

На правах рукописи

Марданов Андрей Владимирович

**Расшифровка структур геномов как основа изучения
особенностей метаболизма, путей эволюции и биоразнообразия архей**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Москва-2013

Работа выполнена в Лаборатории систем молекулярного клонирования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра «Биоинженерия» Российской академии наук

Научный консультант:

доктор биологических наук

Равин Николай Викторович

Официальные оппоненты:

Шестаков Сергей Васильевич, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет, главный научный сотрудник.

Дебабов Владимир Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН, академик РАСХН, Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», научный руководитель.

Пименов Николай Викторович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, заместитель директора по научной работе.

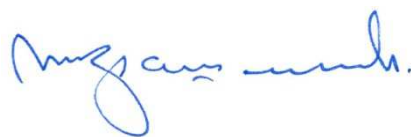
Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита диссертации состоится «18» апреля 2013 г. в 11 часов на заседании Совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций).

Автореферат разослан «31» января 2013г.



Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

С момента описания Карлом Воэе в качестве отдельного, наряду с бактериями и эукариотами, домена живых существ (Woese and Fox, 1977), археи стали одними из наиболее интересных объектов микробиологии, молекулярной биологии и биохимии. Несмотря на большой интерес к археям, успехи в их изучении до середины 1990-х годов были весьма ограничены, что во многом было связано с сложностью культивирования большинства этих микроорганизмов и практически полным отсутствием генетических «инструментов» (генетическая трансформация, векторы для экспрессии, методы нокаута генов и др.), подобных давно разработанным для таких модельных объектов как *Escherichia coli*.

Успехи в развитии геномики вносят особенно заметный вклад в исследование архей. Благодаря прогрессу в разработке геномных технологий растет число полных геномных последовательностей, расширяются знания о биологии архей, их разнообразии и эволюции. Получены новые данные о ключевых генетических процессах у архей, таких как клеточное деление и репликация ДНК, о роли горизонтального переноса генов в эволюции, выявлены взаимосвязи между археями и эукариотами. Основные пути метаболизма у архей и соответствующие ферменты сходны с бактериальными, в то время как аппарат репликации и экспрессии генетической информации более близок к эукариотическому. Вследствие этого археи являются удобными модельными объектами для изучения молекулярных механизмов многих генетических процессов у эукариот.

Среди архей выделяют два основных филума (Woese et al., 1990), - *Crenarchaeota* (кренархеи) и *Euryarchaeota* (эуриархеи). Кренархеи и эуриархеи не только образуют отдельные филогенетические ветви, но и существенно отличаются в организации аппарата репликации и экспрессии генома, клеточного деления и многих других важнейших генетических процессов.

На момент начала данной работы, к 2008г. было определено всего около 50 полных геномов архей, что более чем на порядок меньше, чем число расшифрованных бактериальных геномов. Большинство архей с известными полными геномами представляли всего несколько филогенетических групп, - метаногены, галофилы, термофильные археи порядка *Thermococcales* (эуриархеи) и кренархеи порядка *Sulfolobales*. Для большинства остальных групп, в первую очередь термофильных кренархей, геномные данные отсутствовали либо были доступны для одного-двух представителей, что существенно ограничивало знания о биологии этих организмов.

Таким образом, задача определения и анализа структур геномов архей, в первую очередь представляющих «новые» эволюционные ветви, является актуальной и представляет интерес для фундаментальных исследований в области молекулярной биологии и микробиологии. Не меньшее значение, в первую очередь для понимания молекулярных механизмов эволюции, имеет и сравнительный анализ геномов близкородственных организмов. Расшифровка геномов архей, обитающих в специфических экологических нишах, важна для выяснения соответствующих путей метаболизма и экологической роли этих микроорганизмов в природных сообществах. Функциональная геномика архей, обитающих в экстремальных условиях среды, имеет и очевидное практическое значение, обусловленное биотехнологическим потенциалом этих микроорганизмов в качестве источников новых ферментов.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является изучение особенностей метаболизма, путей эволюции и биоразнообразия термофильных архей на основе определения и анализа полных нуклеотидных последовательностей их геномов.

Конкретные задачи исследования состояли в следующем:

1. Определение полных нуклеотидных последовательностей геномов термофильных архей – объектов исследования.
2. Изучение особенностей структурной организации и функционирования геномов архей.
3. Анализ путей и механизмов эволюции архей на основе геномных данных.
4. Анализ особенностей метаболизма архей.
5. Идентификация и характеристика новых термостабильных ферментов, перспективных для использования в биотехнологии.
6. Определение структур микробных сообществ термальных источников с различными физико-химическими характеристиками, анализ экологической роли отдельных групп микроорганизмов.

Объектами исследования являлись новые виды термофильных архей из коллекции микроорганизмов, выделенных в лаборатории гипертермофильных микробных сообществ Института микробиологии им С.Н. Виноградского РАН. Две археи представляли новые филогенетические группы (*Acidolobus saccharovorans* и *Fervidicoccus fontis*), другие были выделены из ранее неисследованных экологических ниш и/или имели необычные возможности метаболизма (*Desulfurococcus kamchatkensis*,

Thermococcus sibiricus, *Vulcanisaeta moutnovskia*, *Thermoproteus uzoniensis*, *Pyrobaculum* sp. 1860, *Thermophilum carboxydotrophus*, *Thermogladius cellulolyticus*).

Научная новизна работы

Впервые определены полные структуры геномов 9 термофильных архей из различных филогенетических групп. Анализ геномов двух архей, *Acidolobus saccharovorans* и *Fervidicoccus fontis*, подтвердил, что эти микроорганизмы представляют два новых порядка кренархей (*Acidilobales* и *Fervidicoccales*), наряду с тремя ранее известными порядками (*Desulfurococcales*, *Sulfolobales* и *Thermoproteales*). В результате анализа геномных данных охарактеризованы основные пути метаболизма исследуемых архей, механизмы их приобретения и потери на молекулярном уровне.

Впервые проведена глубокая количественная характеристика состава сообществ микроорганизмов термальных источников Камчатки с помощью высокопроизводительного пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК. Полученные результаты значительно расширяют знания о разнообразии микроорганизмов термальных источников. Обнаружены ранее неизвестные группы архей. Определена зависимость состава и разнообразия микробных сообществ от температуры и pH, что дало новую информацию о распространении в природе и вероятной экологической роли отдельных групп архей.

Анализ геномов архей выявил ряд особенностей генетических процессов на молекулярном уровне. Обнаружено, что репликация хромосомы *A. saccharovorans* инициируется с двух *ori* - сайтов. Один из них расположен вблизи гена, кодирующего архейный инициаторный белок WhiP, гомолог эукариотического белка Cdt1. *WhiP* гены и ассоциированные с ними *ori* - сайты присутствуют в геномах *Sulfolobales* и некоторых представителей *Desulfurococcales*, но отсутствуют у наиболее эволюционно древней ветви кренархей *Thermoproteales*, а также у *Fervidicoccales*. Филогенетический анализ WhiP показал, что «второй» *ori*-сайт и *whiP* были приобретены на раннем этапе эволюции кренархей (и впоследствии утрачены в некоторых линиях), а не в результате интеграции вирусов и горизонтального переноса, как это предполагалось ранее.

Определение полных структур геномов стало основой работ по микробиологической и биохимической характеристике этих архей, изучению молекулярных механизмов генетических процессов, эволюции архей и структурно-функциональному исследованию белков, представляющих интерес как для исследований в области эволюционной энзимологии, так и для решения биотехнологических задач.

Практическая ценность работы

Практическая значимость работы обусловлена биотехнологическим потенциалом термостабильных ферментов и термофильных микроорганизмов. Термостабильные ферменты, продуцируемые гипертермофильными археями, широко используются в различных областях биотехнологии, что обусловлено их устойчивостью не только к высокой температуре, но и к другим экстремальным условиям (рН, высокие концентрации детергентов и растворителей и др.). Биотехнологически значимыми функциональными характеристиками обладают идентифицированные в этой работе термостабильные ферменты: алкогольдегидрогеназа из *T. sibiricus*, протеаза из *D. kamchatkensis*, альдегиддегидрогеназа из *Pyrobaculum* sp. 1860, супероксиддисмутаза из *A. saccharovorans*, бета-галактозидаза из *T. sibiricus*, многофункциональная бета-гликозидаза из *A. saccharovorans*, ДНК-лигазы из *A. saccharovorans* и *T. sibiricus*. Выявленные термостабильные ферменты могут быть использованы для разработки новых биотехнологий для пищевой промышленности, переработки лигноцеллюлозного сырья, производства детергентов, органического синтеза.

В рамках выполнения данной работы были получены патенты на две термостабильные ДНК лигазы (Патенты РФ № 2405823 и № 2413767) и термостабильную алкогольдегидрогеназу из *T. sibiricus* (Патент РФ № 2413766). Поданы две заявки на получение патентов на изобретения – термостабильные бета-галактозидаза из *T. sibiricus* и бета-гликозидаза из *A. saccharovorans*.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих международных и российских конференциях: II международная конференция «BioMicroWorld2007» (Севилья, Испания, 2007), симпозиум «Метабономика и биотехнология» (Майорка, Испания, 2008), международный симпозиум «BAGECO-10» (Упсала, Швеция, 2010), международный симпозиум «Биоразнообразие, молекулярная биология и биогеохимия термофилов» (Петропавловск-Камчатский, 2010), международная конференция «Extremophiles 2010» (Азорские острова, Португалия, 2010), I и II международные научно-практические конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Москва, 2010; Новосибирск, 2011), международный симпозиум «BAGECO-11» (Корфу, Греция, 2011), 2-ая международная конференция «BGRS/SB'12» (Новосибирск, 2012), 3 Московская международная конференция «Молекулярная филогенетика MolPhy-3» (Москва, 2012), 14 международный симпозиум ISME14 (Копенгаген, Дания, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 36 работ, в том числе 21 статья в научных журналах, 12 – в сборниках материалов научных конференций (тезисы сообщений и докладов). Получено 3 патента РФ на изобретения.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 312 страницах машинописного текста и включают 77 рисунков и 36 таблиц. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Цель и задачи исследования», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение» в 6 тематических главах, «Заключение», «Выводы», «Список публикаций по теме диссертации», и «Цитированная литература», список которой содержит 5 отечественных и 427 иностранных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объектами исследования были новые виды термофильных архей из коллекции лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН, для которых ранее не проводилось определение нуклеотидных последовательностей геномов. *Desulfurococcus kamchatkensis* и *Thermogladius cellulolyticus* представляют порядок Desulfurococcales; *Vulcanisaeta moutnovskia*, *Thermoproteus uzoniensis*, *Pyrobaculum* sp. 1860 и *Thermofilum carboxydophilus* – порядок Thermoproteales; *Acidilobus saccharovorans* и *Fervidicoccus fontis* – два новых порядка филума Crenarchaeota. Еще одна архея, *Thermococcus sibiricus*, относится к филуму Euryarchaeota. Для определения полных структур геномов был использован метод высокопроизводительного пиросеквенирования.

1. Термоацидофильная архея *Acidilobus saccharovorans* – представитель новой филогенетической линии кренархей

Архея *Acidilobus saccharovorans* 345-15^T была выделена из кислого горячего источника кальдеры вулкана Узон, Камчатка, Россия (Prokofeva et. al., 2009). Этот микроорганизм является облигатным анаэробом, термоацидофилом, растущим при pH 2,5-5,8 и температурах от 60 до 90°C. *A. saccharovorans* – органогетеротроф, способный утилизировать разнообразные углеводы и белковые субстраты (Prokofeva et. al., 2009). Рост микроорганизма стимулируется добавлением S⁰ и тиосульфата, которые восстанавливаются до H₂S. Геном *A. saccharovorans* является первым расшифрованным геномом облигатно анаэробной термоацидофильной археи.

Геном *A. saccharovorans* представляет собой кольцевую хромосому длиной 1.496.453 п.н. и не содержит внехромосомных элементов (Рис. 1). Геном содержит одну копию оперона 16S-23S рРНК, одну удаленно расположенную копию гена 5S рРНК и

45 генов тРНК. С помощью стандартных протоколов поиска генов было найдено 1499 потенциальных белок-кодирующих генов со средней длиной 902 нт, покрывающих 90.4 % генома. Функции 972 белков (65%) могут быть предсказаны с различной степенью достоверности и детализации в результате сравнения с базами данных. Функции остальных 527 генов предсказать по аминокислотной последовательности соответствующих белков не представляется возможным, причем 246 генов являются уникальными для *A. saccharovorans*.

Из мобильных элементов в геноме была найдена одна копия транспозона семейства IS607, интегрированные архейные вирусы и плазмиды обнаружены не были. Геном *A. saccharovorans* содержит пять кластеров коротких tandemных повторов (CRISPR), включающих 24, 10, 26, 42 и 8 повторяющихся спейсеров. Предполагается, что CRISPR-локус участвует в системе защиты клетки, действующей по механизму, аналогичному РНК-интерференции эукариот, а спейсерные последовательности являются производными внехромосомных элементов, например вирусов. В подтверждение этой гипотезы мы обнаружили, что последовательность одного из спейсеров совпадает с последовательностью плазмиды pHVE14 из *Sulfolobus islandicus*. Активностью CRISPR системы может объяснять отсутствие интегрированных вирусов и минимальное число мобильных элементов в геноме *A. saccharovorans*.

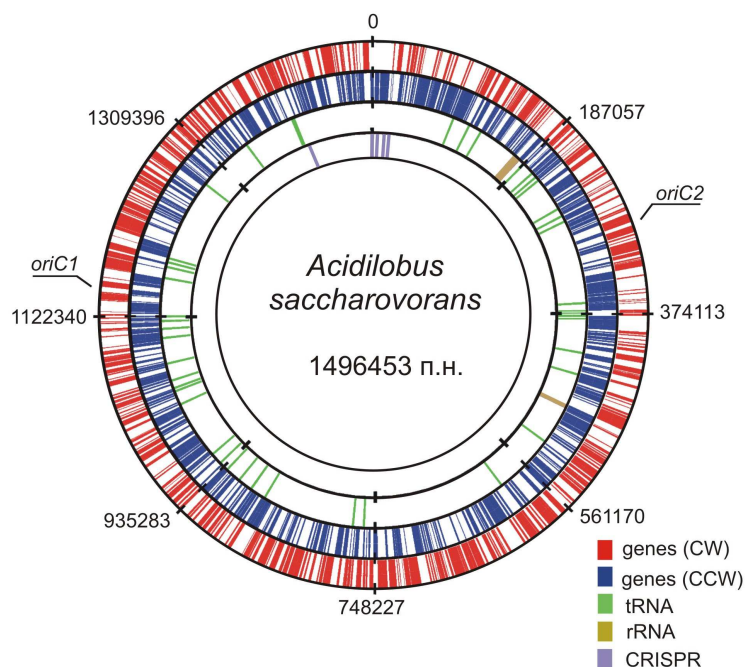


Рисунок 1. Карта генома *A. saccharovorans*.

На двух внешних кругах отмечены гены, транскрибирующиеся по часовой стрелке и против часовой стрелки, соответственно. На двух внутренних кругах отмечены гены тРНК, рРНК и CRISPR-локусы.

На Рис. 2 представлены данные о количестве белок-кодирующих генов *A. saccharovorans*, гомологи которых присутствуют в геномах других архей. Полученные результаты показывают, что ближайшим родственником *A. saccharovorans* является кренархея *Aeropyrum pernix*, описанная как представитель порядка Desulfurococcales,

около половины (~740) белков у них гомологичны. Значительно меньшее число «общих» белков *A. saccharovorans* имеет с другими представителями Desulfurococcales (478-586 белков) и Thermoproteales (491-624 белков). Особо стоит отметить то, что *A. saccharovorans* имеет большее число «общих» белков с представителями Sulfolobales (661-687 белков). Причина такого сходства между протеомами *A. saccharovorans* и Sulfolobales, вероятно, связана с адаптацией этих организмов, способных расти на сложных белковых и полисахаридных субстратах, к термоацидофильным условиям и обусловлена событиями горизонтального переноса генов. Эту гипотезу подтверждает совместное обитание этих микроорганизмов в кислых горячих источниках и наличие у них похожих мобильных элементов.

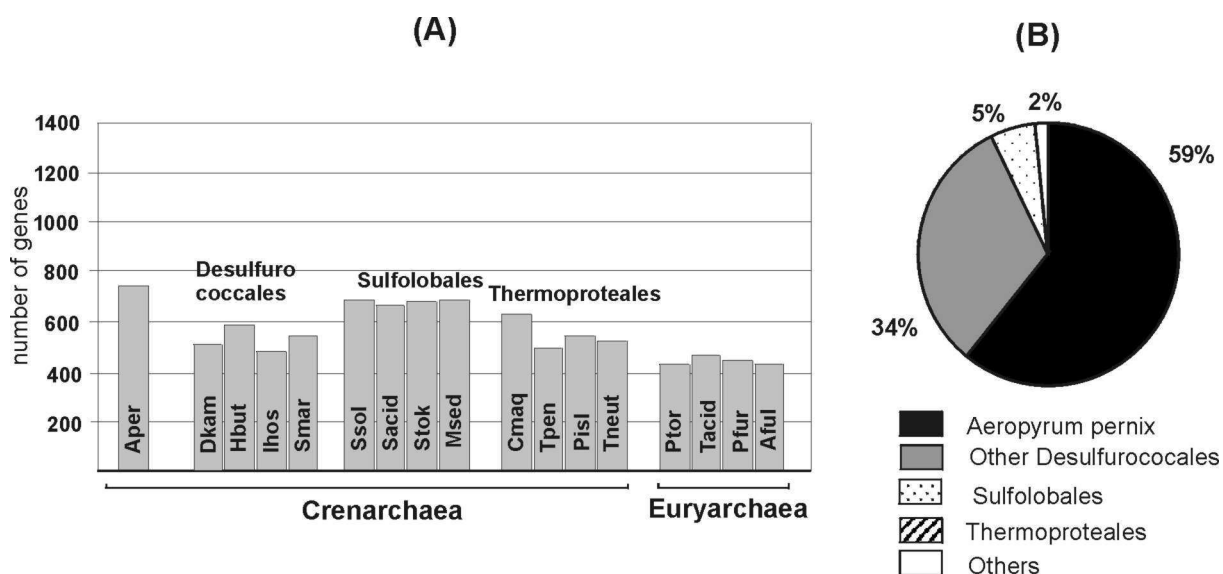


Рисунок 2. Сравнения протеомов *A. saccharovorans* и других архей.

(А) Число белок-кодирующих генов *A. saccharovorans* имеющих гомологов в геномах других архей. Два гена считались гомологичными, если соответствующие белковые последовательности перекрывались на длине > 70%, при этом $E < 10^{-10}$. Обозначение: Aper, - *Aeropyrum pernix*; Dkam, - *Desulfurococcus kamchatkensis*; Hbut, - *Hyperthermus butylicus*; Ihos, - *Ignicoccus hospitalis*; Smar, - *Staphylothermus marinus*; Ssol, - *Sulfolobus solfataricus*; Sacid, - *Sulfolobus acidocaldarius*; Stok, - *Sulfolobus tokodaii*; Msed, - *Metallosphaera sedula*; Cmaq, - *Caldvirga maquilingensis*; Tpen, - *Thermofilum pendens*; Pisl, - *Pyrobaculum islandicum*; Tneut, - *Thermoproteus neutrophilus*; Ptor, - *Picrophilus torridus*; Tacid, - *Thermoplasma acidophilum*; Pfur, - *Pyrococcus furiosus*; Aful, - *Archaeoglobus fulgidus*.

(В) Распределение ближайших гомологов рибосомных белков, найденных с помощью BLASTP, между различными таксонами.

Для определения филогенетического положения Acidilobales мы провели таксономический анализ состава протеомы *A. saccharovorans*, определяя для каждого белка таксономическое положение его ближайшего гомолога в базе данных NCBI. Если предположить, что *A. saccharovorans* относится к Desulfurococcales, то большая часть его белков должна иметь наилучшие совпадения именно с белками архей порядка Desulfurococcales. Однако, мы установили, что около 40% белков *A. saccharovorans* имеют ближайшие гомологи среди белков *A. pernix*, а остальные наилучшие совпадения

распределены между разными порядками кренархей, - Desulfurococcales (21%), Sulfolobales (15%) и Thermoproteales (13%). Также были построены филогенетические деревья, основанные на сравнении последовательностей 53 рибосомных белков *A. saccharovorans* и других кренархей с известными полными геномными последовательностями (Рис. 3). Полученные результаты показывают, что *A. saccharovorans* кластеризуется с *A. pernix* и образует отдельную линию, ответвляющуюся от Desulfurococcales вскоре после расхождения Desulfurococcales и Sulfolobales. В целом полученные данные полногеномного анализа свидетельствуют о близком родстве *A. saccharovorans* с *A. pernix* и поддерживают классификацию Acidilobales в качестве нового порядка кренархей.

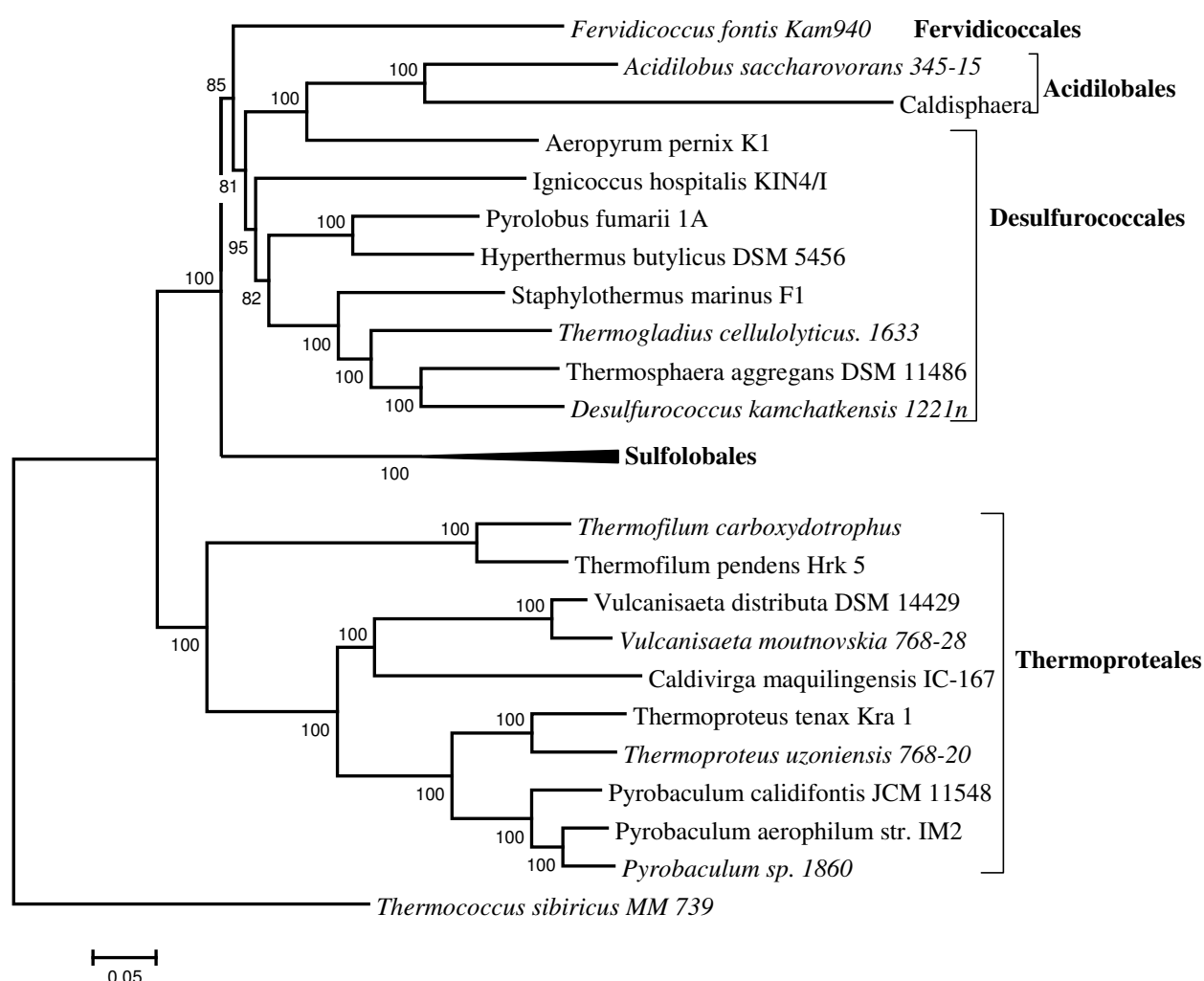


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное на основании контактенированных последовательностей 53 рибосомных белков, построенное методом Neighbour-joining.

Анализ распределения состава нуклеотидов в геноме *A. saccharovorans* показал наличие двух основных локальных минимумов на графике, демонстрирующем диспаритет содержания G и C (GC-skew) (Рис. 4В). Это указывает на возможное

наличие в геноме двух сайтов инициации репликации (*ori*). В результате поиска консервативных последовательностей сайтов связывания инициаторных белков Orc1/Orb6 (ORB-мотивы), было найдено три копии вероятного ORB мотива в некодирующем участке между генами ASac_1056 и ASac_1057 (Рис. 4С).

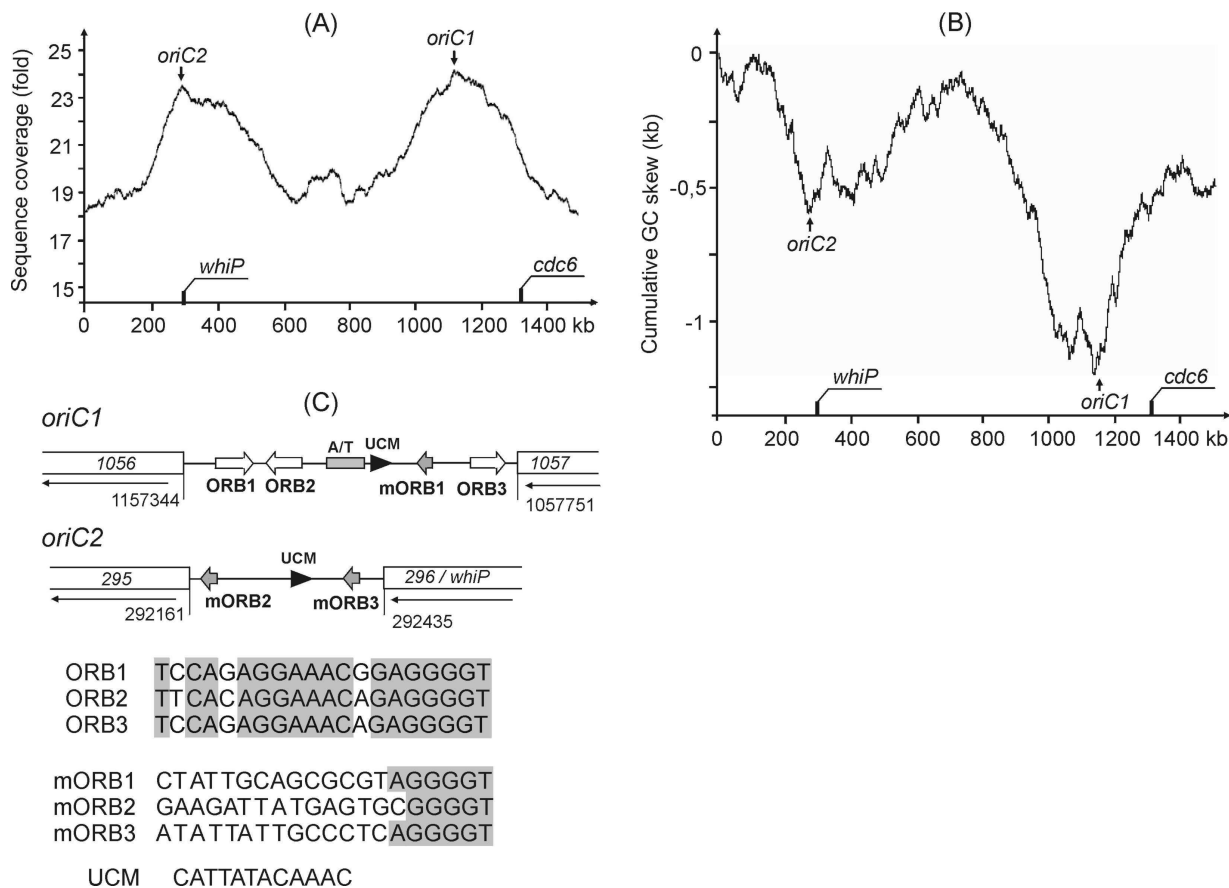


Рисунок 4. Идентификация сайтов инициации репликации в геноме *A. saccharovorans*.

(А) Кратность прочтения нуклеотидных последовательностей генома *A. saccharovorans*.

(В) GC-skew анализ генома (показана кривая «кумулятивного» GC skew).

(С) Структура предсказанных *oriC1* и *oriC2* сайтов. Белые стрелки показывают положение ORB элементов, серые стрелки – укороченные ORB (mini-ORB), черная стрелка указывает положение мотивов UCM. A/T – A/T богатый регион в *oriC1*.

Экспериментальное подтверждение наличия и функционирования двух *ori* сайтов было получено при анализе распределения кратности прочтения нуклеотидной последовательности по длине генома. Препарат геномной ДНК *A. saccharovorans* для геномного секвенирования был выделен из растущей культуры, в которой происходит репликация ДНК. Поэтому участки, прилегающие к *ori*-сайтам, должны быть представлены в большем числе копий, чем прилегающие к сайтам терминции. Поскольку при секвенировании генома фрагменты «выбираются» из геномной ДНК случайным образом, прилегающие к *ori*-сайтам районы должны быть прочтены большее число раз. График, иллюстрирующий распределение кратности прочтения по

длине генома (Рис. 4А) действительно имеет два основных максимума, положения которых точно совпадают с минимумами кривой GC skew и положением консервативных мотивов архейных *ori*-сайтов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что репликация хромосомы *A. saccharovorans* инициируется с двух *ori*-сайтов и является двунаправленной.

В результате анализа генома были выявлены гены, кодирующие ферменты, обеспечивающие возможность роста *A. saccharovorans* на различных субстратах. Рост *A. saccharovorans* на белках и пептидах обеспечивается несколькими внеклеточными ферментами, среди которых обнаружены сериновые и термолисин-подобные протеазы, а также различные пептидазы. Дальнейшее расщепление импортированных в клетку пептидов обеспечивается внутриклеточными протеолитическими ферментами. Образующие аминокислоты в дальнейшем могут быть деаминированы набором аминотрансфераз, действующих совместно с глутамат-дегидрогеназой, и в дальнейшем могут быть окислены с образованием соответствующих производных CoA. Образующие ацил-CoA производные в дальнейшем могут служить субстратом для ацетил-CoA синтазы (ACS) или сукцинил-CoA синтазы (SCS), в результате чего образуется соответствующая кислота и синтезируется АТФ.

Геномные данные также указывают на возможность роста *A. saccharovorans* на триглицеридах и жирных кислотах, поскольку в геноме имеется 14 генов внеклеточных эстераз, а также полный набор ферментов пути β -окисления жирных кислот.

Наличие генов кодирующих различные ферменты гидролиза поли- и олигосахаридов, в том числе секретируемых из клетки, коррелирует со способностью *A. saccharovorans* расти на крахмале, мальтозе, целлобиозе, ксилане и сахарозе. Некоторые гены, кодирующие гликолитические ферменты, были клонированы, экспрессированы в *E. coli*, а их продукты функционально охарактеризованы. Одним из наиболее интересных ферментов является ASAC_1390, относящийся к семейству GH1 гликозил-гидролаз. Рекомбинантный фермент активен в диапазоне значений pH от 4.0 до 7.0 при температурах 80-100°C (оптимум при 93°C) и обладает высокой термостабильностью, - при прогревании фермента при 90°C в течении 4 часов, активность снижается всего на 30%. ASAC_1390 является многофункциональным ферментом и обладает активностями бета-гликозидазы, бета-галактозидазы, бета-ксилозидазы и бета-маннозидазы. Активность фермента в оптимальных условиях составляла 550 ед/мг, - одна из самых высоких для известных термостабильных бета-гликозидаз. Вероятно, именно ASAC_1390 может обеспечивать способность *A. saccharovorans* расти на целлобиозе, лактозе и некоторых других сахарах.

Мономерные сахара и низкомолекулярные олигосахарды импортируются в клетку двумя первичными системами транспортеров ABC-типа, а также более чем двадцатью вторичными транспортными системами. Большая доля вторичных транспортеров по сравнению с первичными может указывать на то, что высокая концентрация протонов в окружающей среде в значительной степени используется *A. saccharovorans* для процессов транспорта. В отличие от большинства известных архей *A. saccharovorans* обладает ферментами сразу двух путей метаболизма глюкозы - Эмбдена-Мейергофа и Энтнера-Дудорова. Образующийся пируват может окисляться пируват:ферредоксин оксидоредуктазой до ацетил-CoA, а затем ацетил-CoA синтаза обеспечивает образование ацетата и синтез АТФ.

A. saccharovorans может запасать энергию в процессах субстратного фосфорилирования, в которых при окислении одной молекулы глюкозы до ацетата образуется две молекулы АТФ, а при окислении одной молекулы аминокислоты – одна молекула АТФ. Кроме того, *A. saccharovorans* может запасать энергию в процессах анаэробного дыхания (окислительного фосфорилирования), при котором происходит восстановление S^0 и перенос протонов мембран-связанными комплексами. В результате переноса протонов через мембрану формируется протонный градиент, который используется АТФазой для синтеза АТФ. В геноме *A. saccharovorans* кодируется одна A_1A_0 АТФ синтаза, состоящая из 9 субъединиц.

У *A. saccharovorans* при росте в присутствии серы в качестве акцептора электронов может функционировать разветвленная дыхательная цепь. В геноме *A. saccharovorans* содержатся гены, кодирующие полный набор ферментов окислительного цикла трикарбоновых кислот (ТКА), в котором ацетил-CoA окисляется в присутствии S^0 или тиосульфата. В присутствии S^0 восстановленный ферредоксин и NAD(P)H могут быть окислены совместным действием мембран-связанных белковых комплексов и цитоплазматических белков, в результате чего формируется трансмембранный протонный градиент. Геномный анализ выявил мембран-связанный белковый комплекс (ASAC_0373 – ASAC_0383), который имеет сходство с бактериальной NADH:хинон оксидоредуктазой (дыхательный комплекс I) и может осуществлять перенос протонов. У *A. saccharovorans* этот комплекс является протон-переносящей ферредоксин:NADP оксидоредуктазой (FNOR), получающей электроны от восстановленного ферредоксина и переносящий их на $NADP^+$; при этом формируется трансмембранный протонный градиент. Образовавшийся NAD(P)H окисляется NAD(P)H: S^0 оксидоредуктазой (NSR) с образованием H_2S или участвует в других процессах, связанных с повторным окислением NAD(P)H. FNOR может также

переносить электроны на хиноны дыхательной цепи и далее на мембран-связанные редуктазы. Помимо FNOR комплекса, дыхательная цепь *A. saccharovorans* включает сукцинат:хинон оксидоредуктазу (SQOR; ASAC_1440 – ASAC_1443, дыхательный комплекс II), который представляет собой мембран-связанный компонент окислительного ТСА. Вторым возможным сайтом восстановления S^0 в *A. saccharovorans* является мембран-связанный серо-редуктазный комплекс (SR, ASAC_1394-ASAC_1397), который может функционировать как конечная оксидаза при S^0 -зависимом дыхании.

Таким образом, при росте в присутствии серы в качестве акцептора электронов, во-первых, электроны от восстановленного ферредоксина могут быть использованы комплексами FNOR и NSR. В результате их функционирования восстанавливается сера и образуется трансмембранный протонный градиент. Во-вторых, часть электронов от FNOR и SQOR может быть перенесена на хиноны. Их окисление с помощью SR, связанное с формированием трансмембранного протонного градиента, является вторым сайтом восстановления серы.

При росте микроорганизма в среде, не содержащей серы, цикл трикарбоновых кислот не функционирует и дыхательная цепь, включающая SQOR комплекс, хиноны и SR, не работает. Однако трансмембранный градиент протонов все же может быть образован при окислении восстановленного ферредоксина FNOR комплексом, функционирование которого требует повторного окисления NAD(P)H. У многих архей эта задача решается с помощью гидрогеназы (протоны используются как акцепторы электронов), однако в геноме *A. saccharovorans* гены гидрогеназы отсутствуют, и водород во время роста не образуется (Prokofeva et al. 2009). Однако, регенерация $NADP^+$ может осуществляться в реакциях, приводящих к образованию других восстановленных продуктов брожения (например аланина, этанола, лактата и формиата). Дополнительно протонный градиент в отсутствии серы может создавать H^+ -транспортирующая мембранная пирофосфатаза. Реконструкция метаболизма *A. saccharovorans* на основе геномных данных представлена на Рис. 5.

A. saccharovorans является строгим анаэробом, однако, в естественных условиях наземных горячих источников он может периодически подвергаться воздействию кислорода при попадании в аэробную зону. Геном *A. saccharovorans* кодирует различные системы защиты клетки от повреждения кислородом. Ключевым ферментом, обеспечивающим защиту от окислительного стресса является супероксиддисмутаза (СОД), которая превращает свободные радикалы кислорода в

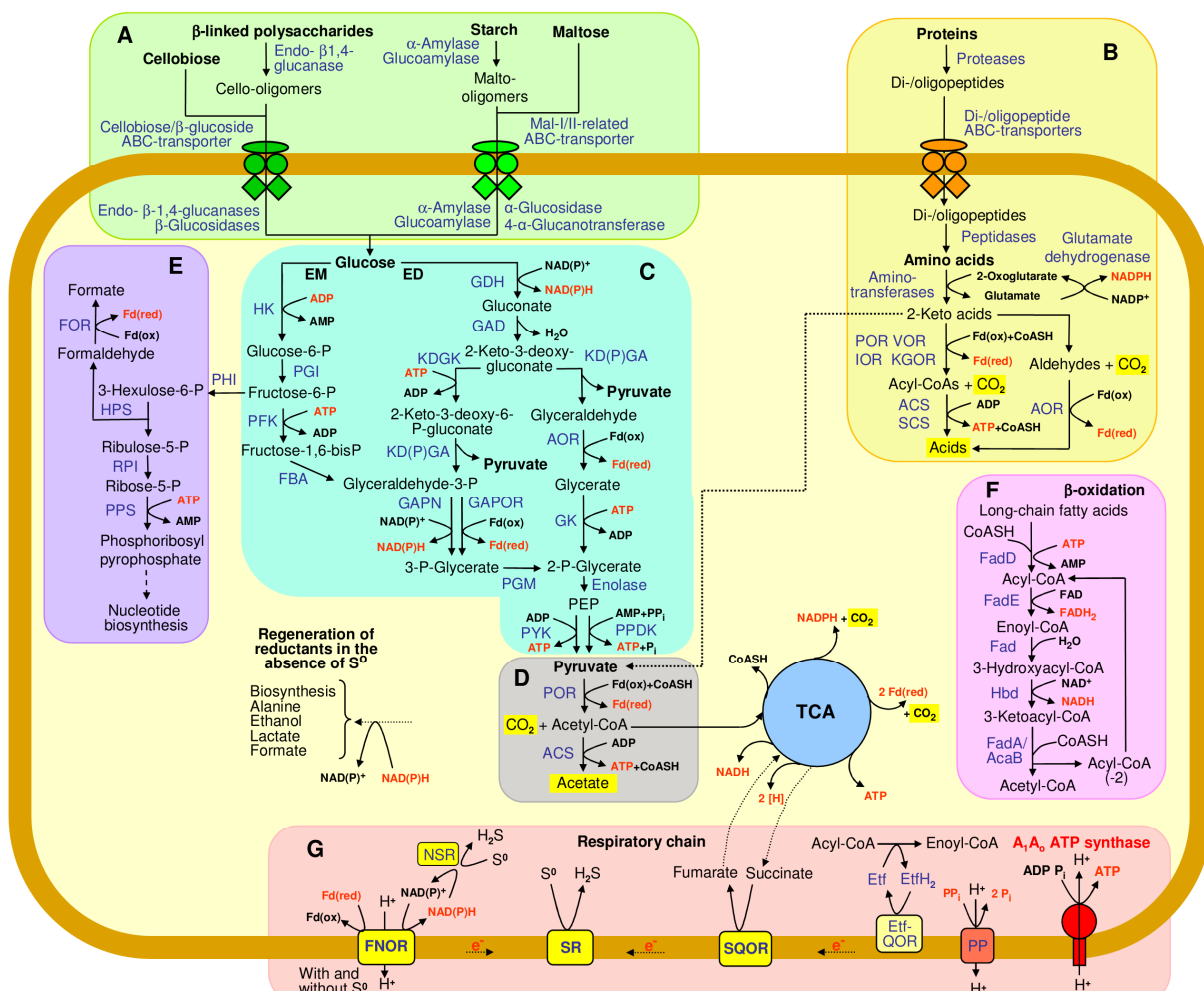


Рисунок 5. Основные пути метаболизма у *A. saccharovorans*.

Жирным шрифтом отмечены используемые субстраты, ферменты и белки отмечены синим, высокоэнергетические интермедиаты (АТФ и др.) отмечены красным.

(А) – утилизация углеводов, (В) – утилизация белков, (С) – гликолиз (Э-М и Э-Д пути), (D) – метаболизм пирувата, (Е) синтез пентозо-фосфатов, (F) – цикл β-окисления жирных кислот, (G) формирование протонного градиента с образованием АТФ, ТСА – цикл трикарбоновых кислот. Обозначения: POR, пируват:ферредоксин оксидоредуктаза; VOR, 2-кетоизовалерат: ферредоксин оксидоредуктаза; IOR, индол-пируват: ферредоксин оксидоредуктаза; KGOR, 2-кетоглутарат: ферредоксин оксидоредуктаза; ACS, ацетил коэнзим А синтетаза; SCS, сукцинил коэнзим А синтетаза; AOR, альдегид: ферредоксин оксидоредуктаза; HK, гексокиназа; PGI, фосфоглюко-изомераза; PFK, фосфофруктокиназа; FBA, фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза; GAPOR, глицеральдегид-3-фосфат ферредоксин оксидоредуктаза; GAPN, нефосфорилирующая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; PGM, фосфоглицерат мутаза; PYK, пируват киназа; PPDK, пируват фосфат дикиназа; GDH, глюкоз-дегидрогеназа; GAD, глюконат дегидратаза; KDGK, 2-кето-3-дезоксиглюконат киназа; KD(P)GA, 2-кето-3-дезоксиглюконат альдолаза; GK, глицерат киназа; PHI, 6-фосфо-3-гексулоизомераза; HPS, 3-гексулоз-6-фосфат синтаза; RPI, рибозо-5-фосфат изомераза; PPS, фосфорибозил пирофосфат синтаза; FOR, формальдегид: ферредоксин оксидоредуктаза; PEP, фосфоэноилпируват; Fd(ox), окисленный ферредоксин; Fd(red), восстановленный ферредоксин; FNOR, ферредоксин:NAD(P)⁺ оксидоредуктазный комплекс; NSR, NAD(P)H:S⁰ оксидоредуктаза; PP, H⁺-пирофосфатаза; SQOR, сукцинат: хинон оксидоредуктазный комплекс; SR, сероредуктаза; Etf, электрон переносящий флавопротеин, Etf-QOR, электрон переносящий флавопротеин:хинон оксидоредуктаза; CoASH, коэнзим А; FadD, ацил-КоА лигаза; FadE, ацил-КоА дегидрогеназа; Fad, эноил-КоА гидратаза; Hbd, 3-гидроксил-КоА дегидрогеназа; FadA/AcaB, 3-кетоацил-КоА тиолаза.

перекись водорода и кислород. СОД кодируется геном Asac_0498, который был нами клонирован и экспрессирован в *E. coli*. Биохимическая характеристика рекомбинантной СОД (Слущкая и др., 2012), показала, что фермент относится к классу Fe-зависимых супероксиддисмутаз. Температурная денатурация фермента наблюдается при 107°C. СОД широко распространены у аэробных архей (*Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus* и др.) но крайне редко встречаются у анаэробов.

2. Органотрофные кренархеи порядков *Desulfurococcales* и *Fervidicoccales*

В лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН из термальных источников Камчатки были выделены три анаэробные органотрофные кренархеи - *Desulfurococcus kamchatkensis* 1221n (Kublanov et al. 2008), *Thermogladius cellulolyticus* 1633 и *Fervidicoccus fontis* (Perevalova et al., 2010). Первые две археи относятся к порядку *Desulfurococcales*, а *F. fontis* при его описании было предложено выделить в новый порядок, *Fervidicoccales* (Perevalova et al., 2010).

По своим физиологическим характеристикам эти три организма являются анаэробными органотрофами, растущими при нейтральных или умеренно-кислых pH (6-7). *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* являются гипертермофилами (оптимальная температура 84°C) и способны расти на белках и некоторых сахарах. *F. fontis* растет только на белковых субстратах при более низких температурах (оптимально от 70°C до 75°C). Морфологически все три организма представляют собой неподвижные кокки диаметром около 1 µm.

В таблице 1 представлены основные характеристики геномов *D. kamchatkensis*, *T. cellulolyticus* и *F. fontis*. Микроорганизмы имеют одну кольцевую хромосому размером 1.3-1.4 млн. нуклеотидов, внехромосомные элементы не обнаружены.

Таблица 1. Основные характеристики геномов

Характеристика	<i>D. kamchatkensis</i>	<i>T. cellulolyticus</i>	<i>F. fontis</i>
Размер генома, нт.	1 365 223	1 356 318	1 319 216
G+C, %	45.3	56	37.5
Число идентифицированных ОРС	1474	1431	1405
Средняя длина ОРС, нт	818	866	821
Доля кодирующей последовательности (% генома)	88.4	91.4	87.4
ОРС с предсказанными функциями	1111 (75%)	1040 (72.7%)	960 (68.3%)
Уникальные ОРС	205	170	336
Гены тРНК (с интронами)	47 (16)	46 (15)	48 (12)
Гены рРНК (* содержит интрон)	16S-23S, 5S	16S-23S*, 5S	16S-23S, 5S
CRISPR локусы	2	2	5

В результате сравнения трех геномов было определено количество общих генов (Рис. 6). Около 65% генов *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* сходны, но только 40% генов *F. fontis* имеют гомологов в геномах двух других организмов. Эти результаты показывают, что по набору кодируемых белков *F. fontis* существенно отличаются от представителей порядка Desulfurococcales, что свидетельствует в пользу правомерности его выделения в отдельный порядок Fervidicoccales. Проведенный нами филогенетический анализ последовательностей 53 рибосомных белков также показал, что *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* являются близкородственными микроорганизмами в порядке Desulfurococcales, а *F. fontis* формирует отдельную филогенетическую ветвь на дереве кренархий, расположенную вблизи «корня» порядка Desulfurococcales и Acidilobales (Рис. 3).

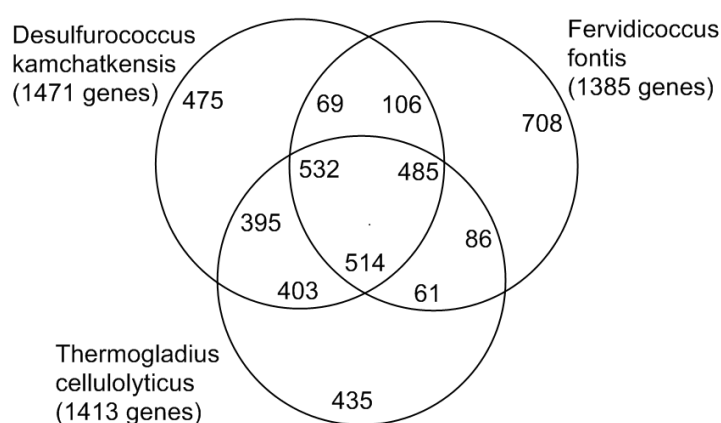


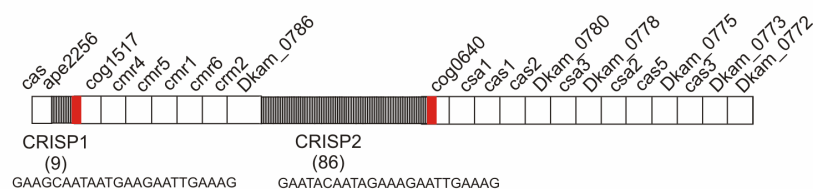
Рисунок 6. Сравнение наборов белок-кодирующих генов *D. kamchatkensis*, *T. cellulolyticus* и *F. fontis*. Общими считались белки, перекрывающиеся на более чем 80% аминокислотной последовательности, при e -value меньше $1 \cdot 10^{-10}$.

В результате поиска мобильных элементов в геноме *D. kamchatkensis* были выявлены полноразмерные транспозоны, принадлежащих к двум семействам – ISC1913 (6 копий) и IS607 (1 копия). Три копии транспозонов семейства ISC1913 были обнаружено в геноме *T. cellulolyticus*. В геноме *F. fontis* полноразмерные транспозоны отсутствуют. Обнаружены MITE-элементы (miniature inverted repeat transposable element), которые являются производными как обнаруженных в геноме, так и неизвестных транспозонов, вероятно, уже элиминированных из генома. MITE элементы содержат концевые области «родительского» транспозона, но не центральные кодирующие участки. Транспозиция этих элементов зависит от активности ферментов «родительского» транспозона.

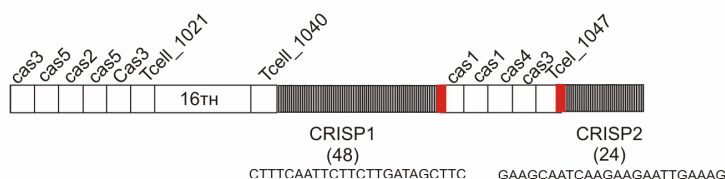
В геномах *D. kamchatkensis*, *T. cellulolyticus* и *F. fontis* обнаружены различные системы защиты генома от инвазии чужеродной ДНК, среди которых были обнаружены системы рестрикции-модификации, а также CRSIPR-локусы (Рис. 7). В геномах *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* было обнаружено по два CRSIPR локуса, содержащих 9 и 86, и 24 и 48 повторов, соответственно. В геноме *F. fontis* имеется

четыре локуса, содержащие 14, 18, 18 и 18 повторов. Последовательности спейсеров не совпадали ни с одним известным внехромосомным элементом архей, но одна последовательность спейсера CRISPR локуса *D. kamchatkensis* совпадала с 3'-концевым участком гена Dkam_1260. Функция Dkam_1260 неизвестна, хотя гомологичные гены присутствуют в геномах некоторых других представителей Desulfurococcales. Сходство спейсерной последовательности CRISPR-локуса и последовательности собственного гена ставит вопрос о возможном механизме контроля экспрессии генов самого микроорганизма за счет активности CRISPR-локуса, подобно РНК интерференции в эукариотах.

A. *Desulfurococcus kamchatkensis*



Б. *Thermogladius cellulolyticus*



В. *Fervidicoccus fontis*

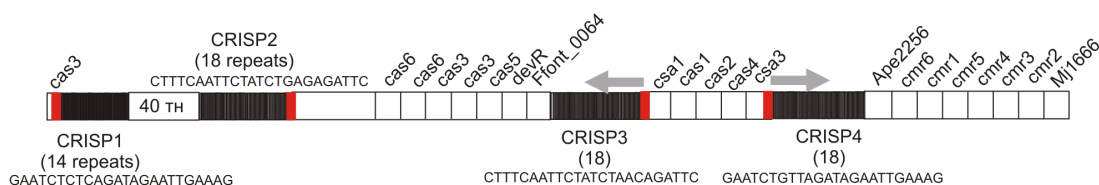


Рисунок 7. Схема CRISPR-локусов. Черными прямоугольниками отмечены CRISPR-локусы, в скобках указано число повторов, снизу приведена последовательность повтора. Стрелками указаны инвертированные повторы длиной 395 нт.

D. kamchatkensis, *T. cellulolyticus* и *F. fontis* растут на различных белковых субстратах, что предполагает наличие у них термостабильных внеклеточных протеаз В геномах каждого из этих микроорганизмов было идентифицировано более двух десятков пептидаз/протеаз различных типов. Некоторые протеолитические ферменты, экспрессированные в *E. coli* были функционально охарактеризованы. Так, субтилизин-подобная сериновая протеаза Dkam_1144 из *D. kamchatkensis*, активная форма которой образовывалась в результате автопроцессинга пропептида, проявляла максимальную

активность при 90°C в присутствии ионов кальция и активировалась в присутствии 0.01% SDS. Протеаза Dkam_1144 обладает высокой термостабильностью, сохраняя свою активность в течение 4 часов инкубации при 80°C. Такие характеристики Dkam_1144 делают этот фермент перспективным для применения в различных областях биотехнологии.

В геномах *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* найдены гены различных гликозил-гидролаз, что соответствует способности этих архей расти на некоторых полисахаридах. Так у них имеется набор ферментов, обеспечивающих гидролиз крахмала и родственных полимеров. *T. cellulolyticus*, в отличие от *D. kamchatkensis*, может использовать в качестве субстратов различные виды целлюлозы, однако, гены известных целлюлозолитических ферментов в геноме *T. cellulolyticus* не найдены. Поэтому, можно предположить, что у *T. cellulolyticus* функционирует неизвестный механизм гидролиза целлюлозы. Более узкоспециализированным органотрофным метаболизмом, ориентированным на гидролиз белковых субстратов, характеризуется *F. fontis*, – его геном кодирует широкий спектр протеолитических ферментов при отсутствии ферментов, обеспечивающих гидролиз полисахаридов.

Анализ геномов выявил наличие генов, кодирующих все ферменты метаболизма глюкозы по модифицированному пути Эмбдена-Мейергофа. В отличие от *A. saccharovorans*, в геномах *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* и *F. fontis* отсутствуют гены ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот, что ограничивает возможности метаболизма этих архей по пути брожения и не позволяет им полностью окислять органические субстраты даже в присутствии внешнего акцептора электронов (напр. S⁰). Отсутствие ферментов известных циклов автотрофной фиксации углерода согласуется с неспособностью этих микроорганизмов к автотрофному росту.

Согласно результатам геномного анализа *D. kamchatkensis*, *T. cellulolyticus* и *F. fontis* могут синтезировать АТФ как за счет субстратного фосфорилирования, так и в процессе окислительного фосфорилирования с помощью АТФ синтаз, использующих для синтеза АТФ трансмембранный ионный градиент. У всех трех микроорганизмов протонный градиент может создаваться за счет окисления восстановленного ферредоксина мультисубъединичными мембран-связанными комплексами двух типов. Комплекс первого типа, энерго-преобразующая гидрогеназа (МВН), использует восстановленный ферредоксин в качестве донора электронов и переносит их на протоны как акцептор электронов, образуя водород. При этом происходит перенос протонов через мембрану и образуется протонный градиент. Помимо МВН трансмембранный протонный градиент может быть создан мембран-связанной

ферредоксин:NADPH оксидоредуктазой (MBX), которая окисляет ферредоксин и восстанавливает NADP^+ с генерацией протон-движущей силы. Перенос электронов на серу с образованием водорода может осуществлять растворимая NAD(P)H:полисульфид оксидоредуктаза или аналогичный фермент, окисляющий NAD(P)H с образованием H_2S . Сера не стимулирует рост *F. fontis*, что согласуется с отсутствием в его геноме явных гомологов генов ферментов, окисляющих NAD(P)H и восстанавливающих серу. Другие потенциальные акцепторы электронов (сульфат, нитрат, тиосульфат) *D. kamchatkensis*, *T. cellulolyticus* и *F. fontis* не используются, что согласуется с отсутствием генов, кодирующие соответствующие редуктазы.

Наряду с мембран-связанными гидрогеназами, у *T. cellulolyticus* и *F. fontis* имеется цитоплазматическая гидрогеназа, относящаяся к группе 3b [NiFe]-гидрогеназ. Донором электронов для этих бинаправленных гидрогеназ является NADPH. Гидрогеназы этого типа ранее не были описаны в археях.

Образованный в результате активности мембранных комплексов MBH и MBX протонный градиент используется A_1A_0 АТФ-синтазой для синтеза АТФ. Анализ аминокислотных последовательностей «роторных» субъединиц АТФ-синтазы *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* выявил наличие консервативных остатков, участвующих в связывании Na^+ в Na^+ -АТФ синтазах. Это означает, что транспортируемым ионом в АТФ-синтазах этих двух микроорганизмов является Na^+ . Это может объяснять наличие натрий-протонных антипортеров. Ранее была выдвинута гипотеза о том, что ионы натрия имеют ряд преимуществ над протонами в качестве сопряженных ионов при росте в анаэробных высокотемпературных местообитаниях (Pisa et al., 2007). Возможно, натрий-зависимые биоэнергетические процессы в гипертермофильных археях определяют их адаптацию к внешним условиям. Растущий при более низких температурах *F. fontis* имеет H^+ -зависимую АТФ-синтазу.

3. Геномы трех кренархей порядка Thermoproteales

Представители родов *Vulcanisaeta*, *Pyrobaculum* и *Thermoproteus* вместе с *Thermocladium*, *Caldivirga* и *Thermofilum* образуют порядок Thermoproteales филума Crenarchaeota, объединяющий термофильных кренархей, имеющих клетки палочковидной формы. Этот порядок является эволюционно наиболее древним среди гипертермофильных кренархей. Три новых вида архей порядка Thermoproteales были выделены сотрудниками ИНМИ РАН: *Vulcanisaeta moutnovskia* 768-28 и *Thermoproteus uzoniensis* 768-20 из сульфатары, расположенной в вулкане Мутновский на Камчатке

(Prokofeva et al., 2005), а новый штамм *Pyrobaculum* sp. 1860 - из озера Фумарольное кальдеры вулкана Узон.

Основные характеристики геномов этих трех микроорганизмов представлены в таблице 2. Размеры геномов значительно больше, чем у архей порядка *Desulfurocossales* и составляют от 1.9 млн нуклеотидов у *T. uzoniensis* до 2,5 млн. нуклеотидов у *Pyrobaculum* sp. 1860. Соответственно, больше и общее число предсказанных белок-кодирующих генов. Все геномы содержат по одному рибосомному оперону, включающему гены 16S и 23S рРНК, а также отдельно расположенный ген 5S рРНК.

Таблица 2. Основные характеристики геномов

Характеристики	<i>V. moutnovskia</i> 768-28	<i>T. uzoniensis</i> 768-20	<i>Pyrobaculum</i> sp. 1860
Размер генома, нт.	2 298 983	1 936 063	2 467 972
G+C, %	42,4	59,7	57
Число идентифицированных ОРС	2320	2188	2828
Доля кодирующей последовательности (% генома)	88.0	91.3	89.7
ОРС с предсказанными функциями	1496	1441	1460
Гены рРНК (* содержит интроны)	16S-23S и 5S	16S-23S и 5S	16S*-23S и 5S
CRISPR локусы	4	0	8

В гене 16S рРНК *Pyrobaculum* sp. 1860 найдено три интрона длиной 717, 785 и 602 нт. У других представителей *Pyrobaculum* в генах 16S рРНК может содержаться 1-2 интрона. В интронах гена 16S рРНК *Pyrobaculum* sp. 1860 найдены три гена, кодирующие интронные хоминг-эндонуклеазы. Предполагается, что присутствие этих генов в последовательностях интронов архей указывает на инфекционную природу интронов (Itoh et al 2003).

В результате поиска CRISPR-систем в геномах *V. moutnivskia* и *Pyrobaculum* sp. 1860 были идентифицированы 4 и 8 CRISPR кластеров, соответственно. В геноме *T. uzoniensis* CRISPR локусов не содержится, что необычно для гипертермофильных архей. Отсутствие CRISPR системы коррелирует с практически полным отсутствием в геноме *T. uzoniensis* генов транспозаз и интеграз, которые указывали бы на наличие мобильных элементов или их остатков. Возможно, отсутствие CRISPR системы и мобильных элементов у *T. uzoniensis* обусловлены особенностями экологической ниши, занимаемой этой археей, в которой возможно отсутствуют вирусы и другие мобильные элементы. Альтернативным объяснением может являться наличие другой эффективной системы защиты генома от чужеродной ДНК, что делает CRISPR систему ненужной.

Мы провели попарные сравнения геномов *V. moutnovskia* и *T. uzoniensis* с геномами близкородственных им микроорганизмов (Рис. 8). Ближайшим родственником *V. moutnovskia* является *V. distributa* DSM 14429, геном которого был секвенирован в Joint Genome Institute (Mavromatis et al., 2010). Около 77% предсказанных белков *V. moutnovskia* имеют сходство с белками, кодируемыми геномом *V. distributa*, а 72% предсказанных белков *T. uzoniensis* 768-20 имеют сходство с белками его ближайшего родственника *T. tenax*, геном которого был опубликован в 2011 году.

Сравнение полных геномных последовательностей *V. moutnovskia* и *V. distributa*, а также *T. uzoniensis* и *T. tenax* выявило не только сходство последовательностей отдельных генов, но и сохранение порядка генов на протяжении крупных участков хромосомы (синтению), что характерно для близкородственных микроорганизмов (Рис. 8). Наибольшее сходство, как по набору генов, так и по порядку их расположения было обнаружено при сравнении геномов *V. moutnovskia* и *V. distributa*. Эти геномы отличаются четырьмя крупными инверсиями (Рис. 9). Число перестроек между геномами *T. uzoniensis* и *T. tenax* значительно больше, но синтения на протяжении крупных фрагментов геномов также прослеживается.

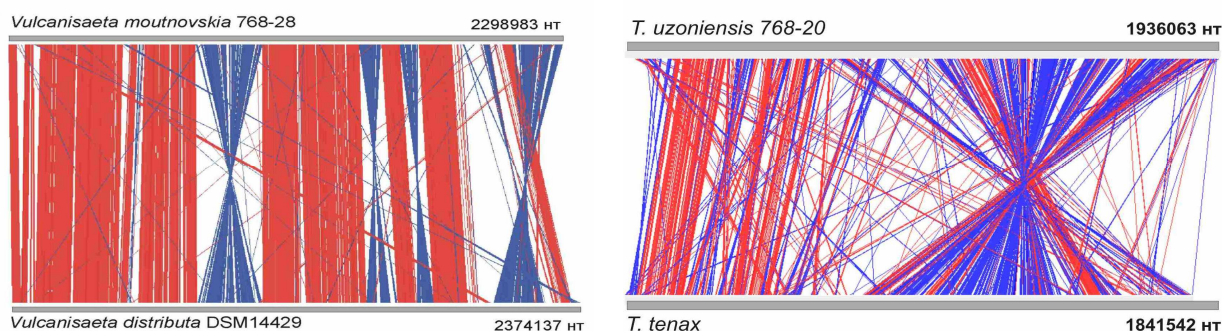


Рисунок 8. Локализация гомологичных участков в геномах.

Сравнение выполнено по протоколу BLASTN (e-value < 1e-10) и визуализировано с помощью WebACT tool (<http://www.webact.org/WebACT/home>). Для удобства визуализации начальная точка смещена в положение 1.413.820 нт. в последовательности генома *V. moutnovskia* (GenBank CP002529) и в положение 588.199 нт в геноме *V. distributa* (GenBank NC014537), в положение 400 000 нт. в последовательности генома *T. uzoniensis* 768-20 (GenBank NC_015315), координаты в последовательности генома *T. tenax* (GenBank FN869859) не изменяли.

Сравнение геномов *V. moutnovskia* и *V. distributa* выявило уникальные участки, имеющиеся лишь в одном из геномов. Большая часть генов, расположенных в этих районах, кодирует белки с неизвестными функциями, отсутствующие в геномах других архей; их появление может быть результатом интеграции неизвестных вирусов или мобильных элементов (хотя не исключены и связанные с использованием разных программ артефакты аннотации, особенно для коротких генов). Так, из 540 генов

V. moutnovskia, отсутствующих в геноме *V. distributa*, 365 составляли гены гипотетических белков, не имеющих гомологов в базах данных, а 15 – гены транспозаз. На вирусную природу генов гипотетических белков во многих случаях указывает их кластерное расположение в геноме. Это согласуется с тем, что большинство белков вирусов архей не имеют гомологов в базах данных. Однако, в некоторых случаях появление «уникального» района в одном геноме отражает делецию соответствующего участка генома у другого анализируемого организма, что проявляется в потере определенных свойств.

Анализ путей метаболизма у *V. moutnovskia*, *T. uzoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860 выявил наличие различных гидролитических ферментов, которые могут обеспечивать утилизацию белковых субстратов и некоторых сахаров, что соответствует спектру используемых для роста субстратов. У этих трех архей метаболизм глюкозы может осуществляться через модифицированные пути Эмбдена-Мейергофа и Энтнера-Дудорова. Образовавшийся пируват может окисляться пируват:ферредоксин оксидоредуктазой до ацетил-CoA и далее до ацетата ацетил-CoA синтетазой с образованием АТФ. Конверсия пирувата в ацетил-CoA у *T. uzoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860 может также осуществляться пируват-дегидрогеназным комплексом, который используется для этой цели у эукариот и большинства аэробных бактерий. У *V. moutnovskia* этот комплекс отсутствует. Возможно, его приобретение в процессе эволюции Thermoproteales произошло после разделения рода *Vulcanisaeta* и общего предшественника *Thermoproteus* и *Pyrobaculum*.

В каждом из трех геномов были обнаружены гены внеклеточных эстераз и набора ферментов пути бета-окисления жирных кислот, что предполагает возможность использования этими археями липидов. В геноме *V. moutnovskia* также кодируется глицерол-киназа, что позволяет этой архее использовать не только жирные кислоты, но и глицерин, образующийся при гидролизе триглицеридов.

Энергия может запасаться как в процессах субстратного фосфорилирования, так и анаэробного дыхания в присутствии внешнего акцептора электронов. Образующийся в результате метаболизма сахаров, белков и жирных кислот ацетил-CoA может не только сбраживаться до ацетата, но и окисляться до CO₂ в ходе анаэробного дыхания. Для этого в геномах *V. moutnovskia*, *T. uzoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860 кодируется полный набор ферментов окислительного цикла трикарбоновых кислот. Анализ геномов *T. uzoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860 позволяет предсказать способность этих архей осуществлять автотрофную фиксацию CO₂ благодаря наличию восстановительного

цикла трикарбоновых кислот и дикарбоксилат/4-гидроксibuтиратного цикла. В геноме *V. moutnovskia* ключевые ферменты циклов автотрофной фиксации CO₂ отсутствуют.

Особенностью *T. uzoniensis*, предсказанной в результате анализа генома, является способность к автотрофному росту за счет анаэробного окисления водорода, связанного с восстановлением серы (hydrogen-sulfur autotrophy). Окисление водорода ($H_2 > 2H^+ + 2e^-$) и восстановление серы ($2H^+ + 2e^- + S^0 > H_2S$) осуществляются мембран-связанными гидрогеназой и сероредуктазой; их совместное функционирование в короткой электрон-транспортной цепи приводит к переносу протонов из клетки и к образованию трансмембранного градиента протонов, используемого для синтеза АТФ. Аналогичные кластеры генов, кодирующих сероредуктазу и гидрогеназу, имеются и в геноме *V. distributa*, однако, в геноме *V. moutnovskia* делетированы два из трех генов, кодирующих субъединицы сероредуктазы, гидрогеназа также отсутствует (Рис. 9).

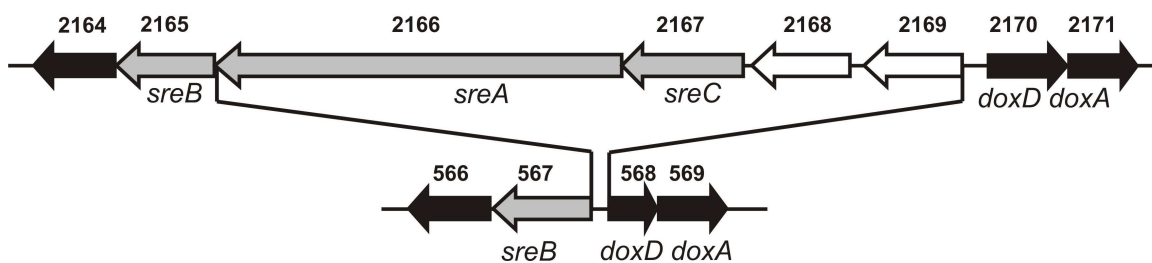


Рисунок 9. Локус, кодирующий мембран-связанную сероредуктазу у *V. distributa* (вверху) и соответствующий участок генома *V. moutnovskia* (внизу). Гены, кодирующие субъединицы сероредуктазы, указаны серыми стрелками, гены с неизвестными функциями, - незакрашенными стрелками.

В процессах анаэробного дыхания в присутствии акцептора электронов восстановленный ферредоксин, NAD(P)H и водород, могут быть окислены в результате согласованной работы набора мембран-связанных оксидоредуктазных комплексов и цитоплазматических редуктаз, приводящей к образованию трансмембранного протонного градиента. Все три генома кодируют протон-транспортирующие ферредоксин: NAD(P)⁺ оксидоредуктазные комплексы, получающие электроны от восстановленного ферредоксина и передающие их на NAD(P)⁺ и/или на хиноны дыхательной цепи и далее на мембран-связанные редуктазы. В геномах *V. moutnovskia* и *T. uzoniensis* кодируется NAD(P)H:S оксидоредуктаза NSR, которая может окислять восстановленный NAD(P)H с образованием сероводорода. В геноме *Pyrobaculum* sp. 1860 отсутствуют гены цитоплазматической NSR и мембран-связанной сероредуктазы, что согласуется с тем, что этот микроорганизм не восстанавливает серу.

У *V. moutnovskia*, *T. uzoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860 имеются различные терминальные оксидоредуктазы. Так, *T. uzoniensis* кодирует мембран-связанную сероредуктазу, а также цитохром *bd* и цитохром *c* оксидазы. Особенностью *V. moutnovskia* является наличие полного набора генов, кодирующих ферменты пути восстановления сульфатов, редко встречающегося у архей и на сегодняшний день описанного только у зуриархеи *Archaeoglobus fulgidus* и кренархеи *Caldivirga maquilingensis*. Наиболее широкий спектр мембран-связанных оксидоредуктаз, которые могут служить конечными акцепторами электронов при анаэробном дыхании, обнаружен у *Pyrobaculum* sp. 1860. Это цитохром-оксидазы различных типов, нитрат редуктаза NarG-типа, цитохром *c* нитрит редуктаза, NO-редуктаза, цитохром *c* редуктаза закиси азота, редуктаза оксида железа Fe(III) цитохром *c* типа, и молибдоптериновые оксидоредуктазы Psr/Phs семейства, которые могут восстанавливать арсенат, тиосульфат или полисульфид. Нитрит редуктаза кодируется двумя расположенными рядом генами (P186_0727 и P186_0728); анализ их нуклеотидных последовательностей показал, что удаление одного нуклеотида может приводить к восстановлению рамки считывания. Это может указывать на наличие в этом гене потенциального сайта программируемого сдвига рамки считывания. Реальная физиологическая роль терминальных оксидоредуктаз у *Pyrobaculum* sp. 1860 является предметом изучения, поскольку экспериментально была показана только способность *Pyrobaculum* sp. 1860 восстанавливать нитрат, оксид железа (III) и арсенат.

Таким образом, у *V. moutnovskia*, *T. uzoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860 функционируют разветвленные дыхательные цепи. По-видимому, в зависимости от условий окружающей среды эти микроорганизмы используют оптимальные акцепторы электронов. Во всех трех микроорганизмах протонный градиент, являющийся результатом действия протонных насосов и пирогосфатазы, может использоваться АТФ-синтазой A_1A_o типа для синтеза АТФ, сопряженного с переносом протонов в клетку. Этот фермент может действовать в обоих направлениях. При росте в отсутствие внешних акцепторов электронов активности протонных насосов может оказаться недостаточно для создания протонного градиента, необходимого для поддержания нормального внутриклеточного рН в условиях кислой среды. В этом случае дополнительный протонный градиент может генерироваться обратной активностью АТФазы, действующей как протонный насос за счет гидролиза АТФ, синтезированного в реакциях субстратного фосфорилирования.

4. *Thermofilum carboxydotrophus*, карбоксидотрофная кренархея порядка *Thermoproteales*.

Анаэробная кренархея *Thermofilum carboxydotrophus* 1505 была выделена из горячего источника, расположенного вблизи вулкана Мутновский, Камчатка. Культура растет в анаэробной среде, содержащей 100 мг/л дрожжевого экстракта, в присутствии 45% CO в газовой фазе (Sokolova et al., 2009). В процессе роста CO полностью потреблялся с образованием молекулярного водорода и CO₂. *T. carboxydotrophus* является первым представителем Crenarchaeota, способным к гидрогеногенной карбоксидотрофии (реакция $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} > \text{CO}_2 + \text{H}_2$). Это свойство широко распространено среди бактерий типа *Firmicutes*, но крайне редко встречается у архей.

Геном *T. carboxydotrophus* является кольцевой хромосомой длиной 1.754.192 нт и не содержит внехромосомных элементов. Содержание G+C составляет 46.4 %. Было идентифицировано 2013 потенциальных генов, покрывающих 89.7% хромосомы, из них 1969 – кодирующих белки. В результате сравнения с базами данных аминокислотных последовательностей с различной степенью детализации и достоверности были предсказаны функции 66% предполагаемых белков. 320 предсказанных белков являются специфичными для *T. carboxydotrophus* и не имеют сходства с последовательностями, представленными в GeneBank.

Геном содержит одну копию рибосомного оперона, включающего гены 16S и 23S РНК, а также отдельно расположенный ген 5S рРНК. Гены рибосомных РНК не содержат интронов, однако, интроны были найдены в половине идентифицированных генов тРНК. В геноме *T. carboxydotrophus* найдено 9 CRISPR локусов, 8 из них расположены в одном участке генома размером около 300 т.п.н. У *T. carboxydotrophus* найдено только 4 гена, кодирующих необходимые для функционирования CRISPR-системы Cas белки, т.е. минимальный набор *cas*-генов, найденных в других организмах, по-видимому, отсутствует. Поэтому можно предположить, что CRISPR-система у *T. carboxydotrophus* не функционирует.

В результате сравнения наборов белок-кодирующих генов установлено, что ближайшим родственным *T. carboxydotrophus* микроорганизмом с известной полной геномной последовательностью является *T. pendens*. Около 65% предсказанных белков *T. carboxydotrophus* (~1300 белков) имеют сходство с белками *T. pendens*. Сравнение полных геномных последовательностей *T. carboxydotrophus* и *T. pendens* (Рис. 10) выявило сохранение порядка генов на протяжении крупных участков хромосомы. Однако, распределение такой синтении в геномах не равномерно – на протяжении примерно 3/4 длины геномы в основном колинеарны, а оставшиеся фрагменты сильно

различаются (Рис. 10). У *T. carboxydotrophus* этот «видоспецифический» участок включает 577 белок-кодирующих генов. Среди этих белков только 35 % (~200 белков) имеют гомологию с белками *T. pendens*, это в два раза ниже, чем в среднем по геному. Большая часть генов этого района кодирует белки с неизвестными функциями, отсутствующие в геномах других архей. Появление таких генов может быть результатом интеграции крупных фрагментов чужеродной горизонтально перенесенной ДНК и геномных перестроек.

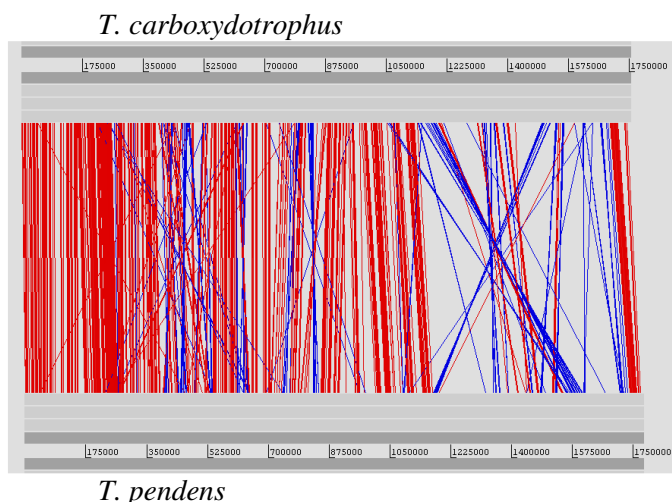


Рисунок 10. Локализация гомологичных участков в геномах *T. carboxydotrophus* и *T. pendens*. Сравнение выполнено по протоколу BLASTN (e-value < 1e-10) и визуализировано с помощью WebACT tool. Для удобства визуализации начальная точка смещена в положение 1.123.000 нт. в последовательности генома *T. carboxydotrophus*, а для генома *T. pendens* показана комплементарная последовательность.

T. carboxydotrophus растет на пептоне и глюкозе в присутствии дрожжевого экстракта и серы. Анализ генома выявил гликолитические и протеолитические ферменты, а также транспортеры сахаров и пептидов. Особенностью *T. carboxydotrophus* является то, что абсолютное большинство гидролитических ферментов являются внутриклеточными. Например, из 14 гликозил-гидролаз лишь один фермент семейства GH57 имеет сигнальную последовательность, что может предполагать его внеклеточное функционирование. В геноме кодируется большое количество различных транспортеров сахаров и пептидов, в том числе ферменты фосфотрансферазной системы транспорта углеводов, редко встречающейся у архей. Все это указывает на то, что рост *T. carboxydotrophus* обеспечивается не за счет гидролиза внеклеточных полисахаридов и сложных белковых субстратов, а, в первую очередь, за счет эффективного транспорта и использования низкомолекулярных соединений, присутствующих в среде.

Основные пути центрального метаболизма у *T. carboxydotrophus* сходны с таковыми у проанализированных представителей Desulfurococcales (Рис. 12). Метаболизм глюкозы может осуществляться посредством модифицированного пути

Эмбдена-Мейергофа. В отличие от других *Thermoproteales*, у *T. carboxydotrophus* отсутствуют путь Энтнера-Дудорова и цикл трикарбоновых кислот.

Анализ генома выявил два мембран-связанных оксидоредуктазных комплекса. Первый комплекс подобен MBH гидрогеназе, окисляющей восстановленный ферредоксин с образованием водорода и переносом протонов через мембрану. Второй MBX-подобный комплекс формирует протонный градиент за счет окисления ферредоксина и восстановления NADP^+ . Образующийся NADPH может в дальнейшем окисляться NAD(P)H:S оксидоредуктазой с образованием H_2S . Восстановление серы также может осуществляться посредством мембран-связанной сероредуктазы, которая может получать электроны от хинонов дыхательной цепи или мембран-связанной гидрогеназы.

Еще одной особенностью *T. carboxydotrophus*, указывающей на его способность использовать продукты деятельности других микроорганизмов, является наличие пути ассимиляции глицерина, который может образовываться, в частности, в результате гидролиза присутствующих в среде триглицеридов липолитическими ферментами. Глицерин может фосфорилироваться, а затем окисляться мембран-связанной глицерол-3-фосфат дегидрогеназой, которая может переносить электроны на хиноны дыхательной цепи. Образованный гидроксиацетон-фосфат может утилизироваться по пути Эмбдена-Мейергофа.

T. carboxydotrophus является единственной известной кренархеей, способной к росту на CO с образованием H_2 и CO_2 . Ранее анаэробные гидрогеногенные карбоксидотрофы были описаны в основном среди бактерий типа *Firmicutes*. Среди архей этот тип метаболизма был обнаружен у некоторых представителей эуриархей рода *Thermococcus*. В результате анализа генома *T. carboxydotrophus* был выявлен кластер генов (Ther_0860 – Ther_0871), кодирующих CO -дегидрогеназу (CODH). Этот кластер включает транскрипционный регулятор и гены, кодирующие субъединицы CODH: электрон-транспортную CooF , каталитическую CooS , вспомогательную субъединицу CooC , субъединицы гидрогеназы CooM , CooU , CooH , CooL , CooK и CooX . Организация кластера генов CODH у *T. carboxydotrophus* сходна с таковой у эуриархей рода *Thermococcus* (Рис. 11), что указывает на горизонтальный перенос этого кластера между *T. carboxydotrophus* и *Thermococcus*. Первоначальным источником этих генов, вероятно, были термофильные карбоксидотрофные бактерии филума *Firmicutes*.

Каталитическая субъединица CO -дегидрогеназы *T. carboxydotrophus*, CooS , имеет высокую гомологию с CooS (THERMP_01153) из *Thermococcus barophilus* MP (74% идентичности), а также функционально охарактеризованным CooS из *Carboxydotherrmus*

hydrogenoformans (Chy_0085) и *Rhodospirillum rubrum*. CODH комплекс *Rhodospirillum rubrum* принимает участие в СО-зависимой цепи переноса протонов. СО-дегидрогеназа окисляет СО до СО₂, используя Н₂О, и переносит электроны на протоны с образованием водорода, энергия генерируется в виде трансмембранного протонного градиента (Рис. 12).

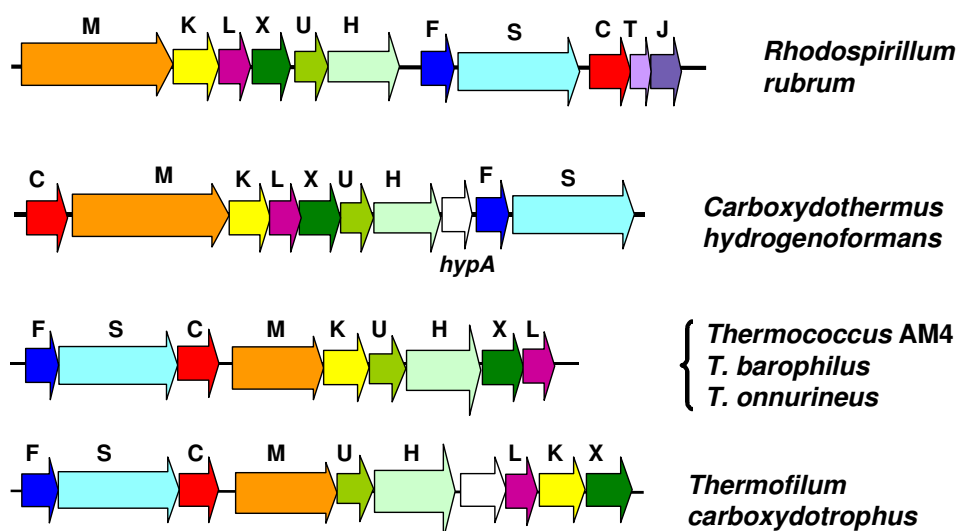


Рисунок 11. Организация кластера CODH генов у карбоксидотрофных архей и бактерий филума *Firmicutes*.

На основании геномных данных можно предположить, что *T. carboxydophilus* использует СО не только как источник энергии, но и как источник углерода. Геном содержит ген рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы, ключевого фермента автотрофной фиксации углекислого газа в цикле Кальвина. Также в геноме кодируются ферменты, участвующие в преобразовании рибозофосфатной группы аденозинмонофосфата (АМФ) в рибулозо-1,5-бисфосфат: АМФ фосфорилаза и рибулозо-1,5-бисфосфат изомеразы. В условиях недостатка гетеротрофных субстратов и ограниченного образования СО₂ в процессах катаболизма, СО₂, образуемый в результате действия CODH, может быть субстратом для рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы (Рис. 12).

Культивирование *T. carboxydophilus* требует присутствия в среде дрожжевого экстракта, что указывает на потребность микроорганизма в сложных соединениях. Более того, другой представитель этого рода, *T. pendens*, требует для роста клеточных экстрактов археи *T. tenax*, что указывает на потерю многих биосинтетических процессов. Как и в случае *T. pendens* (Anderson et al., 2008), анализ генома *T. carboxydophilus* указывает на потерю способности синтезировать многие метаболиты, в том числе пурины, большинство кофакторов и аминокислот. Из 125 COG (Clusters of

Orthologous Groups), кодирующих биосинтетические ферменты у архей (Anderson et al., 2008), в геномах *T. pendens* и *T. carboxydotrophus* имеются гены лишь 11 ферментов. Такая потеря биосинтетических путей характерна для некоторых облигатных паразитов (например *Rickettsia*). Вероятно, *T. carboxydotrophus* оптимальным образом приспособлен для получения необходимых им метаболитов из содержащей разнообразную органику среды термального источника.

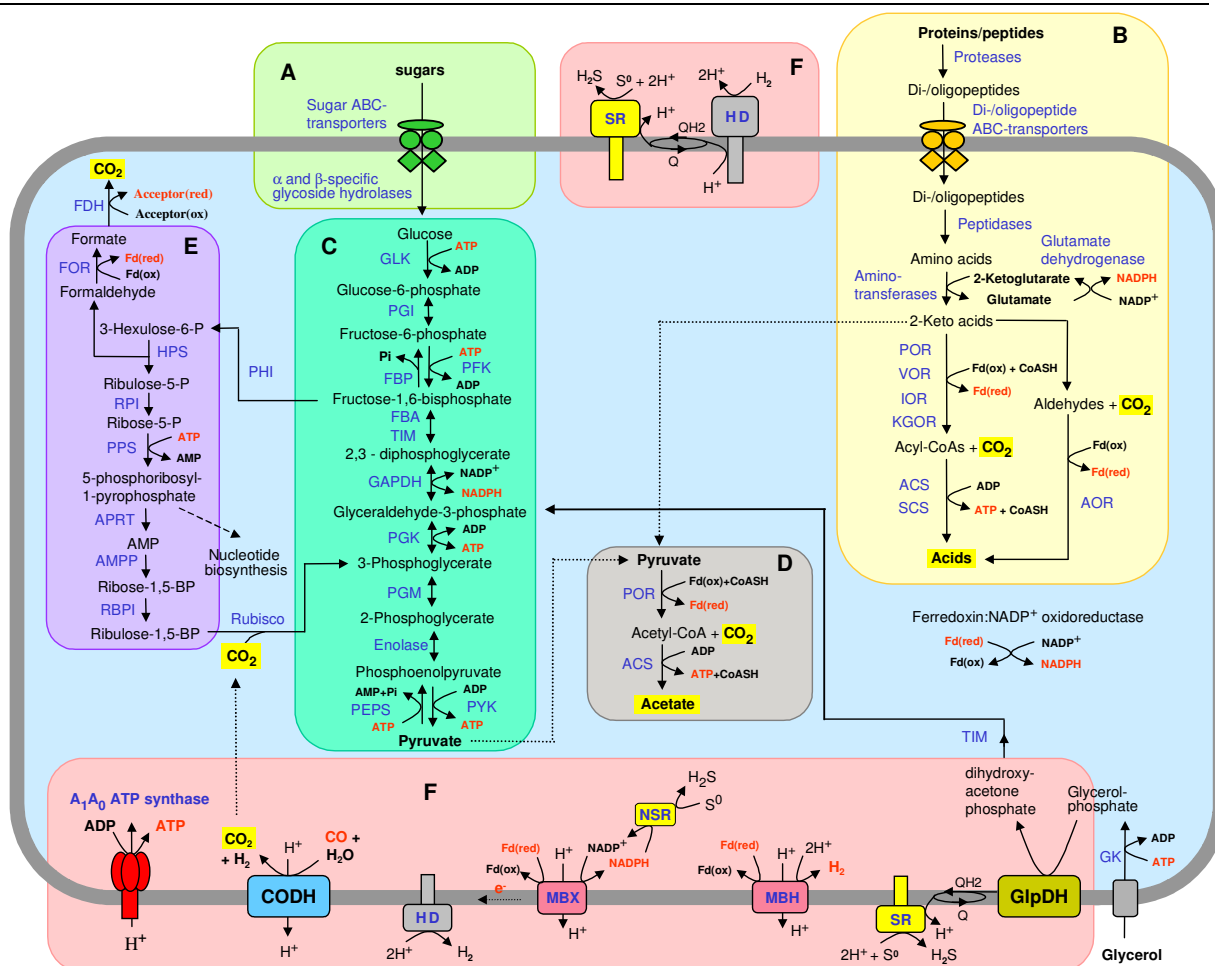


Рисунок 12. Основные пути метаболизма *T. carboxydotrophus*.

(А) – утилизация сахаров, (В) – утилизация белков, (С) – гликолиз (Э-М) и глюконеогенез, (D) – метаболизм пирувата, (Е) – синтез пентоз-фосфатов, (F) формирование протонного градиента с образованием АТФ.

5. Эуриархея *Thermococcus sibiricus*, выделенная из пластовых вод нефтяного резервуара

Представители рода *Thermococcus* широко распространены в наземных и морских гидротермах, а также в пластовых водах подземных нефтяных месторождений. Гипертермофильная анаэробная эуриархея *Thermococcus sibiricus* ММ 739 была выделена из пластовых вод высокотемпературного нефтяного месторождения Самотлор в Западной Сибири (Miroshnichenko et. al., 2001). Температура вод в месте

выделения (глубина 2350 метров) составляла около 84°C. Вместе с родами *Pyrococcus* и *Palaeococcus*, *Thermococcus* относится к эуархейному порядку *Thermococcales*. Большинство *Thermococcales* являются органогетеротрофами, растущими на белках и некоторых углеводах, используя серу или протоны в качестве акцепторов электронов.

Ранее были определены геномные последовательности нескольких представителей *Thermococcales*, выделенных из морских гидротерм. В отличие от них *T. sibiricus* был выделен из пластовых вод высокотемпературного нефтяного резервуара. Такие места обитания характеризуются низким уровнем растворенного органического углерода и следовыми количествами свободных аминокислот. Тем не менее, первоначально *T. sibiricus* был описан как анаэроб, сбраживающий белковые субстраты (Miroshnichenko et al. 2001). Этот организм был найден в изолированном нефтесодержащем горизонте Юрского периода, причем в это месторождение вода искусственно не закачивалась. Оптимальные условия роста *T. sibiricus* (температура, pH и соленость) соответствуют условиям месторождения. Поэтому можно предположить, что *T. sibiricus* является аборигенным микроорганизмом для нефтесодержащего горизонта, что предполагает его выживание с момента образования месторождения и адаптацию его метаболизма к условиям подземного резервуара. Результаты анализа генома *T. sibiricus* позволяют объяснить способность этой археи расти в такой экологической нише.

Геном *T. sibiricus* имеет длину 1.845.800 нт., содержит одну копию оперона 16S-23S рРНК и две копии гена 5S рРНК, расположенных удалено от 16S-23S оперона. Было найдено 46 генов тРНК для 20 аминокислот, распределенных по всей длине генома. В геноме идентифицировано 2061 потенциальных белок-кодирующих генов со средней длиной 815 нт, покрывающие 91% генома. Функции 1413 (69%) белков могут быть предсказаны с различной степенью достоверности и детализации в результате сравнения с базами данных. Функции остальных 648 (31%) предсказать по аминокислотной последовательности не представляется возможным, причем 181 ген является уникальным для *T. sibiricus*.

На рисунке 14 представлены диаграммы, иллюстрирующие количества белок-кодирующих генов *T. sibiricus*, гомологи которых присутствуют в геномах других представителей порядка *Thermococcales*. Полученные данные показывают, что около 70% (1480) белков имеют гомологов кодируемых в геномах *T. kodakaraensis* и *T. onnurineus* (Рис. 13). Из них 1024 белка имеются у всех трех известных представителей рода *Pyrococcus*. Можно предположить, что этот общий набор генов имелся у общего предка архей порядка *Thermococcales*. Около 387 белков *T. sibiricus* отсутствуют у

других представителей порядка Thermococcales, и хотя функции большинства из этих белков неизвестны, среди них есть ферменты, которые могут обеспечивать специфические особенности метаболизма *T. sibiricus* (см. ниже).

Первоначально, согласно микробиологическим данным, *T. sibiricus* был описан как анаэроб, сбраживающий белковые субстраты. В результате анализа генома *T. sibiricus* было найдены гены для 281 белка с сигнальными последовательностями на N-конце. Большинство из них были аннотированы как транспортные белки, протеазы, гликозил гидролазы, липазы/эстеразы. В результате геномного анализа были выявлены секретируемые ферменты, которые могут обеспечивать рост *T. sibiricus* на других субстратах, помимо белков. В ИНМИ РАН была экспериментально проверена предсказанная в результате анализа геномных данных способность *T. sibiricus* расти на других субстратах. В результате была подтверждена возможность роста на мальтозе, декстрани, целлюлозе, целлобиозе, агарозе, гексадекане, ацетоне, оливковом масле и глицерине.

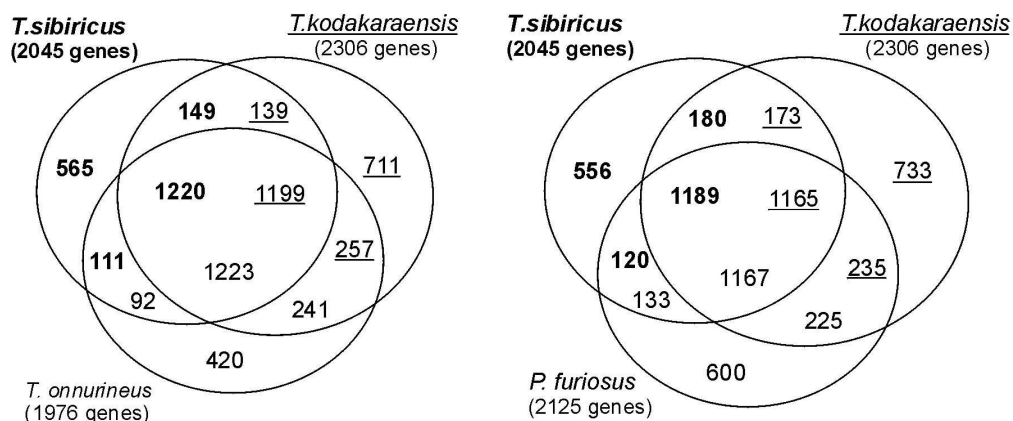


Рисунок 13. Сравнение наборов белок-кодирующих генов *T. sibiricus* и других представителей порядка Thermococcales.

Анализ геномных данных показал, что определенный участок генома *T. sibiricus* (нт 308742 – 328657, соответствует генам Tsib_0320-Tsib_0334), содержит набор генов, кодирующих ферменты, существенные для использования целлюлозы, ламинарина, агара и других β -связанных полисахаридов (Рис. 14). Этот «сахаролитический остров» кодирует ферменты для внеклеточного гидролиза этих субстратов, транспорта олигосахаридов в клетку и их последующего расщепления до мономеров: две внеклеточные и одну внутриклеточную эндо- β 1,4-глюканазы, целлобиоз-фосфорилазу, внеклеточную ламинариназу (эндо- β 1,3-глюканазу), β -галактозидазу, внеклеточную

β -агаразу, β -гликозидазу и транспортную систему ABC-типа для β -гликозидов. Ближайшие гомологи этих ферментов (за исключением β -агаразы) были найдены у бактерий рода *Thermotoga*, однако этот регион отсутствует у близких родственников *T. sibiricus* - *T. kodakaraensis* и *T. onnurineus* (Рис. 14). В *T. sibiricus* этот «сахаролитический остров» расположен в кластере генов рибосомных белков, который имеется и у *T. kodakaraensis* и *T. onnurineus*. Все эти данные свидетельствует о том, что «сахаролитический остров» был горизонтально перенесен в геном *T. sibiricus* из неизвестной термофильной бактерии, возможно, близкой к *Thermotoga*. Также нельзя исключить архейного происхождения этого «острова», поскольку предполагается, что значительная фракция генов *T. maritima* (более 20%) является результатом горизонтального переноса из геномов термофильных архей.

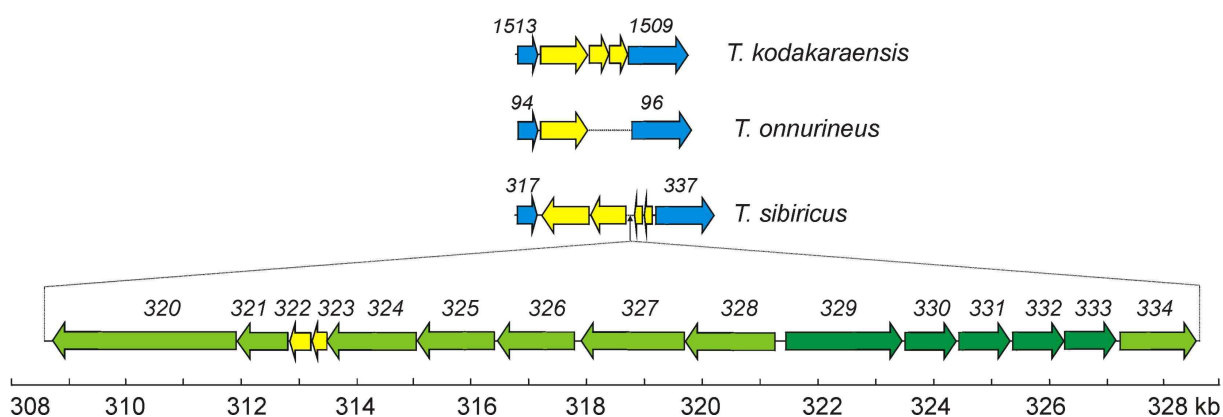


Рисунок 14. «Сахаролитический остров» в геноме *T. sibiricus*.

Гены, показанные синим цветом, встречаются во всех геномах *Thermococcus*. Гены не участвующие в деградации полисахаридов или с неизвестной функцией обозначены желтым. Гены, кодирующие сахаролитические ферменты, представлены светло зеленым; гены транспортной системы ABC-типа отмечены темно зеленым цветом.

Еще одним вероятным результатом горизонтального переноса генов у *Thermococcales* является имеющий размер около 16 тпн кластер генов деградации мальтозы и трегалозы, найденный в геномах *P. furiosus* и *Thermococcus litoralis*. Аналогичный локус имеется в геноме *T. sibiricus* (нт 340628 – 356664, соответствует генам Tsib_0356-Tsib_0369), причем порядок генов совпадает с порядком генов в геноме *P. furiosus*. Этот кластер генов кодирует предполагаемую трегалоз-синтазу, гликоген-расщепляющий фермент и гликозидазу. Он также содержит гены двух высоко аффинных транспортных систем ABC-типа для α -гликозидов.

В геноме *T. sibiricus* обнаружено 15 генов, кодирующих липазы/эстеразы, четыре из которых содержат сигнальные пептиды, что предполагает их внеклеточную активность. Один из этих генов, кодирующий липазу, Tsib_1424, был нами клонирован, экспрессирован в *E. coli* и полученный рекомбинантный белок был функционально

охарактеризован. Было установлено, что Tsib_1424 может гидролизовать производные п-нитрофенила с различной длиной цепи при температурах 50-70°C, т.е. проявляет липолитическую активность. В соответствии с этими данными было обнаружено, что *T. sibiricus* растет на оливковом масле, основным компонентом которого является триолеин. Это свойство крайне редко встречается у архей. Гидролиз триглицеридов липазами приводит к образованию глицерина и жирных кислот. *T. sibiricus* растет на глицерине, но не на длинноцепочечных жирных кислотах, что согласуется с отсутствием пути β -окисления жирных кислот. Следовательно, рост на оливковом масле является результатом утилизации глицерина, образующегося в результате гидролиза липидов.

Центральный метаболизм глюкозы в *T. sibiricus* может осуществляться с помощью ферментов пути Эмбдена-Мейергофа. Образовавшийся пируват может быть в дальнейшем окислен до CO_2 в результате совместного действия пируват:формат-лиаза и формат:водород-лиазного комплекса, а также может окисляться пируват:ферредоксин оксидоредуктазой.

T. sibiricus способен запасать энергию с помощью субстратного фосфорилирования и анаэробного дыхания. Основным механизмом сохранения энергии *T. sibiricus* является образование протонного градиента тремя мембранными комплексами, сходными с NADH:хинон оксидоредуктазой. Это два мембран-связанных гидрогеназных комплекса MBH1 и MBH2, а также мембран-связанный NADP^+ - восстанавливающий комплекс MBX, связанный с восстановлением серы. Повторное окисление образованного NADPH может осуществляться NADPH: S^0 оксидоредуктазой, которая переносит электроны на серу и образует H_2S . Донором электронов для MBH и MBX комплексов, вероятно, является восстановленный ферредоксин, который образуется в ферредоксин-зависимых реакциях в процессе окисления углеводов и белков. Функционирование H_2 -образующих гидрогеназ MBH типа подтверждается образованием H_2 во время роста *T. sibiricus* в отсутствие S_0 как акцептора электронов. В отсутствие серы *T. sibiricus*, вероятно, запасает энергию с помощью MBH1 и MBH2, а в присутствии серы - с помощью MBX-комплекса.

Сформированный за счет работы MBH1, MBH2, и MBX трансмембранный протонный градиент может быть использован АТФ синтазой для синтеза АТФ. В геноме *T. sibiricus* кодируется одна АТФ синтаза, транспортирующая ионы натрия. Отметим, что для роста *T. sibiricus* требуется довольно высокая соленость (оптимум при 20 г/л NaCl).

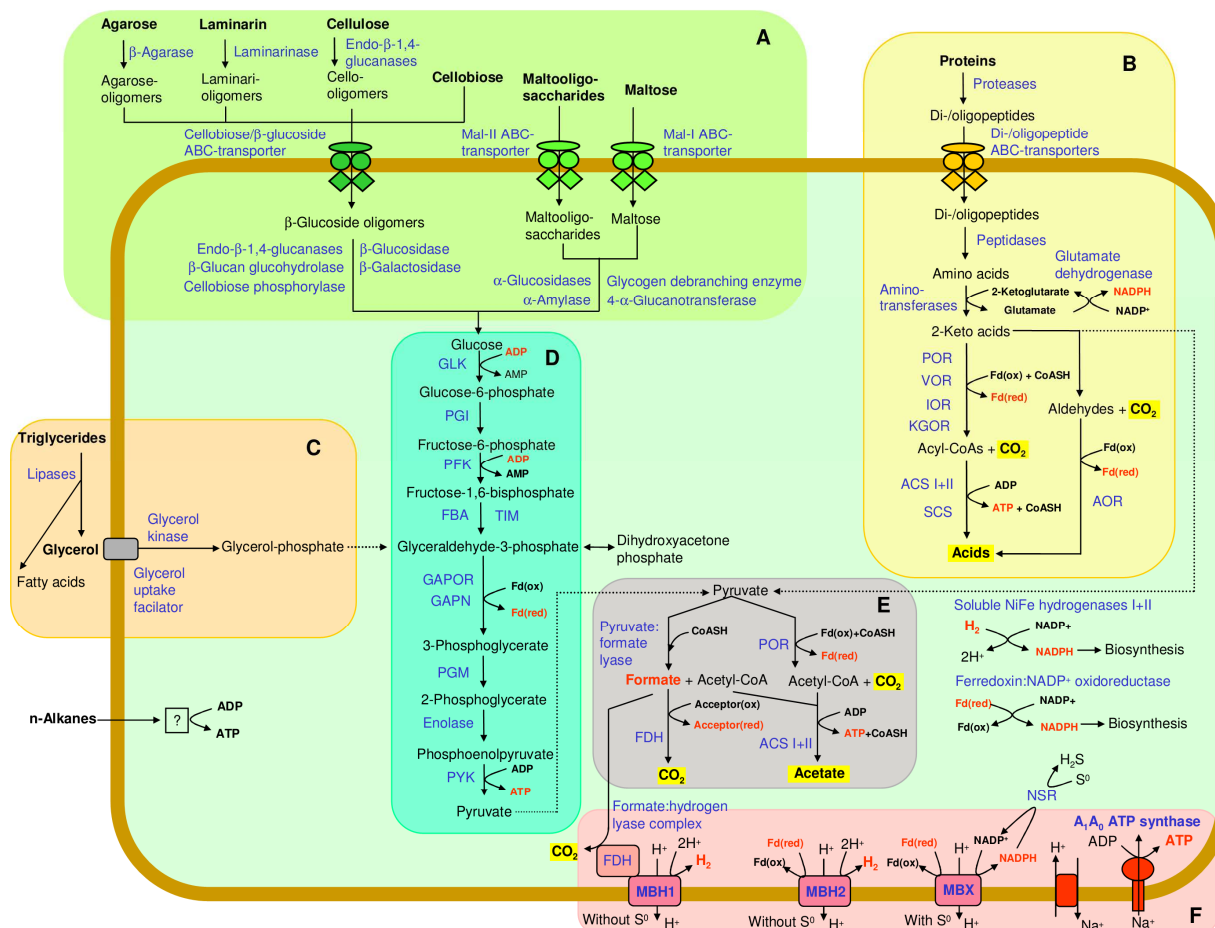


Рисунок 15. Основные пути метаболизма *T. sibiricus*.

(А) – утилизация сахаров, (В) – утилизация белков, (С) – гидролиз триглицеридов и утилизация глицерина (D) – гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа), (Е) – метаболизм пирувата, (F) формирование протонного градиента и синтез АТФ.

Различные пути метаболизма, идентифицированные на основании геномных данных, представлены на Рис. 15. Расшифровка генома создала основу для открытия новых физиологических особенностей данного микроорганизма, который изначально был описан как архея, способная расти только на белковых субстратах. В результате геномного анализа были выявлены ферменты, необходимые для деградации полисахаридов, а также системы транспорта сахаров в клетку. Способность *T. sibiricus* расти на олигомерных и полимерных углеводах с α -связями (мальтоза, декстран) и β -связями (целлобиоза, целлюлоза, ламинарин и агароза) была подтверждена экспериментально в ИНМИ РАН. Способность к росту на агарозе ранее не была описана для термофильных эуриархей. Гены ферментов гидролиза полисахаридов и транспорта сахаров в клетку локализованы в геноме в виде «островков», вероятно приобретенных в результате горизонтального переноса генов. Более того, *T. sibiricus*, по-видимому, использует неизвестный механизм деградации n-алканов, поскольку его

рост стимулируется гексадеканом, а известные пути анаэробного метаболизма алканов в геноме отсутствуют. Редким для термофильных архей является способность *T. sibiricus* к росту на липидах, что обеспечивается наличием у него липаз, а не только часто встречающихся у архей эстераз, расщепляющих лишь короткоцепочечные триглицериды.

Особенности метаболизма *T. sibiricus*, установленные в результате анализа его генома, подтверждают предположение об аборигенном происхождении этой археи из пластовых вод нефтяного резервуара Юрского периода и объясняют ее выживание в этой изолированной экологической нише со времени ее образования. Помимо пептидов и аминокислот, присутствующих в нефтяных резервуарах в следовых количествах, *T. sibiricus* может расти на полисахаридах и липидах, источником которых могут являться океанические осадки, из которых образовалась нефть Западной Сибири, а также на алканах сырой нефти.

6. Молекулярный анализ микробных сообществ термальных источников Камчатки

За последние 30 лет из термальных источников Камчатки было выделено большое число новых видов термофильных бактерий и архей, в том числе представляющих новые филогенетические линии высокого уровня и характеризующихся различными типами метаболизма (Заварзин, 2004; Лебединский и др., 2007). Некоторые из них были объектами исследования в рамках данной работы. По сравнению с такими экологическими нишами, как гейзеры Исландии и Йеллоустонского парка США, биоразнообразие термофильных микроорганизмов Камчатки исследовано хуже.

В кальдере Узон располагается большое количество разнообразных термальных источников, характеризующихся различными значениями температуры и pH, а также химическим составом. До начала нашей работы «глубокий» молекулярный анализ биразнообразия, основанный на пиросеквенировании фрагментов генов 16S рРНК, для термальных источников кальдеры Узон не проводился.

Целью этой части работы являлся анализ микробных сообществ нескольких термальных источников кальдеры вулкана Узон, отличающихся физико-химическими параметрами. В качестве объектов исследования были выбраны пять «кислых» (pH 3.7-5.6) источников «1805», «1810», «1807», «1818» и «1884», различающихся по температуре, а также два «нейтральных» (pH 6.3) источника «Заварзин» и «Бурлящий», имеющие температуры 55-58°C и 90-94°C, соответственно (Табл. 3). Пробы

биоматериала (воды и/или взвеси грунта) были отобраны в ходе экспедиций в кальдере Узон в 2007, 2008 и 2009 гг.

Важнейшими факторами, влияющими на состав и разнообразие сообществ термофильных микроорганизмов, по крайней мере, для наземных гидротермальных экологических ниш, являются температура и pH. Исследования микробных сообществ нейтральных и умеренно-щелочных источников Йеллоустонского парка США, показали, что бактерии во всех случаях составляют большую часть сообществ, а на долю архей обычно приходится не более нескольких процентов микроорганизмов. Большую часть гипертермофильных сообществ (обычно более 75%) составляли бактерии Aquificales, также встречались представители Thermotogales, Thermus-Deinococcus, и Thermodesulfobacteria. Суммарно, на эти группы приходилось более 90% всех микроорганизмов. В источниках, температура которых была ниже границы, при которой возможен фотосинтез (около 70°C) были широко распространены фототрофные бактерии, - Cyanobacteria и Chloroflexi. С ростом температуры биоразнообразие сообществ уменьшалось (Miller et al., 2009), и в наиболее высокотемпературных источниках ограничивалось всего несколькими группами бактерий. Например, в источнике West Thumb Pool (температура 89°C, pH 7.3) на долю бактерий рода *Hydrogenobacter* (филум Aquificales) приходилось 92% сообщества, а остальные 8% составляли *Thermotogales* (Spear et al. 2005).

Эти закономерности подтверждаются результатами сравнительного анализа микробных сообществ воды из двух «нейтральных» источников, - Бурлящего и Заварзина (Табл. 3). В высокотемпературном «Бурлящем» доминируют всего две группы хемолитоавтотрофных микроорганизмов, - Aquificales среди бактерий (69%) и Thermoproteales среди архей (91%), причем последняя группа представлена почти исключительно родом *Pyrobaculum*, который отсутствовал в менее горячих гидротермах. Эти кренархеи обладают разнообразными системами автотрофного и гетеротрофного метаболизма (раздел 3).

Имеющий более низкую температуру источник Заварзина содержит разнообразное по составу сообщество, в котором абсолютное большинство составляют термофильные бактерии (Табл. 3). Поскольку температура источника ниже верхней границы, при которой возможен фотосинтез (около 70°C), первичная продукция органического вещества может осуществляться как фотосинтетически, так и хемолитоавтотрофно, в результате окисления восстановленных субстратов вулканического происхождения, поставляемых геотермальным потоком.

Таблица 3. Состав микробных сообществ термальных источников.

	Заварзин	Бурлящий	1884	1805	1807	1810	1818
Температура	55-58°C	90-94°C	50°C	60°C	86 °C	89-91°C	80 °C
pH	6.3	6.2	4.0	3.7	5.6	4.1	3.5
Бактерии							
Aquificales	33.8	68.7	-	36.0	35.0	0.1	4.0
Deinococcus-Thermus	4.6	12.2	-	-	-	-	-
Defferribacteres	12.7	-	-	-	-	-	-
Thermotogae	6.6	-	-	-	-	-	1.0
Thermodesulfobacteria	7.6	0.9	-	-	-	-	-
Dictyoglomi	1.7	-	-	-	-	-	-
BRC1	2.0	-	-	-	-	-	-
Caldiserica	1.8	-	-	-	-	-	-
Verrucomicrobia	1.0	-	41.0	-	-	-	-
Alpha-proteobacteria	-	3.3	4.0	18.0	4.0	31.0	2.0
Beta-proteobacteria	6.9	-	1.0	1.0	2.0	2.0	7.0
Gamma-proteobacteria	11.5	0.1	24.0	14.0	33.0	14.0	1.0
Delta-proteobacteria	3.1	-	1.0	-	-	-	-
Actinobacteria	-	5.3	-	1.0	10.0	1.0	7.0
Bacteroidetes	-	0.4	-	-	-	-	-
Firmicutes	-	-	12.0	29.0	16.0	43.0	73.0
Nitrospira	-	-	1.0	-	-	-	-
другие	6.6	9.1	16.0	1.0	0.0	9.0	5.0
Археи							
Thermoplasmatales	42.0	-	39.0	2.0	0.6	2.0	-
Halobacteriales	-	-	-	1.0	0.3	5.0	7.8
Fervidicoccales	-	-	9.0	-	-	-	-
Acidilobales	-	-	1.0	13.0	25.7	3.0	64.0
Sulfolobales	-	-	1.0	55.0	33.4	46.0	18.8
Pyrobaculum	25.2	85.0	-	-	-	-	-
Thermoproteus	-	-	1.0	1.0	0.5	12.0	-
Vulcanisaeta	-	-	-	5.0	3.5	3.0	-
Other crenarchaeota	24.8	12.0	47.0	17.0	4.9	1.0	0.3
Korarchaeota	7.5	-	-	-	-	-	-
Nanoarchaeota	0.5	2.4	-	5.0	1.8	24.0	4.9
Thaumarchaeota	-	-	-	-	27.0	-	2.0
другие	-	0.6	2.0	1.0	2.3	4.0	2.2
Соотношение архей/бактерии	0.05	0.8	1.9	1.3	1.1	0.9	6.6

Показаны доли (%), которые соответствующие группы составляют среди бактерий или архей (доли менее 0.1% не показаны)

Фотосинтетическая продукция в источнике Заварзина осуществляется цианобактериальным матом, покрывающим дно, тогда как в воде концентрация фототрофов (цианобактерий и *Chloroflexi*) была низкой. Хемолитоавторофная продукция может осуществляться в аэробных или микроаэрофильных условиях за счет окисления серы и ее восстановленных соединений (*Sulfurihydrogenibium*, *Thiofaba*), а в анаэробной зоне путем окисления водорода с использованием в качестве акцептора электронов серы (при участии *Thermosulfidibacter*, *Caldimicrobium*, *Thiomonas*).

Образуемая фотосинтетиками и хемолитоавтотрофами, а также поступающая с поверхностными водами из окружающих низкотемпературных зон органика может использоваться разнообразными гетеротрофными микроорганизмами, представленными в основном анаэробами. В их число входят как бактерии, сбраживающие органические субстраты (*Fervidobacterium*, *Dictyoglomus* и др), так и осуществляющие ее полное окисление за счет использования в качестве акцептора электронов кислорода, серы или нитрата (*Thermus*, *Desulfurella*, *Calditerrivibrio*). В целом, источник Заварзина характеризуется высоким разнообразием обитающих в нем термофильных прокариот, при этом в отличие от Бурлящего не наблюдается абсолютного доминирования какой-либо одной группы микроорганизмов, например, *Aquificales*. Вероятно, это обусловлено как сравнительно умеренными значениями температуры и pH, так и разнообразием процессов первичной продукции органических веществ. Большое количество филогенетически разнообразных групп говорит о том, что это – хорошо сбалансированное сложное сообщество, где каждая группа занимает свою экологическую нишу.

Объектами большинства ранее опубликованных исследований были термальные источники с высокой температурой и нейтральным pH, в то время как «кислые» термальные источники встречаются реже и охарактеризованы хуже. Именно термоацидофильные экологические ниши могут быть источником совершенно неизвестных линий бактерий и архей. Мы охарактеризовали микробные сообщества четырех «кислых» источников с близким pH (от 3.5 до 4.1, - «1884», «1805», «1818» и «1810»), но различной температурой, а также микробное сообщество источника «1807», являющегося промежуточным между «кислыми» и «нейтральными» источниками (86°C, pH 5.6). Прежде всего, отметим, что во всех «кислых» источниках археи составляли значительную, а в некоторых – большую часть микробных сообществ (Табл. 3). С учетом того, что большинство бактерий в источниках «1805», «1818», «1807» и «1810», по-видимому, не являются эндогенными (см. ниже), можно сделать вывод о том, что именно археи доминируют в сообществах кислых гидротерм.

Микробное сообщество источника «1884», представлявшего собой искусственно вырытую заполненную грунтовой водой яму в месте выноса на поверхность углеводов термальными водами, имело необычный состав. В нем доминировали не бактерии, а археи, составлявшие более 70% всех микроорганизмов. Почти 90% архей относились к различным линиям, не имеющих культивируемых представителей. В отсутствие фотосинтеза первичная продукция органических веществ может обеспечиваться за счет использования неорганических субстратов вулканического происхождения, к которым относятся метан, водород и восстановленные соединения серы, присутствующие в источнике «1884». Первичную продукцию органических веществ могут обеспечивать две группы аэробных автотрофных бактерий: представители рода *Acidithiobacillus*, окисляющие неорганические соединения серы и/или металлы, а также термоацидофильные метанотрофы филума *Verrucomicrobia*. Эти группы бактерий используют в качестве источника углерода, соответственно, CO₂ и метан. Другие микроорганизмы сообщества являются органотрофами (*Fervidicoccales*, *Geobacillus*, *Actinobacteria*), или их функциональная роль не может быть предсказана исходя из таксономической принадлежности (некультивируемые линии бактерий и архей). Поэтому можно предположить, что в сообществе присутствуют неизвестные группы термофильных литоавтотрофов, либо это сообщество зависит от притока органических веществ извне, с дождевыми водами, поступающими из окружающих более холодных районов и/или от поступления углеводов из глубинных слоев с геотермальным потоком. Отметим, что «1884» - единственный из проанализированных источников, в котором значительную долю сообщества составляли кренархеи порядка *Fervidicoccales*. Вероятно, умеренно горячие кислые гидротермы являются оптимальными для роста этих органотрофных микроорганизмов, сбраживающих белковые субстраты (глава 2).

Особенностью кислых источников естественного происхождения («1805», «1818», «1807» и «1810») является значительная доля архей в сообществе. Более того, в обнаруженном составе бактериального компонента сообществ большинство бактерий относится к мезофильным, а не термофильным линиям. По-видимому, эти бактерии не являются эндогенными компонентами сообществ, а попали в источники извне, с дождевыми водами из окружающих низкотемпературных зон. К термофилам относятся *Aquificales*, которые составляли 36% бактерий в «1805», 35% - в «1807», 6% - в «1818», но отсутствовали в «1810». Термоацидофилы *Acidithiobacillus* были обнаружены в источниках «1805» (12% бактерий), «1807» (0.7%) и «1810» (18%). Еще одна группа термофилов, - *Thermotogae*, составляла около 1% бактерий в источнике «1818». В

пользу гипотезы об экзогенном происхождении «нетермофильных» бактерий в этих источниках свидетельствуют результаты сравнительного анализа бактерий из источников «1805» и «1810». Если исключить из рассмотрения Aquificales, относительные доли основных групп бактерий в источниках «1805» и «1810» окажутся практически одинаковыми, несмотря на большие различия в их температурах. Оба источника расположены вблизи друг от друга, что объясняет сходство состава «экзогенных» бактерий. Кроме того, в отличие от источника Заварзина, источники «1805» и «1810» (а также «1818» и «1807») представляют собой замкнутые бассейны, в которых отсутствует постоянный приток воды из подземных гидротермальных выходов, который мог бы постоянно обновлять воду источника, удаляя попавшие извне микроорганизмы. Таким образом, если сделанное нами предположение верно, археи должны составлять абсолютное большинство в «эндогенных» микробных сообществах кислых термальных источников.

В отличие от бактерий, археи микробных сообществ источников «1805», «1818», «1807» и «1810» относятся к известным линиям термофилов. Две группы термоацидофильных кренархей, Sulfolobales и Acidilobales, доминировали в этих сообществах, представляя более половины архей. Sulfolobales, - типичные обитатели кислых горячих источников, например, сульфатар. Именно эти в основном аэробные археи, окисляющие водород и серу, являются первичными продуцентами в термоацидофильных сообществах, но многие из них способны окислять и органические вещества в процессах аэробного и анаэробного дыхания. Напротив, культивируемые представители Acidilobales являются анаэробными гетеротрофами, способными осуществлять полное окисление органических веществ в процессах анаэробного дыхания в присутствии серы. Сосуществование этих двух групп в кислых термальных источниках может объяснять и интенсивный горизонтальный перенос генов между Sulfolobales и Acidilobales, выявленный в результате анализа генома *A. saccharovorans*.

Некоторые группы архей в значительных количествах были обнаружены только в отдельных источниках. Прежде всего, это представители филума Taumarchaeota, обнаруженные в источниках «1807» и «1818», в которых они составляют 27% и 2% архейного сообщества, соответственно. Это аэробные, окисляющие аммоний археи первоначально были найдены в морях и почвах, но впоследствии были обнаружены и в гидротермальных местообитаниях Йеллоустонского парка США. Оптимальными для них, видимо, являются высокотемпературные умеренно-кислые гидротермы, о чем свидетельствует сравнение долей Taumarchaeota в источниках «1807» (86°C, pH 5.6) и «1818» (80°C, pH 3.5). Еще одной группой архей, доля которых увеличивалась при

снижении pH и росте температуры, являются эуриархеи Halobacteriales, на долю которых приходилось 0.6% архейных последовательностей в «1805», 0.3% - в «1807», 5% в «1810» и 7% - в «1818». Вероятно, обнаруженные нами микроорганизмы образуют группу термоацидофильных галоархей.

7. Основные характеристики отдельных групп архей

Расшифровка и анализ геномов позволили не только охарактеризовать конкретные организмы, но и выявить ряд закономерностей и общих характеристик отдельных линий архей. Анализ геномов трех представителей (*V. moutnovskia*, *T. izoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860) наиболее древнего порядка гипертермофильных кренархей, Thermoproteales, показал, что они имеют сравнительно крупные геномы (1.8-2.4 млн. нт.) и обладают разнообразными системами автотрофного и гетеротрофного метаболизма. Эти микроорганизмы способны гидролизовать сложные белковые субстраты и полисахариды, и не только сбраживать органические вещества, но и осуществлять их полное окисление в процессах анаэробного дыхания. В их геномах кодируются ферменты окислительного цикла трикарбоновых кислот и разнообразные цитоплазматические и мембран-связанные оксидоредуктазы, позволяющих этим археям использовать различные акцепторы электронов. Набор этих оксидоредуктаз отличается у разных представителей Thermoproteales. По-видимому, в процессе эволюции Thermoproteales происходили потери отдельных оксидоредуктаз и их приобретение в процессах горизонтального переноса и дупликации генов с последующей специализацией ферментов. Широкий спектр путей метаболизма у Thermoproteales обуславливает их распространение в термальных источниках с различными физико-химическими характеристиками. Наиболее многочисленными они являются в нейтральном источнике с наиболее высокой температурой, «Бурлящем». По-видимому, Thermoproteales являются не только первичными продуцентами органических веществ благодаря своей способности к литоавтотрофному росту, но и осуществляют их полное окисление в процессах анаэробного дыхания.

Другой тип метаболизма характерен для *T. carboxydotrophus*, - представителя рода *Thermofilum*, образующего базовую ветвь порядка Thermoproteales. Анализ генома *T. carboxydotrophus* показывает, что эта архея специфически адаптирована к использованию низкомолекулярных продуктов жизнедеятельности других микроорганизмов, присутствующих в среде. У *T. carboxydotrophus* потеряны многие биосинтетические пути, что характерно для облигатных паразитов. Вероятно, более простой набор путей метаболизма у представителей рода *Thermofilum* по сравнению с

другими Thermoproteales обусловлен не эволюционной древностью *Thermofilum*, а утратой этих путей в результате вторичной адаптации к получению необходимых метаболитов в «готовом» виде из содержащей разнообразную органику среды термального источника.

Гораздо более простыми по сравнению с Thermoproteales путями метаболизма обладают проанализированные нами представители порядка Desulfurococcales, - *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus*. Они имеют одни из наименьших геномов (1.3-1.4 млн. нт), среди свободноживущих микроорганизмов и обладают специализированным метаболизмом, осуществляя гидролиз высокополимерных белковых субстратов и полисахаридов. Анализ генома *F. fontis*, представителя нового порядка Fervidicoccales, показал, что он характеризуется узкоспециализированным метаболизмом, связанным с гидролизом и сбраживанием только белковых субстратов. Видимо, Fervidicoccales представляют собой имеющую общее происхождение с Desulfurococcales линию, которая эволюционировала по пути специализации к росту на сложных белковых субстратах с потерей «ненужных» генов.

В отличие от *F. fontis*, термоацидофильная кренархея *A. saccharovorans* не только филогенетически относится к новому порядку Acidilobales, но и обладает специфическими особенностями метаболизма. Как и Thermoproteales, *A. saccharovorans* обладает сразу двумя путями метаболизма глюкозы - Энтнера-Дудорова и Эмбдена-Мейергофа. Другой общей чертой *A. saccharovorans* и Thermoproteales является наличие цикла трикарбоновых кислот, который обеспечивает полное окисление органических веществ в анаэробных условиях в присутствии внешних акцепторов электронов. Редким свойством, не описанным у Desulfurococcales, но также характерным для Thermoproteales, является наличие цикла бета-окисления жирных кислот. Однако, у *A. saccharovorans* отсутствует характерный для Thermoproteales широкий спектр терминальных оксидаз, а в качестве акцептора электронов могут использоваться только сера или тиосульфат. Представители Acidilobales могут завершать анаэробный цикл углерода, не только расщепляя сложные полимерные субстраты, но и осуществляя минерализацию органических веществ в процессах анаэробного дыхания. В отличие от мезофильных микробных сообществ, в которых процесс анаэробного разложения органических субстратов состоит из нескольких стадий, осуществляемых разными группами микроорганизмов (гидролиз, ферментация, синтрофные реакции и конечное окисление), в высокотемпературных условиях этот процесс может быть осуществлен всего одной группой микроорганизмов, Thermoproteales – в нейтральных горячих источниках и Acidilobales – в кислых.

Особенности метаболизма *T. sibiricus*, установленные в результате анализа его генома, подтверждают предположение об аборигенном происхождении этой археи из нефтяного резервуара Юрского периода и объясняют ее выживание в этой изолированной экологической нише со времени ее образования. В результате анализа генома были выявлены ферменты, необходимые для деградации полисахаридов и липидов, источником которых могут являться океанические осадки (водоросли как источник агара, ламинарина и целлюлозы), из которых образовалась нефть, а также системы транспорта сахаров в клетку. Эти гены локализованы в виде «островков», вероятно приобретенных в результате горизонтального переноса.

ВЫВОДЫ

1. Определены полные структуры геномов термофильных архей *Acidolobus saccharovorans*, *Fervidicoccus fontis*, *Desulfurococcus kamchatkensis*, *Thermogladius cellulolyticus*, *Vulcanisaeta moutnovskia*, *Thermoproteus uzoniensis*, *Pyrobaculum* sp. 1860, *Thermofilum carboxydophilus*, и *Thermococcus sibiricus*.
2. Анализ геномов кренархей *Desulfurococcus kamchatkensis* и *Thermogladius cellulolyticus*, представляющих порядок Desulfurococcales, показал, что эти микроорганизмы обладают комплексом ферментов, которые могут обеспечивать гидролиз белковых субстратов и некоторых полисахаридов. В геномах *D. kamchatkensis* и *T. cellulolyticus* отсутствуют гены ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот, что ограничивает возможности метаболизма этих архей брожением и не позволяет им полностью окислять органические субстраты.
3. Анализ генома кренархеи *Fervidicoccus fontis*, представителя порядка Fervidococcales, показал, что эта архея обладает специализированным типом метаболизма, осуществляя гидролиз высокополимерных белковых субстратов и их сбраживание с образованием ацетата и водорода.
4. Анализ генома кренархеи *Acidolobus saccharovorans* подтвердил правомерность выделения этого микроорганизма в новый порядок Acidilobales филума Crenarchaeota. В геноме были выявлены пути Эмбдена-Мейергофа и Энтнера-Дудорова метаболизма глюкозы и путь бета-окисления жирных кислот. Наличие окислительного цикла трикарбоновых кислот и ферментативных комплексов, осуществляющих восстановление серы, позволяет *Acidolobus saccharovorans* помимо сбраживания органических субстратов осуществлять их полное окисление в процессах анаэробного дыхания в присутствии внешних акцепторов электронов. Репликация хромосомы А.

saccharovorans иницируется с двух сайтов инициации репликации и является двунаправленной.

5. Бета-гликозидаза ASAC1390 из кренархеи *Acidolobus saccharovorans* является многофункциональным ферментом, обладающим бета-гликозидазной, бета-галактозидазной, бета-ксилозидазной и бета-маннозидазной активностями.

6. Анализ геномов кренархей *Vulcanisaeta moutnovskia*, *Thermoproteus uzoniensis* и *Pyrobaculum* sp. 1860 порядка *Thermoproteales* показал, что эти микроорганизмы могут осуществлять окисление органических субстратов в присутствии внешних акцепторов электронов и автотрофно фиксировать CO₂. Геномы этих архей кодируют пути Эмбдена-Мейергофа и Энтнера-Дудорова метаболизма глюкозы. Геномные данные указывают на способность *Pyrobaculum* sp. 1860 использовать широкий спектр акцепторов электронов, в том числе оксид железа и нитрат.

7. Анализ генома кренархеи *Thermofilum carboxydophilus* порядка *Thermoproteales* показал, что эта архея адаптирована к использованию низкомолекулярных продуктов жизнедеятельности других микроорганизмов. В её геноме отсутствуют гены ферментов путей биосинтеза многих метаболитов. Способность *Thermofilum carboxydophilus* к росту на CO с образованием H₂ и CO₂ обеспечивается мембран-связанной СО-дегидрогеназой, кластер генов которой получен путем горизонтального переноса.

8. В результате анализа генома термофильной эуриархеи *Thermococcus sibiricus*, выделенной из пластовых вод нефтяного резервуара в Западной Сибири, были выявлены пути метаболизма, с помощью которых эта архея может использовать различные органические субстраты, включая белки, липиды и полисахариды. Гены ферментов гидролиза полисахаридов и транспорта сахаров в клетку локализованы в геноме в виде кластеров, приобретенных в результате горизонтального переноса. Особенности метаболизма *T. sibiricus* подтверждают предположение об аборигенном происхождении этой археи из пластовых вод нефтяного резервуара Юрского периода и объясняют ее выживание в этой изолированной экологической нише со времени ее образования.

9. Методом пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК определены составы микробных сообществ семи термальных источников кальдеры вулкана Узон, различающихся температурой и рН воды. Наибольшее разнообразие автотрофных и гетеротрофных микроорганизмов при отсутствии доминирования какой-либо одной группы обнаружено в воде источника Заварзина, имеющего нейтральный рН и умеренно-высокую температуру воды (55-58°C). В высокотемпературном нейтральном источнике «Бурлящий» (90-94°C, рН 6.2) доминируют две группы

хемолитоавтотрофных микроорганизмов, - бактерии Aquificales и археи *Pyrobaculum*. В источниках с низким pH археи составляют большинство микроорганизмов. В источнике с температурой около 50°C преобладают различные линии архей, не имеющие культивируемых представителей, в кислых источниках с температурой 60-90°C - ацидофильные кренархеи порядков Sulfolobales и Acidilobales.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Скрыбин К.Г., Марданов А.В., Кубланов И.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Определение полной нуклеотидной последовательности генома гипертермофильного микроорганизма. // Доклады Академии наук. 2008 Т. 421. С. 204-206.
2. Смагин В.А., Марданов А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Выделение и характеристика новой термостабильной ДНК-лигазы из архей рода *Thermococcus*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 45. С. 523-528.
3. Ravin N.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kublanov I.V., Kolganova T.V., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G. Complete genome sequence of the anaerobic, protein-degrading hyperthermophilic crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis*. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 2371-2379.
4. Kublanov I.V., Bidjjeva S.Kh., Mardanov A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Desulfurococcus kamchatkensis* sp. nov., a novel hyperthermophilic protein-degrading archaeon isolated from a Kamchatka hot spring. // Int. J. Syst. Evol. Micr.. 2009. V. 59. P.1743-1747.
5. Mardanov A.V., Ravin N.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a Siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. // Appl. Environ. Microbiol.. 2009. V. 75. P. 4580-4588.
6. Stekhanova T.N., Mardanov A.V., Bezsudnova E.Y., Gumerov V.M., Ravin N.V., Skryabin K.G., Popov V.O. Characterization of a thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 4096-4098.
7. Lyashenko A.V., Bezsudnova E.Y., Gumerov V.M., Lashkov A.A., Mardanov A.V., Mikhailov A.M., Popov V.O., Ravin N.V., Skryabin K.G., Stekhanova T.N., Kovalchuk M.V. Expression, purification and crystallization of a thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from archaeon *Thermococcus sibiricus*. // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 2010. V. 66. P. 655-657.

8. Марданов А.В., Гумеров В.М., Белецкий А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Характеристика биоразнообразия термофильного микробного сообщества методом параллельного пиросеквенирования. // Доклады Академии наук. 2010. Т. 432. С. 544-548.
9. Mardanov A.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. The genome sequence of the crenarchaeon *Acidilobus saccharovorans* supports a new order, Acidilobales, and suggests an important ecological role in terrestrial acidic hot springs. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 5652–5657.
10. Perevalova A.A., Bidzhieva S.K., Kublanov I.V., Hinrichs K.U., Liu X.L., Mardanov A.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Fervidicoccus fontis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic thermophilic crenarchaeote from hot springs in Kamchatka, and proposal of Fervidicoccaceae fam. nov. and Fervidicoccales ord. nov. // Int J Syst Evol Microbiol. 2010. V. 60. P. 2082-2088.
11. Gumerov V.M., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Complete genome sequence of “*Vulcanisaeta moutnovskia*” strain 768-28, a novel member of the hyperthermophilic crenarchaeal genus *Vulcanisaeta*. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 2355-2356.
12. Гумеров В.М., Марданов А.В., Белецкий А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Молекулярный анализ биоразнообразия микроорганизмов в источнике Заварзина, кальдера Узон, Камчатка // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 258-265.
13. Mardanov A.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Perevalova A.A., Karpov G.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. Uncultured archaea dominate in the thermal groundwater of Uzon Caldera, Kamchatka. // Extremophiles. 2011. V. 15(3). P. 365-372.
14. Mardanov A.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Complete genome sequence of the thermoacidophilic crenarchaeon *Thermoproteus uzoniensis* 768-20. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 3156-3157.
15. Голубев С.С., Кононогов С.А., Кудяров Ю.А., Марданов А.В., Николаева П.Ю., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Метрологическое обеспечение секвенирования молекул ДНК. // Измерительная техника. 2012. Т. 3. С. 64-68.
16. Слуцкая Э.С., Безсуднова Е.Ю., Марданов А.В., Гумеров В.М., Ракитина Т.В., Попов В.О., Липкин В.М. Характеристика новой М42 аминопептидазы из кренархеи *Desulfurococcus kamchatkensis*. // Доклады Академии наук. 2012. Т. 442. С. 551-554.

17. Гумеров В.М., Марданов А.В., Колосов П.М., Равин Н.В. Выделение и характеристика липазы из термоалкалофильной бактерии *Thermosyntropha lipolytica*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. С. 376-382.
18. Слуцкая Э.С., Безсуднова Е.Ю., Марданов А.В., Сафенкова И.В., Клейменов С.Ю., Чеботарева Н.А., Гумеров В.М., Равин Н.В., Скрябин К.Г., Попов В.О. Fe-зависимая супероксиддисмутаза из новой термоацидофильной кренархеи *Acidilobus saccharovorans*: от гена до активного фермента. // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 1681-1692.
19. Mardanov A.V., Gumerov V.M., Slobodkina G.B., Beletsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Complete genome sequence of strain 1860, a crenarchaeon of the genus *Pyrobaculum* able to grow with various electron acceptors. // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 727-728.
20. Mardanov A.V., Kochetkova T.V., Beletsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Complete genome sequence of the hyperthermophilic cellulolytic crenarchaeon "*Thermogladius cellulolyticus*" 1633 // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 4446-4447.
21. Марданов А.В., Равин Н.В. Роль геномики в исследовании разнообразия и эволюции архей. // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 965-980.

Патенты

22. Смагин В.А., Марданов А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. (2010) Термостабильная ДНК-лигаза из археи рода *Thermococcus*, способ ее получения и нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая эту ДНК-лигазу. Патент РФ № 2405823 от 10.12.2010г.
23. Смагин В.А., Марданов А.В., Прокофьева М.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. (2011) Термостабильная ДНК-лигаза из археи рода *Acidilobus*. Патент РФ № 2413767 от 10.03.2011г.
24. Безсуднова Е.Ю., Бонч-Осмоловская Е.А., Гумеров В.М., Марданов А.В., Попов В.О., Равин Н.В., Скрябин К.Г., Стеханова Т.Н. (2011) Термостабильная алкогольдегидрогеназа из археи *Thermococcus sibiricus*. Патент РФ № 2413766 от 10.03.2011г.

Избранные материалы конференций

25. Mardanov A.V., Smagin V.A., E.A. Bonch-Osmolovskaya, Ravin N.V. Isolation of new thermostable DNA ligase from the archaeon *Thermococcus*. Abstracts of the II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007), Seville, Spain. 2007. P. 21.

26. Mardanov, A., Bonch-Osmolovskaya, E., Ravin, N. Molecular analysis of microbial communities from hydrothermal environments of Kamchatka volcanic area in Russia. Abstracts of the workshop on metabolomics and environmental biotechnology, Palma de Mallorca, Spain. 2008. P13.
27. Gumerov V.M., Mardanov A.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. (2009) Microbial community of high-temperature spring "Burluashy" of Uzon Caldera, Kamchatka peninsula. Abstracts of the 10th International Symposium on Bacterial Genetics and Ecology BAGECO-10, Uppsala, Sweden. 2010. P.210.
28. Mardanov A.V., Gumerov V.M., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. (2010) Molecular analysis of microbial communities of hydrothermal environments of Uzon Caldera. Abstracts of the International Workshop "Biodiversity, molecular biology and biogeochemistry of thermophiles", Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia. 2010. P. 18.
29. Ravin N.V., Mardanov A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G. Complete genome sequences of ten hyperthermophilic archaea reveal their metabolic capabilities and possible ecological roles. Abstracts of the international conference "Extremophiles 2010", Azores, Portugal. 2010. P. 185.
30. Mardanov A.V., Gumerov V.M., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. Microbial diversity of thermal springs of Uzon Caldera, Kamchatka, as revealed by 454 pyrosequencing. Abstracts of the international conference "Extremophiles 2010", Azores, Portugal. 2010. P. 250.
31. Марданов А.В., Равин Н.В. Расшифровка геномов термофильных архей: фундаментальные и прикладные аспекты. Тезисы I международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Москва, Россия. 2010. С. 86.
32. Mardanov A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. (2011) Complete genome sequences of new crenarchaeones isolated from hot springs of Kamchatka revealed their metabolic potentials and possible ecological roles. Abstracts of the 11th International Symposium on Bacterial Genetics and Ecology BAGECO-11, Corfu, Greece. 2011. P. 58.
33. Марданов А.В., Кадников В.В., Равин Н.В. Геномика и метагеномика экстремофильных микроорганизмов. Тезисы II международной научно-практической конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика", Новосибирск, Россия. 2011. С. 64.
34. Mardanov A.V., Kadnikov V.V., Gumerov V.M., Ravin N.V. Advances in genomic and metagenomic studies of extremophilic microorganisms. Abstracts of the Eight

international conference on bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB'12), Новосибирск, Россия. 2012. P. 198.

35. Mardanov A.V., Kadnikov V.V., Ravin N.V. The impact of genomics on research in diversity and evolution of thermophilic microorganisms. Тезисы 3-й Московской международной конференции «Молекулярная филогенетика MolPhy-3», Москва, Россия. 2012. P. 21.

36. Mardanov A.V., Kadnikov V.V., Ravin N.V. Metagenomic analysis of microbial community inhabiting the deep subsurface thermal waters in Western Siberia. Abstracts of the 14th International Symposium on Microbial Ecology - ISME14, Copenhagen, Denmark. 2012. P. 905.