



Doctoral Thesis

Exploring alternative solutions in the central carbon metabolism of *Methylobacterium extorquens* AM1 by metabolic engineering

Author(s):

Schada von Borzyskowski, Lennart

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010815815> →

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

DISS. ETH NO. 23883

Exploring alternative solutions in the central carbon metabolism of *Methylobacterium extorquens* AM1 by metabolic engineering

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

LENNART SCHADA VON BORZYSKOWSKI

Dipl.-Nat., Technische Universität Bergakademie Freiberg
Born on 02.01.1986
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia Vorholt
Dr. Tobias Erb
Prof. Dr. Uwe Sauer
Prof. Dr. Sven Panke

2016

Abstract

Cellular growth is a fundamental characteristic of life, which is enabled by the transformation of carbon substrates into the multitude of compounds that are required for biosynthetic reactions within a cell. The carbon that is essential for biosynthetic processes is obtained either by the fixation of inorganic carbon dioxide (autotrophy) or by the assimilation of reduced organic carbon compounds (heterotrophy). The pathways for assimilation of carbon substrates are also of central importance in energy conservation. Routes for biosynthesis are branching off from these metabolic hubs, thereby draining metabolites from the often cyclic carbon assimilation pathways. To ensure continuous operation and avoid metabolite depletion of the carbon assimilation pathways, anaplerotic routes are operating to replenish pathway intermediates that have been extracted for biosynthesis.

Both carbon fixation and assimilation pathways as well as anaplerotic pathways are at the heart of cellular metabolism. It is deemed a challenging, but highly interesting goal of synthetic biology to engineer such pathways in non-native host organisms, thereby completely rewiring the central carbon metabolism of a cell. In this study, alternative solutions in the central carbon metabolism of *Methylobacterium extorquens* AM1 were explored by metabolic engineering. *M. extorquens* AM1 is a metabolically versatile and biotechnologically relevant Alphaproteobacterium that is capable of growth on methanol as sole source of carbon and energy. The following results were achieved:

1. The set of genetic tools available for metabolic engineering of *M. extorquens* AM1 and related Alphaproteobacteria was considerably extended (Chapter 2). Three novel promoters were characterized in detail using single-cell fluorescence microscopy and shown to drive protein expression at different levels. These promoters were applied to develop the so-called Methylobrick vectors that allow the fast and efficient assembly of multi-gene operons for metabolic engineering as well as their plasmid-borne expression or genomic integration. A three-enzyme pathway was constructed using these vectors as a proof of principle, allowing for the assimilation of glyoxylate by *M. extorquens* AM1.
2. The Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle for fixation of carbon dioxide was implemented in *M. extorquens* AM1 in order to generate an artificial organoautotrophic organism that conserves energy by oxidation of methanol (Chapter 3). By overexpression of the two enzymes RubisCO and phosphoribulokinase, a CBB cycle module was generated that resulted in a phenotype in a growth-deficient strain of *M. extorquens* AM1 and strongly increased its cellular viability. ¹³C-tracer analysis indicated that a functional CBB cycle is operating in the engineered strain, and comparative proteomics revealed remarkable metabolic plasticity of the host cell in response to the CBB cycle module.
3. The ethylmalonyl-CoA pathway (EMCP) for regeneration of glyoxylate was replaced with the glyoxylate shunt in *M. extorquens* AM1 (Chapter 4). Overexpression of the two enzymes isocitrate lyase and malate synthase in EMCP-deficient strains of *M. extorquens* AM1 resulted in restoration of wild type-like growth on acetate, demonstrating the functionality of the heterologous anaplerotic pathway. The strongly decreased activity of methanol dehydrogenase was identified as a potential reason for failure of the engineered strains to grow on methanol, pointing towards previously unknown regulatory principles in the central carbon metabolism of *M. extorquens* AM1.

In summary, this study laid the foundation for extensive metabolic engineering of *M. extorquens* AM1 by creating novel genetic tools (Chapter 2), which were subsequently applied for implementation of a heterologous carbon fixation pathway (Chapter 3) and a heterologous anaerobic pathway (Chapter 4). Establishing these alternative solutions for crucial cellular functions demonstrated that novel modules can rewire central carbon metabolism in *M. extorquens* AM1 and hinted at unexpected regulatory interactions. The results of these metabolic engineering projects provide deep insights into the central carbon metabolism of the host organism and may serve as the basis for further strain enhancement, resulting in artificial organoautotrophy and efficient engineered production strains based on the utilization of methanol and carbon dioxide.

Kurzbeschreibung

Zelluläres Wachstum ist ein fundamentales Kennzeichen des Lebens, welches durch die Transformation von Kohlenstoffsubstraten in die Vielzahl von chemischen Verbindungen, die für biosynthetische Reaktionen in Zellen benötigt werden, ermöglicht wird. Der Kohlenstoff, welcher für biosynthetische Stoffwechselwege essentiell ist, wird von Lebewesen entweder durch Fixierung von anorganischem Kohlendioxid (Autotrophie) oder durch die Assimilation von reduzierten organischen Kohlenstoffverbindungen (Heterotrophie) erlangt. Die Stoffwechselwege für die Assimilation von Kohlenstoffverbindungen sind ebenfalls entscheidend für die Nutzbarmachung von chemischer Energie. Biosynthetische Stoffwechselwege zweigen von diesen Drehscheiben des Metabolismus ab, wodurch Metabolite aus den oftmals zyklischen Kohlenstoff-Assimilationsrouten abfließen. Um eine kontinuierliche Operation dieser Kohlenstoff-Assimilationsrouten sicherzustellen und das völlige Abfließen von Metaboliten zu verhindern, gibt es anaplerotische Stoffwechselwege, die Intermediate aus zentralen Stoffwechselwegen wieder auffüllen, wenn diese für biosynthetische Reaktionen genutzt wurden.

Sowohl Stoffwechselwege für die Fixierung oder Assimilierung von Kohlenstoffverbindungen als auch anaplerotische Stoffwechselwege stellen das Herzstück des zellulären Metabolismus dar. Es ist ein herausforderndes, aber sehr interessantes Ziel der synthetischen Biologie, solche Stoffwechselwege in andere Wirtsorganismen einzubringen, wodurch der zelluläre Kohlenstoff-Metabolismus von Grund auf verändert wird. In dieser Arbeit wurden alternative Lösungen im zentralen Kohlenstoff-Metabolismus von *Methylobacterium extorquens* AM1 durch Manipulationen des Stoffwechsels auf genetischer Ebene untersucht. *M. extorquens* AM1 ist ein metabolisch vielseitiges und biotechnologisch relevantes Alphaproteobakterium, welches Methanol als einzige Quelle für Kohlenstoff und Energie verwenden kann. Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

1. Das Arsenal von Werkzeugen für die genetische Manipulation von *M. extorquens* AM1 und verwandten Alphaproteobakterien wurde deutlich erweitert (Kapitel 2). Drei neuartige Promotoren wurden mit den Methoden der Einzelzell-Fluoreszenzmikroskopie detailliert charakterisiert und es wurde gezeigt, dass diese Promotoren die Expression von Proteinen mit verschiedenen Stärken veranlassen. Die Promotoren wurden im Folgenden verwendet, um die sogenannten Methylobrick-Vektoren zu entwickeln, welche das schnelle und effiziente Zusammenstellen von Operons aus mehreren Genen erlauben. Diese können daraufhin von Plasmiden exprimiert werden oder in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Ein Stoffwechselweg, der aus drei Enzymen besteht und die Assimilation von Glyoxylat durch *M. extorquens* AM1 ermöglicht, wurde mit diesen Vektoren konstruiert, um ihre Funktionalität zu demonstrieren.
2. Der Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB-Zyklus) für die Fixierung von Kohlendioxid wurde in *M. extorquens* AM1 implementiert, um einen künstlichen organoautotrophen Organismus zu erschaffen, welcher Energie aus der Oxidation von Methanol nutzbar machen kann (Kapitel 3). Durch die Überexpression der zwei Enzyme RubisCO und Phosphoribulokinase wurde ein CBB-Zyklus-Modul generiert. Als das Modul in einen wachstumsdefizienten Stamm von *M. extorquens* AM1 eingebracht wurde, zeigte dieser einen klaren Phänotyp, und die Überlebensfähigkeit der genetisch veränderten Zellen war deutlich erhöht. Dynamische ¹³C-Markierungsstudien deuteten darauf hin, dass ein funktioneller CBB-Zyklus in dem manipulierten Organismus in Betrieb ist, und vergleichende Analysen des Proteoms dieses

Stamms offenbarten eine bemerkenswerte metabolische Plastizität der Wirtszelle als Reaktion auf das Vorhandensein des CBB-Zyklus-Moduls.

3. Der Ethylmalonyl-CoA-Stoffwechselweg (EMCS) für die Regeneration von Glyoxylat wurde in *M. extorquens* AM1 durch den Glyoxylatzyklus ersetzt (Kapitel 4). Überexpression der zwei Enzyme Isocitratlyase und Malat-Synthase in EMCS-defizienten Stämmen von *M. extorquens* AM1 resultierte in der Wiederherstellung der Wachstumsfähigkeit der genetisch manipulierten Bakterien auf Acetat, wodurch die Funktionalität dieses heterologen anaplerotischen Stoffwechselwegs demonstriert wurde. Die deutlich verringerte Aktivität des Enzyms Methanoldehydrogenase wurde als möglicher Grund für das Scheitern des Wachstums dieser Stämme auf Methanol identifiziert. Dies deutet auf vorher unbekannte regulatorische Prinzipien im zentralen Kohlenstoff-Metabolismus von *M. extorquens* AM1 hin.

Zusammengefasst hat die vorliegende Arbeit das Fundament für weitreichende genetische Manipulationen von *M. extorquens* AM1 durch die Erschaffung neuer genetischer Werkzeuge gelegt (Kapitel 2), welche im Folgenden verwendet wurden, um einen heterologen Stoffwechselweg für die Fixierung von Kohlendioxid (Kapitel 3) und einen heterologen anaplerotischen Stoffwechselweg (Kapitel 4) in diesem Bakterium zu implementieren. Die Etablierung dieser Alternativlösungen für entscheidende zelluläre Funktionen machte deutlich, dass neuartige metabolische Module den zentralen Kohlenstoff-Metabolismus von *M. extorquens* AM1 von Grund auf verändern können, und wies darüberhinaus auf unerwartete regulatorische Wechselwirkungen hin. Die Ergebnisse dieser Projekte gewähren tiefgehende Einsichten in den zentralen Kohlenstoff-Metabolismus des Wirtsorganismus und können als die Basis für weitere Arbeiten dienen, welche zu künstlichen organoautotrophen Bakterienstämmen und effizienten Produktionsstämmen, welche Methanol und Kohlendioxid verwerten, hinführen werden.