

На правах рукописи

УДК 579.852.11

**КАЮМОВ АЙРАТ РАШИТОВИЧ**

**СТРУКТУРА ГЕНА СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ  
*BACILLUS INTERMEDIUS* И РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО ЭКСПРЕССИИ**

03.00.07 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2006

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии ГОУВПО Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор  
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, с.н.с.  
Коксин Владимир Петрович  
(РЦПБ СПИД, Казань)

Доктор биологических наук, с.н.с.  
Чернова Ольга Александровна  
(КИББ РАН, Казань)

Ведущая организация: Институт им. Белозерского МГУ (г. Москва)

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете, 420008, г.Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание, ауд. \_\_\_\_\_.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2006 г.

И.о. ученого секретаря  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

З.И.Абрамова

**Актуальность проблемы.** Эффективность метаболизма бактериальной клетки определяется балансом процессов анаболизма и катаболизма. На их активацию и репрессию влияют факторы окружающей среды. У бактерий выработались механизмы, позволяющие координировать метаболизм в зависимости от доступности и разнообразия питательных веществ. Долгое время исследования ученых были посвящены выяснению роли индивидуальных сигнальных систем. Взаимодействие различных регуляторных путей и их приоритетность все чаще становятся объектом внимания исследователей. Множественная регуляция экспрессии катаболитных генов отражается на организации структуры их промоторов. Анализ взаимного расположения сайтов регуляции в промоторной области гена позволяет предсказать возможные механизмы активации его транскрипции. Несмотря на революционный прорыв современных методов биоинформатики и молекулярной биологии идентификация участков взаимодействия с регуляторами транскрипции является сложной задачей. Даже в бактериальных клетках пока не установлены функции всех факторов транскрипции, обнаруженных при секвенировании геномов. Для многих из идентифицированных регуляторных белков остается невыясненной последовательность нуклеотидов в сайтах взаимодействия с ДНК (Joseph et al., 2005). Несмотря на это, методы биоинформатики позволяют прогнозировать результаты с высокой точностью (95-98%) (Mironov et al., 1999).

Бактерии *Bacillus intermedius* секретируют различные протеиназы, среди которых доминирует субтилизиноподобная сериновая протеиназа (AprVi), ее доля составляет до 80% от пула внеклеточных протеиназ, выделяемых этими бактериями в среду (Шарипова с соавт., 2000). Белок выделен из культуральной жидкости на разных фазах роста и изучены его основные физико-химические и каталитические свойства (Балабан с соавт., 1994, 2004). Ген протеиназы клонирован в лаборатории проф. С.В.Кострова (ИМГ РАН) на плазмиде pCS9, производной вектора pCB22. Экспрессия гена *aprVi* в штамме *B.subtilis* AJ73, дефицитном по собственным внеклеточным протеиназам, показала два максимума протеолитической активности: в ранней и поздней стационарной фазах роста (Кириллова с соавт., 2006). Поздняя и ранняя протеиназы различаются по некоторым физико-химическим характеристикам и условиям биосинтеза. Предполагается, что это связано со сложной системой регуляции экспрессии гена этого фермента на различных фазах роста бактерий. Для выяснения механизмов регуляции экспрессии гена *aprVi* представляло интерес выяснить структуру гена этого фермента.

**Целью** работы явилось определение и анализ нуклеотидной последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*, и исследование влияния двухкомпонентной системы DegS-DegU и азотной катаболитной репрессии на экспрессию гена.

### **Основные задачи исследования:**

1. Определение и анализ нуклеотидной последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*, определение сайта инициации трансляции в гене *aprVi*.
2. Исследование экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* в условиях солевого стресса.
3. Выяснение роли двухкомпонентной системы DegS-DegU в регуляции экспрессии гена *aprVi*.
4. Определение вклада азотной катаболитной репрессии в регуляцию экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.
5. Исследование влияния белков NrgA и NrgB, участвующих в азотном обмене бактерий на экспрессию гена *aprVi*.

**Научная новизна.** Установлена последовательность нуклеотидов гена субтилизиноподобной протеиназы *AprVi B.intermedius*. Для анализа структуры гена применен подход, основанный на оценке его последовательности современными методами биоинформатики. Определены потенциальные сайты регуляции в промоторе гена и особенности их расположения. Установлено, что трансляция в гене *aprVi* начинается с нестандартного GTG кодона. Впервые показано, что синтез протеиназы *B.intermedius* активируется в условиях солевого стресса в отличие от субтилизина *B.subtilis*. Получены приоритетные данные о регуляции экспрессии гена *aprVi* двухкомпонентной системой трансдукции сигнала DegS-DegU. Впервые показано, что экспрессия гена протеиназы регулируется механизмом азотной катаболитной репрессии. Установлено, что в ранней стационарной фазе роста экспрессия гена *aprVi* зависит от белка NrgB, участвующего в азотном обмене бактерий.

**Практическая значимость.** Данные сиквенса гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* занесены в базу данных Международного ГенБанка (AN AY754946) и могут быть использованы для сравнительного анализа белков этой группы. Примененные в работе методы биоинформатики позволили провести анализ структуры промотора гена, что в целом расширяет представление о строении «поздних» генов, находящихся под множественной регуляцией. Полученные в работе данные о механизмах контроля синтеза внеклеточных ферментов бактерий могут быть использованы при конструировании систем экспрессии для получения высокоэффективных промышленных штаммов-продуцентов целевых белков.

**Связь работы с научными программами.** Работа выполнялась в соответствии с планом НИР КГУ (№ гос. регистрации 01.2.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования поддержаны грантами РФФИ 05-04-48182-а, Федерального агентства по образованию А04-2.12-783, Академии Наук

республики Татарстан 03-3.10-295/2004(Ф), программой ДААД и Минобрнауки РФ «Михаил Ломоносов» А/04/39635 и А/05/58617.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Определена нуклеотидная последовательность гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.
2. Экспрессия гена *aprVi* регулируется двухкомпонентной системой DegS-DegU и механизмом азотной катаболитной репрессии.

**Апробация работы** Основные положения диссертации представлены на ежегодных научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2003, 2004), школах-конференциях молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2004, 2005, 2006), Всероссийских научных конференциях "Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии" (Казань, 2004) и "Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение" (Казань, 2005), V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес» (Казань, 2005), Всероссийской конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии», (Москва, 2005), Международной конференции аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006» (Москва, 2006).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 научных работ.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность научному руководителю профессору М.Р.Шариповой за внимательное отношение к работе; к.б.н. с.н.с. Н.П.Балабан за постоянную помощь в проведении экспериментов; профессору С.В.Кострову (ИМГ РАН) за предоставление плазмид pCS9 и pCB22; профессору Ю.Йомантасу (ГНИИ Генетика и Селекция Промышленных микроорганизмов) за предоставление протеазодефицитного штамма *B.subtilis* AJ73; к.б.н. с.н.с. И.В.Демидюку (ИМГ РАН) за консультацию при проведении экспериментов по мутагенезу точки инициации трансляции; профессору К.Форшхаммеру (Университет Гиссена, Германия) за научную консультацию в области регуляции азотного обмена бактерий; профессору Я. Маартен Ван Дижлу (университет Гронингена, Голландия) за предоставление штаммов *B.subtilis*, мутантных по Deg-белкам; профессору Й.Штульке (Университет Геттингена, Германия) за предоставление штаммов *B.subtilis*, дефектных по белкам NrgA и NrgB.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 22 рисунка. Библиография содержит 252 наименования российских и зарубежных авторов.

## Материалы и методы

**Штаммы и плазмиды.** В качестве исходного штамма использовали штамм *Bacillus intermedius* 3-19 из музея Казанского университета. Штаммом-реципиентом для плазмид с геном субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* служил штамм *Bacillus subtilis* AJ73, дефицитный по внеклеточным протеиназам, предоставленный проф. Ю.Йомантасом, ГНИИ Генетика и Селекция Промышленных микроорганизмов. Штаммы *B.subtilis* 8G5  $\Delta degS \Delta degU$  (like 8G5; *degS*, *degU*; Km<sup>r</sup>), дефектный по генам *degS* и *degU*, *B.subtilis* 8G5 *degU32*(Hy) (like 8G5; *degU32*(Hy); Km<sup>r</sup>) с мутацией по гену *degU*, ведущей к Hy-фенотипу и *B.subtilis* 8G5 (*trpC2*; *tyr*; *his*; *nic*; *ura*; *rib*; *met*; *ade*; *sipP*) с полноценными регуляторными белками предоставлены доктором Я. Маартен Ван Дижлом, университет Гронингена, Голландия. Штаммы *B.subtilis* 168 (*trpC2*), *B.subtilis* GP254 (*trpC2*; *nrgA*, Cm<sup>r</sup>), *B.subtilis* GP253 (*trpC2*; *nrgB*, Cm<sup>r</sup>) предоставлены проф. Штульке, университет Геттингена, Германия. Плазмида pCS9, несущая ген *aprBi*, и вектор pCB22 предоставлены для работы проф. Костровым, ИМГ РАН, Москва. Плазмиды pKA, pKT, pKG, pKTG получены в работе на основе вектора pCB22 (Sorokin et al., 1990).

**Культивирование** штаммов *B.subtilis* проводили на среде LB (Sambrook et al., 1989) и минимальной среде Спицайзена (Saxild et al., 1987), для создания условий солевого стресса в среду LB дополнительно вносили NaCl и цитрат Na до конечных концентраций 1 М и 0,25 М, соответственно. В среду для культивирования *B.intermedius* 3-19 добавляли стрептомицин 500 мкг/мл. При выращивании рекомбинантных штаммов *B.subtilis* с плазмидами pCS9, pKA, pKT, pKG, pKTG в среду вносили эритромицин (20 мкг/мл). При культивировании штаммов *B.subtilis* с дефектами белков NrgA и NrgB в среду дополнительно вносили хлорамфеникол 20 мкг/мл, для штаммов *B.subtilis*, мутантных по белкам DegS и DegU, – канамицин 20 мкг/мл.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при 590 нм. Протеолитическую активность определяли по синтетическому хромогенному субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNA (Люблинская с соавт., 1987). Продуктивность культуры (удельную активность) определяли как отношение активности фермента в культуральной жидкости к количеству биомассы и выражали в условных единицах.

Выделение плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса (Sambrook et al., 1989). Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили как описано (Anagnostopolous et al., 1961). Трансформацию протопластов *B.subtilis* плазмидной ДНК (Chang et al., 1979) проводили при работе со штаммами, дефектными по *deg*-генам.

Определение нуклеотидной последовательности гена *aprBi* проводили методом терминации цепи дидеоксинуклеотидами в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН. Амплификацию

ДНК проводили по (Sambrook et al., 1989). 50 мкл реакционной смеси содержало: Pfu-ДНК полимеразу («Сибэнзим») – 1 единица активности, буфер для Pfu-ДНК полимеразы 10-кратный – 5 мкл, по 200 мкМоль каждого из дезоксинуклеотидов, по 10 пМоль каждого из праймеров, 0,01 мкг матричной ДНК. Рестриксию и лигирование ДНК проводили как рекомендовано фирмой производителем («Сибэнзим»).

Схема конструирования плазмид с мутациями в гене *aprVi* представлена на рис. 1. Конструирование генов протеиназы *B.intermedius* с мутацией в предполагаемом сайте инициации трансляции проводили в 2 этапа с предварительным синтезом мегапраймера как описано в (Sambrook et al., 1989). Использованные синтетические олигонуклеотиды представлены в табл. 1.

Таблица 1. Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название праймера	Последовательность праймера
Pm1	5' GAATGGGGATCCCTTGATTACAACGTGGTCAG 3'
Sub TTG	5' CTTTTTCACGCAG <b>GGATCC</b> ACATCCC 3'
Sub GTG	5' CTTTTT <b>AG</b> CGCACAATCCACATCCC 3'
Sub TTG GTG	5' CTTTTT <b>AG</b> CGCAG <b>GGATCC</b> ACATCCC 3'
Sub ATG	5' CAGCCAATAAAACACTTGT <b>TAG</b> CAC 3'
Sub term	5' AGAGAGGGATCCGAGAGGCAGGGGTGACGTCTTTTC 3'

\* Нуклеотиды, ведущие к образованию мутаций выделены жирным. Сайт узнавания рестриктазой *BamHI* подчеркнут.

На первом этапе проводили амплификацию 5'- области гена *aprVi*. Правый праймер содержал замену нуклеотидов, приводящую к мутации одного из предполагаемых иницирующих кодонов: ATG→СТА (Met→Leu), GTG→GCT (Val→Ala), TTG →TCC (Leu→Ser). Синтезированный полинуклеотид нес замену в одном из потенциальных сайтов инициации трансляции и служил левым праймером на втором этапе ПЦР, который проводился в этой же реакционной смеси после дополнительного внесения второго правого праймера, дезоксинуклеотидов и ДНК-полимеразы. У полученных линейных ДНК фосфорилировали 5'-конец киназой фага T4 и лигировали с вектором pCB22, который был предварительно линейризован рестриктазой *EcoRV*. Лигазную смесь снова рестрицировали ферментом *EcoRV*, чтобы отобрать те плазмиды, у которых имеется вставка по этому сайту. Клоны отбирали рестрикционным анализом: выделенные плазмиды рестрицировали по *BamHI* и отбирали те, при расщеплении которых образовывались фрагменты величиной 1,8 kb в случае плазмид pKA и pKG и величиной 1,4 и 0,4 kb в случае плазмид pKT и pKGT.

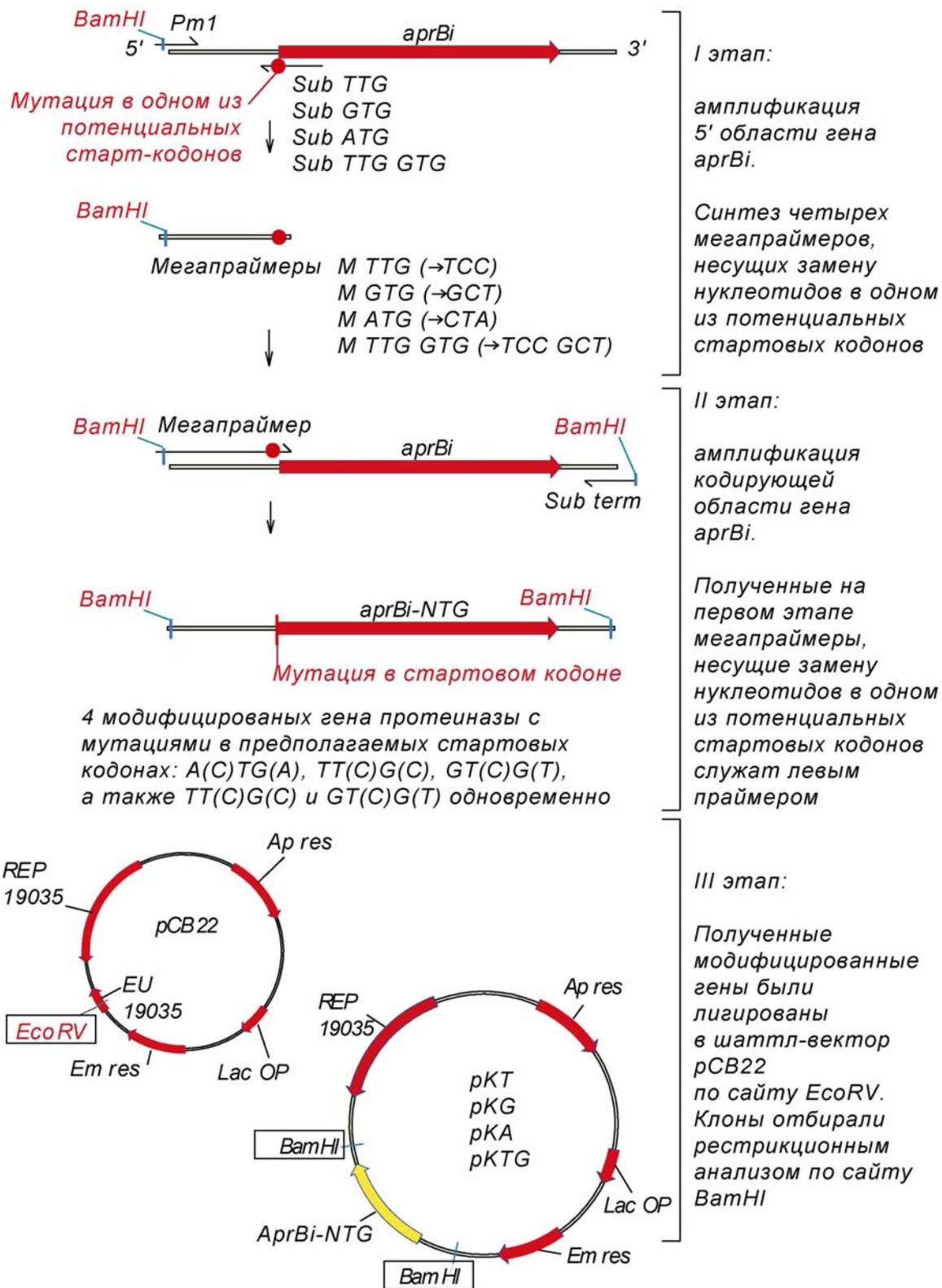


Рис. 1. Схема конструирования плазмид pKT pKG pKA и pKGT на основе вектора pCB22.

**Анализ последовательности** гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* проводили с использованием пакета программ BLAST, представленных на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1997). Поиск открытой рамки считывания и иницирующих кодонов проводили с помощью программы ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf>). Потенциальный старт-кодон трансляции определяли с использованием алгоритма SignalP (Bendtsen et al., 2004) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Потенциальные –10 и –35 области для узнавания  $\sigma^A$  фактором транскрипции в промоторной области гена *aprBi* идентифицировали с использованием сервера Softberry BPRM (<http://www.softberry.com>). Потенциальные участки связывания с  $\sigma$ -факторами транскрипции и с белками-регуляторами DegU, Spo0A, CsrA и AbrB в регуляторной области гена *aprBi* были выявлены с использованием пакета программ Vector NTI Suite 8.0.

**Математическую обработку** результатов проводили с помощью программы STATGRAPHICS Plus for Windows (Version 2.1).

### Результаты и их обсуждение

**1. Определение нуклеотидной последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* и ее анализ.** Для определения нуклеотидной последовательности была использована мультикопийная плазида pCS9, производная вектора pCB22 (Sorokin et al., 1990), содержащая клонированный фрагмент ДНК хромосомы *B.intermedius* с геном *aprBi*. Его последовательность была определена методом праймерной прогулки. Последовательность гена *aprBi* зарегистрирована в базе данных ГенБанка (AN AY754946).

В 6,06-kb участке хромосомной ДНК *B.intermedius* 3-19 идентифицирована открытая рамка считывания, которая кодирует полипептид, имеющий структурную гомологию с сериновыми протеиназами. Ее анализ выявил 3 потенциальных сайта инициации синтеза белка: TTG (1), GTG (2) и ATG (3) (рис. 2). С помощью алгоритма SignalP, позволяющего предсказать функциональную активность синтезируемого лидерного пептида, нами установлена минимальная вероятность для стартового кодона ATG (67,7%). Два других кодона (TTG и GTG) с одинаковой степенью вероятности являются потенциальными старт-кодонами (99,8% и 96,4%, соответственно).

Чтобы выяснить, какой из них является началом рамки считывания, был проведен олигонуклеотид-направленный мутагенез и сконструированы гены с модификацией каждого из предполагаемых сайтов инициации трансляции. Получены плазмиды pKA, pKT, pKG и pKTG, содержащие ген *aprBi* с мутациями в соответствующих сайтах: A(C)TG(A), TT(C)G(C), GT(C)G(T), а также TT(C)G(C) и GT(C)G(T)

одновременно (рис. 2). Экспрессию модифицированных генов изучали в протеазодефицитном штамме *B.subtilis* AJ73.

	1	2	3	
TAAGAAAAAAGGGATGTGGA	TTG	TGC	GTG	AAAAAGAAAAATGTG
			ATG	ACAAGTT pCS9
TAAGAAAAAAGGGATGTGGA	TTGTGC	<u>GCT</u>	AAAAAGAAAAATGTG	GATGACAAGTT pKG
TAAGAAAAAAGGGATGTGGA	<u>TCC</u>	TGC	GTGAAAAAGAAAAATGTG	GATGACAAGTT pKT
TAAGAAAAAAGGGATGTGGA	<u>TCC</u>	TGC	<u>GCT</u>	AAAAAGAAAAATGTG
				GATGACAAGTT pKTG
TAAGAAAAAAGGGATGTGGA	TTGTGC	GTGAAAAAGAAAAATGTG	<u>CTA</u>	ACAAGTT pKA

Рис. 2. Фрагмент последовательности гена *aprBi*. Предполагаемые старт-кодоны, идентифицированные с помощью программы ORF Finder, выделены курсивом и взяты в рамочку. Подчеркнуты триплеты, в которых проведены замены нуклеотидов и справа указаны соответствующие им плазмиды.

Динамика биосинтеза протеиназы штаммом *B.subtilis* AJ73 (pKA), несущим ген протеиназы с мутацией в сайте ATG, не отличалась от контрольного штамма *B.subtilis* AJ73 (pCS9). Эти данные позволили заключить, что кодон ATG не является стартовым. Одновременная мутация триплетов GTG и TTG привела к отсутствию экспрессии модифицированного гена протеиназы *B.intermedius* штаммом *B.subtilis* AJ73 (pKTG). Изменение сайта TTG привело к снижению уровня экспрессии гена *aprBi* в среднем в 3 раза по сравнению с контролем. Экспрессия модифицированного гена *aprBi* полностью подавлялась у рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 (pKG), что позволило заключить, что синтез протеиназы начинается с нестандартного GTG кодона. Снижение уровня протеолитической активности в штамме с мутацией кодона TTG, возможно, связано с образованием шпильки (GGATCC) между последовательностью Шайна-Дельгарно и стартовым кодоном (GTG), что могло негативно отразиться на связывании рибосомы с матричной РНК. Отметим, что секвенирование генома *B.subtilis* показало, что в генетическом аппарате бацилл, кроме классического старт-кодона ATG, в пятой части генов стартовыми являются GTG и TTG. В том числе, в гене субтилизина *B.subtilis* стартовым является кодон GTG.

Таким образом, открытая рамка считывания гена *aprBi* состоит из 1146 нуклеотидных пар, что соответствует 381 аминокислотному остатку (рис. 3). В структуре кодирующей части идентифицированы 3 основных участка, которые характерны для субтилаз: пре-, пропоследовательность и зрелый белок. Последовательность, соответствующая сигнальному пептиду, кодирует полипептид из 29 аминокислотных остатков. Он включает три положительно заряженных лизина на N-конце, гидрофобный домен (VLLAVPLLFSAGFGG), за которым следует сайт расщепления для

1 gaatggaaggtccttgattacaacgtggtcagccatttactccatcctcc  
51 ccttttttaagaacctgttattgtaacaggtnntttttnaatgccaaaacc  
102 aaaaaataatatttttttatatcgaaattcgaaatagatgctagacgtttc  
153 tacctatttttaaggcttttcgggtatcgaatatttgccgaaaatggatca  
204 taagaaaaaaagcacacttcctttttaatagataaccgctgaaacagcaga  
255 acaacatattttcccaacgtttccaagtgacttaattccccaattttcgc  
306 taggactttcacaaaaattcgggtctactcttattttgcctacttcccttaa  
-35  
357 actgaatatacagaataatcaaacgaatcatt**tcttta**tagactacgaatgat  
-10 **RBS** V K K K N  
408 **tattct**gaaataagaaaaaagggatgtggattgtg**ctg**gaaaaagaaaaat  
V M T S V L L A V P L L F S A G F  
459 gtgatgacaagtgttttattggctgtccctcttctgttttcagcagggttt  
G G S M **A N A** E T V S K S A S E K  
510 ggaggctccatggcaaagtccgagacgggtctcaaagtcagctagtgaaaag  
S Y I V G F K A S A T T N S S K K  
561 agctatattggttgcttttaaagcctctgccaccacaaaacagctctaagaaa  
Q A V T Q N G G K L E K Q Y R L I  
612 caagccgtcactcaaaatggcggaaaactagaaaagcaatatcgtcttatt  
N A A Q V K M S E Q A A K K L E H  
663 aatgccgcacaagtaaagatgtccgaacaagccgcaaaaaaacttgaacat  
D P S I A Y V E E D H K A E A Y A  
714 gaccctagcattgcttacgtagaagaagaccacaaagcagaagcatatgca  
Q T V P Y G I P Q I K A P A V H A  
765 caaacgctcccttatggaatccctcaaatacaaagctccagctgtacacgct  
Q G Y K G A N V K V A V L **D** T G I  
816 caaggttataaagggtgctaatgtcaaagtagctgtccttgatactggaatc  
H A A H P D L N V A G G A S F V P  
867 cacgctgcacatcctgacttaaatggtgcagggcggtgccagcttccgtccct  
S E P N A T Q D F Q S **H** G T H V A  
918 tcagagccaaatgccacccaagactttcaatcacatggaactcacgtagcc  
G T I A A L D N T I G V L G V A P  
969 ggaaccattgctgcccttgataacacaattggtggttcttggggctcgtcca  
S A S L Y A V K V L D R N G D G Q  
1020 agtgcttccctatatgctgttaaagtattagaccgcaatggcgcacggacaa  
Y S W I I S G I E W A V A N N M D  
1071 tacagctggatcattagcggattgaatgggctgtagccaataacatggat  
V I N M S L G G P N G S T A L K N  
1122 gtcatcaatatgagcttaggtggaccaaacggttcaacagcgttataaaat  
A V D T A N N R G V V V V A A A G  
1173 gccgttgatacagcaaataaccgcgagtcggttgttggtggcggccgcaggt  
N S G S T G S T S T V G Y P A K Y  
1224 aattcaggttccactggctctacaagtacagttggctatccagcaaaatat  
D S T I A V A N V N S S N V R N S  
1275 gattctacaattgccggtgccaatgtaaacagcagcaatgtcagaaaactcg  
S S S A G P E L D V S A P G T S I  
1326 tcttccagcgcaggtcctgaattagatgtttctgcacctggctacttctatt  
L S T V P S S G Y T S Y T G T **S** M  
1377 ttaagtacagtaccaagcagtggtacacatcttatactggaacttctatg  
A S P H V A G A A A L I L S K N P  
1428 gcgtctcctcatgtagcaggagcagcagcgttatttcttctaaaaatccg

N L S N S Q V R Q R L E N T A T P  
 1479 aacctatcaaattcacaggttcgccagcgcttagaaaaacacggcaacaccg  
 L G N S F Y Y G K G L I N A Q A A  
 1530 cttggtaactccttctattacggcaagggttaatcaacgctcaagcggct  
 S N \*  
 1581 tctaactaaACAAGCGCAAAAAAAAAATCCGGCTGATCCAGCCGGATTTTATT  
 1632 TGTTTATTGCTTCCTCGACGTTTCCTCTTTTTCCGCTGCATTTTCCATCTC  
 1683 cATGATTCTCTCCATCATGGTTGGGTGTCCATAGCGGAAGACSTTCACTAA  
 1734 AAGCGGTGGATTACSTGAGACAGCCCTGATTTTGCAAGCTTTTGAAAAGA  
 1785 CGTCACCCCTGCCTCTCCGTCTTTTGTCA

Рис. 3. Структура гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*. –10 и –35 области для связывания с  $\sigma$ -А фактором транскрипции выделены. Сайт расщепления сигнальной пептидазой (ANA) выделен. N-конец зрелого белка, продуцируемого нативным штаммом *B.intermedius* 3-19 (Балабан с соавт., 1994, 2004), подчеркнут. Аминокислоты, входящие в каталитическую триаду, выделены. Подчеркнуты последовательности, которые могут участвовать в формировании терминатора транскрипции.

сигнальной пептидазы (ANA). Далее следует предполагаемый пропептид из 77 аминокислот, количество которых совпадает с пропептидами протеиназы VPN *B.amyloliquefaciens* и AprP *B.pumilus*. Зрелый белок AprVi состоит из 275 аминокислот, что характерно для известных субтилаз бактерий.

В последовательности аминокислот белка идентифицированы три аминокислоты, формирующие каталитический центр – аспарагиновая кислота, гистидин и серин (D32, H64 и S221) (рис. 3) и отсутствуют остатки цистеина, что характерно для структуры субтилизиноподобных протеиназ бацилл. (Siezen et al., 1997).

Сравнительный анализ последовательности гена *aprVi* с использованием алгоритма BLAST позволил выявить высокую степень гомологии с геном субтилизиноподобной протеиназы *B.pumilus* (*aprP*): идентичность кодирующих областей составляет 94%. Большинство нуклеотидных замен локализованы в третьем положении кодонов и не оказывают влияния на аминокислотную последовательность белка. Первичная структура кодируемых белков гомологична на 98%, что объясняет сходство их физико-химических и каталитических свойств. Промоторы генов *aprVi* и *aprP* идентичны на 91%. Этот факт позволил предположить сходство механизмов регуляции их экспрессии. Выявлен 61% идентичности промоторов генов *aprVi* и субтилизина *B.subtilis* (*aprE*) на протяжении 81 пары оснований. По данным литературы, в промоторе гена *aprE* установлен сайт связывания с  $\sigma$ -А фактором транскрипции (Jan et al., 2000), который слабо выражен в гене *aprVi*. По-видимому, для эффективной транскрипции гена *aprVi* необходимы дополнительные

регуляторные факторы, повышающие сродство промотора и сигма-фактора РНК полимеразы. Кодированные области генов *aprBi* и *aprE* имеют 76% идентичности, кодируемые белки гомологичны на 70%. Выявлена идентичность в 71% со структурной областью гена субтилизина ВРН из *B.amyloliquefaciens*. Гомология наблюдается в последовательностях, формирующих каталитический центр фермента. Гомология белков составляет 70%. Выравнивание генов *aprBi* и протеиназы Карлсберг из *B.licheniformis* выявило гомологию в 80% на протяжении 88 пар оснований в области каталитического центра фермента; структура белков гомологична на 64%.

Был проведен анализ регуляторной области гена *aprBi* с целью выявления потенциальных сайтов регуляции. Она отличается повышенным содержанием А/Т пар оснований (АТ/СГ=1,96), что характерно для промоторов активно транскрибируемых генов. В этой области нами выявлены участки с гомологией к сайтам взаимодействия с минорными ( $\sigma$ -L и  $\sigma$ -H) и спороспецифичным ( $\sigma$ -E) сигма-факторами транскрипции. Обнаружен сайт связывания с белком-оператором AbrB, регулирующим экспрессию ряда генов в период перехода культуры к стационарному росту. В последовательности гена, которая соответствует лидерному пептиду, выявлен потенциальный сайт связывания с белком CsrA, контролирующим экспрессию генов по типу катаболитной репрессии. Этот факт позволяет предположить влияние 5' конца кодирующей области гена на регуляцию его экспрессии. Такие же результаты получены для рибонуклеазы *B.amyloliquefaciens*: в гене барназы существенный вклад в регуляцию экспрессии гена вносит структура препоследовательности белка. По-видимому, присутствие сайтов регуляции в кодирующей области гена широко распространено у бацилл и, возможно, характерно для ферментов, синтез которых активируется в период перехода в стационарную фазу.

В промоторе гена *aprBi* выявлены потенциальные участки для взаимодействия с регуляторными белками DegU (AGAA N<sub>11-13</sub> TTCAG)(Dartois et al., 1998) и Spo0A (TGTCGAA)(Strauch et al., 1990) (рис. 4). Эти участки расположены в виде прямых тандемных повторов на протяжении 460 пар оснований. Выявленной нами особенностью является близкое расположение и частичное перекрытие потенциальных DegU- и Spo0A-боксов друг с другом. Видимо, обе регуляторные системы не могут одновременно оказывать влияние на транскрипцию гена *aprBi* и разнесены во времени. По данным литературы, в промоторе гена *aprE* сайт взаимодействия с белком DegU, установленный экспериментально, расположен в области -150, где отсутствует гомология промоторов генов *aprE* и *aprBi*. В регуляторной области гена *aprBi* нами идентифицировано 8 потенциальных сайтов связывания с белком DegU, из них 3 имеют высокую степень гомологии к консенсусной последовательности.

gaatggaagggtccttgattacaacgtgggtcagccatttactccatcctcctta  
 aagaal|cctggttattgtaacaggtntttttnaa|tgccaaa|accaaaaaataat  
 attttttta|tatcgaa|attcgaaatagatgctagacgtttctacctattttaa  
 ggcttttcggg|tatcgaa|tatttgctccgaaaatggatcataagaaaaaaagca  
cacttcctttttaatagataac|cgctgaa|acagcagaacaacatattttccc  
 aacgtttccaag|tgactta|attccccaattttcgctaggactttcacaaaaat  
tcgggtctactcttatt|tgctact|ttcccttaaactgaata|tacagaal|aatc  
 aaacgaa|tcattcttat|agactacgaatgattattctgaaataagaaaaaagg  
 gatgtggattgtgcgtgaaaaagaaaaatgtgatg

Рис. 4. Промоторная область гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*. Spo0A-боксы выделены рамкой, DegU-боксы подчеркнуты, жирным выделены DegU-боксы с максимальной гомологией с консенсусу. Иницирующий кодон подчеркнут.

Был проведен поиск Spo0A- и DegU-боксов в промоторах генов субтилаз различных видов бацилл (*B.thuringiensis*, *B.pumilus*, *B.sp.*, *B.licheniformis*), последовательности которых находятся в свободном доступе на сайте NCBI. Нами установлено, что Spo0A- и DegU- боксы располагаются в виде прямых тандемных повторов и перекрываются друг с другом. Локализация идентифицированных DegU- боксов в промоторах генов протеиназ бацилл относительно точки инициации транскрипции и их гомология с консенсусной последовательностью, представлены в таблице 2.

Табл. 2. Расположение DegU-боксов в промоторах генов субтилизиноподобных протеиназ бацилл

Фермент	Положение DegU-боксов и степень их гомологии с консенсусами			
	<60%	60-70%	70-80%	>80%
Протеиназа <i>B.intermedius</i> 3-19	-364 -289	-65 -163 -193	-29 -116 -218	-
Протеиназа <i>B.pumilus</i> TYO-67 (AB029082),	-	-	-52 -113	-
Протеиназа AprA <i>B.thuringiensis</i> (AF170567)	-	-	-140 -207	-46
Термостабильная протеиназа <i>Bacillus</i> sp. (D13158, S50880),	-	-229 -354	-190	-83
Протеиназа Карлсберг <i>B.licheniformis</i> (X91261),	-313	-191	-273	-237

Анализ промотора гена *aprBi* не выявил потенциальных сайтов взаимодействия с белками SinR и Hpr, которые участвуют в регуляции экспрессии гена субтилизина *B.subtilis*. Также не обнаружено сайтов для связывания с белком TnrA - регулятором азотного метаболизма бацилл.

Результаты анализа позволяют заключить, что регуляция экспрессии гена *aprBi* может осуществляться при участии регуляторных систем DegS-DegU и Spo0A, а также глобальных регуляторов метаболизма CspA и AbrB. Выявленные различия в строении регуляторной области генов сериновых протеиназ *B.intermedius* и *B.subtilis* позволяют предположить различия в регуляции их экспрессии.

**2. Экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* в условиях солевого стресса и вклад системы DegS-DegU в ее регуляцию.** По данным литературы, в процессе ответа на повышение солености среды у бацилл активируется двухкомпонентная система трансдукции сигнала DegS-DegU, отвечающая за синтез ферментов деградации, таких как протеазы, рибонуклеазы, амилаза и пр. (Kunst et al., 1995; Steil et al., 2003). При этом экспрессия генов, регулируемых белками DegS и DegU, активируется или сильно подавляется в условиях солевого стресса. Нами установлено, что биосинтез субтилизиноподобной протеиназы исходным штаммом *B.intermedius* 3-19 повышается в условиях солевого стресса. В среде, содержащей 1 М хлорид натрия, удельная активность протеиназы увеличивалась в 1,5 раза, а в присутствии 0,25 М цитрата натрия – в 3 раза по сравнению с контролем (среда LB без дополнительно внесенных солей). При этом на среде с цитратом натрия рост бактерий снижался в 1,5-2 раза по сравнению с контрольной средой. По всей видимости, это связано с тем, что присутствие цитрата в среде культивирования подавляет рост микроорганизмов (Sleator et al., 2002).

Экспрессию гена протеиназы *AprBi* на средах с высоким содержанием солей в данном исследовании изучали в клетках рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Хлорид натрия в концентрации 1 М не влиял на рост рекомбинантного штамма *B. subtilis* AJ73 (pCS9) (рис. 5 а). На среде с 0,25 М цитратом натрия, как и в случае нативного штамма *B.intermedius*, накопление биомассы происходило медленнее, чем на контрольной среде (рис. 5 а). По-видимому, на среде с добавлением цитрата натрия фаза экспоненциального роста и фаза замедления роста пролонгированы, и продукция фермента сохранялась стабильно высокой до 48 ч выращивания. В этот период в культуре наблюдали единичные споры после 40-го ч роста (на бессолевой среде – после 28 ч роста), что свидетельствовало об увеличении продолжительности стадии вегетативного роста бактерий. Продуктивность культуры в отношении синтеза протеиназы увеличивалась по сравнению с контролем в 2 раза на среде с хлоридом натрия и в 15 раз на среде с цитратом натрия (рис. 5 в).

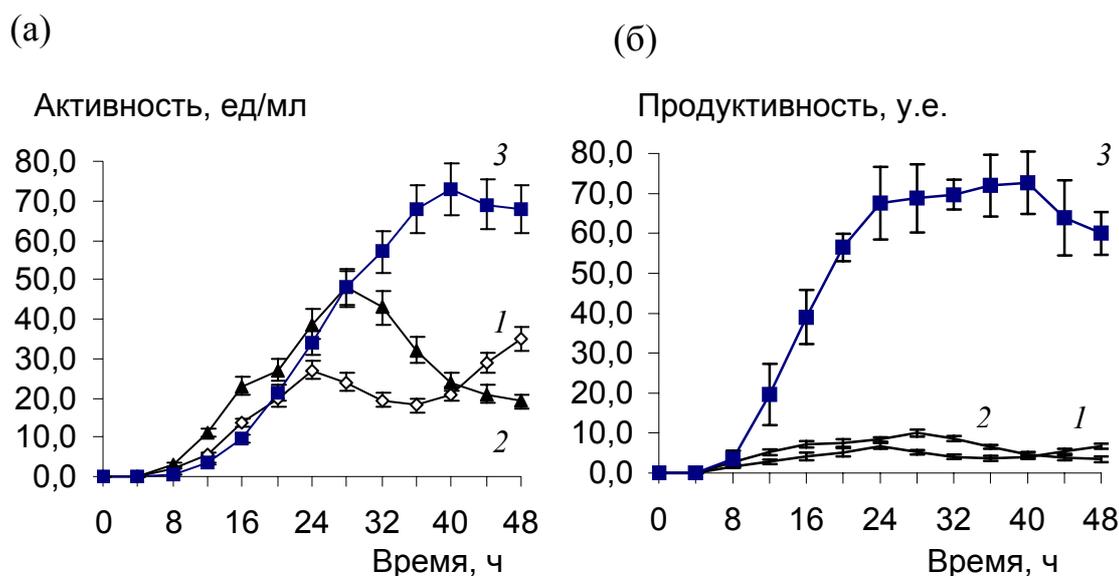


Рис. 5. Влияние высоких концентраций солей в среде культивирования на экспрессию гена *aprVi* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 (pCS9). а – накопление биомассы, б – активность, в – продуктивность. 1 – среда без дополнительного внесения солей (контроль), 2 – среда, содержащая 1 М хлорид натрия, 3 – среда, содержащая 0.25 М цитрат натрия.

Синтез фермента в условиях солевого стресса активировался позже, чем в контроле, и в течение 36 ч роста уровень протеолитической активности оставался выше контроля (рис. 5 в). Так, первый пик активности, наблюдаемый на контрольной среде на 24 ч роста (рис. 5 б), приходился на 28 ч на среде с хлоридом натрия и на 40 ч на среде с цитратом натрия. Причиной поздней активации синтеза фермента может быть увеличение продолжительности стадии вегетативного роста, в течение которой транскрипция гена *aprVi* может подавляться белками AbtV и CodY, участие которых в регуляции гена субтилизина *B.subtilis* показано экспериментально (Strauch, 1993; Molle et al., 2003). Возможно, сдвиг пиков активности фермента по времени является также следствием увеличения продолжительности лаг-фазы, в течение которой происходит адаптация бактерий к новой среде.

Полученные данные об увеличении уровня экспрессии гена протеиназы *AprVi* в условиях солевого стресса, а также выявление участков ДНК с гомологией к DegU-боксам в промоторе гена, позволили предположить участие регуляторной пары DegS-DegU в контроле экспрессии гена фермента. Экспрессию гена *aprVi* изучали в штаммах *B. subtilis*, мутантных по генам белков регуляторной системы DegS-DegU. В клетках *B.subtilis* 8G5  $\Delta degS \Delta degU$  с делецией обоих белков DegS и DegU, трансформированных плазмидой pCS9 с геном *aprVi*, на среде LB

наблюдалось снижение продуктивности протеиназы на 60% по сравнению с контрольным штаммом *B. subtilis* 8G5 (pCS9) с полноценной системой DegS-DegU (рис. 6 а).

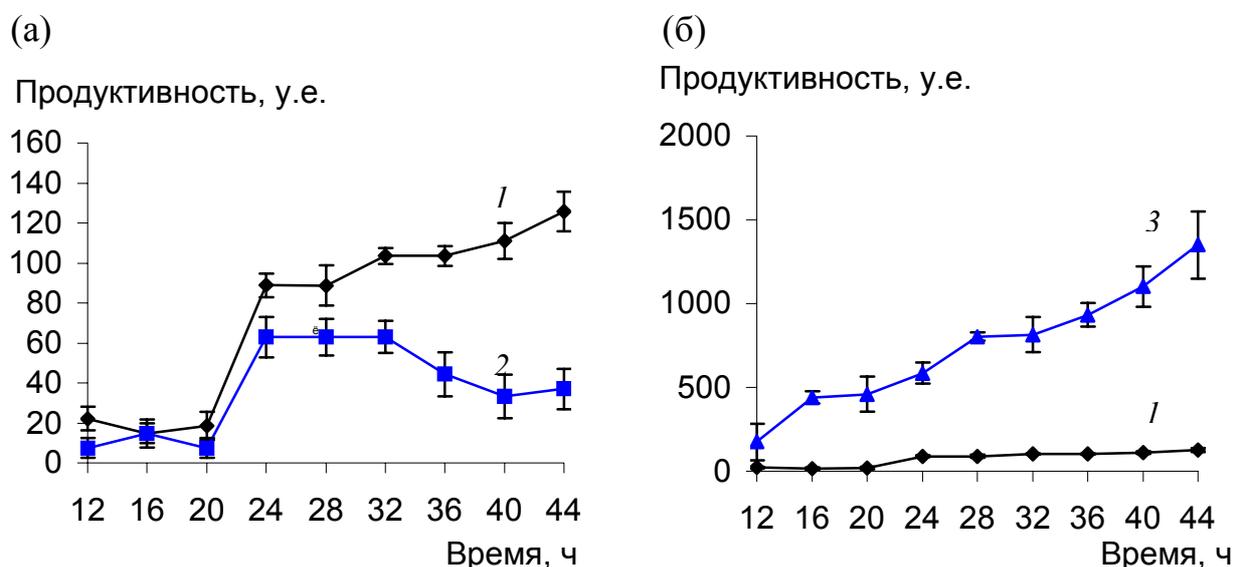


Рис. 6. Экспрессия гена *aprBi* на среде LB в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*, дефектных по регуляторным белкам DegS и DegU. 1- *B. subtilis* 8G5 (pCS9) (контроль), 2 – *B. subtilis* 8G5 $\Delta degS \Delta degU$  (pCS9), 3 - *B. subtilis* 8G5 DegU32 (Hy) (pCS9).

По-видимому, для эффективной экспрессии гена *aprBi* необходима система DegS-DegU в активном состоянии. Тем не менее, по нашим данным инактивация Deg-системы не привела к полному подавлению экспрессии гена *aprBi*, как в случае экспрессии гена субтилизина *B. subtilis* (Valle et al., 1989). По-видимому, Deg-система не является доминантной в регуляции экспрессии гена протеиназы AprBi. Возможно, это связано с перекрестной регуляцией большинства генов, входящих в состав DegS-DegU регулона, которые, как правило, подвержены регуляции со стороны нескольких регуляторных систем (Mader et al., 2002).

Экспрессию гена *aprBi* изучали в мутантном штамме *B. subtilis* 8G5 *degU32*(Hy), который характеризуется повышенной продукцией фосфорилированной формы регуляторного белка DegU. В этих мутантах наблюдается гиперпродукция белков, транскрипция генов которых позитивно регулируется белком DegU~P (Msadek et al., 1990). После трансформации этого штамма плазмидой pCS9 продуктивность в отношении протеиназы на среде LB возрастала в 6-10 раз по сравнению с контролем (рис. 6 б). Полученные данные позволили заключить, что белок DegU~P повышает уровень экспрессии гена *aprBi*, а значит, регуляторная пара DegS-DegU способна увеличить уровень синтеза фермента в определенных условиях.

Полученные результаты свидетельствуют о позитивной регуляции экспрессии гена протеиназы *B.intermedius* со стороны двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU. Этот факт указывает на участие протеиназы в адаптационных процессах клетки, протекающих в процессе перехода к стационарной фазе роста. По данным литературы, биосинтез субтилизина *B.subtilis* наоборот подавляется в условиях солевого стресса (Kunst et al., 1995). По-видимому, регуляция генов, являющихся функциональными гомологами, может различаться. Известно, что при повышенной концентрации солей в среде бактерии интенсивно накапливают в клетках различные низкомолекулярные осмопротекторы (Sleator et al., 2002; Смирнова с соавт., 2001), включающие глутатион, глутамин, глутамат и пролин, которые не синтезируются клетками, а транспортируются из окружающей среды (McLaggan et al., 1990). Интенсивная деградация различных углеродсодержащих субстратов, в том числе и белков, необходима для поддержания внутриклеточного пула низкомолекулярных веществ. Возможно, повышение уровня биосинтеза внеклеточной протеиназы, которая участвует в неспецифическом расщеплении белков до аминокислот и олигопептидов, является одним из способов защиты клетки в условиях солевого стресса.

**3. Влияние механизма азотной катаболитной репрессии и белков NrgA и NrgB на экспрессию гена *aprVi*.** В настоящее время установлена связь между углеродной и азотной катаболитной репрессией (Commichau et al., 2006). Для исходного штамма *B.intermedius* показано, что внесение хлорида или цитрата аммония в среду культивирования *B.intermedius* подавляет биосинтез сериновой протеиназы (Балабан с соавт., 2003). Этот факт позволяет нам предположить, что экспрессия гена *aprVi* может регулироваться механизмом азотной катаболитной репрессии. Предпочтительным источником азота для бактерий является аммоний, его присутствие подавляет образование ферментов утилизации альтернативных источников азота. Исследовали экспрессию гена протеиназы *AprVi* в процессе роста рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 (pCS9) на синтетических средах (SMM) с использованием в качестве источника азота хлорида аммония или нитрата натрия (рис. 7). На среде с ионами аммония уровень экспрессии гена *aprVi* снижался в 3-5 раз по сравнению с контрольной средой (рис. 7б). Это свидетельствует о том, что синтез фермента связан с азотным метаболизмом клетки. Отметим, что в присутствии аммония активный синтез протеиназы наблюдался лишь в поздней стационарной фазе роста (42-44 часы культивирования), в отличие от контрольного варианта. По-видимому, в поздней стационарной фазе включаются системы регуляции, независимые от азотного обмена (регуляция спороспецифическими сигма факторами).

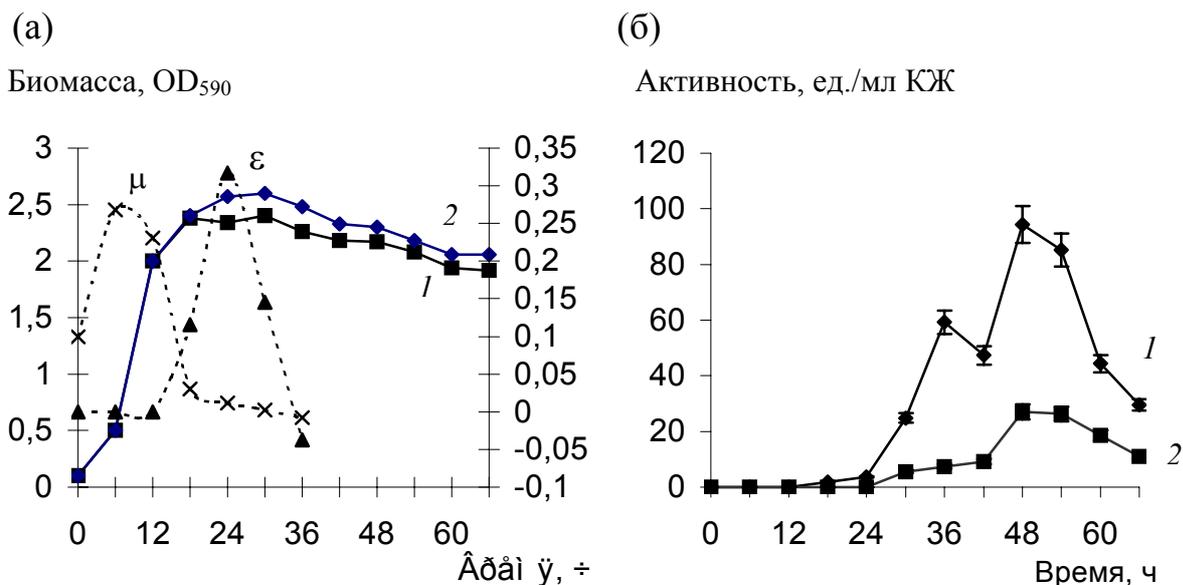


Рис. 7. Влияние источника азота в среде культивирования на экспрессию гена *aprBi* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 (pCS9). а – накопление биомассы, б – продуктивность: 1 – среда с нитратом натрия (контроль), 2 – среда, содержащая хлорид аммония.

Таким образом, полученные нами данные позволили заключить, что экспрессия гена протеиназы *B.intermedius* в переходный период регулируется механизмом азотной катаболитной репрессии.

В клетках бацилл контроль азотного метаболизма осуществляют белки CodY, TnrA и GlnR. При азотном голодании активируется фактор TnrA, который запускает транскрипцию генов, кодирующих ферменты деградации азотсодержащих субстратов. Предполагается, что в модуляции его активности принимает участие белок NrgB, который вместе с мембранным белком NrgA составляет аппарат транспорта аммония в клетки и является близким гомологом белков-регуляторов азотного метаболизма PII в грам-отрицательных бактериях (Detsch et al., 2003). Наши результаты показали, что дефект белка NrgA не влияет на экспрессию гена протеиназы (рис. 8 б): уровень экспрессии гена *aprBi* в штамме с мутацией гена *nrgA* сопоставим с контролем. В штамме с мутацией белка NrgB происходило трехкратное повышение уровня экспрессии гена *aprBi* (рис. 8 б). Отметим, что эффект наблюдался только на стадии перехода к стационарному росту.

Чтобы подтвердить предположения об участии белка NrgB в регуляции биосинтеза протеиназы *B.intermedius*, мы исследовали динамику синтеза фермента на синтетической минимальной среде (SMM), в которой источником азота служили хлорид аммония или нитрат натрия.

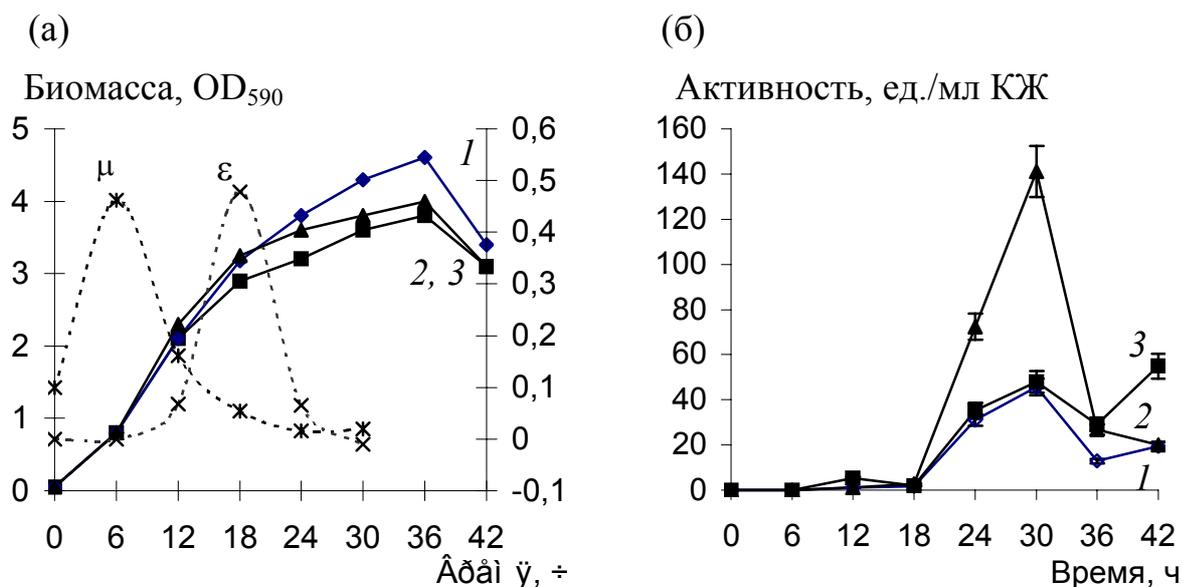


Рис. 8. Экспрессия гена *aprBi* на среде LB в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*, дефектных по белкам NrgA и NrgB. а – накопление биомассы, б – активность ед/мл культуральной жидкости: 1- *B. subtilis* 168 (pCS9) (контроль), 2 – *B. subtilis*  $\Delta nrgA$  (pCS9), 3 – *B. subtilis*  $\Delta nrgB$  (pCS9).

Эксперименты показали, что в штамме, дефектном по белку NrgA, сохраняется зависимость экспрессии гена от системы азотной регуляции (рис. 9 в). При этом уровень продуктивности в отношении протеиназы остается на уровне контроля (штамм с полноценными белками NrgA и NrgB). Экспрессия гена *aprBi* в штамме, мутантном по белку NrgB, не зависела от источника азота в среде (рис. 9 г).

Независимо от того, нитрат или аммоний был внесен в среду, уровень протеолитической активности оставался на одном уровне и соответствовал уровню экспрессии гена фермента контрольным штаммом при росте с аммонием (рис. 7). Этот факт позволил нам предположить, что белок NrgB в условиях недостатка азота способствует повышению уровня экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы.

В промоторе гена *aprBi* не идентифицируются последовательности для взаимодействия с фактором транскрипции TnrA, который контролирует гены ассимиляции азота. По-видимому, этот регуляторный белок не принимает непосредственного участия в контроле транскрипции гена *aprBi*. Тем не менее, в литературе описано не прямое участие фактора TnrA в регуляции экспрессии гена, например, в случае гуанин деаминазы (Nygaard et al., 2000). Можно предположить, что контроль со стороны системы азотной катаболитной репрессии осуществляется опосредованно через другие регуляторные пути, например, белком CodY. Предпосылкой может служить тот факт, что механизм действия CodY в клетке основан на подавлении экспрессии ряда катаболических генов при избытке питательных веществ (Ratnayake-Lecamwasam et al., 2001). При попадании

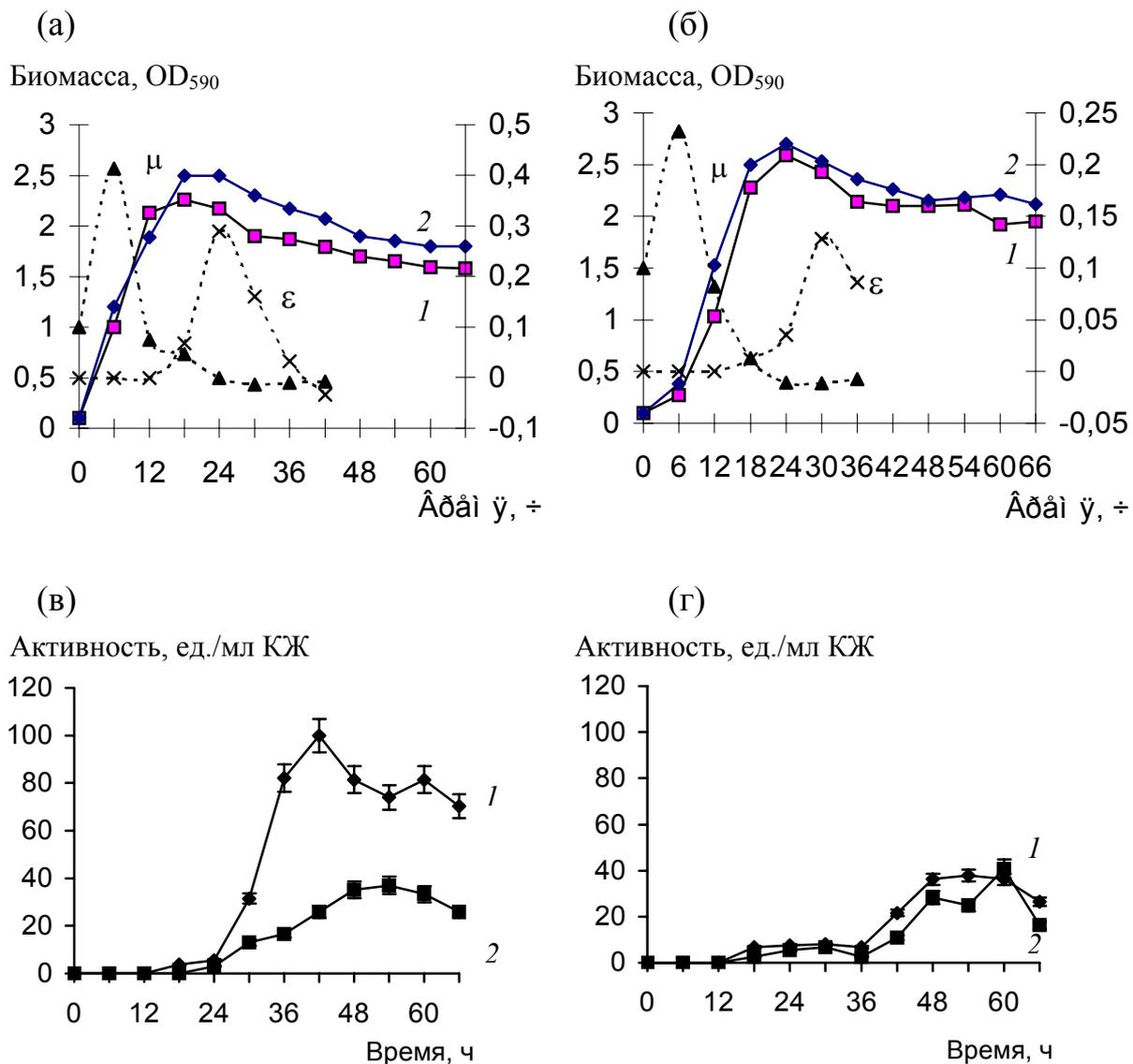


Рис. 9. Влияние источника азота в среде культивирования на экспрессию гена *aprBi* рекомбинантными штаммами *B.subtilis*, дефектными по белкам NrgA и NrgB. а, в – накопление биомассы и экспрессия гена протеиназы штаммом, мутантном по гену *nrgA*, б, г – накопление биомассы и экспрессия гена протеиназы штаммом, мутантном по гену *nrgB*: 1 – среда с нитратом натрия (контроль), 2 – среда, содержащая хлорид аммония.

клеток бацилл в условия голодания, репрессия белком CodY снимается. Эксперименты со штаммами, мутантными по белку NrgB, также продемонстрировали активацию экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы в условиях недостатка азота, а не репрессию предпочтительным источником азота. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что экспрессия гена *aprBi* регулируется по

типу азотной катаболитной репрессии, и повышается в условиях азотного голодания.

Таким образом, анализ последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* выявил сложную организацию промоторной области, что свидетельствует о его множественной регуляции. Полученные нами данные позволяют сделать заключение, что экспрессия гена *aprBi* модулируется несколькими регуляторными системами, которые активны в различные периоды жизненного цикла бацилл. В фазе замедления роста и ранней стационарной фазе экспрессию гена протеиназы регулируют двухкомпонентная система DegS-DegU и механизм азотной катаболитной репрессии, которые не активны в поздней стационарной фазе роста.

### ВЫВОДЫ

1. Определена нуклеотидная последовательность гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* (*aprBi*) (AN AY754946). Установлены потенциальные сайты регуляции и особенности их расположения в промоторной области гена. Выявлена высокая гомология (>90%) гена *aprBi* с геном субтилизиноподобной протеиназы *B.pumilus* (*aprP*). Установлено, что трансляция в гене *aprBi* начинается с нестандартного GTG-кодона.
2. Установлено, что экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* активируется в условиях солевого стресса (1 М хлорид натрия, 0,25 М цитрат натрия).
3. Установлено, что экспрессия гена *aprBi* позитивно регулируется двухкомпонентной системой трансдукции сигнала DegS-DegU, ответственной за синтез ферментов деградации, и зависит от фосфорилированной формы белка DegU.
4. Показано, что экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* в рекомбинантном штамме *B.subtilis* регулируется механизмом азотной катаболитной репрессии: уровень протеолитической активности при росте на синтетической среде с хлоридом аммония снижается в 3 раза по сравнению с нитратом натрия.
5. Установлена взаимосвязь экспрессии гена *aprBi* с азотным обменом: белок NrgB, участвующий в азотном метаболизме бацилл, активирует экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* в условиях азотного голодания.

## Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Знаменская Л.В. Биосинтез новых высокомолекулярных секретлируемых рибонуклеаз из *Bacillus intermedius* и *Bacillus subtilis* / Л.В. Знаменская, М.А. Харитоновна, **А.Р. Каюмов**, С.И. Краснов // Микробиология. - 2002. - Т.71, № 6 - С.801-808.
2. Знаменская Л.В. Роль промотора и лидерной последовательности внеклеточной рибонуклеазы *Bacillus amyloliquefaciens* в регуляции биосинтеза фермента / Л.В. Знаменская, **А.Р.Каюмов**, М.А.Харитоновна, В.И.Вершинина // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. –2005. –№3. –С.38-43.
3. **Каюмов А.Р.** Механизмы регуляции синтеза бактериальных субтилаз / А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Ученые Записки Казанского университета. -2005. -Т. 147, Серия Естественные науки, Книга 2, №1. - С. 89-98.
4. Кириллова Ю.М. Особенности биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Ю. М. Кириллова, Е. О. Михайлова, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, **А. Р. Каюмов**, Г. Н. Руденская, С. В. Костров, М. Р. Шарипова // Микробиология. –2006. –Т.73, №2. –С.8-14.
5. Sharipova M. The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* / M. Sharipova, N.Balaban, **А.Каюмов**, Y.Kirillova, L.Gabdrakhmanova, A.Mardanov, I.Leshchinskaya, G.Rudenskaya, T.Akimkina, D.Safina, I.Demidyuk, S.Kostrov // Microbiol. Res. -2006. (Принято в печать.)
6. **Каюмов А. Р.** Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* в условиях солевого стресса / А. Р. Каюмов, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, С. В. Костров, М. Р. Шарипова // Микробиология. –2006. (Принято в печать.)
7. **Каюмов А.Р.** Биосинтез протеиназ *Bacillus intermedius* регулируется двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU / А.Р. Каюмов, А.Р. Сабирова, Р.А.Байрамов, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов IV научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. -Казань. -16-17 марта 2004. –С.39.
8. **Каюмов А.Р.** Роль двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU в регуляции синтеза протеиназ *Bacillus intermedius* / А.Р. Каюмов, А.Р. Сабирова, Р.А.Байрамов, Л.А. Габдрахманова, С.В. Костров, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов 8-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых “БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА”. -Пушино. -17-21 мая 2004 г. –С.13-14.

9. **Каюмов А.Р.** Участие двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU в регуляции синтеза сериновой и металлопротеиназы *Bacillus intermedius* / А.Р. Каюмов, А.Р. Сабирова, Р.А. Байрамов, М.Р. Шарипова // Материалы научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». –Казань. -17-18 июня 2004. – С.46-47.
10. Кириллова Ю.М. Регуляция синтеза субтилизина *Bacillus intermedius* / Ю.М. Кириллова, **А.Р. Каюмов**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». –Казань. -17-18 июня 2004. –С.14-15.
11. **Каюмов А.Р.** Анализ нуклеотидной последовательности гена сериновой протеиназы *Bacillus intermedius*/ А.Р. Каюмов, А.Р. Сабирова, Р.А. Байрамов, М.Р. Шарипова // Материалы 9-й международной пушкинской школы-конференции молодых ученых “БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА”. –Пушино. -18-22 апреля 2005. –С.8.
12. **Каюмов А.Р.** Роль двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU в регуляции синтеза протеиназ *Bacillus intermedius* / А.Р. Каюмов, Р.А. Байрамов, А.Р. Сабирова, М.Р. Шарипова // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». –Казань. -4-8 апреля 2005. –С.14-15.
13. Кириллова Ю.М. Закономерности биосинтеза протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73/ Ю.М. Кириллова, Е.О. Михайлова, **А.Р. Каюмов**, М.Р. Шарипова // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». -Казань. -4-8 апреля 2005. –С.44-45.
14. **Каюмов А.Р.** Анализ промоторной области гена субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius* / А.Р. Каюмов, Р.А. Байрамов, А.Р. Сабирова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес». –Казань. -9 июня 2005. – С.76-77.
15. **Каюмов А.Р.** Сравнительный анализ промоторной области последовательности генов субтилизинов бацилл / А.Р. Каюмов, А.Р. Сабирова, Р.А. Байрамов, М.Р. Шарипова // Материалы Молодежной школы конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии», 1-3 ноября 2005, Москва. -С.73-74.
16. **Каюмов А.Р.** Идентификация стартового кодона субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius* / А.Р. Каюмов, Р.А. Байрамов, М.Р. Шарипова // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». –Москва. -12-15 апреля 2006.

17. Шамсутдинов Т.Р. Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *B.intermedius* в клетках *B.subtilis* / Т.Р. Шамсутдинов, **А.Р. Каюмов**, Р.А. Байрамов, М.Р. Шарипова // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». –Москва. -12-15 апреля 2006.
18. **Каюмов А.Р.** Идентификация стартового кодона субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*/ А.Р. Каюмов, Р.А. Байрамов, М.Р. Шарипова // Материалы 10-й международной пушинской школы-конференции молодых ученых. Пущино, 17-21 апреля, 2006, –С.21.
19. Шамсутдинов Т.Р. Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *B.intermedius* в клетках *B.subtilis* / Т.Р. Шамсутдинов, **А.Р. Каюмов**, Р.А. Байрамов, М.Р. Шарипова // Материалы 10-й международной пушинской школы-конференции молодых ученых. Пущино, 17-21 апреля, 2006, –С.60.