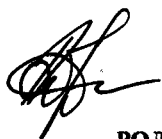


(ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ)

На правах рукописи

ГАБДРАХМАНОВА ЛЕЙЛА АСХАТОВНА



**РОЛЬ АДАПТАЦИОННЫХ СИСТЕМ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ  
И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В РЕГУЛЯЦИИ  
БИОСИНТЕЗА ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**

03.00.07 – микробиология

03.00.23 - биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Щелково – 2006

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина.

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
Ильинская Ольга Николаевна

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Воробьева Галина Ивановна

доктор биологических наук, профессор  
Мелентьев Александр Иванович

доктор ветеринарных наук, профессор  
Госманов Рауис Госманович

**Ведущая организация:** Центр «Биоинженерия» Российской  
академии наук, г. Москва

Защита диссертации состоится «24» ноября 2006 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 006.069.01 при Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте биологической промышленности РАСХН по адресу: 141142, г.Щелково, Московская область, пос. Биокомбинат, ВНИТИБП.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВНИТИБП РАСХН

Автореферат разослан «20» октября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Ю.Д.Фролов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Современная биотехнология включает целый ряд разнообразных, быстро развивающихся, социально ориентированных направлений исследований. При этом успехи биотехнологии во многом связаны с использованием ферментов и ферментативных систем, позволяющих оптимизировать традиционные производства путем замены химических подходов энзиматическими либо за счет повышения эффективности уже существующих ферментативных процессов. Актуальной проблемой биотехнологии является поиск простых и экономически выгодных подходов направленного влияния на уровень синтеза целевых белков. Выяснение роли адаптационных систем бактерий в регуляции синтеза ферментов может открыть перспективное направление в микробной биотехнологии, заключающееся в использовании новых аспектов теории стресса для оптимизации ферментативных производств. Однако в настоящее время молекулярные механизмы, контролируемые адаптационный потенциал микробной клетки, изучены недостаточно.

Бактерии обладают множеством регуляторных систем, позволяющих им быстро адаптироваться в неблагоприятных условиях и контролирующими широкий спектр процессов, протекающих в клетке, включая образование жгутиков [Aizawa et al., 2000], синтез внутри- и внеклеточных ферментов [Kunst, Rapoport, 1995; Volker, Hecker, 2005], формирование состояния компетентности [Hamoen et al., 2003], переход к спорообразованию [Sonenshein, 2000], вступление в стационарную фазу роста [Головлев, 1999], образование некультивируемых форм [Романова с соавт., 2002]. В основе формирования перечисленных адаптационных реакций лежит регуляция экспрессии соответствующих генов на различных уровнях, в частности, на уровне инициации транскрипции [Lloyd et al., 2001; Mooney et al., 2005]. Широко распространена у бактерий позитивная регуляция экспрессии генов с участием сенсорно-регуляторных систем: фосфатный регулон или DegS-DegU система представляют собой примеры глобального контроля за процессами в клетке в стрессовых условиях [Wanner, 1993; Pragai et al., 2004; Eguchi, Utsumi, 2005]. У части клеток в условиях стресса включается механизм, генерирующий множественные адаптивные мутации (SOS-ответ) [Janion, 2001; Foster, 2005].

Секретируемые гидролазы бактерий в последние годы вызывают все больший интерес как модельные объекты при исследовании отдельных регуляторных процессов и как перспективные для промышленного использования ферменты. Так как усиленный синтез гидролитических ферментов является одним из способов

адаптации бактерий к агрессивным условиям окружающей среды, установление молекулярных механизмов регуляции синтеза гидролаз может внести существенный вклад в выявление путей формирования ответа бактериальной клетки на стресс, а также позволит направленно влиять на уровень продукции этих ферментов.

Бактерии *Serratia marcescens* являются единственными представителями семейства *Enterobacteriaceae*, секретирующими в среду уникальные по свойствам гидролитические ферменты, включая хитиназы (КФ 3.2.1.14), и представляют собой адекватную систему для изучения механизмов регуляции синтеза хитинолитических ферментов. Циклизующие гуанилспецифичные рибонуклеазы (КФ 3.1.27) и глутамилэндопептидазы (3.4.21.19), продуцируемые различными видами бацилл, являются интересными моделями для исследования эволюционного развития ферментативной системы спорообразующих бактерий. Кроме того, хитиназы, РНКазы и глутамилэндопептидазы широко используются в биотехнологии, в молекулярной биологии, находят применение в медицине. Изучены физико-химические и каталитические свойства ферментов, установлены первичные структуры белков, клонированы и секвенированы соответствующие гены. Однако крайне мало работ посвящено изучению регуляции биосинтеза гидролаз, а накопленные данные, полученные традиционными физиолого-биохимическими методами исследования, часто противоречивы и недостаточно информативны. Все это определяет актуальность данной работы, посвященной исследованию конкретных молекулярных механизмов регуляции биосинтеза секретируемых гидролаз грамотрицательных и грамположительных бактерий в неблагоприятных условиях внешней среды.

**Целью данной работы** явилось установление механизмов регуляции биосинтеза ферментов гидролитического типа действия у *Serratia marcescens* и различных видов бацилл в условиях стресса.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие экспериментальные задачи:

1. Выяснение закономерностей биосинтеза хитиназ *S.marcescens*, РНКаз *B.intermedius*, *B.pumilus*, *B.amyloliquefaciens* и глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в процессе роста бактерий.
2. Характеристика качественного и количественного состава хитинолитического комплекса штамма *S.marcescens* Вu-211 АТСС 9986. Характеристика мутантного штамма *S.marcescens* с повышенной хитиназной активностью.

3. Исследование влияния индуктора SOS-функций клетки митомицина С (МС) и субстрата фермента – хитина на биосинтез белков с хитиназной активностью у *S.marcescens*.
4. Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов РНКаз *B.intermedius*, *B.pumilus*, *B.amyloliquefaciens* и глутамилэндопептидазы *B.intermedius* с целью обнаружения возможных консервативных участков для связывания с регуляторными белками.
5. Получение рекомбинантных штаммов *E.coli*, несущих плазмиды со структурными генами РНКаз *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.amyloliquefaciens* под собственными и гетерологичными регуляторными областями, а также рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, несущих полный ген глутамилэндопептидазы *B.intermedius*, для изучения экспрессии генов данных ферментов.
6. Выяснение механизмов регуляции биосинтеза РНКаз *B.intermedius*, *B.pumilus* и *B.amyloliquefaciens* в условиях недостатка и избытка неорганического фосфата и под воздействием специфического ингибитора транскрипции актиномицина Д (АД).
7. Исследование механизмов регуляции биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в условиях солевого и температурного стрессов.

**Научная новизна работы.** К началу настоящей работы данные по биосинтезу хитиназ *S.marcescens* и гуанилспецифичных РНКаз бацилл были ограничены изучением влияния факторов внешней среды, а для глутамилэндопептидазы *B.intermedius* публикации по исследованию биосинтеза фермента отсутствовали. В данной работе впервые исследования регуляторных механизмов биосинтеза перечисленных ферментов проведены на качественно новом уровне и систематизированы, установлены конкретные молекулярные механизмы регуляции биосинтеза хитиназ *S.marcescens*, а также РНКаз и глутамилэндопептидазы бацилл в условиях стресса.

Впервые изучен качественный и количественный состав хитинолитического комплекса штамма *S.marcescens* Vu-211 ATCC 9986 и мутантного штамма *S.marcescens* Д5 с конститутивным синтезом хитиназ. Получены приоритетные данные о том, что в условиях индукции системы SOS-ответа происходит координированная индукция белков, обладающих хитиназной активностью.

Впервые на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов, физиологических экспериментов и исследования экспрессии соответствующих

генов в рекомбинантных штаммах *E.coli* и *B.subtilis* показана регуляция синтеза РНКаз и глутамилэндопептидазы бацилл посредством сенсорно-регуляторных систем на уровне транскрипции. Установлено, что секретируемые РНКазы бацилл по типу регуляции биосинтеза можно разделить на две принципиально различные группы: синтез РНКаз *B.intermedius* и *B.pumilus* индуцируется посредством активации двухкомпонентной системы PhoP/PhoR; синтез РНКазы *B.amyloliquefaciens* не подвержен регуляторным воздействиям со стороны данной системы. Показано, что АД стимулирует синтез РНКаз, регулируемых по типу активации генов фосфатного регулона, и не оказывает видимого эффекта на синтез РНКазы *B.amyloliquefaciens*. Биосинтез глутамилэндопептидазы *B.intermedius* также подвержен регуляции со стороны сенсорно-регуляторной системы. В данном случае системой, контролирующей регуляцию процесса биосинтеза, является система трансдукции сигнала DegS/DegU, а внешним индуктором служат условия солевого стресса.

**Практическая значимость работы.** Выявленные в работе закономерности важны для общего понимания механизмов формирования ответа бактериальных клеток на стресс. Хитиназы, секретируемые *S.marcescens*, РНКазы и специфические протеиназы, секретируемые бациллами, могут найти применение в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, а также в аналитических технологиях и промышленности. В ходе исследования охарактеризован новый штамм *S.marcescens*, синтезирующий внеклеточные хитиназы в отсутствие индукторов. Разработана биотехнологическая схема для получения препарата хитиназы *S.marcescens* в промышленных условиях, отраженная в акте об испытании на ГУП Опытный завод АН РБ. Оптимизированы и заявлены к патентованию питательные среды, обеспечивающие высокую продукцию всех исследованных ферментов. Исследована экспрессия генов РНКаз и Glu,Asp-специфической протеиназы бацилл в рекомбинантных штаммах *E.coli* и *B.subtilis*, соответственно. Полученные рекомбинантные штаммы предложены как продуценты соответствующих ферментов. В каждом отдельном случае подобраны условия накопления гетерологичных ферментов в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов, что используется при получении белков в препаративных количествах для структурно-функциональных исследований в соответствии с актом о внедрении в Институте молекулярной генетики РАН.

### **Научные положения, выносимые на защиту:**

1. Все исследованные гидролазы являются ферментами второй фазы роста, и максимум их активности приходится на стационарную фазу роста культуры. Факторы среды, регулирующие биосинтез ферментов, индивидуальны для каждой группы гидролаз.
2. В присутствии индукторов штамм *S.marcescens* Вu-211 ATCC 9986 секретирует в среду четыре белка с хитиназной активностью с молекулярными массами 58, 52, 38 и 21 кДа. Мутантный штамм *S.marcescens* Д5 синтезирует хитиназы конститутивно и не нуждается в индукторах для продукции больших количеств ферментов.
3. В условиях активации системы SOS-ответа происходит координированная индукция биосинтеза всех четырех хитиназ *S.marcescens*.
4. Близкородственные гуанилспецифичные циклизующие РНКазы бацилл имеют принципиальные различия в регуляции их биосинтеза: экспрессия генов РНКаз *B.intermedius* и *B.pumilus* контролируется двухкомпонентной системой трансдукции сигнала PhoP/PhoR, тогда как регуляция экспрессии гена РНКазы *B.amyloliquefaciens* происходит по иному механизму.
5. Регуляция биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* осуществляется посредством сенсорно-регуляторной системы типа DegS/DegU системы *B.subtilis* в условиях солевого стресса. Регуляция биосинтеза фермента не зависит от активации  $\sigma^B$ -фактора, а также от функционирования специфических механизмов, индуцирующихся при холодовом и тепловом шоке.

**Связь работы с базовыми научными программами.** Исследования по теме диссертационной работы проводились в соответствии с программой НИР КГУ (№ гос.регистрации 01.2.00 104982; «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования автора как исполнителя данной тематики поддержаны грантами фонда «Университеты России – фундаментальные исследования» (№ 015.07.01.32), Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 01-04-48037, 04-04-49385, 05-04-48182), фонда НАТО (НТЕСНЛГ. 97337213), фонда Санкт-Петербургского университета (№ E00-6.0-15), фонда Российско-Американской Программы «Фундаментальные исследования и высшее образование» (№ REC-007), фонда НИОКР и Академии Наук РТ (№№ 04-02/99, 04-02/2000, 03-3.10-11, 03-3.10-295), фонда Else-Kroner, Fresenius Medical Care (2003-2004 гг.), Государственными контрактами № 02.434.11.3020

«Конструирование противоопухолевых препаратов селективного действия на основе микробных рибонуклеаз (2005-2006 гг.) и № 02.451.11.7019 «Центр коллективного пользования КГУ», Государственной программой «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП 2.1.1.1005.

**Место выполнения работы.** Экспериментальные данные получены автором за время работы на кафедре микробиологии Казанского государственного университета в период с 1991 по 2005 гг. Научные положения диссертации и выводы, вытекающие из анализа полученного экспериментального материала, базируются на результатах собственных исследований автора.

Исследования были начаты в НИЛ биосинтеза и бионженерии ферментов кафедры микробиологии КГУ под руководством к.б.н. Л.В.Знаменской и д.б.н., проф. И.Б.Лещинской. Изучение экспрессии гетерологичных генов РНКаз бактерий в рекомбинантных штаммах *E.coli* частично проводили в лаборатории проф. А. Ди Донато (кафедра биохимии Университета г. Неаполь, Италия). Работа по исследованию хитиноподобного комплекса *S.marcescens* выполнена в лаборатории к.б.н. Д.В.Юсуповой при участии к.б.н. Порфирьевой, к.б.н. Е.В.Петуховой и Р.Б.Соколовой (НИЛ ББФ, КГУ). Исследования экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* в клетках *B.subtilis* частично были выполнены в лаборатории д.х.н. С.В.Кострова (Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва). Работа по изучению биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius* проходила в сотрудничестве с к.х.н. Н.П.Балабан, к.б.н. А.М.Мардановой и д.б.н. М.Р.Шариповой (НИЛ ББФ, КГУ).

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность проф. Р.Хартли и доктору Е.Б.Чернокальской (Национальные Институты Здоровья, США), проф. М.Дебарбюлье (Институт Пастера, Франция), проф. С.В.Кострову (ИМГ РАН, г.Москва), проф. Й.Йомантасу (ГНИИ Генетика, г.Москва) за любезно предоставленные для работы штаммы и плазмиды, а также сердечно благодарит всех коллег, в сотрудничестве с которыми выполнена работа.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы были представлены на III, IV, V Международных симпозиумах по РНКазам (Капри, 1993; Гронинген, 1996; Уоррентон, 1999), VI конференции «Новые направления биотехнологии» (Пушино, 1994), Международных симпозиумах по биотехнологии (Брайтон, 1994; Мельбурн, 1995), Международной конференции «Молекулярная биология на рубеже XXI века» (Москва, 1995), VIII Европейском конгрессе по биотехнологии (Будапешт, 1997), VII Всемирной конференции по промышленному



использованию ферментов (Барселона, 1997), Международной конференции «Экологические эффекты микробиологических воздействий» (Вильнюс, 1997), V, VI и VIII Международных конференциях «Новые перспективы в исследованиях хитина и хитозана» (Щелково, 1999, 2001; Казань, 2006), V Симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2002), III съезде Биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), I Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002), Всероссийской конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2004), XI, XII и XIII Всероссийских конференциях «Ферменты микроорганизмов» (Казань, 1998, 2001, 2005), Всероссийской конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2005).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 70 печатных работ, из них 30 статей в центральных отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 316 страницах и содержит 15 таблиц и 45 рисунков. Работа оформлена по стандартному плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы, список цитируемой литературы (629 наименований), приложения.

- стресса. Промоторная область гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* содержит консервативную последовательность нуклеотидов, необходимую для связывания с белком-регулятором клеточного ответа DegU.
6. Механизмы, связанные с активацией альтернативного  $\sigma^B$ -фактора, а также специфические механизмы, индуцирующиеся при холодовом и тепловом стрессах, не вовлечены в регуляцию биосинтеза глутамилэндопептидазы *B.intermedius*.
  7. В условиях стресса биосинтез ферментов, использованных в качестве модельных объектов, индуцируется посредством активации различных адаптационных систем: SOS-системы клетки либо двухкомпонентных систем сигнальной трансдукции.

### Основные работы, опубликованные по теме диссертации

#### Статьи в рецензируемых журналах

1. Знаменская Л.В. Регуляция биосинтеза внеклеточных рибонуклеаз в исходных бактериальных и рекомбинантных штаммах *Escherichia coli* / Л.В. Знаменская, Л.А. Габдрахманова, Е.Б. Чернокальская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 1995. – Т.64, №5. – С. 616-622.
2. Znamenskaya L.V. Phosphate regulation of biosynthesis of extracellular RNases of endospore-forming bacteria / L.V. Znamenskaya, L.A. Gabdrakhmanova, E.V. Chernokalskaya, I.B. Leshchinskaya, R.W. Hartley // FEBS Letters. - 1995. - V.357 - P.16-18.
3. Габдрахманова Л.А. Влияние компонентов питательных сред на накопление внеклеточных бактериальных рибонуклеаз в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* / Л.А. Габдрахманова, Л.В. Знаменская, С.И. Краснов, Е.Б. Чернокальская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 1996. – Т.65, №5. – С.599-606.
4. Порфирьева О.В. Хитиноподобный комплекс *Serratia marcescens* и особенности его биосинтеза / О.В. Порфирьева, Д.В. Юсупова, Н.Л. Зоткина, Р.Б. Соколова, Л.А. Габдрахманова // Микробиология. - 1997. - Т. 66, № 3. - С.347-353.
5. Юсупова Д.В. Физиолого-биохимическая характеристика штамма *Serratia marcescens* с повышенной хитиназной активностью / Д.В. Юсупова, О.В. Порфирьева, Р.Б. Соколова, А.З. Пономарева, Л.А. Габдрахманова // Биотехнология. - 1997. - № 2. - С.3-9.

6. Габдрахманова Л.А. Влияние актиномицина Д на биосинтез внеклеточных рибонуклеаз спорообразующих бактерий / Л.А. Габдрахманова, Л.В. Знаменская, И.Б. Лещинская // Антибиотики и химиотерапия. - 1997. - Т.42, № 11. - С.15-21.
7. Gabdrakhmanova L.A. Biosynthesis of endochitinase of *Serratia marcescens* / L.A. Gabdrakhmanova, E.V. Petukhova, R.B. Sokolova, D.V. Yusupova // Microbios. - 1998. - V.96. - P.157-163.
8. Gabdrakhmanova L.A. Biosynthesis and localization of glutamylendopeptidase of *Bacillus intermedius* 3-19 / L.A. Gabdrakhmanova, E.V. Shakirov, N.P. Balaban, M.R. Sharipova, I.B. Leshchinskaya, G.N. Rudenskaya // Microbios. - 1999. - V.100. - P.97-108.
9. Шакиров Е.В. Влияние компонентов питательной среды на накопление глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости *Bacillus intermedius* 3-19 / Е.В. Шакиров, Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2000. – Т.69, №1. – С.29-33.
10. Шарипова М.Р. Локализация протеолитических ферментов в клетках *Bacillus intermedius* / М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2000. – Т.69, №5. – С.660-667.
11. Габдрахманова Л.А. Среда для биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Л.А. Габдрахманова, Е.В. Шакиров, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Г.Н. Руденская, С.В. Костров, Т.В. Акимкина, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2000. – Т.69, №5. - С.653-659.
12. Sharipova M.R. Factors influencing the cellular location of proteolytic enzymes of *Bacillus intermedius* / M.R. Sharipova, E.V. Shakirov, L.A. Gabdrakhmanova, N.P. Balaban, N.V. Kalacheva, G.N. Rudenskaya, I.B. Leshchinskaya // Med. Sci. Monitor. - 2000. – V.6, №1. – P.8-12.
13. Ilyina A.V. Chitinolytic complex of *Serratia marcescens* as the tool in obtaining of low-molecular-weight water-soluble chitosan / A.V. Ilyina, V.P. Varlamov, L.A. Gabdrakhmanova, D.V. Yusupova // In: «Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives» (Ed. By Henryk Struszczyk), V. VII, Lodz, Poland. – 2001. – P.57-63.
14. Балабан Н.П. Протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемые в поздней стационарной фазе роста / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Ю.С. Токмакова, Е.А. Соколова, И.Б. Лещинская // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского, серия Биология. – Вып. 1 (3). – 2001. – С.45-50.

15. Габдрахманова Л.А. Оптимизация среды культивирования для продукции глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* 3-19 / Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Ю.В. Токмакова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2002. – Т.71, №3. – С.323-329.
16. Balaban N.P. Proteinases from *Bacillus intermedius* secreted in the late stages of sporulation / N.P. Balaban, L.A. Gabdrakhmanova, M.R. Sharipova, A.M. Mardanova, E.A. Sokolova, G.N. Rudenskaya, I.B. Leshchinskaya // Med. Sci. Monitor. - 2002. - V.8, N 5. – P.168-171.
17. Юсупова Д.В. Динамика накопления белков с хитиназной активностью в культуральной жидкости мутантного штамма и исходного штамма *Serratia marcescens* в присутствии митомицина С / Д.В. Юсупова, Е.В. Петухова, Р.Б. Соколова, Л.А. Габдрахманова // Микробиология. – 2002. – Т.71, №5. – С.635-638.
18. Gabdrakhmanova L.A. Optimization of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase production by recombinant strain of *Bacillus subtilis* and localization of glutamyl endopeptidase in *Bacillus subtilis* cells / L.A. Gabdrakhmanova, N.P. Balaban, M.R. Sharipova, S.V. Kostrov, T.V. Akimkina, G.N. Rudenskaya, I.B. Leshchinskaya // Enzyme Microb. Technol. – 2002. – V.31. – P.256-263.
19. Шарипова М.Р. Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, Ю.М. Кадырова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2002. – Т.71, №4. – С.494-499.
20. Балабан Н.П. Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* на поздних стадиях спорообразования / Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, А.М. Марданова, Ю.С. Токмакова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2003. – Т.72, №3. – С.338-342.
21. Шарипова М.Р. Мембрано-связанные 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.
22. Балабан Н.П. Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, А.В. Гарусов, Е.И. Мильготина, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Биохимия. – 2003. – Т.68, №11. – С. 1514-1521.
23. Габдрахманова Л.А. Гидролитические ферменты спорообразующих бактерий и их физиологические функции: механизмы корегуляции синтеза и секреции ключевых гидролитических ферментов спорообразующих бактерий и процесса спорообразования / Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, В.И. Вершинина,

- И.Е. Вишняков // Отчеты Академии Наук Республики Татарстан. – Казань.: Фэн. – 2003. - С. 228-229.
24. Балабан Н.П. Выделение и характеристика сериновой протеиназы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Биохимия. – 2004. – Т.69, № 4. – С. 519-526.
25. Balaban N. Selection of cultivation medium for production of late stationary phase serine proteinases from *Bacillus intermedius* / N. Balaban, L. Gabdrakhmanova, M. Sharipova, E. Sokolova, L. Malikova, A. Mardanova, G. Rudenskaya, I. Leshchinskaya // J. Basic Microbiol. – 2004. – V.44, № 6. – P. 415-423.
26. 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.
27. Частухина И.Б. Особенности биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными клетками *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. – 2005. – Т.74, № 1. – С. 39-47.
28. Gabdrakhmanova L. Salt stress induction of glutamyl endopeptidase biosynthesis in *Bacillus intermedius* / L. Gabdrakhmanova, I. Vishniakov, M. Sharipova, N. Balaban, S. Kostrov, I. Leshchinskaya // Microbiol. Res. – 2005. - V.160, No 3. – P. 233-242.
29. Габдрахманова Л.А. Влияние экзогенных факторов на продукцию глутамилэндопептидазы штаммом *Bacillus intermedius* 7P / Л.А. Габдрахманова // Вестник ТО РЭА. – 2005. – Т. 4, № 26. – 50-55.
30. Gabdrakhmanova L.A. Biosynthesis of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius*, strain 7P / L.A. Gabdrakhmanova // J. Microbiol. Immunol. Inf. – 2006. – in press.

### Патенты

1. Габдрахманова Л.А. Способ получения РНКазы *Bacillus intermedius* (биназы) с использованием рекомбинантного штамма *Escherichia coli* SURE pML 163 / Л.А.Габдрахманова, О.Н.Ильинская // Заявка на патент рег. № 2006125926.
2. Габдрахманова Л.А. Способ получения РНКазы *Bacillus amyloliquefaciens* (барназы) с использованием рекомбинантного штамма *Escherichia coli* SURE pML 416 / Л.А.Габдрахманова, О.Н.Ильинская // Заявка на патент рег. № 2006125924.

### *Статьи в материалах конференций*

1. Leshchinskaya I. Molecular cloning of RNases from *Bacilli* / I. Leshchinskaya, L. Znamenskaya, L. Gabdrakhmanova, E. Chernokalskaya // Proceedings of The II UK Congress of Biotechnology. - Brighton, UK, 1994. - P.28-30.
2. Yusupova D.V. Chitinase of mutant strains of *S.marcescens*: obtaining, purification, biological activity / D.V. Yusupova, O.V. Porfirieva, R.B. Sokolova, L.A. Gabdrakhmanova // Proceedings of the conference «Ecological effects of microorganism action». - Vilnius, Lithuania, 1997. - P.158-161.
3. Шакиров Е.В. Глутамилэндопептидаза *Bacillus intermedius*. Биосинтез и выделение / Е.В. Шакиров, Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Р.К. Хуззятова, А.В. Гарусов, И.Б. Лещинская, Г.Н. Руденская // Материалы XI Всероссийской конференции «Ферменты микроорганизмов». – Казань, 1998.- С.70-79.
4. Петухова Е.В. Внеклеточные хитиназы *Serratia marcescens* и особенности их синтеза / Е.В. Петухова, Л.А. Габдрахманова, Р.Б. Соколова, Д.Р. Сафина, Д.В. Юсупова // Материалы конференции “Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана”. - Щелково, 1999. - С.276-278.
5. Юсупова Д.В. Накопление белков с хитиназной активностью в культуральной жидкости энтеробактерий *Serratia marcescens* в процессе роста / Д.В. Юсупова, Д.В. Герасименко, Е.В. Петухова, Р.Б. Соколова, Л.А. Габдрахманова // Материалы VI конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана». – Щелково, 2001. – С. 365-368.
6. Габдрахманова Л.А. Биосинтез глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в условиях стресса / Л.А. Габдрахманова // Материалы XIII Международной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». – Казань, 2005. – С.19-20.
7. Юсупова Д.В. Индукция биосинтеза ферментов хитинолитического комплекса *Serratia marcescens* в условиях стресса / Д.В. Юсупова, Л.А. Габдрахманова, О.Н. Ильинская // Материалы XIII Международной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». - Казань, 2005. – С.102-103.
8. Габдрахманова Л.А. Регуляция биосинтеза хитиназ *Serratia marcescens* в условиях стресса / Л.А. Габдрахманова // Материалы VIII Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». – Казань, 2006. – С. 281-285.

*Автор посвящает свою работу любимому Учителю, вложившему свою душу и свой талант в создание и развитие Казанской школы микробиологов, Инне Борисовне Лещинской.*

Подписано в печать 02.10.2006.  
Форм. 60 x 84 1/16. Печать ризографическая.  
Печ.л. 3,25. Тираж 150. Заказ 379.

Лаборатория оперативной полиграфии УМУ КГУ  
420045, Казань, Кр.Позиция, 2а  
Тел. 272-22-54