

*На правах рукописи*



УЛЬЯНОВА Вера Владимировна

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ  
БАЦИЛЛ В УСЛОВИЯХ ФОСФАТНОГО ГОЛОДАНИЯ**

03.00.07 – микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2009

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В. И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент  
Вершинина Валентина Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Коксин Владимир Петрович  
(РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ, г. Казань)

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Морозова Ольга Владимировна  
(Институт проблем экологии и  
недропользования АН РТ, г. Казань)

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики  
КНЦ РАН, г. Казань

Защита диссертации состоится «26» ноября 2009 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском государственном университете.

Автореферат разослан «21» октября 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Ферменты нуклеинового обмена в течение многих лет привлекают к себе внимание исследователей в связи с их исключительной ролью в жизни организмов и практической значимостью для человека. Рибонуклеазы выполняют важные функции в метаболизме бактериальных клеток: они не только необходимы для извлечения рибонуклеотидов из окружающей среды и элиминации ненужных внутриклеточных РНК, но и участвуют в контроле экспрессии генов путем изменения стабильности различных видов РНК. Кроме того, секретлируемые рибонуклеазы могут являться для их продуцентов эффективным средством в конкурентной борьбе с другими микроорганизмами за экологическую нишу.

Рибонуклеазы применяются в генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии для удаления РНК из биологического материала, структурно-функциональных исследований нуклеиновых кислот и их комплексов с белками, разработке векторов для позитивной селекции рекомбинантов, получения стерильных трансгенных растений. Перспективным прикладным аспектом использования микробных РНКаз является медицинский. Области их возможного применения связаны с лечением опухолей и вирусных инфекций.

Внеклеточные гуанилспецифичные рибонуклеазы обнаружены у многих видов бацилл, в том числе у *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.circulans* (барназоподобные РНКазы), *B.intermedius*, *B.pumilus*, *B.thuringiensis* (биназоподобные РНКазы). Ферменты сходны по первичной структуре, близки по физико-химическим и каталитическим свойствам. Однако исследование биосинтеза рибонуклеаз выявило значительные различия в условиях, при которых происходит их накопление в среде, что оставляет открытым вопрос о назначении этих ферментов.

Клонирование и секвенирование генов гуанилспецифичных РНКаз открыло возможность для изучения регуляции их синтеза на уровне транскрипции. Выявление регуляторных механизмов, отвечающих за экспрессию генов в тех или иных условиях, является одной из глобальных проблем молекулярной биологии. Бактерии способны активировать синтез определенных продуктов только в специфической экологической обстановке, либо репрессировать его, если образуемые белки препятствуют другим процессам, протекающим в данный момент в клетке. Регуляция экспрессии генов может также осуществляться как часть процесса дифференцировки и развития клеточной популяции. Информация о путях контроля экспрессии гена важна не только для установления функции кодируемого им белка, но и необходима для осуществления направленного воздействия на геном микроорганизма с целью увеличения выхода желаемого продукта.

Таким образом, знание молекулярных механизмов регуляции синтеза рибонуклеаз позволит создать фундамент для их эффективного использования в прикладных сферах и будет способствовать решению ряда общебиологических

проблем, связанных с ролью этих ферментов в основных физиологических процессах клетки.

**Целью** настоящего исследования явилось выяснение механизмов регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл в условиях фосфатного голодания.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Провести поиск у различных видов бацилл ортологов *phoP*, *spo0A* и *resD* генов *B.subtilis*, продукты которых контролируют специфический ответ на фосфатное голодание.
2. Исследовать взаимодействие фактора транскрипции PhoP *B.subtilis* с регуляторными областями генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл.
3. Определить потенциальные сайты связывания Spo0A и ResD белков в промоторах генов бациллярных рибонуклеаз.
4. Изучить экспрессию генов гуанилспецифичных рибонуклеаз в нативных и дефектных по регуляторным белкам Pho регулона штаммах *B.subtilis*.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Регулятор транскрипции PhoP *B.subtilis* - типичный представитель семейства гомологичных белков, контролирующих Pho ответ у различных видов бацилл, может быть использован в качестве модельного белка для изучения связывания с промоторами генов гуанилспецифичных рибонуклеаз.
2. Специфическое взаимодействие белка PhoP с промоторами генов рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus*, *B.thuringiensis* позволяет отнести их к новым членам Pho регулона, функционирующего у бацилл в условиях фосфатного голодания.
3. Наличие в промоторах генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл потенциальных сайтов связывания регуляторных белков ResD и Spo0A и изменение уровня ферментативной активности в соответствующих мутантных штаммах свидетельствует о роли этих белков в экспрессии генов исследуемых РНКаз.

**Научная новизна работы.** Анализ распространенности среди бацилл двухкомпонентных систем трансдукции сигнала PhoP-PhoR, ResD-ResE и многокомпонентной системы Spo0A-фосфопередачи, контролирующих Pho ответ *B.subtilis*, выявил высокую консервативность регуляторов ответа и видовые особенности, присущие гистидин киназам. Впервые показано непосредственное связывание основного регулятора Pho ответа бацилл – белка PhoP с промоторами генов рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus*, *B.thuringiensis*, что на молекулярном уровне подтверждает его участие в контроле транскрипции их генов. Кроме того, в регуляторных областях генов рибонуклеаз охарактеризованы потенциальные сайты связывания для Spo0A и ResD белков и получены приоритетные данные об участии данных факторов транскрипции в регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных РНКаз.

**Практическая ценность работы.** Полученные в работе данные о механизмах контроля синтеза внеклеточных рибонуклеаз бацилл могут быть использованы при конструировании экспрессионных систем с целью получения высокоэффективных промышленных штаммов-продуцентов целевых белков. Подобные системы должны включать ген целевого белка под контролем промотора биназоподобной рибонуклеазы и бациллярный штамм-хозяина для его экспрессии, дефектный по негативному регулятору Sp0A. В частности этот подход позволил нам получить суперпродуцент рибонуклеазы *B.intermedius*, обладающей противоопухолевой и противовирусной активностью. Кроме того, выявленные в работе закономерности важны для общего понимания механизмов функционирования регуляторных систем бациллярной клетки и могут быть использованы в учебном процессе в соответствующих курсах лекций и семинарах для студентов-биологов.

**Связь работы с научными программами.** Исследования проводились в соответствии с планом НИР КГУ (№ гос. регистрации 01.2.006.09683 «Механизмы функциональной активности клетки») и были выполнены при финансовой поддержке ФЦНТП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники" (Госконтракты 02.434.11.3020, 02.512.11.2050 и 02.512.12.2014), гранта РФФИ 05-04-48182, гранта Правительства Республики Татарстан (2008 г.), программы Международного союза микробиологических сообществ «UNESCO-IUMS-SGM Fellowship».

**Апробация работы.** Основные положения диссертации представлены на XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005); V Республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес» (Казань, 2005); Всероссийской молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2005); 10-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых, посвященной 50-летию Пущинского научного центра РАН, «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2006); I Международной научно-практической конференции «Микробная биотехнология – новые подходы и решения» (Казань, 2007); XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2007); I Всероссийском, с международным участием, конгрессе студентов и аспирантов биологов «Симбиоз Россия 2008» (Казань, 2008); Первой междуниверситетской конференции по современной биологии «Bionews» (Kazan, 2008); XIV Международной конференции, посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным университетом и Гиссенским университетом им. Ю. Либиха, «Microbial enzymes in biotechnology and medicine» (Kazan, 2009).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность профессору Колину Харвуду (Университет Ньюкасла, Великобритания) за предоставленную возможность проведения на базе его лаборатории экспериментов по изучению взаимодействия PhoP белка *B.subtilis* с регуляторными областями генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл; профессору Мичико Накано (Университет здоровья и науки Орегона, США) за предоставленные для работы *resD-resE* мутантные штаммы, а также сердечно благодарит научного руководителя к.б.н., доцента Вершинину Валентину Ивановну за внимательное отношение к работе и всех коллег НИЛ биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии КГУ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, включающего 218 источника, из них 186 зарубежных, и приложений. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 27 рисунков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий. *Escherichia coli* BL21 λDE3 ( $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B$  ( $r_B^- m_B^-$ ) λDE3 (*lacI lacUV5-T7 ind1 sam7 nin5*)), предоставленный проф. К. Харвудом (Университет Ньюкасла, Великобритания) был использован для продукции PhoP и PhoR белков *B.subtilis*; *B.amyloliquefaciens* H2 (проф. Р. Хартли, Национальные институты здоровья, США), *B.circulans* BCF247 и *B.thuringiensis var. subtoxicus* B388 (Центр “Биоинженерия” РАН), *B.intermedius* 7P (Всероссийская коллекция промышленных организмов), *B.pumilus* КММ62 (ТИБОХ ДВО РАН) - для получения промоторных областей генов гуанилспецифичных рибонуклеаз. Роль регуляторных белков в контроле экспрессии генов РНКаз изучали в штаммах *B.subtilis*: JH642 (*pheA1 trpC2*), JH646 (*pheA1 trpC2 spo0A12*), JH647 (*pheA1 trpC2 spo0E11*) и R15-13 (*pheA1 trpC2 abrB23 spo0A12*), полученных из Бациллярного генетического стокового центра (Государственный университет Охайо, США); LAB2506 (*trpC2 pheA1 resD::cat*) и LAB2234 (*trpC2 pheA1 ΔresE::spc*), предоставленных проф. М. Накано (Университет здоровья и науки Орегона, США).

Плазмиды pET-PhoP и pET-PhoR231 предназначены для получения белка PhoP и цитоплазматического фрагмента белка PhoR *B.subtilis* в клетках *E.coli* (проф. К. Харвуд, Университет Ньюкасла, Великобритания); pMZ55, pMZ56, pMZ58, pMZ59 и pMT420 - для экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B.intermedius* (биназа, РНКазы Vi), *B.pumilus* (РНКазы Vpu), *B.thuringiensis* (РНКазы Vth), *B.circulans* (РНКазы Vci) и *B.amyloliquefaciens* (барназа, РНКазы Va) соответственно в штаммах *B.subtilis* (коллекция НИЛ биосинтеза и биоинженерии ферментов КГУ).

Бактерии культивировали на L-бульоне либо бесфосфорной синтетической среде (содержание  $\Phi_n$  - 4 мкг/мл) при 37°C с аэрацией. Контроль роста культуры производили путем измерения оптической плотности суспензии при длине волны 590 нм. При необходимости в среды добавляли соответствующие антибиотики: канамицин (10 мкг/мл), спектиномицин (75 мкг/мл), хлорамфеникол (5 мкг/мл – для штамма *B.subtilis* LAB2506 и 10 мкг/мл – для штаммов, несущих плазмиду pMT420), ампициллин (100 мкг/мл), а для ауксотрофных штаммов - фенилаланин и триптофан (50 мкг/мл).

Выделение хромосомной ДНК из клеток *B.subtilis* осуществляли с помощью набора реактивов «DNeasy Blood & Tissue Kit» («Qiagen»). Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli* и *B.subtilis*, рестрикцию плазмид, электрофорез ДНК в агарозном геле, а также трансформацию плазидами компетентных клеток *E.coli* и *B.subtilis* проводили стандартными методами [Sambrook and Russell, 2001].

Промоторные области генов рибонуклеаз бацилл и гена *ykoL B.subtilis* (позитивный контроль для EMSA анализа) амплифицировали в программируемом термостате «Techne TC-512» в реакционной смеси с Platinum Pfx-полимеразой («Invitrogen»), хромосомной ДНК соответствующих видов бацилл и праймерами, представленными в таблице. Состав реакции и условия проведения ПЦР, оптимальные для каждой пары праймер-матрица, подобраны в данной работе. Очистку ПЦР-продуктов проводили с помощью китов «QIAquick PCR Purification Kit» или «QIAquick Gel Extraction Kit» («Qiagen»).

Таблица

Праймеры для амплификации регуляторных областей генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл и гена *ykoL B.subtilis*

Праймеры	Промоторы генов для амплификации	Последовательность
FBaR	PНКаз Ba и Bci	5'-GAAAACGTCACATTGC-3'
RBaR		5'-TCATCATGTGAAGCTG-3'
FBpR	PНКаз Bi, Bpu Bth	5'-ТТААТСGGAAAAGACG-3'
RBpR		5'-GAAGCTGTCCTCTTG-3'
YkoL-FOR	<i>ykoL</i>	5'-TGAAATGCTGGAGACGTTTATG-3'
YkoL-REV		5'-TTTTCTAAAGCGGATTTCAATA-3'

Белки PhoP-His<sub>6</sub> и PhoR-His<sub>6</sub> *B.subtilis* выделяли из цитоплазмы рекомбинантного штамма *E.coli*, выращенного при 30°C на L-бульоне с добавлением в середине логарифмической фазы роста индуктора ИПТГ (0.5 мМ). Клетки разрушали ультразвуком. Осветленный дезинтеграт клеток наносили на колонку с никель-сефарозой, уравновешенную фосфатным буфером (рН 8.0). Элюцию связавшегося белка проводили в градиенте 20-500 мМ имидазола. Полученный препарат подвергали гель-фильтрации на

сефадексе G-100. Степень чистоты и молекулярный вес белков оценивали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза, используя 4%-ый концентрирующий (pH 6.8) и 10%-ый разделяющий (pH 8.8) гели на основе трис-глицинового буфера [Laemmli, 1970].

Масс-спектрометрический анализ очищенных PhoP и PhoR белков проведен на MALDI-TOF масс-спектрометре «Voyager DE-RP» доктором Дж. Греем (лаборатория «Pinnacle», Университет Ньюкасла, Великобритания). Результаты проанализированы с помощью программы «Mascot PMF» (<http://www.matrixscience.com>).

О ДНК-связывающей активности PhoP белка в отношении промоторов генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл судили по изменению электрофоретической подвижности комплекса ДНК–белок – метод EMSA [Allenby *et al.*, 2006].

Способность трансформантов к синтезу РНКазы проверяли по методу Джеффриса. Активность рибонуклеазы РНКазы в культуральной жидкости определяли модифицированным методом Анфинсена по кислоторастворимым продуктам гидролиза РНК [Лещинская с соавт., 1980]. Специфическую активность рассчитывали как отношение общей рибонуклеазной активности к величине биомассы.

Информация о геномах бацилл, нуклеотидных и аминокислотных последовательностях рибонуклеаз и регуляторных белков извлечена из баз данных Виртуального института микробного стресса и выживания «MicrobesOnline» (<http://www.microbesonline.org>) и Национального центра биотехнологической информации (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>).

Поиск ортологов регуляторных белков *B.subtilis* проводили с помощью средств сайта «MicrobesOnline». Филогенетические древа были построены методом ближайшего связывания (neighbour-joining) на основе выровненных с помощью программы «MUSCLE» (<http://www.drive5.com/muscle>) и отредактированных с помощью программы «GBlocks» ([http://molerol.cmima.csic.es/castresana/gblocks\\_server.html](http://molerol.cmima.csic.es/castresana/gblocks_server.html)) аминокислотных последовательностей.

Потенциальные сайты для взаимодействия регуляторных белков с промоторами генов рибонуклеаз выявляли с помощью программы «Virtual Footprint» ([http://www.prodoric.de/vfp/vfp\\_promoter.php](http://www.prodoric.de/vfp/vfp_promoter.php)) и визуально, используя их логотипы, представленные в базах «Prodoric» (<http://www.prodoric.de>) и «DBTBS» (<http://dbtbs.hgc.jp>).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Excel 2003». Рассчитывали среднеквадратичное отклонение ( $\sigma$ ), результаты считали достоверными при  $\sigma \leq 10\%$ . При расчете достоверности получаемых разностей использовали t-критерий Стьюдента, принимая  $P \leq 0.05$  за достоверный уровень значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Ортологи *phoP*, *spo0A* и *resD* генов *Bacillus subtilis* в секвенированных геномах бацилл.

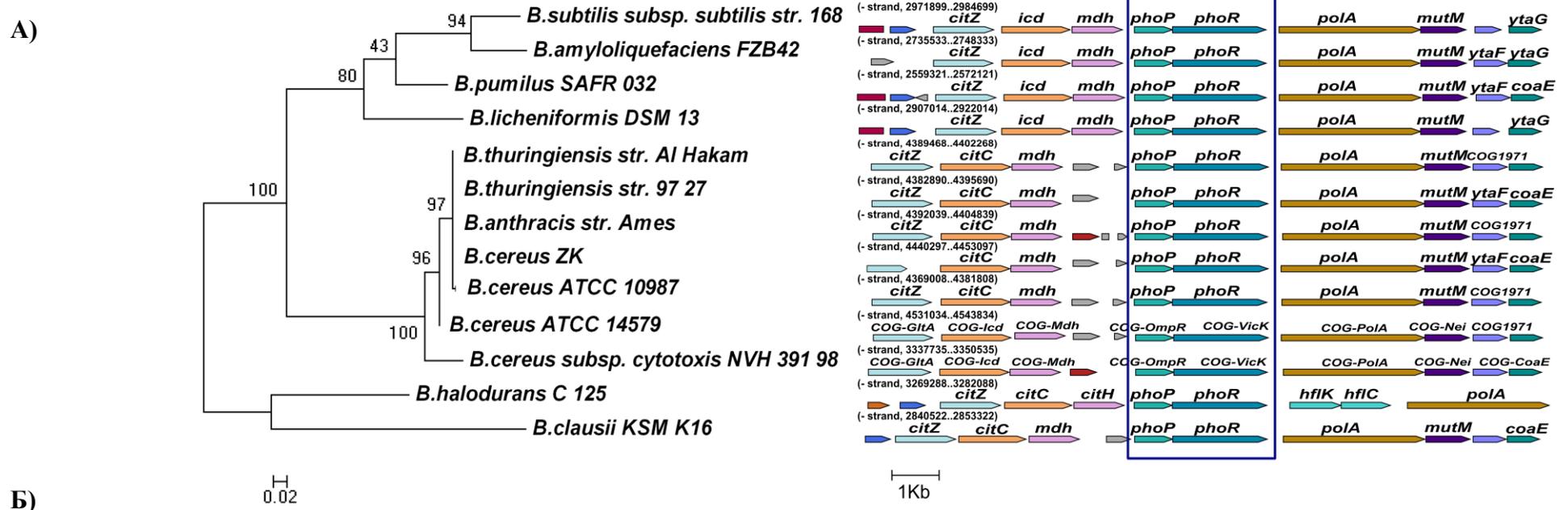
Известно, что функционирование Pho регулона в условиях дефицита в среде неорганического фосфата контролируется у *B.subtilis* тремя взаимосвязанными системами [Birkey *et al.*, 1998] - PhoP-PhoR (основная роль в регуляции метаболизма фосфора), ResD-ResE (отвечает за модуляцию процессов аэробного и анаэробного дыхания) и многокомпонентной системой Spo0A-фосфопередачи (инициирует спорообразование). Для того чтобы оценить их роль в регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл, на первом этапе работы было необходимо установить, присутствуют ли подобные системы у других представителей рода и насколько они могут быть функционально сходны. Для этого в секвенированных геномах бацилл мы провели поиск ортологов указанных регуляторных систем. Так как у прокариот многие гены являются ксенологами [Lerat *et al.*, 2005; Kunin *et al.*, 2005], было важно оценить вероятность происхождения исследуемых белков в результате горизонтального транспорта генов. Поэтому мы также сравнивали генетический контекст генов [Korbel *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005] и сопоставляли филогенетические деревья бациллярных видов, построенные на основе аминокислотных последовательностей регуляторных белков и гена 16S-рРНК [Price *et al.*, 2007].

Потенциальные ортологи *phoP-phoR*, *resD-resE* и *spo0A* генов *B.subtilis* были обнаружены у всех бацилл. Генетический контекст *phoP-phoR* генов бацилл оказался весьма сходным (рис. 1А), в то время как *resD-resE* и *spo0A* гены расположены в более вариабельных локусах. Аминокислотные последовательности PhoP белков бацилл были идентичны таковым *B.subtilis* на 69-88%, PhoR – на 40-71%, ResD - на 73-95%, ResE – на 52-91%, Spo0A - на 75-97%. По степени идентичности аминокислотных последовательностей и сходству организации генетических локусов виды бацилл можно разделить на отдельные группы, преимущественно отражающие филогенетическое родство, что характерно только для истинных ортологов.

В совокупности полученные данные позволяют утверждать, что у различных видов бацилл имеются структурно и функционально сходные PhoP, Spo0A и ResD белки, что позволило нам использовать *B.subtilis* в качестве модельного организма для изучения регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл.

### 2. Взаимодействие PhoP белка *Bacillus subtilis* с промоторами генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл.

В промоторах генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus*, *B.thuringiensis* ранее были обнаружены потенциальные последовательности для связывания PhoP белка *B.subtilis* и установлено, что



**N-терминальный регуляторный домен**

<b>Bsub_168</b>	1	MNKKILVVDDEESIVTLLQYNLERSGYDVTASD GEEALEKKAETEPD L I V L D V M L P K L D G I E V C K Q L R Q Q K L M F P I L M L T A K D D E F D K V L G L E L G A D D Y M T K P F S P R E V W A R V K A I L F R S E
<b>Bamy_FZB42</b>	1	MNKKILVVDDEQSI V T L L Q Y N L E R S G Y D V I T A S D G E E A L E L A E N E M P D L I V L D V M L P R W D G I D V C K Q L R Q Q K M M V P I L M L T A K D E E F D K V L G L E L G A D D Y M T K P F S P R E V T A R V K A I L F R A D
<b>Bpum_SAFR-032</b>	1	MNKKILVVDDEESIVTLLSYNLERAGYDVTARD GEEALEKAASEQPD L I V L D L M L P K M D G I E V C K Q L R I Q K M M F P I L M L T A K D D E F D K V L G L E L G A D D Y M T K P F S P R E V G A R V K A I L F R A Q
<b>Bthu_Al_Hakam</b>	1	MNKKILVVDDEESIVTLLSYNLERAGYDVTARD GEEALEKAASEQPD L I V L D L M L P K M D G I E V C K Q L R I Q K M M F P I L M L T A K D D E F D K V L G L E L G A D D Y M T K P F S P R E V G A R V K A I L F R A Q
<b>Bthu_97-27</b>	1	-----M D G E M A L Q K A T T E R P D L I L D L M L P K M D G M E V C K E L R L Q R V M T P I L M L T A K D D E F D K V L G L E L G A D D Y M T K P F S P R E V W A R V K A I L F R I T K

**C-терминальный ДНК-связывающий домен**

<b>Bsub_168</b>	123	IR--APSSSEMNDEMEGOI V I G D L K I L P D H Y E A Y F K E S Q L E L T P K E F E L L Y L G R H K G R V L T R D L L L S A V W N Y D F A G D T R I V D V H I S H L R D K I E N N T K K P I Y I K T I R G L G Y K L E E P K M M E
<b>Bamy_FZB42</b>	123	IS--SLS-QGREEEKDGO L I G E L K I L P E H Y E A Y F K S E Q L E L T P K E F E L L Y L G R H K G R V L T R D L L L S A V W N Y D F A G D T R I V D V H I S H L R D K I E S N T K K P I Y I K T I R G L G Y K L E E P K M M E
<b>Bpum_SAFR-032</b>	123	QSQPAP T Q E E K E I I A D Q K I G E L R I L P E H Y E W Y F Q E R L E L T P K E F E L L Y L A K H K G R V L T R D L L L S A V W N Y D F A G D T R I V D V H I S H L R D K I E K N T K K P T Y I K T I R G L G Y K L E E P K P M E
<b>Bthu_Al_Hakam</b>	123	QSQPAP T Q E E K E I I A D Q K I G E L R I L P E H Y E W Y F Q E R L E L T P K E F E L L Y L A K H K G R V L T R D L L L S A V W N Y D F A G D T R I V D V H I S H L R D K I E K N T K K P T Y I K T I R G L G Y K L E E P K S M E
<b>Bthu_97-27</b>	91	LQ---QEEQVACAPDED S I I A E L K I L P E F Y E A Y F Q G R K L E L T P K E F E L L Y L A R K M S R V L T R D Q L L S A V W N Y D F A G D T R I V D V H I S H L R D K I E Q N T K K P T Y I K T I R G L G Y K L E E P K G M E

Рисунок 1. Ортологи PhoP белков *B.subtilis* у различных видов бацилл.

А) Филогенетическое древо, построенное на основе аминокислотных последовательностей PhoP белков бацилл, и генетический контекст кодирующих их генов. Гены *phoP-phoR* выделены рамкой.

Б) Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей PhoP белков бацилл. Функционально значимые аминокислоты ДНК-связывающего домена отмечены звездочкой.

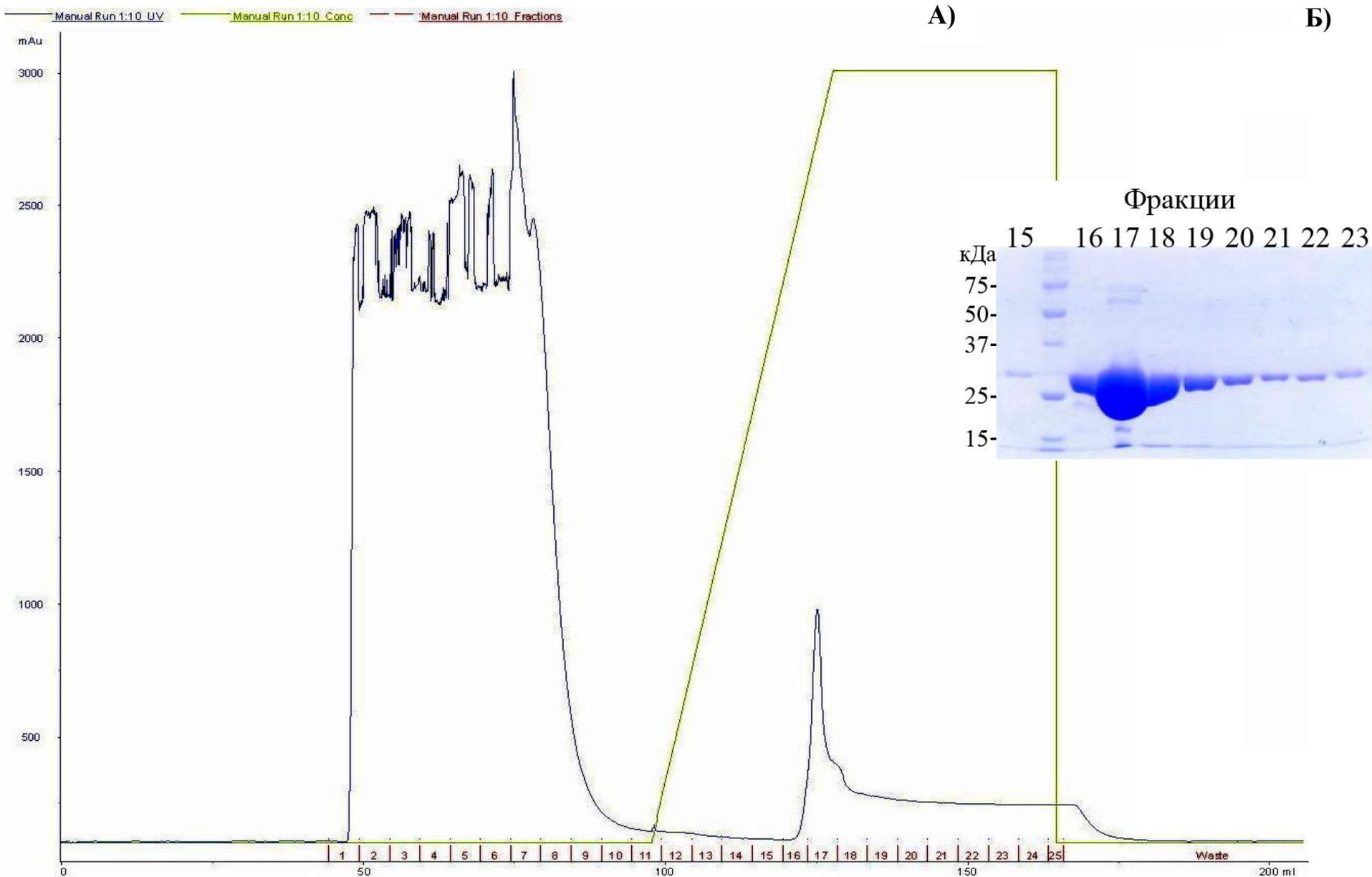


Рисунок 2. Аффинная хроматография осветленного дезинтеграта клеток *E.coli*, экспрессировавших PhoP-His<sub>6</sub> белок *B.subtilis*, (A) и DS-Na-ПААГ-электрофорез белковых фракций (B).

экспрессия их генов в рекомбинантных штаммах *B.subtilis* является PhoP-PhoR-зависимой [Знаменская с соавт., 1999, Морозова с соавт., 2001], в то время как синтез рибонуклеазы *B.circulans* хотя и зависел от содержания фосфора в окружающей среде, но не подчинялся контролю со стороны PhoP-PhoR системы. Чтобы сделать окончательный вывод о непосредственном участии PhoP белка в транскрипции генов рибонуклеаз бацилл, было необходимо экспериментально оценить его способность связываться с их промоторными областями.

Проведенный нами сравнительный анализ первичной структуры PhoP белков *B.subtilis*, *B.amyloliquefaciens*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis* показал, что основные различия сосредоточены в линкерной области, соединяющей N- и C-домены белков, в то время как функционально значимые аминокислотные остатки ДНК-связывающих доменов консервативны (рис. 1Б). Это свидетельствует об универсальности взаимодействия этих регуляторов ответа с ДНК-мишенями, поэтому мы использовали PhoP белок *B.subtilis* для изучения связывания с промоторами генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл методом EMSA.

*Получение PhoP и PhoR регуляторных белков B.subtilis.* Белки PhoP и PhoR *B.subtilis* были экспрессированы в индуцибельной T7-системе, включающей конструкцию на основе рЕТ вектора и штамм-реципиент *E.coli* BL21(λDE3). Для оптимизации синтеза рекомбинантных белков была проведена серия экспериментов, в которой варьировали температуру выращивания продуцента, концентрацию вносимого индуктора и время индукции. Эффективным оказалось выращивание бактерий при температуре 30°C и индукция синтеза целевых белков с помощью 0.5 mM ИПТГ в течение 3 часов. Эти условия были применены для препаративного выделения белков. В результате очистки с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии (рис. 2) и последующей гель-фильтрации были получены электрофоретически гомогенные белки (рис. 3). Проведенный масс-спектрометрический анализ препаратов подтвердил, что они являются именно PhoR и PhoP белками *B.subtilis*.

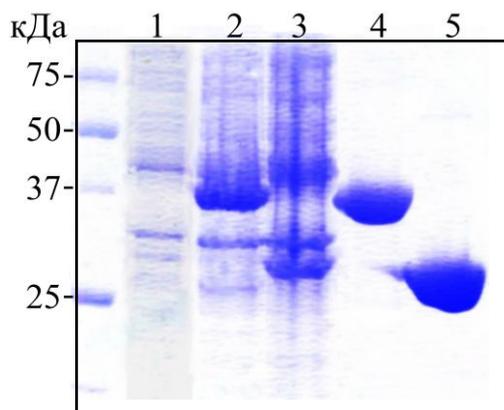


Рисунок 3. PhoP и PhoR белки *B.subtilis*, выделенные из рекомбинантных штаммов *E.coli*.

Условные обозначения: 1 – неиндуцированная культура; 2-3 – растворимые клеточные фракции, содержащие соответственно PhoR и PhoP белки; 4 – PhoR, 5 – PhoP.

*ПЦР-амплификация промоторов генов гуанилспецифичных рибонуклеаз.* Для получения регуляторных областей генов РНКаз бацилл была выделена их хромосомная ДНК и проведена амплификация необходимых участков с помощью ПЦР. Принимая во внимание сходство промоторных областей генов рибонуклеаз, для их амплификации были использованы две пары праймеров – одна для биназоподобных РНКаз, а другая - для барназоподобных РНКаз (см. табл.). Так как праймеры не были строго специфичными, потребовалась оптимизация условий проведения ПЦР. Для каждого промотора были подобраны концентрации ДНК-матрицы и ионов магния, а также температура отжига праймеров. Полученные фрагменты были очищены и определена концентрация ДНК в препаратах (рис. 4).

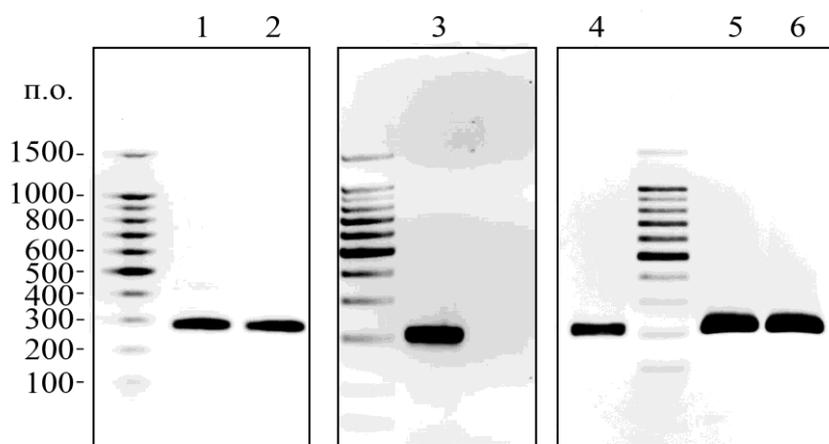


Рисунок 4. Промоторные области генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл и гена *ukoL B.subtilis*, амплифицированные с помощью ПЦР.

Условные обозначения: 1 – *B.amyloliquefaciens* H2, 2 – *B.circulans* BCF247, 3 – *B.subtilis subsp. subtilis str.* 168, 4 – *B.intermedius* 7P, 5 – *B.pumilus* KMM62, 6 – *B.thuringiensis var. subtoxicus* B388.

*Анализ изменения электрофоретической подвижности в геле комплекса ДНК–белок.* Чтобы доказать непосредственное связывание белка PhoP с промоторами генов рибонуклеаз бацилл, был проведен EMSA-анализ, в котором использовали PhoP белок в активной (фосфорилированной с помощью родственной киназы PhoR) и неактивной формах. Было показано, что регулятор транскрипции PhoP эффективно связывается с промоторами генов РНКаз *Vi*, *Vri* и *Vth* (рис. 5А), степень взаимодействия зависит от концентрации белка. Фосфорилирование регулятора ответа белком PhoR оказывает незначительное влияние, что объясняется возможным фосфорилированием PhoP с помощью киназ *E.coli* [Yamamoto *et al.*, 2005; Baek and Lee, 2007]. Промоторы генов РНКаз *Va* и *Vci* не обладали способностью образовывать комплекс с PhoP белком (рис. 5Б).

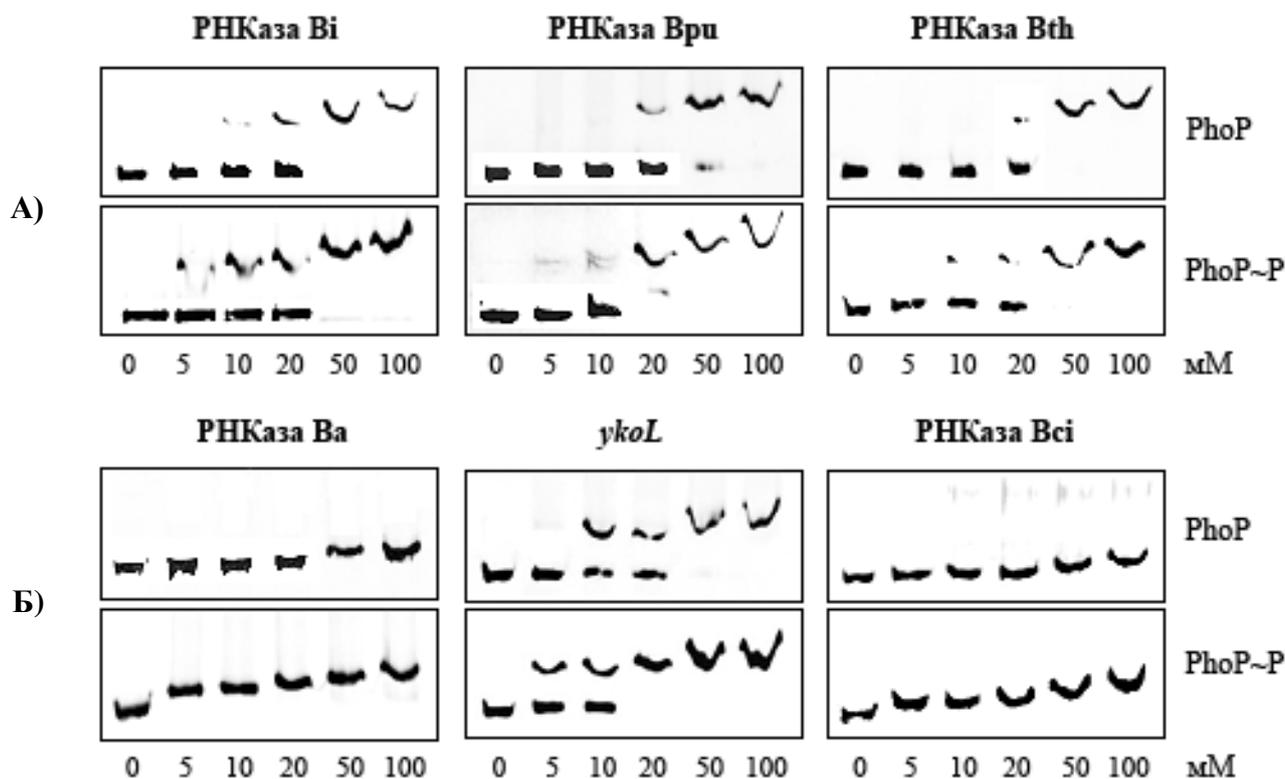


Рисунок 5. Изменение электрофоретической подвижности комплекса белка PhoP с регуляторными областями генов рибонуклеаз бацилл.

А) Промоторы генов рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis*.

Б) Промоторы генов рибонуклеазы *B.amyloliquefaciens*, *ykoL* *B.subtilis* (позитивный контроль) и рибонуклеазы *B.circulans*.

Таким образом, полученные данные о взаимодействии PhoP белка с промоторами генов биназоподобных рибонуклеаз *in vitro* в совокупности с более ранними результатами по изучению экспрессии их генов в *phoP-phoR* мутантных штаммах *B.subtilis* позволяют отнести внеклеточные рибонуклеазы *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis* к новым членам Pho регулона бацилл. Вместе с тем открытым остался вопрос о механизмах регуляции экспрессии генов других гуанилспецифичных рибонуклеаз – РНКаз *B.circulans* и *B.amyloliquefaciens*, промоторы которых не способны взаимодействовать с PhoP белком.

### 3. Сайты связывания регуляторных белков Pho регулона в промоторах генов рибонуклеаз бацилл.

Для обнаружения нуклеотидных последовательностей, определяющих регуляторные механизмы экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз, был проведен сравнительный анализ их промоторных областей на наличие сайтов взаимодействия с регуляторными белками Spo0A и ResD *B.subtilis*. В промоторных областях генов РНКаз Ва и Bci было выявлено несколько

### Spo0A



PHKasa\_Bam -95 CGGTTGGTTCAG-----CCGGGGTTTATTTTTCGCTAGATAAAAAGTACTATTTTTTAAA-----TTCTTTCTATTTCCT  
 PHKasa\_Bci -96 CGGTTGGTTCATG-----CCGGGGTTTATTTTTCGCTGATCAAAAAGTACTATTTTTTAAA-----TTCTATCTATTTCCT  
 PHKasa\_Bin -100 CTTTTTATTTATTTCATCAGAAGGTTAT-----CAGTGAAAAAGCCTCATTTTAGCAAAGAACCTGTTTCCTTTACATTTCCT  
 PHKasa\_Bpu -100 CTTTTTATTTATTTCATCAGAAGAATAT-----CAGGAGAAAAGCCTCATTTTAGCAAAGATCCTGTTTCCTTTACATTTCCT  
 PHKasa\_Bth -100 CTTTTTGTTTACGTCATCTAGAGACAGT-----AGGTCAAAAAGCCTCATTTTTTCCAATCTCCTGATTCCTTTACATTTCCT

-10 SD Met

PHKasa\_Bam TTCTTTTCGTTGCTGATACAATG-----AAAAGGAATCAGCTTCACATGATGAAAATGGGAGGTATTGCTTTG +40  
 PHKasa\_Bci TTCTTTTCGATGCTGATACAATA-----AAAAGGAATCAGCTTCACATGATGAAAATGGGAGGTATTGCTTTG +40  
 PHKasa\_Bin TTCATGTTCCGGGTGCTATAAATATGAGGTAGACAAGCATCAAGAGGA--CAGCATCCGATTTTCCTTAATAGGAGG-ATGAAGATG +57  
 PHKasa\_Bpu TTCATATTCCGGGTGCTATAAATATGAGGTAGACAAGCATCAAGAGGA--CAGCATCCGATTTTCCTTAATAGGAGG-ATGAAGATG +57  
 PHKasa\_Bth TTCATATGCCGGTGTATAAATATGAGGTAGACAAGCATCAAGAGGA--CGGCATCCCATTTTCCTTTTGGAGAGG-ATCAAGATG +57

A)

### ResD



PHKasa\_Bam -95 CGGTTGGTTCAG-----CCGGGGTTTATTTTTTCGCTAGATAAAAAGTACTATTTTTTAAA-----TTCTTTCTATTTCCT  
 PHKasa\_Bci -96 CGGTTGGTTCATG-----CCGGGGTTTATTTTTTCGCTGGATCAAAAAGTACTATTTTTTAAA-----TTCTATCTATTTCCT  
 PHKasa\_Bin -100 CTTTTTATTTATTTCATCAGAAGGTTAT-----CAGTGAAAAAGCCTCATTTTAGCAAAGAACCTGTTTCCTTTACATTTCCT  
 PHKasa\_Bpu -100 CTTTTTATTTATTTCATCAGAAGAATAT-----CAGGAGAAAAGCCTCATTTTAGCAAAGATCCTGTTTCCTTTACATTTCCT  
 PHKasa\_Bth -100 CTTTTTGTTTACGTCATCTAGAGACAGT-----AGGTCAAAAAGCCTCATTTTTTCCAATCTCCTGATTCCTTTACATTTCCT

-10 SD Met

PHKasa\_Bam TTCTTTTCGTTGCTGATACAATG-----AAAAGGAATCAGCTTCACATGATGAAAATGGGAGGTATTGCTTTG +40  
 PHKasa\_Bci TTCTTTTCGATGCTGATACAATA-----AAAAGGAATCAGCTTCACATGATGAAAATGGGAGGTATTGCTTTG +40  
 PHKasa\_Bin TTCATGTTCCGGGTGCTATAAATATGAGGTAGACAAGCATCAAGAGGA--CAGCATCCGATTTTCCTTAATAGGAGG-ATGAAGATG +57  
 PHKasa\_Bpu TTCATATTCCGGGTGCTATAAATATGAGGTAGACAAGCATCAAGAGGA--CAGCATCCGATTTTCCTTAATAGGAGG-ATGAAGATG +57  
 PHKasa\_Bth TTCATATGCCGGTGTATAAATATGAGGTAGACAAGCATCAAGAGGA--CGGCATCCCATTTTCCTTTTGGAGAGG-ATCAAGATG +57

B)

Рисунок 6. Потенциальные сайты связывания регуляторных белков Pho регулона в промоторах генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл.

A) Spo0A-последовательности. Б) ResD-последовательности.

Условные обозначения: сайты связывания регуляторных белков на «плюс» цепи выделены рамкой, на «минус» цепи – серым цветом; предполагаемые Pho-боксы подчеркнуты одной линией, точка начала транскрипции – дважды; сверху приведены логотипы Spo0A- и ResD-боксов *B.subtilis*.

нуклеотидных последовательностей, гомологичных ОА-боксу *B.subtilis* (рис. 6А). Они отличались от консенсусной 1-3 нуклеотидами. Расположение большинства потенциальных ОА-боксов в промоторах генов РНКаз Ва и Вс<sub>1</sub> практически совпадало, хотя в них были отмечены и небольшие различия. В промоторах генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis* ОА-подобных сайтов *B.subtilis*, обнаружено не было. Сайты, гомологичные ResD-связывающим последовательностям *B.subtilis*, были найдены в промоторах генов всех исследуемых РНКаз, однако количество сайтов и их расположение было различно (рис. 6Б). Таким образом, наличие в промоторах генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл потенциальных сайтов для связывания регуляторных белков, указывает на возможную роль данных факторов в регуляции транскрипции генов РНКаз.

#### **4. Экспрессия генов гуанилспецифичных рибонуклеаз в нативных и дефектных по регуляторным белкам Pho регулона штаммах *Bacillus subtilis*.**

*Влияние ResD-ResE белков на экспрессию генов рибонуклеаз бацилл в клетках B.subtilis.* Чтобы установить, участвуют ли регуляторные белки в контроле экспрессии генов рибонуклеаз, был исследован эффект мутаций в кодирующих их генах на активность РНКаз. Известно, что дефекты в ResD-ResE системе оказывают влияние на экспрессию генов Pho регулона в условиях фосфатного голодания [Sun *et al.*, 1996a]. В наших исследованиях показано, что *resD* мутация негативно сказывается на уровне продукции биназоподобных рибонуклеаз. Специфическая активность рибонуклеаз Vi, Vru и Vth в штаммах, дефектных по ResD белку, снижается по сравнению с уровнем РНКазной активности в штамме с полноценной регуляторной системой соответственно на 89, 87 и 94% (рис. 7). Полученные результаты согласуются с данными литературы о специфической активности щелочной фосфатазы, типичного представителя Pho регулона, в *resD* мутанте, которая также снижается на 80-90% от уровня активности в штамме дикого типа [Hulett, 1996]. Это позволяет сделать вывод о том, что белок ResD задействован в контроле экспрессии генов биназоподобных рибонуклеаз так же, как и других членов Pho регулона, т.е. является позитивным регулятором [Birkey *et al.*, 1998; Schau *et al.*, 2004].

Показано, что делеция гена киназы *resE* не приводит к утрате ферментативной активности рекомбинантными штаммами *B.subtilis*, несущими плазмиды с генами биназоподобных рибонуклеаз (рис. 7). Это объясняется тем, что ResD белок может быть фосфорилирован другими сенсорными киназами либо низкомолекулярными донорами фосфата, такими как ацетилфосфат [Laub and Goulian, 2007].

Отсутствие белков двухкомпонентной системы ResD-ResE не оказывает влияния на экспрессию гена РНКазы *B.amyloliquefaciens* и *B.circulans* в условиях фосфатного голодания. Однако наличие потенциальных сайтов

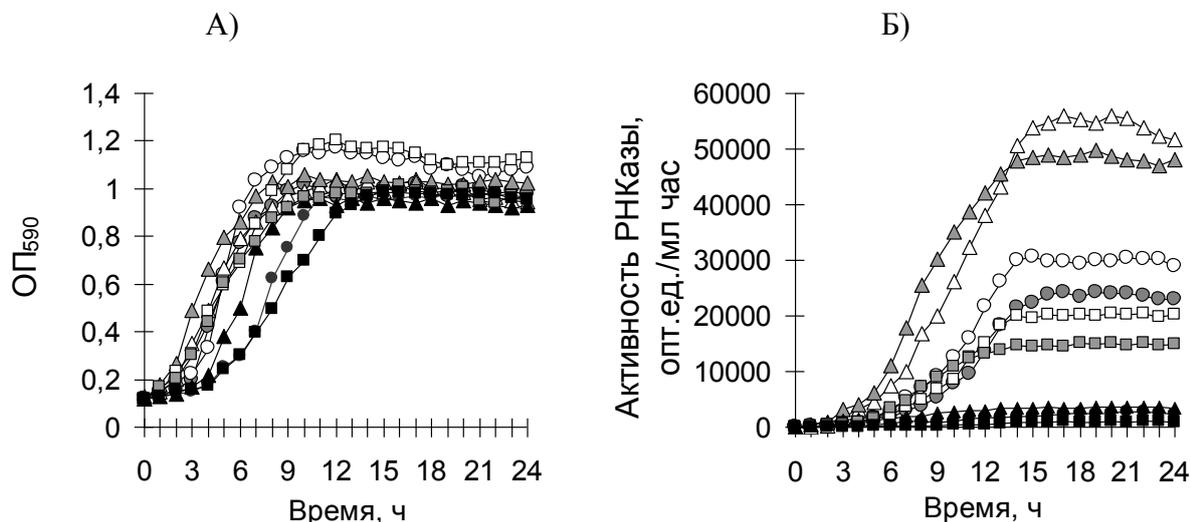


Рисунок 7. Экспрессия генов биназоподобных рибонуклеаз в дефектных по ResD и ResE белкам рекомбинантных штаммах *B.subtilis*.

А) Рост рекомбинантных штаммов. Б) рибонуклеазная активность.

Условные обозначения: штамм *B.subtilis* JH642 изображен белым цветом, *B.subtilis* LAB2234 ( $\Delta resE$ ) – серым, *B.subtilis* LAB2506 ( $resD^-$ ) – черным; РНКза Vi кружками, РНКза Vri – треугольниками, РНКза Vth - квадратами.

связывания для белка ResD в промоторах всех гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл, свидетельствует о том, что данный фактор все же может регулировать экспрессию их генов, но, по-видимому, в других условиях.

*Роль Spo0A белка в регуляции экспрессии генов рибонуклеаз бацилл в клетках B.subtilis.* Исследование влияния Spo0A белка на экспрессию генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл проводили в штаммах, несущих мутации в самом гене *spo0A* (образование функционального регулятора ответа практически невозможно), гене его фосфатазы *spo0E* (гиперактивная фосфатаза делает Spo0A регулятор неактивным), а также в двойном *spo0A/abrB* мутанте (возможность проследить AbrB-опосредованный путь функционирования Spo0A белка).

Установлено, что мутация в гене *spo0A* негативно сказывается на продукции РНКазы Va. Рибонуклеазная активность как в одиночном, так и в двойном *spo0A/abrB* мутанте практически отсутствовала (рис. 8). Полученный результат свидетельствует о том, что белок Spo0A является позитивным регулятором экспрессии гена рибонуклеазы *B.amyloliquefaciens*, и действует независимо от AbrB белка.

Специфическая активность барназы в *spo0E* мутантном штамме, в котором основная часть Spo0A белка присутствует в неактивной форме, соответствовала контролю (рис. 8). Этот результат в сравнении с тем, что получен с одиночным *spo0A* мутантом, позволяет полагать, что ген РНКазы Va, по-видимому, активируется небольшими количествами фосфорилированного Spo0A

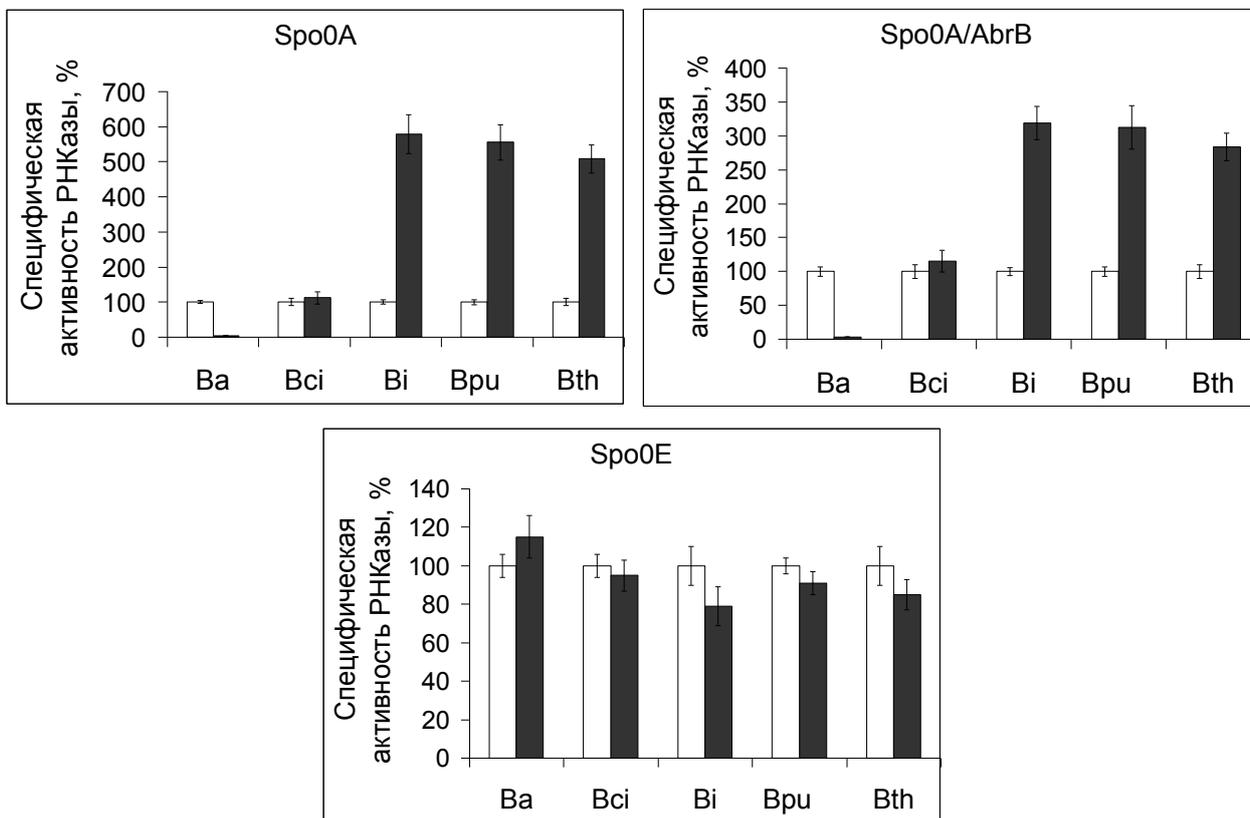


Рисунок 8. Экспрессия генов рибонуклеаз бацилл в рекомбинантных штаммах *B.subtilis*, дефектных по Spo0A, AbrB и Spo0E белкам.

Условные обозначения: уровень активности фермента в рекомбинантном штамме *B.subtilis* с полноценными регуляторными белками - белые столбики, активность РНКазы в мутантных штаммах – черные столбики.

регулятора. Присутствуя в клетках в стадии замедления роста в малых количествах, активный Spo0A регулятор выполняет важные функции. Он не только способствует высвобождению вторичных метаболитов, в том числе и гидролитических ферментов и антимикробных веществ, но и принимает участие в регуляции таких важных для популяции бактерий процессов, как бактериальный «апоптоз» и формирование колоний сложного типа - биопленок [Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003; Verhamme *et al.*, 2009].

Активность рибонуклеазы Bci в исследуемых мутантных штаммах *B.subtilis* не отличалась от контроля (рис. 8). Следовательно, ее биосинтез не подвержен действию Spo0A белка. Отсутствие регуляции со стороны основных белков фосфатного регулона, а также альтернативного сигма В фактора [Морозова, 2000], который контролирует у *B.subtilis* неспецифический ответ на фосфатное голодание [Allenby *et al.*, 2005], свидетельствует о том, что ген фосфат-зависимой рибонуклеазы *B.circulans* относится к группе малоизученных генов фосфатного стимулона, неспецифически индуцируемых при истощении фосфора в окружающей среде.

Несмотря на то, что в промоторах генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis* сайтов, подобных 0A-боксам *B.subtilis*, выявлено не было (рис. 6), не исключена вероятность участия регулятора ответа Spo0A в контроле экспрессии генов этих РНКаз, так как известно, что данный белок контролирует множество процессов в клетке косвенно, влияя на транскрипцию других регуляторных белков, в частности AbrB [Molle *et al.*, 2003].

В наших экспериментах было показано, что Spo0A белок является негативным регулятором экспрессии генов биназоподобных РНКаз, на что указывает значительное повышение РНКазной активности (в 5-6 раз) в Spo0A-дефектных штаммах (рис. 8). В двойных *spo0A/abrB* мутантах уровень РНКазной активности превышает контрольные значения лишь в 3 раза (рис. 8), что свидетельствует о том, что белок AbrB является позитивным регулятором. Результаты о влиянии Spo0A белка на экспрессию генов биназоподобных РНКаз согласуются с данными литературы для гена щелочной фосфатазы [Hulett, 1996] и подтверждают его AbrB-опосредованный эффект.

Эксперименты с мутантными штаммами не только подтвердили справедливость отнесения генов гуанилспецифичных рибонуклеаз к новым членам Pho регулона, но и способствовали решению практической задачи, нацеленной на получение суперпродуцентов этих важных с практической точки зрения ферментов.

*Получение суперпродуцентов бациллярных рибонуклеаз.* Существуют различные методы для получения микроорганизмов, характеризующихся способностью к повышенному синтезу целевого белка, которые успешно были применены в отношении бацилл-продуцентов гуанилспецифичных рибонуклеаз. В частности, использование принципов генной инженерии и мутагенеза позволило добиться 5 и 10-кратного увеличения активности биназы по сравнению с природным продуцентом [Балабан с соавт., 1992; Знаменская с соавт., 1999]. В настоящей работе мы предлагаем иной подход, основанный на устранении негативного регулятора синтеза целевого белка. Клонировав мультикопийную плазмиду с геном биназы в Spo0A-дефектный штамм *B.subtilis*, нам удалось увеличить выход фермента в 30 раз по отношению к природному штамму *B.intermedius* 7P. К тому же использование для получения внеклеточных целевых белков *spo0A*-мутантного штамма-хозяина, имеет ряд неоспоримых преимуществ, в частности нарушения в синтезе протеолитических ферментов у таких бактерий способствуют продукции полноразмерных секретируемых белков [Kodama *et al.*, 2007]. Более того, предложенный подход может быть положен в основу конструирования систем для экспрессии других важных белковых продуктов. Подобные системы должны включать ген целевого белка под контролем промотора биназоподобной рибонуклеазы и Spo0A-дефектный штамм-хозяина.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ секвенированных геномов бактерий рода *Bacillus* показал, что ортологи *phoP*, *spo0A* и *resD* генов *B.subtilis*, продукты которых контролируют специфический Pho ответ, представлены у всех бацилл, что позволило нам использовать *B.subtilis* в качестве модельного организма для изучения регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз.

2. Основной регулятор Pho ответа – фактор транскрипции PhoP *B.subtilis* образует специфический комплекс с промоторами генов рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis* и не взаимодействует с промоторами РНКаз *B.circulans* и *B.amyloliquefaciens*.

3. В регуляторных областях генов гуанилспецифичных рибонуклеаз выявлены нуклеотидные последовательности, гомологичные сайтам связывания других регуляторных белков Pho регулона: ResD сайты – у всех исследуемых РНКаз, а Spo0A боксы – только у рибонуклеаз *B.circulans* и *B.amyloliquefaciens*.

4. В условиях фосфатного голодания экспрессия генов рибонуклеаз *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis* в рекомбинантных штаммах *B.subtilis* позитивно регулируется белком ResD, и негативно - белком Spo0A. Синтез рибонуклеазы *B.circulans* не зависит от этих регуляторов, в то время как экспрессия гена РНКазы *B.amyloliquefaciens* находится под позитивным контролем белка Spo0A.

5. Полученные результаты дают основание считать внеклеточные рибонуклеазы *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.thuringiensis* новыми членами фосфатного регулона, а рибонуклеазу *B.circulans*, в отличие от близкого структурного гомолога – фосфат-независимой РНКазы *B.amyloliquefaciens*, следует отнести к участникам неспецифического Pho ответа.

## Публикации по теме диссертации

1. **Ульянова, В. В.** Роль Spo0A и AbrB белков в регуляции экспрессии гена рибонуклеазы *Bacillus pumilus* в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis* / В. В. Ульянова, В. И. Вершинина, М. Р. Шарипова // Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение: материалы XIII Международной научной конференции, Казань, 4-8 апр. 2005. - Казань: Казан. гос. ун-т. – С. 86-87.

2. **Ульянова, В. В.** Роль белков системы Spo0A-фосфопереноса в регуляции экспрессии гена биназы в клетках *Bacillus subtilis* / В. В. Ульянова, В. И. Вершинина // Наука. Инновации. Бизнес: материалы V Республиканской

- научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, Казань, 9 июня. 2005. – Казань: Экоцентр, 2005. – С. 64-65.
3. **Ульянова, В. В.** Роль белков системы Spo0A-фосфопереноса в регуляции экспрессии гена рибонуклеазы *Bacillus intermedius* в клетках *Bacillus subtilis* / В. В. Ульянова, В. И. Вершинина // Актуальные аспекты современной микробиологии: тезисы Всероссийской молодежной школы-конференции, Москва, 1-3 нояб. 2005. – С. 81.
  4. **Ульянова, В. В.** Экспрессия гена рибонуклеазы *B.thuringiensis* позитивно регулируется двухкомпонентной системой ResD-ResE *B.subtilis* / В. В. Ульянова, М. А. Золотова, В. И. Вершинина // Биология – наука XXI века: сб. тез. 10-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых, посвященной 50-летию Пущинского научного центра РАН, Пущино, 17-21 апр. 2006. - С. 56.
  5. **Ульянова, В. В.** Влияние Spo0A и AbrB белков на экспрессию генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus intermedius* и *Bacillus pumilus* в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis* / В. В. Ульянова, В. И. Вершинина, М. А. Харитоновна, М. Р. Шарипова // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 5. – С. 639-644.
  6. **Ульянова, В. В.** Регуляция экспрессии генов рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans* / В. В. Ульянова, М. А. Золотова, В. И. Вершинина // Материалы докладов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 11-14 апр. 2007. - М.: Издательский центр Факультета журналистики МГУ им. М.В. Ломоносова, 2007. - С. 29-30.
  7. **Ульянова, В. В.** Двухкомпонентная система ResD-ResE позитивно регулирует экспрессию генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл / В. В. Ульянова, М. А. Золотова, М. А. Харитоновна, О. Н. Ильинская, В. И. Вершинина // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2008. - №3. – С. 23-28.
  8. **Ульянова, В. В.** Системы, контролирующие специфический ответ бацилл на фосфатное голодание / В.В. Ульянова, В.И. Вершинина // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2008. – Т. 150, кн. 2. – С. 231-244.
  9. **Ульянова, В. В.** Участие гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans* в ответе клеток на фосфатное голодание / В. В. Ульянова, В. И. Вершинина // Биология: традиции и инновации в 21 веке: Сб. науч. тр. по материалам I Всероссийского, с международным участием, конгресса студентов и аспирантов биологов «Симбиоз Россия 2008», Казань, 6-10 июля. 2008. – Казань: Изд-во КГУ, 2008. - С. 35-36.
  10. **Ulyanova, V. V.** Role of sigma B factor in regulation of binase gene expression in *Bacillus subtilis* cells / V. V. Ulyanova, E. G. Glazunova, V. I. Vershinina // Building the Future in Biology “Bionews”: Proceedings of the First

Interuniversity Conference on Modern Biology, Kazan, 24 Nov. 2008. – Kazan: Kazan State University, 2008. – P. 47.

11. **Ulyanova, V. V.** Interaction of *Bacillus subtilis* PhoP regulator with promoter regions of guanyl-specific ribonuclease genes / V. V. Ulyanova // Microbial enzymes in biotechnology and medicine: XIV International conference devoted to the 20<sup>th</sup> anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University, Kazan, 5-7 June 2009. – Kazan: Kazan State University, 2009. - P. 118-119.