

УДК 577.21+579.258+57.044

**ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИЙ В ПРОМОТОРЕ НА ЭКСПРЕССИЮ
ГЕНА ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS***

А.А. Тойменцева, Е.И. Шагимарданова, А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова

Аннотация

Исследована экспрессия гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* с различной длиной 5'-нетранслируемой области. Установлено, что изменение длины промотора приводит к снижению уровня экспрессии гена *gseBi* и сдвигу максимумов накопления фермента в среде относительно контроля. Обнаружено, что общие закономерности биосинтеза фермента в условиях солевого стресса не зависят от длины промотора гена, однако при полноценном промоторе продуктивность штамма в 1.5 раза выше. Установлено, что делеции в регуляторной области гена на расстоянии более 300 п.о. от точки инициации транскрипции, содержащие потенциальные сайты взаимодействия с регуляторными белками Sro0A, DegU, CsrA, приводят к потере чувствительности экспрессии гена *gseBi* в отношении глюкозо-катаболитной репрессии.

Ключевые слова: глутамилэндопептидаза, *Bacillus intermedius*, модификация промотора, регуляция экспрессии, сайты регуляции, солевой стресс, катаболитная репрессия.

Введение

Большинство протеолитических ферментов, используемых в мировой промышленности, производится на основе микроорганизмов, принадлежащих к роду *Bacillus* [1, р. 3]. Эта практика обоснована непатогенностью бацилл и простотой выделения внеклеточных гидролаз. Кроме того, протеазы занимают центральное положение в физиологии микробной клетки. Они выполняют трофическую функцию, участвуют в споруляции, прорастании спор, расщеплении и круговороте белков, что является основанием для исследования регуляторных механизмов экспрессии и секреции этих стратегически важных клеточных ферментов, клонирования их генов и скрининга и модификаций целевых продуктов практического назначения [2].

Bacillus intermedius 3-19 в постэкспоненциальной фазе роста секретируют различные внеклеточные протеазы, среди которых менее 10% приходится на глутамилэндопептидазу (GseBi) [3]. Глутамилэндопептидаза *B. intermedius* – химотрипсинподобная сериновая протеаза, с высокой специфичностью гидролизующая пептидные связи, образованные α -карбоксильными группами глутаминовой и аспарагиновой аминокислот [4]. Фермент выделен из культуральной жидкости до гомогенного состояния [12], ген белка клонирован и секвенирован (AN Y15136) [5]. Изучены условия накопления глутамилэндопептидазы в рекомбинантных штаммах: фермент появляется в культуральной жидкости на стадии замедления роста культуры, его активность достигает максимума в стационарной фазе [6]. В этот период на синтез глутамилэндопептидазы не оказывает влияния

глюкозо-катаболитная репрессия [7]. Установлено оптимальное соотношение основных компонентов питательной среды для максимального накопления фермента [8]. Описана и проанализирована регуляторная область гена *gseBi*: выявлены потенциальные сайты взаимодействия с белками двухкомпонентных сигнальных систем, глобальных регуляторов и альтернативных сигма-факторов [7]. Показано, что сокращение 3'-некодирующего региона гена *gseBi*, ответственного за терминацию, приводит к уменьшению активной продукции протеазы в клетках *B. subtilis* [9].

Исследование секретируемой глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 является важным не только с точки зрения узкой субстратной специфичности фермента и его высокого потенциала практического использования, но также для понимания фундаментального механизма регуляции экспрессии гена фермента на поздних стадиях развития культуры и в условиях стресса. Настоящая работа посвящена изучению влияния длины промотора на экспрессию гена глутамилэндопептидазы, в том числе в условиях стресса.

1. Материалы и методы

Штаммы и плазмиды. В работе использовали мультикопийную плазмиду Δ58.21, содержащую полный ген глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 [5]. Для клонирования модифицированных генов *gseBi* был использован вектор pUP110 из музея Казанского университета. В качестве штаммов-реципиентов плазмидной ДНК использовали штамм *B. subtilis* JB 20-36 дефицитный по собственным внеклеточным протеазам (Ferrari, USA). Плазмиды, использованные и полученные в работе, перечислены в табл. 1.

Табл. 1.

Использованные в работе плазмиды

Название плазмиды	Генотип	Размер, т.п.н.	Ссылки
Δ58.21	Сm ^R *, <i>gseBi</i> (с длиной промотора – 665 п.о.)	6.136	ИМГ РАН [5]
pUP110	Кm ^R	3.571	КФУ
pLAD	Кm ^R , <i>gseBi</i> (модифицированный промотор – 364 п.о.)	4.860	Получена в работе
pPD	Кm ^R , <i>gseBi</i> (модифицированный промотор – 215 п.о.)	4.710	Получена в работе

* Кm – канамицин, Сm – хлорамфеникол, R – резистентность.

Питательные среды. Для культивирования рекомбинантных штаммов *B. subtilis* использовали среду LB [10, p. 756]. Для создания условий солевого стресса в среду дополнительно вносили хлорид натрия до конечных концентраций 0.5 и 1 М. Посевным материалом служила 15-часовая ночная культура (1 об. %), выращенная на контрольной среде с добавлением антибиотика. Культивирование клеток рекомбинантных штаммов проводили в колбах объемом 100 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1/7 на качалке (200 об./мин) при 37 °С. Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при длине волны 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах светопоглощения в кювете с длиной оптического пути 1 см (культуральную жидкость с клетками разводили в соответствующее число раз в случае больших величин ОП).

1 aagctttcttctcagaaagaagcaagtcatttaccttttagatcagccgattcaaatgaga
 61 gaattacttgcgtcacatggtgagcttcaagagcctgcaacacgtacgcagcctaagagag
 121 ctcgcagcatatacagtttgtccgcctcaccgcgtggagccttgagcaaatggctggtgaa
 181 gcatatcaagaagccggttttaaagaaacgagtaaccaTGC^{TGG}Acttattagatcaaatat
 241 gaagcgtgtgagctgccgtttgTgcacttttttagcacttttaccaggttgaagccgcg
 301 tattactcaatttctagctcaccaaaagtcgaagaaaaagagtcagtatcacagTGGCG
 361 GTtgTgaaaggtaaagcaTggagcgcgcgagaaatcgccggagtcgcatcaaacattt
 421 tatgcggtccttcaggcaggagaagaagtcgcctgcttccctccacgaagcgcaggcagga
 481 ttccagctgccaccttcatctgaagtaccgatgatcatgatcggaccgggtacaggaatc
 541 gctccatttagagggttgttcaggcaagagaagtgtggcagaaggaaggaanccacta
 601 gqcgagctcacctgtattttgctgctgcctcaccctctTGAAGATgatctgtatttgag
 661 gaaatgcagcttgcagcgcaaaaaggagttgttcacatccaccgggcttattctcgtcac
 721 aaagagcaaaaagtatatgtccagcatttgttgaagagacggcgcatgctgatcaag
 781 ttacttga^{GluLAD}ccaaggtgggtatctttacgtgtgcggggacggaagttatggcaccagac
 841 gtagaggctacgcttatcgacctctatcaaaacgagaacattgctcgaaggaacagct
 901 gaaaattggcTgaca^{GluPD}acccttgcaaatgacaatagatatgtaaaagatgtgtggagcTga
 961 aaaattaggaagaccgccaatttagcggttttttctatttcatagagagagatcaataga
 1021atgaaggtTggaaagatacaaaacacctaatttataaaatgaaatattttgtaaaaataa
 -35 -10 +1
 1081gaatattctctcatttactccaatatgaaacaatcgtatgatttttgatataggacataa
 SD M
 1141aggaggaatatgatg

Рис. 1. Схема промотора гена *gseVi*. Жирным шрифтом и прописными буквами выделены участки с гомологией к *Spo0A*-боксу. Двойным подчеркиванием выделены потенциальные сайты связывания с белком *DegU*. Обведены в рамку предполагаемые последовательности для связывания с белком *CsrA*. Тенью обозначена область с гомологией к последовательности для связывания с белком *AbrB*. -35 и -10 – области узнавания РНК полимеразы; +1 – точка инициации транскрипции; SD – последовательность Шайна – Дальгарно. Стрелочками на рисунке показаны выбранные участки, по которым проводили укорачивание регуляторной области

Конструирование укороченной области регуляции гена *gseVi*. При использовании алгоритма BLAST и комплекса программ, представленных на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), был проведен поиск консервативных мотивов в промоторной области гена глутамилэндопептидазы. Вероятное расположение потенциальных сайтов связывания с регуляторными белками *DegU* и *Spo0A*, глобального регулятора *CsrA* [7] послужило основанием для модификации регуляторной области гена. Схема получения модифицированных генов *gseVi* приведена на рис. 1, 2. На рис. 1 указаны оставшиеся участки промотора, которые содержат плазмиды *pLAD* и *pPD*. На первой стадии амплифицировали ген протеазы при использовании пар праймеров *GluLAD-GluSTOP* и *GluPD-GluSTOP* (табл. 2). Полученные фрагменты ДНК рестрицировали по сайтам *BamHI*, *HindIII* и лигировали в бациллярный вектор *pUP110*, предварительно рестрицированный по этим же сайтам. Полученные конструкции были обозначены *pLAD*, *pPD* соответственно.

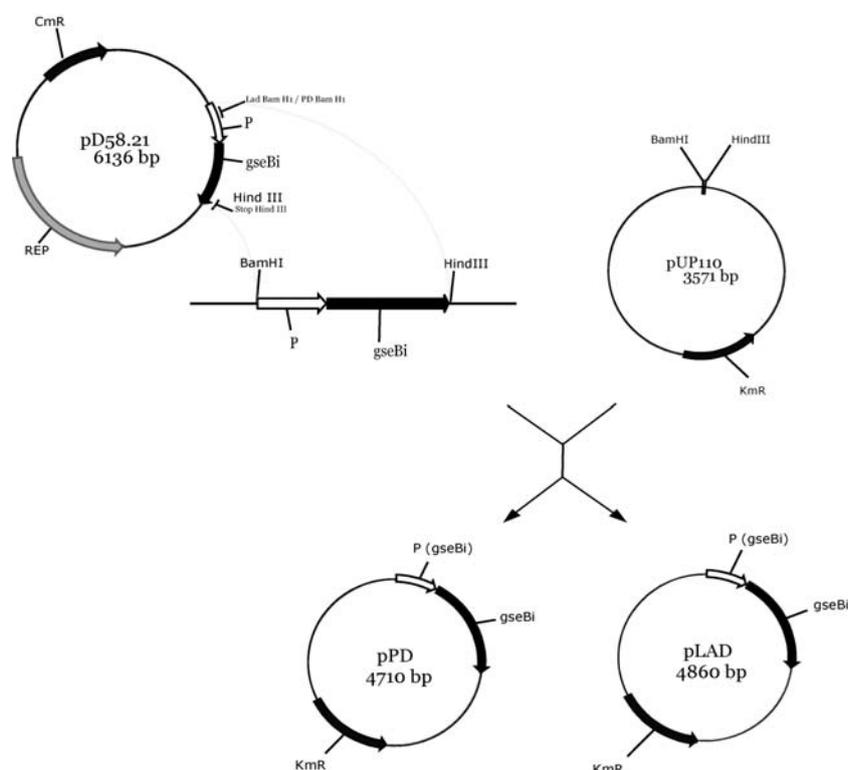


Рис. 2. Схема конструирования плазмид, несущих ген *gseBi* с различной длиной 5'-нетранслируемой области регуляции. На первой стадии получали амплификаты, содержащие ген протеазы и участок промотора. Для этого были сконструированы синтетические олигонуклеотиды специфичные к 5'-концевой области промотора и 3'-концевой структурной области гена (табл. 2). При использовании олигонуклеотидных пар (GluLAD-GluSTOP и GluPD-GluSTOP) регуляторная 5'-область гена глутамилэндопептидазы укорачивалась до 364 и 215 п.о. соответственно. Полученные амплифицированные фрагменты полностью расщепляли по сайтам BamHI, HindIII и клонировали по одноименным сайтам в бактериальный вектор pUP110. Отобранные конструкции получили названия pLAD, pPD соответственно

Табл. 2

Олигонуклеотиды, использованные в работе (производство фирмы "Syntol", г. Москва). Сайты узнавания для рестриктаз BamHI и HindIII подчеркнуты

Название	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
GluLAD (5')	5' AGTTACGGATCCAAGGTGGGTATCTTTACG 3'
GluPD (5')	5' GACAATGGATCCGTAAAAGATGTGTGGAG 3'
GluSTOP (3')	5 ATAAGGAAGCTTCAGTGATCCAGCCTCTTC 3'

Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили как описано в [11]. Определение протеолитической активности проводили по методу, описанному ранее [12]. Субстратом служил пара-нитроанилид карбобензокси-L-глутаминовой кислоты (Z-Glu-pNA). За единицу протеолитической активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Полученный результат умножали на коэффициент 1000.

Продуктивность культуры в отношении синтеза глутамилэндопептидазы (удельная активность) определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к величине биомассы и выражали в условных единицах.

При анализе результатов экспериментов использовали общепринятые методы статистической обработки. При этом статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ SPSS 12.0. Рассчитывали среднеквадратичное отклонение (σ), результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

2. Результаты и их обсуждение

Анализ регуляторной области гена *gseBi*. Особенностью экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 является его способность к индукции в период формирования клетками различных адаптивных реакций в ответ на дефицит питательных веществ, стрессовое воздействие, переход в анабиотическое состояние [8, 13]. Подобная регуляция, вероятно, достигается путем смены регуляторных факторов в разные периоды роста бациллярной клетки. Ранее в 5'-регуляторной области гена *gseBi* обнаружены потенциальные последовательности для специфического взаимодействия с регуляторными белками DegU (AGAA N₁₁₋₁₃TTCAG) и Spo0A (TGTCGAA), сайт связывания с белком катаболического контроля CsrA (TGWAARCGYTWNCW), а также идентифицирована последовательность для взаимодействия с белком AbrB (WAWWTTTWCAAAAAW) (рис. 1) [7]. Для выяснения вклада данных систем в контроль экспрессии гена фермента были получены две модификации гена *gseBi* с укороченными промоторами. В первом случае создана плаزمида pLAD, несущая ген *gseBi*, в промоторе которого имеются следующие потенциальные сайты взаимодействия с регуляторными белками: три CsrA, два DegU и по одному Spo0A и AbrB. Плазмида pPD несет регуляторную область гена *gseBi*, которая содержит два DegU и два CsrA бокса.

Биосинтез глутамилэндопептидазы под контролем делеционных промоторов. Исследованы динамика роста культуры и изменение накопления глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости в процессе роста двух рекомбинантных штаммов *B. subtilis* (pLAD и pPD) на среде LB. Результаты представлены на рис. 3. Рост клеток рекомбинантных штаммов практически не отличался друг от друга: через 10–12 ч заканчивается логарифмическая фаза роста и обе культуры переходят в стационарную фазу роста к 20-му часу. Глутамилэндопептидаза появляется в культуральной жидкости обоих штаммов на стадии замедления роста культуры. Обнаружено два пика с максимальной протеолитической активностью фермента в отношении специфического субстрата для глутамилэндопептидазы – Z-Glu-pNA (рис. 3). Первый пик в рекомбинантном штамме *B. subtilis* pLAD приходится на 24-й час роста бактерий. У штамма *B. subtilis*, трансформированного плазмидой pPD, первый пик синтеза фермента приходится на 28-й час, что соответствует началу стационарной фазы. Второй максимум накопления активности протеазы в культуральной жидкости приходится

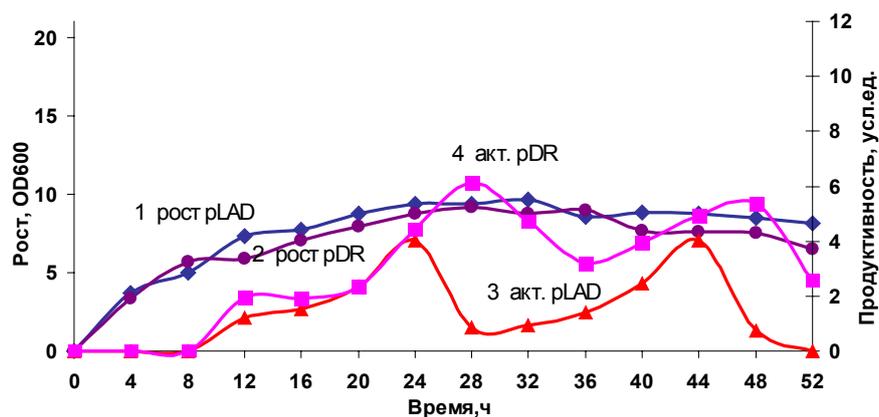


Рис. 3. Динамика роста культуры и биосинтеза глутамилэндопептидазы в рекомбинантном штамме *B. subtilis*, содержащем плазмиды pLAD и pDR с укороченной 5'-областью регуляции гена *gseBi* на среде LB: удельная скорость роста клеток *B. subtilis* pLAD (1), *B. subtilis* pPD (2); продуктивность фермента штаммами *B. subtilis* pLAD (3), *B. subtilis* pPD (4)

на 44-й (*B. subtilis* pLAD) и 48-й (*B. subtilis* pPD) часы роста бактерий, то есть в поздней стационарной фазе. Результаты в отношении накопления глутамилэндопептидазы с полной регуляторной областью в рекомбинантном штамме *B. subtilis* Δ58.21 были представлены ранее: первый пик активности приходится на 20-й час роста, второй – на 48-й [13].

Изучение динамики роста и накопления фермента в культуральной жидкости на среде LB показало, что отсутствие последовательности (содержащей большинство потенциальных сайтов связывания с белками DegU, Spo0A, CspA) выше 365 п.о. от точки +1 приводит к снижению уровня экспрессии гена *gseBi* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* pLAD и pPD по сравнению со штаммом, несущим полную регуляторную область гена фермента.

Влияние солевого стресса на биосинтез модифицированных генов *gseBi*.

Согласно данным литературы секреция щелочных протеаз у бацилл коррелирует с активностью двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU [14]. Наличие в промоторе гена глутамилэндопептидазы *B. intermedius* последовательностей нуклеотидов, характерных для связывания с регуляторным белком DegU, предполагает индукцию биосинтеза фермента в условиях солевого стресса. Нами исследовано влияние высоких концентраций солей на уровень биосинтеза глутамилэндопептидазы в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* несущих плазмиды pLAD и pPD. Динамика роста культуры и биосинтеза фермента рекомбинантными штаммами на средах, содержащих хлорид натрия, представлена на рис. 4 и 5. Внесение в среду 0.5 М NaCl подавляло рост обоих рекомбинантных штаммов. При этом продуктивность клеток в отношении синтеза протеазы также уменьшалась в 2–3 раза (рис. 4). Увеличение концентрации соли в среде до 1 М вызывало значительное увеличение продуктивности биосинтеза глутамилэндопептидазы в 6–10 раз в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* (pPD

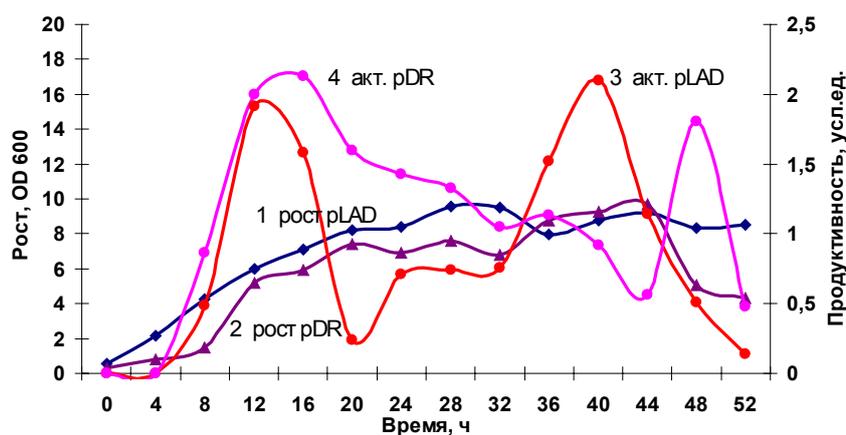


Рис. 4. Влияние 0.5 М NaCl на динамику роста и продуктивность фермента глутами-лэндопептидазы в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*: удельная скорость роста клеток *B. subtilis* с плазмидами pLAD (1) и pPD (2); продуктивность протеазы в штаммах *B. subtilis* pLAD (3) и pPD (4)

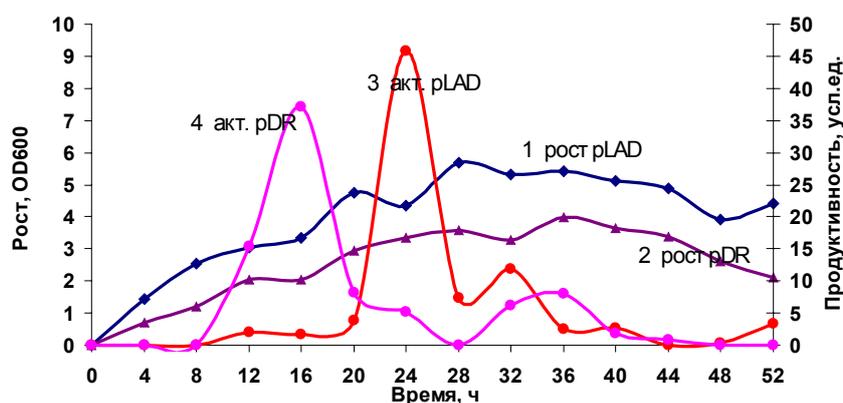


Рис. 5. Влияние 1 М NaCl на динамику роста и продуктивность глутами-лэндопептидазы в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*: удельная скорость роста клеток *B. subtilis* с плазмидами pLAD (1) и pPD (2); продуктивность протеазы в штаммах *B. subtilis* pLAD (3) и pPD (4).

и pLAD соответственно) (рис. 5). Полученные данные в отношении влияния NaCl на биосинтез глутами-лэндопептидазы говорят о положительной регуляции экспрессии гена *gseVi* со стороны сохранившихся участков промотора, содержащих два потенциальных сайта регуляции для системы DegS-DegU.

Влияние глюкозо-катаболитной репрессии на биосинтез модифицированной глутами-лэндопептидазы. Интересные данные получены при культивировании рекомбинантных штаммов на среде, содержащей 1%-ную глюкозу. По данным исследователей известно, что в присутствии глюкозы активизируется механизм катаболитной репрессии [15, 16]. Ранее в нашей лаборатории установлено, что синтез глутами-лэндопептидазы подвержен влиянию данной системы

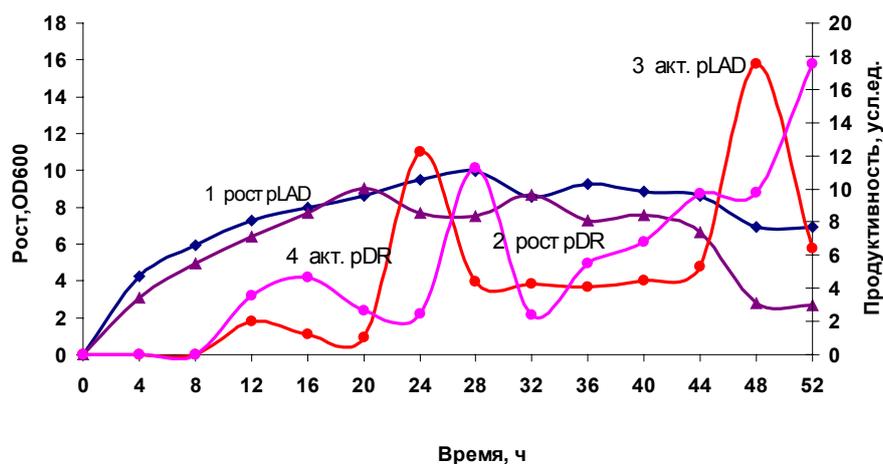


Рис. 6. Влияние 1%-ной глюкозы на динамику роста и продуктивность глутамилэндопептидазы в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*: удельная скорость роста клеток *B. subtilis* с плазмидами pLAD (1) и pPD (2); продуктивность протеазы в штаммах *B. subtilis* pLAD (3) и pPD (4)

регуляции, если глюкозу вносить в среду в начальной стадии культивирования (0–10-й часы роста, вегетативный рост) [7]. После 20-го часа роста, то есть в стационарной фазе, биосинтез фермента не чувствителен к добавлению глюкозы в среду, активность фермента не снижается после добавления индуктора [7]. Тем не менее наши результаты показали, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы сохраняется на достаточно высоком уровне в присутствии глюкозы в среде (рис. 6).

Первый пик активности рекомбинантного штамма *B. subtilis* pLAD на среде с глюкозой наблюдали на 24-й час, а второй – на 48-й. Что касается штамма, содержащего плазмиду pPD, активность наблюдалась на 24-й и 52-й часы культивирования.

Таким образом, нами впервые получены данные, свидетельствующие о том, что модификация промоторов приводит к потере чувствительности к катаболитной репрессии. По-видимому, в результате делеций в модифицированных промоторах гена *gseBi* нет либо недостаточно сайтов для запуска системы катаболитной репрессии. Можно предположить, что идентифицированные нами в ходе геноинформационного анализа сайты регуляции (СсрА боксы) либо неактивны в данной системе экспрессии, либо близко расположены относительно стартовой точки гена *gseBi*, что может являться препятствием для правильного связывания РНК-полимеразы с модифицированным промотором гена *gseBi*.

Работа поддержана грантами: РФФИ (проект № 09-04-99044), Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 годы (ГК № П323), Аналитической ведомственной целевой Федеральной программы (РНП 2.11.1005).

Summary

A.A. Toymentseva, E.I. Shagimardanova, A.R. Kayumov, M.R. Sharipova. Biosynthesis of *Bacillus intermedius* Glutamyl Endopeptidase under Control of Promoter Region with Different Lengths.

The expression of the *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene was investigated for different length of its regulatory region. It was proved that the change of the length of the promoter region results in the decrease of the *gseBi* gene expression level and the shift of the protease accumulation maximums in the medium relative to control. It was also found that the enzyme biosynthesis in salt stress conditions does not depend on the length of the 5'-region. However, with the full-length promoter region the strain's productivity is 1.5 times higher. It was ascertained that the reduction of the promoter region up to 365 bp, when there is no potential binding sites for the regulatory Spo0A, DegU, and CspA proteins, leads to the loss of sensitivity of the *gseBi* gene expression to the glucose catabolite repression.

Key words: glutamyl endopeptidase, *Bacillus intermedius*, promoter modification, expression control, potential binding sites, salt stress, catabolite repression.

Литература

1. Godfrey T., West S. Introduction to industrial enzymology // Industrial enzymology / Eds. T. Godfrey, S. West. – N. Y.: Macmillan Publ. Inc., 1996. – P. 1–8.
2. Mala B.R., Aparn M.T., Mohini S.G., Vasanti V.D. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – V. 62, No 3. – P. 597–635.
3. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Шилова М.А., Кадырова Ю.М., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б. Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* // Микробиол. – 2002. – Т. 71, № 4. – С. 494–499.
4. Руденская Г.Н. Глутамилэндопептидазы микроорганизмов – новое подсемейство химотрипсиноподобных протеиназ // Биоорг. химия. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 256–261.
5. Rebrikov D.V., Akimkina T.V., Shevelev A.B., Demiduyk I.V., Bushueva A.M., Kostrov S.V., Chestukhina G.G., Stepanov V.M. *Bacillus intermedim* glutamyl endopeptidase. Molecular cloning and nucleotide sequence of the structural gene // J. Prot. Chem. – 1999. – V. 18, No 1. – P. 21–27.
6. Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Марданова А.М., Токмакова Ю.С., Соколова Е.А., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б. Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* 3-19 на поздних стадиях спорообразования // Микробиол. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 338–342.
7. Sharipova M.R., Shagimardanova E.I., Chastukhina I.B., Shamsutdinov T.R., Balaban N.P., Mardanova A.M., Rudenskaya G.N., Demidyuk I.D., Kostrov S.V. The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains // Mol. Biol. Rep. – 2007. – V. 34, No 2. – P. 79–87.
8. Частухина И.Б., Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Сафина Д.Р., Костров С.В., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б. Регуляция биосинтеза внеклеточной глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* на стадии спорообразования // Микробиол. – 2004. – Т. 73, № 3. – С. 335–342.
9. Gasanov E.V., Romanova D.V., Gromova T.Iu., Demidiuk I.V. Effect of deletion of 3'-noncoding region of the *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene on the active protein production level in the culture of the *B. subtilis* cells // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. – 2007. – No 2. – P. 31–32.

10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1659 p.
11. Chang S., Cohen S.N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA // Mol. Gen. Genet. – 1979. – V. 168, No 1. – P. 111–115.
12. Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovitch E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius*, strain 3-19 // FEBS Lett. – 1997. – V. 404, No 2–3. – P. 241–244.
13. Частухина И.Б., Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Костров С.В., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б. Особенности биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными клетками *Bacillus subtilis* в стационарной фазе роста // Микробиол. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 39–47.
14. Steil L., Hoffmann T., Budde I., Volker U., Bremer E. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185, No 21. – P. 6358–6370.
15. Henkin T.M. The role of the CspA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Lett. – 1996. – V. 135, No 1. – P. 9–15.
16. Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2009. – V. 73, No 2. – P. 245–259.

Поступила в редакцию
22.03.10

Тойменцева Анна Александровна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: TojmencevaAA@mail.ru

Шагимарданова Елена Ильясовна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: elenakazan@yahoo.com

Каюмов Айрат Рашитович – кандидат биологических наук, ассистент кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: kairatr@yandex.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru