

На правах рукописи

УДК 579.852.11

ЧАСТУХИНА ИННА БОРИСОВНА

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ *Bacillus intermedius* В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *Bacillus subtilis*

03.00.07 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2004

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Казанского государственного университета

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Эль-Регистан Галина Ивановна (Институт микробиологии РАН, Москва)

доктор биологических наук, старший научный сотрудник Коксин Владимир Петрович (РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ, Казань)

Ведущая организация: Государственный научно-исследовательский институт (ГНИИ) Генетика, г.Москва

Защита диссертации состоится 16 декабря 2004 г. в 13⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете, 420008, г.Казань, ул.Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан _____ 2004 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

А.Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Представители рода *Bacillus* в ходе эволюции выработали сложную и разветвленную регуляторную систему, которая включает транскрипционную модификацию группы генов, контролирующих клеточную дифференцировку, индукцию ряда стрессовых белков, а также синтез ферментов деградации (рибонуклеаз, протеиназ, фосфатаз и др.). В основе формирования бактериями адаптивных ответов лежит механизм сигнальной трансдукции, а именно, двухкомпонентная система регуляции экспрессии генов. Определенные гены активируются регуляторными белками разных двухкомпонентных систем. Сложные взаимодействия между двухкомпонентными системами, образующими сеть сигнальной трансдукции, контролируются на более высоком уровне, объединяющем все генетические ответы клетки. Вклад разных систем регуляции в контроль экспрессии гена можно оценить с помощью модельных систем с мутациями в регуляторных белках. Определение молекулярных механизмов регуляции синтеза гидролитических ферментов позволит направленно влиять на уровень продукции тех из них, которые интересны в практическом отношении. Протеиназы бацилл широко используются в медицине: при лечении ожоговых поражений, для ускорения заживления ран, при защите организма от вирусных инфекций и роста раковых клеток, а также в производстве моющих средств, кожевенной и пищевой промышленности.

Бактерии *B.intermedius* наряду с рибонуклеазой и фосфатазой секретируют сериновые протеиназы, одна из которых относится к группе глутамилэндопептидаз – ферментов, расщепляющих пептидные связи, образованные карбоксильными группами глутаминовой и аспарагиновой кислот (Leschinskaya et al., 1997). Клонирование и секвенирование гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* (Rebrikov et al., 1999) открыло возможность изучения механизмов регуляции биосинтеза фермента. В связи с тем, что бациллярные ферменты имеют практическую значимость, результаты исследования регуляции их синтеза могут быть использованы в биотехнологии, например, для повышения выхода ферментов путем клонирования и модификации генов с эффективными регуляторными элементами.

Целью работы явилось выяснение молекулярных механизмов регуляции биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius*, синтезируемой рекомбинантными штаммами *B.subtilis* в стационарной фазе роста.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Исследование закономерностей биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными штаммами *B.subtilis* под влиянием различных экзогенных факторов в стационарной фазе роста бактерий.
2. Анализ структуры промоторной области гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.
3. Выяснение роли регуляторных белков двухкомпонентной сигнально-сенсорной системы KinA/Spo0F/Spo0A в регуляции экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.
4. Исследование влияния спороспецифичных σ -факторов транскрипции на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.
5. Определение вклада регуляторных Ger-белков, активных в период прорастания спор, на регуляцию экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.

Научная новизна. К началу настоящей работы интерес исследователей был направлен на изучение регуляции синтеза бациллярной внеклеточной сериновой протеиназы - глутамилэндопептидазы - факторами внешней среды. Новизна данной работы заключается в качественно новом уровне изучения регуляторных механизмов биосинтеза данного фермента. Впервые проведено изучение регуляции синтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* на молекулярном уровне в связи с процессом клеточной дифференцировки. Выявлены основные закономерности биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными штаммами *B.subtilis* в стационарной фазе роста бацилл. Впервые установлено, что в стационарной фазе экспрессия гена глутамилэндопептидазы не регулируется по типу катаболитной репрессии, в отличие от стадии вегетативного роста бактерий. Получены приоритетные данные, свидетельствующие о том, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* подвергается позитивной регуляции со стороны основных регуляторных белков системы Spo0A-фосфопереноса, спороспецифичных σ -факторов транскрипции, регуляторных Ger-белков. Полученные результаты позволили установить, что контроль активности гена *gse Vi* осуществляется по перекрестному типу регуляции.

Практическая ценность работы. Разработана питательная среда, обеспечивающая высокий уровень продукции глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными штаммами *B.subtilis* в стационарной фазе роста, которая может быть использована для препаративного получения фермента. Сведения об установленных механизмах контроля экспрессии гена глутамилэндопептидазы в стационарной фазе роста могут быть полезны при разработке стратегии

направленного синтеза протеолитических ферментов промышленными штаммами спорообразующих бактерий. Данные о механизмах функционирования регуляторных систем поздних белков бацилл могут послужить основой для направленной модификации промоторной области гена с целью получения высокопродуктивных штаммов в условиях ограниченного роста бацилл.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на Международном конгрессе по микробиологии FEMS “*Bacillus*-2003” (Словения, 2003), 7-ом Международном семинаре-презентации инновационных научно-технических проектов в области биотехнологии “Биотехнология-2003” (Пушино, 2003), ежегодных научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ “Материалы и технологии XXI века” (Казань, 2003, 2004) и ежегодных школах-конференциях молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2003, 2004), 3-й Междисциплинарной конференции с международным участием (“НБИТТ-21”) (Петрозаводск, 2004), Всероссийской научной конференции “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии” (Казань, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 28 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве штамма-реципиента для плазмид с геном глутамилэндопептидазы *B. intermedius* использовали штамм *B. subtilis* AJ73 (amyE4, npr512, apr73), из хромосомы которого делетированы гены внеклеточных протеиназ, любезно предоставленный проф. Ю.Йомантасом, ГНИИ Генетика. Бактериальные штаммы *B. subtilis*, дефектные по *spo*-, *kin*- и *ger*-генам, получены из коллекции *Bacillus Genetic Stock Center* (BGSC). В работе использовали мультикопийные плазмиды pV и Δ58.21, сконструированные на основе вектора pCB22, отличающиеся по размеру фрагмента хромосомной ДНК *B. intermedius* (Rebrikov et al., 1999). Плазмиды любезно предоставлены для работы проф. С.В. Костровым, Институт молекулярной генетики РАН.

Культивирование штаммов *B. subtilis*, дефектных по *spo*-генам, проводили на среде LB (Sambrook et al., 1989). При культивировании клеток рекомбинантного штамма *B. subtilis* AJ73 pV в качестве исходной использовали среду следующего состава (%): пептон - 1.7; дрожжевой экстракт - 0.5; желатин - 1.0; CaCl₂·2H₂O - 0.01;

MgSO₄·7H₂O - 0.05; NaCl - 0.3; MnSO₄ - 0.01; NH₄Cl - 0.01; Na₂HPO₄ - 0.036; pH - 8.5. При культивировании клеток рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 в качестве исходной использовали среду следующего состава (%): пептон - 2.4; дрожжевой экстракт - 1.0; желатин - 1.0; CaCl₂·2H₂O - 0.02; MgSO₄·7H₂O - 0.03; NaCl - 0.3; MnSO₄ - 0.01; Na₂HPO₄ - 0.03; pH - 8.5.

В среды для рекомбинантных штаммов *B.subtilis* добавляли эритромицин и хлорамфеникол в концентрации 20 мкг/мл, т.к. плазмиды pV и Δ58.21 несут гены устойчивости к данным антибиотикам, соответственно. Культивирование проводили при 30⁰C. Раствор неорганического фосфата (Na₂HPO₄), растворы NH₄Cl и C₆H₆O₇(NH₄)₂, желатин, казеин и глюкозу (1%), а также соли металлов вносили стерильно перед посевом.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при 590 нм. Продуктивность культуры (удельную активность) определяли как отношение активности фермента в культуральной жидкости к количеству биомассы и выражали в условных единицах или процентах. Белок определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует A₂₈₀ = 1 оптической единице (опт. ед.) при 280 нм в кювете толщиной 1 см. Протеолитическую активность определяли по синтетическому хромогенному субстрату Z-Glu-pNA (Мосолова с соавт, 1987).

Для выявления эндоспор мазок окрашивали по Граму (Гусев и Минеева, 1992), фазы спорообразования рассчитывали, как описано (Шлегель, 1987).

Для выделения и очистки глутамилэндопептидазы использовали ионообменную хроматографию на КМ-целлюлозе и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Степень чистоты препаратов и молекулярную массу глутамилэндопептидазы определяли электрофорезом в 12.5%-ном ПААГ в присутствии 0.1% Ds-Na по методу Лаэммли (Laemmli, 1970).

Протопласты получали после инкубации клеток с лизоцимом. Активность фермента определяли в культуральной жидкости, во фракции клеточной стенки, полученной после удаления протопластов центрифугированием, во фракции мембранных белков путем солюбилизации протопластов растворами солей металлов высокой концентрации (2M MgCl₂, 2M CaCl₂), во фракции цитоплазмы, полученной после лизиса протопластов и осаждения нуклеиновых кислот

Гидролиз гомогенных препаратов глутамилэндопептидазы проводили модифицированным трипсином ("Promega") в геле после электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в присутствии 0.1% Ds-Na. Надгелевый раствор использовали для получения

масс-спектров на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре “Reflex III BRUKER” (Германия).

Выделение плазмид и трансформацию клеток *B.subtilis* проводили стандартными методами (Гловер, 1988).

Математическую обработку результатов проводили в программной среде Microsoft Excel путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$. В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

Обработка результатов многофакторных экспериментов проводилась с помощью программы STATGRAPHICS Plus for Windows (Version 2.1) для персональных компьютеров, позволяющей выводить на экран уравнения регрессии, выводы о степени достоверности модели, графическое изображение поверхности отклика.

Обработку результатов масс-спектрометрии препаратов глутамилэндопептидазы проводили с использованием интернет-программы Matrix Science (<http://www.matrixscience.com/>).

Потенциальные -10 и -35 области для узнавания σ^A фактором транскрипции идентифицировали в промоторной области гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* при использовании сервера Softberry BPRON network (Helmann, 1995). Потенциальные участки связывания с сигма-факторами транскрипции и с белками-регуляторами Spo0A, CsrA и AbrB в регуляторной области гена *gse Vi* были идентифицированы с использованием интерактивной программы BLAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Динамика роста, биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* и спорообразования рекомбинантных штаммов *B.subtilis*

Синтез ферментов катаболизма у микроорганизмов представляет собой двухфазный процесс, при котором максимальный синтез белка наступает в период замедления или полного прекращения роста культуры (Coleman et al., 1975). Глутамилэндопептидаза *B.intermedius* появляется в культуральной жидкости в стадии замедления роста бактерий (Gabdrakhmanova et al., 1999). На рис.1 представлены динамика роста, спорообразования и накопления глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis* AJ73, несущих плазмиды pV и $\Delta 58.21$ с геном глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.

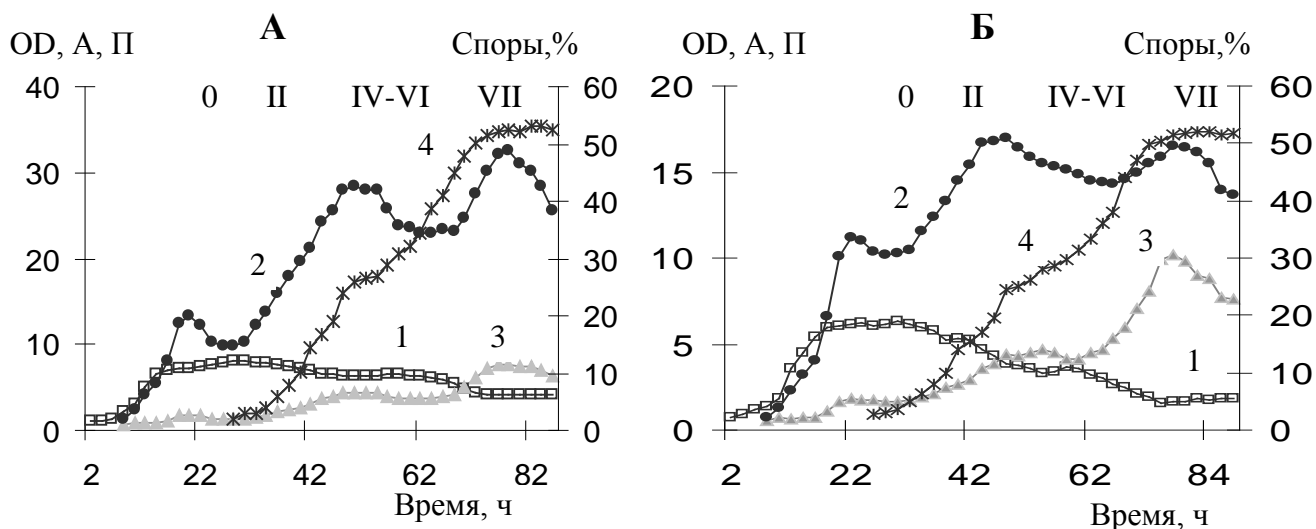


Рис.1. Динамика роста, биосинтеза глутамилэндопептидазы и спорообразования рекомбинантных штаммов (А) *B.subtilis* AJ73 pV и (Б) *B.subtilis* AJ73 Δ58.21: 1 – OD₅₉₀, опт. ед.; 2 – А, активность глутамилэндопептидазы, ед/мл; 3 – П, продуктивность синтеза глутамилэндопептидазы, усл. ед; 4 – споры, %; 0-VII – стадии спорообразования. 100% - общее количество вегетативных и спорующих клеток. $\sigma \leq 10\%$.

Выбор в качестве объектов исследования рекомбинантных штаммов обусловлен тем, что нативный штамм *B.intermedius* секретирует в среду ряд внеклеточных протеолитических ферментов – субтилизин, глутамилэндопептидазу и металлопротеазу. При изучении путей регуляции биосинтеза индивидуальной протеиназы наложение пула ферментов затрудняет процесс исследования и искажает полученные результаты. Напротив, из хромосомы штамма *B.subtilis* AJ73, использованного нами в качестве реципиента, делетированы гены внеклеточных протеиназ, что позволяет оценить влияние экзогенных факторов на модели, когда синтезируется и секретируется только один из этих белков.

Для того, чтобы оценить влияние дополнительных регуляторных областей, присутствующих на мультикопийных плазидах в работе использовали две плазмиды pV и Δ58.21, отличающиеся по размеру фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius* (Rebrikov et al., 1999). Плазида pV несет 6,2 kb фрагмент ДНК *B.intermedius*, включающий полный ген глутамилэндопептидазы и прилегающие к нему области хромосомной ДНК *B.intermedius*. Плазида Δ58.21 содержит PstI-VamHI локус клонированного в составе плазмиды pV фрагмента ДНК *B.intermedius* и биосинтез глутамилэндопептидазы протекает под контролем собственных регуляторных элементов.

Для обоих рекомбинантных штаммов, наряду с накоплением фермента в стадии замедления роста нами обнаружены два пика глутамилэндопептидазной активности в стационарной фазе, соответствующие 48 ч и 78 ч роста, которые в 1,5-2 раза превышают уровень накопления фермента в фазе замедления роста и соответствуют V-VII стадиям спорообразования. Этот факт находится в полном соответствии с положением о взаимоотношениях между скоростью роста штамма и скоростью накопления катаболических ферментов в среде: чем ниже скорость роста, тем выше скорость образования ферментов деградации (Цаплина, 1979). Прекращение роста бактерий может способствовать накоплению протеолитических ферментов, синтез которых становится нерепрессированным.

Характер динамики биосинтеза глутамилэндопептидазы у обоих рекомбинантных штаммов *B.subtilis* идентичен характеру биосинтеза фермента у исходного штамма *B.intermedius* (Балабан с соавт., 2003б): наблюдаются те же пики активности протеиназы в фазе замедления роста и в стационарной фазе. Эти результаты свидетельствуют о корректном протекании процессов биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в рекомбинантных клетках *B.subtilis*.

2. Закономерности биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными штаммами *B.subtilis* под влиянием экзогенных факторов в стационарной фазе роста бактерий

Клетки, несущие плазмиды, тратят часть ресурсов, которые в обычных условиях используются для роста и репродукции, на репликацию гетерологичных плазмид и экспрессию чужеродных генов (Lenski, Nguen, 1988). Для выяснения условий биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными штаммами *B.subtilis* мы исследовали влияние ряда факторов среды на эффективность продукции фермента в стационарной фазе роста бактерий.

Влияние экзогенной глюкозы на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантными штаммами *B.subtilis*. При внесении глюкозы в среду культивирования на разные часы роста бактерий установлено, что добавление глюкозы до стационарной фазы роста (0 ч, 6-й и 10-й ч) приводит к резкому снижению продуктивности фермента (более чем на 90%). Внесение глюкозы в среду начиная с 20-го ч роста вызывало снижение удельной активности глутамилэндопептидазы на 10%, внесение после 30-го ч роста приводило к возрастанию уровня продуктивности глутамилэндопептидазы в среднем на 10-15%.

Таким образом, в отличие от биосинтеза фермента в фазе замедления роста, синтез глутамилэндопептидазы рекомбинантными штаммами *B.subtilis* в стационарной фазе не подвержен катаболитной репрессии. Полученные результаты свидетельствуют о различиях в механизме регуляции экспрессии гена глутамилэндопептидазы на разных этапах развития бактериальной культуры – во время вегетативного роста и в период образования эндоспор.

Влияние пептона и неорганического фосфата на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантными штаммами *B.subtilis*. Нами подобран состав питательной среды для максимальной продукции глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными штаммами *B.subtilis* в стационарной фазе роста. В результате постановки многофакторных экспериментов установлены различия в содержании основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата. В стационарной фазе роста культуры для синтеза фермента рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 pV требуется в 2 раза меньшее содержание неорганического фосфата в среде по сравнению с биосинтезом фермента этим же штаммом в фазе замедления роста (Габдрахманова с соавт., 2000). Для биосинтеза протеазы рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 в стационарной фазе требуется в 6 раз меньше пептона в среде, чем в фазе замедления роста (Gabbrakhmanova et al., 2002). Возможно, это объясняется меньшей потребностью в источниках питания при переходе части клеток в покоящееся состояние. Потребность в пептоне штамма *B. subtilis* AJ73 Δ58.21 для оптимальной продукции глутамилэндопептидазы на поздних стадиях роста в 5 раз меньше по сравнению с исходным штаммом *B.intermedius* (Балабан с соавт., 2003б) и рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 pV. Полученные результаты мы связываем с предполагаемыми различиями в регуляции биосинтеза фермента, которые могут определяться присутствием дополнительного гена на мультикопийной плазмиде pV. Секвенирование генома *B.subtilis* показало, что у бактерий гены расположены близко относительно друг друга так, что практически отсутствуют межгенные участки и, более того, соседние гены могут перекрываться в области 3'-5'-концевых последовательностей. Таким образом, экспрессия гена может зависеть от соседнего близко расположенного гена и, в частности, от его промоторов. В плазмиде Δ58.21 (2.6 kb) на 5'-конце последовательности фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius*, содержащей ген *gse*, имеется протяженная область соседнего гена, которая была идентифицирована как NAD-связывающий домен. В более крупной плазмиде pV

(6.2kb) ген гидрогеназы расположен целиком перед геном глутамилэндопептидазы (Костров, 2001), включая область регуляции, которая может влиять на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в рекомбинантных штаммах.

Влияние ионов аммония на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантными штаммами *B.subtilis*. Нами показано, что введение в среду дополнительного неорганического источника азота (4 мМ хлорида аммония и 5мМ цитрата аммония) оказывает положительный эффект на продукцию глутамилэндопептидазы рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 pV на поздних стадиях роста, что аналогично данным, полученным для биосинтеза фермента этим же штаммом в фазе замедления роста (Габдрахманова с соавт., 2000). Для штамма *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 нами установлено, что внесение в питательную среду ионов аммония незначительно понижает продуктивность культуры на 48-й ч роста. Напротив, на 78-й ч роста добавление 1 мМ хлорида аммония стимулирует синтез фермента (на 45% по сравнению с контролем), а внесение в среду цитрата аммония не оказывает значительного влияния на продукцию фермента. Ранее было показано, что соли аммония не влияют на накопление фермента в культуральной жидкости штамма с плазмидой Δ58.21 на стадии вегетативного роста (Gabbrakhmanova et al., 2002). Наличие в питательной среде помимо пептона дополнительного источника азота (ионы аммония) оказывает репрессирующий эффект на продукцию глутамилэндопептидазы в стационарной фазе роста у исходного штамма *B.intermedius* (Балабан с соавт., 2003б), а в фазе замедления роста выход фермента увеличивается при данных условиях (Gabbrakhmanova et al., 1999). Тот факт, что уровень накопления глутамилэндопептидазы на разных фазах роста по-разному изменяется в ответ на введение в среду источников азота, возможно, является следствием смены механизмов регуляции экспрессии гена глутамилэндопептидазы на разных фазах развития бацилл.

Влияние белковых субстратов на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантными штаммами *B.subtilis*. Продуктивность бактерий *B.subtilis* AJ73 pV в отношении синтеза протеиназы в стационарной фазе роста увеличивается при внесении в питательную среду 0,5% казеина и 1% желатина. Для штамма *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 оптимальной является концентрация казеина и желатина 2%, в отличие от исходного штамма *B.intermedius*, для которого показано, что добавление этих субстратов в среду не влияет на накопление глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости (Gabbrakhmanova et al., 1999). Возможно, это связано с

различиями в питательных потребностях бесплазмидных и рекомбинантных штаммов. Присутствие плазмиды может влиять на уровень отдельных метаболитов в рекомбинантной клетке и в целом вызывать изменения в регуляции клеточного метаболизма (Несмеянова с соавт., 1990).

Влияние ионов двухвалентных металлов на биосинтез глутамилэндопептидазы рекомбинантными штаммами *B.subtilis*. Биосинтез глутамилэндопептидазы на поздних стадиях роста стимулируется при внесении в среду культивирования ионов Ca^{2+} (5 мМ и 2 мМ для штаммов *B.subtilis* AJ73 pV и *B.subtilis* AJ73 Δ 58.21, соответственно), Mg^{2+} (1мМ), Mn^{2+} (1мМ). Активация ионами Ca^{2+} сильнее выражена в отношении фермента, синтезируемого рекомбинантными клетками на 48-й ч инкубации, что может быть обусловлено различиями в конформации ферментов, секретируемых на 48-й и 78-й ч роста культуры (Балабан с соавт., 2003а). Известно, что спорулирующие клетки поглощают много ионов Ca^{2+} (Seto-Young, Ellar, 1981; Cazemier et al., 2001). В этом случае клеточная стенка истощается по Ca^{2+} , а он необходим для формирования новых активных Ca^{2+} -зависимых сайтов в белковой глобуле на заключительном этапе секреции (Шарипова, 2000). Содержание в среде ионов Zn^{2+} , Fe^{2+} и Cu^{2+} (1-10 мМ) подавляло биосинтез протеиназы. Введение в среду культивирования ионов Co^{2+} (2 мМ) приводило к увеличению уровня фермента в культуральной жидкости обоих рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, при этом рост микроорганизмов сильно угнетался, как в случае исходного штамма *B.intermedius* (Gabbrakmanova et al., 1999). При исследовании локализации глутамилэндопептидазы *B.intermedius* ранее показано, что фермент в клетках обнаруживается на мембране (~10% от внеклеточного белка) и соли кобальта, по-видимому, могут влиять на процесс диссоциации фермента с мембраны, способствуя выходу мембраносвязанного белка в среду с образованием внеклеточного фермента (Шарипова с соавт., 2000).

Таким образом, регуляция биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными клетками *B.subtilis* в стационарной фазе роста бактерий осуществляется аналогично регуляции синтеза других протеиназ: синтез фермента активируется в присутствии ионов кальция, неорганического фосфата, белковых субстратов – казеина и желатина. Нами установлено отсутствие подавления синтеза фермента на поздних этапах роста бактерий легкометаболизируемыми источниками углерода по типу катаболитной репрессии. Это свидетельствует о смене механизмов регуляции экспрессии гена протеиназы в стационарной фазе. По нашим данным на

экспрессию гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* может оказывать влияние соседний ген гидрогеназы, который присутствует на мультикопийной плазмиде pV. Результаты исследований биосинтеза глутамилэндопептидазы рекомбинантными штаммами *B.subtilis* в стационарной фазе роста суммированы в табл.1.

Таблица 1. Влияние компонентов питательной среды на накопление глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis*

Штамм		Компоненты питательной среды																
		Глюкоза, 1%	Неорг. фосфат, г/л	Пептон, г/л	Органические субстраты, %		Ионы аммония, мМ		Ионы двухвалентных металлов, мМ									
					казеин	железа	хлорид	цитрат	Ca	Co	Zn	Mg	Mn	Fe	Cu			
<i>B.subtilis</i> AJ73 pV	48-й час роста	не влияет	0,18	16	0,5	1	4	5	5	Стимулирует биосинтез, но подавляет рост клеток (1-10)	Подавляет биосинтез (2-10)	1	Подавляет биосинтез (1-10)	Подавляет биосинтез (2-10)	Подавляет биосинтез (2-10)			
	78-й час роста		0,2	22	0,5	1	4	5	5			1						
<i>B.subtilis</i> AJ73 Δ58.21	48-й час роста		0,28	4	2	2	подавляет биосинтез (1-6)	2	2			Подавляет биосинтез (2-10)	Подавляет биосинтез (2-10)			1	Подавляет биосинтез (2-10)	Подавляет биосинтез (2-10)
	78-й час роста		0,26	4	2	2	1	не влияет (1-6)	2							1		

3. Получение гомогенной глутамилэндопептидазы *B.intermedius*, синтезируемой рекомбинантными клетками *B.subtilis*

Для выяснения степени гомологии ферментов, синтезируемых рекомбинантными штаммами *B.subtilis* в стационарной фазе роста (48-й ч культивирования), с ферментом, синтезируемым в фазе замедления роста клетками нативного штамма *B.intermedius*, проводили **выделение и очистку** соответствующих белков. В результате трехстадийной очистки для обоих рекомбинантных штаммов *B.subtilis* AJ73 pV и *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 получены по две гомогенные белковые фракции фермента, обозначенные нами индексами 1 и 2 (табл. 2).

Таблица 2. Выделение глутамилэндопептидазы поздней стационарной фазы роста (48-й ч культивирования) из культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis*

Стадии очистки		Объем, мл	Общий белок, A ₂₈₀	Активность		Степень очистки	Выход, %
				общая, ед.	удельная, ед/ A ₂₈₀		
<i>B. subtilis</i> AJ73 pV							
Культуральная жидкость		995	19 900	69 212	3,478	1	100
Хроматография на КМЦ		24,5	51,45	19 625	381,45	109,67	28
Хроматография на колонке Mono S	1 фракция	5,2	2,45	7 696	3 135	901,5	11
	2 фракция	2,1	0,69	1 234	1 786	513,5	1,78
Рехроматография на колонке Mono S	1 фракция	1,2	0,7	3 374	4766	1 370	4,87
	2 фракция	0,65	0,21	577	2699	776	0,83
<i>B. subtilis</i> AJ73 Δ58.21							
Культуральная жидкость		970	31 525	24 405	0,774	1	100
Хроматография на КМЦ		35	68,25	8 575	125,64	162	35
Хроматография на колонке Mono S	1 фракция	7,3	1,59	3 646	2 291	2 959,9	14,9
	2 фракция	4,1	0,82	2 010	2 451	3 166,6	8,2
Рехроматография на колонке Mono S	1 фракция	1,1	0,55	2 089	3 798	4 906,9	8,5
	2 фракция	0,75	0,3	961,95	3 128	4 041	3,9

Полученные гомогенные препараты глутамилэндопептидазы рекомбинантных штаммов *B.subtilis* подвергали процедуре **масс-спектрометрии**. При расщеплении трипсином препаратов глутамилэндопептидазы фракций 1 и 2 из рекомбинантных штаммов *B.subtilis* AJ73 pV и *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 для каждой фракции были получены ряд пептидов. В результате масс-спектрометрии были установлены молекулярные массы (830 - 4820 Да) (рис.2) и аминокислотные последовательности данных фрагментов. На основании компьютерного сравнения последовательности аминокислот полученных пептидов с полной первичной последовательностью ряда протеиназ, имеющих в банке данных установлено, что полученные нами фракции протеиназ соответствуют глутамилэндопептидазе *B.intermedius* (номер регистрации в Европейской базе данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей (EMBL) Y15136) (рис. 3).

Иммунологический анализ позволил установить, что глутамилэндопептидаза, синтезируемая рекомбинантными клетками *B.subtilis* по иммунологическим свойствам идентична глутамилэндопептидазе, синтезируемой нативным штаммом *B.intermedius* (рис.4). Также сделано заключение о гомологии ферментов, секретируемых в фазе замедления роста и в стационарной фазе.

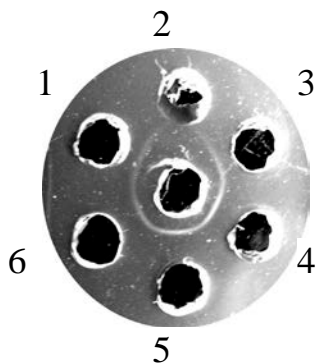


Рис. 4. Иммунореакция с антителами против глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.

1 - глутамилэндопептидаза *B.intermedius*, секретируемая на стадии замедления роста (позитивный контроль); 2 – субтилизин *B.intermedius* (негативный контроль); 3, 4 – фракции 1 и 2 глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 pV стационарной фазы роста; 5, 6 – фракции 1 и 2 глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 Δ58.21 стационарной фазы роста. Кроличья антисыворотка к глутамилэндопептидазе *B.intermedius* предоставлена проф. С.В. Костровым (Институт молекулярной генетики РАН, Москва).

4. Освобождение глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в культуральную жидкость рекомбинантных клеток *B.subtilis*

Ранее показано, что в процессе секреции глутамилэндопептидазы у исходного штамма *B.intermedius* основная часть белка освобождается в культуральную жидкость, небольшая часть активного фермента (до 10 %) остается связанным с мембраной, а в цитоплазме активный фермент не обнаружен (Шарипова с соавт., 2000). При исследовании процесса освобождения глутамилэндопептидазы *B.intermedius* у рекомбинантных штаммов *B.subtilis* нами установлено, что так же, как и у исходного штамма, основная часть образующегося фермента освобождается клетками в культуральную жидкость, где обнаружено 80-90% всего активного белка. Каталитически активная глутамилэндопептидаза не обнаружена нами в цитоплазме. Часть фермента, освобождаемого клетками (от 10 до 15 %) остается связанной с цитоплазматической мембраной.

Таким образом, по совокупности полученных результатов показано, что использованная нами система экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

рекомбинантными штаммами *B.subtilis* является адекватной и применима для изучения механизмов регуляции экспрессии клонированного гена.

5. Анализ регуляторной области гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

Биосинтез индивидуальных белков в необходимом для бактерий количестве на определенном этапе их развития обеспечивается за счет разнообразия регуляторных механизмов, выработанных в процессе эволюции. Потенциальную оценку механизмов регуляции синтеза можно дать путем анализа промоторной области, контролирующей экспрессию генов. На рис.5 представлена промоторная область гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* (номер регистрации в Европейской базе данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей (EMBL) Y15136). При анализе нуклеотидной последовательности промоторной области гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* (*gse Vi*) выявлено девять участков,

```

1   aagctttcttctcagaaagaagcaagtcatttacctttagatcagccgattcaaatgagagaat
65  tacttgcgtcacatgttgagcttcaagagcctgcaacacgtacgcagctaagagagctcgcagc
129 atatacagtttgtccgcctcaccgcgtggagcttgagcaaatggcTGGTGAAgcatatcaagaa
193 gccgttttaaagaaacgagtaaccaTGCTGGActtattagatcaatatgaagcgtgtgagctgc
257 cgtttg[tgcaacttttttagca]cttttaccagggtttgaagccgcgctattactcaatttctagctc
321 ассаааAGTCGAAgааааааgagtcagtatcacagTGGCGGTtg[tgaaaggtaaagca]tggagc
385 gccgcgagaatatcgccggagtcgcatcaaaactatttatgcggtccttgcaaggcaggagaagaag
449 tcgcctgcttctccacgaagcgcaggcaggattccagctgccaccttcatctgaagtaccgat
513 gatcatgatcggaccgggtacaggaatcgctccatthagagggtttgttcaggcaagagaagtg
577 tggcagaaggaaggaaanccactAGGCGAAgctcacctgtattttggtgtcgtcacctctTG
641 AAGATgatctgtatTTGAGGAAatgcagcttgcaagcgaaaaaggagttgttcacatccaccg
705 ggcttattctcgtcacaaagagcaaaaagtatatgtccagcattTGTTGAAagaagacggcggc
769 atgctgatcaagttactTGACCAAagggtgggtatctttacgtgtgcggggacggaaaagtatgg
833 caccagacgtagaggctacgcttatcgaccttatcaaaacgagaaacattgctcgaaggaaac
897 agctgaaaattggc[tgacaacccttgca]aatgacaatagatatgtaaaagatgtgtggagctga
961 [aaaattaggaag]gaccgccaattaggcggttttttctatttcatagagagagatcaatagaa[tga]
1025aggt[tggaagatacaaa]acacctaatttaaaaatgaaatattttgtaaaaaataagaatattc
      -35                -10                SD
1089tctcatttactccaatatgaaacaatcg[atgatg]ttttgatataggacataaaggaggaatatg

```

Рис. 5. Промотор гена *gse Vi*. Последовательность Шайна-Дальгарно и сайты инициации синтеза мРНК, -10 и -35 области, узнаваемые РНК-полимеразой с σ^A -фактором, подчеркнуты. Жирным шрифтом (прописные буквы) выделены участки с гомологией Sро0А-боксу. Цветом выделена область с гомологией к последовательности для связывания с белком АbrВ. Обведены в рамку последовательности с гомологией для связывания с белком СsrА.

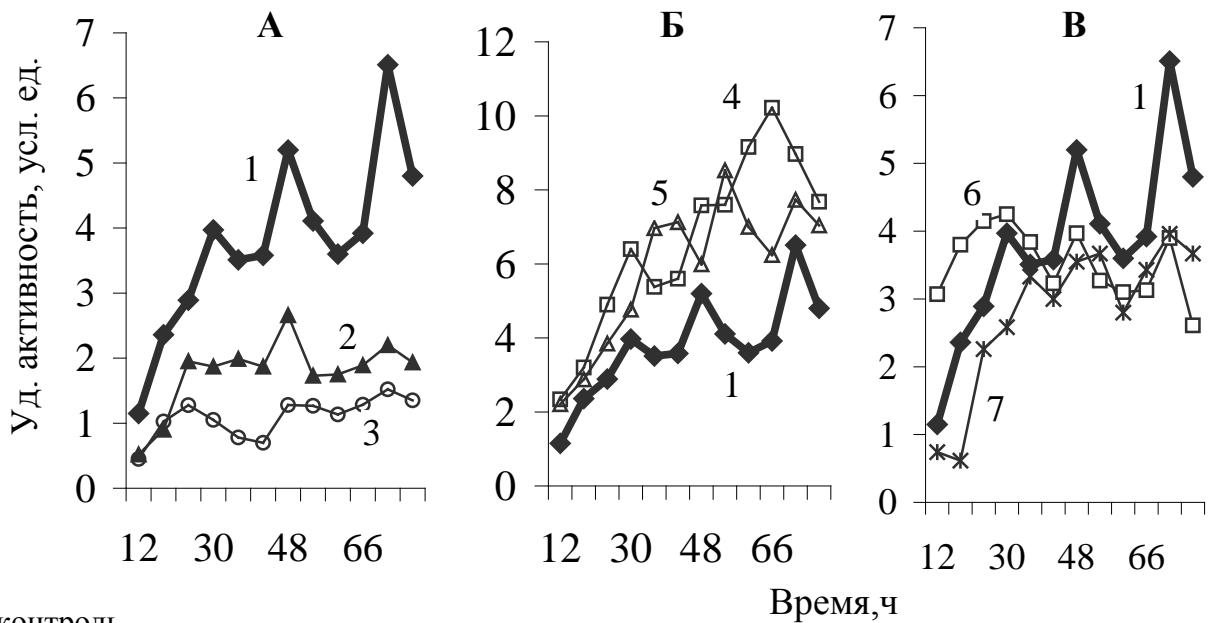
обладающих 71-86 %-ной гомологией для взаимодействия с регуляторным белком Spo0A (TGNCGAA), четыре участка ДНК с 71-78%-ной гомологией к консенсусному сайту взаимодействия с белком катаболитного контроля CsrA (TGWAARCGYTWNCW) (Weicket, Chambliss, 1990) и предполагаемый участок с 81%-ной гомологией к последовательности для специфического взаимодействия с регуляторным белком AbrB - плейотропным репрессором ранних генов споруляции (WAWWTTTWCAAAAAAW) (Strauch,1995b) (рис.5). Выявленные сайты регуляции в промоторной области гена *gse Vi* позволили выдвинуть предположения о возможном участии двухкомпонентной системы Spo0A-фосфопереноса и механизмов глобальной регуляции (катаболитная и AbrB-репрессия) в регуляции экспрессии гена *gse Vi*. В промоторной области гена *gse Vi* нами идентифицированы потенциальные последовательности для взаимодействия с σ -факторами транскрипции. Среди них – сайты связывания с альтернативными вегетативными факторами транскрипции - σ^D , σ^L и σ^H , а также со спороспецифичными сигма-факторами - σ^E , σ^F , σ^G и σ^K (табл. 3). При этом участки связывания с различными сигма факторами близко расположены или частично перекрываются друг с другом. Этот факт может свидетельствовать о различиях во временной экспрессии гена в зависимости от активации того или иного σ -фактора, что соответствует молекулярной основе механизма системной регуляции активности генов.

Таблица 3. Сравнительный анализ промоторной области гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

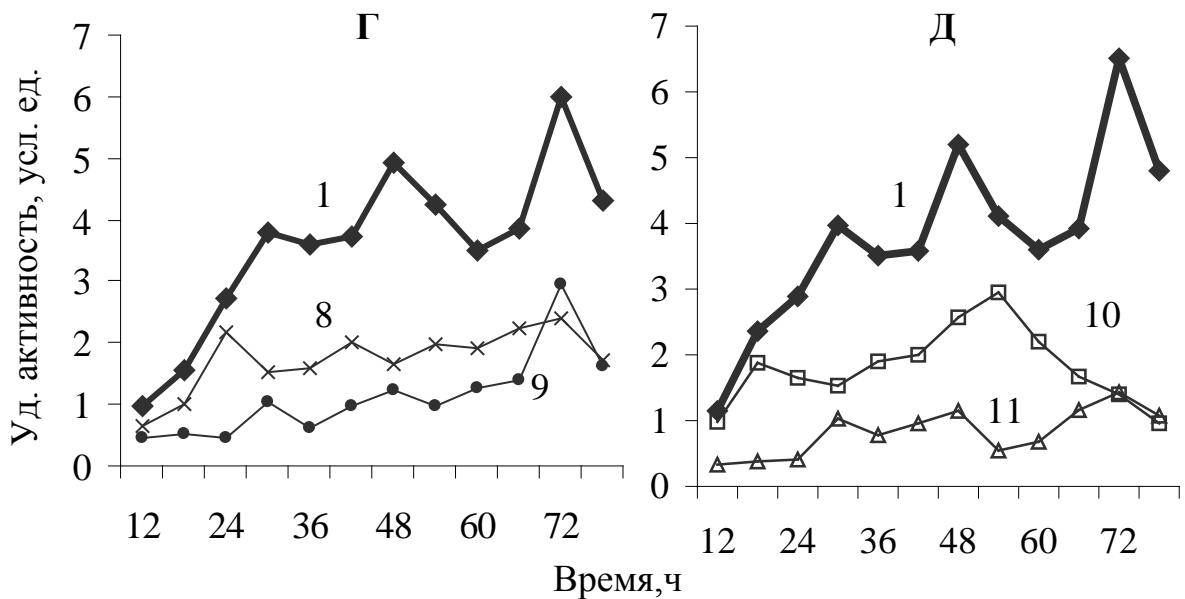
Сигма-факторы <i>B.subtilis</i> (Haldenwang, 1995)			Степень гомологии предполагаемых сайтов взаимодействия с σ -факторами транскрипции в промоторной области гена <i>gse Vi</i>	
Сигма-фактор	Промоторные последовательности			
		-35	-10	-35
Факторы вегетативной клетки				
σ^D (σ^{28})	TAAA	GCCGATAT	100 %	50-62%
σ^L	TGGCAC	TTGCANNN	67-100 %	50-87 %
Споруляционно-специфичные факторы				
σ^H (σ^{30})	RWAGGAXXT	HGAAT	89 %	80 %
σ^E (σ^{29})	ZHATAXX	CATACANT	100 %	50 %
σ^F ($\sigma^{spoIIAC}$)	GCATR	GGHRARHTX	80-100 %	55-87 %
σ^G	GHATR	CATXHTA	80-100%	100 %
σ^K (σ^{27})	AC	CATANNNTA	100 %	55-77 %

6. Молекулярные механизмы регуляции синтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius*

Влияние регуляторных белков системы Spo0A-фосфопереноса в контроле экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. Использование мутантов по регуляторным белкам, входящим в состав двухкомпонентной системы Spo0A-фосфопереноса показало, что влияние этих факторов регуляции на экспрессию гена глутамилэндопептидазы не является выраженным, т.е. во всех вариантах сохраняется остаточная активность этого фермента (25-80%). На рис. 6, 7 представлены результаты, полученные для штаммов, трансформированных плазмидой pV (для штаммов с плазмидой Δ58.21 результаты были аналогичны). Полученные нами данные свидетельствуют о 30-50%-ном снижении продуктивности глутамилэндопептидазы в мутантных штаммах с дефектным белком Spo0A, конечного в цепи переноса фосфата от гистидин киназ в системе, контролирующей инициацию спорогенеза. Этот эффект компенсируется супрессорной мутацией в гене *abrB*, что подтверждают данные о восстановлении уровня экспрессии гена *gse Vi* в двойных мутантах *spo0A/abrB* (рис. 6 А-Б). Таким образом, экспрессия гена глутамилэндопептидазы подвергается позитивной регуляции со стороны Spo0A-белка, а регуляторный белок AbrV оказывает репрессирующее действие на транскрипцию гена *gse Vi*. Дефект в гене одной из гистидин киназ, участвующих в передаче сигнала в этой системе контроля, а именно, в гене *kinA82*, оказывает незначительное влияние на экспрессию гена глутамилэндопептидазы: после трансформации активность фермента в мутантом штамме снижается на 15% (рис.6В). В штаммах с инактивированной Spo0E-фосфатазой, участвующей в дефосфорилировании Spo0A-фактора транскрипции, уровень продуктивности глутамилэндопептидазы *B. intermedius* снижается на 75% по сравнению с контролем (рис.6Д). Этот факт свидетельствует о корреляции синтеза Spo0E-белка и глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. В штаммах, дефектных по Spo0K-белку, а также по фосфотрансферазам Spo0B и Spo0F экспрессия гена *gse Vi* снижается в среднем на 50 % (рис. 6 Г-Д). В совокупности, полученные нами данные свидетельствуют об участии регуляторных белков двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции Spo0A-фосфопереноса в контроле экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.



1 - контроль
 2 - *B.subtilis* JH646 (*spo0A12*) 4 - *B.subtilis* SCR372 (*spo0A12absB24*) 6 - *B.subtilis* MB170 (*kinA82*)
 3 - *B.subtilis* 9V(*spo0A9*) 5 - *B.subtilis* R15-13 (*spo0A12abrB23*) 7 - *B.subtilis* JH651 (*sigH81*)



1 - контроль
 8 - *B.subtilis* JH649 (*spo0F221*) 10 - *B.subtilis* Z31(*opp141*)
 9 - *B.subtilis* JH648 (*spo0B136*) 11 - *B.subtilis* JH647(*spo0E11*)

Рис. 6. Динамика накопления глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, дефектных по *spo*-генам. В качестве контроля использованы штаммы *B.subtilis* 168 и *B.subtilis* JH642 (выделены жирным) в зависимости от того, на основе какого из них сконструированы мутантные штаммы. Для всех вариантов $\sigma \leq 10\%$.

Экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в штаммах, дефектных по спороспецифичным факторам транскрипции. Нами установлено, что регуляция экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в штаммах, дефектных по спороспецифичным σ -факторам транскрипции, подвергается ослабленному контролю со стороны данных системных регуляторов и идентична для обеих плазмид. Мутация *spo0H* с инактивированным σ^H фактором приводит к снижению уровня экспрессии гена *gse Vi* на 20-25% относительно контроля (рис.6). В штаммах *B.subtilis*, с нарушениями в активации σ^E , σ^G и σ^K факторов транскрипции, экспрессия гена *gse Vi* снижается на 50% (рис.7 А-Б). В большей степени эффект подавления экспрессии гена (65%) выражен в штамме с дефектом по синтезу активного σ^F фактора (рис.7 Б). Эти данные свидетельствуют о том, что ген *gse Vi* может экспрессироваться на всех стадиях развития бактерий, включая позднюю стационарную фазу, а также этап формирования эндоспор.

Влияние *ger*-мутаций на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. Изучали экспрессию гена *gse Vi* в штаммах, мутантных по *Ger*-белкам, вовлеченным в процесс прорастания спор (рис. 7 В). Максимальное снижение экспрессии гена *gse Vi* (на 50% относительно контроля) установлено для штаммов с инактивированным геном *gerA*, ответственным за синтез специфических белков-рецепторов для узнавания спорами определенных питательных веществ - факторов прорастания (Sammons et al., 1981).

Прорастание бактериальной споры инициирует процесс ее возвращения к вегетативному росту. Наши данные показали, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* сохраняется и на этом этапе развития бацилл. По данным литературы известно, что в ходе превращения споры в вегетативную клетку в бактериях активированы σ^D и σ^H факторы транскрипции, тогда как σ^B -фактор остается неактивным до окончания первого клеточного деления (Horsburgh et al., 2001). Тот факт, что в регуляторной области гена *gse Vi* нами идентифицированы последовательности, с гомологией к сайтам узнавания σ^G и σ^H факторами транскрипции, и не обнаружены участки с гомологией к сайтам для узнавания σ^B -фактором, позволяет предположить подобный механизм регуляции экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.

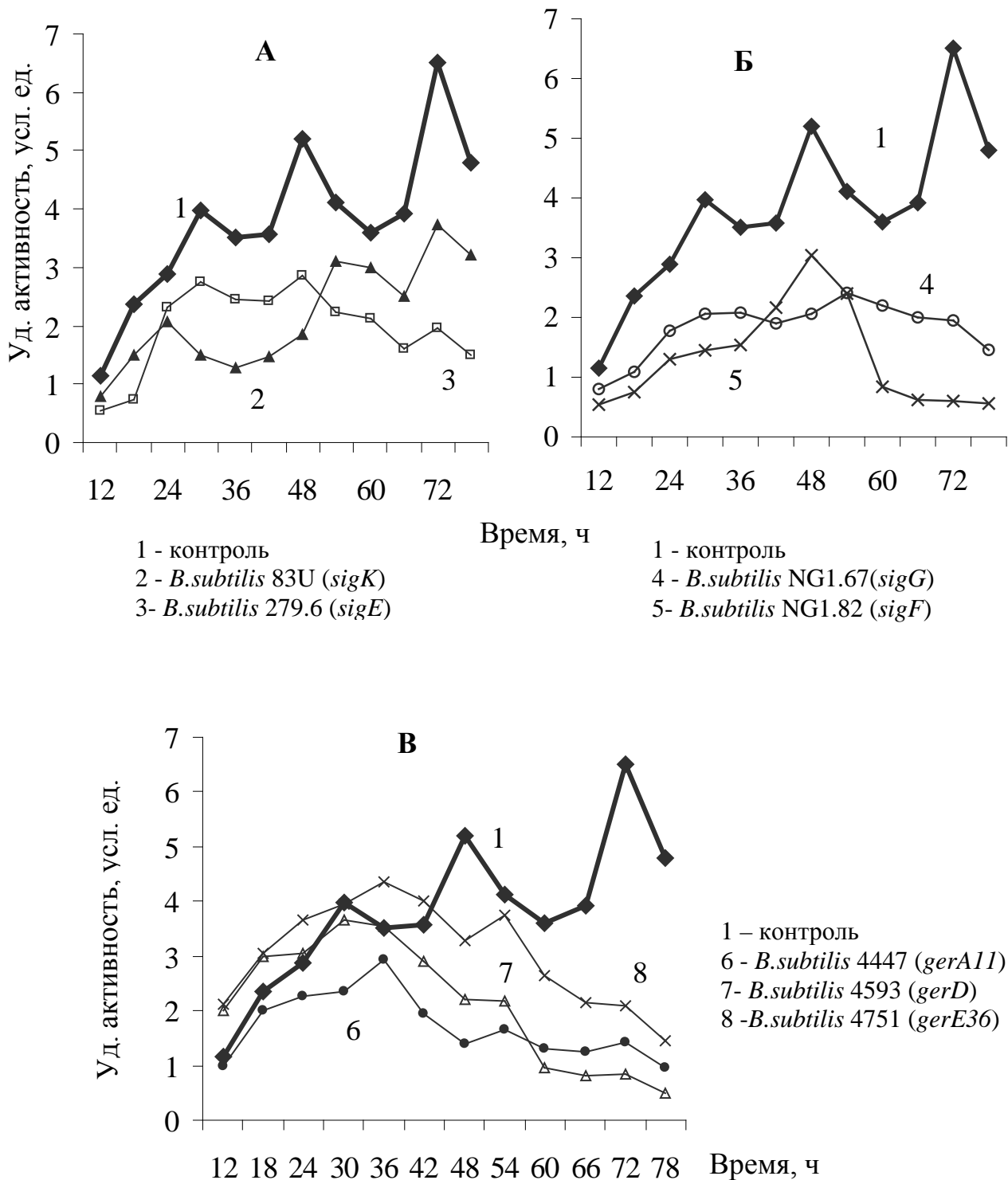


Рис. 7. Динамика накопления глутамилэндopeптидазы *B.intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, дефектных по спороспецифичным сигма-факторам транскрипции Sig (А-Б) и белкам прорастания спор Ger (В). 1 (контроль) - штамм *B.subtilis* 168 (выделен жирным). Для всех вариантов $\sigma \leq 10\%$.

Таким образом, нами установлено, что в поздней стационарной фазе роста экспрессия гена *gse Vi* подчиняется позитивной регуляции со стороны основных регуляторных белков сигнально-сенсорной системы Spo0A-фосфопередачи, спороспецифичных σ -факторов транскрипции, Ger-белков и не регулируется по механизму катаболитной репрессии. Во всех вариантах, соответствующих выключению каждой из исследованных систем регуляции, не происходит полной инактивации гена протеиназы. Уровень экспрессии гена *gse Vi* частично сохраняется в регуляторных мутантах *B.subtilis* в пределах 25-80%, что может свидетельствовать о пересечении путей контроля активности данного гена. В результате анализа последовательности гена *gse Vi* установлена сложная организация его регуляторной области, что также может свидетельствовать об участии нескольких систем регуляции в контроле экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius*. Итак, полученные нами данные позволяют сделать заключение, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* модулируется разными регуляторными системами и осуществляется по типу перекрестной регуляции.

ВЫВОДЫ

1. Рекомбинантные штаммы *B.subtilis* AJ73, несущие плазмиды pV и Δ 58.21, выделяют в среду глутамилэндопептидазу в период стационарной фазы роста с максимальной активностью на 48-й и 78-й часы роста культур, соответствующей V и VII стадиям спорообразования. Синтез фермента на этой стадии роста активируется в присутствии в среде белковых субстратов, ионов кальция, неорганического фосфата и не подавляется глюкозой.
2. В промоторной области гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* выявлены нуклеотидные последовательности, гомологичные сайту связывания со Spo0A-регуляторным белком, участвующим в инициации споруляции (71-86%), последовательности для взаимодействия с регуляторным белком AbrB - плейотропным репрессором ранних генов споруляции (81%) и участки, с гомологией к консенсусному сайту связывания с белком катаболитного контроля

СсрА (71-78%). Обнаружены участки ДНК с гомологией к сайтам связывания с вегетативными и спороспецифичными сигма-факторами транскрипции

3. Регуляторные белки двухкомпонентной системы Sro0A-фосфопереноса участвуют в позитивной регуляции экспрессии гена *gse Vi*: уровень экспрессии гена в штаммах, мутантных по Sro0-белкам снижается на 15-75%. Регуляторный белок AbrV участвует в негативной регуляции экспрессии гена *gse Vi*.
4. Регуляция экспрессии гена *gse Vi* со стороны спороспецифических факторов транскрипции не является выраженной: при инактивации σ^E , σ^F , σ^G , σ^K и σ^H факторов транскрипции уровень экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* снижается на 20-65%.
5. Экспрессия гена *gse Vi* подвергается позитивной регуляции со стороны Ger-белков, вовлеченных в процесс прорастания спор: уровень экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в штаммах, мутантных по Ger-белкам снижается на 25-50 %.

Публикации по теме диссертации

1. Шарипова М.Р. Мембраносвязанные формы сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* / М.Р. Шарипова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, **И.Б. Частухина**, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // **Микробиология**. – 2003. – Т.72, №5. – С.639-644.
2. **Частухина И.Б.** Биосинтез глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* на поздних стадиях спорообразования / И.Б. Частухина, Д.Н. Забирова, А.А. Голенищева-Кутузова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова // Тезисы докладов III научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. - Казань, 14-15 февраля, 2003. – С.92.
3. **Частухина И.Б.** Особенности биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* в поздней стационарной фазе роста / И.Б. Частухина, Д.Н. Забирова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова // Сборник тезисов 7-й Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. - Пущино, 14-18 апреля, 2003. - С.388.

4. **Частухина И.Б.** Синтез и регуляция внеклеточной глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis* на поздних стадиях роста / И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, А.М. Марданова, С.В. Костров, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // 7-ой Международный семинар-презентация инновационных научно-технических проектов в области биотехнологии “Биотехнология-2003”. - Пущино, 24-25 ноября, 2003. – С. 58.
5. **I.B. Chastukhina.** Biosynthesis of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase by recombinant strain of *Bacillus subtilis* on the late stage of sporulation / I.B. Chastukhina, M. R. Sharipova, L. A. Gabdrakhmanova, N. P. Balaban, G. N. Rudenskaya, S. V. Kostrov, I. B. Leshchinskaya. // FEMS Congress of European Microbiologist “Bacillus-2003”. - Ljubljana, Slovenia, 1-3 july, 2003. – P.41.
6. **Частухина И.Б.** Биосинтез глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis*, дефектными по *spo*-генам / И.Б. Частухина, Е.И. Шагимарданова, А.А. Голенищева-Кутузова // Тезисы докладов IV научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. - Казань, 16–17 марта, 2004. - С.83.
7. **Частухина И.Б.** Влияние *spo*-мутаций на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* / И.Б. Частухина, Е.И. Шагимарданова, Л.А. Габдрахманова, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов 8-й Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. - Пущино, 17-21 мая, 2004. – С.38.
8. **Частухина И.Б.** Влияние Spo0-белков на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* / И.Б. Частухина, Е.И. Шагимарданова, Л.А. Габдрахманова, М.Р. Шарипова // Материалы третьей междисциплинарной (медицина, биология, физика, радиоэлектроника, химия, биохимия, информатика, педагогика...) конференции с международным участием (“НБИТТ-21”). - Петрозаводск, 21-23 июня, 2004. – С. 41.
9. **Частухина И.Б.** Оптимизация биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis* / И.Б. Частухина, Е.И. Шагимарданова, Л.А. Габдрахманова, М.Р. Шарипова // Материалы научной

конференции “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии”. - Казань, 17-18 июня, 2004. – С. 87-88.

10. **Частухина И.Б.** Экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* рекомбинантными штаммами *B.subtilis* / И.Б. Частухина, Е.И. Шагимарданова, А.А. Голенищева-Кутузова, М.Р. Шарипова // Сборник статей научной конференции “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии”. - Казань, 2004. – С.47.
11. **Частухина И.Б.** Регуляция биосинтеза внеклеточной глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* на стадии спорообразования / И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, Д.Р. Сафина, С.В. Костров, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // **Микробиология.** – 2004. – Т.73, №3. – С.335-342.
12. **Частухина И.Б.** Особенности биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis* в стационарной фазе роста / И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, С.В. Костров, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // **Микробиология.** – 2004. – Принята в печать.
13. **Chastukhina I.B.** Regulation of *Bacillus intermedius* glutamylendopeptidase gene expression on the stationary stage of growth / I.B. Chastukhina, L.A. Gabdrakhmanova, N.P. Balaban, I.V. Demidyuk, S.V. Kostrov, G.N. Rudenskaya, I.B. Leshchinskaya, M.R. Sharipova // **Curr. Microbiol.** – 2004. – in press.