

УДК 579.22:579.852.11:577.218

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ СУБТИЛАЗ

А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова

Аннотация

С использованием базы данных ГенБанка и пакета программ BLAST проведен анализ промоторной области гена *aprBi*, кодирующего внеклеточную субтилизиноподобную протеиназу *Bacillus intermedius*. Регуляторная область гена имеет 91-ную структурную гомологию с соответствующей последовательностью гена субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus*. Проведен сравнительный анализ области регуляции гена *aprBi* с генами сериновых протеиназ других представителей рода *Bacillus*. Идентифицированы потенциальные сайты для взаимодействия с регуляторными белками DegU и Spo0A и изучена закономерность их расположения. Показано, что системы сигнальной трансдукции Spo0A фосфопередачи и DegS-DegU участвуют в позитивной регуляции активности гена *aprBi*.

Введение

Изменчивость и адаптация – это важнейшие характеристики бактерий рода *Bacillus*, обладающих способностью выживать и пролиферировать в разнообразных условиях окружающей среды. В природе бактерии постоянно подвергаются воздействию негативных факторов, таких, как тепловой, холодовой или осмотический шок, недостаток питательных веществ и микроэлементов. У микроорганизмов выработались определенные механизмы адаптации к подобным воздействиям. В основе формирования бактериями специфических адаптивных ответов лежит механизм сигнальной трансдукции [1, 2]. Так, при истощении питательных веществ в среде активируется ряд двухкомпонентных систем трансдукции сигнала: регуляторная пара DegS-DegU регулирует синтез ферментов деградации и, вместе с системой ComP-ComA, достижение состояния компетентности [3–5]. PhoP-PhoR пара отвечает на недостаток неорганического фосфата образованием и секрецией ферментов фосфорного обмена [6]. Переход в покоящееся состояние – споры – находится под контролем Spo0-системы фосфопередачи с киназы на Spo0A белок [7]. Результатом активации этих адаптивных механизмов являются синтез в среду пула внеклеточных гидролаз, антибиотиков и, наконец, споруляция.

Бактерии *Bacillus intermedius* секретируют в среду несколько протеиназ, среди которых доминирует сериновая субтилизиноподобная протеиназа, кодируемая геном *aprBi* [8]. Продукция фермента происходит в стационарной фазе роста бацилл и достигает максимального уровня на 48 ч роста. Белок выделен и очищен из культуральной жидкости на 24 и 48 ч культивирования, изучены основные свойства обеих белковых фракций, N-концевые последовательности

которых идентичны [9, 10]. Фермент появляется в среде в начале стационарной фазы роста. Максимальный уровень продуктивности фермента обнаружен в поздней стационарной фазе и соответствует стадии созревания эндоспор и их освобождения в среду [11]. Однако до сих пор механизмы регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* остаются неизвестными.

Целью работы являлся анализ регуляторной области гена *aprBi* с идентификацией в ней сайтов регуляции и установлением механизмов контроля биосинтеза белка на уровне транскрипции.

1. Материалы и методы исследования

Анализ последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* проводили с использованием алгоритма BLAST и пакета программ, представленных на сервере NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] [12]. Поиск открытой рамки считывания и иницилирующих кодонов проводили с помощью программы ORF Finder [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf>]. Потенциальный старт-кодон трансляции определяли с использованием алгоритма SignalP [<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>], который дает возможность определить вероятность функционирования олигопептида в качестве сигнальной последовательности белка [13].

Бактериальные штаммы и плазмиды. Ген субтилизиноподобной протеиназы из *B. intermedius* клонирован на плазмиде pCS9, сконструированной на основе шатл-вектора pCB22, несущей 6,0-kb фрагмент хромосомы *B. intermedius*, содержащий ген *aprBi* и ген устойчивости к эритромицину [14]. В качестве реципиента плазмидной ДНК был использован штамм *Bacillus subtilis* AJ73, из хромосомы которого делетированы гены внеклеточных протеиназ, любезно предоставленный для работы проф. Ю. Йомантасом, ГНИИ Генетика. Штамм *Bacillus subtilis* 8G5 DegS-DegU (like 8G5; $\Delta degS \Delta degU$; Km^r), дефектный по генам *degS* и *degU* двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU, штамм *B. subtilis* 8G5 *degU32*(Hy) (like 8G5; *degU32*(Hy); Km^r) с мутацией по гену *degU*, ведущей к Hy-фенотипу и штамм *B. subtilis* 8G5 (*trpC2*; *tyr*; *his*; *nic*; *ura*; *rib*; *met*; *ade*; lacks the *sipP* genes) с полноценными регуляторными белками предоставлены доктором Jan Maarten van Dijk, University of Groningen, Holland. Бактериальные штаммы, дефектные по *spo*-генам, получены из коллекции *Bacillus Genetic Stock Center* (BGSC): *B. subtilis* 168 (*trpC2*), *B. subtilis* 9V(*spo0A9 trpC2*), *B. subtilis* JH651 (*pheA1 spo0H81 trpC2*).

Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили по Гловеру [15]. При использовании *deg*-мутантов проводили трансформацию протопластов по методу Chang, Cohen [16].

Культивирование клеток *B. subtilis* проводили в колбах объемом 100 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1/7 на качалке с интенсивностью качания 200 об./мин. при 30°C. Для культивирования клеток *B. subtilis* использовали среду LB [15]. Посевным материалом служила 18-часовая культура (1% объем/объем). Прирост биомассы измеряли нефелометрически.

Определение протеолитической активности проводили по методу, описанному ранее [17]. В качестве субстрата использовали синтетический хромогенный субстрат Z-Ala-Ala-Leu-pNA. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 нМ субстрата за 1 мин. Продуктивность культуры в отношении синтеза протеиназы (удельная активность) определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к величине биомассы и выражали в условных единицах (у.е.).

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ SPSS 12.0. Рассчитывали среднеквадратичное отклонение (σ), результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.5$ за достоверный уровень значимости.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Анализ нуклеотидной последовательности. Плаزمида pCS9 была сконструирована путем лигирования геномной библиотеки штамма *B. intermedius* 3-19, полученной рестрикцией по *Sau* I всей хромосомы бактерии, и шатлл-вектора pCB22, рестрицированного по сайту *Bam*H I [14]. Было проведено картирование полученной вставки, рестрикционная карта участка хромосомы *B. intermedius* 3-19 представлена на рис. 1.

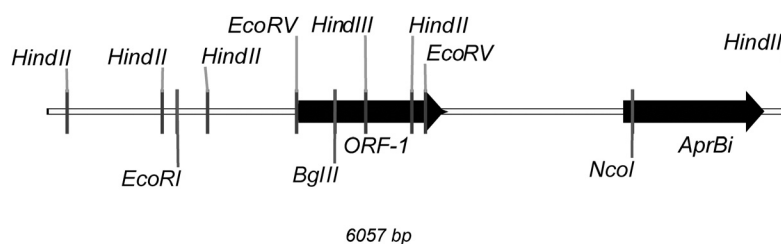


Рис. 1. Рестрикционная карта участка хромосомы *B. intermedius* 3-19

В 6,06-kb вставке участка хромосомы *B. intermedius* с помощью программы ORF Finder были идентифицированы две открытые рамки считывания, одна из которых кодирует сериновую протеиназу. Гомологии к второй ОРС, обозначенной как ORF-1, в Банке Генов найдено не было. В анализируемом участке ДНК отсутствует четко выраженная последовательность Shine-Delgarno (сайт связывания с рибосомой – RBS). Проведенный программный анализ последовательности позволил выявить три потенциальных сайта инициации синтеза белка (рис. 2).

Для установления сайта инициации трансляции был использован алгоритм SignalP [13], основанный на статистическом анализе последовательности, следующей после предполагаемого иницирующего кодона. Эта последовательность должна с максимальной вероятностью функционировать как сигнальный пептид. Результаты анализа представлены в табл. 1.

AAAGGAGG

TAAGAAAAAG GGATGTGG TTG TGC GTG AAAAAAGAAAAATGTG ATG ACAAGTT

Рис. 2. Сайт инициации трансляции. Предполагаемые старт-кодоны, идентифицированные с помощью программы ORF Finder, выделены курсивом и взяты в рамочку. Предполагаемая последовательность Shine-Delgarno взята в рамочку. Консенсусная последовательность сайта связывания рибосомы (RBS) указана сверху [18]; жирными указаны совпадающие нуклеотиды

Табл. 1

Вероятности функционирования сигнальных пептидов при синтезе полипептида с различных иницирующих кодонов

Потенциальные старт-кодоны	Предсказанная вероятность сигнального пептида, синтезируемого с потенциального старт-кодона
TTG	0.998
GTG	0.964
ATG	0.007

Результаты анализа показали, что с максимальной вероятностью функционально активному сигнальному пептиду будут соответствовать последовательности, синтез которых начинается с TTG или GTG кодонов. Однако в первом случае не выявляется подходящая область для последовательности Shine-Delgarno (AAAGGAGG), которая должна располагаться на расстоянии 7–9 нуклеотидов от старт кодона [18]. На основании этих результатов было сделано предположение, что иницирующим является кодон GTG.

gaatggaaggtccttgattacaacgtggtcagccatttactccatcctcccctttt
taaagaa cctgttattgtaacagggtntntttttnaa tgccaaa accaaaaaataata
 ttttttta tatcgaa attcgaaatagatgctagacgtttctac ctatttttaaggct
 tttcgggt tatcgaa tatttgtccgaaaatggatcataagaaaaaaagcacacttcc
 ttttta atagataac cgctgaa acagcagaacaacaacatattttcccaacgtttcca
 agt gactta attccccaat tttcgctaggactttcacaaaaattcgggtctactct
 tatt gcctac ttcccttaaac gaata tacagaataatc aaacgaat cattctta
taga ctacgaat gattattctgaaataagaaaaaagggatgtggattgtgcgtgaa
aaagaaaaatgtgatg

Рис. 3. Промоторная область гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*. Сайты связывания с регуляторными белками Spo0A (взяты в рамку) и DegU (весь сайт связывания подчеркнут, канонические последовательности выделены курсивом). Иницирующий кодон выделен курсивом и подчеркнут

В промоторной области гена *aprBi* нами идентифицированы потенциальные участки для специфического взаимодействия с регуляторными белками DegU (AGAA N₁₁₋₁₃ TTCAG) и Spo0A (TGNCGAA) с гомологией 70–80% (рис. 3). Эти участки расположены в виде прямых tandemных повторов на про-

тяжении 460 п.о. Выявленной нами характерной особенностью регуляторной области поздних генов субтилизиноподобных протеиназ является тот факт, что Spo0A-боксы располагаются близко или частично перекрываются с последовательностями для связывания с белком DegU.

Был проведен анализ промоторов генов субтилизиноподобных протеиназ различных видов бацилл (*B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. sp.*, *B. licheniformis*) на наличие в них Spo0A и DegU боксов (рис. 4).

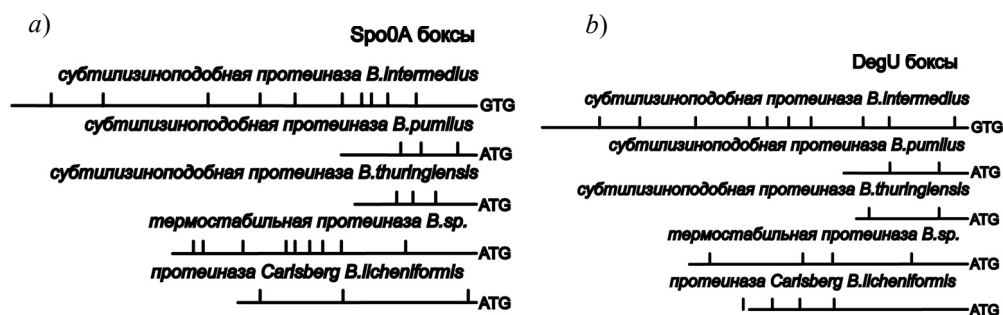


Рис. 4. Схематическое расположение сайтов связывания с регуляторными белками протеиназ различных представителей рода *Bacillus*

Установлено, что во всех вариантах присутствуют прямые тандемные повторы, состоящие из нескольких потенциальных Spo0A- и DegU- боксов на расстоянии до 150 нуклеотидов от точки начала трансляции. Во всех проанализированных последовательностях промоторов Spo0A- и DegU- сайты связывания перекрываются друг с другом.

По-видимому, эти две регуляторные системы не могут одновременно оказывать влияние на транскрипцию генов протеиназ. Эти системы сигнальной трансдукции участвуют в регуляции экспрессии генов бациллярных внеклеточных протеиназ на различных этапах клеточного цикла. Мы предполагаем, что они активируются, возможно, при участии различных сигма-факторов транскрипции. Так, известно, что транскрипция генов, кодирующих ферменты деградации, в частности леваназы, происходит при участии сигма L фактора [19]. Экспрессия же поздних генов, находящихся под контролем Spo- системы, происходит с участием спороспецифичных сигма H и сигма E факторов [19].

Присутствие в промоторе тандемных повторов из сайтов связывания с одним и тем же регуляторным белком, по всей видимости, обеспечивает большую частоту инициации транскрипции в условиях активации соответствующих систем сигнальной трансдукции.

Сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов промоторной области показал 91-процентную гомологию у генов субтилизиноподобных протеиназ *B. intermedius* и *B. pumilus* на протяжении 200 п.о. от предполагаемого сайта инициации трансляции, в отличие от гена субтилизина *B. subtilis*, в области регуляции которого выявлен только небольшой участок длиной 85 п.о. с 61-процентной гомологией с геном *aprBi* (рис. 5).

Этот участок, в частности, включает регуляторный сайт для взаимодействия со спороспецифичным сигма E фактором транскрипции. Этот факт может

```

B. pumilus
B. intermedius
B. subtilis      GCGGCCGCATCTGATGTCTTTGCTTGGCGAATGTTTCATCTTATTTCTTCCTCC

B. pumilus
B. intermedius   GGAAGGTCCTTGATTACAACGTGGTCAGCCATTTACTCCATCCTCCCCTTTTTAAAGAAC
B. subtilis      CTCTCAATAAATTTTTCATTCTATCCCTTTTCTGTAAAGTTTATTTTTTCAGAATACTTTT

B. pumilus
B. intermedius   CTGTTATTGTAACAGGTTNTTTTTNAATGCCAAAACCAAAAAATAATATTTTTTATATC
B. subtilis      ATCATCATGCTTTGAAAAAATATCACGATAATATCCATTGTTCTCAGGAAGCACACGCA

B. pumilus
B. intermedius   GAAATTCGAAATAGATGCTAGACGTTTCTACCTATTTTAAAGGCTTTTCGGGTATCGAATA
B. subtilis      GGTCAATTGAAACGAATTTTTCGACAGGAATTTGCCGGACTCAGGAGCATTTAACCTAA

B. pumilus
B. intermedius   TTTGTCCGAAAATGGATCATAAGAAAAAAGCACACTTCCTTTTTAATAGATAACCGCTG
B. subtilis      AAAAGCATGACATTTACGATATGAAACATTTACTCATGTCTATTTTCGTTCTTTCTGT

B. pumilus
B. intermedius   AAACAGCAGAACAACATATTTCCCAACGTTTCCAAGTGACTTAATTCCTCAATTTT--
B. subtilis      ATGAAAATAGTTATTTTCGAGTCTCTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACCTAAATAG--

B. pumilus
B. intermedius   CGCTAGGACTTCCACAAAAATTCGGGTCTTACTCTTATTTGCCTATCTCTATTAACCTGA
B. subtilis      CGCTAGGACTTTCACAAAAATTCGGGTCT-ACTCTTATTTGCCTACTTCCCTTAAACTGA
AGATAAAATCATCTCAAAAAAATGGGTCT-ACTAAAATATATCCATCTATTTACAATAA

B. pumilus
B. intermedius   AAATACAGAATAATCAAACGGATCATTTCTAATAGACTACGGATGATTATTTCTGAAATAAG
B. subtilis      ATATACAGAATAATCAAACGAATCATTTCTTATAGACTACGAATGATTATTTCTGAAATAAG
ATTACACAGAATAGTCATAGTCTTTTAAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTAAAGGAGAG

B. pumilus
B. intermedius   AAAAA-GGGATGTGGAATGTGCGTGAAAAAGAAAAATGTGATGACAAGTGTTTTATTGGC
B. subtilis      AAAAAAGGGATGTGGATTGTGCGTGAAAAAGAAAAATGTGATGACAAGTGTTTTATTGGC
GTTAAAGAGTGAGAAGCAAAAAATGTGGATCAGCTTGTGTGTTGCGTTAACGTTAATCT

```

Рис. 5. Выравнивание гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* относительно таковых *B. pumilus* и *B. subtilis*. Иницирующие кодоны выделены курсивом

свидетельствовать о сохранении экспрессии генов субтилиз в период споруляции. Наряду с этим, в промоторной области гена субтилизина *B. subtilis* идентифицированы последовательности с высокой гомологией для сайтов связывания с сигма А фактором транскрипции, которые не были обнаружены в промоторной области гена *aprVi*. Различия в строении регуляторной области поздних генов, кодирующих гомологичные по структуре и выполняемым функциям белки, могут свидетельствовать о разнообразии механизмов регуляции их экспрессии в зависимости от сигналов внешней среды.

2.2. Роль двухкомпонентной системы DegS-DegU в регуляции биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*. Система DegS/DegU отвечает за регуляцию синтеза ферментов деградации и активируется в период постэкспоненциального роста бактерий [20]. Наличие в промоторе гена потен-

циальных сайтов связывания с белком DegU позволило нам предположить участие этой системы в регуляции экспрессии гена *aprBi*. Известно, что эта регуляторная система активируется в ответ на условия солевого стресса, а именно при повышенной концентрации в среде цитрата натрия и калия. Уровень синтеза белков, экспрессия генов которых контролируется DegS/DegU-системой, повышается в стрессовых условиях в несколько раз [20]. По нашим данным в среде, содержащей 0.25 М цитрата натрия, биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* с плазмидой pCS9 возрастает в 25 раз на 40-й час роста (рис. 6).

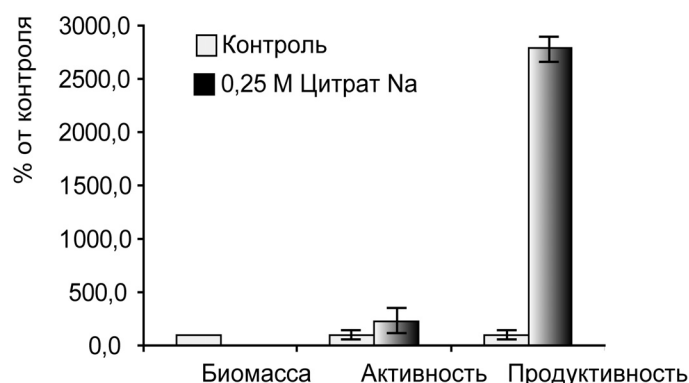


Рис. 6. Влияние высоких концентраций солей в среде культивирования на биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 pCS9. Контролем служила среда LB без внесения цитрата натрия (100%)

Полученные результаты позволяют предположить, что регуляторная система DegS/DegU участвует в регуляции экспрессии гена *aprBi*.

В мутантах *B. subtilis* 8G5ΔDegSΔDegU с делецией по регуляторным белкам DegS и DegU, трансформированных плазмидой pCS9 с геном *aprBi*, наблюдается снижение продуктивности протеолитической активности на 30% (рис. 7).

Экспрессию клонированного гена изучали также в мутантном штамме *B. subtilis* 8G5 DegU32 (Hy), который характеризуется повышенной продукцией фосфорилированной формы регуляторного белка DegU. Это приводит к гиперпродукции тех белков, в регуляции активности генов которых участвует система DegS/DegU [3]. После трансформации этого штамма плазмидой pCS9 с геном *aprBi* его продуктивность в отношении протеиназы резко возрастает по сравнению с контролем (рис. 8).

Полученные данные свидетельствуют в пользу позитивной регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* со стороны двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS/DegU.

2.3. Роль Spo0-системы фосфопереноса в регуляции биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*. Плазмидой pCS9, несущей полный ген *aprBi*, были трансформированы штаммы *B. subtilis*, мутантные по белкам Spo0, участвующим в инициации спорообразования. Ключевыми белками-регуляторами в этом процессе являются белки Spo0A и Spo0H, представляющие

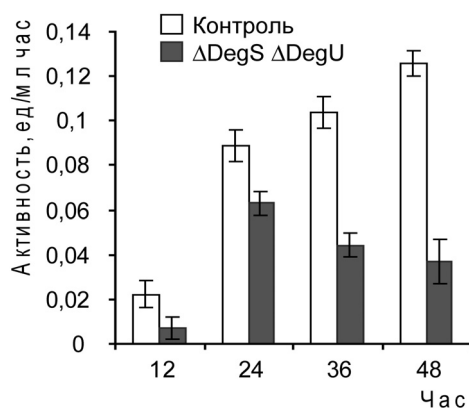


Рис. 7. Экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* 8G5ΔDegSΔDegU с делецией по регуляторным белкам DegS и DegU

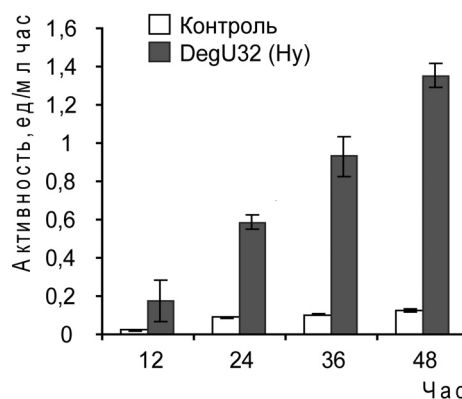


Рис. 8. Влияние мутации DegU32 (Hy) на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis*

собой ДНК-связывающий регулятор транскрипции и спороспецифичный сигма-фактор транскрипции соответственно. Результаты экспериментов показали, что экспрессия гена *aprBi* практически полностью подавляется в штаммах, мутантных по Spo0A-белку: в штаммах с инактивированным Spo0A белком, ген которого поврежден точечными мутациями (Spo0A9 [21]), уровень активности субтилизина составляет менее 8% от контроля (рис. 9).

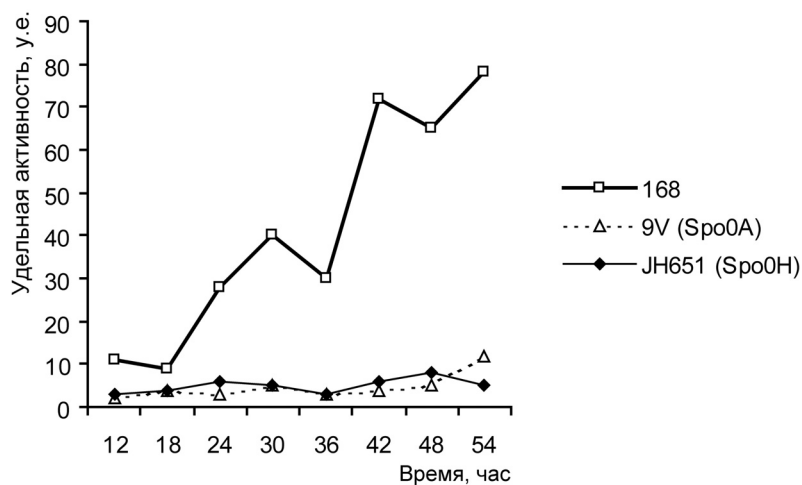


Рис. 9. Экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* в штаммах *B. subtilis*, мутантных по компонентам Spo-системы фосфопердачи. В качестве контроля были взяты штамм *B. subtilis* 168

Протеолитическая активность в штаммах, дефектных по гену *spo0H*, также резко снижалась (рис. 9). Однако данные о подавлении продукции субтилизина в штаммах, мутантных по сигма Н фактору транскрипции, неоднозначны. Они свидетельствуют о влиянии такой мутации на экспрессию гена *aprBi*, и в то же время отсутствие протеолитической активности у этих штаммов может быть следствием

низкого уровня экспрессии Spo0A-белка, транскрипция которого зависит от сигма Н фактора. Таким образом, наши результаты подтверждают наличие позитивной регуляции экспрессии гена *aprBi* со стороны Spo0A-регулятора транскрипции.

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о множественной регуляции экспрессии поздних генов бацилл на примере субтилизиноподобных протеиназ. Проведенные исследования показали, что для установления регуляторных механизмов, участвующих в контроле активности генов, целесообразно проводить теоретические исследования промоторной области гена для идентификации возможных регуляторных элементов. Анализ нуклеотидной последовательности позволяет выявить и экспериментально установить системы регуляции, участвующие в контроле экспрессии исследуемых генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 05-04-48182), Санкт-Петербургского университета (проект № А04-2.12-783), Фонда НИОКР Республики Татарстан (проект № 03-3.10-295/2004(Ф)).

Summary

A.R. Kayumov, M.R. Sharipova. The mechanisms of regulation of bacterial subtilases synthesis.

The analysis of regulatory sequence of *aprBi* gene coding extracellular subtilisin-like protease from *Bacillus intermedius* using GenBank database and BLAST algorithm was performed. Nucleotide sequence of regulatory region of the gene shares 91% of identity with that of *Bacillus pumilus* subtilisin gene. The study of promoters of subtilisin-like proteases from other *Bacillus* species was performed. Analysis of promoter region of the gene for *B. intermedius* subtilisin-like protease revealed the presence of a tentative target sequence for binding with DegU and Spo0A proteins. It was shown that expression of *B. intermedius* subtilisin-like protease gene is under the positive control of the DegS-DegU and Spo0A phosphorelay signal transduction systems.

Литература

1. Stock J.B., Ninfa A.J., Stock A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria // *Microbiol. Rev.* – 1989. – V. 53. – P.450–490.
2. Parkinson J.S., Kofoed E.C. Communication modules in bacterial signaling proteins // *Annu. Rev. Genet.* – 1992. – V. 26. – P. 71–112.
3. Msadek T., Kunst F., Henner D., Klier A., Rapoport G., Dedonder R. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU* // *J. Bacteriol.* – 1990. – V. 172. – P. 824–834.
4. Msadek T., Kunst F., Rapoport G. Two-component regulatory systems / In: A.L. Bloch, J.A. Losick. *R. Bacillus subtilis* and other Grampositive bacteria // *Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics.* – Sonenshein, Washington, DC: American society for Microbiology Press. –1993. – P. 729–745.
5. Kunst F., Msadek T., Bignon J., Rapoport G. The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis* // *Res. Microbiol.* – 1994. – V. 145, No 5–6. – P. 393–402.

6. *Hulett F.M.* The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* – 1996. – V. 19, No 5. – P. 933–939.
7. *Errington J.* *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis // *Microbiological Rev.* – 1993. – V. 57, No 1. – P. 1–33.
8. *Sharipova M.R., Balaban N.P., Kayumov A.R., Kirillova Y.M., Gabdrakhmanova L.A., Mardanova A.M., Leshchinskaya I.B., Rudenskaya G.N. Akimkina T., Safina D., Demidjuk I.V., Kostrov S.V.* // *J. of Appl. Microbiol.* – 2005. – In press.
9. *Balaban N.P., Sharipova M.R., Itskovich E.L., Leshchinskaya I.B., Rudenskaya G.N.* Secreted serine protease from the spore-forming bacterium *Bacillus intermedius* 3-19 // *Biochemistry (Moscow)*. – 1994. – V. 59, No 9. – P. 1033–1038.
10. *Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Соколова Е.А., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б.* Очистка и характеристика сериновой протеиназы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 // *Биохимия*. – 2004. – Т. 69. – С. 519–526.
11. *Akimkina T.V., Nosovskaya E.A., Kostrov S.V.* Cloning and gene expression of *Bacillus cereus* neutral proteinase in *Bacillus subtilis* cells // *Molek. Biol. (Mol. Biol. Moscow)*. – 1992. – V. 26. – P. 418–423.
12. *Altschul S.F., Madden T.L., Schaumluffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucl. Acids Res.* – 1997. – V. 25. – P. 3389–3402.
13. *Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. // *Mol. Biol.* – 2004. – V. 340. – P. 783–795.
14. *Костров С.В., Демидюк И.В.* Неопубликованные данные.
15. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. *Chang S., Cohen S.N.* High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA // *Mol. Gen. Genet.* – 1979. – V. 168. – P. 111–115.
17. *Itskovitch E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Shakirov E.V., Sharipova M.R., Leshchinskaya I.B., Ksenofontov A.L., Rudenskaya G.N.* Enzymatic properties of thiol-dependent serine proteinase of *Bacillus intermedius* // *Biochemistry (Moscow)*. – 1997. – V. 62. – P. 60–65.
18. *Rocha E.P., Danchin A., Viari A.* Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 1; 27(17). – P. 3567–3576.
19. *Wosten M.M.* Eubacterial sigma-factors // *FEMS Microbiology Rev.* – 1998. – V. 22. – P. 127–150.
20. *Kunst F.G., Rapoport G.* Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis* // *J. of Bacteriol.* – 1995. – V. 177, No 9. – P. 2403–2407.
21. *Ionesco H., Michel J., Cami B., Schaeffer P.* Genetics of sporulation in *Bacillus subtilis* Marburg // *J. Appl. Bacteriol.* – 1970. – V. 33. – P. 13–24.

Поступила в редакцию
25.06.05

Каюмов Айрат Рашитович – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: airat_kayumov@rambler.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru