

Заюлина Ксения Сергеевна

ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫЕ АРХЕИ КАК ИСТОЧНИК НОВЫХ
ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ И ТЕРМОАКТИВНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ

1.5.11 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: **Кубланов Илья Валерьевич,**
кандидат биологических наук, главный научный
сотрудник, заведующий лабораторией метаболизма
экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН

Официальные оппоненты: **Грабович Маргарита Юрьевна,**
доктор биологических наук, профессор, старший
научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии
клетки, Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Воронежский государственный университет»
Тутукина Мария Николаевна,
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник, Центр молекулярной и клеточной биологии,
Автономная некоммерческая образовательная
организация высшего образования «Сколковский
институт науки и технологий».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской
академии наук, ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный
центр биологических исследований РАН»

Защита диссертации состоится 30 июня 2022 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: <https://www.fbras.ru/dissertacionnyj-sovet-po-mikrobiologii.html>

Автореферат разослан «____» _____ 2022 года

**Ученый секретарь
диссертационного совета**

доктор биологических наук,
Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Гипертермофильными считаются микроорганизмы, оптимум роста которых лежит выше 80°C (Stetter, 1996). Актуальность изучения гипертермофильных архей обусловлена присущими им модификациями и новыми вариантами метаболических путей, а также высокой стабильностью их биомолекул. Белки из гипертермофильных архей являются устойчивыми к высоким температурам, и зачастую к давлению, экстремальным значениям pH и солености, присутствию растворителей, детергентов и тяжелых металлов, что подразумевает высокий потенциал этих ферментов в качестве инструмента в прикладных процессах биотрансформации, протекающих в экстремальных условиях (Bouzas et al., 2006).

Все это верно и для гликозидаз, одного из самых востребованных во многих отраслях промышленности классов гидролитических ферментов. Один из наиболее прямых и эффективных путей поиска и получения новых высокостабильных гликозидаз с заданными свойствами – выделение накопительных и чистых культур гипертермофильных микроорганизмов, растущих на полисахаридах, с последующим применением омиксных подходов.

Однако выделение новых гипертермофильных архей, способных разлагать полисахариды – крайне нетривиальная задача. Это связано с трудностями культивирования всех гипертермофильных архей: созданием и поддержанием необходимых анаэробных условий, подбором физико-химических параметров среды (pH, высокой температуры), потребностью в особых факторах роста (витаминах, микроэлементах, экстрактах других микроорганизмов), подбором твердых сред и культивированием на них. Для гипертермофильных архей, использующих полисахариды, ко всему этому добавляются сложности, связанные с ригидностью и нерастворимостью субстратов. Это объясняет тот факт, что большинство культивируемых гетеротрофных гипертермофильных архей (представленных в трех филумах: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* и *Thaumarchaeota* (Kato et al., 2021)) растут на аминокислотах, пептидах и простых сахарах и только представители 12 родов способны к росту на полисахаридах, что также на порядки меньше, чем у бактерий (Medina-Chavez & Travisano, 2022). Более того, эти немногочисленные археи в основном используют субстраты с α -гликозидными связями (крахмал, амилоза, декстрины, пуллулан), в то время как на полисахаридах с β -(1-4) гликозидными связями (целлюлоза, ксилан, различные маннаны и бета-глюканы) способны расти лишь единицы. Все сказанное выше делает актуальным поиск и выделение новых гипертермофильных архей с такими свойствами.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является выделение и изучение гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах, и характеристика их новых гликозидаз.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Выделить из горячих источников чистые культуры гипертермофильных архей, способных расти на различных полисахаридах.
2. Охарактеризовать фенотипы выделенных штаммов, в первую очередь спектр используемых ими углеводов, включая полисахариды.

3. Определить последовательности геномов выделенных гипертермофильных архей, выявить гены, кодирующие ферменты деструкции полисахаридов, а также вовлеченные в центральный метаболизм сахаров.
4. Выделить и охарактеризовать рекомбинантные ферменты, участвующие в гидролизе полисахаридов у данных гипертермофильных архей.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Выделен и охарактеризован ряд гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах: *Thermosphaera* sp. штаммы 3507, 3507L и 3507L2, растущие на ксилане, лихенане, ксилоглюкане и крахмале; представитель нового рода *Infirmifilum lucidum* штамм 3507LT, способный утилизировать лихенан, ксилоглюкан и крахмал. Помимо гидролитических свойств *I. lucidum* оказался представителем глубокой линии кренархеот, исследование филогенетического положения которой привело к предложению нового порядка *Thermofilales*. Охарактеризован штамм *Thermococcus* sp. 2319x1 являющийся первой археей, растущей на ксилоглюкане и первой эвриархеотой, растущей на ксилане. Впервые для представителей рода *Pyrobaculum* показано потребление сахаров в процессе анаэробного дыхания *P. arsenaticum* штаммом 2319x2. С помощью сравнительно-геномного и протеомного подходов у гипертермофильной кренархеоты *Thermofilum adornatum* 1910b обнаружены четыре гликозидазы, участвующие в разложении целлюлозы, две из которых не относятся ни к одному из известных семейств гликозидаз, и вообще не имеют родственников с предсказанной функцией. Две другие относятся к семействам GH1 и GH3 среди которых нет известных эндоглюканаз. Рекомбинантные гликозидазы, кодируемые этими четырьмя генами, охарактеризованы. Каждая из них обладала своими особенностями, а их совместное действие обуславливает способность *T. adornatum* эффективно разлагать целлюлозу и другие полисахариды и расти на продуктах их гидролиза. Выделена и охарактеризована мультидоменная гликозидаза (МДГ) эвриархеоты *Thermococcus* sp. 2319x1, обладающая уникальной доменной организацией и широкой субстратной специфичностью. Помимо целой МДГ выделены и охарактеризованы ее отдельные каталитические домены, которые также как и отдельные гликозидазы *T. adornatum* обладают своими особенностями и дополняют друг друга в процессе гидролиза полисахаридов.

Практическая значимость работы

Технологические процессы переработки растительного сырья нередко проводятся в жестких условиях среды, а именно при высоких температурах, концентрациях солей или растворителей, экстремальных значениях pH и др. Это делает затруднительным и экономически невыгодным использование ферментов из мезофильных и нейтрофильных микроорганизмов ввиду их невысокой стабильности (Krüger et al., 2018, Pramanik et al., 2021). Альтернативой им могут быть ферменты из экстремофильных прокариот (в частности, гипертермофилов), активные и стабильные в различных экстремальных условиях. В данной работе показано, что исследуемые каталитические домены МДГ *Thermococcus* sp. 2319x1, относящиеся к гликозидазам из семейства GH12, представляют собой термостабильные ферменты с продолжительным временем жизни при высоких температурах. Особенно стоит отметить белок GH12-1, время полужизни которого достигает 11 суток при 90°C. Показано, что эти ферменты высокоактивны и устойчивы к наличию в реакционной

смеси детергентов, что делает их привлекательными объектами для промышленного применения, например, для гидролиза целлюлозы.

Личный вклад соискателя

Соискатель лично принимал участие в проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на X Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2015), международной конференции «Thermophiles» (Сантьяго, Чили, 2015), V съезде биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016), молодежной научно-практической школе «NorthBiotechYoung 2017» (Архангельск, Россия, 2017), 1-м Российском Микробиологическом Конгрессе (Пушино, Россия, 2017), международной конференции «Bioinformatics: from algorithms to applications» (Санкт-Петербург, Россия, 2018), 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019 (Глазго, Великобритания, 2019), 2-ом Российском Микробиологическом Конгрессе (Саранск, Россия, 2019) и 3-ем Российском Микробиологическом Конгрессе (Псков, Россия, 2021).

Публикации.

По материалам работы опубликовано 17 печатных работ, из них: 6 экспериментальных статей и 11 тезисов конференций.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста и включает 57 рисунков и 26 таблиц. Работа состоит из введения, 7-ти глав (обзор литературы, материалы и методы, экспериментальная часть – результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 266 наименований.

Место проведения работы и благодарности

Работа выполнялась в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот, отдела биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2015 по 2022 годы.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю заведующему лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот к.б.н. Кубланову И.В. за предоставленную тему, внимание и помощь в планировании экспериментов, при написании статей, тезисов конференций и диссертации. Автор благодарен Бонч-Осмоловской Е.А. за помощь в работе, решении различных трудностей и теплое отношение. Автор также крайне признателен всем сотрудникам лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот за поддержку и прекрасные дружеские отношения в коллективе, а также за помощь при выполнении различных этапов работы. Работа выполнена в рамках и при поддержке проектов РНФ №18-44-04024 «Метаболизм углеводов у гипертермофильных архей: новые подходы, ферменты и метаболические пути», РФФИ №21-54-10006_КоА «Новые термостабильные гидролазы архей Курило-Камчатского региона», "Хотзаймс - систематический скрининг новых гидролаз в гидротермальных местообитаниях" ("HotZyme - Systematic screening for novel hydrolases from hot environments"). Автор выражает благодарность всем участникам этих проектов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами исследования были накопительные и чистые культуры гипертермофильных архей, выделенные из горячих источников в ходе этой работы. Также в работе были задействованы гипертермофильные археи из коллекции лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот: *Thermococcus* sp. 2319x1, *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 и *Thermofilum adornatum* 1910b.

Отбор проб. Пробы из горячих источников Камчатки, Чукотки, республики Тыва (Россия) и Чили (Южная Америка) отбирали в 50 мл флаконы или 15 мл пробирки Хангейта с газонепроницаемыми пробками, герметично закрывали и транспортировали в лабораторию без охлаждения. Во время отбора измеряли температуру, Eh и pH в источниках.

Приготовление сред. Для получения и культивирования накопительных и чистых культур использовали различные анаэробные среды, имитирующие пресную и морскую воду, разливали в пробирки Хангейта, или в 50 мл/100 мл флаконы и стерилизовали при 1 АТИ. В качестве субстратов вносили в пробирки полисахариды до стерилизации (0.2%), как и некоторые акцепторы - элементную серу и ферригидрит. Растворы ди- и моносахаридов и некоторые белковые субстраты, как и растворимые акцепторы стерильно вносили в среду после её стерилизации из стерильных стоковых растворов, как и фильтрованные растворы клеточных экстрактов архей. В каждую пробирку или флакон с помощью стерильного шприца вносили 1 V посевного материала к 100 V среды.

Контроль роста в различных условиях. Рост штаммов определяли с помощью прямого подсчета клеток с использованием светового фазово-контрастного микроскопов Leica DM500 и Olympus CX41.

Получение накопительных и чистых культур. Для получения *in situ* накопительных культур в стеклянные флаконы объемом 50 мл с навесками полисахаридов: 30 – 40 мг целлюлозы или ксилана, трагаканта, хитина добавляли осадки и воду из источников, после чего их закрывали пробками, и полностью погружали в те же источники на 5 суток. В лаборатории, пробы и *in situ* накопительные культуры засекали на анаэробные синтетические среды. Из накопительных культур, в которых был обнаружен рост, делали три последовательных пересева в свежую среду. Для получения чистых культур использовали метод десятикратных предельных разведений или метод лазерного сортирования (Kochetkova et al., 2019). Из накопительных и чистых культур выделяли тотальную ДНК для последующего ДГГЭ или NGS секвенирования фрагментов V4 генов 16S рРНК, по результатам которых определяли представленность и разнообразие в них архей.

Измерение продуктов метаболизма. Концентрацию сероводорода измеряли колориметрическим методом (Trueper & Schlegel, 1964). Концентрацию газов H₂, O₂, N₂ и CO₂ измеряли с помощью газового хроматографа '3700' (ZIOC RAS., Россия). Содержание летучих жирных кислот измеряли на хроматографе Chromatech-Crystal 5000.2.

Выделение ДНК. Выделение ДНК из накопительных и чистых культур проводили с использованием фенол-хлороформной экстракции (Park, 2007; Gavrilov et al., 2016).

Секвенирование. Секвенирование геномов проводили при помощи системы высокопараллельного секвенирования Illumina Miseq (США). Сборку геномов *de novo* осуществляли с использованием программ SPADES 3.10.0 и Unicycler v 0.4.8 (Wick et al., 2017).

Анализ геномов. Первичную аннотацию полученных последовательностей геномов проводили с использованием сервисов порталов RAST и/или IMG.

Для более точного определения функций белков использовали различные базы данных UniProt, Pfam 27.0, COG, для поиска генов, кодирующих CAZymes (ферментов, вовлеченные в деградацию углеводов), применяли сервис dbCAN. Предсказание локализации белка проводили с использованием нескольких серверов SignalP 4.1, TMHMM 2.0 и SecretomeP. Предсказание путей катаболизма углеводов осуществляли с помощью метаболических карт MetaCyc, KEGG. Построение филогенетических деревьев проводили методом максимального правдоподобия в MEGA7 (Kumar et al., 2016), выравнивание нуклеотидных последовательностей предварительно производили с помощью алгоритма MAFFT, аминокислотных – с помощью MUSCLE. Для полногеномного сравнительного анализа использовали: pyani v 0.2.7 для вычисления ANI, AAI-matrix calculator для вычисления AAI и Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 для предсказания ДНК-ДНК гибридизации.

Анализ протеомов. Археи *T. adornatum* 1910b и *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 растили в оптимальных условиях 80°C, pH 5.7 на целлюлозе и T=92°C, pH 5.6 на ксилане, соответственно. В контрольных экспериментах штамм 1910b растили на пирувате, а штамм 2319x2 на желатине. Всего было сделано 2 биологические повторности контроля и 3 повторности опыта. Сконцентрированные центрифугированием клетки разрушали согласно Kulak et al. (2014). Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили после трипсинолиза протеомов образцов на системе Ultimate 3000 Nano LC System, сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF, (Sidorenko et al., 2018). Необработанные MS-данные анализировали с помощью программного пакета MaxQuant и геномных последовательностей исследуемых архей (CP006646 для штамма 1910b и 2867967589 для штамма 2319x2). Визуализацию данных проводили в R (Green, Sambrook, 2019).

Подготовка проб для биохимических исследований. Сконцентрированные клетки архей, выращенных в оптимальных условиях на полисахаридах и других субстратах, отмывали от остатков среды в буферах с соответствующим для той или иной культуры значением pH, после чего центрифугировали. Осадок (клетки) ресуспендировали в 100 мкл буфера. Для отделения ферментов (фракции поверхностных мембрансвязанных белков) к осадку добавляли 50 мкл 1 М NaCl, 3 М мочевины, 0.5% ДСН (додецилсульфат натрия), 0.5% Тритон X-100 или 0.5% Твин-80 и инкубировали 1 час при T=25°C. Далее добавляли 450 мкл соответствующего буфера, перемешивали и ждали еще 30 минут. Получившуюся смесь центрифугировали 15 минут при 13400 об/мин, отбирали супернатант и измеряли в нем концентрацию белка с помощью Qubit Protein Kit или BCA метода (Smith et al., 1985).

Измерение активностей ферментов. Образование продуктов гидролиза полисахаридов исследуемыми ферментами (как нативными, так и рекомбинантными) определяли с помощью динитросалицилового метода (Miller, 1959) и/или с использованием хромогенных субстратов (Megazyme). В качестве контролей

использовали ту же реакционную смесь, проинкубированную в тех же условиях, но без добавления фермента. Количество редуцирующих остатков сахаров (мкмоль/мл) рассчитывали по калибровочной кривой, построенной при измерении известных концентраций моносахаридов (глюкозы, маннозы или ксилозы). Специфическую активность гликозидаз определяли как количество (мкмоль/мл) образующихся редуцирующих сахаров на 1 мг белка за минуту. Измерение активности проводили также при оценке термостабильности, субстратной специфичности, устойчивости к детергентам и степени зависимости от кофакторов.

Получение рекомбинантных ферментов. Системы праймеров для амплификации генов гликозидаз разрабатывали с помощью Vector NTI. Гены исследуемых гликозидаз клонировали в вектор pLATE51 с помощью набора aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System kit. Во всех конструкциях была заложена последовательность из 6 гистидинов на N-конце. С помощью электропорации компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) были трансформированы плазмидами с целевыми генами. Рекомбинантные штаммы *E. coli* BL21(DE3) выращивали в жидкой культуре, экспрессию генов индуцировали добавлением 0.5 мМ ИПТГ. Сконцентрированные клетки разрушали ультразвуком, избавлялись от нерастворимых компонентов центрифугированием (40 мин, 13400 об/мин, +4°C), после чего полученные экстракты чистили посредством аффинной хроматографии на Ni-сефарозной колонке HP HisTrap, 1 мл (Cytiva), с линейным градиентом имидазола от 25 мМ до 500 мМ на хроматографе низкого давления Äkta Start. Фракции, содержащие целевые белки обессоливали с помощью Amicon Ultra, после чего проводили очистку методом анионообменной хроматографии (колонка C10/10, носитель DEAE-Sephарose, Cytiva) на Äkta Start. Для выявления возможности олигомеризации исследуемых белков проводили электрофорез в нативных условиях, а также эксклюзионную хроматографию на Äkta Start (колонка C16/100, носитель Sephadex G100, Cytiva). Для всех фракций измеряли концентрацию белка с помощью Qubit Protein Kit, а также проводили ПААГ-электрофорез с последующей окраской геля коллоидным раствором Кумасси G-250 (Dyballa and Metzger, 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах.

Из образцов воды и осадков горячих источников Чили были получены накопительные культуры из которых впоследствии были выделены гипертермофильные археи родов *Thermosphaera*, *Pyrobaculum* и *Thermofilum* (Табл.1). Из проб, отобранных в кальдере Узон, Камчатка, были получены накопительные культуры, содержащие археи родов *Fervidicoccus*, *Desulfurococcus*, *Caldisphaera*, *Thermoproteus* а также представителей глубоких некультивируемых групп, таких как *Thermoplasmatales* A10 и THSCG. Всего в ходе данной работы, были выделены 10 чистых культур гипертермофильных архей, растущих на таких полисахаридах, как ксилан, лихенан, ксилоглюкан, целлюлоза, хитин или трагакант. Дальнейшая работа была сконцентрирована на характеристике представителей родов *Thermosphaera* и *Thermofilum*, выделенных из термальных источников Чили.

Таблица 1. Штаммы гипертермофильных архей, выделенные в ходе работы

Название штамма	Морфология	Субстрат	Анализ гена 16S рРНК (сходство с ближайшим организмом)
3502	Кокки	Ксилан	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
3507	Кокки	Ксилан	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
3507L	Кокки	Лихенан	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
3507LT	Тонкие палочки	Лихенан	97% <i>Thermofilum usonense</i> 1807-2
3507L2	Кокки	Ксилоглюкан	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
3524	Палочки	Ксилан	98% <i>Pyrobaculum aerophilum</i>
KZ7_Cs	Кокки	Трагакант	нет данных
KZ4_Cs	Кокки	МКЦ	нет данных
KZ1_Cs	Кокки	Ксилан	100% <i>Caldisphaera lagunensis</i>
KZ4_Cs	Кокки	Хитин	98% <i>Desulfurococcus fermentans</i>

Характеристика гипертермофильных архей.

***Thermosphaera* sp. 3507.** Клетки штамма 3507 представляли собой кокки от 1 до 3 мкм в диаметре, подвижные, иногда образующие гроздьевидные агрегаты. Диапазон роста штамма находился в интервале температур от 70 до 92°C с оптимумом при 85°C. Штамм 3507 рос при значениях pH среды от 5.0 до 7.0 с оптимумом в области 6.2-6.5. Рост клеток наблюдался на ксилане, ксилоглюкане, α-целлюлозе, лихенане, крахмале, пуллулане, а также на белковых субстратах - пептоне, триптоне и дрожжевом экстракте. Анализ последовательности гена 16S рРНК нового изолята показал, что его ближайшим родственником является *Thermosphaera aggregans* M11TL^T с уровнем сходства 99%. Несмотря на высокое родство, штамм 3507 отличался от своего ближайшего родственника, *T. aggregans*, который не способен был расти на углеводах, включая полисахариды, не считая термически обработанного ксилана (Huber et al., 1998; Spring et al., 2010). Геном штамма 3507 был секвенирован и собран в кольцевую хромосому; среднее сходство по нуклеотидам (ANI) с *T. aggregans* M11TL^T было ниже порогового для вида (95%) и составляло 86.5%, что позволяет отнести штамм 3507 к новому виду рода *Thermosphaera*. Способность к разложению полисахаридов у нового представителя определяется наличием генов, кодирующих CAZymes, представленных десятью гликозидазами из семейств GH1, GH13, GH57 и GH122 и 17 гликозилтрансферазами.

Новый представитель семейства *Thermofilaceae*. Штамм 3507LT был выделен из того же горячего источника, что и *Thermosphaera* sp. 3507. Клетки штамма 3507LT представляли собой тонкие, неподвижные палочки (Рис. 1) длиной 3-20 мкм и шириной 0.15-0.2 мкм. Изолят был анаэробным гипертермофильным органотрофным микроорганизмом, растущим при 73-93 °C и в диапазоне pH от 5 до 7.5 (оптимальный рост – при 85 °C и pH 6.0-6.7). Для роста штамма 3507LT было необходимо присутствие клеточного фильтрата *Thermosphaera* sp. 3507, обитающего в том же источнике, или клеточных фильтратов других архей.

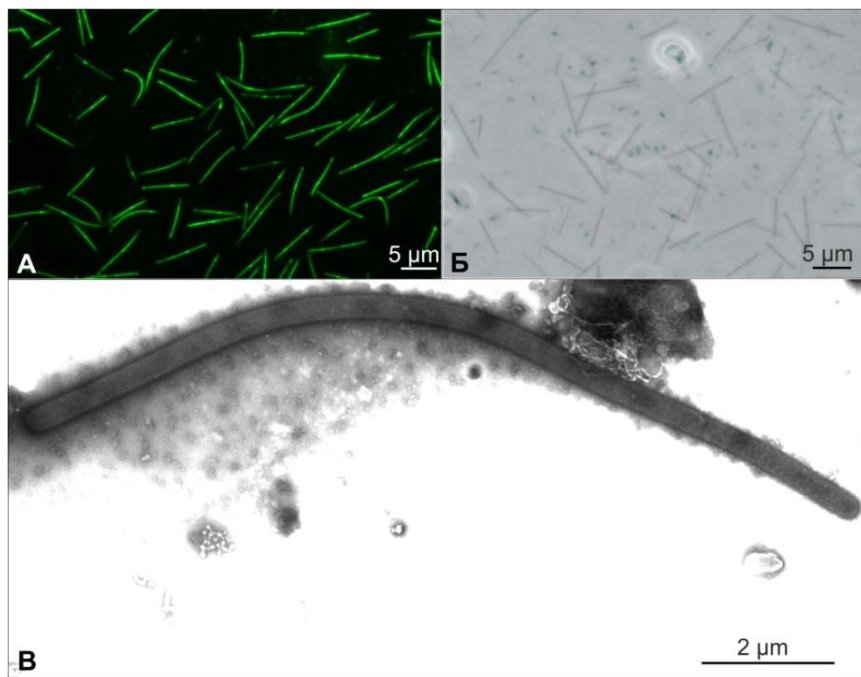


Рисунок 1. Морфология клеток штамма 3507LT:

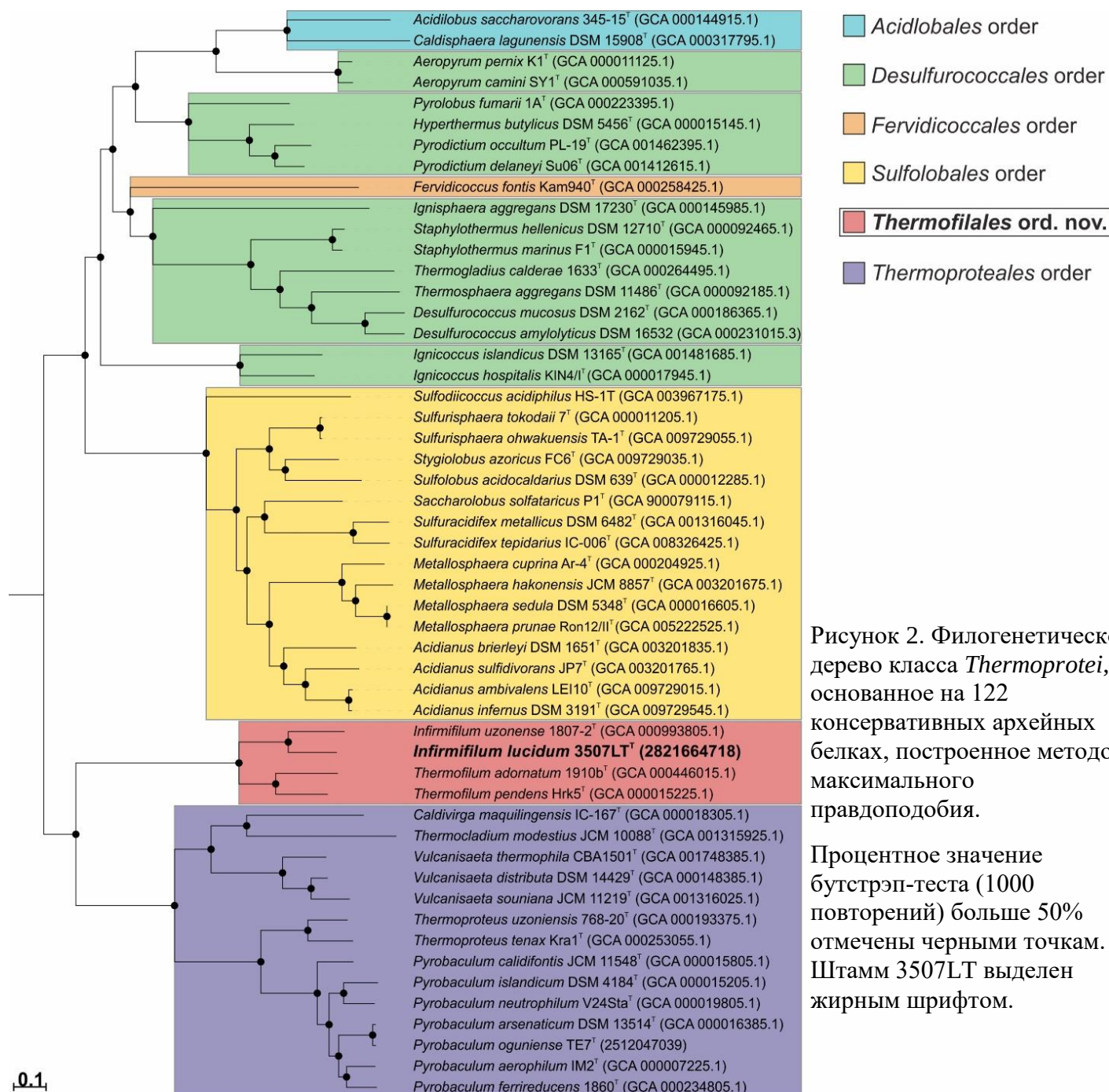
А) микрофотографии клеток, окрашенных акридином оранжевым; Б) клетки под фазово-контрастным микроскопом; В) микрофотографии клеток, полученные с помощью трансмиссионного электронного микроскопа

Штамм 3507LT был способен к сбраживанию моносахаридов, дисахаридов и широкого спектра полисахаридов (лихенана, крахмала, ксантановой камеди ксиланоглюкана, альфа-целлюлозы и аморфной целлюлозы). Добавление акцепторов (серы, нитрата, селената и тиосульфата) не стимулировало рост. Геном штамма был секвенирован и замкнут в одну кольцевую хромосому. По сходству последовательностей гена 16S рРНК ближайшими родственными видами оказались *Thermophilum uzonense* 1807-2 (97.6 % сходства), *Thermophilum pendens* Hrk5 (97.07 % сходства) и *Thermophilum adornatum* 1910b (96.67% сходства). Филогенетический анализ последовательности полного гена 16S рРНК штамма 3507LT показал, что данный микроорганизм относится к семейству *Thermofilaceae*, порядка *Thermoproteales*, класса *Thermoprotei*. Значения величины полногеномного сравнения ANI было ниже порогового (Табл.2) для вида - 95% (Kim et al., 2014).

Таблица 2. Полногеномные сравнения штамма 3507LT и видов *Thermophilum*.

	<i>Thermophilum uzonense</i> 1807-2	<i>Thermophilum adornatum</i> 1910b	<i>Thermophilum pendens</i> Hrk5
ANI	70.7%	70.3%	71.0%

Филогенетическое дерево, основанное на сравнении 122 консервативных белков (ar122), подтвердило, что штамм 3507LT находится внутри кластера, содержащего охарактеризованные виды рода *Thermophilum*, и попадает в группу вместе с *T. uzonense*, в то время как *T. adornatum* и *T. pendens* формируют отдельную группу (Рис. 2). Помимо этого, было отмечено, что представители *Thermofilaceae* располагаются в отдельном кластере, удаленном от других порядков *Thermoprotei*. Основываясь на этом анализе, было предложено: 1) описание нового рода, в который входили штамм 3507LT и *T. uzonense* 1807-2; 2) реклассификация семейства *Thermofilaceae* в порядок *Thermofilales*.



Обнаружено, что центральный углеводный метаболизм штамма 3507LT сходен со всеми известными представителями *Thermofilaceae* и типичен для других сахаролитических гипертермофильных архей (Bräsen et al., 2014). Окисление глюкозы происходит через гликолиз архейного типа. Манноза, транспортируемая в клетки через фосфотрансферазную систему, превращается в глюкозо-6-фосфат при помощи маннозо-6-фосфат-изомеразы, ген которой обнаружен в геномах всех представителей *Thermofilaceae*, включая штамм 3507LT. Конверсия лактозы и галактозы происходит по пути Лелуара (Frey, 1996). Анализ распределения групп COG (clusters of orthologous group) показал, что представители *Thermofilaceae* обладают функциональным профилем, четко отличающимся от членов других порядков класса *Thermoprotei*, включая порядок *Thermoproteales*, к которому ранее относили это семейство (Рис. 3).

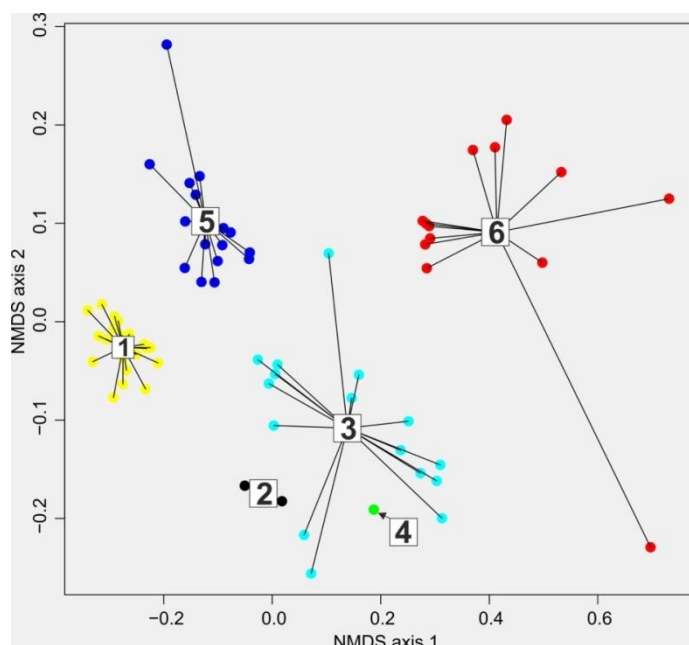


Рисунок 3. NMDS* график, демонстрирующий распределение COG среди представителей класса *Thermoprotei*: 1 – *Sulfolobales*, 2 – *Thermoproteales* (за исключением *Thermofilaceae*), 3 – *Acidilobales*, 4 – *Desulfurococcales*, 5 – *Fervidococcales*, 6 – *Thermofilaceae*
*-неметрическое многомерное шкалирование

Анализ потерь и приобретений генов в ходе эволюции *Thermofilales* позволил объяснить зависимость роста представителей *Thermofilales* от присутствия других архей, находящихся в тех же экосистемах. Внутри группы *Thermofilales* была обнаружена потеря генов биосинтеза L-аминокислот, таких как аргинин, триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин, треонин, глицин, гистидин и глутамат. Отсутствовали некоторые гены биосинтеза липидов. Выявлены потери некоторых генов биосинтеза пиримидинов, участвующих в важнейших путях биосинтеза нуклеотидов, пиридоксала и тиамина, и потеря генов биосинтеза пуринов, а также кобаламина, рибофлавина, пантотената, кофермента А и фолиевой кислоты. С другой стороны, *Thermofilales* сохранили некоторые гены, утраченные порядком *Thermoproteales*, например, гены, кодирующие белки некоторых транспортеров аминокислот, витаминов, нуклеотидов. Примечательно, что группа культивируемых *Thermofilales* приобрела гены, кодирующие фосфотрансферазную систему (ФТС), которые отсутствуют у других представителей филума *Crenarchaeota*. По-видимому, ФТС, наряду с гликозидазами и ферментами центрального метаболизма углеводов является одной из основных причин способности всех известных представителей *Thermofilales* расти на углеводах. Основываясь на филогении, полногеномных сравнениях и фенотипических различиях, мы предложили новый род *Infirmifilum* gen. nov., состоящий из двух видов: *Infirmifilum lucidum* sp. nov. штамм 3507LT и *Infirmifilum uzonense* comb. nov (ранее известный как *Thermofilum uzonense* штамм 1807-2).

***Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2.** Штамм *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 рос только на трех полисахаридах: на ксилане, пуллулане и крахмале, а также на многих моносахаридах, включая ксилозу и глюкозу – мономеры выше указанных полисахаридов. Рост штамма 2319x2 на углеводах наблюдали только при наличии внешних акцепторов электронов – ферригидрита (FeOOH), селената (SeO_4^{2-}) и тиосульфата ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). Сбраживать углеводы данный штамм не способен.

В ходе роста на ксилозе в присутствии акцептора, происходило потребление последней и образование углекислоты, что подтверждает анаэробное дыхание этой археи (Рис. 4). Продуктами при росте в присутствии 10 мМ тиосульфата натрия были

сероводород и CO_2 . Образование летучих жирных кислот в процессе роста не было выявлено.

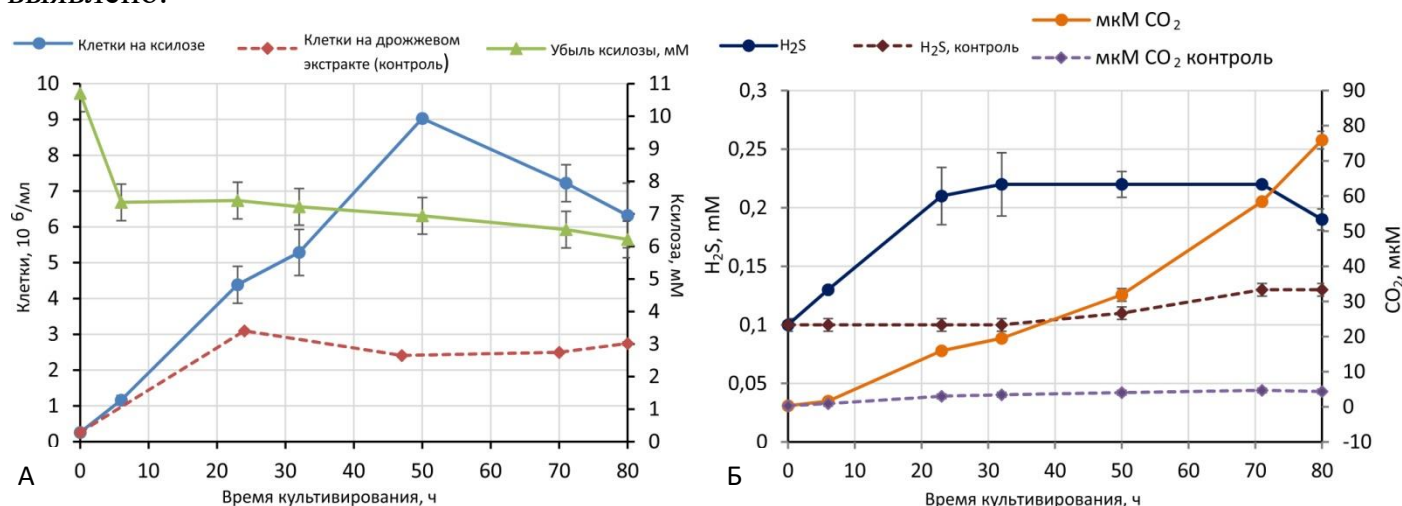


Рисунок 4. Рост, потребление ксилитозы и образование продуктов метаболизма (А) штаммом 2319x2 на среде с ксилитозой и тиосульфатом (контроль – среда с дрожжевым экстрактом (ДЭ) и тиосульфатом). Образование (Б) сероводорода (H_2S) и CO_2 показаны на графике справа.

В ходе анализа генома было обнаружено 8 генов гликозидаз, отнесенных к 6 семействам, участвующих в метаболизме крахмала, пуллулана и дисахаридов: GH 13, GH 31, GH 57, GH 77, GH 99. Генов, кодирующих известные семейства ксиланаз в геноме данного штамма обнаружить не удалось. Примечательно, что набор гликозидаз у других представителей рода *Pyrobaculum* был сходен с гликозидазами штамма 2319x2, однако, ни один из них не был способен расти на сахарах или полисахаридах. В геноме 2319x2 были обнаружены все гены, кодирующие ферменты модифицированного гликолиза, необходимого для метаболизма D-гексоз. Путь метаболизма D-ксилитозы остаётся неясным, однако, геном *P. arsenaticum* 2319x2 содержал большое количество генов, кодирующие НАД(Ф)⁺-зависимые оксидоредуктазы, сахарокиназы и изомеразы, которые могут быть вовлечены в данный процесс. Скорее всего, в метаболизме D-ксилитозы могут участвовать некоторые ферменты неокислительной ветви пентозофосфатного пути – транскетолаза и рибозо-5-фосфат изомераза. Для выявления белков, участвующих в разложении ксилана и дальнейшем метаболизме ксилитозы, был проведен сравнительный анализ протеомов клеток штамма 2319x2, выращенных на ксилане и желатине. При росте на ксилане было обнаружено увеличение экспрессии генов транскетолаз, но не генов других ферментов пентозофосфатного пути. Кроме того, остаётся неясной последовательность биохимических реакций на этапе превращения ксилитозы в рибулозо-5-фосфат, что подразумевает наличие нового пути окисления ксилитозы.

Поскольку генов ксиланаз в геноме не обнаружено, измерение нативной ксиланазной активности стало особенно актуальным. Для этого, клетки штамма 2319x2 выращенные на ксилане отделяли от культуральной жидкости и измеряли ксиланазную активность в обеих фракциях (Табл. 3). Наибольшая скорость образования редуцирующих сахаров наблюдалась при инкубации ксилана с клетками, выращенными на тиосульфате. В культуральной жидкости ксиланазной активности обнаружено не было. Таким образом, ксиланазная активность у *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 была подтверждена, причем, ксиланазы оказались связаны с поверхностью клеток.

Таблица 3. Активности гликозидаз *Pyrobaculum arsenaticum* 2319х2

Клетки, выращенные на ксилане с разными акцепторами электронов)	Скорость образования редуцирующих сахаров, мкг/мл*ч
Клетки + FeOOH	3.03±0.15
Клетки + Na ₂ S ₂ O ₃	4.19±0.17
Клетки + Na ₂ SeO ₄	2.87±0.09

Характеристика *Thermofilum adornatum* 1910b. Для гипертермофильной кренархеи *Thermofilum adornatum* 1910b, растущей при T=50-95 °C и pH 5.3-8.5, с оптимумом при 80 °C и pH 5.5–6.0, был показан рост на таких полисахаридах как аморфная целлюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, β-глюкан и крахмал. Ранее способность роста на целлюлозе не была показана для представителей рода *Thermofilum*, однако она предполагалась в связи с обнаружением гена гликозидазы семейства GH5 в геноме *T. pendens* (Anderson et al., 2008). Геном *T. adornatum* 1910b был секвенирован и собран в кольцевую хромосому. В геноме были обнаружены все гены гликолиза архейного типа: отличительными чертами этого варианта были участие гексокиназы из семейства ROK в процессе фосфорилирования глюкозы и маннозы; окисление глицеральдегид-3-фосфата в одну необратимую стадию под действием глицеральдегид-3-фосфат:ферредоксин оксидоредуктазы. Такой тип гликолиза был выявлен у всех представителей рода *Thermofilum*.

В *in silico* транслированном геноме штамма 1910b не было обнаружено гомологов ранее охарактеризованных целлюлаз. Тем не менее, были предсказаны ферменты, имеющие β-глюкозидазную активность, и относящиеся к семействам GH1 и GH3, для которых ранее не было показано эндоглюканазной активности. Для выявления белков, участвующих в разложении целлюлозы, были проанализированы все цитоплазматические, мембранные и заякоренные на мембране белки в протеомах клеток, выращенных на целлюлозе (опыт) и на пирувате (контроль). Сравнительный анализ протеомов *Thermofilum adornatum* штамма 1910b показал значительное увеличение экспрессии на целлюлозе генов N186_RS00340 (Cel40 – GH1), N186_RS00345 (Cel45) и N186_RS00230 (Cel30). В то время как уровень экспрессии гена N186_RS00225, локализованного рядом с N186_RS00230 и кодирующего бета-глюкозидазу (Cel25 – GH3) при росте клеток на целлюлозе остался соизмеримым с контролем. Пара генов N186_RS00340 и N186_RS00345, кодирующие белки Cel40 и Cel45, также колокализованы (Рис. 6), что является хорошим аргументом в пользу функциональной связи этих ферментов.

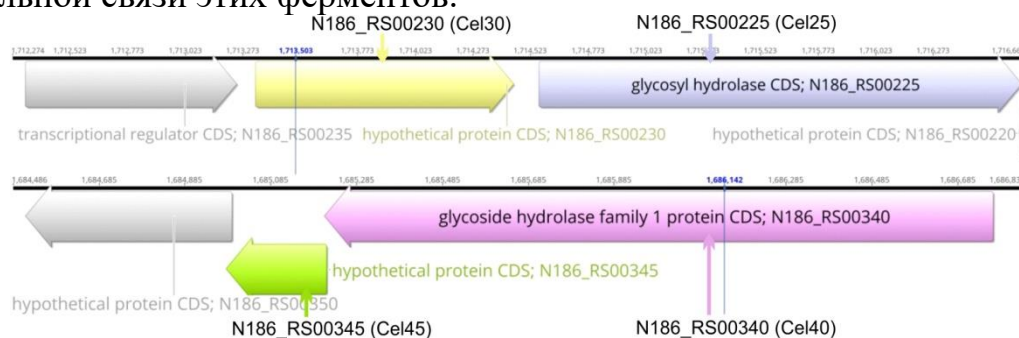


Рисунок 5. Расположение генов предполагаемых целлюлаз в геноме штамма 1910b.

Протеомный анализ подтвердил, что при росте штамма 1910b на целлюлозе также увеличивается экспрессия белков ABC-транспортеров: N186_RS06740-

N186_RS06750 и N186_RS08050-N186_RS08060. Помимо них значительно возрастает экспрессия ряда генов, ответственных за ферменты модифицированного гликолиза: фосфофруктокиназы (N186_RS07290), фруктозо-1,6-бисфосфатацетальдолазы (N186_RS05135), триозофосфатизомеразы (N186_RS05665), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (N186_RS05135) и фосфоглицераткиназы (N186_RS05220).

Идентификация целлюлазной активности нативных гликозидаз *Thermofilum adornatum* штамма 1910b, выращенного на микрокристаллической целлюлозе (условия культивирования T=80°C, pH=5.5) была проведена для целых клеток, культуральной жидкости (супернатант), а также для фракций ФМБ (мембран-связанных белков), полученных обработкой детергентами (Табл. 4). Для фракций, полученных с помощью Triton-X100 и мочевины были показаны наибольшие скорости гидролиза целлюлоз – АМЦ и КМЦ.

Таблица 4. Активности гликозидаз *Thermofilum adornatum* 1910b

Фракция	Скорость образования редуцирующих сахаров, мкг/мл*ч	
	Аморфная целлюлоза, 0.2%	КМЦ, 0.2%
Клетки	3.48±0.174	0
Супернатант	0	0
ФМБ (SDS)	0	0
ФМБ (Triton-X100)	3.38±0.016	3.68±0.09
ФМБ (Мочевина)	3.85±0.19	6.67±0.2

*-КМЦ - карбоксиметилцеллюлоза

Описание штамма *Thermococcus* sp. 2319x1. Штамм являлся анаэробом и органотрофом, способным расти на моно-, ди- (глюкозе, ксилозе, мальтозе, лактозе) и полисахаридах – различных видах целлюлоз (АМЦ и КМЦ), хитине, альгинате, ксилане, ксилоглюкане, лихенане, бета-глюкане и крахмале. Рост наблюдали при 60-98 °C и pH 5.2 - 9.5 с оптимумом при 85 °C и pH 7.5.

Для выявления активности гликозидаз, штамм был выращен на АМЦ, ксилане, ксилоглюкане и желатине, были получены фракции солюбилизованных мембран-связанных белков (ФМБ) и измерена активность по отношению к ксилану, ксилоглюкану, АМЦ, КМЦ и бета-глюкану (Рис. 6). Были обнаружены ксиланазная и целлюлазная активность для ФМБ из клеток, выращенных на всех полисахаридах. Эти ферменты (или фермент) являются индуцибельными поскольку гликозидазной активности при выращивании штамма 2319x1 на желатине обнаружено не было.

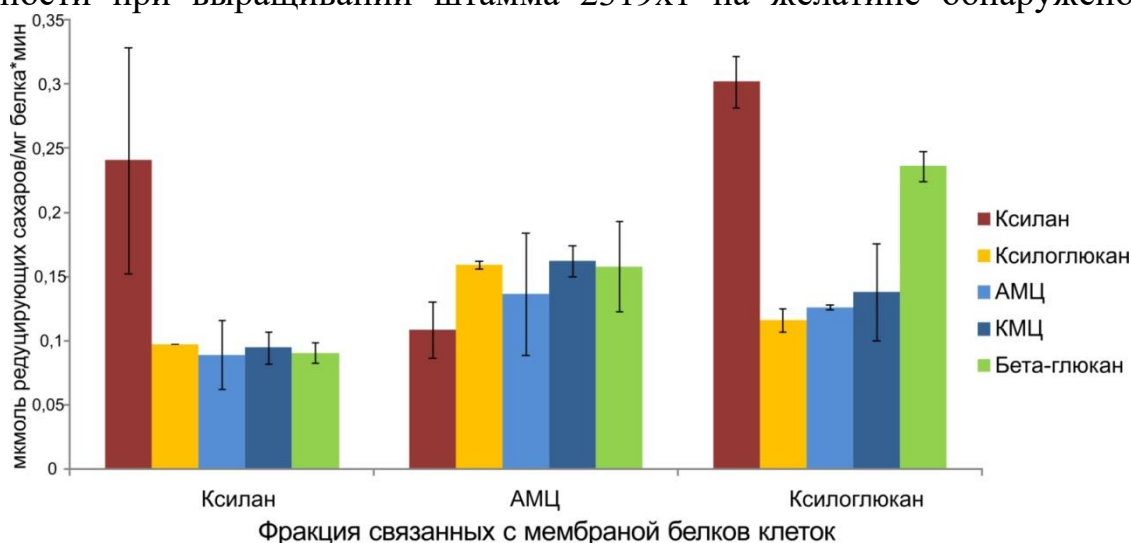


Рисунок 6. Гидролитическая активность фракций белков штамма 2319x1, связанных с мембраной, по отношению к ксилану, ксилоглюкану, АМЦ, КМЦ и бета-глюкану, соответственно.

В геноме данного штамма были обнаружены гены различных гликозидаз, относящихся к семействам GH1, 13, 35, 57, 63, 122 и 130. Ни одна из них не относится к семействам с известными целлюлазами, за одним исключением, которым являлась пятидоменная гликозидаза с уникальным расположением доменов: GH5-GH12-GH12-CBM2-CBM2. Каталитические домены этого белка относятся к семействам для которых известны эндоксилазная и эндоглюканазная активности, а связывающие домены CBM2 также распространены среди целлюлаз и ксиланаз. Также в геноме штамма 2319х1 были обнаружены все ферменты модифицированного пути гликолиза, характерного для *Euryarchaeota*, включающего ферменты: АДФ-глюкокиназу (ADU37_CDS01920), АДФ-фосфофруктокиназу (ADU37_CDS09450), глицеральдегид-3-фосфат:ферредоксин оксидоредуктазу (ADU37_CDS17140), нефосфорилирующую НАД(Ф)⁺-зависимую глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (ADU37_CDS19860).

Характеристика рекомбинантных белков гипертермофильных архей.

Рекомбинантные белки из *Thermofilum adornatum* 1910b. Гены четырех предполагаемых целлюлаз *T. adornatum* 1910b (Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45) были гетерологически экспрессированы в *E. coli*, что позволило охарактеризовать активность этих белков. Клеточные экстракты, содержащие белки Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45, были проверены на способность к гидролизу КМЦ и целлобиозы. Эндоглюканазная активность была идентифицирована у клеточных экстрактов с белками Cel40, Cel45 и Cel30, причем наибольшую активность проявляли экстракты с Cel40 и Cel45 (37.36 U/мг и 27.81 U/мг, соответственно). По отношению к целлобиозе были активны три фермента – Cel40, Cel30 и Cel25 (15.26, 6.10 и 4.17 U/мг, соответственно), что предполагает их участие в отщеплении концевых остатков глюкозы в целлюлозе.

Все рекомбинантные гликозидазы были очищены с помощью аффинной хроматографии, за исключением Cel30, который не связывался с колонкой (дальнейшая работа велась с фракцией растворимых белков, полученных после разрушения клеток *E.coli*). Размер обнаруженных с помощью ПААГ-электрофореза полос целевых белков совпадал с их теоретической массой: 77 кДа для Cel25, 42 кДа для Cel30, 60 кДа для Cel40 и 10 кДа для Cel45 (Рис.7).

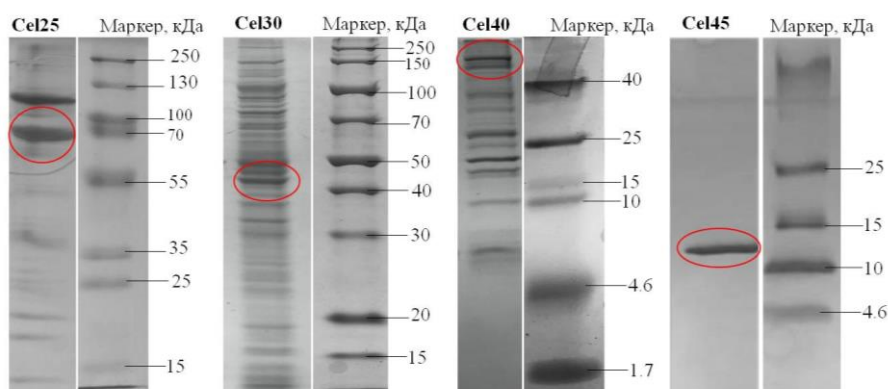


Рисунок 7. Наличие целевых белков во фракциях после аффинной хроматографии.

Все частично очищенные рекомбинантные гликозидазы *T. adornatum* 1910b были активны по отношению к КМЦ, АМЦ, β -глюкану, лихенану и глюкоманнану (Рис. 10). Ни один из исследованных белков не гидролизировал ксилан, пахиман, крахмал, галактан и курдлан. Целлобиозу гидролизировали 2 белка – Cel25 и Cel40, что

характерно для представителей семейств GH3 и GH1, к которым, соответственно, относятся данные белки. На ксилоглюкане наблюдали активность белков Cel30 и Cel45. Гликозидаза Cel25 обладала наибольшей активностью, которая составляла от 16 (галактоманнан) до 373 (бета-глюкан) mU/мг белка; другие ферменты обладали активностью от 0.8 до 22 mU/мг (Рис. 8).

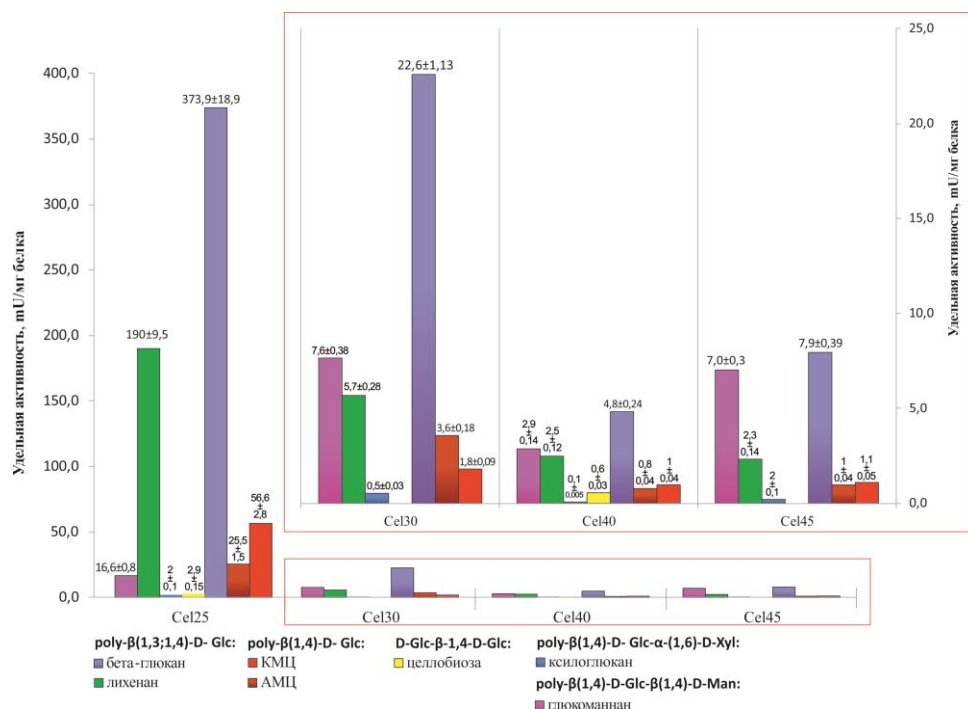


Рисунок 8. Удельная активность рекомбинантных гликозидаз *T. adornatum* 1910b.

Был определен спектр образуемых остатков моно- и олигосахаридов для целевых рекомбинантных белков на полисахаридах, мономеры которых были связаны β-(1,4)- и β-(1,3)-гликозидными связями (Рис. 9), и на которых ранее была показана активность (а именно КМЦ, бета-глюкан, лихенан и целлобиоза).

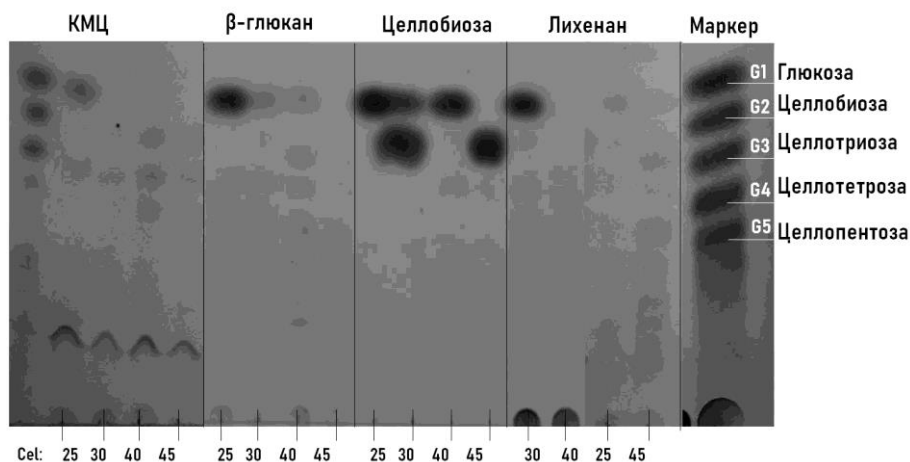


Рисунок 9. Тонкослойная хроматография ферментативных смесей на различных полисахаридах рекомбинантных гликозидаз *T. adornatum* 1910b (Cel25, Cel30, Cel40, Cel45).

Белки Cel25, Cel30, Cel40 проявляли экзо -, бета-, и эндоглюканазные активности, а Cel45 лишь эндоглюканазную. Таким образом, для всех рекомбинантных белков было показано участие в разложении целлюлозы. Белки Cel45 и Cel25 играют ключевую роль в гидролизе полисахаридов: Cel45 является узкоспецифичной эндоглюканазой, а Cel25, напротив, - более высокоактивный и универсальный фермент, обладающий широким спектром разлагаемых субстратов и образуемых продуктов. Белки Cel30 и Cel40, по-видимому, участвуют в дальнейшем гидролизе образующихся олигосахаридов.

Рекомбинантные белки из *Thermococcus* sp. 2319x1. Для изучения специфической активности и стабильности мультидоменной гликозидазы (МДГ), ее полный ген и фрагменты, содержащие некоторые или отдельные каталитические домены GH5, GH12-1и GH12-2 (Рис. 10) были заклонированы и экспрессированы в *E. coli*.

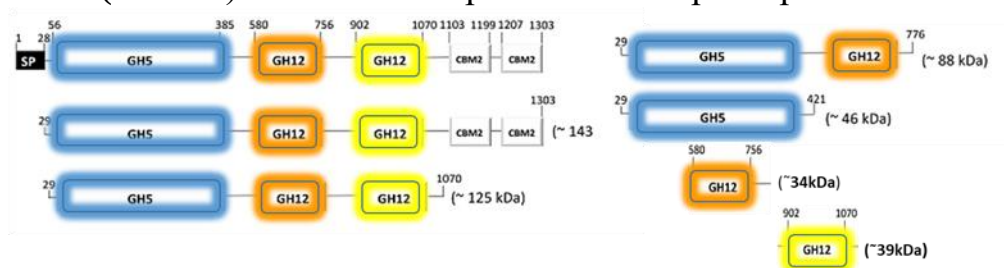


Рисунок 10. МДГ и все исследованные ее фрагменты. Цветом отмечены каталитические домены.

В начале были получены полная МДГ и ее фрагменты, созданные путем удаления связывающих и каталитических доменов с С-конца. При измерении активностей полученных рекомбинантных белков «GH5-GH12-GH12-CBM2-CBM2», «GH5-GH12-GH12», «GH5-GH12» и «GH5» по отношению к различным полисахаридам (Рис. 11): наибольшая активность для всех четырех белков проявлялась по отношению к растворимым β -1,3/1,4-глюканам - β -глюкану и лихенану. Была определена высокая эндо- β -1,4-глюканазная активность – для КМЦ (3–7 U/мг) и гидроксиэтилцеллюлозы (2–5 U/мг), на частично растворимой АМЦ активность наблюдали в пределах от 2 до 5 U/мг. Все белки были наименее активны по отношению к нерастворимой МКЦ. Низкая активность белков была также выявлена на ксилане (<1 U/мг), ксилоглюкане и курдлане (0.4 – 0.5 U/мг). Примечательно, что высокая активность (2–9 U/мг) наблюдалась на галактоманнана. Таким образом, удалось установить, что домен GH5, имеющийся во всех вариантах, обладает множественной, но в большей степени эндоманнаназной и эндоглюканазной активностями, а домены GH12, по-видимому, являются глюканазами широкого спектра действия – от бета-глюкозидаз, до экзо- и эндоглюканаз. Для более надежного определения их функций они были получены в виде отдельных рекомбинантных ферментов.

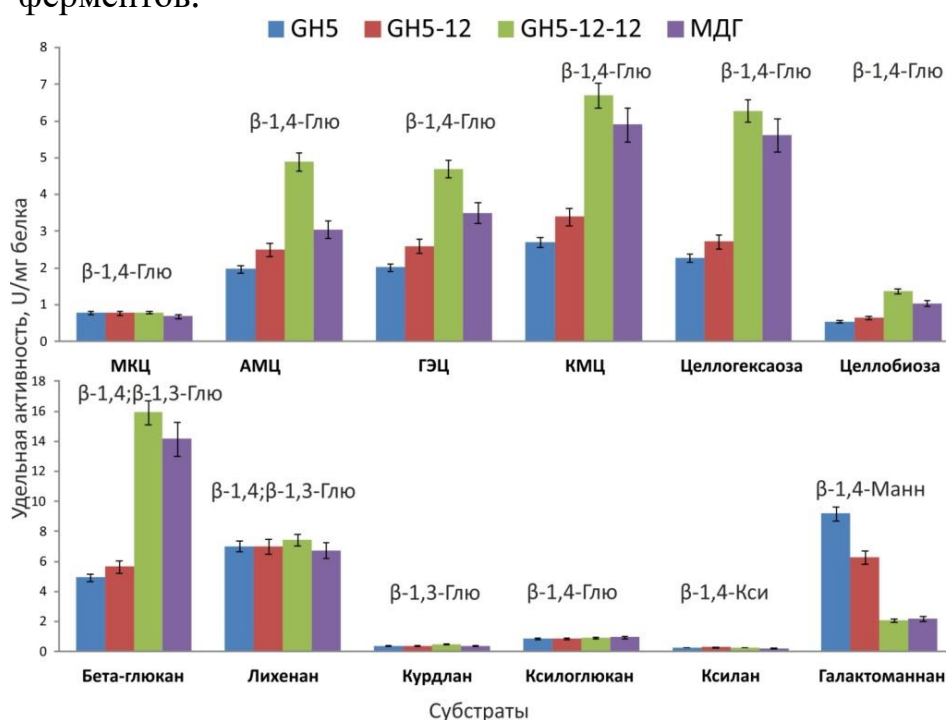


Рисунок 11. Субстратная специфичность МДГ и ее отдельных частей: GH5-GH12-GH12, GH5-GH12 и GH5. (ГЭЦ – гидроксиэтилцеллюлоза, КМЦ - карбоксиметилцеллюлоза, АМЦ – аморфная целлюлоза, МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза)

Характеристика доменов GH12-1 и GH12-2. В ходе многостадийной очистки были получены гомогенные ферментативные препараты доменов GH12-1 и GH12-2. Этапы очистки визуализировали с помощью ПААГ-электрофореза (Рис. 12 А, Б), из которого видно, что предсказанные молекулярные массы доменов близки к теоретическим: 42 кДа для GH12-1 и 37 кДа для GH12-2. Эксклюзионная хроматография подтвердила, что оба домена являются мономерами.

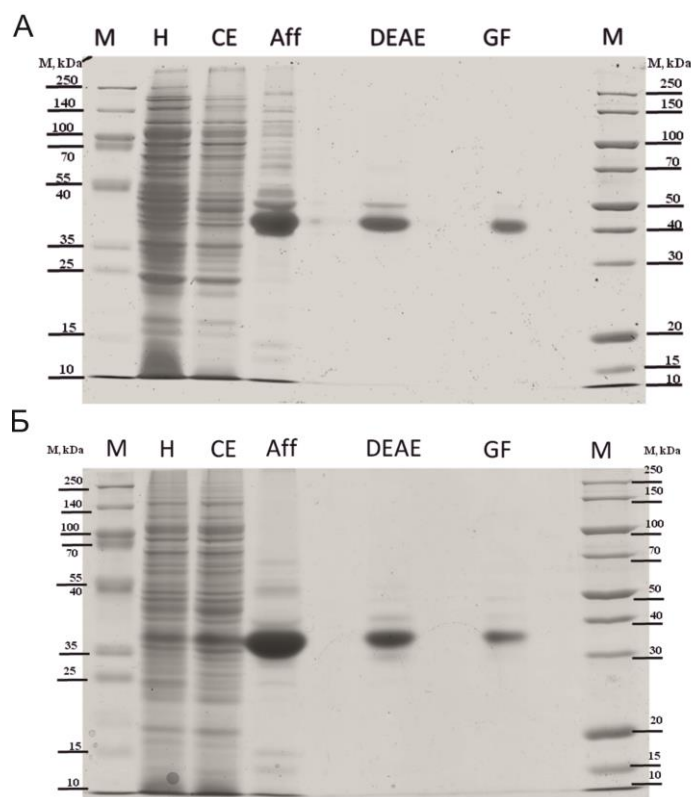


Рисунок 12. Фотографии ПААГ-электрофореза:

А) фракций, содержащих GH12-1 домен. М – белковый маркер; Н – гомогенат; СЕ – клеточный экстракт; Aff – фракция после аффинной хроматографии; DEAE – фракция после ионнообменной хроматографии; GF – фракция эксклюзионной

Б) фракций, содержащих GH12-2 домен. М – белковый маркер; Н – гомогенат; СЕ – клеточный экстракт; Aff – фракция после аффинной хроматографии; DEAE – фракция после ионнообменной хроматографии; GF – фракция после гель фильтрации

Для белка GH12-1 коэффициент очистки и выход от общего количества белка составляли 55.1 и 17.5%, соответственно, в то время как для GH12-2 коэффициент очистки равнялся 94.18, а выход – 25.1%.

Оба домена обладали наибольшей активностью при температурах от 80 до 100°C, но отличались по pH – оптимумам активности: GH12-1 проявлял наибольшую активность при pH=5, а GH12-2 – при pH=9.0 (Рис. 13 А, Б).

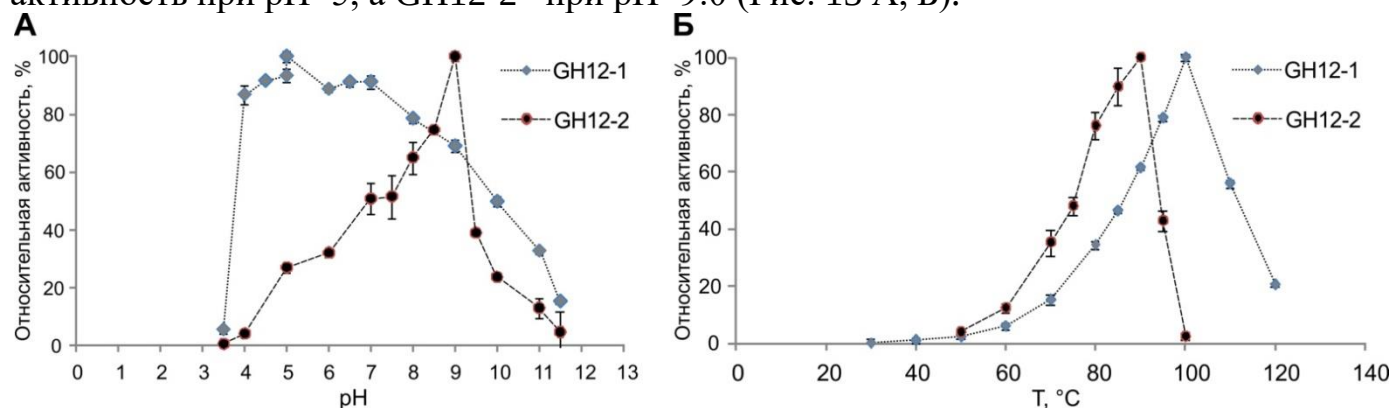


Рисунок 13. Влияние физико-химических параметров - pH (А) и температуры (Б) на активность GH12-1и GH12-2 доменов.

Оба фермента были активны по отношению к бета-глюкану, лихенану и КМЦ, а для GH12-1 была также детектирована активность по отношению к ксилану и арабиноксилану (Табл. 5).

Таблица 5. Кинетические параметры гликозидаз GH12-1 и GH12-2 для различных субстратов.

Субстрат	КМ (мг/мл)		Макс. скорость V _{max} (мкмоль/мин)		Каталитическая константа, k _{cat} (с ⁻¹)		Константа специфичности, k _{cat} /K _m (мл/мг/с)	
	GH12-1	GH12-2	GH12-1	GH12-2	GH12-1	GH12-2	GH12-1	GH12-2
β-глюкан	1.59	1.29	0.09	0.84	113.4	4053.9	71.3	3142.568
Лихенан	1.08	1.03	0.08	0.47	100.8	2268.3	93.3	2202.2
КМЦ	5.42	2.8	0.044	0.11	27.7	265.4	5.1	94.8
AZO-КМЦ	4.22	2.2	0.011	0.5	2.8	1206.5	0.7	548.4
Ксилан	1.49	нд*	0.028	нд	7.1	-	4.7	-
AZO-ксилан	2.03	нд	0.032	нд	4	-	1.99	-
Арабиноксилан	2.28	нд	0.039	нд	9.8	-	4.3	-

*нд – нет данных

Наибольшее сродство оба фермента имели к бета-глюкану и лихенану. Для GH12-1 домена сродство к ксилану и арабиноксилану было примерно одинаковым. Значения Км для обоих ферментов, измеренные на КМЦ, были высокими (5.42 мг/мл для GH12-1 и 2.8 мг/мл для GH12-2), что означает менее эффективный гидролиз, по сравнению с другими субстратами. Список гидролизуемых обеими гликозидазами субстратов указывает на то, что обе гликозидазы GH12-1 и GH12-2 обладают эндоглюканазной активностью – они способны гидролизовать полисахариды с β-(1-4)-связями, но не гидролизуют полисахариды β-(1-3)-связями, такие как пахиман и курдлан.

Температурная стабильность доменов GH12-1 и GH12-2 была проанализирована при 90°C и 100°C (Рис. 14 А, Б). При 90°C домен GH12-1 показал время полужизни 284.5 часа, а для домена GH12-2 оно составило 19 часов. При 100°C домен GH12-1 имел время полужизни 42 ч, а GH12-2 – лишь 30 мин. Домен GH12-1 полностью терял активность через 374 часа при 90°C, а при 100°C – через 102 часа. Активность белка GH12-2 не наблюдалась после 135 ч инкубации при температуре 90°C, а при 100°C фермент полностью инактивировался через 4.5 часа.

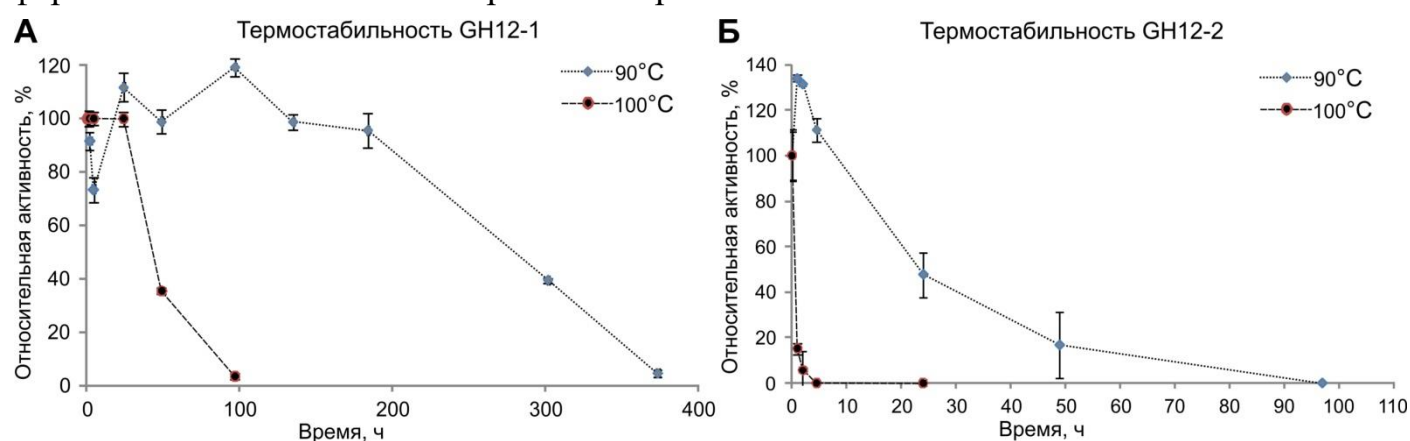


Рисунок 14. Термостабильность GH12 доменов при 90 и 100°C. А – GH12-1, Б-GH12-2.

При добавлении ионов Na⁺, Mg²⁺ и Zn²⁺ активность домена GH12-1 существенно не изменялась, оставаясь в пределах 89-91% от исходной (Рис. 15). Мочевина и ЭДТА также не влияли на активность домена GH12-1 в отличие от β-меркаптоэтанол и ДТТ (дитиотреитол), которые снижали ее до 46% и 51.7%, соответственно. Активность домена GH12-2 существенно не изменялась после добавления таких ионов металлов,

как K^+ , Na^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} , оставаясь в пределах 80-109% от исходной (Рис. 15). Незначительный эффект увеличения активности был отмечен при добавлении ионов Mn^{2+} и Ca^{2+} , в результате чего активность составила 127% и 117%, соответственно. Добавление мочевины, ДТТ, ЭДТА и β -меркаптоэтанола снижало активность GH12-2 от 69% до 52%. Примечательно, что добавление 5 мМ ДСН и 5 мМ Твин 80 не влияло на активность фермента – она сохранялась на уровне 99% и 83% от исходной. Таким образом, активность доменов не зависит от наличия ионов металлов.

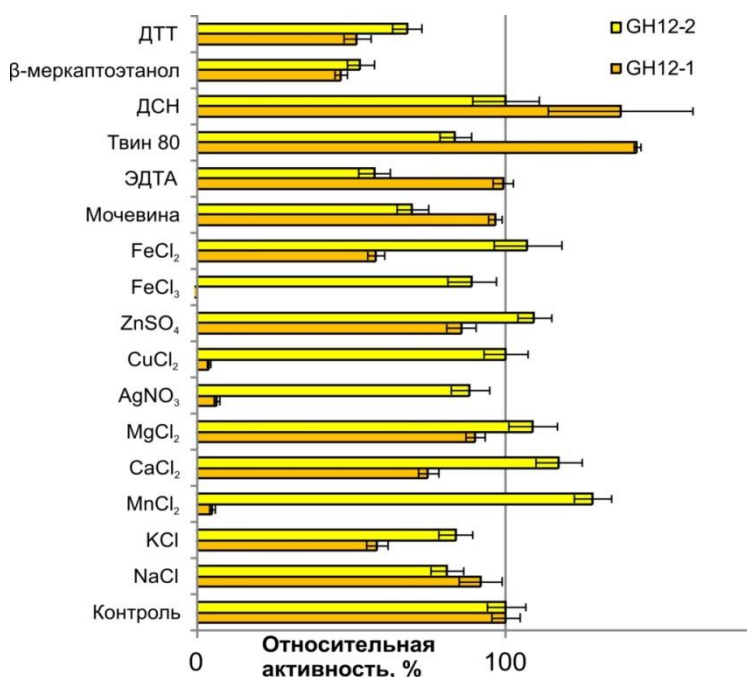


Рисунок 15. Влияние кофакторов и детергентов на активности GH12-1 и GH12-2

Анализ продуктов гидролиза полисахаридов показал (Рис. 16), что при гидролизе β -глюкана, КМЦ и лихенана GH12-1 образует сходные смеси олигосахаридов, состоящие из глюкозы и целлоолигосахаридов (C2-C6), в отличие от смеси олигосахаридов, высвобождаемых доменом GH12-2 – от глюкозы до целлотетраозы на β -глюкане и от глюкозы до целлотриозы на КМЦ и лихенане. При гидролизе ксилана доменом GH12-1 наблюдали образование спектра продуктов от ксилозы до ксилотетраозы и более высокомолекулярных ксилоолигосахаридов.

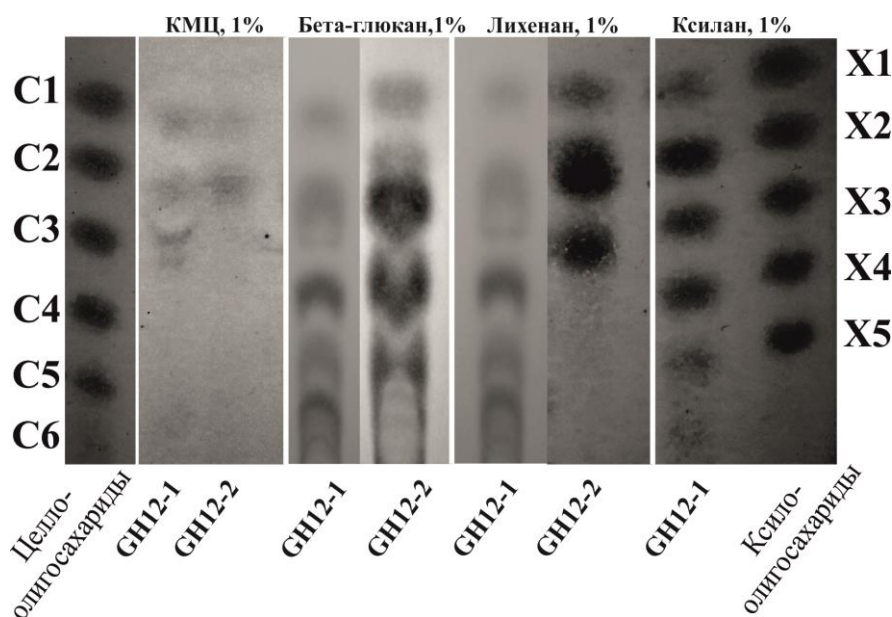


Рисунок 16. Анализ продуктов гидролиза полисахаридов доменами GH12-1 и GH12-2 с помощью ТСХ.

Рассматривая функциональные особенности индивидуальных GH12 доменов, можно утверждать, что оба домена играют свою роль в общей активности мультидоменной эндоглюканазы/эндоксилазы: помимо общей бета-глюкозидазной и экзоглюканазной активности GH12-1 также является ксиланазой, а GH12-2 эндоглюканазой. Помимо этого, анализ активности обоих GH12-х доменов подтверждает предположение о том, что такие полисахариды как ксилоглюкан, галактоманнан и курдлан МДГ гидролизует за счет действия лишь одного GH5-го домена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день известно всего лишь 38 видов из 12 родов гипертермофильных архей, разлагающих полисахариды, большинство из которых способны расти только на крахмале и его производных. Данная работа вносит вклад в расширение сведений об этой группе микроорганизмов: как на количественном уровне – было выделено 10 штаммов гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах, так и на качественном – некоторые из них были детально охарактеризованы, что привело к обнаружению принципиально новых свойств. В ходе сравнительно-геномного и протеомного исследований были выявлены новые ферменты, участвующие в разложении полисахаридов и реконструированы пути центрального метаболизма сахаров. Биохимическая характеристика нескольких рекомбинантных гликозидаз выявила их высокую удельную активность, широкую субстратную специфичность, выдающуюся термостабильность и устойчивость к различным детергентам.

Так, в данной работе было впервые показано разложение ксилоглюкана археями на примере штамма *Thermococcus* sp. 2319x1, который также способен расти на широком спектре полисахаридов (целлюлозе, хитине, альгинате, бета-глюкане, крахмале, пуллулане). Выявлен рост и подтверждена утилизация крахмала и его производных, а также потребление моносахаридов для *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2, что показано впервые для представителей рода *Pyrobaculum*. Для штаммов *Thermosphaera* sp. 3507, 3507L и 3507L2 был показан рост на ксилане, лихенане, ксилоглюкане и крахмале, что значительно расширяет представление о гидролитическом потенциале этого рода. Кроме того, был выделен новый представитель семейства *Thermofilaceae*, штамм 3507LT, способный расти на лихенане, ксилоглюкане и крахмале. На основании фенотипических и геномных различий этого микроорганизма и его родственников был предложен новый род и вид *Infirmifilum lucidum*, проведена реклассификация семейства и предложен новый порядок – *Thermofilales*.

Приведены доказательства роста на целлюлозе штамма *Thermofilum adornatum* 1910b. С помощью протеомного и сравнительно-геномного подходов, были выявлены белки данной археи, участвующие в разложении целлюлозы и ее остатков. Белки Cel30 и Cel45 не имеют охарактеризованных гомологов среди гликозидаз или каких-либо других ферментов. Другие две гликозидазы, Cel25 и Cel40, содержат каталитические домены из семейств GH3 и GH1, соответственно, среди которых до этого не было известно эндоглюканаз. Предполагается, что эти четыре фермента

действуют синергически, позволяя *T. adornatum* 1910b эффективно разлагать целлюлозу и расти на продуктах её гидролиза.

Анализ геномов трех штаммов *Thermococcus* sp. 2319x1, *P. arsenaticum* 2319x2 и *T. adornatum* 1910b показал, что все три археи имеют гены ферментов метаболизма глюкозы. Для штаммов 2319x2 и 1910b также был обнаружен путь окисления маннозы. При этом у штаммов 2319x1 и 2319x2 остается неясным катаболизм ксилозы, поскольку в их геномах не было найдено генов, кодирующих ключевые ферменты известных путей окисления ксилозы.

Были выявлены активности нативных ферментов из *Thermococcus* sp. 2319x1, *P. arsenaticum* 2319x2 и *T. adornatum* 1910b. У всех трех штаммов внеклеточные целлюлазы/ксилаказы были заякорены на мембранах, что указывает на то, что для эффективного разложения полисахаридов данным археям нужен максимально плотный контакт с субстратом. Также было показано, что эти гликозидазы являются индуцибельными.

Гены четырех новых целлюлаз *T. adornatum* 1910b были успешно экспрессированы в *E.coli* и охарактеризованы. Оптимальными условиями для активности всех белков являются температура 80-82°C и pH 5.6. В гидролизе целлюлозы участвуют все четыре гликозидазы. Ключевыми ферментами являются Cel25 и Cel45: Cel45 является эндоглюканазой, а Cel25, имеющий в своей структуре два домена GH3, показывает свойства и эндо- и экзоглюканазы и бета-глюкозидазы, благодаря способности разлагать целлобиозу. Ферменты Cel30 и Cel40, как и Cel25, проявляют экзо-, эндоглюканазную и β -глюкозидазную активности, но их удельные активности меньше. Помимо целлюлозы, все 4 фермента гидролизуют β -глюкан и лихенан, при этом, наибольшую активность все белки проявляли именно по отношению к β -глюкану. Кроме того, все исследуемые белки разлагают глюкоманнан, а Cel30 и Cel45 способны разлагать ксилотглюкан.

Была выделена и детально охарактеризована уникальная широко специфичная мультидоменная гликозидаза (МДГ) *Thermococcus* sp. 2319x1, а также ее фрагменты и индивидуальные каталитические домены (в виде индивидуальных ферментов). Показано, что все три каталитических домена являются термостабильными ферментами с отличающимися друг от друга оптимумами активности: GH5 (T=90°C, pH=5.5), GH12-1 (T=100°C, pH=5) и GH12-2 (T=90°C, pH=9). Для GH12-х доменов и особенно, для фермента GH12-1, показано продолжительное время полужизни при высоких температурах (в частности, время полужизни GH12-1 при 90°C составило 11 суток). Оба фермента GH12 высокоактивны и устойчивы к наличию в реакционной смеси детергентов. Для всех доменов был показан гидролиз β -глюкана, лихенана и КМЦ. Кроме того, GH5-й домен был способен катализировать гидролиз галактоманнана и ксилотглюкана. Для белка GH12-1 приведены доказательства разложения ксилана и арабиноксилана, что является новым свойством для представителей семейства GH12.

Примечательно, что кренархеота *T. adornatum* 1910b и эвриархеота *Thermococcus* sp. 2319x1 достигали схожего результата – разложения разнообразных полисахаридов за счет синергического действия нескольких гликозидаз, – только в одном случае было задействовано 4 разных белка, а в другом – один мультидоменный белок, содержащий 3 каталитических домена, отличающихся происхождением и ролью.

Суммируя вышеизложенное, можно утверждать, что использование в данной работе различных подходов, как традиционных микробиологических, молекулярно-биологических и биохимических, так омиксных и биоинформатических позволило выделить и охарактеризовать новых гипертермофильных архей-полисахаридолитиков, а также найти, выделить и охарактеризовать новые семейства гликозидаз и/или гликозидазы с новыми свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Выделены 10 штаммов гипертермофильных архей из родов *Pyrobaculum*, *Thermosphaera*, *Thermofilum* и *Infirmifilum*, растущих на различных олиго- и полисахаридах, что позволило расширить представление о метаболических возможностях и экологической роли представителей филума *Crenarchaeota*.
2. Подробно охарактеризованы гипертермофильные археи, растущие на полисахаридах с β -(1,4)-связью: *Thermococcus* sp. 2319x1 (впервые для эвриархей выявлен рост на ксилане и ксилоглюкане), *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 (впервые для рода *Pyrobaculum* показан рост на полисахаридах) и *Thermofilum adornatum* 1910b (впервые для рода *Thermofilum* показан роста на целлюлозе). У всех трех штаммов были обнаружены заякоренные на мембранах внеклеточные индуцибельные целлюлазы/ксилаказы.
3. С помощью сравнительно-геномного и протеомного подходов у *Thermofilum adornatum* 1910b были обнаружены четыре целлюлазы, две из которых не относятся к известным семействам гликозидаз и вообще не имеют родственников с предсказанной функцией, а две другие относятся к семействам для которых целлюлазной активности не было показано. В геноме штамма 2319x1 обнаружен ген, кодирующий мультидоменную гликозидазу (МДГ) с уникальной доменной организацией GH5-GH12-GH12-CBM2-CBM2. Для штаммов *T. adornatum* 1910b, *Thermococcus* sp. 2319x1 и *P. arsenaticum* 2319x2 реконструированы пути катаболизма моносахаридов.
4. Четыре рекомбинантные гликозидазы из *Thermofilum adornatum* 1910b способны гидролизовать целлюлозу, играя следующие роли: Cel45 является эндоглюканазой, в то время как остальные три – более широкоспецифичными целлюлазами. Помимо целлюлозы, все 4 фермента гидролизуют β -глюкан, лихенан и глюкоманнан, Cel30 и Cel45, кроме того, еще и ксилоглюкан.
5. Рекомбинантная мультидоменная гликозидаза *Thermococcus* sp. 2319x1, ее фрагменты и отдельные каталитические домены – GH5, GH12-1 и GH12-2 – способны гидролизовать широкий спектр β -(1-4)-полисахаридов. Белок GH12-1 является самой термостабильной известной целлюлазой и в целом одним из самых термостабильных известных ферментов: время полужизни при 100°C составляет 42 ч, а при 90°C – 284.5 ч. Также три домена отличаются по субстратной специфичности, таким образом, дополняя друг друга и делая МДГ таким широкоспецифичным ферментом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи

1. Gavrilov S.N., Stracke C., Jensen K., Menzel P., Kallnik V., Slesarev A., Sokolova T., **Zayulina K.**, Brasen K., Bonch-Osmolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I., Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319X1 and its unusual multidomain glycosidase // Front. Microbiol. – 2016. – V.7 – 552 – doi: 10.3389/fmicb.2016.00552.2.

2. Bonch-Osmolovskaya E.A., Elcheninov A.G., **Zayulina K.S.** and Kublanov I.V. New thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities // Microbiol. Austral. – 2018. – V. 39 - № 3 – P. 122-125 – doi: 10.1071/MA18038.

3. **Zayulina K.S.**, Kochetkova T.V., Piunova U.E., Ziganshin R.H., Podosokorskaya O.A., Kublanov I.V. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Thermofilum adornatum* sp. nov. uses GH1, GH3, and two novel glycosidases for cellulose hydrolysis // Front. Microbiol. – 2020 – V.10 – №2972 – doi:10.3389/fmicb.2019.02972

4. **Zayulina K.S.**, Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Kublanov I.V. Complete genome sequence of a hyperthermophilic archaeon, *Thermosphaera* sp. strain 3507, isolated from a chilean hot spring // Microbiol. Resour. Announc. – 2020 – V.9 – №50 – e01262-20 – doi:10.1128/MRA.01262-20

5. **Zayulina K.S.**, Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Kochetkova T.V., Novikov A.A., Blamey J.M., Kublanov I.V. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Infirmifilum lucidum* gen. nov. sp. nov., reclassification of *Thermofilum uzonense* as *Infirmifilum uzonense* comb. nov. and assignment of the family *Thermofilaceae* to the order *Thermofilales* ord. nov. // Syst. Appl. Microbiol. – 2021 – V.44 – №4 – 1126230 – doi:10.1016/j.syapm.2021.126230

6. Klaus T., Ninck S., Albersmeier A., Busche T., Wibberg D., Jiang J., Elcheninov A., **Zayulina K.**, Kaschani F., Bräsen C., Overkleeft H. S., Kalinowski J., Kublanov I., Kaiser M. and Siebers B. Activity-based protein profiling for the identification of novel carbohydrate-active enzyme involved in xylan degradation in the hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319x1E // Front. Microbiol. – 2021 – V.12 – 734039 – doi: 10.3389/fmicb.2021.734039

Тезисы конференций

7. **Заюлина К.С.**, Гаврилов С.Н., Елизаров И.М., Кожевникова Д.А., Подосокорская О.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Деструкция полисахаридов гипертермофильными археями // Сборник тезисов X Молодежной школы-конференции с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии»: 27-30 октября 2015 г. – Москва – С. 68-70.

8. Kublanov I., **Zayulina K.**, Stracke C., Kallnik V., Jensen K., Menzel P., Slesarev A., Bräsen C., Peng X., Bonch-Osmolovskaya E., Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319X1 and its multidomain cellulose/xylanase // Thermophiles, book of abstracts, 30 августа-4 сентября 2015 г. – Santiago de Chile – P. 97.

9. **Заюлина К.С.**, Гаврилов С.Н., Елизаров И.М., Кожевникова Д.А., Подосокорская О.А., Тошаков С.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Метаболизм сахаров двух новых гипертермофильных архей родов *Thermosoccus* и *Pyrobaculum* // Acta Naturae научные труды: V съезд биохимиков России. Спецвыпуск Т2: 4-8 октября 2016 г. – Сочи-Дагомыс – С. 206.
10. **Заюлина К.С.**, Кубланов И.В., Гаврилов С.Н., Соколова Т.Г., Слесарев А.И., Бонч-Осмоловская Е.А. Гипертермофильные археи и их способности к разложению полисахаридов // Молодежная научно-практическая школа «Современные методы молекулярной биологии и биотехнологии: изучение и использование потенциала микроорганизмов, функционирующих в экстремальных условиях окружающей среды, NorthBiotechYoung 2017» 27 февраля – 1 марта 2017. – Архангельск – С. 8.
11. **Заюлина К.С.**, Гаврилов С.Н., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Гипертермофильные археи-гидролитики из горячих источников Кунашира и Чили // Материалы 1-го Российского Микробиологического Конгресса: 17-18 октября 2017 г. – Пущино – С. 105.
12. Елизаров И.М., Лопатин С.А., **Заюлина К.С.**, Кубланов И.В., Гаврилов С.Н. Субстрат и хелатор: участие ксилана в процессе восстановления нерастворимых соединений трёхвалентного железа // Материалы 1-го Российского Микробиологического Конгресса: 17-18 октября 2017 г. – Пущино – С. 98.
13. **Zayulina K.**, Piunova U., Kochetkova T., Kublanov I. Comparative genomic analysis of *Thermofilum* genus: insights into polysaccharide degradation and carbohydrate metabolism. Bioinformatics from algorithms to applications. Conference proceedings & conference schedule, 16-19 July, 2018. Saint Petersburg, Russia. – P. 37-38.
14. Piunova U., **Zayulina K.**, Kochetkova T., Kublanov I. Supplier dependent metabolism of *Thermofilaceae* family representatives. Bioinformatics from algorithms to applications. Conference proceedings & conference schedule, 16-19 July, 2018. Saint Petersburg, Russia – P. 42-43.
15. **Zayulina K.**, Piunova U., Kochetkova T., Kublanov I. Comparative genomic analysis of the representatives of genus *Thermofilum*: insights into the central metabolism and specific features of biosynthetic pathways. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS2019); 7-11 July 2019 (Glasgow, Scotland). Abstract Book, P. 1288.
16. **Заюлина К.С.**, Пиунова У.Е., Кочеткова Т.В., Тошаков С.В., Кубланов И.В. Сравнительная геномика представителей рода *Thermofilum*: изучение особенностей метаболизма сахаров и биосинтетических путей. 2-ой Российский Микробиологический Конгресс. 23-27 сентября 2019 (Саранск, Россия). Сборник тезисов – С. 110.
17. **Заюлина К.С.**, Малышева А.Д., Кубланов И.В. Выделение и характеристика новых термостабильных гликозидаз гипертермофильной археи *Thermofilum adornatum* 1910b // 3-й Российский Микробиологический конгресс, Псков (Россия), 26 сентября - 1 октября 2021 г.: материалы конгресса – С. 69.