier les flux métaboliques *in vivo* chez *M. extorquens* AM1 poussant sur méthanol. La distribution de flux obtenue révèle l'opération de cycle de substrats autour d'un sous-réseau dense qui représente un potentiel point de routage des flux lors de l'adaptation à de nouvelle sources de carbone.

iv) La stratégie des microorganismes facultatifs pour utiliser deux sources de carbones disponibles dans le milieu a souvent été trouvée comme consistant en une transition diauxique, c'est-à-dire une utilisation séquentielle des substrats. Néanmoins, des études suggèrent que la co-consomation, c'est-à-dire l'utilisation simultanée des substrats, peut aussi s'établir. Ainsi, *M. extorquens* AM1 a été cultivé en présence de méthanol en plus de succinate pour évaluer sa stratégie métabolique en condition mixte de substrat. Une ségrégation du métabolisme en termes d'utilisation de voie métabolique et d'approvisionnement de fonctions métaboliques a été observée. Ainsi, le méthanol est utilisé comme source d'énergie en plus de pourvoire spécifiquement la biosynthèse d'unités à 1 carbone alors que le succinate est utilisé comme source principale de carbone (97%). L'explication de la ségrégation observée a été étudiée en comparant les prédictions *in silico* avec les observations *in vivo*. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation des substrats s'effectue en accord avec leur utilisation méatbolic la plus appropriée.