

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

---

**Bettina Siebers, Markus Kaiser, Oliver J. Schmitz**

**- *HotAcidFACTORY* -**

***Sulfolobus acidocaldarius* als neuartige  
thermoacidophile Biofabrik**

Siebers, Bettina, Bräsen, Christopher, Schröder Carsten, Tum, Jan-Niklas,  
Dziwornu, Promise, Stracke, Christina, Schmerling, Christian, Kuschmierz, Laura,  
Wagner, Alexander, Knura, Thomas, Kaiser, Markus, Ninck, Sabrina, Oliver J.  
Schmitz, Lidia Montero, Yassine Oulad-El Majdoub

**Förderkennzeichen 031 B0848A**



## Schlussbericht zu Nr. 3.2 (2024)

### HotAcidFACTORY

„Mikrobielle Biofabriken für die industrielle Bioökonomie – Neuartige Plattformorganismen für innovative Produkte und nachhaltige Bioprozesse“ im Rahmen der „Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030“

---

*Zuwendungsempfänger:*

*Bettina Siebers (P1A), Markus Kaiser (P1B) und Oliver J. Schmitz (P1C)*

*Förderkennzeichen:*

*031 B0848A*

---

*Vorhabenbezeichnung: - HotAcidFACTORY -*

**Mikrobielle Biofabriken: HotAcidFACTORY- *Sulfolobus acidocaldarius* als neuartige thermoacidophile Biofabrik (Teilprojekt A)**

---

*Laufzeit des Vorhabens:*

**01.02.2020 bis 31.01.2023 (kostenneutrale Verlängerung bis 31.12.2023)**

---

*Berichtszeitraum:*

**01.02.2020 bis 31.12.2023**

---

## ***I. Kurze Darstellung zu***

### ***1. Aufgabenstellung,***

Archaeen wurden erstmals vor ca. 40 Jahren als eigenständige dritte Domäne des Lebens beschrieben und sind häufig die dominierende Organismengruppe in extremen Habitaten. Diese archaealen Vertreter zeichnen sich durch eine große "Robustheit" aus und werden als 'Extremophile' und ihre Enzyme als 'Extremozyme' bezeichnet. Archaeen verfügen generell über einzigartige zelluläre und Stoffwechseleigenschaften wie z. B. neue Stoffwechselwege oder Enzyme. **HotAcidFACTORY** zielt darauf ab, ein praktisches und hochflexibles Bioproduktionssystem (*bio-factory*) auf der Basis des thermoacidophilen Crenarchaeons *Sulfolobus acidocaldarius* (*Saci*) (75 – 80 °C, pH 2-3) zu entwickeln, das für den Einsatz in industriellen Prozessen mit harschen Reaktionsbedingungen geeignet ist. Dieses neuartige Bioproduktionssystem soll die effektive Produktion von Extremozymen als auch von anderen added-value Produkten aus industriellen Abfall- und Nebenprodukten ermöglichen. Im Rahmen des **HotAcidFACTORY**-Projektes sollte (i) ein verbessertes, genetisches System von *Saci* zur Verfügung gestellt werden, um den Organismus als neuartige Plattform für die Expression von Extremozymen und für das metabolic engineering zu etablieren; (ii) die Verwertung alternativer Substrate, insbesondere von industriellen Neben- bzw. Abfallprodukten wie Glycerin und CO<sub>2</sub>, durch *Saci* etabliert werden und (iii) die Kultivierungsbedingungen für *Saci* insbesondere auf Glycerin und CO<sub>2</sub> optimiert werden, so dass hohe Zelldichten für industrielle Produktions- und Anwendungsprozesse erreicht werden können.

### ***2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,***

**HotAcidFACTORY** war ein interdisziplinäres Projekt an dem Partner mit unterschiedlichen Expertisen beteiligt waren. Insgesamt bestand das Team aus drei nationalen Partnern und einem assoziierten Partner, Oliver Spadiut aus Österreich (Bioreaktor Wachstum; TU Wien, ohne HotAcidFACTORY Finanzierung). Als nationale Partner waren Sonja-Verena Albers (Biochemie (Transport), Genetik; Universität Freiburg) und Jörn Kalinowski (Transcriptomik; CeBiTech Bielefeld) beteiligt und an der Universität Duisburg-Essen neben der Koordinatorin Bettina Siebers (Biochemie (Metabolismus), Genetik; Molekulare Enzymtechnologie und Biochemie, Fakultät Chemie), Markus Kaiser (Proteomik; Chemische Biologie, Fakultät Biologie) sowie Oliver Schmitz (Metabolomik; Angewandte Analytische Chemie, Fakultät Chemie).

HotSolute zeichnete sich durch eine enge Zusammenarbeit zwischen den Partnern aus mit einigen signifikanten Überschneidungen der fachlichen Expertise. So wurden z.B. neue Stoffwechselwege und Enzyme identifiziert und charakterisiert und das genetische System für *Saci* verbessert eine wichtige Voraussetzung zur Etablierung als *bio-factory*.

### ***3. Planung und Ablauf des Vorhabens,***

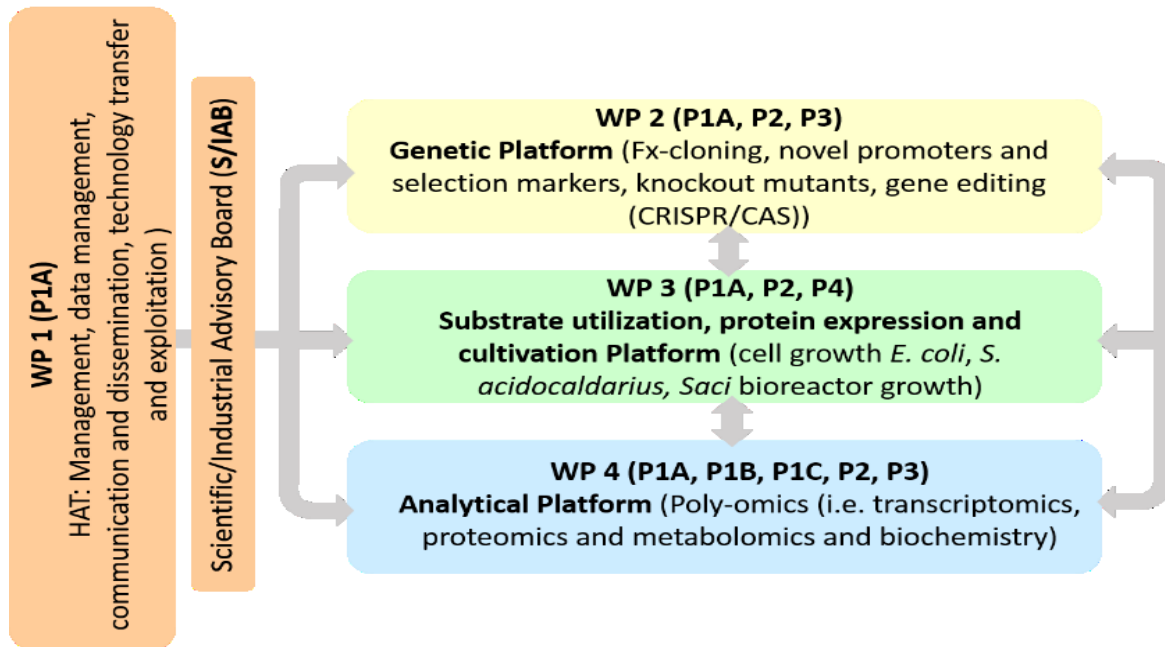
Im Rahmen des **HotAcidFACTORY**-Projektes werden **vier** Arbeitspakete (**WPs**) eingerichtet (Abb. 1):

**(WP1) HAT:** Projektmanagement, Datenmanagement, Kommunikation und Dissemination, Technologietransfer und Nutzung unterstützt durch einen wissenschaftlich/industrieller Beirat (S/IAB) mit einem akademischen Experten (Prof. Dr. Christoph W. Sensen, TU Graz, Österreich) sowie Experten aus der Industrie (Dr. Felix Müller, Evonik Industries, Dr. Kenneth Jensen (Novozyme).

**(WP2)** Verbesserung des *Saci*-Gensystems

(WP3), Verbesserung von *Saci* Substratverwertung, Proteinexpression und -kultivierung,

(WP4) Analytische Plattform (Polyomics (d. h. Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik) und Biochemie/Genetik.



**Abb. 1: HotAcidFACTORY Projektübersicht.** Aufteilung der kollaborativen Projekte in Arbeitspakete (Work packages, WPs).

#### 4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

**HotAcidFACTORY** basiert auf Vorarbeiten und früheren Erkenntnissen aller Partner. Hier sind insbesondere frühere Verbundprojekte zu nennen bei denen bereits mehrere der Partner beteiligt waren. Insbesondere SulfoSYS (2007-2010, SysMO1 - Systems Biology of Microorganism), SulfoSYS<sup>BIOTECH</sup> (2013-2015, e:Bio-1 Initiative, BMBF) und HotSysAPP (2016-2019, e:Bio-2, BMBF) waren bedeutsam als Vorläuferprojekte um die Anwendung von *S. solfataricus* und *Saci* für die weiße Biotechnologie zu untersuchen. In diesen Projekten wurden *Standard Operating Procedures* (SOPs) entwickelt, das Wachstum auf verschiedenen Kohlestoffquellen, Multi-omics Studien zur Identifizierung von Kandidaten durchgeführt, die beteiligten Stoffwechselwege und Enzyme untersucht und Genomweite weite stöchiometrische sowie detaillierte enzymkinetische Modelle erstellt. Ferner wurde während dieser Projekte das genetische System für *Saci* weiterentwickelt. Für die Enzym-Charakterisierung wurden i.d.R. etablierte Methoden aus der Literatur herangezogen und bei Bedarf an entsprechend hohe Temperaturen angepasst. Der beabsichtigte Arbeitsplan von **HotAcidFACTORY** wurde weder durch Patente noch durch andere Arten von geistigem Eigentum eingeschränkt.

#### 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Im Rahmen des **HotAcidFACTORY** Projektes fanden engere Zusammenarbeiten insbesondere mit den Partnern statt.

## **II. Eingehende Darstellung**

### **1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,**

#### **WP 1 || HAT: Projekt Management, Datenmanagement, Kommunikation und Dissemination, Technologietransfer und Verwertung**

Das **HotAcidFACTORY** Projekt wurde von Bettina Siebers (**P1 A**, UDE) koordiniert. Sie hat die Administration Kommunikation mit dem PtJ-Büro und externe Berichterstattung z.B. Zwischen- und Abschlussberichte der Partner im Verbundprojekt koordiniert sowie die Unterzeichnung des Konsortialvertrags und die Projekttreffen organisiert. Ein weiterer Schwerpunkt ihrer Arbeiten war die Gewährleistung von Interaktion und Zusammenarbeit der einzelnen Partner durch Projekttreffen und Partnerbesuche. Dies war insbesondere wichtig für die Organisation der Arbeitsabläufe zwischen den WPs. So wurden bei gemeinsamen Experimenten verschiedener Teilprojektpartner SOPs verfasst und das Konsortium wurde über den genauen geplanten experimentellen und zeitlichen Ablauf informiert. Der Projektstatus wurde regelmäßig über interne Berichte, ZOOM Treffen oder Telefonate verfolgt. Das Erstellung von gemeinsamen Projektpublikationen wurde koordiniert.

Während der Projektlaufzeit wurden regelmäßige Treffen organisiert (s. Zwischenberichte) und das **HotAcidFACTORY** Abschlusstreffen fand mit allen PartnerInnen und beteiligten WissenschaftlerInnen und dem SAB/IAB am 21-22.06.2023 in Essen in Präsenz statt.

Zum sicheren Austausch von Daten und Informationen wurde ein neues **HotAcidFACTORY** Projekt eingerichtet (de.NBI cloud, Bielefeld). Resultierende Daten werden der Öffentlichkeit durch Publikationen in Fachjournalen und unter Verwendung der entsprechenden Datenrepositorien (z.B. BRENDA, PDB, PRIDE, FairdomHUB) zur Verfügung gestellt.

Das **HotAcidFACTORY** Projekt wurde auf zahlreichen Tagungen durch Posterbeiträge oder Vorträge vorgestellt (s. Zwischenberichte) und in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht. Ferner wurde das Projekt Schülern in diversen Laborbesuchen und Schülerpraktika (1-3 Wochen) vorgestellt.

#### **WP2 || Verbesserung des *Saci*-Gensystems**

##### **FX-Klonierung für die Proteinexpression (Bettina Siebers (P1A) und Sonja-Verena Albers (P2))**

Um die Anwendbarkeit und Flexibilität des Expressionssystems zu steigern wurde das FX-cloning ([Geertsma and Dutzler, 2011](#)) für die Anwendung in *S. acidocaldarius* (kurz *Saci*) implementiert. Die entsprechenden Arbeiten wurden bereits 2020 publiziert:

Van der Kolk N, **Wagner A**, Wagner M, Waßmer B, **Siebers B**, Albers SV. (2020) Identification of XylR, the activator of arabinose/xylose inducible regulon in *Sulfolobus acidocaldarius* and its application for homologous protein expression. *Frontiers Microbiol*, 11:1066.

### **CRISPR-CAS als genetisches Tool für *Sulfolobus acidocaldarius* (Bettina Siebers (P1A) und Sonja-Verena Albers (P2))**

Um die genetische Veränderung in *S. acidocaldarius* weiter zu optimieren wurde CRISPR-Cas als genetisches System etabliert. Die entsprechenden Arbeiten wurden bereits 2023 publiziert:

**Bost J., A. Recalde, B. Waßmer, A. Wagner, B. Siebers and S.-V. Albers (2023).** Application of the endogenous CRISPR-Cas type I-D system for genetic engineering in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Front. Microbiol.* 14:1254891; doi: 10.3389/fmicb.2023.1254891

### **Identifizierung und Etablierung neuer Promotoren für die Proteinexpression (Bettina Siebers (P1A))**

Wachstumsversuche auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden durchgeführt und den Partnern Jörn Kalinowski (P3, Transkriptomik) und Markus Kaiser (P1B, Proteomik) zur Verfügung gestellt. Dabei konnten Glycerin abhängige Promotoren identifiziert werden, die derzeit weiter bei uns im Labor getestet werden.

## **WP3 || Verbesserung von *Saci* Substratverwertung, Protein-expression und Kultivierung**

### ***Saci* Wachstumsexperimente (Roh)Glycerin, CO<sub>2</sub> und Proteinexpression (Bettina Siebers (P1A))**

Nachdem *S. acidocaldarius* an Glycerin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle adaptiert worden war, wurde dieser Stamm auf Glycerin und zum Vergleich auf D-Xylose sowie auf NZ-Amin kultiviert und die Zellen (jeweils aus derselben Anzucht) den Poly-omics Partnern (P1B, P1C und P3) für die jeweiligen Analysen zur Verfügung gestellt. Die Analysen sind inzwischen abgeschlossen (s. WP4) und eine Vorversion des Manuskripts wurde auf bioRxiv publiziert:

**Schmerling, C., C. Schroeder, X. Zhou, T. Busche, J. Kalinowski, L. Montero, O. Schmitz, F. Kaschani, S. Ninck, M. Kaiser, J. Bost, B. Waßmer, S.-V. Albers, B. Siebers, C. Bräsen (2024).** Glycerol degradation in the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* involves an unusual glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *bioRxiv* 2024 Pages 2024.02.29.582781, doi: <https://doi.org/10.1101/2024.02.29.582781>

Nach der Adaptation wurde der Glycerin-adaptierte *Saci*-Stamm benutzt, um das Wachstum auf Rohglycerin zu etablieren (s. Zwischenberichte). Rohglycerin ist das Beiprodukt der Biodieselherstellung und beinhaltet neben Glycerin variierende Konzentrationen an verschiedenen Verunreinigungen, wie andere organische Verbindungen, Asche, Salze und Methanol. Da sowohl die Aufreinigung zu reinem Glycerin als auch die fachgerechte Entsorgung kostspielig sind, stellt die Umwandlung von Rohglycerin als abundant verfügbares und günstiges Substrat zu hochwertigeren Produkten durch Mikroorganismen eine vielversprechende Alternative dar. Für die Wachstumsexperimente von *Saci* standen sechs Rohglycerinproben aus Fertigungsanlagen von Evonik Industries und der Firma KFS Biodiesel Gruppe (Cloppenburg) und verschiedenen Produktionsschritten mit variierenden Glycerinkonzentrationen sowie Verunreinigungen zur Verfügung. Für vier dieser Rohglycerinproben konnte das Wachstum bei

Konzentrationen bis zu 50 mM Glycerin etabliert werden (Abb. 2). Neben den Wachstumsversuchen wurde das Transkriptom sowie das Proteom von auf 10 mM und 50 mM Rohglycerin ((i) und (ii)) gezogenen Zellen analysiert, welche jedoch keine signifikanten Unterschiede zu auf reinem Glycerin gezogenen Zellen aufwiesen.

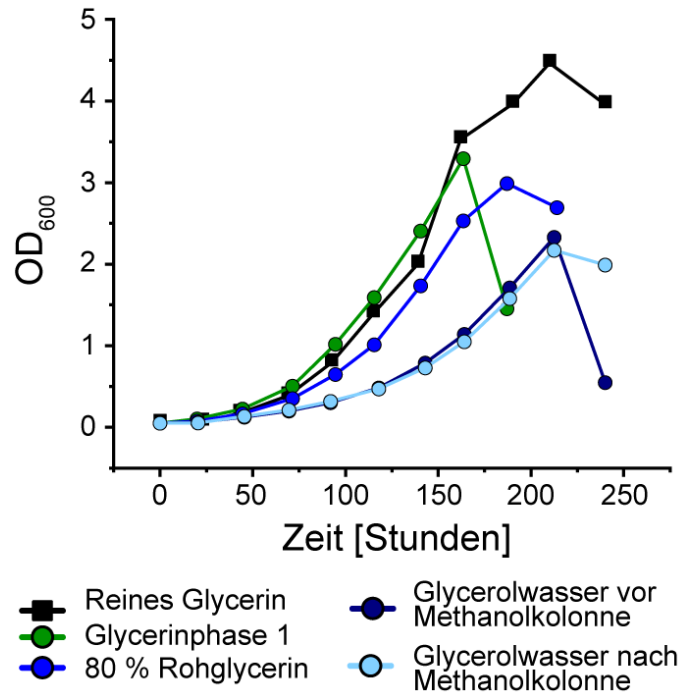
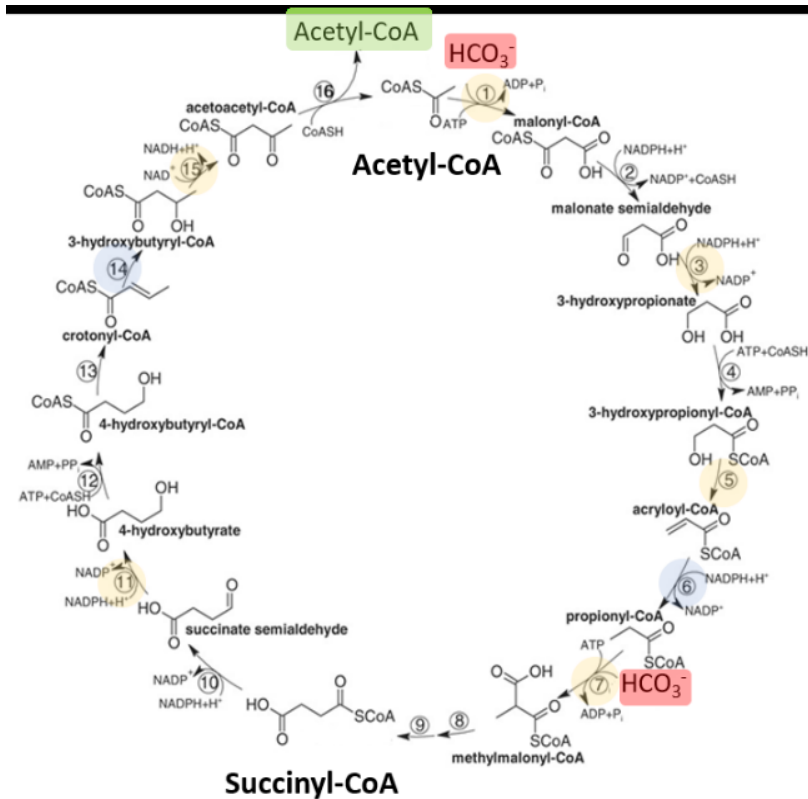


Abb. 2 || Wachstumskurve von *S. acidocaldarius* auf 50 mM reinem Glycerin (im offenem System) und auf 50 mM Rohglycerin aus verschiedenen Glycerinproben (im geschlossenem System).



**Abb. 2 || Der 3HP/4HB Zyklus in Sulfolobales.** Die Reaktionen der CO<sub>2</sub> Fixierung (rot), Acetyl-CoA Freisetzung (grün) sowie bereits zur Expression klonierte Gene aus *Saci* (gelb) und Enzyme, die aufgrund der bisherigen Ergebnisse, vermutlich in *Saci* fehlen (blau) sind hervorgehoben (geändert nach Knockelkorn und Fuchs G. (2009)).

Das Wachstum von *S. acidocaldarius* auf CO<sub>2</sub> konnte trotz zahlreicher Versuche nicht etabliert werden. Der Befund, dass alle Homologen zum 3HP/4HB-Weg in *Saci* vorhanden sind, wurde im vorliegenden Berichtszeitraum durch funktionelle Analysen (Expression, Reinigung und Charakterisierung) einiger Schlüsselenzyme weiter bestätigt (Abb. 2, Zwischenbericht 2023). Hinweise, dass eine Regulation auf Genebene über den Regulator (*Saci\_0446*) (Leyn *et al*, 2015; Orell *et al*, 2013) reguliert werden konnten durch die konstruierte *Saci\_0446* Deletions-Mutante (PS) und anschließende Transkriptomstudien nicht bestätigt werden. Es zeigte sich kein Effekt auf die Transkription der Gene des

putativen 3HP/4HB-Zyklus. Als alternative Funktion des 3HP/4HB-Zyklus wurde eine Funktion im Propionat-Metabolismus (Reaktionen 7-9, (Textor *et al.*, 1997)) durch die Erstellung einer Deletionsmutante überprüft, die jedoch keinerlei Wachstumsdefizit auf Propionat zeigte, was eindeutig gegen eine Funktion in der Propionat-Assimilierung spricht. Ferner wurde der Propionatverbrauch während des Wachstums über Metabolomik bestimmt und ein Metabolitenprofil von Propionat gewachsenen *S. acidocaldarius* Zellen erstellt (P1C, s. Zwischenbericht 2023). Eine Bedeutung für die Acetat-Assimilation konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Damit bleibt zwar die Rolle der 3HP/4HB-Homologen in *S. acidocaldarius* ungewiss. Durch die Konstruktion von Deletionsmutanten ergaben sich erste Hinweise, dass Propionat über den Methylcitrat-Zyklus und Acetat über den Glyoxylat-Zyklus abgebaut wird. Diese Arbeiten sollen in Zukunft fortgeführt werden.

### Optimierung des Expressionssystems in *Sulfolobus acidocaldarius* mit 5'-untranslatierten Region-Sequenzen (P1A)

Durch die Integration von 5'UTR-Sequenzen in den Expressionsvektor von *S. acidocaldarius* konnte die Expression von verschiedenen getesteten Reporterproteinen wie z.B. Esterasen bis zu vierfach gesteigert werden und Proteine die bislang in *S. acidocaldarius* nicht exprimiert wurden konnten produziert werden.

Die entsprechenden Arbeiten sind auf bioRxiv veröffentlicht und derzeit bei Frontiers Microbiology zur Publikation eingereicht.

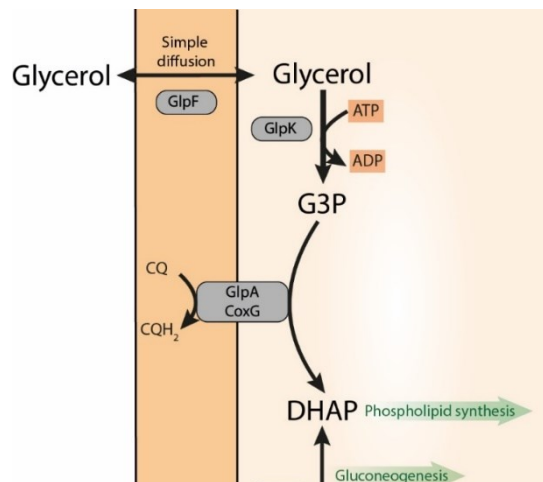
**Kuschmierz, L., A. Wagner, T. Busche, J. Kalinowski, C. Bräsen and B. Siebers (2024).** 5'-untranslated region sequences enhance plasmid-based protein production in *Sulfolobus acidocaldarius*. bioRxiv 2024 Pages 2024.03.01.582787, DOI: 10.1101/2024.03.01.582787

### Kontinuierliche Fermentation (Oliver Spadiut, assoziierter Partner (P4))

Zwei der Rohglycerinproben (s.o.), sowie der Glycerin-adaptierte Stamm wurden P4 für die kontinuierlicher Fermentation übergeben. Nach Wachstumsversuchen konnte die Zelldichte in Gegenwart von Glycerin deutlich gesteigert werden.

### WP4 || Analytische Plattform (Poly-omik (d. h. Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik) und Biochemie/Genetik)

Im Rahmen des **HotAcidFACTORY** Projektes konnte der erstmals das Wachstum von *S. acidocaldarius* auf Glycerin gezeigt und mit Hilfe von Poly-omik Analysen (P1B, P1C, P3), Biochemie und Genetik (P1A, P2) konnte der Abbauweg für Glycerin entschlüsselt werden. Dabei zeigte sich, dass *S. acidocaldarius* eine ungewöhnliche Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase besitzt, die über das CoxG Protein an der Membran verankert ist, um die Elektronen in die Atmungskette einzuspeisen. Weiterführende phylogenetische und Genom-Analysen zeigten eine breite Varianz an Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase in Archaeen, die eine Anpassung an unterschiedliche Elektronenakzeptoren und Lebensweisen ermöglicht.



**Abb. 10 || Glycerin-Metabolismus in *S. acidocaldarius*.** Die Aufnahme von Glycerin erfolgt wahrscheinlich über den GlpF-ähnlichen Glycerin-Transporters Saci\_2034 und durch einfache Diffusion durch die Cytoplasmamembran. Intrazellulär wird Glycerin durch eine Glycerinkinase (GlpK Saci\_2033; Saci\_1117), phosphoryliert. Das gebildete Glycerin 3-Phosphat (G3P) wird dann durch eine membrangebundene, FAD-abhängige GlpA-ähnliche Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (G3PDH, Saci\_2032, Saci\_1118) oxidiert. Hierbei sind Saci\_2032/Saci\_1118 durch die CoxG-Homologe Saci\_2031/Saci\_1119 an der Membran verankert und bildet einen Komplex, der Elektronen auf das Caldariellaquinon (CQ) überträgt, wodurch Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) entsteht. DHAP kann für die Phospholipidsynthese (über G1P in Archaea) und mit Hilfe der Triosephosphat-Isomerase (TPI, Saci\_0117) in Glyceraldehyd-3-phosphat (GA3P) - für die Gluconeogenese (grüne Pfeile) oder die Glykolyse (roter Pfeil) umgewandelt werden.

**2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,**

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises sind dem Verwendungsnachweis zu entnehmen.

**3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,**

Das **HotAcidFACTORY** Projekt verfolgte einen sehr innovativen Ansatz zur Verbesserung des genetischen Systems in *S. acidocaldarius* und zur Etablierung des Wachstums auf Glycerol und CO<sub>2</sub> als wichtige industrielle Neben- und Abfallprodukte. In unseren Arbeiten konnte das genetische System verbessert werden (FX-Cloning, CRISPR-Cas, 5'UTR für Expression), das Wachstum von *S. acidocaldarius* auf Glycerin etabliert werden und der beteiligte Stoffwechselweg entschlüsselt werden. Ferner konnte das Wachstum auf verschiedenen Rohglycerin Chargen etabliert werden und in der kontinuierlichen Fermentation konnten hohe Zelldichten erreicht werden. Das Wachstum auf CO<sub>2</sub> sowie die Funktion des 3HP/4HB Zyklus in *S. acidocaldarius* konnte nicht entschlüsselt werden. Die Finanzierung des Projekts ermöglichte es, das breite Fachwissen der Partner innerhalb eines starken Netzwerks zu kombinieren, um die experimentellen Herausforderungen zu verstehen und zu lösen. Durch das SAB/IAB konnten wirtschaftliche Anwendungsmöglichkeiten frühzeitig diskutiert und zukünftige Zusammenarbeiten gestärkt werden. Die Finanzierungsmöglichkeiten des EU-Programms „Horizont 2020“, des Programms „Human Frontier Science“ und des Europäischen Forschungsrats (ERC) wurden eingehend geprüft. Zu diesem Zeitpunkt gab es bei beiden Programmen keine offenen Ausschreibungen, die dem Thema dieses vorgeschlagenen Projekts entsprachen.

**4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,**

Der wirtschaftliche Nutzen des **HotAcidFACTORY** Projektes ist auf eine langfristige Perspektive ausgerichtet. Das Wachstum auf (Roh)Glycerin bietet großes Potential für zukünftige Anwendungen. Aufgrund der hier erbrachten Vorarbeiten wurde ein Antrag in der Circularity Ausschreibung der VW Stiftung „HotCircularity– Harnessing thermophilic Archaea for production of biodegradable alternatives to microplastics from biodiesel waste byproducts“ gestellt. Es sind wichtige Methoden zur genetischen Manipulation in *S. acidocaldarius* sowie zur Verbesserung des Expressionssystems erstellt worden, die in Zukunft weiter optimiert werden sollen. Zudem ist ein breiteres, grundlegendes Verständnis des Metabolismus notwendig um die Nutzung von *metabolic engineering* zu verbessern. Dieses Projekt legt damit weitere wichtige Grundsteine für die zukünftige weitere Entwicklung von *Saci* als *bio-factory*. Eine kurzfristige wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse war bei diesen Grundlagen-orientierten Projekt nicht zu erwarten.

**5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,**

Es sind keine Arbeiten bekannt die, die hier durchgeführten Projekte betreffen.

## 6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Van der Kolk N, **Wagner A**, Wagner M, Waßmer **B**, **Siebers B**, Albers SV. (2020) Identification of XylR, the activator of arabinose/xylose inducible regulon in *Sulfolobus acidocaldarius* and its application for homologous protein expression. *Frontiers Microbiol*, 11:1066.

Lewis AM, Recalde A, **Bräsen C**, Counts JA, Nussbaum P, Bost J, **Schocke L**, **Shen L**, Willard DJ, Quax TEF, Peeters E, **Siebers B**, Albers SV, Kelly RM. (2021) The biology of thermoacidophilic archaea from the order Sulfolobales. *FEMS Microbiol Rev*. 21:fuaa063. Doi: 10.1093/femsre/fuaa063

**Bost J., A. Recalde, B. Waßmer, A. Wagner, B. Siebers and S.-V. Albers (2023)**. Application of the endogenous CRISPR-Cas type I-D system for genetic engineering in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Front. Microbiol*. 14:1254891; doi: 10.3389/fmicb.2023.1254891

**Kuschmierz, L., A. Wagner, T. Busche, J. Kalinowski, C. Bräsen and B. Siebers (2024)**. 5'-untranslated region sequences enhance plasmid-based protein production in *Sulfolobus acidocaldarius*. *bioRxiv* 2024 Pages 2024.03.01.582787, DOI: 10.1101/2024.03.01.582787

**Schmerling, C., C. Schroeder, X. Zhou, T. Busche, J. Kalinowski, L. Montero, O. Schmitz, F. Kaschani, S. Ninck, M. Kaiser, J. Bost, B. Waßmer, S.-V. Albers, B. Siebers, C. Bräsen (2024)**. Glycerol degradation in the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* involves an unusual glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *bioRxiv* 2024 Pages 2024.02.29.582781, doi: <https://doi.org/10.1101/2024.02.29.582781>

**Wenn zur Wahrung berechtigter Interessen des ZE oder Dritter oder aus anderen sachlichen Gesichtspunkten bestimmte Einzelheiten aus dem Bericht vertraulich zu behandeln sind (z.B. zur Wahrung der Priorität bei Schutzrechtsanmeldungen), so hat der ZE den ZG ausdrücklich darauf hinzuweisen.**

### Literaturangaben

Geertsma E. R., Dutzler R. 2011. A versatile and efficient high-throughput cloning tool for structural biology. *Biochemistry* 50:3272-8

Kockelkorn D, Fuchs G. Malonic semialdehyde reductase, succinic semialdehyde reductase, and succinyl-coenzyme A reductase from *Metallosphaera sedula*: enzymes of the autotrophic 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle in Sulfolobales. *J Bacteriol*. 2009 Oct;191(20):6352-62. doi: 10.1128/JB.00794-09.

Leyn SA, Rodionov DA. Comparative genomics of DtxR family regulons for metal homeostasis in Archaea. *J Bacteriol*. 2015 Feb;197(3):451-8. doi: 10.1128/JB.02386-14.

Orell A, Peeters E, Vassen V, Jachlewski S, Schalles S, Siebers B, Albers SV. Lrs14 transcriptional regulators influence biofilm formation and cell motility of Crenarchaea. *ISME J*. 2013 Oct;7(10):1886-98.

Textor S, Wendisch VF, De Graaf AA, Müller U, Linder MI, Linder D, Buckel W. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch Microbiol*. 1997 Nov;168(5):428-36.

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel  <b>HotAcidFACTORY- <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> als neuartige thermoacidophile Biofabrik</b>	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Siebers, Bettina Bräsen, Christopher Schröder Carsten Tum, Jan-Niklas Dziwornu, Promise Stracke, Christina Schmerling, Christian Kuschmierz, Laura Wagner, Alexander Knura, Thomas Kaiser, Markus Ninck, Sabrina Oliver J. Schmitz Lidia Montero Yassine Oulad-El Majdoub	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2023
	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)  Universität Duisburg-Essen Molekulare Enzymtechnologie und Biochemie Prof. Dr. Bettina Siebers Universitätsstr. 5 45141 Essen	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 031 B0848A
	11. Seitenzahl
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben
	14. Tabellen
	15. Abbildungen
16. Zusätzliche Angaben -	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	

18. Kurzfassung

Archaeen wurden erstmals vor ca. 40 Jahren als eigenständige dritte Domäne des Lebens beschrieben und sind häufig die dominierende Organismengruppe in extremen Habitaten. Diese archaealen Vertreter zeichnen sich durch eine große „Robustheit“ aus und werden als „Extremophile“ und ihre Enzyme als „Extremozyme“ bezeichnet. Archaeen verfügen generell über einzigartige zelluläre und Stoffwechsel-Eigenschaften wie z. B. neue Stoffwechselwege oder Enzyme. **HotAcidFACTORY** zielt darauf ab, ein praktisches und hochflexibles Bioproduktionssystem (*bio-factory*) auf der Basis des thermoacidophilen Crenarchaeons ***Sulfolobus acidocaldarius* (Saci)** (75 – 80 °C, pH 2-3) zu entwickeln, das für den Einsatz in industriellen Prozessen mit harschen Reaktionsbedingungen geeignet ist. Dieses neuartige Bioproduktionssystem soll die effektive Produktion von Extremozymen als auch von anderen *added-value* Produkten aus industriellen Abfall- und Nebenprodukten ermöglichen. Im Rahmen des **HotAcidFACTORY**-Projektes sollte (i) ein verbessertes, genetisches System von *Saci* zur Verfügung gestellt werden, um den Organismus als neuartige Plattform für die Expression von Extremozymen und für das *metabolic engineering* zu etablieren; (ii) die Verwertung alternativer Substrate, insbesondere von industriellen Neben- bzw. Abfallprodukten wie Glycerin und CO<sub>2</sub>, durch *Saci* etabliert werden und (iii) die Kultivierungsbedingungen für *Saci* insbesondere auf Glycerin und CO<sub>2</sub> optimiert werden, sodass hohe Zelldichten für industrielle Produktions- und Anwendungsprozesse erreicht werden können.

In **HotAcidFACTORY** konnte das genetische System für *S. acidocaldarius* verbessert werden. So konnte die FX-Klonierung etabliert werden (Van der Kolk et al. 2020), das Expressionssystem durch 5' untranslatierte Region-Sequenzen signifikant optimiert werden (Kuschmierz et al. 2024 bioRxiv), CRISPR-Cas als genetisches Werkzeug etabliert werden (Bost et al. 2023) und neue Glycerin-induzierbare Promotoren identifiziert werden (fortlaufendes Projekt).

Nach Adaptation konnte das Wachstum von *S. acidocaldarius* mit (Roh)Glycerin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle etabliert werden. Die Stoffwechselwege für den Glycerinabbau sowie die beteiligten Enzyme wurden mit Hilfe von Multi-omics identifiziert, kloniert, gereinigt und charakterisiert. Dies ist von besonderer Bedeutung für zukünftige Anwendungen, da (Roh)Glycerin ein Abfallprodukt der Biodieselherstellung ist.

Das Wachstum von *S. acidocaldarius* auf CO<sub>2</sub> konnte trotz zahlreicher Versuche nicht etabliert werden. Der Befund, dass alle Homologen zum 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat (3HP/4HB)-Weg in *Saci* vorhanden sind, wurde im vorliegenden Berichtszeitraum durch funktionelle Analysen (Expression, Reinigung und Charakterisierung) einiger Schlüsselenzyme weiter bestätigt. Eine alternative Funktion des 3HP/4HB-Wegs bei der Verwertung von Propionat oder Acetat konnte nicht bestätigt werden.

19. Schlagwörter

Archaea, thermoacidophil, Sulfolobus acidocaldarius, Glycerin, Rohglycerin, CO<sub>2</sub>

20. Verlag

21. Preis